

ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z ENZYMOLOGII I CHEMII BIAŁEK DLA STUDENTÓW III ROKU BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ I st.

Ćwiczenie 4. WYZNACZANIE STAŁEJ MICHAELISA DLA REAKCJI KATALIZOWANEJ ENZYMATYCZNIE W OBECNOŚCI I BEZ INHIBITORA

Teoretyczne przygotowanie do zajęć laboratoryjnych według poniższych zagadnień umożliwia podręcznik: **SKRYPT DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII** pod redakcją prof. Ludmiły Węglarz.

Część teoretyczna: rozdział 4 – ENZYMY.

Zasady oznaczeń: część doświadczalna – **Ćwiczenie 3 z rozdziału 4.**

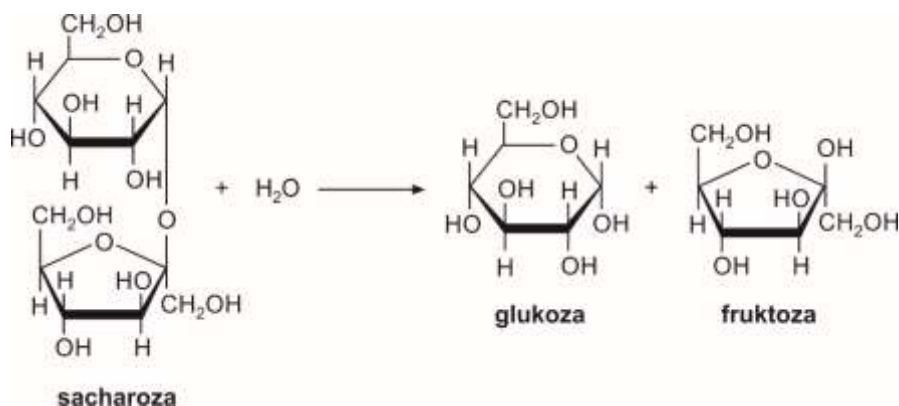
Zagadnienia:

1. Wpływ stężenia enzymu, substratu, zmian pH i temperatury na szybkość reakcji enzymatycznej.
2. Równanie Michaelisa-Menten i jego przekształcenie (wykres podwójnych odwrotności Lineweavera-Burka).
3. Wpływ inhibitorów na szybkość reakcji enzymatycznej – inhibicja kompetycyjna, niekompetycyjna, przykłady inhibitorów, wpływ inhibitorów na K_M i V_{max} , odwracalność inhibicji przez nadmiar substratu.
4. Chemizm reakcji hydrolizy sacharozy, rząd reakcji hydrolizy sacharozy, pochodzenie nazwy inwertaza.
5. Reakcja kwasu pikrynowego z glukozą i fruktozą. Zasada ilościowego oznaczenia produktów reakcji hydrolizy sacharozy.
6. Przykłady inhibitorów kompetycyjnych i niekompetycyjnych inwertazy.

Proszę przynieść na zajęcia papier milimetrowy.

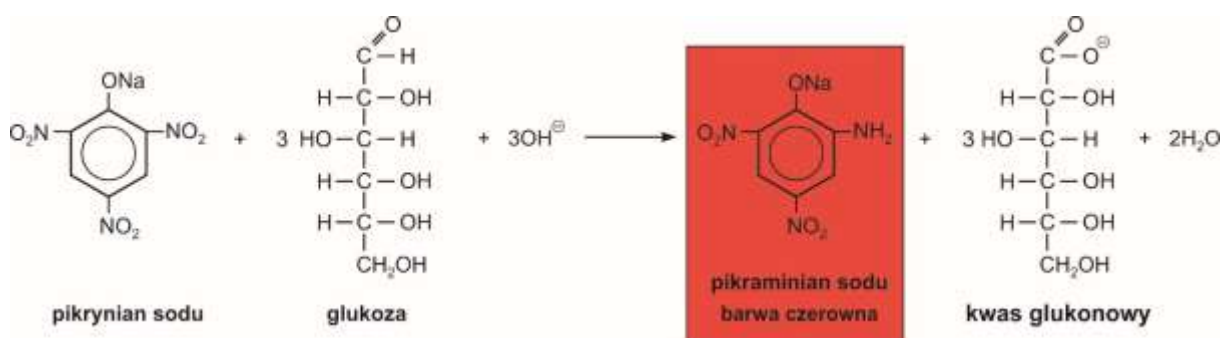
Zasada metody

Sacharoza może hydrolizować do D-glukozy i D-fruktozy zarówno w reakcji nieenzymatycznej w środowisku kwaśnym, jak i w reakcji katalizowanej przez enzym – sacharazę (inwertazę), która jest β -fruktofuranazydazą (EC 3.2.1.26).



Nazwa inwertaza pochodzi od obserwowanej po reakcji zmiany kierunku i wartości kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego: sacharoza skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo o +66,5°, podczas gdy mieszanina D-glukozy i D-fruktozy, stanowiąca produkt reakcji, skręca ją w lewo o -20°. Inwertaza jest stosunkowo stabilnym enzymem wykazującym największą aktywność w zakresie pH = 3,5–5,5 z optimum pH równym 4,5 i temperaturze równej 55°C. Aktywność inwertazy można mierzyć metodą redukcyjną, ponieważ w miarę postępu hydrolizy sacharozy wzrasta stężenie cukrów redukujących, które reagują z kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym, utleniając się do kwasów aldonowych, natomiast grupa nitrowa kwasu pikrynowego redukuje się do grupy aminowej, wytwarzając w środowisku zasadowym czerwono zabarwiony pikraminian, absorbujący światło przy 530 nm.

Pozwala to na wyznaczenie szybkości początkowych reakcji przy różnych stężeniach substratu (sacharozy) i wyznaczenie stałej Michaelisa oraz szybkości maksymalnej z wykresu Lineweavera-Burka.



Inhibitorem kompetycyjnym inwertazy jest 2,5-anhydro-D-mannoza, a inhibitorami niekompetycyjnymi tego enzymu są jony Cu²⁺ i Hg²⁺.

1. Wyznaczanie krzywej kalibracyjnej dla glukozy/fruktozy

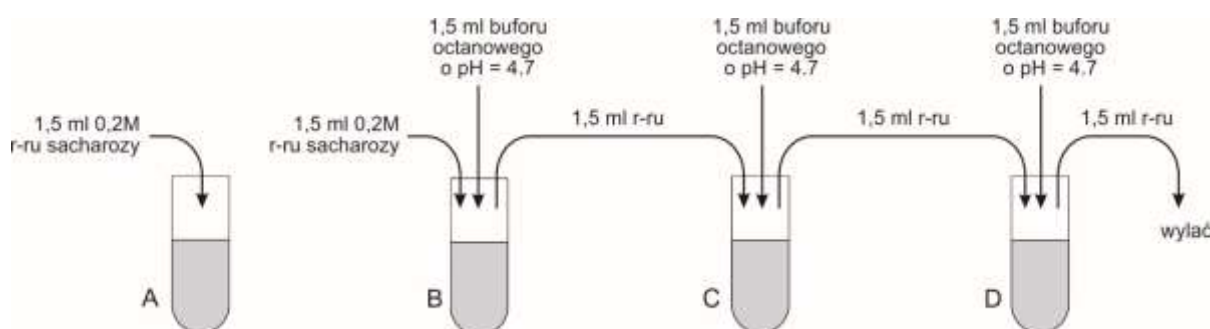
Przygotować sześć probówek i oznaczyć je. Do kolejnych probówek dodać 0,0 (próbka kontrolna); 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml 0,5% roztworu glukozy:fruktozy w stosunku 1:1 i uzupełnić wodą do 0,5 ml. Następnie dodać po 1,5 ml 0,1 M roztworu NaOH i po 1 ml roztworu kwasu pikrynowego. Po 10 min ogrzewania we wrzącej łaźni wodnej uzupełnić wodą do 10 ml, roztwór wymieszać i oznaczyć wartość absorpcji przy długości fali 530 nm wobec próby kontrolnej (próbka, do której nie dodano roztworu glukozy i fruktozy). Na podstawie uzyskanych danych wykreślić krzywą wzorcową przedstawiającą

zależność absorbancji od ilości miligramów glukozy i fruktozy. Z krzywej odczytać, ile miligramów glukozy i fruktozy odpowiada wartości absorpcji równej 1,0.

2. Wyznaczanie szybkości początkowych przy różnych stężeniach substratu (sacharozy)

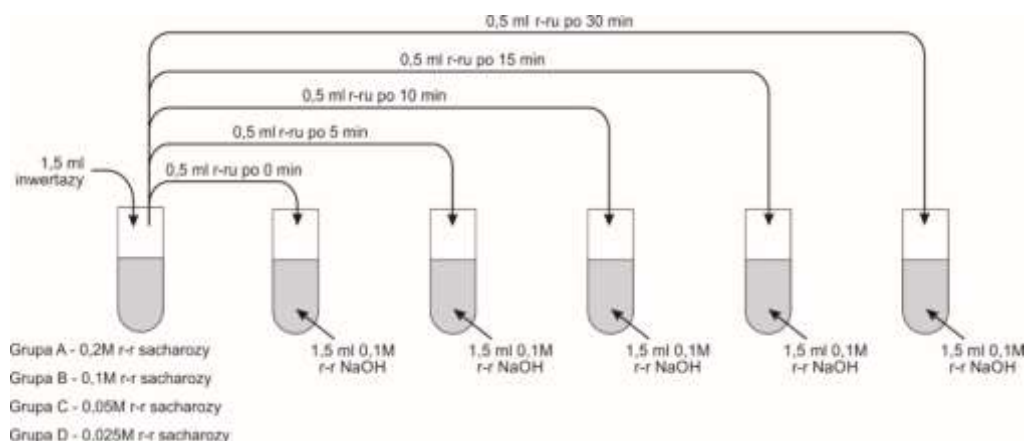
ETAP I

Przygotować cztery próbówki oznaczone jako A, B, C i D. Do próbówki A dodać 1,5 ml 0,2 M roztworu sacharozy. Do próbówki B dodać 1,5 ml 0,2 M roztworu sacharozy i 1,5 ml buforu octanowego o pH = 4,7, a do probówek C i D po 1,5 ml buforu octanowego o pH = 4,7. Następnie z próbówki B przenieść 1,5 ml roztworu do próbówki C, z której po wymieszaniu przenieść 1,5 ml do próbówki D, z której po wymieszaniu należy wylać 1,5 ml. Uzyskuje się w ten sposób następujące cztery roztwory sacharozy (0,2 M; 0,1 M; 0,05 M; i 0,025 M) o objętości 1,5 ml. Sposób wykonania rozcieńczeń wyjściowego 0,2 M roztworu sacharozy przedstawia poniższy schemat:



ETAP II

Probówki A, B, C i D przenieść do osobnych statywów i w każdym z nich umieścić 5 probówek oznaczonych 0 min, 5 min, 10 min, 15 min i 30 min. Do tak oznaczonych pięciu probówek odpipetować 1,5 ml 0,1 M roztworu NaOH stanowiącego inhibitor enzymu umożliwiający zatrzymanie reakcji hydrolizy w danym momencie. Do probówek A, B, C, D dodać następnie po 1,5 ml roztworu inwertazy i natychmiast po wymieszaniu ($t = 0$) pobrać z każdej próbówki po 0,5 ml mieszaniny inkubacyjnej do próbówki oznaczonej 0 min zawierającej 1,5 ml 0,1 M roztworu NaOH. Następne próby (po 0,5 ml) należy pobrać kolejno po upływie 5, 10, 15 i 30 min i wprowadzać je do probówek oznaczonych czasem pobrania.



Po wymieszaniu, do wszystkich probówek dodać po 1 ml nasyconego roztworu kwasu pikrynowego. Ogrzewać 10 min we wrzącej łaźni wodnej, a następnie uzupełnić wodą do 10 ml, roztwór wymieszać i oznaczyć wartość absorbancji przy $\lambda = 530$ nm wobec próby kontrolnej (probówka oznaczona $t = 0$ min).

ETAP III

Powtórzyć całość pomiaru spektrofotometrycznego dla próbek badanych sacharozy o identycznych stężeniach (0,2M, 0,1 M, 0,05 M i 0,025 M), w których substrat reakcji enzymatycznej rozpuszczono w 1,5 ml buforu octanowego zawierającego 0,05 M glicerol stanowiący inhibitor działania enzymu.

ETAP IV

Po odczytaniu z krzywej kalibracyjnej ilości glukozy:fruktozy, sporządzić wykres dla sacharozy w każdym stężeniu (z inhibitorem i bez jego obecności), odkładając na osi rzędnych ilość miligramów produktu, a na osi odciętych czas w minutach. Na każdym wykresie przeprowadzić styczną do krzywej w punkcie odpowiadającym stężeniu produktu w czasie $t = 0$ i obliczyć tangens jej nachylenia od osi odciętych. Wartość $\text{tg}\alpha$ oblicza się ze stosunku wielkości przyprostokątnej przeciwległej do przyprostokątnej przyległej danego kąta (nie mierzyć, nie odczytywać z tablic na podstawie pomiaru kąta, gdyż nanoszone wartości na osiach nie są tej samej wielkości). Na podstawie szybkości początkowych (V_0), wyliczonych dla każdego stężenia substratu $[S]$, obliczyć wartości $1/V_0$ i $1/[S]$ i wykreślić zależność $1/V = f(1/[S])$ Lineweavera-Burka dla reakcji z samym substratem oraz substratem wraz z inhibitorem. Z punktów przecięcia wykresu Lineweavera-Burka z osią odciętych i rzędnych obliczyć wartości K_M i V_{\max} dla inwertazy w dwóch eksperymentach (z inhibitorem i bez jego obecności). Na podstawie otrzymanych wykresów Lineweavera-Burka określić typ inhibicji powodowanej przez glicerol.