

KemiF2

Enzymkinetik

Trypsin er en serinproteinase, der katalyserer hydrolyse af peptid- og esterbindinger, hvor Arg eller Lys leverer carbonylgruppen. Ved øvelsen bestemmes de kinetiske parameterværdier, K_m , V_{max} og k_c for trypsins reaktion med substratet α -N-benzoyl-L-arginin 4 -nitroanilid (BANA).

Forsøgene udføres ved betingelserne: pH 7.6, 0.1 M fosfatpuffer, ved stuetemperatur.

Reaktionstyper

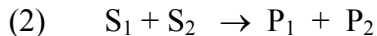
De fleste enzymer katalyserer reaktioner mellem flere reaktanter, substraterne, og reaktionerne fører normalt til dannelse af flere produkter. Umiddelbart kan kun isomerase-katalyserede reaktioner skrives:

E



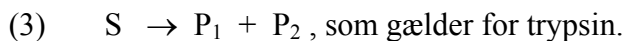
mens mange enzymkatalyserede reaktioner er to-substrat reaktioner (2):

E

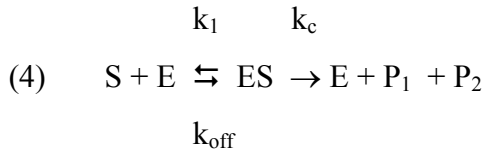


For hydrolytiske reaktioner, hvor et af substraterne er vand, hvis koncentration (aktivitet) i vandig opløsning er konstant, ses der ofte bort fra dette andet substrat og reaktionen skrives (3):

E



Ved en overfladisk beskrivelse af denne type enzymkatalyseret reaktion, angives reaktionen som (4):



Her optræder et udifferentieret enzymsubstratkompleks, ES, som en slags sort kasse, hvori omdannelsen af substratet til produkterne foregår.

Michaelis-Menten ligningen

I praksis viser det sig, at en beskrivelse givet ved (4) af en enzymreaktion er anvendelig i mange sammenhænge. Under de eksperimentelle betingelser, som det ofte er naturligt at anvende ved undersøgelser af en enzymkatalyseret reaktion, $E_0 \ll S_0$, $P_0 = 0$ for $t = 0$, hvor t er reaktionstiden, vil reaktionsskemaet i (4) føre til:

$$(6) \quad E_0 = E + ES \quad (\text{egentlig } E + \sum ES_i) \quad (\text{Massebevarelse})$$

og

$$(7) \quad dES/dt = k_1(E)(S) - (k_{\text{off}} + k_c) ES = k_1(E_0)(S) - (k_1(S) + k_{\text{off}} + k_c) ES$$

For korte tider, hvor substratkoncentrationen endnu ikke er ændret væsentligt, $S \cong S_0$, betragtes S som værende konstant og (7) kan løses, ES-koncentrationen som funktion af tiden for små t bliver:

$$(8) \quad ES = [k_1 E_0 S_0 / (k_1 S_0 + k_{\text{off}} + k_c)] (1 - e^{-\alpha t}) \quad \text{hvor } \alpha = k_1 S_0 + k_{\text{off}} + k_c$$

det ses, at i α er det reaktionens hurtigste trin der tæller, oftest er $k_1 S_0$ størst og af størrelsesordenen 10^3 s^{-1} . Eksponentialleddet i (8) forsvinder altså hurtigt, indenfor nogle få millisekunder. Herefter indtræder en steady state fase, hvor ES har antaget sin **initial steady state koncentration**, der er givet ved (9):

$$(9) \quad ES = [k_1 E_0 S_0 / (k_1 S_0 + k_{\text{off}} + k_c)] = E_0 / [1 + (k_{\text{off}} + k_c) / k_1 S_0]$$

og altså, fra (7), $dES/dt = 0$. Det hedder initial steady state, fordi det er forudsat at $S \cong S_0$.

Ser vi nu på produktdannelsehastigheden, dP/dt , i initial steady state fasen, og anvender at $dP/dt = k_c ES$, ifølge (4), fås (10):

$$(10) \quad \frac{dP}{dt} = \frac{k_c E_0}{1 + \frac{k_{off} + k_c}{k_1 S_0}}$$

dP/dt er også lig med $-dS/dt$, da dES/dt er blevet nul. Substratforbrug og produktdannelse i steady state er ens.

Ligning 9 viser sammenhængen mellem samlet enzymsubstratkoncentration, $ES = \sum ES_i$, som funktion af substratkoncentrationen, S_0 . Der er tradition for at definere en K_m -værdi, (11):

$$(11) \quad ES = \frac{E_0}{1 + \frac{K_m}{S_0}},$$

som for (4), altså bliver:

$$(12) \quad K_m = \frac{k_{off} + k_c}{k_1},$$

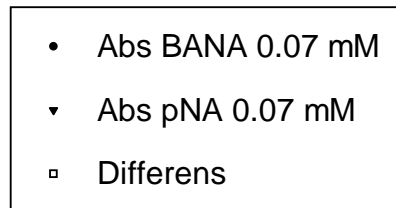
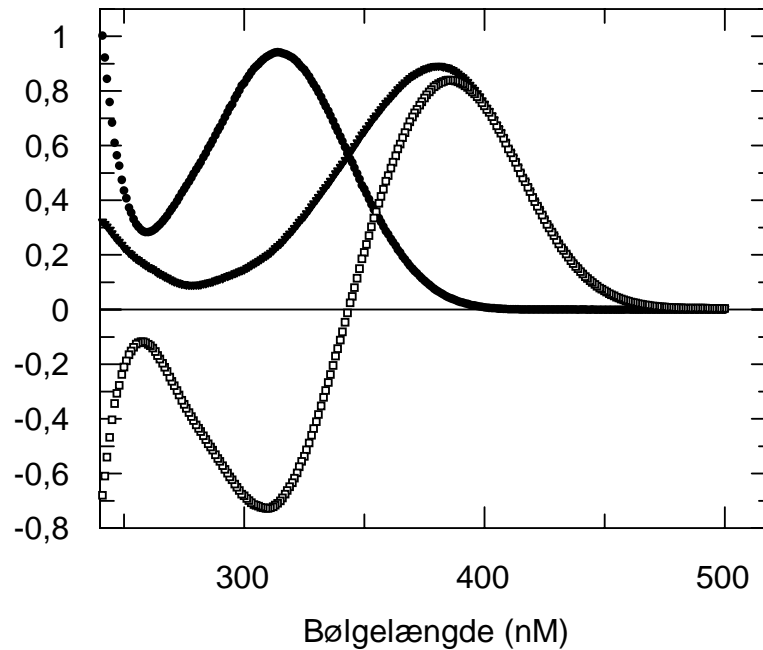
K_m kaldes Michaelis-konstanten, og bestemmer steady state forholdet for systemet

$$(13) \quad K_m = \frac{(E)(S)}{\sum_i^n ES_i}$$

Så bliver produktdannelsehastigheden (fra (10)) :

(14) $dP/dt = k_c E_0 / (1 + K_m / S)$, hvilket er Michaelis ligningen med den maximale hastighed $V_{max} = k_c E_0$.

På figuren ses absorptionsspektrene af substratet, BANA og produktet, pNA samt deres differens. Disse spectre er optaget i kuvetter med 1 cm lysvej ved koncentrationen 0.07 mM.



Det isobestiske punkt ligger ved 343 nm ($\epsilon = 8200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). I skal kontrollere jeres substratkoncentrationer v. hj. a. Lambert-Beers lov og den absorbans I måler ved denne bølgelængde. Omkring 400-410 nm eller 310-320 nm er der størst forskel på spektrene. Begge disse områder er således velegnede til bestemmelser af produktdannelsen eller substratforbruget under reaktionen.

- Forklar hvordan ændringen i absorbans kan bruges til at bestemme (initial)-reaktionshastigheden og hvorfor den aktuelle BANA

koncentration kan bestemmes ved 343nm.

Ved at bestemme initialhastigheden, dp/dt , for reaktionen med forskellige substratkoncentrationer kan man finde K_m og V_{max} , og (hvis man kender enzymkoncentrationen), k_c . Dette sker ved analyse af sammenhørende værdier af substratkoncentration, S og initialhastighed, dP/dt . her anvender vi et program som laver et fit af data til Michaelis-ligningen, der findes også mere primitive metoder, som f. eks. dobbelt-reciprokke plot.

Praktiske anvisninger

Bufferopløsning (0,1 M fosfatbuffer, pH 7,6) og 2 mM BANA i samme buffer er udleveret og opbevares ved stuetemperatur under øvelsen (Noter hvad temperaturen er). Trypsin findes i en 5.2 μ M stamopløsning i 1 mM HCl og skal opbevares på is!

Målingerne udføres med $[S] = 0,1; 0,2, 0,5; 1$ og 2 mM og $[E_0] = ca 0,25 \mu$ M (I skal dog vide nøjagtigt hvor meget enzym I bruger og det skal hver gang være det samme). Lav nogle dobbeltbestemmelser hvis I har tid. Kyvetterne er semi.mikro-engangskyvetter og totalvolumen skal være 1500 μ l.

Beregn hvor meget enzym, buffer og BANA opløsning I skal bruge til hvert forsøg.

- Spektrofotometrene er Avantes fiberoptiske og softwaren er AvaSpec6.2.
- Sørg for at USB-kaplet sidder i spektrofotometret inden I starter programmet.
- Tænd lampen bagpå, dernæst deuteriumlampen og når dens diode lyser grønt, så halogenlampen.
- Sørg for at fibre er ordentligt sat i lampen og spektrofotometret.

Lad være med at flytte på dem under eksperimentet. Disse fibre er meget følsomme og dyre.

- Start dataopsamling, åbn shutteren og sæt integrationstiden så y-skalaværdien holder sig under 14000counts. Denne integrationstid anvendes i alle eksperimenterne.

Lige inden hver måling gøres følgende:

- File -> Start New Eksperiment: gem i jeres mappe med et passende navn
- Fx. BANA0.1mM for det første forsøg (0.1mM BANA)..husk at skifte navn ved begyndelse af nyt forsøg. Alle spektrene indenfor samme eksperiment får løbenumre, dvs at hvis eksperimentet hedder 0.1mM, så kommer spektrene til at hedde BANA0.1mM_a0001, osv.
- Sørg for at softwaren er i scope-mode (S-knappen trykkes ind) og at dataopsamlingen er i gang.
- Luk shutteren, sæt et stykke pap i holderen foran lyset og tag et mørkespektrum (tryk på den sorte firkant).
- Fjern pappet, åbn shutteren og tag et referencespektrum på luft (tryk på den hvide firkant).
- Gå i absorbans-mode (A-knappen trykkes ind).
- Lad være med at slukke for dataopsamlingen.

Sæt en kuvette i spektrofotometret optag et referencespektrum til brug for substrakonstrationsbestemmelsen gør dette hver gang i skifter kuvette, tilsæt derefter buffer og BANA til den ønskede koncentration, omrør ved at boble med en plastikpipette og optag et spektrum svarerende til tiden, $t = 0$ s.

Nu kommer det svære: Enzymet tilsættes, tiden startes (stopuret kan tælle opad) og der omrøres med plastikpipetten igen – alt sammen på samme tid! Herefter gemmes spektre ved at trykke på save-knappen (diskette ikonet) med passende mellemrum. Der vil nu komme en comment box frem. Indtast heri tiden.

Optag et spektrum for 0.1mM og 0.2mM BANA koncentrationer hvert 30ende sekund i 6 minutter og for de resterende hvert 15ende sekund i 3min.

Sæt markøren på f. eks. 410 nm, så kan I følge forløbet på måletallet nederst på skærmen.

Når I er færdige hældes opløsningen i H-dunken i stinkskalet (p-nitroanilin er ikke ugiftigt), kyvetten skylles med vand og smides ud.

Når I er færdige konverteres alle spektre til ækvidistante ascii-data v.hj.a. File-> Convert Graf ->To Ascii – Equi Distance. Sæt her to and from range til 410nm. Databehandlingsvejledning forefindes ved øvelsen.

- Litteraturværdien for p-NA's absorbtion ved 410 nm er $8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
Hvordan passer det med jeres målinger?
Når den teoretisk k_c værdi er 8 s^{-1} .
- Beregn de rigtige substratkoncentrationer ud fra måletallene ved 343 nm ved at sætte to and from range til 343nm for 0.1mM eller 0.2mM BANA.
- Angiv K_m , V_{max} , og den beregnede k_c for trypsinreaktionen og beskriv hvad disse værdier angiver.
- Angiv strukturformler for BANA og p-NA.