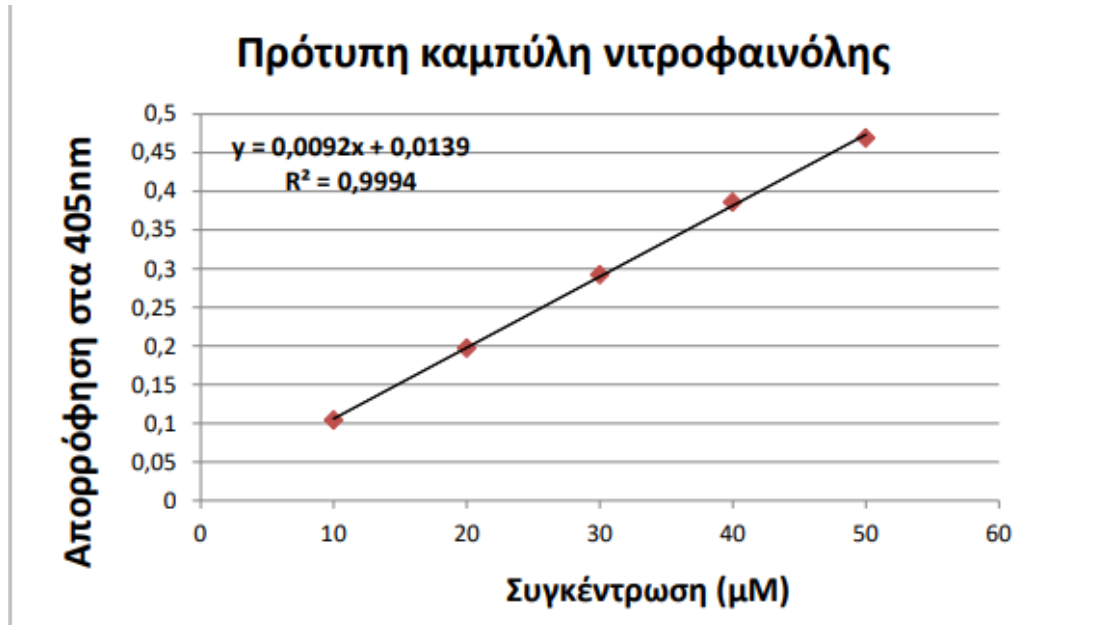


1ο Πείραμα 7^ο Εργαστηρίου

ΣΚΟΠΟΣ: Η δημιουργία πρότυπης καμπύλης νιτροφαινόλης. Από την εξίσωση ευθείας αυτής της πρότυπης, ($y = 0,0092x + 0,0139$ όπου y η απορρόφηση και x η συγκέντρωση π-νιτροφαινόλης), αντικαθιστώντας τις τιμές απορρόφησης στα επόμενα πειράματα θα βρούμε τη συγκέντρωση π-νιτροφαινόλης.



2^ο Πείραμα 7^ο Εργαστηρίου

ΣΚΟΠΟΣ: Η πληρέστερη κατανόηση του ότι για να σχηματιστεί το προϊόν της αντίδρασης, η π-νιτροφαινόλη, θα πρέπει να υπάρχει κατάλληλο pH (ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών), υπόστρωμα(φωσφορική π-νιτροφαινόλη), και ένζυμο (**σωλήνας 2**)

Σε περίπτωση που:

- Δεν υπάρχει ένζυμο δεν σχηματίζεται το προϊόν π-νιτροφαινόλη (**σωλήνας 1**)
- Το ένζυμο έχει μετουσιωθεί. Αυτό σημαίνει πως λόγω υψηλής θερμοκρασίας 100°C (λόγοι μετουσίωσης υπάρχουν κι άλλοι εδώ είναι η υψηλή θερμοκρασία), έχει υποστεί αλλαγή της διαμόρφωσης από τη φυσική/λειτουργική δομή σε μία μη λειτουργική ξεδιπλωμένη ή διαφορετική από την αρχική), άρα δεν μπορεί να δράσει και να ενωθεί με το υπόστρωμα με το οποίο πρέπει να ταιριάζει απόλυτα, (σχέση κλειδιού με κλειδαριά).

Πάλι άρα δεν σχηματίζεται το προϊόν π-νιτροφαινόλη (**σωλήνας 3**)

3^ο Πείραμα 7^ο Εργαστηρίου

ΣΚΟΠΟΣ: Ο έλεγχος της κατάλληλης συγκέντρωσης ενζύμου για να γίνει η κινητική μελέτη. Για να είναι σωστή η συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιούμε, θα πρέπει να ισχύει πως η σχέση του χρόνου επώασης του σωλήνα αντίδρασης και του ποσού της π νιτροφαινόλης που σχηματίζεται θα πρέπει να είναι γραμμική

ΣΩΛΗΝΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΘΕ ΦΟΡΑ ΠΕΡΙΕΧΕΙ: 2 mL 0,1 M Buffer κίτρικού pH = 4,5, 2 mL διαλ/μα 2,5 mM φωσφορική π-νιτροφαινόλη (υπόστρωμα) και 1 mL ενζυμικό παρασκεύασμα ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ 5 mL

Σταματάμε κάθε φορά την αντίδραση λαμβάνοντας 0,5 mL από το σωλήνα αντίδρασης και προσθέτοντάς τα σε νέο σωλήνα που περιέχει 3 mL NaOH. Αυτό διότι το NaOH, σταματά την αντίδραση. Σταματάμε την αντίδραση 5 φορές (σε 0 χρόνο επώασης, 5 min χρόνο επώασης, 10 min χρόνο επώασης, 20 min χρόνο επώασης και 30 min χρόνο επώασης). Άρα εκτός από τον πρώτο σωλήνα που είναι ο σωλήνας της αντίδρασης, έχουμε άλλους 5 σωλήνες που όλοι περιέχουν NaOH 3 mL και σε αυτούς θα προσθέσουμε 0,5 mL από το σωλήνα αντίδρασης σε χρόνο t:

- 0 min επώασης και τον έχουμε ως τυφλό.
- 5 min επώασης στους 37 °C
- 10 min επώασης στους 37 °C
- 20 min επώασης στους 37 °C
- 30 min επώασης στους 37 °C (τη σταματήσαμε σε 26 min λόγω έλλειψης χρόνου)

Στη συνέχεια μετράμε την απορρόφηση και από τις τιμές απορρόφησης και την εξίσωση ευθείας της πρότυπης καμπύλης $y = 0,0092x + 0,0139$ (1^ο πειράματος 7^ο Εργαστηρίου) αντικαθιστώντας το y με την απορρόφηση, βρίσκουμε πόσο π-νιτροφαινόλη υπάρχει στα 3,5 mL.

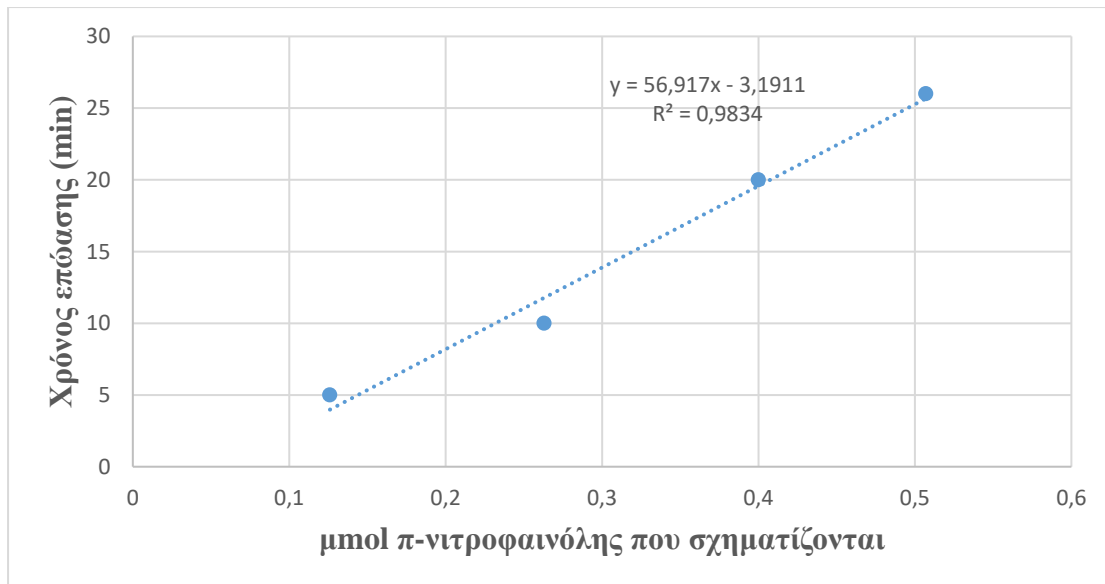
ΠΙΝΑΚΑΣ 1

t (min)	Abs	C π νιτροφαινόλης (μM) στα 3,5 mL
5	0,047	$(0,047 - 0,0139)/0,0092 = 3,60$
10	0,083	$(0,083 - 0,0139)/0,0092 = 7,51$
20	0,119	$(0,119 - 0,0139)/0,0092 = 11,42$
26	0,147	$(0,147 - 0,0139)/0,0092 = 14,47$

Στα 3,5 mL η π-νιτροφαινόλη είναι αραιωμένη. Αυτό γιατί από τα 5 mL πήραμε 0,5 mL και τα αραιώσαμε στα 3,5 mL.

Για παράδειγμα στα 5 min θα ισχύει $C \times 0,5 \text{ mL} = 3,60 \mu\text{M} \times 3,5 \text{ mL}$ Άρα η C στα 5 mL θα είναι $C = (3,5/0,5) \times 3,60 \mu\text{M} = 7 \times 3,60 \mu\text{M} = 25,2 \mu\text{M}$ Με ίδιο τρόπο εργαζόμαστε για τους υπόλοιπους χρόνους.

t (min)	Abs	C π νιτροφαινόλης (μM) στα 3,5 mL	C π νιτροφαινόλης (μmol/1000mL) στο σωλήνα όγκου 5 mL	C π νιτροφαινόλης (μmol/mL) στο σωλήνα όγκου 5 mL	μmol π νιτροφαινόλης που υπάρχουν στο σωλήνα όγκου 5 mL
5	0,047	$(0,047 - 0,0139)/0,0092 = 3,60$	25,2	0,0252	0,126
10	0,083	$(0,083 - 0,0139)/0,0092 = 7,51$	52,57	0,0526	0,263
20	0,119	$(0,119 - 0,0139)/0,0092 = 11,42$	79,94	0,0800	0,400
26	0,147	$(0,147 - 0,0139)/0,0092 = 14,47$	101,29	0,1013	0,5065



Πράγματι η σχέση είναι γραμμική

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η Ταχύτητα U ή αλλιώς ενζυμική δραστηριότητα είναι τα $\mu\text{mol}/\text{min}$ της π νιτροφαινόλης που σχηματίζονται. Για παράδειγμα στα 5 min είναι $0,0252 \mu\text{mol}/\text{min}$

4ο Πείραμα 8^ο Εργαστηρίου

ΣΚΟΠΟΣ: Να βρεθεί το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου

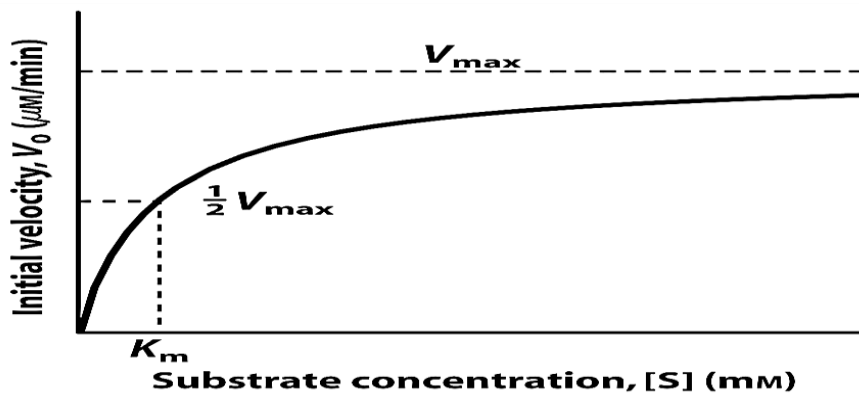
- Θέλουμε 7 σωλήνες με διαφορετικά pH
- Προσθέτουμε σε κάθε σωλήνα 1mL ενζύμου (συγκεκριμένης αρχικής συγκέντρωσης αυτής που τσεκάρουμε στο 3^ο Πείραμα 7^ο Εργαστηρίου ότι είναι σωστή), σε συνολικό όγκο αντίδρασης 5 mL Άρα η συγκέντρωση ενζύμου σταθερή σε κάθε σωλήνα.
- Προσθέτουμε κάθε φορά 2 mL υποστρώματος φωσφορικής π-νιτροφαινόλης αρχικής συγκέντρωσης (2,5 mM), σε συνολικό όγκο αντίδρασης 5 mL Άρα η συγκέντρωση υποστρώματος σταθερή επίσης σε κάθε σωλήνα.
- Προσθέτουμε σε κάθε σωλήνα 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών διαφορετικού pH κάθε φορά
- Από το σωλήνα με pH=7 μεταφέρουμε 0,5 mL σε σωλήνα που περιέχει NaOH 3 mL και σταματάμε την αντίδραση αμέσως. Αυτό είναι το τυφλό
- Επιάζουμε τους άλλους σωλήνες για 20 min στους 37 °C και σταματάμε μετά την αντίδραση σε όλους προσθέτοντας 0,5 mL σε σωλήνες που περιέχουν NaOH 3 mL
- Μετράμε τις απορροφήσεις στους σωλήνες και στη συνέχεια από την εξίσωση ευθείας της πρότυπης 1^ο πειράματος (7^ο Εργαστηρίου) βρίσκουμε C π-νιτροφαινόλης μM στα 3,5 mL (όπως ακριβώς κάναμε και στο 3^ο Πείραμα του 7^ο Εργαστηρίου). Στη συνέχεια και πάλι εργαζόμαστε ακριβώς όπως στο 3^ο πείραμα 7^ο εργαστηρίου, δηλαδή βρίσκουμε C π-νιτροφαινόλης μM στα 5 mL και ενζυμική δραστηριότητα για να κατασκευάσουμε διάγραμμα όπως το παρακάτω και να βρούμε το βέλτιστο pH:



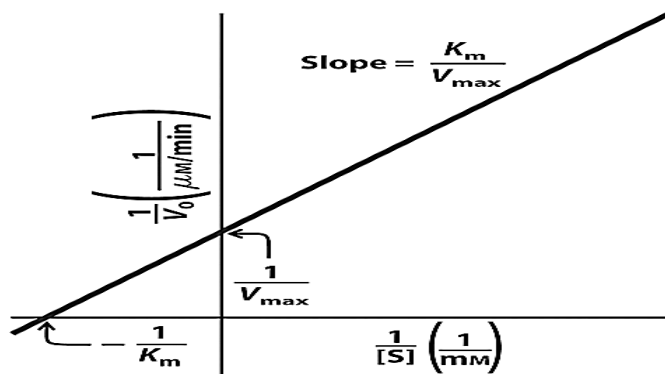
5ο Πείραμα 8^ο Εργαστηρίου

ΣΚΟΠΟΣ: Εδώ πλέον έχουμε τσεκάρει σε προηγούμενα πειράματα και την κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου και το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου. Ο σκοπός μας είναι να κατασκευάσουμε διαγράμματα

- Ταχύτητα (U) προς συγκέντρωση υποστρώματος ([S] για να υπολογίσουμε τη μέγιστη ταχύτητα



- και επίσης διάγραμμα $1/U$ συναρτήσει του $1/[S]$ για να υπολογίσουμε τη σταθερά K_m (Michaelis-Menten)



Άρα εργαζόμαστε με την κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου που ήδη βρήκαμε (3^ο πείραμα 7^ο Εργαστηρίου), το κατάλληλο pH που ήδη βρήκαμε (4^ο Πείραμα 8^ο Εργαστηρίου). ΑΛΛΑΖΟΥΜΕ ΟΜΩΣ ΚΑΘΕ ΦΟΡΑ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ [S]. Κατά τα λοιπά για τους υπολογισμούς ή για τον τρόπο που σταματάμε την αντίδραση ισχύουν τα ίδια με τα προηγούμενα.