

ΠΕΙΡΑΜΑ 4: Κινητική μελέτη Τυροσινάσης (Αναφορά Εργαστηρίου)

Όν/μο (α): _____ Α.Μ.: _____

Ημέρα/Θέση: _____ Ημ/νία: _____

A. Υπολογισμός της συγκέντρωσης της τυροσινάσης

Απορρόφηση του άγνωστου δ/τος της τυροσινάσης στα 280nm, A_2 : _____

Η συγκέντρωση της τυροσινάσης υπολογίζεται από τον τύπο

$$\frac{c_1}{A_1} = \frac{c_2}{A_2}$$

Όπου:

c_1 = συγκέντρωση ενός πρότυπου δ/τος τυροσινάσης 1% w/v

A_1 = απορρόφηση του πρότυπου δ/τος της τυροσινάσης στα 280nm = 24,9

c_2 = συγκέντρωση του άγνωστου δ/τος της τυροσινάσης σε % w/v

A_2 = απορρόφηση του άγνωστου δ/τος της τυροσινάσης στα 280nm.

Μετατρέψτε τη συγκέντρωση της τυροσινάσης σε mg/ml

B. Οργάνωση δεδομένων

Μέρος Β

Καταγράψτε τις απορροφήσεις στις χρονικές στιγμές που επιλέξατε για τις διαφορετικές ποσότητες ενζύμου που προσθέσατε στην αντίδραση.

Όγκος ενζύμου (ml)	Αρχή	30''	60''	90''	120''	150''	180''
0,1	0						
0,2	0						
0,3	0						
0,4	0						

Μέρος Γ

Καταγράψτε τις απορροφήσεις στις χρονικές στιγμές που επιλέξατε για τις διαφορετικές ποσότητες υποστρώματος που προσθέσατε στην αντίδραση.

Όγκος υποστρώματος (ml)	Αρχή	30''	60''	90''	120''	150''	180''
0,1	0						
0,2	0						
0,4	0						
0,8	0						
1,0	0						

Γ. Υπολογισμοί

Αναφέρετε την συγκέντρωση της τυροσινάσης την οποία υπολογίσατε και έχετε μετατρέψει σε mg/ml.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμου για τις μετρήσεις κινητικής

1. Υπολογίστε τις ταχύτητες των αντιδράσεων εκφράζοντας τις ως $\Delta A/\Delta \text{min}$. Εάν επιλέξετε να σχεδιάσετε τα διαγράμματα των απορροφήσεων προς το χρόνο για να υπολογίσετε την αρχική ταχύτητα μπορείτε να τα συμπεριλάβετε στην αναφορά. Εάν κάνετε τους υπολογισμούς με διαφορετικό τρόπο επίσης να τον δείξετε στην αναφορά.
2. Φτιάξτε το σχεδιάγραμμα της ταχύτητας ($\mu\text{mol}/\text{min}$) προς ποσότητα ενζύμου E (mg).

Για να το επιτύχετε αυτό πρέπει το $\Delta A/\text{min}$ να μετατραπεί σε μια πιο χρήσιμη μορφή - ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος προς το χρόνο-συγκεκριμένα σε $\mu\text{mol}/\text{min}$. Η μετατροπή αυτή γίνεται όταν χρησιμοποιηθεί ο νόμος του Beer στην εξής μορφή:

$$C = A/(E \cdot l)$$

όπου E είναι ο συντελεστής απορρόφησης του προϊόντος, dopachrome ($3600 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Για παράδειγμα, αν $\Delta A/\text{min}$ είναι ίσο με 0,1 τότε η μετατροπή σε μmoles σχηματιζόμενου προϊόντος γίνεται με τον παρακάτω τρόπο:

$$\begin{aligned} \Delta c &= \frac{\Delta A/\text{min}}{E \cdot l} = \frac{0,1/\text{min}}{(3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot \text{cm}} = 2,78 \cdot 10^{-5} \text{ M}/\text{min} = 27,8 \mu\text{M}/\text{min} = \\ &= 27,8 \mu\text{mol}/\text{min} \text{ lt} \cdot 0,003 \text{ lt} = 0,083 \mu\text{mol}/\text{min} \end{aligned}$$

(Ο όγκος της αντίδρασης στο συγκεκριμένο πείραμα είναι 3 ml ή 0,003 lt).

Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα :

Όγκος ενζύμου (ml)	$\Delta A_{475}/\text{min}$	mg ενζύμου	$\mu\text{mol}/\text{min}$
0,1			
0,2			
0,3			
0,4			

3. Όταν συμπληρώσετε τον παραπάνω πίνακα, κατασκευάστε το διάγραμμα της ταχύτητας (μmole/min στον άξονα y) προς τη συγκέντρωση του ενζύμου σε κάθε περίπτωση (mg στον άξονα x). Ενώστε όσο το δυνατόν περισσότερα σημεία με μια ευθεία γραμμή η οποία να διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

4. Ποια ποσότητα ενζύμου επιλέξατε για το μέρος B; Εξηγήστε

Κινητική τυροσινάσης- Υπολογισμός K_m , V_{max}

MB L-DOPA: 197,2 Da

1. Υπολογίστε τα units της ενζυμικής ενεργότητας για κάθε ποσότητα υποστρώματος. Υπολογίστε επίσης τη συγκέντρωση του υποστρώματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες τη χρονική στιγμή μηδέν. Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα:

#Δείγματος	Όγκος υποστρώματος (ml)	Συγκέντρωση υποστρώματος (mM)	$\Delta A_{475}/\text{min}$	μmole/min	1/[S]	$[\mu\text{mol}/\text{min}]^{-1}$

1. Φτιάξτε το διάγραμμα Michaelis-Menten τοποθετώντας τις τιμές (μmole/min) στον άξονα y και τις τιμές [S] (mM) στον άξονα x. Υπολογίστε τα K_m , V_{max} από το διάγραμμα αυτό (κατά προσέγγιση φυσικά).
2. Φτιάξτε το διάγραμμα Lineweaver-Burk και υπολογίστε τα K_m , V_{max} και από αυτό το διάγραμμα και συγκρίνετε με τις τιμές που υπολογίσατε κατά προσέγγιση.

3. Χρησιμοποιήστε το μοριακό βάρος της τυροσινάσης (128 kDa) για να βρείτε πόσα μmol τυροσινάσης περιέχονται στους σωλήνες που χρησιμοποιήσατε, για να υπολογίσετε το V_{max} .

4. Ο αριθμός μετατροπής είναι ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που παράγονται ανά λεπτό από 1 mol ενζύμου όταν $v = V_{\text{max}}$. Χρησιμοποιώντας το νούμερο από τον προηγούμενο υπολογισμό και το V_{max} από το διάγραμμα Lineweaver-Burk, υπολογίστε τον αριθμό μετατροπής για την τυροσινάση. Το $[E_{\text{tot}}]$ υπολογίζεται σε μmole .