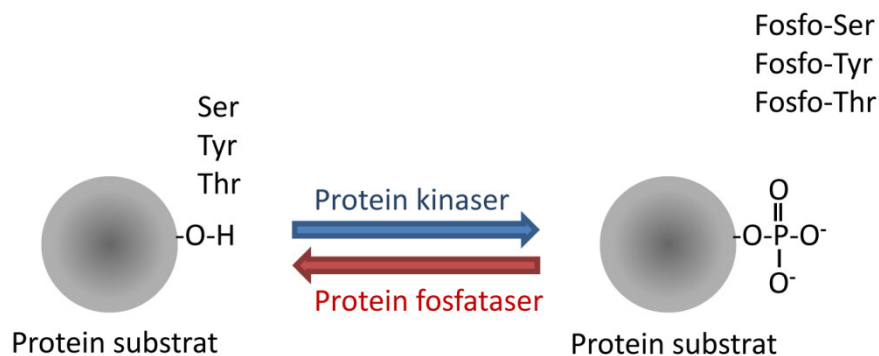


Enzymkinetik

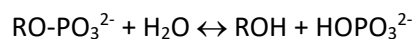
INTRODUKTION

Enzymer er biologiske katalysatorer i alle levende organismer som er essentielle for liv. Selektivt og effektivt katalyserer enzymerne kemiske reaktioner som ellers ikke ville kunne forløbe med den fornødne hastighed ved de temperaturer værtsorganismene har. Udover at spille en afgørende rolle for levende organismers stofomsætning er der stor fokus på enzymkatalyserede reaktioner såvel som enzymfremstilling i den industrielle produktion. Formålet med denne øvelse er at illustrere hvorledes undersøgelser af den hastighed hvormed et enzym katalyserer en bestemt biokemisk reaktion kan gribes an. I disse forsøg undersøges enzymet alkalisk fosfatase.

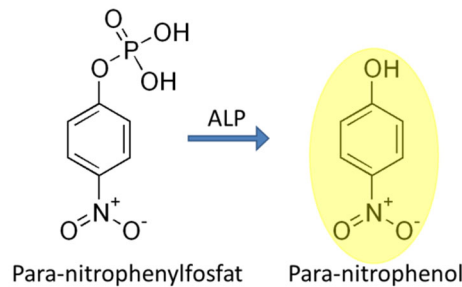
For mange af cellens funktioner er balancen mellem fosforylering af udvalgte molekyler via kinaser og defosforylering af molekylerne via fosfataser et afgørende regulatorisk trin. En meget udbredt måde hvorpå proteiners aktivitet kan påvirkes er f.eks. fosforylering af serin-, tyrosin- og threonin i proteinerne idet mange proteiner har forskellig aktivitet alt efter fosforyleringsstatus.



Fosfataser er meget almindelige i levende organismer og alt efter substratspecificitet katalyserer de ikke kun defosforyleringen af proteiner men også af små organiske molekyler f.eks. nukleotider. Alkalisk fosfatase som skal anvendes i denne øvelse har en meget bred substratspecificitet og katalyserer reaktioner af typen:



Når man skal udføre enzymkinetiske forsøg har man brug for at kunne måle enten på forbruget af en af reaktanterne eller dannelsen af et af produkterne i den biokemiske reaktion. I disse forsøg katalyserer alkalisk fosfatase fraspaltningen af fosfat fra et substrat (para-nitrophenylfosfat), således at der dannes et produkt (para-nitrophenol), der absorberer lys i et bestemt bølgelængdeinterval. Dannelsen af produktet kan altså følges spektrofotometrisk som funktion af tiden.



Indenfor enzymkinetikken beskrev Michaelis og Menten i 1913 en model hvor omdannelsen af et substrat (S) til et produkt (P) sker i to trin hvor det første trin er karakteriseret ved en binding mellem enzym (E) og substrat og dannelsen af et enzym-substratkompleks (ES) mens det andet trin er omdannelsen af substratet til produktet og dissociationen mellem produkt og enzym. Dette kan udtrykkes på følgende måde, hvor k_1 , k_{-1} og k_2 er reaktionernes hastighedskonstanter (k_2 bortfalder da modellen er udledt i starttidspunktet, altså før der er noget produkt):



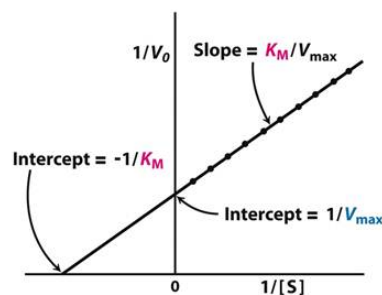
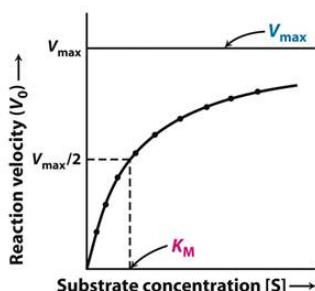
Ovenstående kan, sammen med antagelsen om at mængden af ES kompleks er konstant, føre til udledning af følgende ligning kaldet Michaelis-Menten ligningen:

$$v_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

K_M kaldes Michaelis konstanten og er givet ved:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

V_{\max} og K_M kan bestemmes ud fra et Michaelis-Menten eller et Lineweaver-Burke plot:



I forsøgene skal følgende undersøges:

Forsøg 1: Reaktionens tidsforløb a) med enzym og b) uden enzym

Forsøg 2: Påvirkning af enzymaktiviteten med EDTA

Forsøg 3: Reaktionshastighedens afhængighed af enzym koncentrationen

Forsøg 4: Reaktionshastighedens afhængighed af substrat koncentrationen samt bestemmelse af V_{\max} og K_M

Forsøg 5: Enzymaktivitetens afhængighed af pH

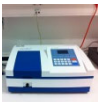
ARBEJDSREGLER

- Der skal anvendes kittel i laboratoriet.
- Der anvendes engangs-handsker ved kontakt med kemikalier.
- Skift tips hver gang der pipetteres en ny opløsning for at undgå kontaminering.
- Overtøj og tasker er ikke tilladt i laboratoriet men skal efterlades i garderoben eller seminarrummet.
- Indtagelse af mad og drikke i laboratoriet er strengt forbudt.
- Sorte affaldssække bruges til almindeligt affald mens affald med kemikalierester såsom pipettespidser og plastik kuvetter kommer i de små affaldsbeholdere på bordene (mærket H-waste).

UDSTRYR



I Mol-X-Lab bruges der 3 slags pipetter: -P20 dækker volumenområdet 2-20 μ L
-P200 dækker volumenområdet 20-200 μ L
-P1000 dækker volumenområdet 200-1000 μ L



I Mol-X-Lab anvendes UV-1600PC spektrofotometre. Et spektrofotometer består grundlæggende af en lyskilde hvor bølgelængden af det indgående lys kan kontrolleres, en kuvetteholder og en detektor. Lyskilden sender lys med én bestemt bølgelængde gennem en kuvette, indeholdende den opløsning hvoraf absorbansen ønskes bestemt, og detektoren måler hvor stor en del af det indgående lys der absorberes i prøven. Absorbansen af en opløsning er proportional med opløsningens molare koncentration (c) samt lysvejen (l) og er givet ved Lambert-Beers lov:

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

ϵ_{λ} : ekstinktionskoefficienten ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

Spektrofotometeret måler lysabsorptionen givet ved

$$A = \log(I_0/I)$$

I_0 : Lysintensitet efter passage af referenceopløsning

I : Lysintensitet efter passage af opløsning med absorberende stof

Det vil sige at for en prøve hvor

50% af lyset absorberes vil $A = \log(100/50) = 0.302$

90% af lyset absorberes vil $A = \log(100/10) = 1.000$

99% af lyset absorberes vil $A = \log(100/1) = 2.000$

MATERIALER

Buffer (0.2M Tris pH 8.5), alkalisk fosfatase (0.25mg/ml), para-nitrophenylfosfat (5mM i alle forsøg desuden også 0.5mM i forsøg 4, $M_w = 371 \frac{g}{mol}$), EDTA (0.1M). Til forsøg 5 anvendes yderligere 0.2M Tris buffer med pH på henholdsvis pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0 og pH 9.0 samt 0.2M CAPS buffer med pH på henholdsvis pH 9.0, pH 10.0 og pH 11.0.

FORKORTELSER

ALP (a_lkali_ne p_hosphatase=alkalisk fosfatase),
NPP (n_itrophenylphosphate=nitrophenylfosfat)
A410 (absorbansen ved 410 nm)

FREM GANGSMÅDE

Inden forsøgene startes

Som forberedelse til øvelsen indstilles spektrofotometret til måling ved 410 nm og nulstilles (tryk på knappen "zero") med 1000µL referenceopløsning (Tris-buffer pH 8.5). Desuden skal der bruges mange 2x2cm stykker parafilm i øvelsen så det er en god idé at starte med at klippe en betragtelig mængde af disse.

Forsøg 1a: Tidsforløb af reaktion med enzym

Pipetter 880µL Tris-buffer pH 8.5 ned i en plast kuvette og dernæst 100µL NPP. Dæk munden af kuvetten med et stykke parafilm, sæt tommelfingeren på så parafilmen slutter tæt til kuvetten og vend den 4-5 gange for at blande indholdet. Sæt kuvetten i spektrofotometeret uden parafilm, luk låget og mål absorbansen ved 410 nm (A410). Noter resultatet i skema 1a ved "Før 20µL ALP".

Den ene person på holdet pipetterer nu 20µL ALP ned i den samme kuvette, sætter parafilm på, blander som før, sætter kuvetten i spektrofotometeret og lukker låget. Med lidt øvelse kan dette gøres på under 15 sekunder. **I det øjeblik ALP pipetteres ned i kuvetten starter den anden person på holdet stopuret.** Nu er enzymreaktionen i gang og efter 30s tages den første aflæsning af A410. Målingerne fortsættes hvert 15. sekund de første 2 min. Derpå hvert minut frem til 10 min.

Skema 1a

Tris buffer	880µL
NPP (5mM)	100µL
ALP	20µL
Tid	A410
Før 20µL ALP	
Tid (efter ALP)	A410
30s	
45s	
60s	
75s	
90s	
105s	
120s	
3 min	
4 min	
5 min	
6 min	
7 min	
8 min	
9 min	
10 min	

Forsøg 1b: Tidsforløb af reaktion uden enzym

Forsøget udføres som forsøg 1a (i en ny kuvette), men i stedet for at tilsætte 20 μ L ALP tilsættes 20 μ L Tris buffer pH 8.5 og der tages kun målinger de første 2 min.

Skema 1b

Tris buffer	880 μ L
NPP (5mM)	100 μ L
Tris buffer	20 μ L
Tid	A410
Før 20 μ L Tris	
30s	
45s	
60s	
75s	
90s	
105s	
120s	

Forsøg 2: Påvirkning af enzymaktiviteten med EDTA

EDTA er en forbindelse, der kan binde divalente metalioner, såsom Zn²⁺, meget kraftigt. Det vil sige at EDTA kan fjerne Zn²⁺ fra enzymer der har en sådan cofaktor bundet.

Forsøget udføres ved først at blande Tris-buffer pH 8.5 og EDTA i en kuvette. Først derefter tilsættes ALP og blandingen tillades nu at reagere i mindst 10 min, hvorefter A410 måles. Noter resultatet i skema 2 ved "Før NPP". Så tilsættes NPP (5mM), kuvetten vendes med parafilm og A410 aflæses som i de andre forsøg. Følg skemaet nedenfor. Her kan forsøg 3 med fordel påbegyndes/laves i ventetiden på minimum 10 minutter.

Skema 2

Tris buffer	780 μ L
EDTA	100 μ L
ALP	20 μ L
NPP (5mM)	100 μ L
Tid	A410
Før NPP	
30s	
45s	
60s	
75s	
90s	
105s	
120s	
V	

Forsøg 3: Reaktionshastighedens afhængighed af enzymets koncentration

Forsøget udføres som i forsøg 1. Der måles i 120s på tre separate blandinger med varierende ALP koncentration og med Tris buffer pH 8.5. Se mængder i tabellen nedenfor.

Skema 3

1		2		3	
Tris buffer	880µL	Tris buffer	890µL	Tris buffer	895µL
NPP (5mM)	100µL	NPP (5mM)	100µL	NPP (5mM)	100µL
ALP	20µL	ALP	10µL	ALP	5µL
Tid	A410	Tid	A410	Tid	A410
30s		30s		30s	
45s		45s		45s	
60s		60s		60s	
75s		75s		75s	
90s		90s		90s	
105s		105s		105s	
120s		120s		120s	
[ALP] (µg/ml)		[ALP] (µg/ml)		[ALP] (µg/ml)	
V		V		V	

Forsøg 4: Reaktionshastighedens afhængighed af substratets koncentration

Inden forsøget startes skal der laves en 1:10 fortynding af NPP så der haves både 5mM NPP (den udleverede) og 0.5mM NPP. Der laves 100µL 0.5mM NPP ved at overføre 10µL 5mM NPP over i nyt eppendorf-rør mærket "0.5mM NPP" hvortil der tilsættes 90µL Tris-buffer pH 8.5 og blandes ved at pipettere op og ned et par gange.

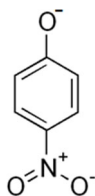
Forsøget udføres som i forsøg 1. Der måles også her i 120s, men på 8 forskellige blandinger med varierende substratkoncentration. Tris bufferen har pH 8.5.

Skema 4

	5 mM NPP					0.5 mM NPP			
	1	2	3	4		5	6	7	8
Tris buffer	880µL	930µL	955µL	970µL		955µL	970µL	975µL	978µL
NPP(5mM)	100µL	50µL	25µL	10µL	1:10 NPP (0.5mM)	25µL	10µL	5µL	2µL
ALP	20µL	20µL	20µL	20µL		20µL	20µL	20µL	20µL
Tid	A410	A410	A410	A410		A410	A410	A410	A410
30s									
45s									
60s									
75s									
90s									
105s									
120s									
[NPP] (µg/ml)									
V									

Forsøg 5: Enzymaktivitetens afhængighed af pH

Absorbansen for p-nitrophenol varierer med pH og for at undgå påvirkning af målingerne fra p-nitrophenol/p-nitrophenolate balancen kan målingerne foretages under basiske forhold således at alt p-nitrophenol er deprotoneret til p-nitrophenolate. Der tilsættes i dette forsøg så meget NaOH at alt p-nitrophenol er deprotoneret og reaktionen samtidig stoppes, da enzymet hæmmes.



Para-nitrophenolate

For at kunne dække et tilpas bredt pH-område, skal forsøget udføres i to forskellige buffere, således at der arbejdes inden for de enkelte buffers pH-områder. Forsøget udføres praktisk næsten som forsøg 1 men i eppendorf-rør i stedet for direkte i kuvetten. Pipetter 880µL buffer med relevant pH ned i et eppendorf-rør og tilsæt dernæst 100µL NPP. Den ene person på holdet pipetterer nu 20µL ALP ned i eppendorf-røret, og i det øjeblik ALP pipetteres ned i røret starter den anden person på holdet stopuret. Sørg for at blande godt ved at pipettere op og ned flere gange, luk låget på eppendorf-røret og lad reaktionen stå på bordet i 2 minutter.

Ved t=2minutter tilsættes 250µL 1M NaOH (husk at bruge handsker) – og husk at blande ved at pipettere op og ned et par gange – hvorved reaktionen stoppes. Overfør 1 ml af den stoppede reaktion til en kuvette og mål absorbansen (A410).

Alternativt kan man udføre alle reaktioner og dernæst måle absorbansen. Når NaOH er tilsat er reaktionen stoppet og der sker derfor ikke noget hvis der går lidt tid inden målingerne foretages.

Ifald man ønsker at nulstille spektrofotometret kan dette gøres med Tris-buffer pH 8.5 - det er den samme buffer som er brugt i forsøg 1-4.

Skema 5-1

Tris buffer pH	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0
Tris buffer	880µL	880µL	880µL	880µL	880µL
NPP (5mM)	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
ALP	20µL	20µL	20µL	20µL	20µL
A410					

Skema 5-2

CAPS buffer pH	pH 9.0	pH 10.0	pH 11.0
CAPS buffer	880µL	880µL	880µL
NPP (5mM)	100µL	100µL	100µL
ALP	20µL	20µL	20µL
A410			

DATABEHANDLING

Databehandling til forsøg 1: Tidsforløb af reaktion med enzym

- Beskriv med egne ord hvad du forventer at se og hvorfor.
- Afbild A410 som funktion af tiden. Lav kurverne for forsøg 1a og 1b i samme koordinatsystem.
- Konkluder på forsøget og diskuter resultatet i lyset af dine forventninger.

Databehandling til forsøg 2: Påvirkning af enzymaktiviteten med EDTA

- Beskriv med egne ord hvad du forventer at se og hvorfor.
- Afbild A410 som funktion af tiden for dette forsøg. I samme koordinatsystem indtegnes A410 for de første 120s fra forsøg 1a
- Beregn reaktionshastigheden V for både forsøg 1a og for forsøg 2 som forskellen mellem A410-værdierne ved 90s og 30s.
- Konkluder på forsøget og diskuter resultatet i lyset af dine forventninger.

Databehandling til forsøg 3: Reaktionshastighedens afhængighed af enzymets koncentration

- Beskriv med egne ord hvad du forventer at se og hvorfor.
- Afbild de tre måleserier i det samme koordinatsystem med A410 som funktion af tiden.
- Beregn reaktionshastigheden V som forskellen mellem A410-værdierne ved 90s og 30s.
- Beregn enzymkoncentrationerne (c_{enz}) i de tre prøver. Her beregnes først m_{enz} ($m_{enz} = c_{stam} \cdot V_{stam} = c_{f\ddot{o}r} \cdot V_{f\ddot{o}r}$) og dernæst koncentrationen i kuvettens totale volumen ($c_{enz} = m_{enz}/V_{total} = m_{enz}/V_{efter}$).
- Afbild reaktionshastigheden som funktion af enzymkoncentrationen.
- Konkluder på forsøget og diskuter resultatet i lyset af dine forventninger.

Databehandling til forsøg 4: Reaktionshastighedens afhængighed af substratets koncentration

- Beskriv med egne ord hvad du forventer at se og hvorfor.
- Beregn reaktionshastigheden V for alle prøver.
- Beregn substratkoncentrationen i hver prøve. Her beregnes først stofmængden (n) af tilsat substrat ($n_{sub} = c_{stam} \cdot V_{stam}$) og dernæst koncentrationen i kuvettens totale volumen ($c_{sub} = n_{sub}/V_{total}$).
- Følger reaktionen Michaelis-Menten kinetik?
- Lav et Lineweaver-Burk plot og bestem herfra de to konstanter K_M og V_{max} .
- Konkluder på forsøget og diskuter resultatet i lyset af dine forventninger.

Databehandling til forsøg 5: Enzymaktivitetens afhængighed af pH

- Beskriv med egne ord hvad du forventer at se og hvorfor.
- Konkluder på forsøget og diskuter resultatet i lyset af dine forventninger.