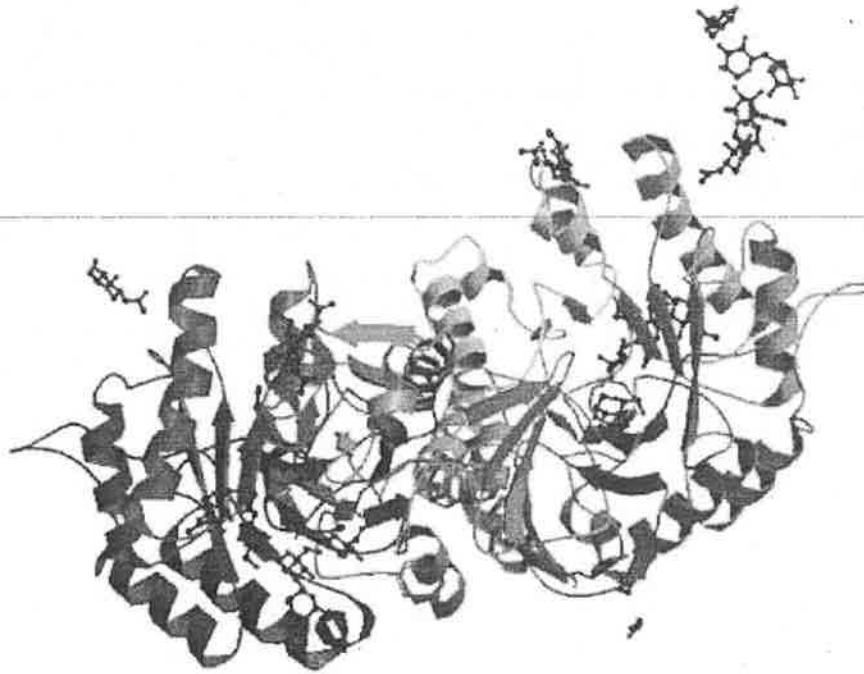


Enzymkinetik og Michaelis-Menten modellen



Alfa-galctosidase [<http://www.ebi.ac.uk/>]

Navn	Gymnasium

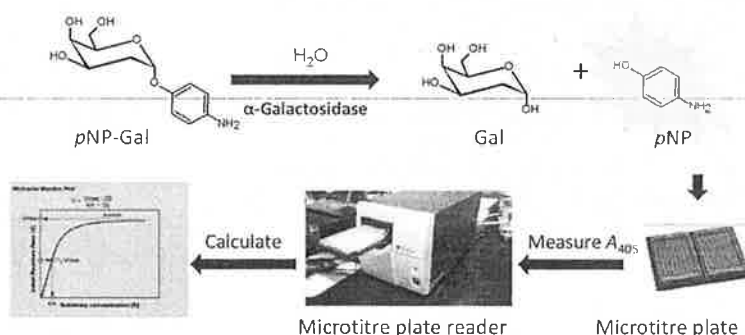
Indhold

1. Introduktion	3
1.1 Hydrolyse- kinetik af pNP-Gal vha. α -galactosidase.....	3
1.2 Introduktion til hæmmere (Inhibitor).....	5
2. Materialer	7
3. Enzymkinetik eksperiment med den industrielle alpha-galactosidase	8
3.1. Standardkurve.....	8
3.2. Enzymkinetik eksperiment.....	9
3.3. Hæmning af alpha-galactosidase eksperiment.....	10
4. Dataanalyse af enzymkinetik.....	12
4.1 Stanard + enzymkinetik.....	12
4.2. Enzymkinetik med hæmmer	16

1. Introduktion

α -Galactosidase katalyserer hydrolysen af terminale galactosylender (residues) i α -galactosid. Man vil typisk kunne måle aktiviteten af disse enzymer ved at bruge den syntetiske substratanalog *para*-nitrophenyl- α -galactoside (pNP-Gal), som bliver hydrolyseret til galactose (Gal) og *para*-nitrophenyl (pNP) (Figur 1.1). pNP-Gal er farveløst, mens pNP produktet er gult og kan blive kvantativt bestemt ved at måle absorbansen A_{405} ved 405 nm med en mikrotiterplade aflæser.

Figur 1.1 Skematisk visning af galactosidase aktivitet eksperimentet: pNP er blevet kvantificeret ved brug af mikrotiter plade aflæseren, som måler absorbansen ved 405 nm. For at kunne måle enzymaktiviteten, benyttes en standardkurve til at beregne koncentrationen af produktet ud fra absorbansen.

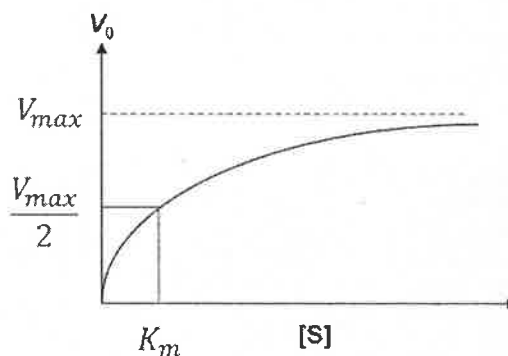


1.1 Hydrolyse- kinetik af pNP-Gal vha. α -galactosidase

I laboratorie del 1 skal vi undersøge hydrolysehastighedens afhængighed af substratkoncentrationen. Michaelis-Menten plot (Figur 1.2) beskriver forholdet mellem hydrolysehastigheden og substratkoncentrationen som er kendt. Ud fra disse værdier kan man estimere de to vigtige parametre V_{max} og K_m (se figurteksten til Fig. 1.2)

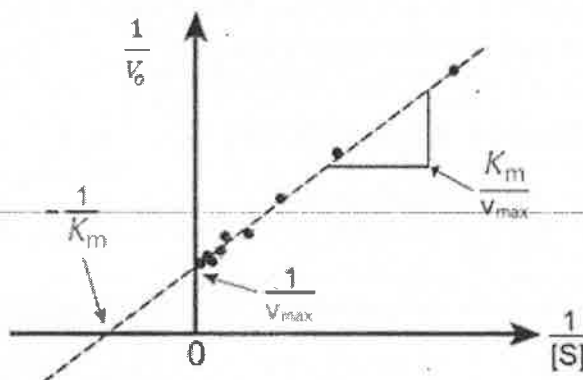
Den indledende reaktionshastighed V_0 kan bestemmes ud fra $\Delta[P]/\Delta t$, som beskriver ændringen i produkt koncentrationen ($[P]$) pr. tid (Δt).

Figure 1.2. Michaelis-Menten plot: Indledende reaktionshastighed V_0 som funktion af substratkoncentrationen $[S]$. K_m er den substrat koncentrationen, der svarer til det halve af maximum reaktionshastigheden, V_{max} , hvilket afspejler mætningen af enzymets aktive site med substrat.



Ved at bruge et andet plot, Lineweaver-Burk plot, kan man bestemme V_{max} og K_m ud fra skæringerne på henholdsvis y-aksen og x-aksen (Figur 1.3). Man laver et Lineweaver-Burk plot ved at plotte den reciproke reaktionshastighed ($1/V_0$) mod den reciproke substratkoncentration ($1/[S]$).

Figure 1.3. Lineweaver-burk plot: Efter at have bestemt V_0 ved forskellige substratkoncentrationer, laves der et Lineweaver-burk plot. En ret linje er indlagt til de reciproke data og herfra kan K_m bestemmes ud fra skæringen med x-aksen og V_{max} ud fra skæringen med y-aksen. Skæringerne er udregnet ud fra linjens ligning.



Turnover rates (turnoverhastighed) konstant:

Den katalytiske turnover hastigheds konstant K_{cat} (reaktions hastigheden for 1 enzym molekyle) har enheden 1/sekund og udregnes som følger:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

1.2 Introduktion til hæmmere (Inhibitor)

Hæmmere er forbindelser som kan binde specifikt til enzymer og dermed reducere deres aktivitet og resultere i ændringer i enten K_m , V_{max} eller i begge. Målbare ændringer i de kinetiske parametre kan bestemmes ud fra et Lineweaver-Burk plot af en enzymatisk reaktion udført i tilstedeværelse af en hæmmer. Reversible (kan løsrive sig igen) hæmmere kan være kompetitiv, non-kompetitiv eller unkompetitiv, afhængigt af den måde de binder til deres enzymatiske target (enzymet). Med kompetitiv menes der at hæmmeren konkurrere om bindingen til enzymet.

Hæmningen af enzymaktiviteten og de målbare ændringer i de kinetiske parametre kan også visualiseres via Michaelis-Menten og Lineweaver-Burk plots (Fig. 2.1).

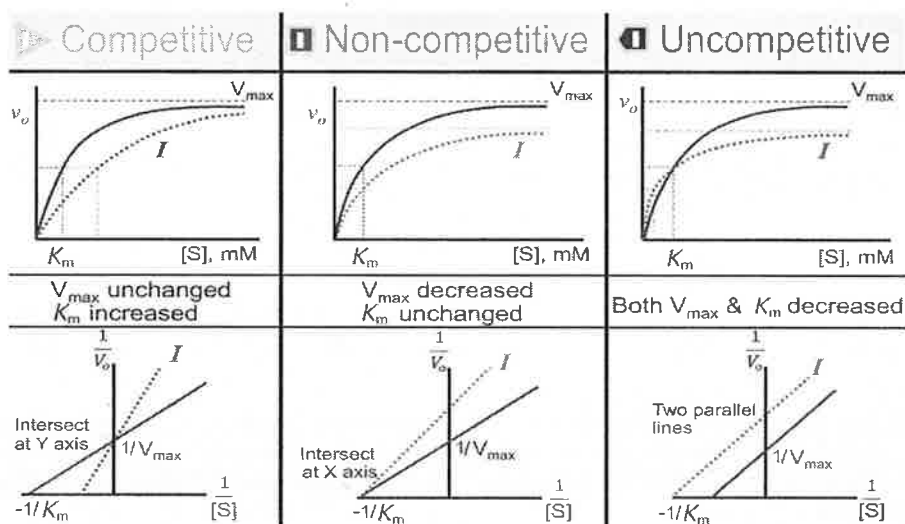


Figure 2.1. Hæmning af enzymaktivitet vist ved hjælp af Michaelis-Menten (øverst) og Lineweaver-Burk (nederst) plots. De stiplede sorte kurver er uden hæmmer mens de fuldt optrukne kurver er i tilstedeværelsen af hæmmer. V_o er initial reaktionshastigheden.

Hæmmere er karakteriseret ved deres hæmningsligevægtskonstant K_i , defineret som:

$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]}$$

Hvor $[I]$, $[E]$ og $[EI]$ er koncentrationerne af henholdsvis hæmmer (alene), enzym (alene) og enzym-hæmmer kompleks.

Ved **kompetitiv hæmning**, vil (apparent K_m) K_m^i i tilstedeværelsen af hæmmer blive betegnet som K_m^i . Den kemiske ligevægt for substratet (S) and hæmmer (I) der binder til enzymet (E) er vist nedenfor. K_m og K_m^i er relateret som beskrevet i nedenstående ligning.

Ved **non-kompetitiv hæmning**, vil (apparent V_{max}) V_{max}^i i tilstedeværelsen af hæmmer blive betegnet som V_{max}^i . V_{max}^i og V_{max} er relateret som beskrevet i nedenstående ligning.

Ved **unkompetitiv hæmning**, vil K_m og V_{max} i tilstedeværelsen af hæmmer blive betegnet som henholdsvis K_m^i og V_{max}^i . K_m og V_{max} er relateret til K_m^i og V_{max}^i som beskrevet i nedenstående ligning.

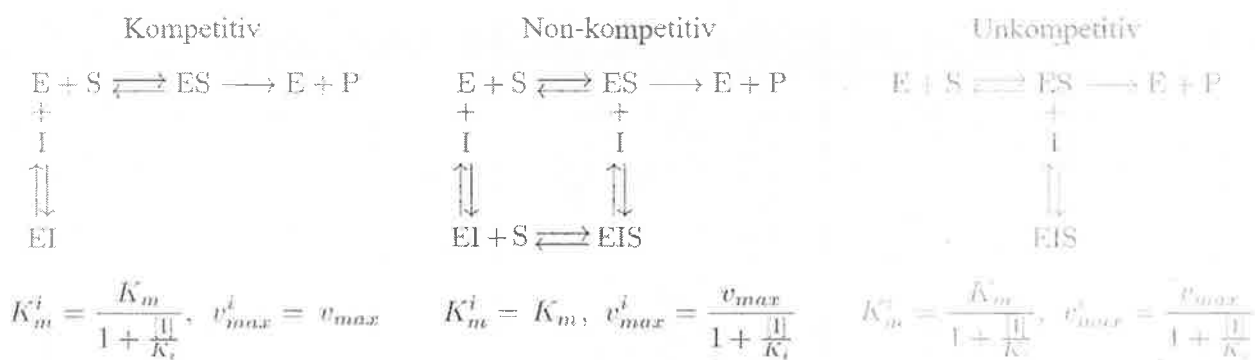


Figure 2.2. Den kemiske ligning for substrat (S) og hæmmers (I) binding til enzymet (E) er vist for de forskellige hæmningstyper, i toppen af ovenstående figur. Den nederste del af figuren viser ligningerne der relaterer ændringerne i de kinetiske parametre i forhold til hæmmer koncentrationer og til hæmmer ligevægt konstanten.

2. Materialer

- A. 1 p200 pipette. Brug p200 pipetten for volumener mellem 20-200 μL , medmindre der står beskrevet noget andet.
- B. 1 p1000 pipette. Brug p1000 pipetten for volumener mellem 201-1000 μL , medmindre der står beskrevet noget andet.
- C. 96 tips (pipettespidser) i en æske til p200 pipetten. Pipettespidserne skal smides ud efter brug, hvis ikke der står andet anført.
- D. 96 tips (pipettespidser) i en æske til p1000 pipetten. Pipettespidserne skal smides ud efter brug, hvis ikke der står andet anført.
- E. Over 30 microcentrifuge rør (1,5 ml).
- F. 1 rack (holder) til microcentrifuge rør.
- G. 1 mikrotiter plade mærket med jeres hold nr.
- H. 1 mikrotiter plade skabelon (udprint).
- I. 9 ml 2 M (Molar=mol/Liter) Na_2CO_3 (**Stop**).
- J. 6,5 ml 15 mM (milli-molar, milli= 10^{-3}) pNP-Gal (**Substrat**).
- K. 15 ml vand (**milliQ**).
- L. 5 ml 1mM pNP (**Standard**).
- M. 2 ml 0,24 mg/ml (**Enzym**).
- N. 5 ml 0,5 M (**Inhibitor**).

3. Enzymkinetik eksperiment med den industrielle alpha-galactosidase

3.1. Standardkurve

Begynd med at lave den standardkurve, som senere skal bruges til at måle produkt (pNP) koncentrationen af den enzymatiske reaktion. For at lave standardkurven skal man fortynde 1mM pNP standard stamopløsning (**Standard**) i stopreagensen (**Stop**).

1mM pNP standard stamopløsningen (**Standard**) skal, når det er nødvendigt, fortyndes i stopreagensen (**Stop**). Udregn voluminerne af pNP og stop reagens, som der behøvers for at forberede standardkoncentrationerne i et total volumen på 500 μL . Skriv udregnede værdier ind i nedenstående tabel (Tabel 1.1).

Tabel 1.1: Skema over opløsningerne til udregning af standardkurven.

Rørmarkat	St1	St2	St3	St4	St5
[pNP] standard (mM)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Volumen of standard stamopløsning (Standard) (μL)					
Volumen af stop reagens (Stop) (μL)					

Klargøring af standardkurve

1. Med din tusch skal du markere fem 1,5 ml mikrocentrifuge rør (eppendorf) som beskrevet første række i tabel 1.1: fra St1 til St5.
2. Overfør de forskellige voluminer af din 1mM pNP standard opløsning (**Standard**) til dine mærkede 1,5 ml rør. Voluminerne har du udregnet og skrevet i tabel 1.1 (**brug den samme pipette spids**).
3. Overfør de forskellige voluminer af stop opløsningen (**Stop**) til de mærkede rør. Voluminerne har du udregnet og skrevet i tabel 1.1. Standard opløsningerne skal mixes grundigt, ved at vende mikrocentrifuge røret op og ned 5 gange.
4. Overfør 100 μL vand (**MilliQ**) til brøndene A1-A5 og B1-B5 på microtiterpladen (**brug den samme pipette spids**), se Figur 1.4 (s. 11) og/eller brug microtiterplade skabelonen for hjælp til at pipettere i de korrekte brønde.
5. Overfør 50 μL af hver af de endelige pNP fortyndede standard (Tabel 1.1) i de samme brønde på microtiter pladen. Hver opløsning skal pipetteres to gange (dupletter) i to forskellige brønde (Dobbeltbestemmelser af de samme opløsninger betegnes I og II, figur 1.4)
6. Tilføj 100 μL stop opløsning (**Stop**) med en p1000 pipette til hver pNP standard (A1-A5 og B1-B5). Mix grundigt ved at pipettere opløsningen op og ned to gange.

Forsæt med del 1.2.2, hvor der skal klargøres den enzymatiske reaktionsmixture til mikrotiterpladerne.

3.2. Enzymkinetik eksperiment

Forbered de forskellige fortyndinger af pNP substratkoncentrationerne til kinetik eksperimentet.

1. Marker med en tusch fem 1,5 ml rør med S1-S5 (tabel 1.2).
2. 15 mM pNP substrat-stam-opløsningen (**Substrat**) er fortyndet med vand (**MilliQ**) i de mærkede 1,5 ml rør (se nedenstående tabel 1.2). De fortyndede opløsninger skal mikses grundigt ved at vende rørene op- og ned 5 gange.

Tabel 1.2: skema over substrat opløsningerne fra kinetik eksperimentet

Rørmarkat	S1	S2	S3	S4	S5
Volumen (µl) af substrat stam opløsningen (Substrat)	40	120	240	400	800
Volumen (µl) af vand (MilliQ)	960	880	760	600	200

3. Overfør 50 µL af hver af de fortyndede substratopløsninger (Tabel 1.2) og 50 µL vand (**MilliQ**) til mikrotiter pladen: brønd D1-D5 og E1-E5. (se figur 1.4 og/eller mikrotiterplade skabelonen)
4. Stil timeren (stopuret) til 5 minutter og start uret øjeblikkeligt efter du har pipetteret enzymopløsningen op i første brønd for at starte den første enzymatiske reaktion (S₁) som beskrevet nedenfor.
5. Pipetter 50 µL af 0,24 mg/ml α-galactosidase enzym (**Enzym**) over til brønd D1-D5 og E1-E5, se Figur 1.4 (s. 10). Start med S₁ og S₁₁ og fortsæt i den samme rækkefølge og tempo gennem hele forsøget indtil S₁₁5, for at starte den enzymatiske reaktion i hver brønd (herefter omtales dette som den "enzymatiske reaktions mixture"). For at sikre, at det er grundigt blandet, skal du hurtigt men forsigtigt pipettere 50 µl af mixturen op og ned i hver i brønd 2 gange.
6. Efter 5 minutters inkubationstid skal du tilføje 100 µL 2 M Na₂CO₃ opløsning (**Stop**) ved hjælp af 1000p pipetten for at stoppe enzym reaktionerne i brønd D1-D5 og E1-E5 i samme rækkefølge og tempo som du startede dem i. Mix grundigt ved at pipettere mixturen op og ned to gange.

Forsæt med del 1.2.3, hvor der skal klargøres den enzymatiske reaktionsmixture til mikrotiterpladerne med hæmning.

3.3. Hæmning af alpha-galactosidase eksperiment

Nu gennemføres forsøget med tilstedeværelsen af 50 μL hæmmer. Hæmmeren har en koncentration på 0,5 M (mol/liter).

Forberedelse af substratet til eksperimentet der viser hæmnings kinetik.

Tabel 2.1: Skema over substrat fortyndningerne for eksperimentet med kinetik målingerne.

Rørmarkat	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
Volumen (μL) af substrat stam opløsningen (Substrat)	80	160	320	600	840
Volumen (μL) af vand (MilliQ)	920	840	680	400	160

1. Forbered substrat koncentrationen ud fra tabel 2.1. Det er samme metode som der er brugt i del 1.2.2. Husk at mixe opløsningen ved at vende rørne op og ned fem gange.
2. Overfør 50 μL hæmmer (**Inhibitor**) til brøndene G1-G5 og H1-H5 på mikrotiterpladen. Der skal bruges den samme pipettespids. Se Figur 1.4 (s. 10) og/eller skabelonen til mikrotiterpladen).
3. Overfør 50 μL af hver slut substrat opløsning (substrat stamopløsning + vand, tabel 2.1) til de samme brønde (G1-G5 og H1-H5).
4. Sæt uret/alarm til 5 minutter. Efter at der er tilsat enzymopløsningen til den første brønd (IS₁) og startet den enzymatiske reaktion (som beskrevet nedenfor), skal man **øjeblikkeligt** begynde uret og registrere tiden.
5. Pipetter 50 μL α -galactosidase (**Enzym**) over i brønd G1-G5 og H1-H5. Begynd med brønd IS₁ og IS₁. Derefter skal der forsættes i den samme rækkefølge og i det samme tempo til IS₅, som der blev benyttes i forrige eksperiment.
6. For at sikre at prøverne er mixet grundigt, skal der forsigtigt pipetteres 50 μL af opløsningen op og ned to gange. Dette skal gøres øjeblikkeligt efter tilsætning af enzym (i hver brønd).
7. Efter 5 minutters inkubation skal der tilsættes 100 μL stop opløsning (**Stop**). Her skal der benyttes en p1000 pipette. Dette vil stoppe den enzymatiske reaktion i brøndene G1-G5 og H1-H5. Stop opløsningen skal tilsættes i den samme rækkefølge og i det samme tempo som den enzymatiske reaktion blev i gangsat.

8. Mix grundigt ved at pipettere op og ned et par gange. Dette skal gøres øjeblikkeligt efter tilførelsen af stop opløsningen.
9. Læs pladen ved $A_{405\text{ nm}}$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St _I 1	St _I 2	St _I 3	St _I 4	St _I 5							
B	St _{II} 1	St _{II} 2	St _{II} 3	St _{II} 4	St _{II} 5							
C												
D	S _I 1	S _I 2	S _I 3	S _I 4	S _I 5							
E	S _{II} 1	S _{II} 2	S _{II} 3	S _{II} 4	S _{II} 5							
F												
G	IS _I 1	IS _I 2	IS _I 3	IS _I 4	IS _I 5							
H	IS _{II} 1	IS _{II} 2	IS _{II} 3	IS _{II} 4	IS _{II} 5							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Figur 1.4: Forsøgsopsætning på pladen til kinestiske eksperimenter på mikrotiterpladen.

epoch biotech

4. Dataanalyse af enzymkinetik

4.1 Stanard + enzymkinetik

Opgaven er nu at bestemme de kinetiske parametre for α -galactosidasens hydrolyse af substratet.

Først skal der bestemmes den lineære funktion af standardkurven for produktet (*p*NP), ved at bruge data fra 3.1.

Ud fra standardkurven kan produktkoncentrationen udregnes i de forskellige reaktionsmixtures. Dette gør det lettere at bestemme enzymets initiale reaktionshastighed (V_0) for hver af de forskellige substrat koncentrationer.

1. Udregn den gennemsnitlige absorbans for hver dobbeltbestemmelse (måling af duplikater) og lav en standard kurve ud fra data fra 3.1. (*Hint: Koncentrationen af PNP (mM) plottes på x-aksen, mens gennemsnitlig absorbans A_{405} nm plottes på y-aksen.*)

Standard kurve af <i>p</i> NP absorbans ved 405 nm					
	St1	St2	St3	St4	St5
[<i>p</i> NP] (mM)	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Gennemsnitlig A_{405} nm fra duplikaterne					

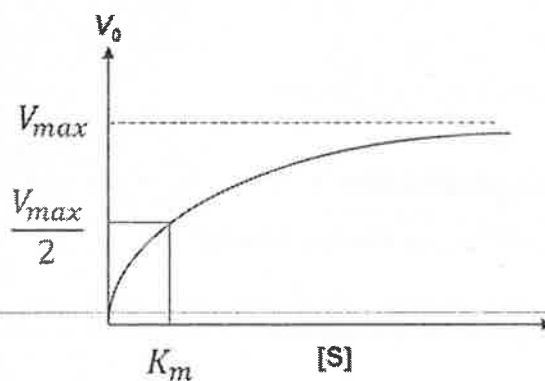
2. Bestem a og b matematisk ud fra standardkurvens lineære funktion, ved kun at bruge at den gennemsnitlige absorbans for de to punkter st1 og st5. (*Hint: Brug plottet fra spg. 1.*)

Hældning ud fra standard kurve (a)	
Skæring med y-aksen ud fra standard kurve (b)	

3. Angiv reaktions volumen, reaktionstiden, produktkoncentration, reaktionshastigheden (V_0), $1/[S]$ samt $1/[V_0]$ i sekunder i den næste tabel.

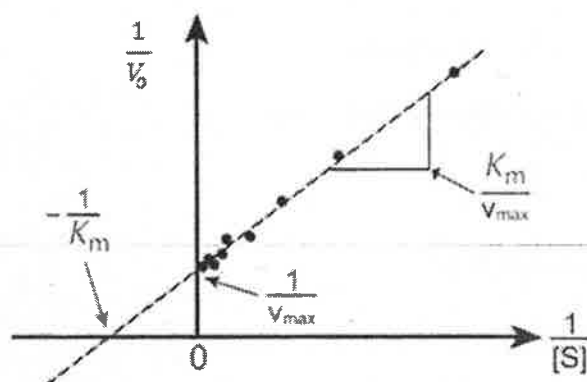
Rør mærket	S1	S2	S3	S4	S5
Volumen stam- opløsning (Substrat) (μl) (fra tabel 1.2)					
Volumen af vand (MilliQ) (μl) (fra tabel 1.2)					
Substrat koncentration $[S]$ før den bliver tilføjet til reaktion mixture (mM)					
Substrat koncentration $[S]$ i reaktions mixture <i>Hint: Tag forholdet mellem volumen af substrat og total volumen i betragtning!</i>					
Gennemsnitlig A_{405} absorbans for reaktions kørt med inhibitor					
$[\text{Produkt}_{\text{gennemsnit}}]$ (mM) <i>Hint: Brug ligningen fra standardkurven til at udregne produkt koncentration for hver reaktions mixture.</i> $A_{405} (\text{absorbans enheder ved } 405 \text{ nm}) = a * [pNP](\text{mM}) + b$ <i>hvor a er hældningen og b er skæringen på y-aksen.</i>					
Reaktionshastighed, V_0 ($\mu\text{M}/\text{sekund}$) <i>OBS: Husk at omregne fra mM til μM!</i>					
$1/[S]$ ($1/\text{mM}$)					
$1/V_0$ ($\text{sekund}/\mu\text{M}$)					

4. Indsæt datapunkter og estimer derefter V_{\max} og K_m ud fra et Michaelis-Menten plot.
(Hint: Koncentrationen af substratet (mM) plottes på x-aksen, mens reaktionshastigheden V_0 ($\mu\text{M}/\text{sekund}$) plottes på y-aksen)



V_{\max} ($\mu\text{M}/\text{s}$)	
K_m (mM)	

5. Indsæt datapunkter og bestem den lineære funktion af Lineaweaver-Burk plottet i.
(Hint: $1/[S]$ (mM) plottes på x-aksen, mens $1/V_0$ plottes på y-aksen.)



- Der skal benyttes nedenstående funktion. a og b skal udregnes ud fra data punkterne for S1 og S5,

$$1/[V_0] = a * 1/[S] + b$$

a (mM·s/ μM)	
b (s/ μM)	

6. Brug den lineære funktion som blev udregnet i 5 til at bestemme K_M og V_{max} matematisk ud fra skæringerne med akserne.

V_{max}	
K_M	

7. Udregn enzym koncentrationen i reaktions mixture i μM ud fra enzym stamopløsning koncentration=0,24 mg/ml og enzymets molare masse (75000 g/mol).

Enzym stamopløsning (mg/ml)	0.24
Mol af enzymet i reaktionsmixture	
[E] (μM) in reaction mixture (micro= 10^{-6})	
Hint: anvend følgende formel: $c = \frac{n}{V}$ V: Total reaktionsvolumen på 150 μl	

8. Bestem K_{cat} (turnover rate) [1/sekund] (se formel beskrevet i indledningen)

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

K_{cat}	
-----------	--

4.2. Enzymkinetik med hæmmer

- Ligesom forrige sektion angives eller udregnes reaktions volumen, reaktionstiden, produktkoncentration, reaktionshastigheden (V_0), $1/[S]$ samt $1/[V_0]$ i sekunder i den næste tabel. For at udregne produkt koncentrationerne i mM skal standardligningen som blev udledt tidligere bruges.

Rør mærket	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
Volumen stam- opløsning (Substrat) (μl) (fra tabel 2.1)					
Volumen af vand (MilliQ) (μl) (fra tabel 2.1)					
Substrat koncentration $[S]$ før den bliver tilføjet til reaktion mixture (mM)					
Substrat koncentration $[S]$ i reaktions mixture <i>Hint: tag forholdet mellem volumen af substrat og total volumen i betragtning!</i>					
Gennemsnitlig A_{405} absorbans for reaktions kørt med inhibitor					
$[\text{Produkt}_{\text{gennemsnit}}]$ (mM) <i>Hint: Brug ligningen fra standardkurven til at udregne produkt koncentration for hver reaktions mixture.</i> $A_{405} (\text{absorbans enheder ved } 405 \text{ nm}) = a * [pNP](\text{mM}) + b$ <i>hvor a er hældningen og b er skæringen på y-aksen.</i>					
Reaktionshastighed, V_0 ($\mu\text{M}/\text{sekund}$) <i>OBS: husk at omregne fra mM til μM!</i>					
$1/[S]$ (1/mM)					
$1/V_0$ (second/ μM)					

- Fremstil et Lineweaver-burk plot på baggrund af hæmnings kinetiske data IS1-IS5.
(Hint: $1/[S]$ (mM) plottes på x-aksen, mens $1/V_0$ plottes på y-aksen.)

3. Bestem matematisk den lineære funktion af Lineweaver-burk plottet (brug evt kun 1S1-IS5 hvis for et hurtigt overslag).

$$1/[V_o] = a * 1/[S] + b,$$

a (mM·s/μM)	
b (s/μM)	

4. Bestem ud fra et Lineweaver-Burk plot, de ændrede kinetiske parametre ved tilstedeværelsen af hæmmer. Kan gøres grafisk, se teoriafsnittet.

V_{max}	
K_M	

