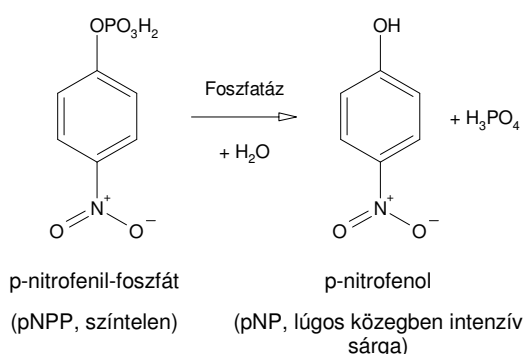


3. GYAKORLAT

KÍSÉRLETEK FOSZFATÁZZAL

A foszfatázok igen elterjedt enzimek, a legtöbb élőlényben megtalálhatók. Hatásukra a szerves foszfátészter-kötésből anorganikus foszfát szabadul fel. Míg a legtöbb enzim szubsztrátspecifitása szigorú, a gyakorlaton vizsgált savas foszfatáz csupán a foszfát-monoészterre specifikus. Többféle foszfátésztert hidrolizál. Természetes szubsztrátokat (glicerol-foszfat, glükóz-6-foszfat, fruktóz-1,6-bisfoszfát, adenozinfoszfát, stb.) és különböző szintetikus foszfátésztereket egyaránt. Kísérleteinkhez szintetikus szubsztrátot, p-nitrofenil-foszfatot használunk.

Az enzim savas közegben (pH 5.3) bontja a színtelen p-nitrofenil-foszfatot (pNPP), miközben anorganikus foszfát és **p-nitrofenol** (pNP) keletkezik. Ez utóbbi lúgos közegben sárga színű, fényelnyelési maximuma 410 nm, moláris abszorpciós koefficiense: $\epsilon = 16000 \text{ [mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \text{]}$.



1. pNP referenciasor készítése

Az enzim hatására keletkező p-nitrofenol mennyiségének meghatározásához készítsünk referenciasort.

Anyagok, eszközök

30 mM NaOH-oldat
 0.1 mM (azaz 0.1 $\mu\text{mol/ml}$) p-nitrofenol, 30 mM NaOH-oldatban
 kémcsövek, pipetták
 fotométer, küvettákkal

Feladat

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Standard pNP-oldat (ml)	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
NaOH-oldat (ml)	4.8	4.50	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0

Össztérfogat: 5.0-5.0 ml

Mérjük az oldat fényelnyelését 400 nm-en. A készüléket desztillált vizet használva nullázzuk.

Méréseinket foglaljuk táblázatba, majd ábrázoljuk az oldatok fényelnyelését a bemért p-nitrofenol μmol függvényében. Állapítsuk meg, hogy az összefüggés megfelel-e a Lambert-Beer törvénynek?

Az ábrázolt egyenesből számítsuk ki a 0.1 μmol p-nitrofenolnak megfelelő A_{400} -értéket. A következő kísérletek során ezt használjuk a p-nitrofenol mennyiségének kiszámításához.

2. Az enzimreakció időfüggése

Anyagok, eszközök

25 mM TRIS-citrát-puffer, pH 5.3
 0.4 mM p-nitrofenil-foszfát-oldat
 10 mM p-nitrofenil-foszfát-oldat
 foszfatáz enzim-oldat
 0.1 M NaOH-oldat
 kémcsövek, pipetták
 37 °C-os vízfürdő
 stopperóra
 fotométer, küvettákkal

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

	1.	2.	3.	4.	5.	6. Vak
10 mM pNPP-oldat (ml)	1	1	1	1	1	1
TRIS-citrát-puffer (ml)	1	1	1	1	1	1
Helyezze a kémcsöveket vízfürdőbe 5 percre						
Enzim-oldat (ml)	1	1	1	1	1	-
Desztillált víz (ml)	-	-	-	-	-	1

A bemérés után pontosan 5 perccel vegyük ki a vízfürdőből az "1" jelű kémcsövet, adjunk hozzá 2 ml 0.1 M NaOH-oldatot, rázzuk jól össze. A sorban következő kémcsövekkel végezzük el ugyanezt 10, 15, 20 és 25 perc után.

Mérjük le a minták fényelnyelését 400 nm-en. A fotométert desztillált vízre nullázzuk.

A hatodik kémcsövet "reagens vak"-nak használva számítsuk ki a képződött pNP μmol mennyiségeket, illetve a reakciósebességeket.

Ismételjük meg az előző feladatot 0.4 mM töménységű szubsztráttal is.

Számoljuk ki itt is a keletkező pNP mennyiséget, illetve a reakciósebességet.

Mérési eredményeinket foglaljuk össze egy-egy táblázatban:

Kémcső száma	Reakcióidő (sec)	A	A-A _V	pNP (μmol)	v ($\mu\text{mol}/\text{sec} = \mu\text{katal}$)
--------------	------------------	---	------------------	-------------------------	--

\underline{A} : a mért abszorpció értéke, \underline{A}_V : a vakérték abszorpciója, \underline{v} : a reakciósebesség.

A táblázatok alapján ábrázoljuk az inkubációs idő függvényében a keletkezett μmol pNP-t, valamint a reakciósebességet ($\mu\text{mol}/\text{sec}$). (Közös ábrán a 10 mM és a 0.4 mM pNPP-tal kapott eredményeket).

Kérdések, problémák

1. Mit állapíthatunk meg a reakcióidő – reakciósebesség összefüggéséből?
2. Hogyan befolyásolja ezt az enzim – szubsztrát arány?
3. Milyen gyakorlati veszéllyel jár ez? (Gondoljunk az enzim-diagnosztikára!)

3. Szubsztrátkoncentráció hatása a reakciósebességre

Anyagok, eszközök

25 mM TRIS-citrát-puffer, pH 5.3
 A szubsztrát (0.375 mM pNPP)
 B szubsztrát (0.6 mM pNPP)
 C szubsztrát (1.0 mM pNPP)
 D szubsztrát (3.0 mM pNPP)
 foszfatáz enzim-oldat
 0.1 M NaOH-oldat
 kémcsövek, pipetták
 fotométer
 0.3 mM K_2HPO_4 -ot tartalmazó TRIS-citrát-puffer, pH 5.3
 0.3 mM NaF-ot tartalmazó TRIS-citrát-puffer, pH 5.3

Feladat

Állítsuk be a következő reakcióelegyeket:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
TRIS-citrát-puffer (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
A szubsztrát-oldat (ml)	1	1	-	-	-	-	-	-
B szubsztrát-oldat (ml)	-	-	1	1	-	-	-	-
C szubsztrát-oldat (ml)	-	-	-	-	1	1	-	-
D szubsztrát-oldat (ml)	-	-	-	-	-	-	1	1
Enzim-oldat (ml)	1	-	1	-	1	-	1	-
Deszillált víz (ml)	-	1	-	1	-	1	-	1

A kémcsöveket helyezzük 37 °C-os vízfürdőbe, pontosan **15 perc után** mérjük mindegyikbe 2 ml NaOH-oldatot. Mérjük az oldatok fényelnyelését fotométerben, 400 nm-es hullámhosszon. Előbb a páros számú elegyeket (vakokat), majd a páratlan számúakat (próbák) a színintenzitás növekvő sorrendjében (1.,3.,5.,7.). A készüléket mindig deszillált vízre nullázzuk. A beállítást mérés közben többször ellenőrizzük.

Számítsuk ki a keletkezett pNP mennyiségét (μmol -ban), majd a reakció sebességét ($\mu\text{mol}/\text{sec}$). Mérési eredményeinket foglaljuk táblázatba. Pl.:

Kémcső száma	(S) _b	(S) _r	A	A-A _v	pNP (μmol)	v ($\mu\text{mol}/\text{sec} = \mu\text{katal}$)
1.	0.375	0.125				
3.	0.600	0.200				
5.	1.000	0.333				
7.	3.000	1.000				

(S)_b: a bemért szubsztrát-oldat p-nitrofenil-foszfat koncentrációja, (S)_r: a reakcióelegy p-nitrofenil-foszfat koncentrációja, A: a mért abszorpció értéke, A_v: a vakérték abszorpciója, v: a reakciósebesség.

Szerkesszük meg a következő táblázatot:

Kémcső száma	(S) _r	1/S _r	v	1/v
1.	0.125	8		
3.	0.200	5		

5.	0.333	3		
7.	1.000	1		

Mérési eredményeink és számításaink alapján ábrázoljuk a reakciósebességet (v) a szubsztrátkoncentráció ($[S]$) függvényében, valamint a reakciósebesség reciprokát ($1/v$) a szubsztrátkoncentráció reciprokának ($1/[S]$) függvényében, Lineweaver-Burk szerint.

A grafikus ábrázolás alapján olvassuk le az $1/K_M$ és $1/V_{max}$ értékeket. Számítsuk ki a K_M és V_{max} értékeket.

4. Kompetitív gátlás orto-foszfáttal

A foszfát-ion kompetitíve gátolja a foszfatázt. A kísérletben a reakcióelegyekhez kis koncentrációban K_2HPO_4 -ot is adunk (0.1 mM a reakcióelegyen). Vizsgáljuk, hogy a növekvő szubsztrátkoncentráció függvényében hogyan változik a reakciósebesség, illetve a gátlás. Ellenőrizzük, hogyan változik a K_M és V_{max} értéke.

Feladat

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
K_2HPO_4 -oldat (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
A szubsztrát-oldat (ml)	1	1	-	-	-	-	-	-
B szubsztrát-oldat (ml)	-	-	1	1	-	-	-	-
C szubsztrát-oldat (ml)	-	-	-	-	1	1	-	-
D szubsztrát-oldat (ml)	-	-	-	-	-	-	1	1
Enzim-oldat (ml)	1	-	1	-	1	-	1	-
Desztillált víz (ml)	-	1	-	1	-	1	-	1

A kémcsöveket helyezük 37 °C-os vízfürdőbe, pontosan 15 perc után mérjük mindegyikbe 2.0 ml NaOH-oldatot, a páros számú kémcsöveket reagens-vaknak használva, mérjük az oldatok fényelnyelését fotométerben, 400 nm-en, mint előbb (először a vakokat 2.,4.,6.,8., majd a próbákat 1.,3.,5.,7. sorrendben)

Számítsuk ki a keletkezett pNP mennyiséget (μmol), valamint a reakciósebességet ($\mu\text{mol}/\text{sec}$). Mérési eredményeinket, az előzőekhez hasonlóan, foglaljuk táblázatba:

Kémcső száma	(S) _b	(S) _r	A	A-A _v	pNP (μmol)	v ($\mu\text{mol}/\text{sec} = \mu\text{katal}$)
--------------	------------------	------------------	---	------------------	-------------------------	--

Szerkesszük meg a következő táblázatot:

Kémcső száma	(S) _r	1/(S) _r	v	1/v
--------------	------------------	--------------------	---	-----

Ábrázoljuk a reakciósebességet (v) a szubsztrátkoncentráció ($[S]$) függvényében, illetve a reakciósebesség reciprokát ($1/v$) a szubsztrátkoncentráció reciprokának ($1/[S]$) függvényében, ugyanazon grafikonon, mint előbb.

5. Nem kompetitív gátlás NaF-dal

Feladat

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
NaF tartalmú puffer (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
A szubsztrát-oldat (ml)	1	1	-	-	-	-	-	-
B szubsztrát-oldat (ml)	-	-	1	1	-	-	-	-
C szubsztrát-oldat (ml)	-	-	-	-	1	1	-	-
D szubsztrát-oldat (ml)	-	-	-	-	-	-	1	1
Enzim-oldat (ml)	1	-	1	-	1	-	1	-
Desztillált víz (ml)	-	1	-	1	-	1	-	1

A kémcsöveket helyezük 37 °C-os vízfürdőbe, pontosan 15 perc múlva mérjük be mindegyikbe 2 ml NaOH-oldatot. A páros számú kémcsöveket reagens-vaknak használva, mérjük az oldatok extinkcióját fotométerben 400 nm-en, mint az előbbieknél.

Számítsuk ki a keletkezett pNP mennyiségét (μmol), illetve a reakciósebességet ($\mu\text{mol}/\text{sec}$). Mérési eredményeinket, az előzőekhez hasonlóan, foglaljuk táblázatba.

Kémcső száma	(S) _b	(S) _r	A	A-A _v	pNP (μmol)	v ($\mu\text{mol}/\text{sec} = \mu\text{katal}$)
--------------	------------------	------------------	---	------------------	-------------------------	--

Szerkesszük meg a következő táblázatot:

Kémcső száma	(S) _r	1/(S) _r	v	1/v
--------------	------------------	--------------------	---	-----

Méréseink, illetve számításaink alapján ábrázoljuk a reakciósebességet (v) a szubsztrátkoncentráció ([S]) függvényében, valamint a reakciósebesség reciprokát (1/v) a szubsztrátkoncentráció reciprokának (1/[S]) függvényében, ugyanazon grafikonokon, mint előzőekben. Eredményeink csak így lesznek összevethetők és értékelhetők.

Kérdések

1. Mi a K_M , mit fejez ki, miért lényeges ismerete egy-egy enzim működését jellemezve?
2. Miért előnyös a kettős reciprokábrázolás (1/[S], 1/v) a lineáris összefüggés ([S], v) helyett?
3. Mi jellemzi a kompetitív és nem kompetitív gátlást, kettős reciprok rendszerben ábrázolva a mérési adatokat?
4. A kompetitív gátlás miért függeszthető fel ellentétben a nem kompetitív gátlással?