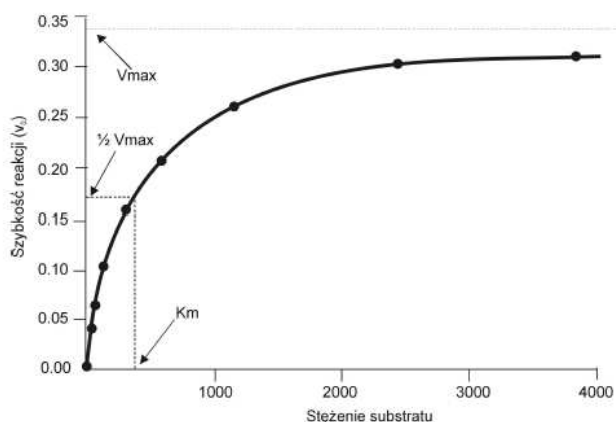


3. Badanie kinetyki enzymów

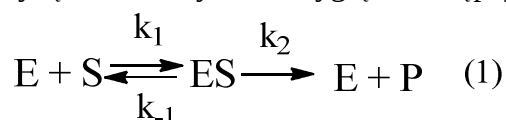
Przy stałym stężeniu enzymu, a przy zmieniającym się początkowym stężeniu substratu, zmiany szybkości reakcji katalizy, wyrażonej jako liczba moli substratu przetworzonego w jednostce czasu, można przedstawić w postaci krzywej hiperbolicznej (rys. 1).



Rys. 1. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej w funkcji stężenia substratu

Przy małych stężeniach substratu niektóre cząsteczki enzymu nie tworzą kompleksu z substratem, co powoduje, że enzym nie wykazuje swojej maksymalnej aktywności katalitycznej. Maksymalną szybkość reakcji osiąga dopiero przy wyższym stężeniu substratu, kiedy wszystkie cząsteczki enzymu będą tworzyć kompleks enzym – substrat. Całkowite wysycenie enzymu substratem powoduje, że dalsze zwiększanie stężenia substratu nie może już wpłynąć na zwiększenie szybkości reakcji: reakcja przebiega ze stałą, maksymalną szybkością V_{MAX} .

Fakt ten tłumaczy się, zgodnie z modelem zaproponowanym w 1913 roku przez L. Michaelisa i M. Menten, powstawaniem kompleksu enzym - substrat w trakcie katalizy enzymatycznej. Najprostszy model, który tłumaczy kinetykę wielu enzymów, wygląda następująco:



Enzym (E) łączy się z substratem (S) tworząc kompleks ES; reakcję charakteryzuje stała szybkości k_1 . Istnieją dwie możliwe drogi rozpadu kompleksu ES. Może on dysocjować do E i S ze stałą szybkości k_{-1} lub może się przekształcać, tworząc produkt (P) ze stałą szybkości k_2 .

Szybkość reakcji enzymatycznej (katalizy) jest równa iloczynowi stężenie kompleksu ES i stałej szybkości k_2 :

$$V = k_2 \times [ES] \quad (2)$$

$$\text{Szybkość powstawania kompleksu (ES)} \quad V = k_1 \times [E] \times [S] \quad (3)$$

$$\text{Szybkość rozpadu kompleksu (ES)} \quad V = k_{-1} \times [ES] + k_2 \times [ES] = (k_{-1} + k_2) \times [ES] \quad (4)$$

Birgs i Halden w 1925 roku po raz pierwszy wprowadzili założenie występowania **stanu stacjonarnego** w przebiegu reakcji enzymatycznej. Badacze ci założyli, że istnieje taki moment reakcji, w którym szybkość tworzenia kompleksu ES równa się sumie szybkości jego rozpadu na produkt (P) i substrat (S), co jest równoważne z warunkiem niezmienności stężenia kompleksu ES. Szybkość powstawania kompleksu ES = szybkość rozpadu kompleksu ES, stąd:

$$k_1 \times [E] \times [S] = (k_{-1} + k_2) \times [ES] \quad (5)$$

Szybkość początkowa reakcji zależy od szybkości rozpadu kompleksu ES ($k_{-1} + k_2$), od stężenia kompleksu oraz szybkości jego powstawania (k_1) i dlatego stała równowagi takiego układu wyraża się wzorem (6) i nosi nazwę **stałej Michaelisa** (K_M).

$$\frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad (6)$$

czyli

$$[ES] = \frac{[E] \times [S]}{K_M} \quad (7)$$

Stężenie enzymu (E) w powyższym wzorze jest stężeniem enzymu wolnego, niezwiązanego w kompleksie, czyli równe całkowitemu (początkowemu) stężeniu enzymu (E_c) pomniejszonemu o stężenie kompleksu ES. Można więc napisać:

$$[E]_C = [E] + [ES] \implies [E] = [E]_C - [ES] \quad (8)$$

Czyli

$$[ES] = \frac{([E]_C - [ES]) \times [S]}{K_M} \quad (9)$$

Szybkość reakcji enzymatycznej zależy głównie od stężenia kompleksu ES i szybkości tworzenia się z niego produktu i wynosi (równanie 2):

$$V = k_2 \times [ES]$$

Przekształcając równanie (9) - obliczamy [ES] - i podstawiając do równania (2) otrzymuje się:

$$V = k_2 \times [E]_C \times \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (10)$$

gdzie: $k_2 = k_{cat}$, zdefiniowane jako stała katalityczna

Maksymalną szybkość reakcji V_{max} uzyskuje się wtedy, kiedy wszystkie miejsca enzymu są wysycane przez substrat, to znaczy, kiedy $[S] \gg K_M$, czyli $[S]/([S] + K_M)$ jest bliskie 1. Stąd:

$$V_{MAX} = k_2 \times E_C \quad (11)$$

W wyniku podstawienia równania (11) do równania (10) otrzymuje się równanie Michaelisa-Menten:

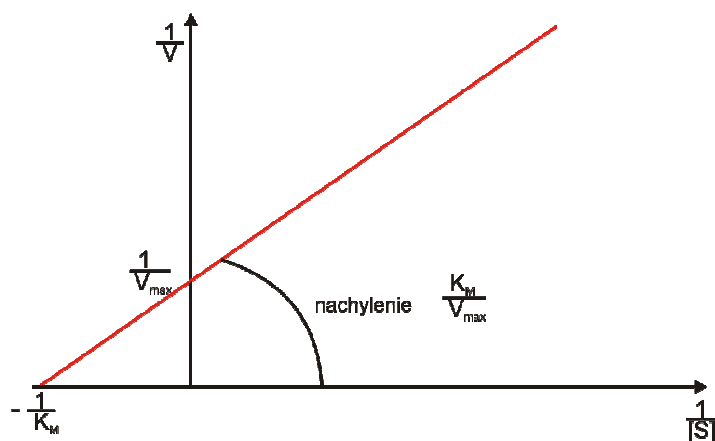
$$V = V_{MAX} \times \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (12)$$

Rozwiązaniem równania (12) jest krzywa przedstawiona na rysunku 1.

Równanie Lineweavera-Burka (13) jest przekształceniem wzoru Michaelisa-Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \quad (13)$$

$$y = ax + b$$



Rys. 2. Krzywa Lineweavera-Burka

Przekształcenie to ma na celu uzyskanie równania o ogólnej postaci linii prostej ($y = ax + b$). Wartość $K_M/V_{\max}$ (a) i $1/V_{\max}$ (b) są wielkościami stałymi, stąd zależność $1/V$ (y) od $1/[S]$ (x) jest linią prostą, której nachylenie określa zawsze stosunek $K_M/V_{\max}$ (współczynnik regresji a) i która przecina oś y (czyli $1/V$) w punkcie wyznaczającym $1/V_{\max}$.

Zadaniem niniejszego doświadczenia będzie wyznaczenie parametrów kinetycznych ($V_{\max}$, $k_{\text{cat}} = V_{\max}/E_C$, K_M i k_{cat}/K_M) w układzie enzym – substrat. Stosowana w doświadczeniu metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze szybkości hydrolizy substratu (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy), której miarą jest przyrost absorbancji uwalnianego chromoforu (*p*-nitroaniliny).

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Spektrofotometr UV-Vis
2. Kuwety plastikowe
3. Roztwór podstawowy bydlęcej β -trypsyny (7 mg w 1 mL 1 mM HCl z dodatkiem 20 mM CaCl_2 , pH 3,0)
4. Roztwór substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu benzoil-D,L-argininy) (stężenie roztworu podstawowego 5 mg/mL DMSO)
5. Bufor weronalowy o stężeniu 40 mM z dodatkiem 20 mM CaCl_2 (pH 8,3)
6. Roztwór NPGb (*p*-guanidynobenzoesan *p'*-nitrofenylu) (0,8 mg związku rozpuszczonego w mieszaninie złożonej z 100 μL DMF i 400 μL acetonitrylu)
7. Bufor 50 mM Tris/HCl zawierający 20 mM CaCl_2 oraz Tritonu X-100, pH 8,3
8. Pipety miarowe automatyczne 20-200 μL i 500-5000 μL

Wykonanie doświadczenia:

Metodyka wyznaczania parametrów kinetycznych w układzie enzym – substrat.

Wyznaczenie parametrów kinetycznych substratów chromogenicznych obejmuje następujące etapy:
enie parametrów kinetycznych substratów chromogenicznych obejmuje następujące etapy:

1. Wyznaczenie stężenia aktywnej formy enzymu.
2. Wyznaczenie stężenia roztworów substratów.
3. Wyznaczenie parametrów kinetycznych.

1.1. Wyznaczenie stężenia aktywnej formy enzymu

Wyznaczanie stężenia bydlęcej β -trypsyny przeprowadza się poprzez miareczkowanie jego centrów aktywnych substratem wybuchowym (ang. burst kinetics substrate), jakim jest NPGb (*p*-guanidynobenzoesan *p'*-nitrofenylu). Wprowadzenie trypsyny do buforu zawierającego NPGb, powoduje gwałtowny przyrost absorbancji („wybuch barwy”). Podczas reakcji hydrolizy katalizowanej przez bydlęcą β -trypsynę, uwolniony zostaje *p*-nitrofenol (barwa żółta), którego absorbancja mierzona przy długości fali $\lambda_{\text{ab}} = 410 \text{ nm}$ jest proporcjonalna do stężenia enzymu.

Miareczkowanie roztworu bydlęcej β -trypsyny przeprowadza się w jednorazowych kuwetach polistyrenowych, zawierających 1,5 mL buforu weronalowego. Do 5 kuwet pomiarowych dodawać 20 μL NPGb, a następnie 50 μL roztworu podstawowego trypsyny. Dokonać pomiaru przyrostu absorbancji *p*-nitrofenolu przy długości fali 410 nm. Po zakończeniu pomiarów, korzystając z prawa Lamberta Beera, obliczyć stężenie aktywnej formy trypsyny. Odpowiedni wzór po uwzględnieniu rozcieńczeń przedstawia się następująco:

$$C = \frac{\Delta A}{16595} \times \frac{1570}{50} [\text{mol/dm}^3]$$

ΔA – średnia wartość absorbancji

Przy obliczeniach przyjąć wartość molowego współczynnika absorpcji *p*-nitrofenolu jako 16595 $\text{dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

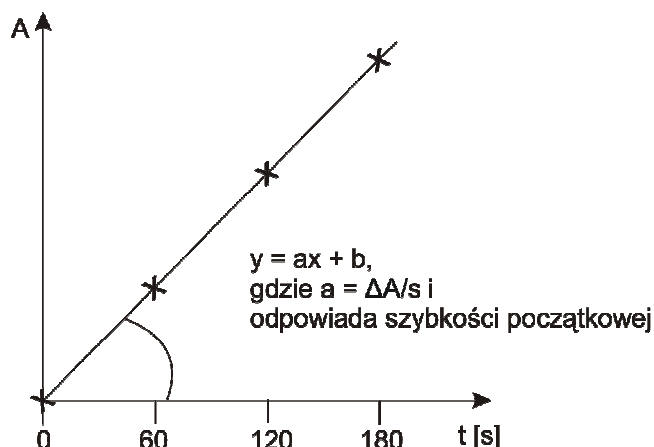
1.2. Standaryzacja roztworu podstawowego substratu

Roztwór podstawowy substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy) o stężeniu 5 mg/mL dimetylosulfotlenku (DMSO) rozcieńczyć 2, 4, 10 i 20 razy. Z każdego rozcieńczonego roztworu substratu pobrać 20 μL i dodać do jednorazowej kuwety polistyrenowej zawierającej 1,5 mL buforu 0,1 M Tris/HCl zawierającego 20 mM CaCl_2 oraz Triton X-100, pH 8,3. W kolejnym etapie do kuwety dodać 20 μL roztworu podstawowego trypsyny. Reakcję hydrolizy prowadzić do momentu uzyskania stałej wartości absorbancji przy 410 nm, **trwa to zwykle kilkanaście minut**. Stężenie substratu obliczyć zgodnie z prawem absorpcji Lamberta-Beera, stosując molowy współczynnik absorpcji dla *p*-nitroaniliny wynoszący $9800 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

1.3. Procedura wyznaczania parametrów kinetycznych

Do 5 jednorazowych kuwet polistyrenowych zawierających po 1,5 mL buforu 0,1 M Tris/HCl z dodatkiem 20 mM CaCl_2 oraz Tritonem X-100, pH 8,3, dodać po 20 μL roztworów substratu (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy) o odpowiednim stężeniu. Do pierwszej kuwety dodać roztwór podstawowy substratu, do drugiej roztwór substratu 2-krotnie rozcieńczony, do trzeciej 4-krotnie rozcieńczony, do czwartej 10-krotnie rozcieńczony, a do piątej 20-krotnie rozcieńczony. Następnie do pierwszej kuwety dodać 20 μL roztworu enzymu o dobranym wcześniej stężeniu (stężenie podane przez prowadzącego ćwiczenia, np. 5-krotnie rozcieńczony roztwór podstawowy). Kuwetę zawierającą bufor, substrat i enzym umieścić w spektrofotometrze i zarejestrować wartość absorbancji w następujących odstępach czasu: 0 sekund, 60 sekund, 120 sekund i 180 sekund. Opisaną procedurę powtórzyć dla pozostałych czterech kuwet.

Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji wyznaczyć w oparciu o równanie regresji liniowej początkowe szybkość hydrolizy substratu (rys. 3).



Rys. 3. Wyznaczanie początkowych szybkości hydrolizy (V)

Otrzymane wartości początkowych szybkości hydrolizy (V) wyznaczone przy zmieniającym się stężeniu substratu, wyrażone w jednostkach absorbancji na minutę (A/s), korzystając z prawa Lamberta Beera, przeliczyć na wartości początkowych szybkości hydrolizy wyrażone w mol/s.

Dla wyznaczonych wartości V i [S] obliczyć $1/V$ oraz $1/[S]$ i wyniki umieścić w tabeli:

	y		x
V	$1/V$	[S]	$1/[S]$

Na podstawie danych zawartych w tabeli narysować krzywą Lineweavera-Burka stanowiącą graficzne rozwiązanie równania (13). Wyznaczyć równanie regresji liniowej, gdzie $a = K_M/V_{\max}$ i $b = 1/V_{\max}$, a następnie obliczyć $V_{\max}$ i K_M , oraz znając stężenie enzymu (E_C), obliczyć wartość $k_{\text{cat}} = V_{\max}/E_C$ oraz wartość stałej specyficzności k_{cat}/K_M .