

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ
ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. Προσδιορισμός της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

Για να μελετήσουμε την επίδραση του υποστρώματος, παρασκευάζουμε διαλύματα υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού) διαφόρων συγκεντρώσεων και προσθέτουμε σταδιακά ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών pH 4.8 και ίση ποσότητα ενζύμου (όξινης φωσφατάσης) σύμφωνα με τον παρακάτω **Πίνακα Ι**.

Πίνακας Ι: Περιέχει τις τιμές των διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού) που θα χρησιμοποιήσει η κάθε ομάδα στους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΩΛΗΝΩΝ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ σε mL	ΣΩΛΗΝΕΣ									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Δ1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Δ2	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
3	Δ3	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
4	Δ4	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
5	Δ5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
ΟΛΕΣ	Ρ.Δ. ΚΙΤΡΙΚΩΝ (pH 4.8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ΟΛΕΣ	H ₂ O	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1
ΟΛΕΣ	ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ 37°C / 1 min										
ΟΛΕΣ	ΕΝΖΥΜΟ (ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
ΟΛΕΣ	ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ 37°C / 10 min										
ΟΛΕΣ											
ΟΛΕΣ	ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑ 400nm										

1. Η κάθε ομάδα αριθμεί τους δικούς της δοκιμαστικούς σωλήνες και προσθέτει τα αντιδραστήρια υποστρώματος (π-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού), ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών pH 4.8 και H₂O που της αντιστοιχούν σύμφωνα με τον **Πίνακα Ι**.
2. Επωάζουμε τους σωλήνες στο υδατόλουτρο στο 37°C για 2min.
3. Η κάθε ομάδα προσθέτει στους δοκιμαστικούς σωλήνες το ένζυμο (όξινη φωσφατάση) σύμφωνα με τον **Πίνακα Ι**.
4. Επωάζουμε τους σωλήνες στο υδατόλουτρο στους 37°C αυστηρά για 10 λεπτά.
5. Η κάθε ομάδα προσθέτει στους σωλήνες 3 ml NaOH 0.1N.
6. Φωτομετρούμε τους σωλήνες 1, 3, 5, 7, 9 στα 400 nm με τα αντίστοιχα τυφλά 2, 4, 6, 8, 10. Χρησιμοποιούμε 2 ml από κάθε δείγμα.
7. Καταγράφουμε τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης (O.D.) στον **Πίνακα ΙΙ**.

Πίνακας II: Περιέχει τις τιμές διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος και τις απορροφήσεις του προϊόντος.

ΟΜΑΔΑ	ΣΩΛΗΝΑΣ	[S] ΑΡΧΙΚΗ (M)	O.D. π-νιτροφαινόλης
1	1	0,001	
2	3	0,0008	
3	5	0,0006	
4	7	0,0004	
5	9	0,0002	

8. Από την πρότυπη καμπύλη της ποσότητας π-νιτροφαινόλης έναντι της απορρόφησης στα 400 nm, υπολογίζουμε την ποσότητα της π-νιτροφαινόλης (μmol) και τις καταγράφουμε στον **Πίνακα III**.
9. Υπολογίζουμε τις αντίστοιχες ταχύτητες της αντίδρασης (V) και καταγράφουμε τις τιμές στον **Πίνακα III**.
10. Υπολογίζουμε τις τελικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος [S] και καταγράφουμε τις τιμές στον **Πίνακα III**.

Πίνακας III: Περιέχει τις τιμές της ποσότητας π-νιτροφαινόλης, της ταχύτητας της αντίδρασης και τις τελικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος.

ΟΜΑΔΑ	ΣΩΛΗΝΑΣ	π-νιτροφαινόλης (μmol)	V (μmol/mL*min)	[S] τελική (mol/mL)
1	1			
2	3			
3	5			
4	7			
5	9			

II. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

11. Με τις τιμές του **Πίνακα III** κατασκευάζουμε καμπύλη Michaelis-Menten της ταχύτητας αντίδρασης **V** έναντι της συγκέντρωσης του υποστρώματος **[S]**.

Προσοχή: Η καμπύλη θα σχεδιαστεί σε χιλιοστομετρικό χαρτί από την κάθε ομάδα.

Πίνακας IV: Περιέχει τις τιμές του λόγου $1/V$ την ταχύτητας της αντίδρασης και $1/[S]$ την συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ όπως υπολογίστηκαν από τους φοιτητές.

ΟΜΑΔΑ	ΣΩΛΗΝΑΣ	$1/V$ ($1/\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$)	$1/[S]$ ($1/\text{mol/mL}$)
1	1		
2	3		
3	5		
4	7		
5	9		

III. Εύρεση των τιμών K_M και V_{max}

12. Με τις τιμές του **Πίνακα IV** κατασκευάζουμε “Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaver-Burk” του αντιστρόφου της ενζυμικής ταχύτητας αντίδρασης ($1/V$) έναντι του αντιστρόφου της συγκέντρωσης του υποστρώματος ($1/[S]$).

Προσοχή η ευθεία γραμμή θα γίνει σε χιλιοστομετρικό χαρτί (που φέρει τα στοιχεία σας) από την κάθε ομάδα.

Το σημείο τομής στον άξονα y είναι το $1/V_{max}$ και το σημείο τομής στον άξονα x είναι το $-1/K_M$ (γραφικός υπολογισμός). Από τα σημεία αυτά υπολογίζετε τις σταθερές K_M (σταθερά Michaelis) και V_{max} οι οποίες και καταγράφονται στο χιλιοστομετρικό χαρτί που φέρει τα στοιχεία σας.