

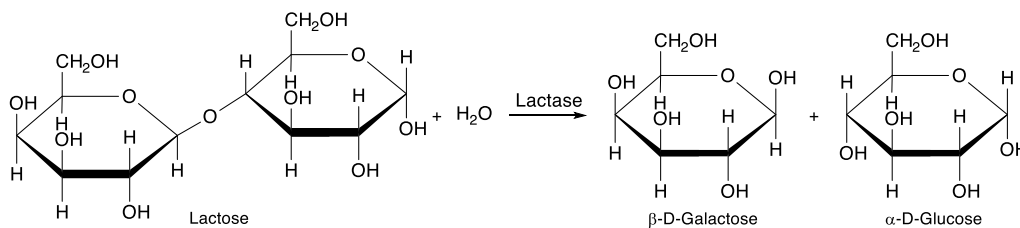


Ekspæriment

Undersøgelse af enzymkinetikken for lactase

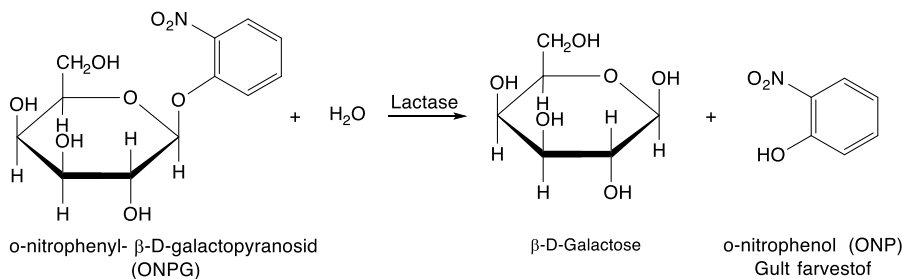
Pattedyrs, også menneskets, modernælk indeholder disaccharidet lactose som også kaldes mælkesukker.

Fra fødslen kan pattedyr danne enzymet lactase, som katalyserer hydrolyse af lactose til D-glucose og D-galactose:



Disse monosaccharider udgør en vigtig energikilde i dyr og mennesker i den første levetid. Men evnen til at kunne danne enzymet lactase forsvinder hos pattedyr og de fleste mennesker, så lactose ikke længere kan nedbrydes i tyndtarmen. Læs mere herom side 45-46.

I forsøget benyttes et syntetisk substrat, **ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranosid** (forkortet ONPG) i stedet for disaccharidet lactose. Substratet spaltes af lactase til **ortho-nitrophenol** (forkortes ONP) og β-D-galactose:



Lactose erstattes af ONPG da udviklingen af det gule produkt ONP kan følges med spektrofotometri ved en bølglængde på 420 nm. ONP følger ved 420 nm Lambert-Beers lov med den molare absorptionskoefficient, $\epsilon_{\lambda} 4,50 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

1. Opskriv Lambert-Beers lov for ONP ved 420 nm.
2. Vis hvordan denne sammenhæng kan benyttes til at omregne de målte absorbanser til aktuelle stofmængdekonzentrationer af ONP.

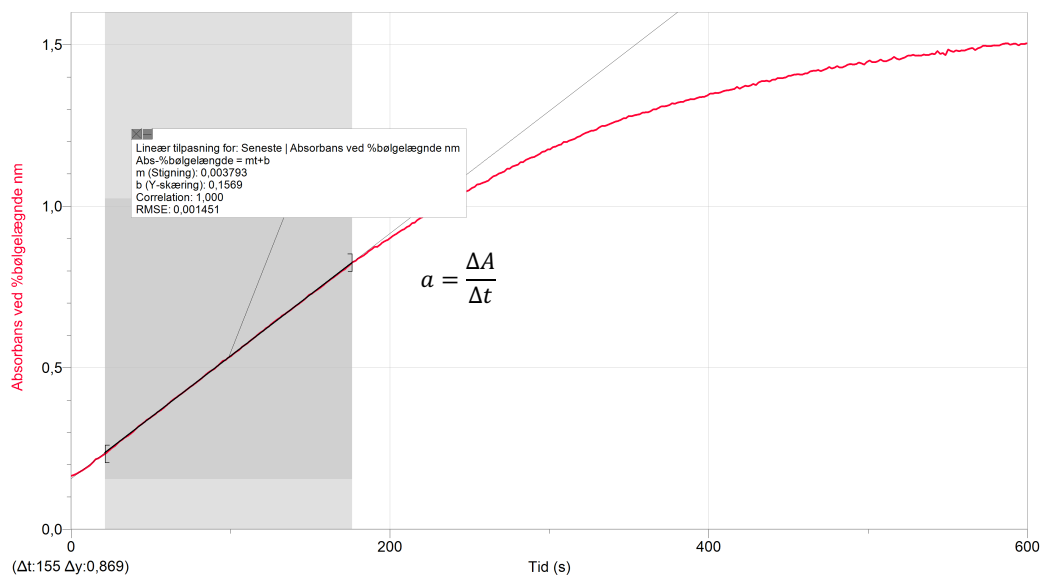
I forsøget følges reaktionens forløb ikke ved at følge ændringen i substratets koncentration, men ved at følge et af reaktionens produkter (ONP). Men da forholdet mellem substratet ONPG og produktet ONP er 1:1, vil metoden derfor svare til, at man målte direkte på substratet.



Reaktionshastigheden vil da være givet som:

$$v = -\frac{d[\text{ONPG}]}{dt} = \frac{d[\text{ONP}]}{dt} \quad (1)$$

I forsøget bestemmes initialhastigheden v ved en bestemt stofmængdekonzentration af substratet, mens alle andre parametre i forsøget, fx enzymkoncentration, pH og temperatur holdes konstant. Et eksempel på en måling er vist i figur 1.



Figur 1. Måling af absorbansen ved 420 nm som funktion af tiden for den enzymkatalyserede omdannelse af ONPG til ONP.

Absorbansen vokser som funktion af tiden og på det første stykke er der en lineær sammenhæng.

3. Forklar at det lineære stykke af grafen i figur 1 viser at reaktionshastigheden v er konstant i dette tidsrum. (Hjælp: Inddrag Lambert-Beers lov opskrevet i opgave 1 og definitionen af reaktionshastigheden i (1)).

Ved beregning af initialhastighederne v ud fra de målte værdier af absorbansen benyttes en faktor $13,3 \cdot 10^3$. Denne værdi ganges på den målte absorption for at få initialhastigheden v målt i enheden $\mu\text{M}/\text{min}$.

Her følger en forklaring på denne omregning. Det antages at målingerne af absorptionen følger Lambert-Beers lov:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot [P]$$

I det følgende betegner A_0 og A_1 henholdsvis absorbansen målt til tiden t_0 og absorbansen målt til tiden t_1 .



De tilhørende koncentrationer af produkt er $[P]_0$ og $[P]_1$. Reaktionshastigheden v defineret ud fra produktet er følgende:

$$v = \frac{d[P]}{dt} \approx \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{[P]_1 - [P]_0}{t_1 - t_0} = \frac{\frac{A_1}{\epsilon_{\lambda} \cdot l} - \frac{A_0}{\epsilon_{\lambda} \cdot l}}{t_1 - t_0} = \frac{1}{\epsilon_{\lambda} \cdot l} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (2)$$

Størrelserne ϵ_{λ} og l er konstanter hvis værdier er kendte. For ONP ved 420 nm er den molare absorptionskoefficient givet tidligere. I forsøget måles hældningen a (se figur 1, $a = \frac{\Delta A}{\Delta t}$) for den lineære sammenhæng mellem tiden t og absorbansen A . Hældningen a er målt i enheden sekunder. For at få enheden af hastigheden i enheden $\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$, laves følgende omregning:

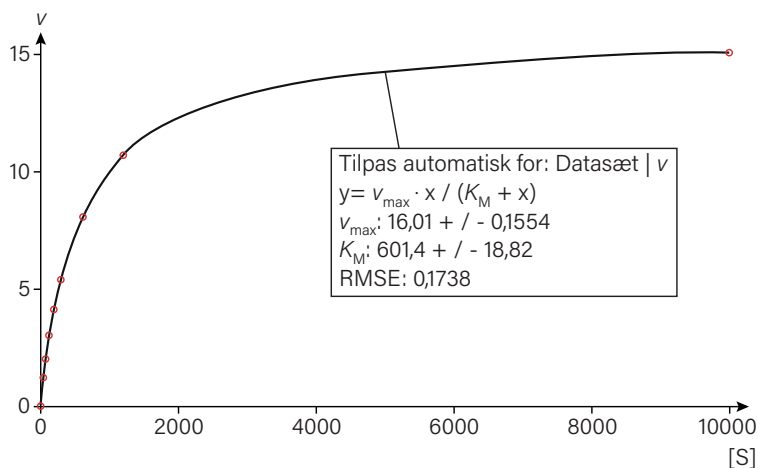
$$v_0 = \frac{1}{\epsilon_{\lambda} \cdot l} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \approx \frac{1}{4,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1,00 \text{ cm}} \cdot \underbrace{1 \cdot 10^6 \frac{\mu\text{M}}{\text{M}}}_{\text{omregning}} \cdot \underbrace{60 \frac{\text{s}}{\text{min}} \cdot a \frac{1}{\text{s}}}_{\text{omregning af tid}} =$$
$$\frac{1000000 \cdot 60}{4500} \cdot a \frac{\mu\text{M}}{\text{min}} \approx v_0 = 13,3 \cdot 10^3 \cdot a \frac{\mu\text{M}}{\text{min}} \quad (3)$$

Størrelsen a (hældningen) måles i forsøget.¹

Enzymer karakteriseres ved deres effektivitet til at spalte substrater. Ofte anvendes Michaelis-Menten kinetik til at beskrive sammenhængen mellem koncentrationen af substrat, $[S]$, og reaktionshastigheden v . Læs mere herom side 52-54. I forsøget måles reaktionshastigheden som initialhastigheden (begyndeshastigheden). Michaelis-Menten kinetik er beskrevet ved følgende sammenhæng:

$$v = v_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

På grafen på figur 2 ses forløbet af sammenhængen i (4).



Figur 2. Eksempel på et Michaelis-Menten plot til initialhastigheden som funktion af substratkoncentrationen for en enzymkatalyseret reaktion.

¹ Faktoren $13,3 \cdot 10^3$ kun gælder i denne sammenhæng, og ikke generelt for Michaelis-Menten kinetik.



Man kan vurdere om en enzymkatalyseret reaktion følger Michaelis-Menten kinetik ved at måle sammenhørende værdier af koncentration af substrat, [S], og reaktionshastigheden v_0 (der skrives et nul, fordi det er initialhastigheden, dvs. hastigheden ved start af reaktionen). Svarer sammenhængen til grafen i figur 2, følger reaktionen en Michaelis-Menten kinetik, og konstanterne K_M og v_{max} kan derfor bestemmes.

En anden metode er at omskrive Michaelis-Menten ligningen (4) således, at man får følgende lineære sammenhæng:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (5)$$

En afbildning af denne lineære sammenhæng kaldes et Lineweaver-Burk plot. Hvis data acceptabelt kan beskrives ved den lineære sammenhæng i (5), siges reaktionen at følge en Michaelis-Menten kinetik. Konstanterne K_M og v_{max} kan herefter bestemmes ud fra den rette linjes hældning og skæring med y-aksen.

Formålet er at undersøge om enzymet lactase ved reaktion med ONPG følger en Michaelis-Menten kinetik, samt at bestemme K_M og v_{max} for enzymet.

Apparatur

- Spektrofotometer tilknyttet LoggerPro
- 3,0 mL kuvette med låg
- Mikropipetter med spidser (10-100 μ L, 100-1000 μ L, 0,5-5 mL)

Kemikalier

- Phosphatpuffer: 0,1 M puffer med pH 7,0.
- Lactaseopløsning: Lactozym 2600L fra Novozymes® fortyndet 1:75 med 0,1 M phosphatpuffer (pH 7,0).
- 20 mm ONPG opløst i demineraliseret vand.
- Demineraliseret vand

Affald

Alt affald opsamles i beholderen mærket organisk.

**Fremgangsmåde**

1. Spektrofotometer med computer opsættes.
Kalibrering: Spektrofotometeret kalibreres med demineraliseret vand.
Indstilling af målinger: Under Konfigurer spektrofotometer vælges 'Absorbans vs tid' og bølgelængden 420 nm. Under Dataopsamling vælges 'varighed 180 s' og 'prøvehastighed 1 prøve/sekund'.
2. Phosphatpuffer og ONPG blandes i kuvetten efter tabel 1.

Prøve nr.	V(Phosphatpuffer)	V(ONPG), (20 mM)	V(lactaseopløsning)
1	2870	30	100
2	2810	90	100
3	2750	150	100
4	2600	300	100
5	2450	450	100
6	2300	600	100
7	2000	900	100
8	1700	1200	100

Tabel 1.

3. **VIGTIGT:** Næste trin skal gå så hurtigt som muligt, så læs hele punktet igennem, inden det udføres:
 - Enzymet tilsættes.
 - Plastlåget sættes på kuvetten, som vendes et par gange (dette bevirker, at der blandes grundigt).
(Prøve-blandingen skal være godt blandet før målingen startes. Pas dog på ikke at få skabt luftbobler i kuvetterne. Det forstyrrer målingerne.)
 - Kuvetten placeres i spektrofotometret. Husk at kuvetten skal vende rigtigt.
 - Målingerne startes. Efter 180 sekunder stoppes målingen.
4. Der tilføjes en tangent til kurvens første lineære stykke, og hældningen noteres i tabel 2.
5. Målingen gemmes med klar angivelse af koncentrationen af ONPG. Luk **ALDRIG** LoggerPro ned, da kalibreringen forsvinder! Brug i stedet 'Gem som' og gem med næste ONPG-koncentration i navnet **FØR** næste måling. De tidligere målinger er da gemt under tidligere navn og kalibreringen er taget med over i ny fil til ny måling.
6. Kuvetten rengøres grundigt, og der fortsættes fra punkt 2 med næste forsøg.

Vigtigt: For hvert forsøg iagttages det, om kurven for (tid, absorbans) stiger jævnt og uden hakker. Det iagttages desuden, om der er luft i kuvetten (kræver nyt forsøg), og om farven ser fornuftig ud.

**Resultater og diskussion**

Generelt: Sørg for at have forklarende tekst, klar metode og beregning med enheder samt konklusioner i jeres besvarelser af nedenstående.

Prøve nr.	[ONPG] (mM)	a (målt i forsøget) ² (s ⁻¹)	v_0 ($\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$)	$\frac{1}{[\text{ONPG}]}$ (mM ⁻¹)	$\frac{1}{v_0}$ ($\frac{\text{min}}{\mu\text{M}}$)	Evt. kommentar
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

Tabel 2.

1. Beregn koncentrationen af ONPG i kuvetten til hvert forsøg, og indsæt de beregnede koncentrationer af ONP i tabel 2. Nedenfor er vist et eksempel med prøve nr. 1:

$$[\text{ONPG}] = \frac{n_{\text{substrat}}}{V_{\text{totalt}}} = \frac{c_0 \cdot V_{\text{substrat}}}{V_{\text{totalt}}}$$


$$[\text{ONPG}] = \frac{20 \text{ mM} \cdot 30 \mu\text{L}}{(2870 + 30 + 100)\mu\text{L}} = \frac{600}{3000} \text{ mM} = 0,200 \text{ mM} = 200 \mu\text{M}$$


2. Hastigheden v_0 bestemmes ud fra hældningen a og ligning (2). Indsæt hastighederne i tabel 2.
3. Omregn sammenhængende værdier af koncentration af ONPG og initialhastighed ($[\text{ONPG}], v$) til sammenhængende værdier af invers ONPG-koncentration og invers initialhastighed ($\frac{1}{[\text{ONPG}]}, \frac{1}{v}$).
Vis eksemplarisk beregning. Indsæt de beregnede værdier i tabel 2.
4. Lav et Lineweaver-Burk plot til sammenhørende værdier af ($\frac{1}{[\text{ONPG}]}, \frac{1}{v_0}$).
5. Diskutér om den enzymkatalyserede reaktion følger Michaelis-Menten kinetik.
6. Bestem K_M og v_{max} for reaktionen ud fra Lineweaver-Burk plottet.

² Hældning skal måles på kurve der viser absorbans som funktion af tid



7. Lav et Michaelis-Menten plot. Benyt LoggerPro til at plote sammenhørende værdier af $([ONPG], v_0)$:

- Åbn et nyt Loggerpro-dokument og indsæt sammenhørende værdier af $([ONPG], v_0)$.
- Under Curve Fit () vælges Define Function.
- Indtast forskriften $f(x) = a \cdot x / (b + x)$, angiv MM plot som beskrivelse og tryk OK.
- Tryk herefter Try Fit og efterfølgende OK når regressionen er udført.



f(x)= $a \cdot x / (b + x)$

Description: MM plot

Figur 3. Michaelis-Menten funktionsforskriften indtastet i LoggerPro.

8. Bestem K_M og v_{max} for reaktionen ud fra Michaelis-Menten plottet.

9. Sammenlign K_M og v_{max} bestemt ud fra de to forskellige plot. Er der fordele og ulemper ved de to metoder til bestemmelse af K_M og v_{max} .

Konklusion

Skriv en samlet konklusion.