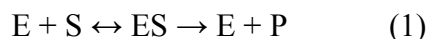


Kinetyka reakcji enzymatycznych

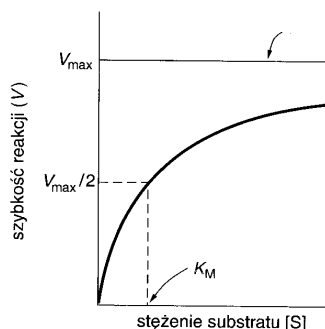
Wstęp

Wiele białek występujących w organizmach żywych to enzymy, czyli katalizatory przyspieszające przemiany biochemiczne. Reakcje katalizowane przez enzymy mają wspólne właściwości. Najważniejszą z nich jest zjawisko wysycenia enzymu substratem, ograniczające szybkość reakcji. Przedstawia to *model Michaelisa-Menten* opisany przez równanie:



Korzystając z przybliżenia stanu stacjonarnego można wyprowadzić wyrażenie na szybkość reakcji enzymatycznej (wyprowadzenia patrz literatura)

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2)$$



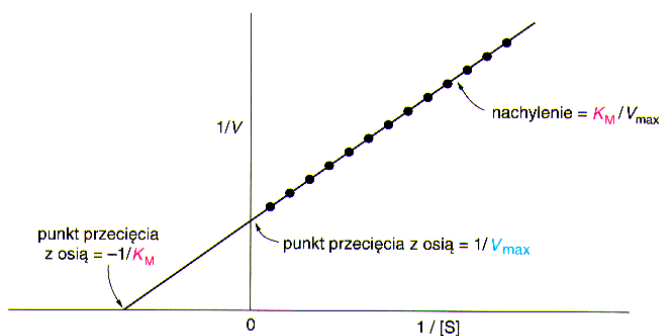
gdzie

K_m – stała Michaelisa

V_{\max} – maksymalna szybkość reakcji

Aby łatwiej otrzymać wartości stałej Michaelisa K_m oraz szybkości maksymalnej V_{\max} można przekształcić równanie Michaelisa-Menten w równanie prostej:

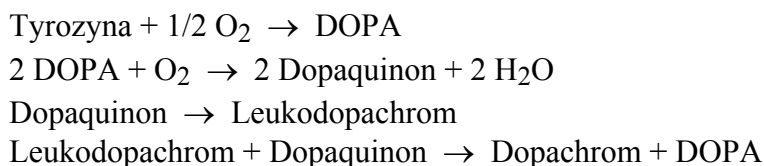
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} * \frac{1}{[S]} \quad (3)$$



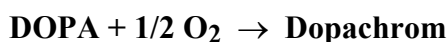
Wykres zależności 1/V od 1/[S] zwany jest *wykresem Lineweavera-Burka*.

W ramach badania kinetyki reakcji enzymatycznej zajmiemy się reakcją katalizowaną przez tyrozinazę. Tyrozinaza jest zwyczajową nazwą dla enzymu oznaczonego symbolem 1.14.18.1 wg nomenklatury enzymatycznej. Jest również znana jako fenolaza lub monofenylo oksydaza, jest enzymem należącym do grupy oksydoreduktaz tlenowych. Katalityczna aktywność tego enzymu polega na zmianie tyrozyny i O_2 w dihydroksyfenyloalaninę (L-DOPA), która następnie zostaje przekształcona w dopaquinon i H_2O . Obie te reakcje

katalizowane są przez tyrozynazę, natomiast dalej dopaquinon ulega spontanicznym reakcjom prowadzącym do powstania dopachromu.



W naszych eksperymentach będziemy obserwować przebieg reakcji enzymatycznych śledząc powstawanie dopachromu z L-DOPA na podstawie zmiany absorbancji przy 475 nm (współczynnik absorpcji molowej: $3800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



Część I

Wstępna analiza aktywności ekstraktów zawierających tyrozynazę

Odczynniki:

15 mM L-DOPA (należy przygotować odpowiednią naważkę i rozpuścić w buforze)
ekstrakt enzymu tyrozynazy (samodzielnie wyizolowany ekstrakt)
0.1 M bufor cytrynianowy pH 6.6 (przygotować zgodnie z instrukcją asystenta)

Sposób postępowania:

Pomiar V_0 (początkowej szybkości reakcji) dla jednego stężenia substratu (5 mM) i ekstraktów tyrozynazy otrzymanych z różnych roślin, w celu wybrania najbardziej aktywnego ekstraktu.

1. Ustawić linie bazową spektrofotometru, jako odnośnika użyć roztwór buforu cytrynianowego.

2. Do 0.9 ml 5 mM L-DOPA dodać 0,1 ml roztworu enzymu, zamieszać i mierzyć zmianę absorbancji przy 475 nm w czasie aż do uzyskania bardzo niewielkich zmian absorbancji.

3. Narysować wykres zależności stężenia dopachromu od czasu i z liniowej części wykresu odczytać prędkość początkową V_0 .

Oszacować aktywność ekstraktu tyrozynazy, czyli określić szybkość z jaką substrat jest zamieniany na produkt. W naszym przypadku będzie to aktywność 0,1 ml ekstraktu enzymu, zdefiniowana jako ilość substratu (DOPA) w μmol jaka ulega zamianie w produkt (dopachrom) w ciągu 1 minuty (czyli V_0 wyrażone w $\mu\text{mol}/\text{min}$).

Analiza kinetyki działania tyrozynazy, wyznaczenie K_m i V_{max}

Sposób postępowania:

Należy powtórzyć eksperyment z ćwiczenia poprzedniego dla roztworów L-DOPA w zakresie 4–15 mM dla najbardziej aktywnego ekstraktu enzymu.

Otrzymane dane wykorzystać do wyliczenia K_m i V_{max} na podstawie wykresu Lineweaver-Burke.

Część II

Wpływ pH, temperatury oraz innych czynników na reakcję enzymatyczną

Aktywność enzymów może ulec zmianie pod wpływem różnych czynników takich jak temperatura, ciśnienie pH oraz dodatkowych substancji, które mogą działać jak inhibitory lub aktywatory. Enzymy mogą ulegać inhibicji odwracalnej lub nieodwracalnej przez specyficzne związki. W inhibicji nieodwracalnej inhibitor łączy się z enzymem kowalencyjnie lub tak silnie, że jego dysocjacja jest bardzo powolna. Natomiast w inhibicji odwracalnej dysocjacja kompleksu enzym-inhibitor jest stosunkowo szybka. Przykładowe inhibitory dla tyrozyminy to: kwas askorbinowy, siarczany(IV), kwas benzoowy i inne.

W tej części ćwiczenia studenci samodzielnie planują przeprowadzenie eksperymentów, które wykażą wpływ różnych czynników na aktywność enzymatyczną badanego ekstraktu tyrozyminy.

Część III

Opracowanie wyników

Forma sprawozdania będzie każdorazowo ustalana przez asystenta z grupą laboratoryjną.

Literatura:

Do zajęć proszę przygotować się z „Biochemii” Styer’a, Cz. II Rozdz. 8

Inne:

J. Witwicki i Q. Ardelta „Elementy enzymologii”.