



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΔΕΙΦΟΡΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

---

7<sup>η</sup> (1<sup>ο</sup>, 2<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup> Πείραμα) και 8<sup>η</sup> (4, 5<sup>ο</sup> Πείραμα) Εργαστηριακή  
Άσκηση: Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων

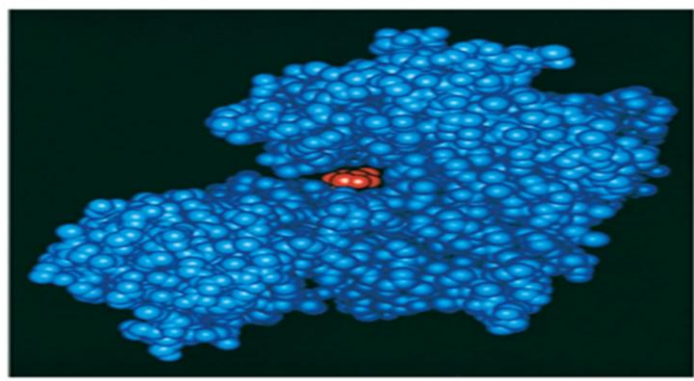
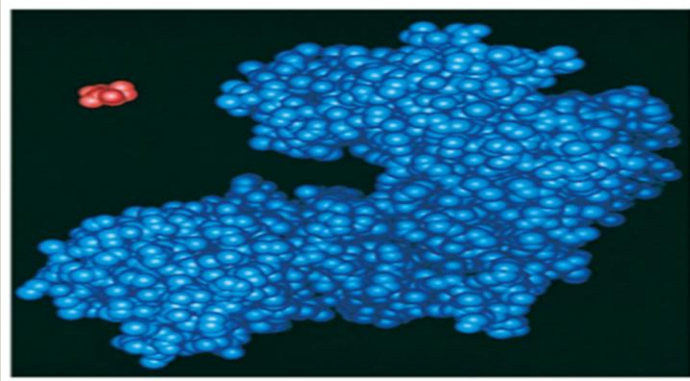
Γαλάνη Αγγελική, Χημικός PhD, Ε.ΔΙ.Π. - Διονυσοπούλου Εύα Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Τα ένζυμα, είναι το «κλειδί» της ζωής, αφού χωρίς αυτά δεν είναι υπερβολή να πούμε πως δεν υπάρχει ζωή. Κάθε στιγμή στα ζωντανά κύτταρα πραγματοποιούνται χιλιάδες αντιδράσεις και τα ένζυμα είναι απαραίτητα ώστε αυτές οι αντιδράσεις να πραγματοποιούνται με κατάλληλες ταχύτητες για τη διατήρηση της ζωής.



## Από χημική άποψη τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που έχουν καταλυτικές ιδιότητες «βιοκαταλύτες»

- Τα ένζυμα που έχουν απομονωθεί σε καθαρή μορφή έχει αποδειχθεί ότι είναι πρωτεΐνες, αλλά και τα ένζυμα που δεν έχουν απομονωθεί έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες πρωτεϊνών.
- Τα μόνα μόρια που βρέθηκαν και δεν είναι πρωτεϊνικά είναι τα καταλυτικά RNA, τα ριβοένζυμα τα οποία έχουν τριτοταγή δομή παρόμοια των πρωτεϊνικών ενζύμων και μπορούν να υδρολύουν και να αποκαθιστούν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε άλλα μόρια RNA ή στον εαυτό τους.
- Είναι γενικά αποδεκτό πως το πρόβλημα προέλευσης της ζωής ανάγεται στο πρόβλημα προέλευσης των ενζύμων που με τη σειρά του σχετίζεται με το πρόβλημα προέλευσης του γενετικού κώδικα.

# ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Ενεργό κέντρο (active center): Η περιοχή του ενζύμου στην οποία καταλύεται η αντίδραση
- Ενεργές περιοχές (active sites) αμινοξέων: Συγκεκριμένες περιοχές του ενεργού κέντρου με ενεργό συμμετοχή στην αντίδραση
- Υποστρώματα (substance): Ουσίες πάνω στις οποίες δρα το ένζυμο



Εικόνα από: Βασική Βιοχημεία, Κωνσταντίνος Δημόπουλος Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, Σμαραγδή Αντωνοπούλου Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διατροφής-Διατροφής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, 3<sup>η</sup> Έκδοση Αθήνα 2020, Εκδόσεις Νέον

Στις πιο πολλές περιπτώσεις οι δραστικές ομάδες των πεπτιδικών αλυσίδων των ενζύμων από μόνες τους, δεν αρκούν για να καταλύσουν μια αντίδραση και πρέπει να συνδεθούν με ιόντα ή μικρά μόρια (οργανικά συνήθως), που όλα μαζί καλούνται συμπαραγοντες (co-factors). Ειδικά τα οργανικά μόρια καλούνται συνένζυμα co-enzymes).

**Ολο-ένζυμο = από-ένζυμο + συνένζυμο ( ή συμπαραγοντας)**

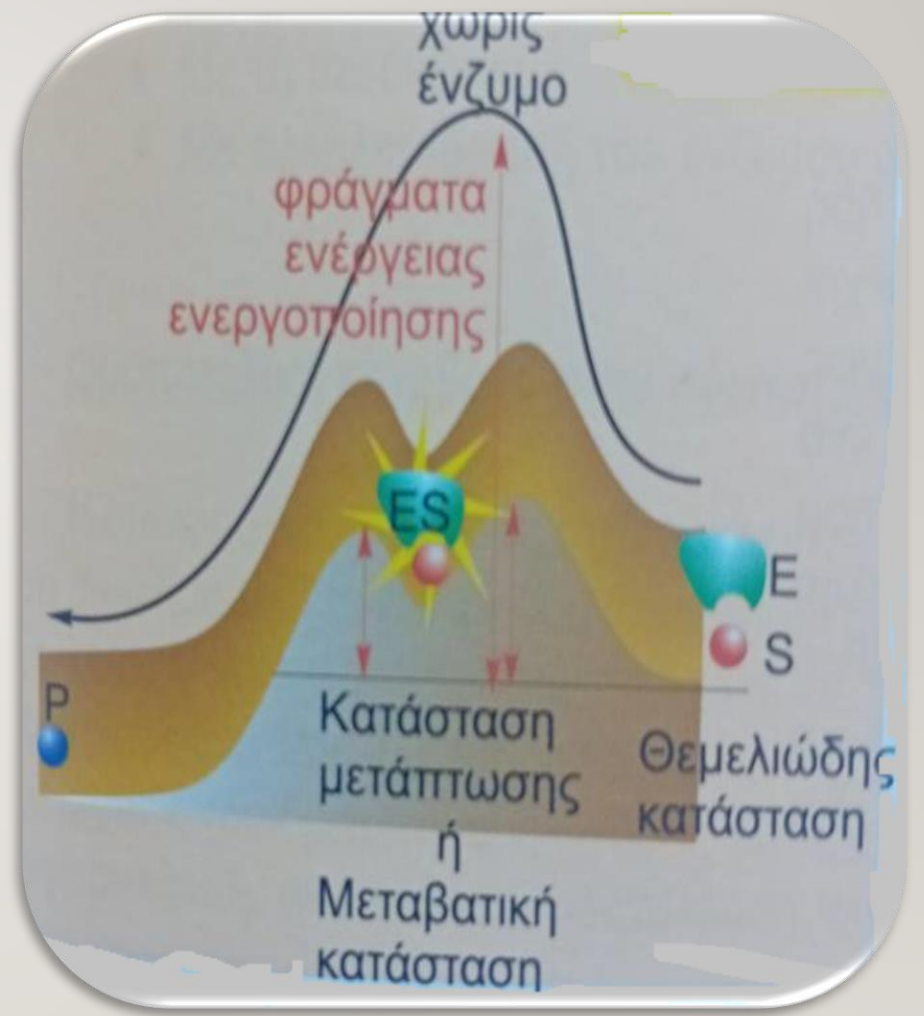
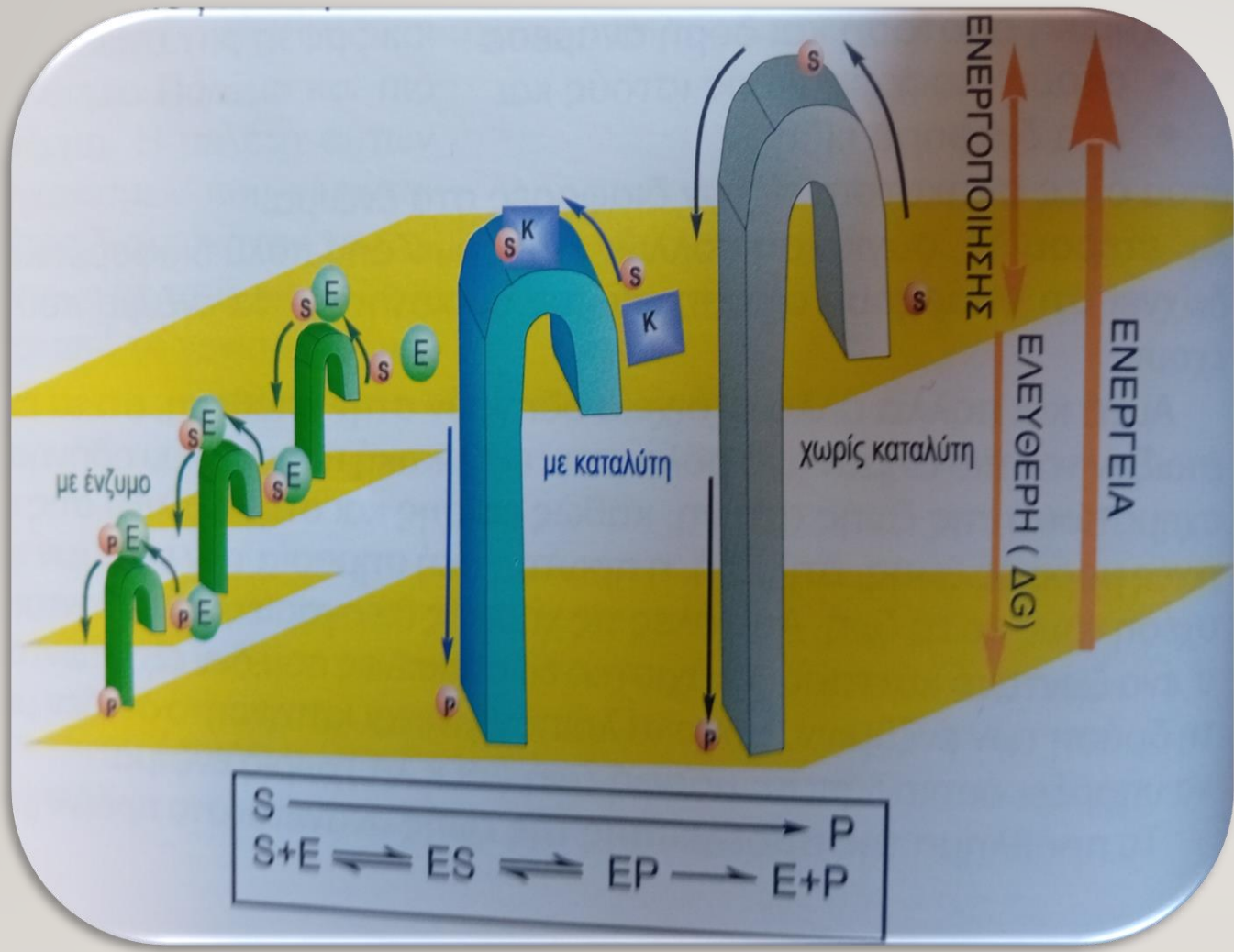


- Το ίδιο συνένζυμο (ή προσθετική ομάδα), είναι δυνατόν να συμμετέχει σε διάφορες χημικές αντιδράσεις με διάφορα ένζυμα.
- Τα ένζυμα ασκούν την καταλυτική τους δράση σε πολύ μικρότερες ποσότητες σε σχέση με τους καταλύτες.

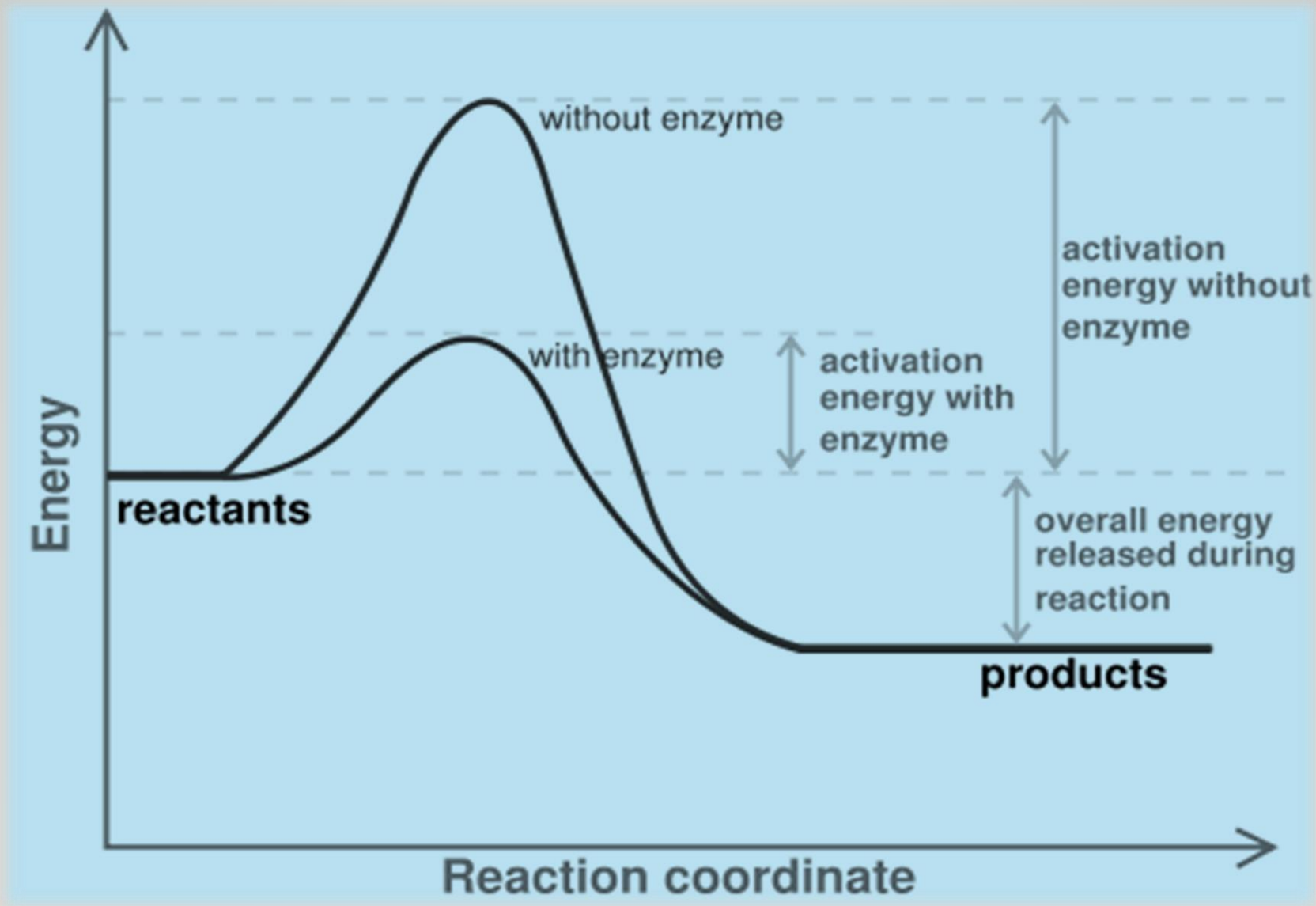
Κάθε αντίδραση χαρακτηρίζεται από κινητικές και θερμοδυναμικές παραμέτρους.

- ✓ Οι κινητικές δείχνουν πόσο γρήγορα γίνεται η αντίδραση (ρυθμός αντίδρασης)
- ✓ Οι θερμοδυναμικές δείχνουν την έκταση που τα αντιδρώντα θα μετατραπούν σε προϊόντα (ισορροπία αντίδρασης)

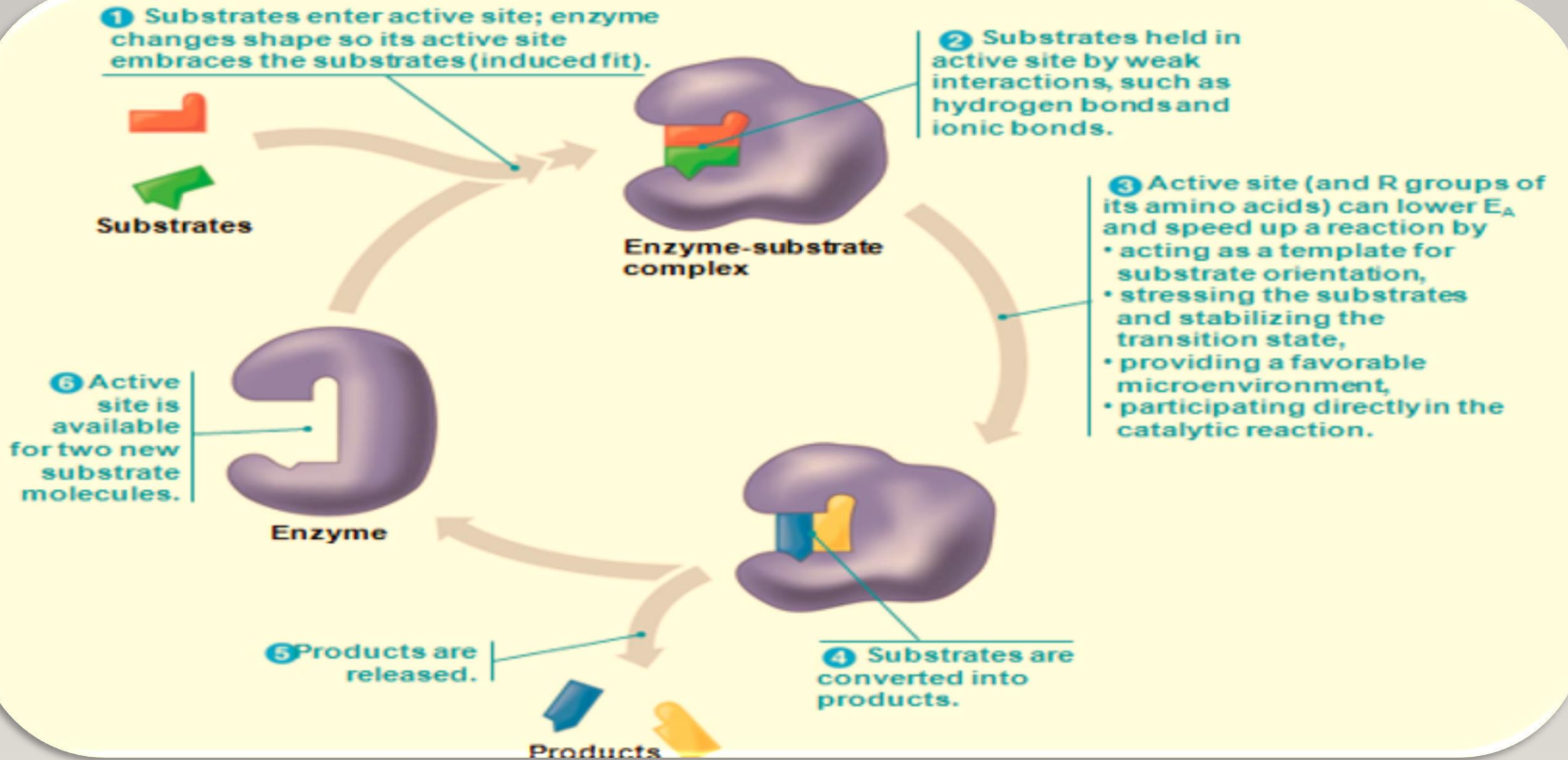
Τα ένζυμα δρουν επηρεάζοντας τις κινητικές παραμέτρους (πόσο γρήγορα αποκαθίσταται η ισορροπία) και όχι τις θερμοδυναμικές (σημείο αποκατάστασης ισορροπίας)



Εικόνες από: Βασική Βιοχημεία, Κωνσταντίνος Δημόπουλος Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, Σμαραγδή Αντωνοπούλου Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, 3<sup>η</sup> Έκδοση Αθήνα 2020, Εκδόσεις Νέον







# ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

---

Εξαιρετικά ευέλικτοι βιοχημικοί καταλύτες με τρία κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα

**1. Καταλυτική ισχύς:** Ο λόγος της ταχύτητας μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης προς την ταχύτητα της μη καταλυόμενης αντίδρασης

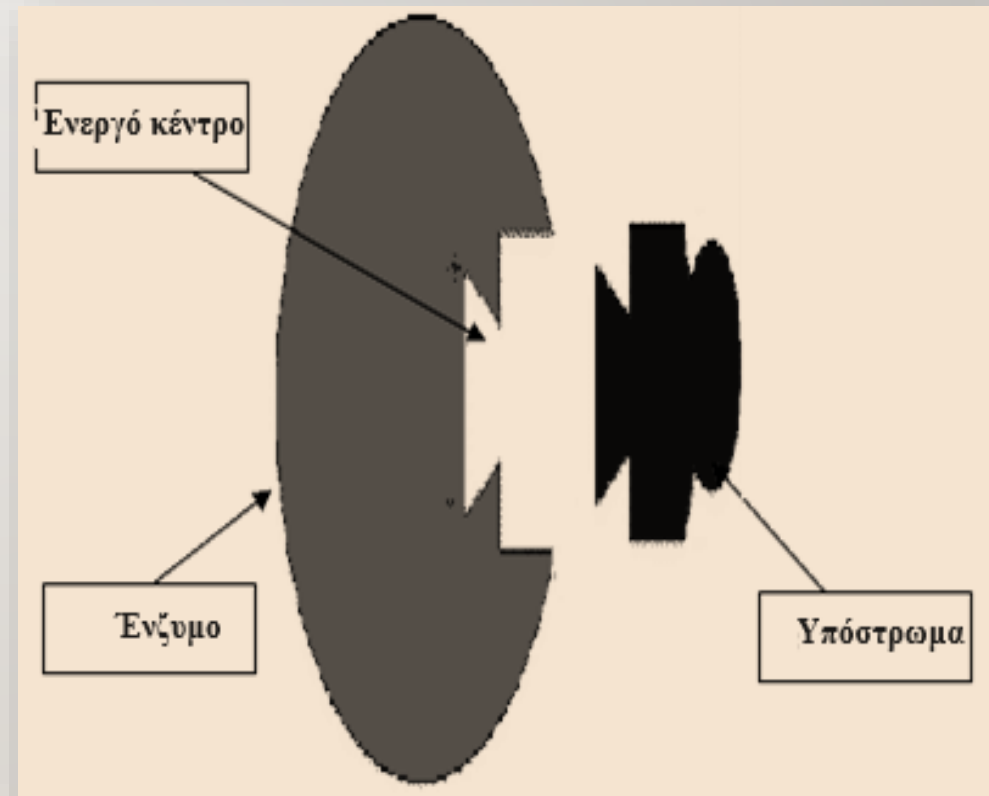
Εμφανίζουν τεράστια καταλυτική ισχύ και μπορούν να επιταχύνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έως και  $10^{26}$  φορές σε σχέση με αυτές των μη καταλυόμενων.

Δρουν σε αραιά υδατικά διαλύματα υπό ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH

# ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

## 2. Εξειδίκευση:

- ✓ Για το υπόστρωμα (ακόμη και στερεοειδική)
- ✓ Για την αντίδραση



# ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

---

**3. Ρύθμιση** Μεταξύ των άπειρων αντιδράσεων που είναι δυνατόν να γίνουν στη φύση κάποιες είναι αυτές που επιλέχθηκαν ώστε να πραγματοποιούνται οι λειτουργίες του μεταβολισμού. Ελέγχεται έτσι και ρυθμίζεται ο μεταβολισμός και μάλιστα με δύο τρόπους:

- ✓ Με κατάλληλη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ενζύμων
- ✓ Με τροποποίηση της δομής του ενζύμου (ομοιοπολική μεταβολή στην πρωτοταγή δομή ή αλλοστερική μεταβολή στη διαμόρφωση της δομής)
- ✓ Με περιορισμένη πρωτεόλυση των ζυμογόνων (προ-ενζύμων)
- ✓ Με τα ισοένζυμα
- ✓ Με αλληλεπίδραση του ενζύμου με άλλη πρωτεΐνη

# ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΕΝΖΥΜΩΝ

Κανόνες από Έπιτροπή Βιοχημικής Ορολογίας των IUB (Διεθνής Ένωση Βιοχημείας) και IUPAC (Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας)

Οξειδοαναγωγάσες : Ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση ή την αναγωγή του υποστρώματος

Υδρολάσες: Ένζυμα που καταλύουν υδρολυτικές διασπάσεις

Λυάσες: Ένζυμα που καταλύουν μη υδρολυτική διάσπαση δεσμών

Ισομεράσες: Ένζυμα που καταλύουν ενδομοριακές μεταβολές

Λιγάσες: Ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών με ταυτόχρονη διάσπαση ATP, ως δότη ενέργειας. Καταλύουν σύνθεση ουσιών από απλούστερες καταναλώνοντας ATP

Τρανσφεράσες: Όλα τα υπόλοιπα ένζυμα που δεν καλύπτονται από τις προηγούμενες

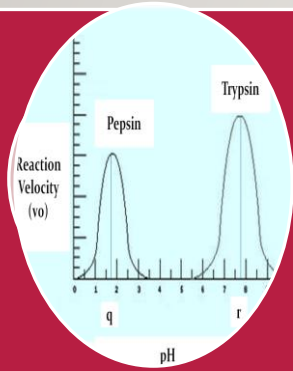
# ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ

---

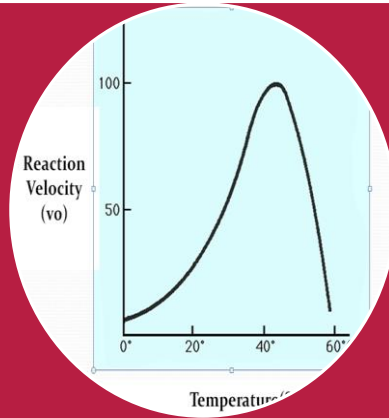
- Η δραστηριότητα ή ενεργότητα ενός ενζύμου συνήθως εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Η ταχύτητα ορίζεται ως η ποσότητα του υποστρώματος που μετατρέπεται στη μονάδα του χρόνου
- Η δραστηριότητα ενός ενζύμου εκφράζεται ποσοτικά ως:
  - ✓ Μονάδα ενζυμικής δράσης: Το ποσό του ενζύμου που μετατρέπει 1 mole υποστρώματος σε 1 sec (Katal ή Kat=1 mole/sec)
- Ειδική δραστηριότητα ή καθαρότητα ενός ενζύμου ορίζεται ως ο λόγος  $\text{Unit/mg}_{\text{πρωτεΐνης}}$  ή  $\text{katal/mg}_{\text{πρωτεΐνης}}$

# ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

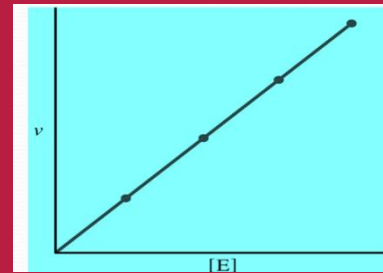
Η ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων επηρεάζεται από τέσσερις παράγοντες κατά κύριο λόγο



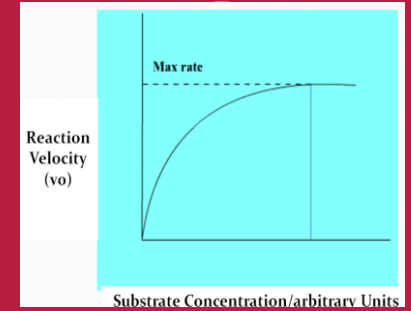
pH



Θερμοκρασία



Συγκέντρωση  
Ενζύμου



Συγκέντρωση  
υποστρώματος

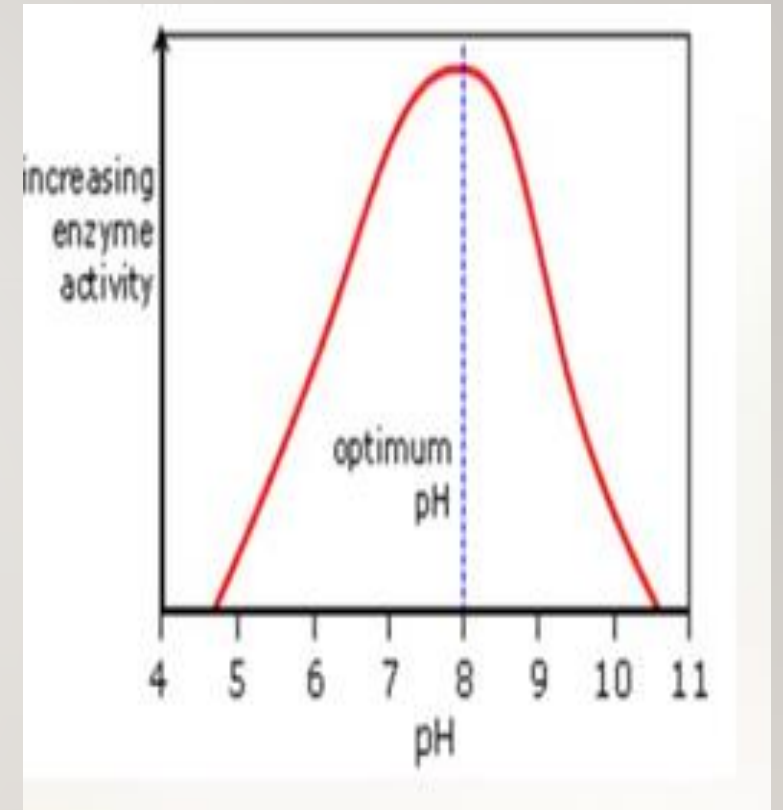


Για να μελετηθεί πειραματικά η επίδραση καθενός από  
από τους πιο πάνω παράγοντες, διατηρούνται όλοι οι  
υπόλοιποι σταθεροί και μεταβάλλεται μόνο αυτός που  
εξετάζεται

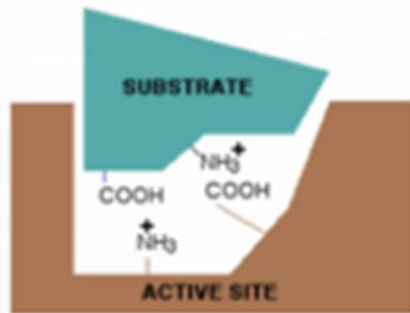
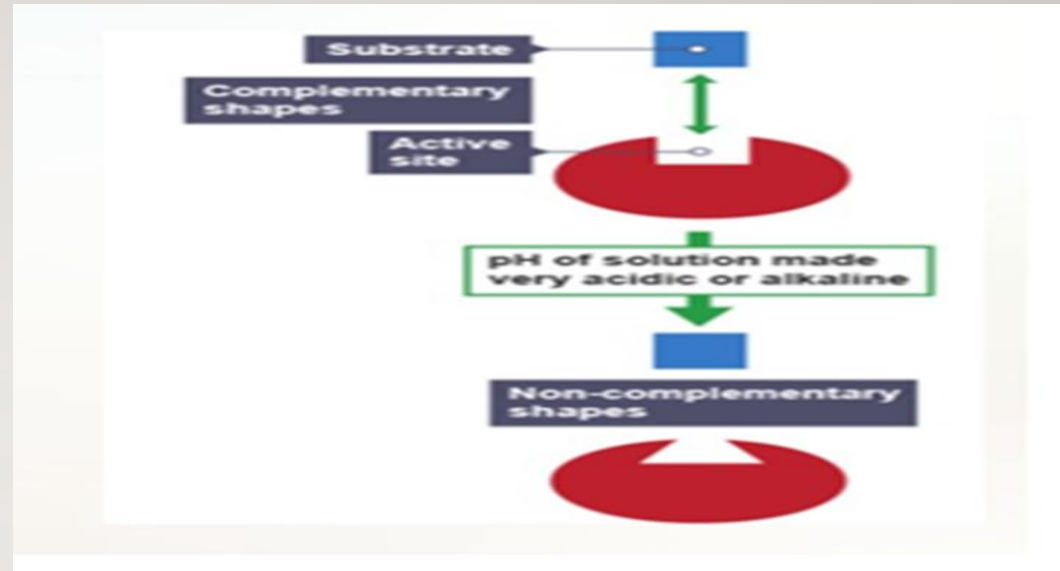


# Επίδραση του pH στην ταχύτητα

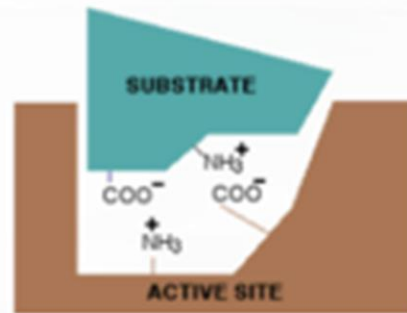
- Τα πιο πολλά ένζυμα έχουν κάποια τιμή pH στην οποία παρουσιάζουν το μέγιστο της δραστηριότητάς τους. Η τιμή αυτή είναι γνωστή ως το βέλτιστο pH.
- Για τα περισσότερα ένζυμα το βέλτιστο pH βρίσκεται στην περιοχή 5 με 9.
- Οι ακραίες τιμές pH επηρεάζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων γιατί έχουν επιπτώσεις στις ανώτερες δομές τους. Έτσι η ταχύτητα αυξάνεται μέχρι κάποια τιμή pH και μετά ελαττώνεται.



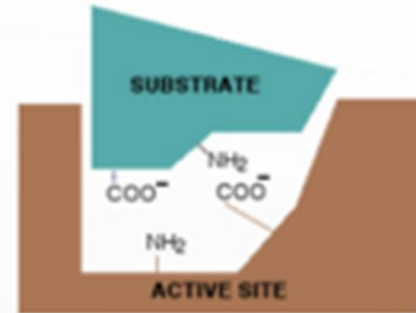
- Οι αλλαγές στο pH επηρεάζουν το σχήμα του ενζύμου.
- Είναι δυνατόν επίσης να έχουν επίδραση στα φορτία των αμινοξέων του ενεργού κέντρου



Low pH



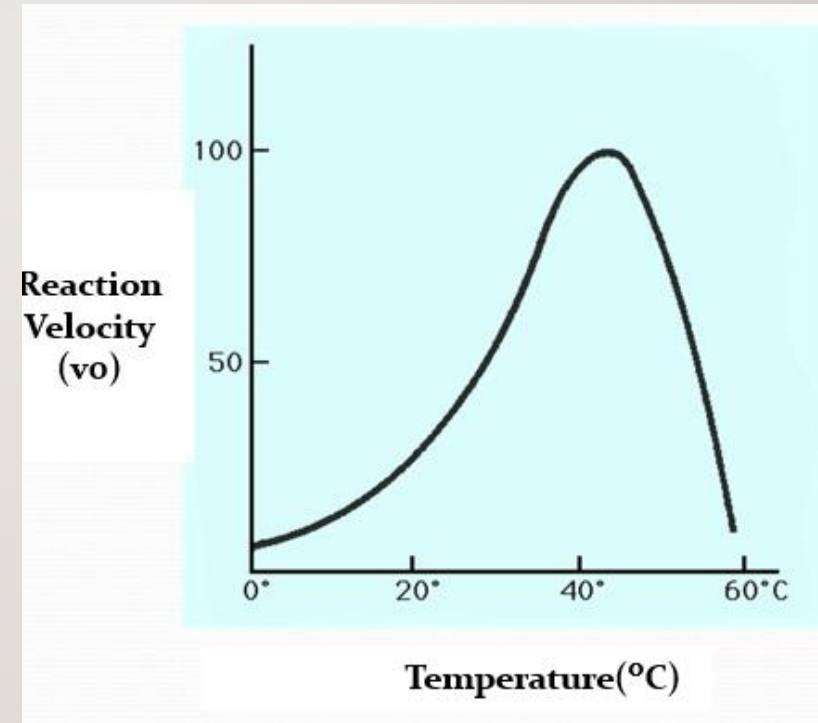
Neutral pH



High pH

## Επίδραση Θερμοκρασίας στην ταχύτητα

Αύξηση θερμοκρασίας αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης μέχρι ορισμένη τιμή θερμοκρασίας και στη συνέχεια η ταχύτητα μειώνεται διότι περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας επιδρά στις ανώτερες μορφές του ενζύμου.

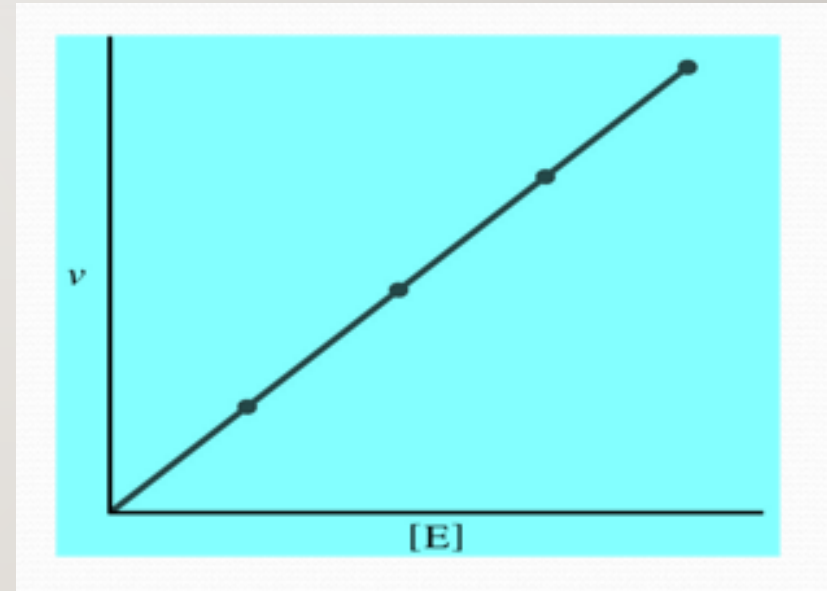


## Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου

---

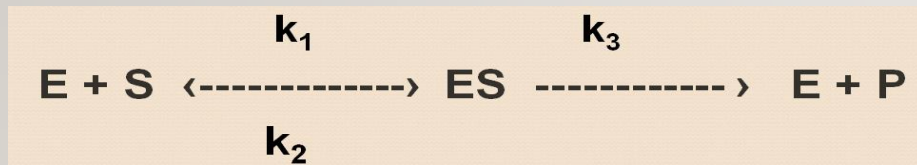
Για καθαρά ενζυμικά συστήματα, η ταχύτητα της αντίδρασης και η συγκέντρωση του ενζύμου είναι ευθέως ανάλογα.

Μετά από ένα σημείο, λόγω της κατανάλωσης του υποστρώματος η γραμμικότητα δεν υφίσταται πλέον.

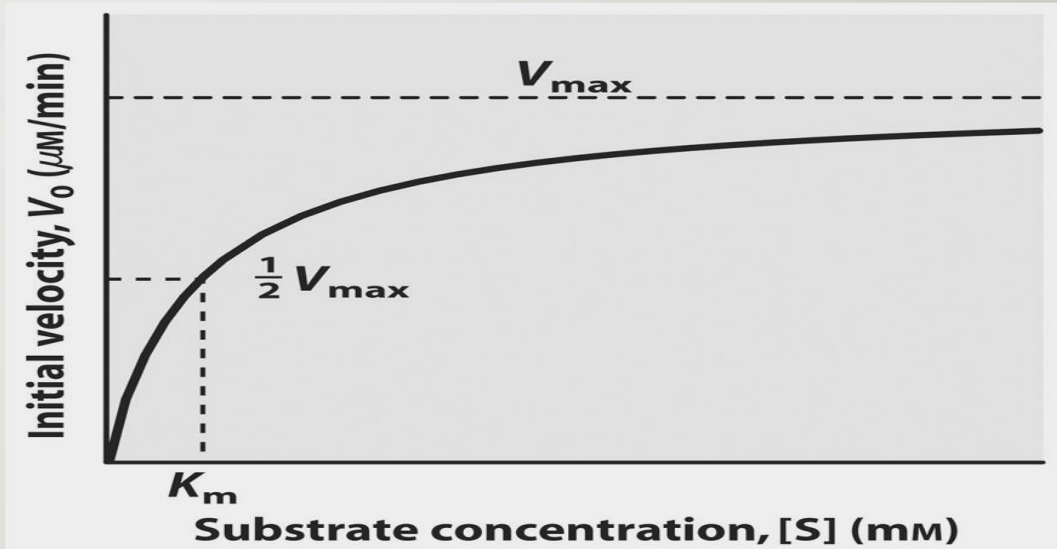


# Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα

Η γενική αντίδραση η οποία περιγράφει τη δημιουργία συμπλόκου υποστρώματος καθώς και τη διάσπαση αυτού στα προϊόντα είναι η ακόλουθη:



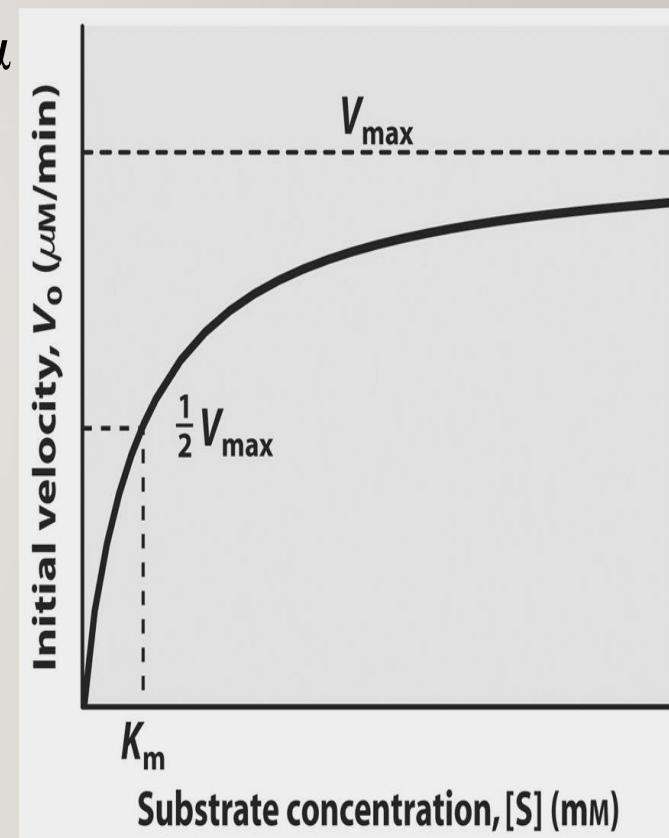
Όπου E: ένζυμο, S: το υπόστρωμα, P: το προϊόν και  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  οι σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεων.



Διάγραμμα μεταβολής ταχύτητας  $V$  συναρτήσει συγκέντρωσης υποστρώματος  $[S]$  (όταν η συγκέντρωση του ενζύμου είναι σταθερή

- Οι τιμές  $V_{\max}$  και  $K_m$  είναι σταθερές για συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση και συμβολίζουν αντίστοιχα τη μέγιστη ταχύτητα και τη συγκέντρωση του υποστρώματος για ταχύτητα ίση με το μισό της μέγιστης
- Όσο πιο μικρή τιμή έχει η  $K_m$  τόσο πιο μεγάλη συγγένεια έχει το ένζυμο με το υπόστρωμά του
- Η εξίσωση η οποία εκφράζει την καμπύλη του διπλανού σχήματος είναι η  $V = \{V_{\max}[S]\}/\{K_m + [S]\}$

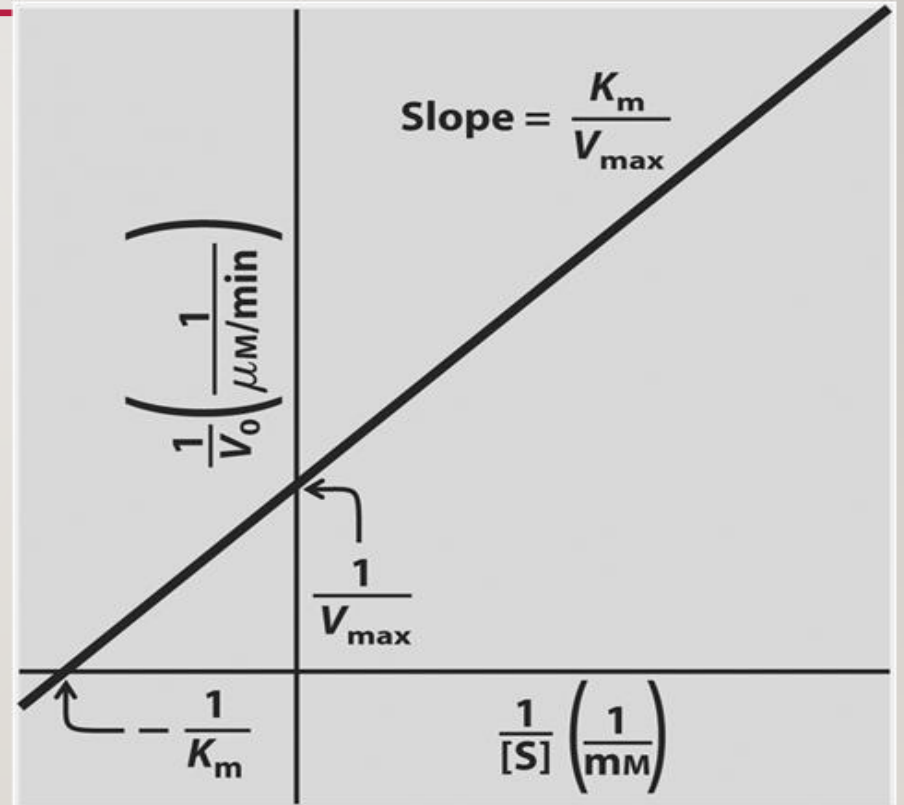
Η εξίσωση είναι γνωστή ως εξίσωση Michaelis-Menten και η σταθερά  $K_m$  ονομάζεται σταθερά Michaelis-Menten.



Επειδή ο γραφικός προσδιορισμός των  $V_{\max}$  και  $K_m$  από το διάγραμμα της προηγούμενης διαφάνειας είναι δύσκολος προτάθηκε από τους Lineweaver και Burk η εξίσωση του διπλού αντιστρόφου

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

που απεικονίζεται στο δίπλα διάγραμμα από το οποίο είναι εύκολος ο προσδιορισμός των  $V_{\max}$  και  $K_m$



# ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

---

Στην περίπτωση που η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μειώνεται ή αναστέλλεται (inhibited), από κάποιο παράγοντα η κινητική της αντίδρασης διαταράσσεται.

Η μελέτη της ενζυμικής αναστολής έχει συμβάλει σε σημαντικό βαθμό στην κατανόηση των ενζύμων.



# ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ:

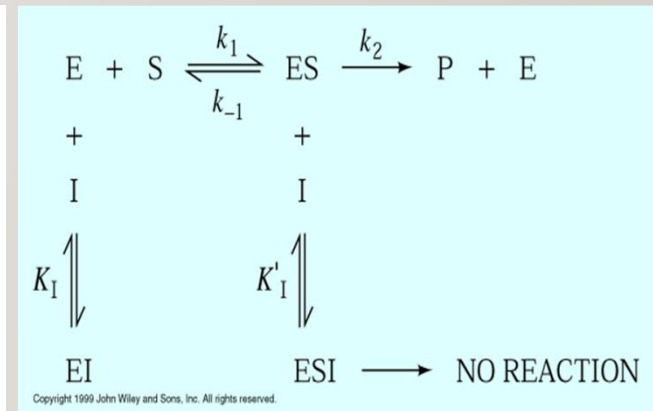
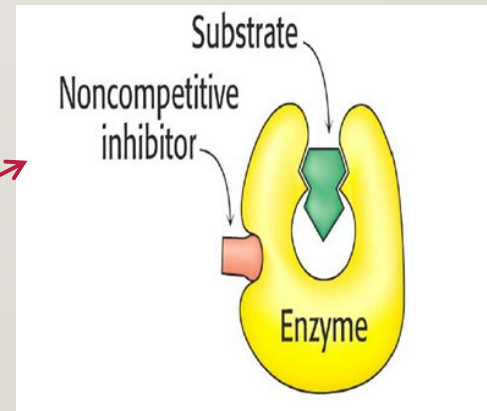
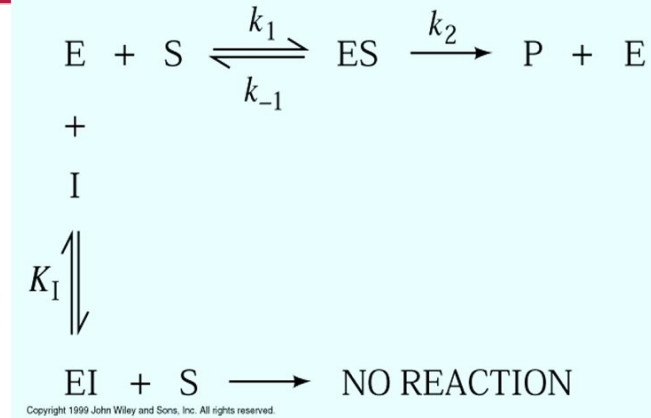
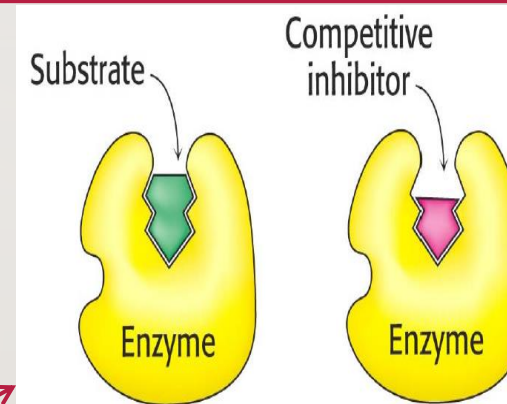
## Αντιστρεπτοί αναστολείς – Μη αντιστρεπτοί αναστολείς

### Αντιστρεπτοί αναστολείς (reversible inhibitors)

Αλληλεπιδρούν με το ένζυμο μέσω αντιδράσεων μη ομοιοπολικής σύνδεσης/αποσύνδεσης. Μπορεί να συνδέονται στο ενεργό κέντρο ή σε άλλη θέση.

Τρεις κατηγορίες

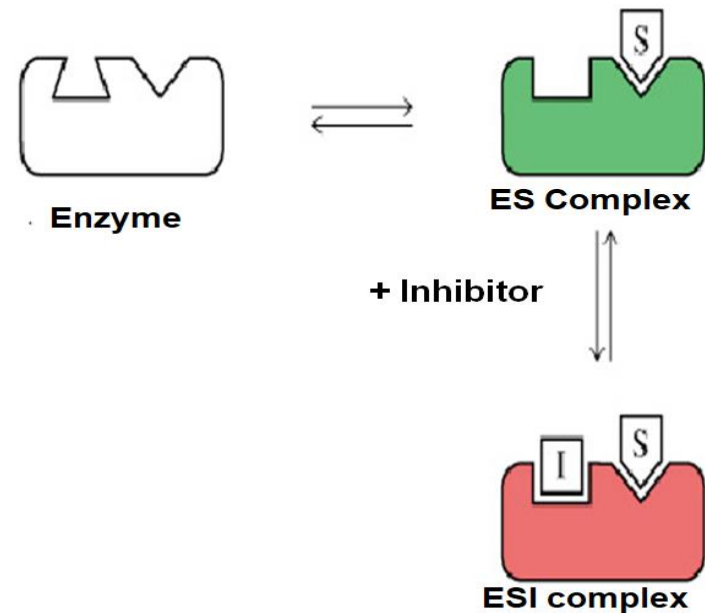
- ✓ Συναγωνιστικοί (competitive)
- ✓ Μη συναγωνιστικοί (Non-competitive)
- ✓ Ασυναγώνιστοι (Un-competitive)



## ✓ Ασυναγώνιστοι (Un-competitive)

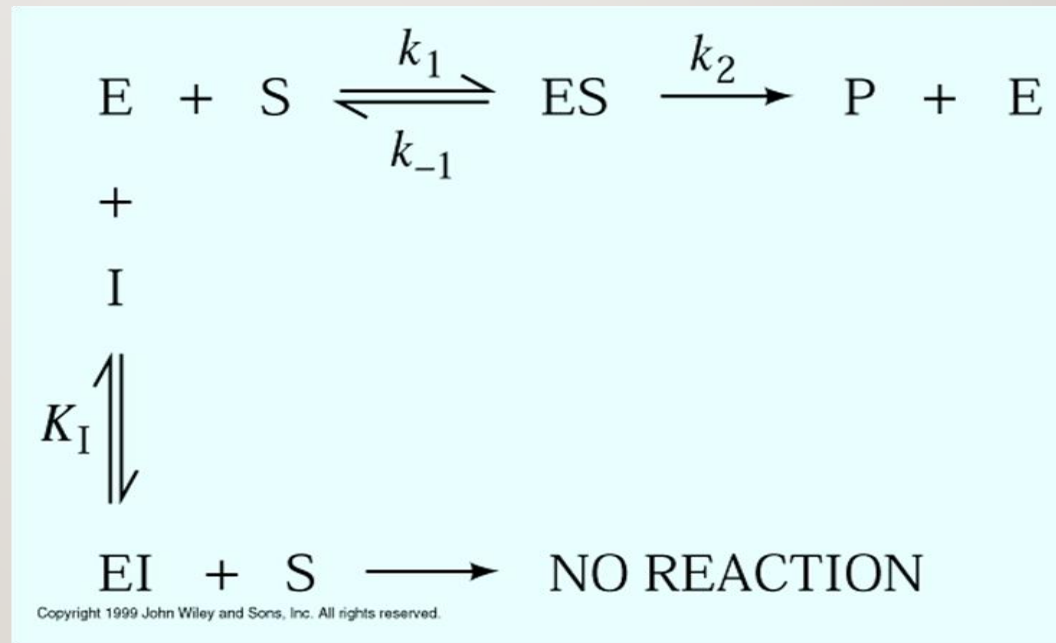
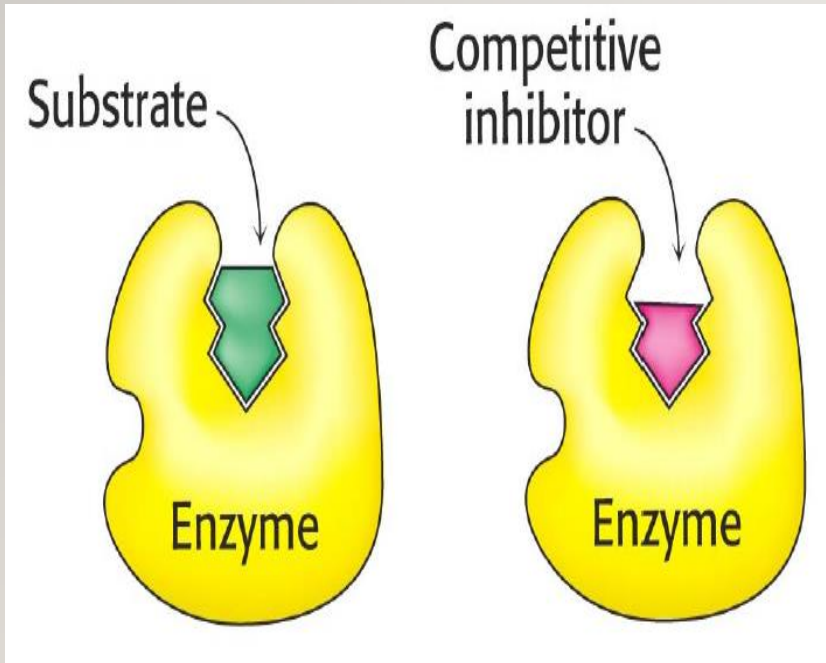
- Συνδέονται μόνο με το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος
- Δεν δεσμεύονται με το ελεύθερο ένζυμο
- Τόσο το  $K_m$  όσο και το  $V_{max}$  μειώνονται.

## Un-competitive Inhibitor



# ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

## Μη Αντιστρεπτοί αναστολείς (reversible inhibitors)



**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ  
ΜΕΡΟΣ  
ΚΙΝΗΤΙΚΉ ΟΞΙΝΗΣ  
ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ**

**1<sup>ο</sup> Πείραμα:**

Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της π-νιτροφαινόλης

**2<sup>ο</sup> Πείραμα:**

Καταλυτική δράση της όξινης φωσφατάσης

**3<sup>ο</sup> Πείραμα:**

Κινητική της δραστηρότητας της όξινης φωσφατάσης  
συναρτήσει του χρόνου επώασης

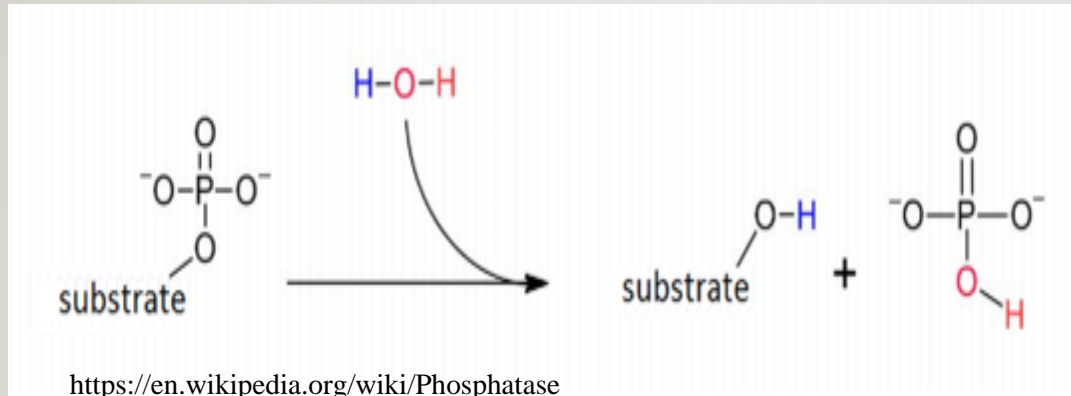
**4<sup>ο</sup> Πείραμα:**

Προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης της όξινης  
φωσφατάσης

**5<sup>ο</sup> Πείραμα:**

Προσδιορισμός της  $K_m$  της όξινης φωσφατάσης ως προς  
φωσφορική π-νιτροφαινόλη

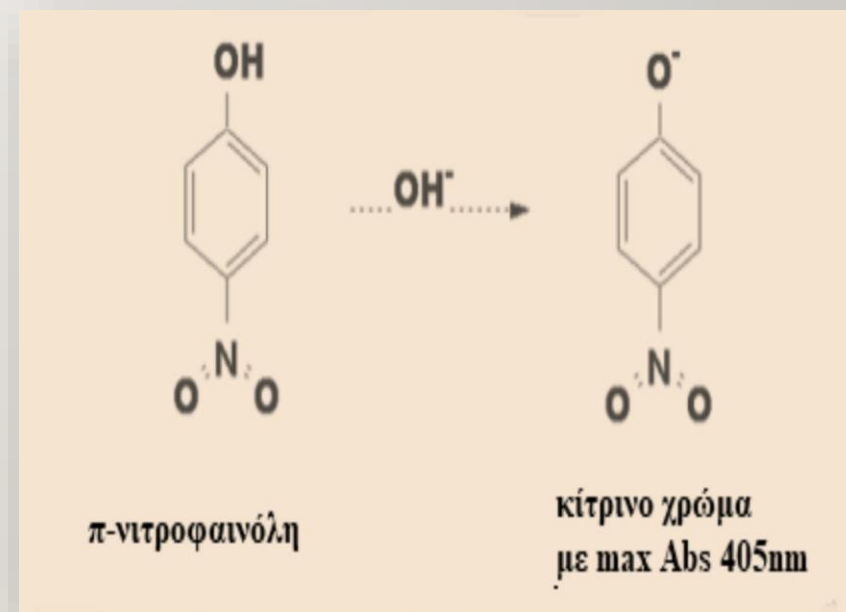
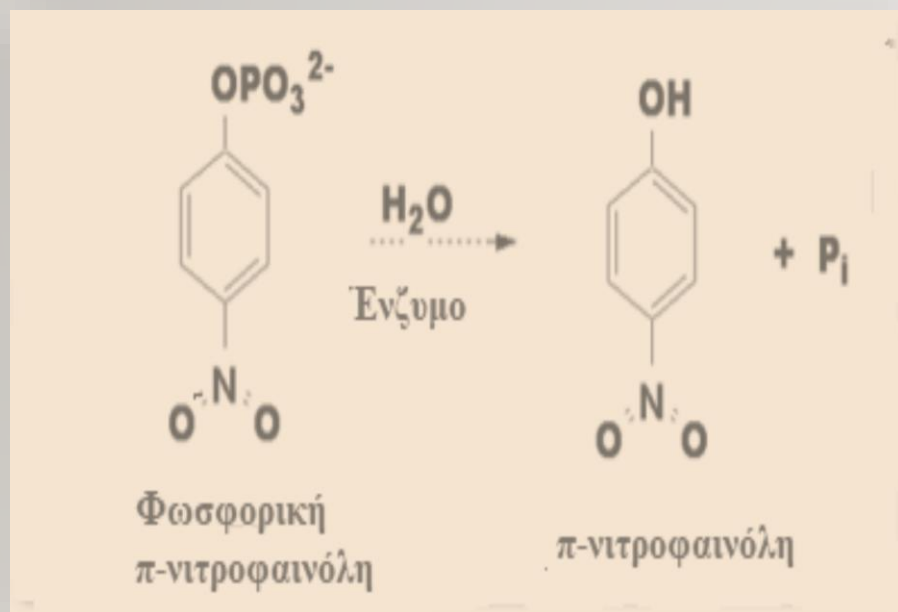
- Τα ένζυμα φωσφατάσες ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία υδρολάσες. Απαντώνται συχνά στη φύση και ο ρόλος τους είναι η κατάλυση της υδρόλυσης φωσφορικών μονοεστέρων με απελευθέρωση ανόργανου φωσφορικού ιόντος (Pi).



- Κάποιες φωσφατάσες δρουν σε συγκεκριμένα μόνο υποστρώματα και κάποιες σε ευρύτερο φάσμα υποστρωμάτων. Οι φωσφατάσες αυτές ταξινομούνται ανάλογα με το pH στο οποίο δρούν σε:
  - Όξινες φωσφατάσες
  - Αλκαλικές Φωσφατάσες

- 
- Ένζυμο όξινη φωσφατάση (από φύτρο σιταριού)
  - Υπόστρωμα φωσφορική π-νιτροφαινόλη (NPP).
  - Η ταχύτητα της αντίδρασης θα υπολογιστεί με βάση το βαθμό υδρόλυσης του υποστρώματος και ο βαθμός υδρόλυσης θα προσδιοριστεί φωτομετρικά.

Η π-νιτροφαινόλη που είναι το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης, σχηματίζει σε περιβάλλον αλκαλικό, ιόντα των οποίων το μέγιστο απορρόφησης είναι στα 405 nm



# 1<sup>ο</sup> Πείραμα

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της π-  
νιτροφαινόλης



# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΣΚΕΥΗ – ΟΡΓΑΝΑ

## 1<sup>ο</sup> Πείραμα

---

- Αντιδραστήρια: Διάλυμα NaOH 0,02 M, διάλυμα π-νιτροφαινόλης 60 μM σε 0,02 M NaOH
- Σκεύη: Δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες
- Όργανα: Φασματοφωτόμετρο, Αναδευτήρας δοκιμαστικών (vortex)

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

## 1ο πείραμα

- Σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέστε τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον πιο κάτω Πίνακα:

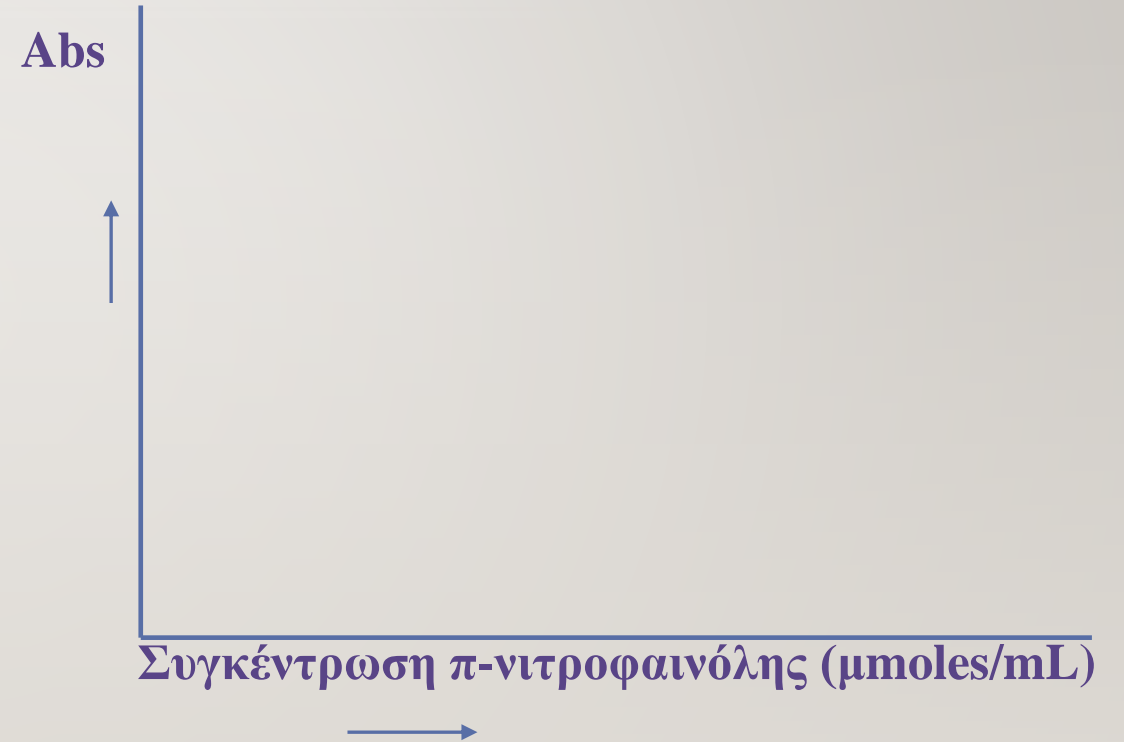
No Σωλήνα	1	2	3	4	5	6
π-νιτροφαινόλη 60 $\mu$ M (mL)	0	1	2	3	4	5
NaOH 0,02 M (mL)	6	5	4	3	2	1

- Αναδεύστε καλά τους σωλήνες
- Μετρήστε την απορρόφηση στα 405 nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό για το μηδενισμό της απορρόφησης του οργάνου τον 1<sup>ο</sup> σωλήνα ο οποίος δεν περιέχει π-νιτροφαινόλη.

# ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1<sup>ο</sup> Πείραμα

No Σωλήνα	Absorbance (A)
1	
2	
3	
4	
5	
6	



## ΣΗΜΕΙΩΣΗ

- Η πρότυπη καμπύλη χρειάζεται για τα επόμενα πειράματα για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων των οποίων θα μετρήσουμε την απορρόφηση στα 405 nm.

### ΩΣΤΟΣΟ

- Υπάρχει και η εναλλακτική λύση αντί της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης της π-νιτροφαινόλης να χρησιμοποιήσουμε τη σχέση  $A = \epsilon \cdot C \cdot l$  και το δεδομένο πως για την π-νιτροφαινόλη το  $\epsilon$  είναι γνωστό βιβλιογραφικά και είναι ίσο με  $18750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Επίσης είναι γνωστό και το  $l$  (εσωτερική διάμετρος κυψελίδας)  $l = 1 \text{ cm}$
- Έτσι αν έστω βρούμε για παράδειγμα  $A = 0,20$  τότε
$$C = 0,20 / (18750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \cdot 1\text{cm} = 1,067 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

# 2<sup>ο</sup> Πείραμα

Καταλυτική δράση της όξινης φωσφατάσης

# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΣΚΕΥΗ – ΟΡΓΑΝΑ

## 2<sup>ο</sup> Πείραμα

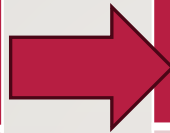
---

- Αντιδραστήρια: Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,1 M pH=4,5 διάλυμα φωσφορικής π-νιτροφαινόλης 2,5 mM, διάλυμα NaOH 0,1 M, ενζυμικό παρασκεύασμα όξινης φωσφατάσης
- Σκεύη: Δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες
- Όργανα: Φασματοφωτόμετρο, Υδατόλουτρο 37 °C Αναδευτήρας δοκιμαστικών (vortex)

# Πειραματική Πορεία

Προσθέστε σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες τα ακόλουθα:

Σωλήνας	0,1 M κιτρικού Buffer pH=4,5 mL	2,5 mM φωσφορική π-νιτροφαινόλη (mL)
1 <sup>ος</sup>	2	2
2 <sup>ος</sup>	2	2
3 <sup>ος</sup>	2	2



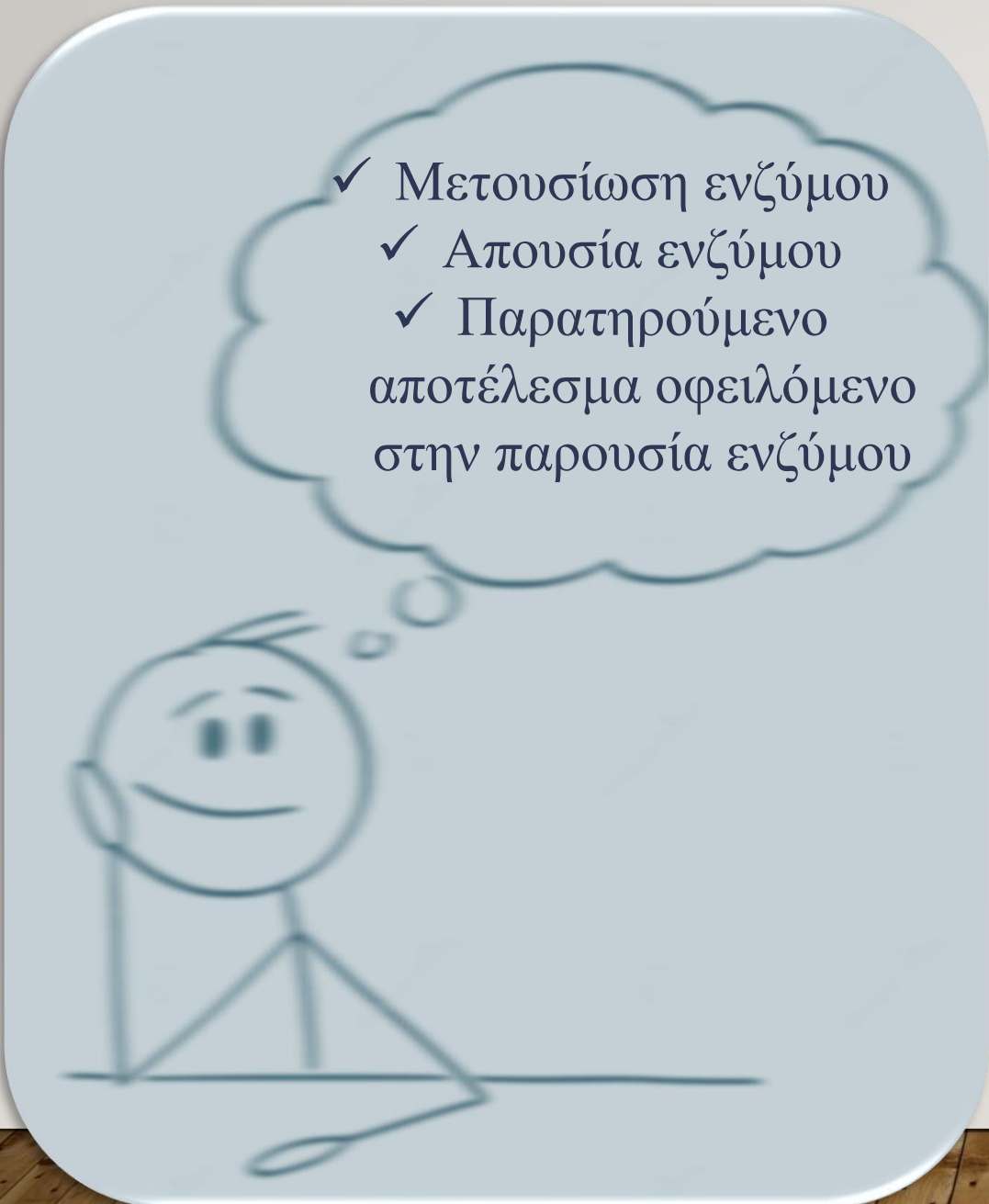
Σωλήνες	d H <sub>2</sub> O (mL)	Ενζυμικό παρασκεύασμα (mL)	Βρασμένο(100°C για 10min) Ενζυμικό Παρασκεύασμα (mL)
1 <sup>ος</sup>	1	-	-
2 <sup>ος</sup>	-	1	-
3 <sup>ος</sup>	-	-	1

Ανάδευση των τριών σωλήνων και τοποθέτηση για επώαση 10 min σε υδατόλουτρο 37 ° C



Στη συνέχεια ακολουθεί μεταφορά 1 mL από κάθε σωλήνα σε τρεις νέους δοκιμαστικούς και άμεση προσθήκη 3 mL 0,1 M NaOH.

Αφού αποκτήσουν Τδωμ μέτρηση απορρόφησης στα 405 nm

- 
- ✓ Μετουσίωση ενζύμου
  - ✓ Απουσία ενζύμου
  - ✓ Παρατηρούμενο αποτέλεσμα οφειλόμενο στην παρουσία ενζύμου

✓ Το NaOH σταματά την ενζυμική αντίδραση κάνοντας αλκαλικό το pH. Έτσι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της π-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε.

✓ Συγκρίνετε τις διαφορές στους τρεις σωλήνες και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα.



# 3<sup>ο</sup> Πείραμα

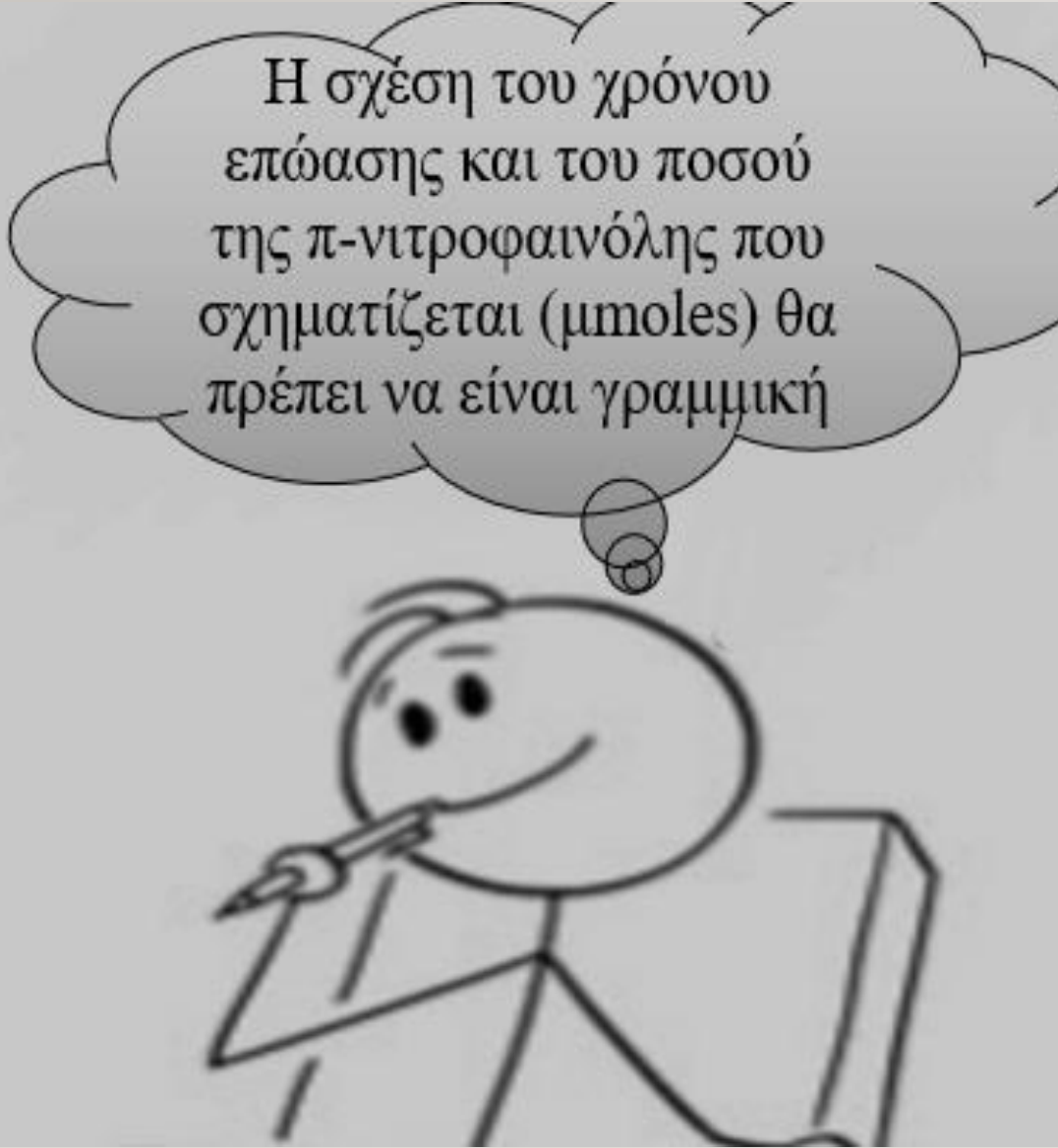
Κινητική της δραστηρότητας της όξινης φωσφατάσης σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης

# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΣΚΕΥΗ – ΟΡΓΑΝΑ

## 3<sup>ο</sup> Πείραμα

---

- Αντιδραστήρια: Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,1 M pH=4,6 διάλυμα φωσφορικής π-νιτροφαινόλης 2,5 mM, διάλυμα NaOH 0,1 M, 1 mL ενζυμικού παρασκευάσματος
- Σκεύη: Δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες
- Όργανα: Φασματοφωτόμετρο, Αναδευτήρας δοκιμαστικών (vortex), υδατόλουτρο 37 ° C



Η σχέση του χρόνου επώασης και του ποσού της π-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται (μmoles) θα πρέπει να είναι γραμμική

Η ποσότητα των προϊόντων μιας ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από το χρόνο επώασης και τη συγκέντρωση του ενζύμου.

- Πριν προχωρήσει κανείς στην κινητική μελέτη της φωσφατάσης, θα πρέπει να προσδιορίσει την κατάλληλη συγκέντρωση του ενζυμικού παρασκευάσματος που θα χρησιμοποιήσει. Αυτό είναι απαραίτητο και διότι τα παραγόμενα φωσφορικά ανιόντα αναστέλλουν τη δράση της φωσφατάσης.

# Πειραματική Πορεία

## 1<sup>ος</sup> δοκ. σωλήνας

- 2 mL 0,1 M Buffer κιτρικού pH = 4,5
- 2 mL διαλ/μα 2,5 mM φωσφορική π-νιτροφαινόλη
- 1 mL ενζυμικό παρασκεύασμα

Ανάμιξη των συστατικών του 1<sup>ου</sup> σωλήνα και αμέσως μεταφορά 0,5 mL αυτού στο σωλήνα τυφλό που περιέχει 3 mL NaOH 0,1 M (Το NaOH σταματά την αντίδραση)

## 1<sup>ος</sup> δοκ. σωλήνας

Επώαση στους 37°C για 5min

Μετά την πάροδο επώασης 5 min σε 37 °C μεταφορά 0,5 mL σε 3ο σωλήνα που περιέχει 3 mL NaOH 0,1 M

Η διαδικασία μεταφοράς 0,5 mL από τον 1<sup>ο</sup> δοκ. σωλήνα επαναλαμβάνεται σε 4<sup>ο</sup>, 5<sup>ο</sup> και 6<sup>ο</sup> δοκιμαστικό σωλήνα με 3mL NaOH 0,1 M αφού περάσουν 10, 20 και 30 min επώασης αντίστοιχα σε 37 °C

## 2ος δοκ. ΤΥΦΛΟ

- 3 mL NaOH 0,1 M
- 0,5 mL 1<sup>ου</sup> σωλήνα

**Αυτό το δείγμα αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 0 min και είναι το τυφλό.**

## 3<sup>ος</sup> δοκ. Σωλήνας 5min

- 3 mL NaOH 0,1 M
- 0,5 mL 1<sup>ου</sup> σωλήνα

**Αυτό το δείγμα αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 5 min**

- Εφόσον οι σωλήνες αφεθούν να αποκτήσουν  $T_{\delta\omega\mu}$  μετριέται η απορρόφησή των δειγμάτων τους στα 405 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το δείγμα που αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 0 min.
- Στο τέλος εξετάζεται εάν η ποσότητα της π-νιτροφαινόλης η οποία σχηματίζεται ( $\mu\text{moles}$ ) είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου κατά τη διάρκεια των 30 min. Στην περίπτωση που δεν είναι, το πείραμα επαναλαμβάνεται με μεγαλύτερη αραιώση του ενζυμικού παρασκευάσματος της φωσφατάσης.

Υπολογισμός  $\mu\text{mol}$  π-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται.

- Να ληφθεί υπόψη ο όγκος του μίγματος επώασης που ήταν 5 mL και πως από αυτό το μίγμα κάθε φορά λαμβάνονταν ποσότητα 0,5 mL και αραιώνονταν ως  $V_{\text{τελ}}=3,5$  mL για τη μέτρηση της απορρόφησης

# 4<sup>ο</sup> Πείραμα

Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της όξινης φωσφατάσης

# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΣΚΕΥΗ – ΟΡΓΑΝΑ

## 4<sup>ο</sup> Πείραμα

---

- Αντιδραστήρια: Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2 M κιτρικού –αιθυλενοδιαμίνης pH=3,0, pH=3,5, pH=4,0 pH=4,5 pH= 5,5 pH=6,2, pH=7,0 διάλυμα φωσφορικής π-νιτροφαινόλης 2,5 mM, διάλυμα NaOH 0,1 M, ενζυμικό παρασκεύασμα όξινης φωσφατάσης
- Σκεύη: Δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες
- Όργανα: Φασματοφωτόμετρο, Αναδευτήρας δοκιμαστικών (vortex), υδατόλουτρο 37 °C





- 
- Μεταφέρατε 0,5 mL δείγματος από το σωλήνα 6 (pH =7,0) σε σωλήνα που περιέχει 3 mL NaOH 0,1 M (το δείγμα αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 0 και αποτελεί το τυφλό) και αφήστε στον πάγκο το σωλήνα.
  - Επωάστε τους υπόλοιπους σωλήνες 5 σωλήνες σε υδατόλουτρο στους 37°C για 20 min
  - Στη συνέχεια μεταφέρατε 0,5 mL από κάθε ένα από τους 6 σωλήνες σε άλλους 6 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 3 mL NaOH 0,1 M και μετρήστε την απορρόφηση καθενός στα 405 nm. (Μηδενίζετε με το τυφλό)

# ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

No Σωλήνα	Abs	Units	pH
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Με βάση την καμπύλη του 1<sup>ου</sup> πειράματος, βρίσκουμε για κάθε σωλήνα τα  $\mu\text{moles}$  της π-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε και στη συνέχεια την ενεργότητα (units) της φωσφατάσης (units =  $\mu\text{moles}/\text{min}$ )

Προσοχή η απορρόφηση που μετράμε αντιστοιχεί σε τελική αραίωση 3,5 mL του όγκου 0,5 mL που λήφθηκε από το σωλήνα αντίδρασης.



# 5<sup>ο</sup> Πείραμα

Προσδιορισμός της Km της όξινης φωσφατάσης ως προς φωσφορική π-νιτροφαινόλη

# ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΣΚΕΥΗ – ΟΡΓΑΝΑ

## 5<sup>ο</sup> Πείραμα

---

- Αντιδραστήρια: Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,1 M pH=4,6 διάλυμα φωσφορικής π-νιτροφαινόλης 12,5 mM, διάλυμα NaOH 0,1 M, ενζυμικό παρασκεύασμα όξινης φωσφατάσης
- Σκεύη: Δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες
- Όργανα: Φασματοφωτόμετρο, Αναδευτήρας δοκιμαστικών (vortex), υδατόλουτρο 37 ° C

# Πειραματική Πορεία 5<sup>ο</sup> Πείραμα

Ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα

No	Φωσφορική π- νιτροφαινόλη 12,5 mM	dH <sub>2</sub> O	0,1 M κιτρικού buffer pH=4,5	Ενζυμικό παρασκεύασμα	Πολύ καλή ανάμιξη όλων <u>Μεταφορά</u> <u>αμέσως 1 mL</u> <u>από τον Νο 1</u> <u>στο τυφλό</u>	Τυφλό Χρόνος επώασης 0 min
1	0,1 mL	1,9 mL	2 mL	1 mL		<ul style="list-style-type: none"><li>• 3 mL NaOH 0,1 M</li><li>• 1 mL από τον σωλήνα Νο 1</li></ul>
2	0,2 mL	1,8 mL	2 mL	1 mL		
3	0,4 mL	1,6 mL	2 mL	1 mL		
4	1 mL	1 mL	2 mL	1 mL		
5	2 mL	0 mL	2 mL	1 mL		



Επώαση των 5 αρχικών σωλήνων στους 37 °C σε υδατόλουτρο

Μετά από επώαση 10 min και 20 min των 5 δοκιμαστικών σωλήνων ακολουθεί μεταφορά ενός 1 mL από κάθε σωλήνα, σε 5 νέους δοκιμαστικούς που ο κάθε ένας περιέχει 3 mL 0,1 N NaOH



Προσδιορίζετε η απορόφηση των δειγμάτων στα 405 nm

# Μετρήσεις

Συγκέντρωση  
υποστρώματος  
[S]

No Σωλήνα	Συγκέντρωση φωσφορικής π- νιτροφαινόλης (mM)	1/C
1		
2		
3		
4		
5		

Κάντε τους κατάλληλους υπολογισμούς σε κάθε σωλήνα έχοντας υπόψη τα εξής:

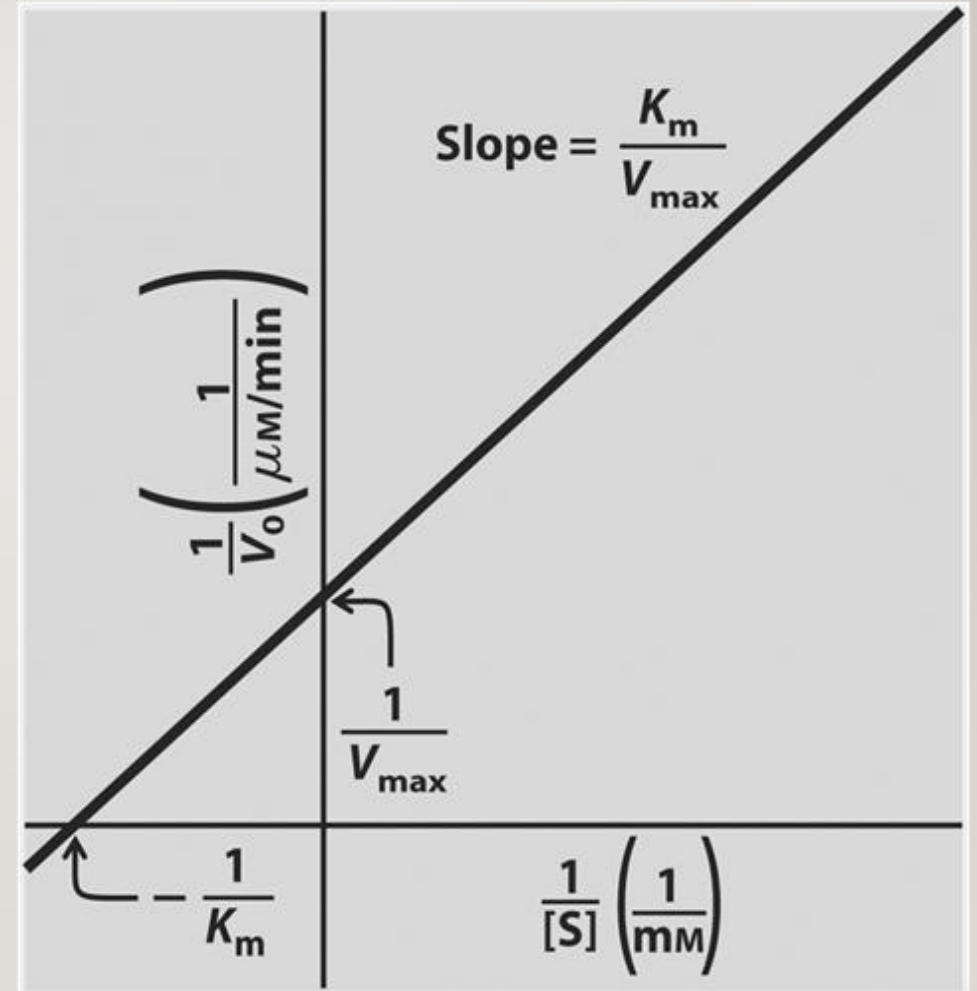
- ✓ Τους όγκους υποστρώματος που σε κάθε σωλήνα προστίθενται (διαφ 51)
- ✓ πως η αρχική συγκέντρωση π-νιτροφαινόλης είναι 12,5 mM
- ✓ Πως η τελική αραίωση είναι 5 mL





## Αποτελέσματα

- Εκφράζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος [S], σε mmol/L
- Υπολογίζονται τα μmoles της π-νιτροφαινόλης η οποία ελευθερώνεται με τη δράση της φωσφατάσης .
- Προσδιορίζεται η ταχύτητα υδρόλυσης της π-νιτροφαινόλης, (ταχύτητα της αντίδρασης V), σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και εκφράζεται ως μmoles π-νιτροφαινόλης/min
- Γίνεται η γραφική παράσταση 1/V σε συνάρτηση με το 1/[S] και προσδιορίζεται η τιμή Km



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ, Αναπλ. Καθηγητής «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ», Τμήμα Βιολογίας Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ, ΑΘΗΝΑ 2023
- Garrett, Charles M. Grisham «Βιοχημεία» 6<sup>η</sup> ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ -1<sup>η</sup> ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ Reginald H., Εκδόσεις Utopia, 2019
- Κωνσταντίνος Δημόπουλος Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, Σμαραγδή Αντωνοπούλου Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, «Βασική ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»3<sup>η</sup> Έκδοση Αθήνα 2020, Εκδόσεις Νέον
- [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Physical\\_Chemistry\\_for\\_the\\_Biosciences\\_\(Chang\)/10%3A\\_Enzyme\\_Kinetics/10.07%3A\\_The\\_Effect\\_of\\_pH\\_on\\_Enzyme\\_Kinetics](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_(Chang)/10%3A_Enzyme_Kinetics/10.07%3A_The_Effect_of_pH_on_Enzyme_Kinetics)
- [https://www.kgmu.org/download/virtualclass/biochemistry/enzyme\\_class2.ppt](https://www.kgmu.org/download/virtualclass/biochemistry/enzyme_class2.ppt)
- <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/citrate-buffer-ph-3-to-6-2>
- <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-concentration-and-buffer-exchange/buffer-reference-center#citric2>