

KemiF2

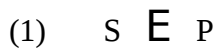
Enzymkinetik

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

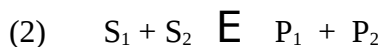
Forsøgene udføres ved betingelserne: pH 7.6, 0.1 M fosfatpuffer, ved stuetemperatur.

Reaktionstyper

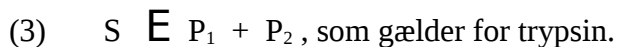
De fleste enzymer katalyserer reaktioner mellem flere reaktanter, substraterne, og reaktionerne fører normalt til dannelse af flere produkter. Umiddelbart kan kun isomerase-katalyserede reaktioner skrives:



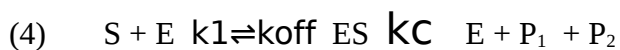
mens mange enzymkatalyserede reaktioner er to-substrat reaktioner (2):



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):



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 produktdannelseshastigheden, dP/dt , i initial steady state fasen, og anvender at $dP/dt = k_c ES$, ifølge (4), fås (10):

$$(10) \quad \frac{dP}{dt} = k_c E_0 \left(1 - \frac{P}{S_0} \right) - \frac{k_1 S_0}{K_m + S_0}$$

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:

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

som for (4), altså bliver:

$$(12) \quad K_m = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

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

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

(13)

Så bliver produktdanneshastigheden (fra (10)) :

$$(14) \quad \frac{dP}{dt} = \frac{k_c E_0 S_0}{1 + K_m/S_0},$$

hvilket er Michaelis ligningen med den maximale hastighed $V_{max} = k_c E_0$.

Ved at bestemme initialhastigheden, dp/dt , for reaktionen med forskellige substratkoncentrationer kan man finde K_m og V_{max} , og (hvis man kender enzymskoncentrationen), k_c . Dette sker ved analyse af sammenhørende værdier af substratkoncentration, S og initialhastighed, dP/dt . her anvender vi et program gnuplot som laver et fit af data til Michaelisligningen, der findes også mere primitive metoder, som f. eks. dobbelt-reciproke 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 μM 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 $[E_0] = \text{ca } 0,25$ μM (I skal dog vide nøjagtigt hvor meget enzym I bruger og det skal hver gang være det samme). Kyvetterne er semi.mikro-engangskyvetter og totalvolumen skal være 1500 μl .

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

- Spektrofotometrene er Avantes fiberoptiske og softwaren er AvaSpec6.2.
- Tænd lampen bagpå, dernæst deuteriumlampen og når dens diode lyser grønt, så halogenlampen.
- Lad være med at flytte på fibrene under et eksperiment. 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: lav en mappe i kemiF2 mappen på desktoppen med et passende navn.
- Fx. SCAN for det første scanningsforsøg og BANA01 for det første kinetik 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 01, så kommer spektrene til at hedde BANA01_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).
- Optag et mørke og reference spektrum før hver forsøgsrække.
- Lad være med at slukke for dataopsamlingen.

Optag et spektrum fra 300 nm til 600 nm (tryk change graph scale) af 0,07 mM BANA og et af 0,07 mM pNA. Et spektrum optages ved at trykke på diskette ikonet. Ved tryk på denne fryses billedet og en comment box fremkommer. Indtast i denne om i måler på BANA eller pNA. Display begge spektra ved at bruge File -> display saved graph og tryk i den hvide firkant højre hjørne hvor der står hvilken graf der vises for at tilføje en graf yderligere.

Hvilken bølgelængde er velegnet til bestemmelse af produktdannelse og substratforbrug under reaktionen?

Hvilken bølgelængde kan anvendes til bestemmelse af den aktuelle BANA koncentration og hvorfor?

Mål hastigheden af trypsins hydrolyse af BANA ved at afpipettere 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 den tomme kuvette hver i skifter denne
- Optag et spektrum for alle Bana koncentrationer hvert 15ende sekund i 3min.
- Lav dobbeltbestemmelse.
- 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.
- Til bestemmelse af den formelle BANA koncentration skal I bruge målingerne for 0.1 mM BANA.

Hvorfor kan man kun bruge målingerne ved lav BANA koncentration til bestemmelse af den formelle BANA koncentration?

Alt databehandling kan laves i gnuplot der kan downloades her <http://sourceforge.net/projects/gnuplot/files/> (vælg gp426win32.zip) eller et andet fitte program. Gnuplot er installeret på lab computerne og ligger i python mappen.

Beregn de aktuelle substratkoncentrationer af BANA.

Angiv K_m (mM), V_{max} ($\mu\text{M/s}$) og den beregnede k_{cat} (s^{-1}) for trypsinreaktionen og beskriv hvad disse værdier angiver.

Angiv strukturformler for BANA (kan findes på sigma aldrich hjemmeside under BAPA) og p-NA.

Data behandling

Beregn de rigtige substratkoncentrationer af BANA

Brug her Lambert-Beers lov og $\epsilon_{343} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Bestem K_m (mM), V_{max} ($\mu\text{M/s}$) og k_{cat} (s^{-1})

Beregn først initialhastighederne ved at plotte absorbansen som en funktion af tid. Omregn til $\mu\text{M/s}$ ved at bruge Lambert-Beers lov og $\epsilon_{410} = 8500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dette kan gøres i excel eller i gnuplot (gøres som beskrevet for fit til Michaelis-Menten ligning) ved at fitte til en ret linie ($f(x)=a*x+b$ i gnuplot). Plot initialhastighederne i $\mu\text{M/s}$ som en funktion af BANA koncentrationen i mM. Fit plottet til Michaelis-Menten ligningen $v = \frac{V_{max}x}{1 + K_m x}$. I gnuplot gøres dette ved at først at lave en tekst fil .txt med jeres data, hvori i indtaster initial hastighederne ($\mu\text{M/s}$) i en kolonne og Bana koncentrationerne (mM) i en anden. Brug punktum til at indikere decimal tal.

I gnuplot indtastes:

ChDir : skrivebord (lokalisere data filen)

Gnuplot> plot "-----.txt" (plotter rå data)

Gnuplot> f(x)=v/(1+Km/x) (definer den ligning I vil fitte til)

Gnuplot> fit f(x) "-----.txt" via v,Km (kopier/noter værdierne)

Gnuplot> plot f(x), "-----.txt"

I axes kan I tilføje X- og Y-label og ændre X. og Y-range