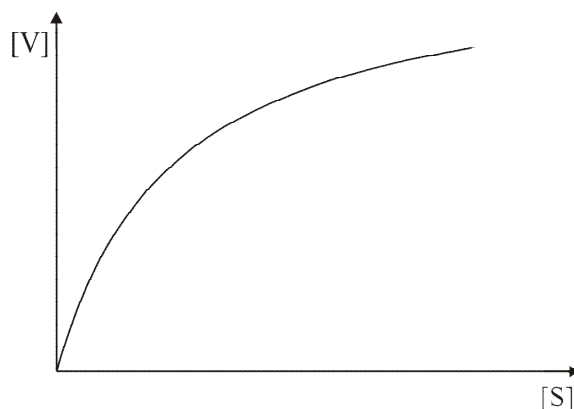


4. Badanie kinetyki enzymów – część II

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.

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_2 lub może się przekształcać, tworząc produkt (P) ze stałą szybkości k_3 .

Reakcje enzymatyczne stanowią zwykle złożony układ, składający się z kilku pośrednich reakcji o różnych stałych szybkości k . Szybkości poszczególnych przemian (równanie 1) przedstawiają się następująco:

$$V_1 = k_1 \times [E] \times [S] \quad (2)$$

$$V_2 = k_2 \times [ES] \quad (3)$$

$$V_3 = k_3 \times [ES] \quad (4)$$

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.

Kompleks ES tworzy się z szybkością V_1 , a rozpada z szybkością V_2 i V_3 . W stanie równowagi można przyjąć, że $V_1 = V_2 + V_3$. Stąd:

$$k_1 \times [E] \times [S] = (k_2 + k_3) \times [ES] \quad (5)$$

Szybkość początkowa reakcji zależy od szybkości rozpadu kompleksu ES (k_2+k_3), 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).

$$K_M = \frac{k_2+k_3}{k_1} = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} \quad (6)$$

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

$$[E] = [E_p] - [ES] \quad (7)$$

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

$$V = V_3 = k_3 \times [ES] \quad (8)$$

Przekształcając i podstawiając odpowiednio równania (7) i (8) do równania (6) otrzymuje się:

$$V = k_3 E_p \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

gdzie: $k_3 = k_{cat}$, zdefiniowane jako stała katalityczna

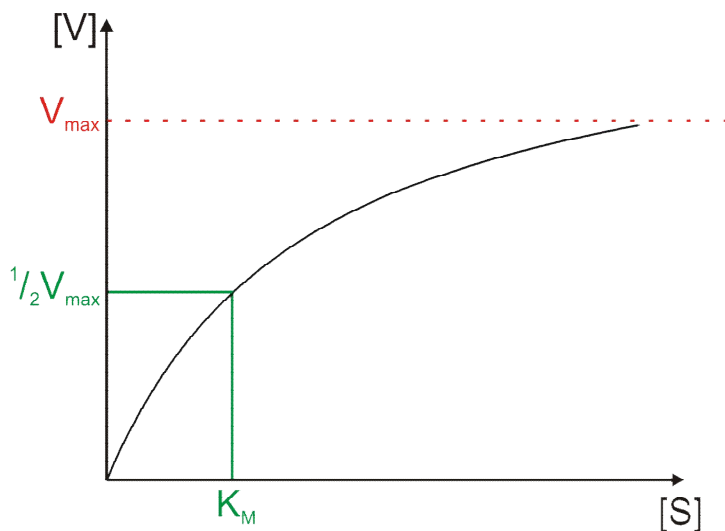
Maksymalną szybkość reakcji V_{max} uzyskuje się wtedy, kiedy wszystkie miejsca enzymu są wysycane przez substrat, to znaczy, kiedy $[S] \gg K_M$, czyli $[S]/([S]+K_M)$ jest bliskie 1. Stąd:

$$V_{max} = k_3 \times E_p \quad (10)$$

W wyniku podstawienia równania (10) do równania (9) otrzymuje się równanie Michaelisa-Menten:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

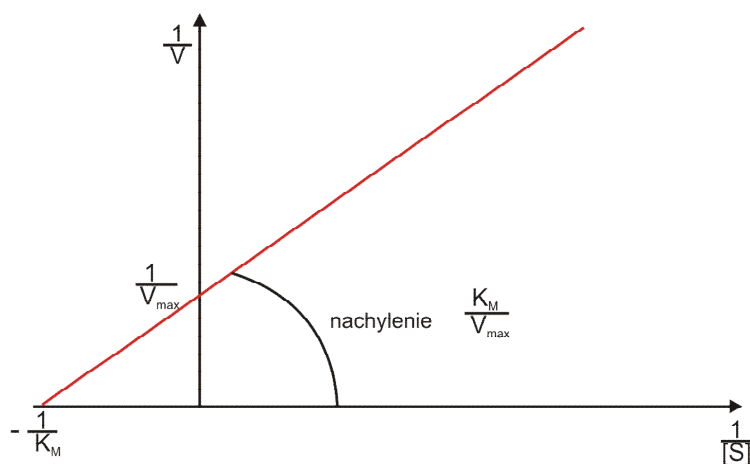
Rozwiązaniem równania (11) jest krzywa przedstawiona na rysunku 2.



Rys. 2. Wykres zależności szybkości reakcji V od stężenia substratu $[S]$, dla enzymu zachowującego się zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten

Równanie Lineweavera-Burka (12) jest przekształceniem wzoru Michaelisa Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (12)$$



Rys. 3. 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} , $k_{\text{cat}} = V_{\max}/E_0$, 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 trypsyny (7 mg w 1 mL 1 mM HCl z dodatkiem 20 mM CaCl_2), (pH 3,0)
4. Roztwór substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy) (stężenie roztworu podstawowego 2,5 mg/mL DMSO)
5. Bufor weronalowy o stężeniu 0,1 M 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 0,1 M Tris/HCl zawierający 20 mM CaCl_2 oraz 0,005% 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 $\lambda_{ab} = 410$ 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 μ L NPGB, a następnie 50 μ L roztworu podstawowego trypsyny. Dokonać pomiaru przyrostu absorbancji *p*-nitrofenolu przy długości fali 410 nm. Po zakończeniu pomiarów, korzystając z prawa Lamberta Beera, obliczyć stężenie trypsyny. Odpowiedni wzór po uwzględnieniu rozcieńczeń przedstawia się następująco:

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

ΔA – średnia wartość absorbancji

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

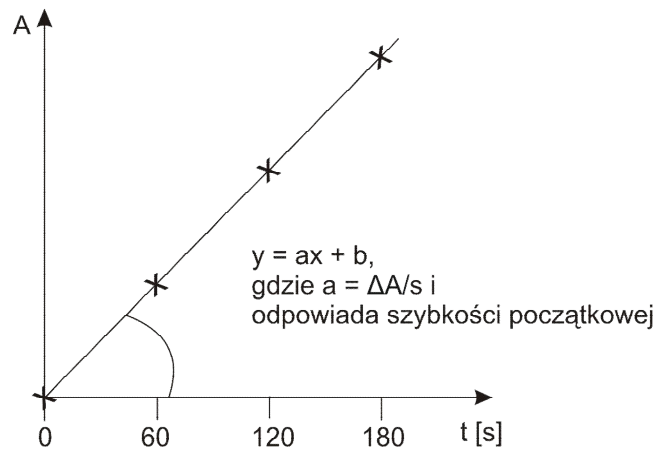
1.2. Standaryzacja roztworu podstawowego substratu

2,5 mg substratu chromogenicznego (*p*-nitroanilidu-D,L-argininy) rozpuścić w 1 mL dimetylosulfotlenku (DMSO). Następnie rozcieńczyć roztwór podstawowy 2, 5, 10 i 20 razy. Z każdego rozcieńczonego roztworu substratu pobrać 20 μ L i dodać do jednorazowej kuwety polistyrenowej zawierającej 1,5 mL buforu 0,1 M Tris/HCl zawierającego 20 mM CaCl_2 oraz 0,005% Tritonu X-100, pH 8,3. W kolejnym etapie do kuwety dodać 20 μ L 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 kilkudziesięciu jednorazowych kuwet polistyrenowych i zawierających 1,5 mL buforu 0,1 M Tris/HCl zawierającego 20 mM CaCl_2 oraz 0,005% Tritonu X-100, pH 8,3, dodać po 20 μ L roztworu substratu o odpowiednim stężeniu, a następnie 20 μ L roztworu enzymu o dobranym wcześniej stężeniu (stężenie podane przez prowadzącego ćwiczenia). Objętość dodawanego substratu i enzymu jest zawsze stała i wynosi 20 μ L.

Kuwetę pomiarową umieścić w spektrofotometrze i zarejestrować wartość absorbancji w następujących odstępach czasu: 0 sekund, 60 sekund, 120 sekund i 180 sekund. Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji wyznaczyć w oparciu o równanie regresji liniowej początkowe szybkość hydrolizy substratu (rys. 4).



Rys. 4. 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 (12). 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_0), obliczyć wartość $k_{cat} = V_{max}/E_0$ oraz wartość stałej specyficzności k_{cat}/K_M .