

Sprawozdanie z ćwiczenia nr 3 - Kinetyka enzymatyczna

Imię i nazwisko

Data.....

UZYSKANE WYNIKI LICZBOWE

(wartości liczbowe i wymiar)

Stała Michaelisa dla H_2O_2 , K_m :

Prędkość maksymalna V_{max} :

Stężenie enzymu w próbce, $[E]$: $10 \text{ nM} = 10^{-8} \text{ M} = \dots\dots\dots \text{mM}$

Liczba obrotów, stała katalityczna (k_{kat}) = $V_{max}/[E]$

Skuteczność = k_{kat}/K_m

Bufor (stężenie i skład) :

Stężenie gwajakolu (drugi substrat reakcji) w próbce, oblicz:

Do sprawozdania należy dołączyć wyniki w postaci:

- 5 krzywych kinetycznych (na wspólnym wykresie): C_{TG} od t
- wykresu Michaelisa-Menten, z zaznaczonymi stałymi K_m , V_{max}
- wykresu Lineweavera-Burka, z zaznaczonymi stałymi $-1/K_m$, $1/V_{max}$

WYNIKI

1. Denaturacja peroksydazy

Wpisz wyniki doświadczenia do tabeli

Oznaczanie katalitycznej aktywności peroksydazy prób 1'-6' po działaniu różnych czynników na próby 1-6:

Próba	Nazwa próby	Obserwowana barwa	Katalityczna aktywność peroksydazy Tak/nie	Denaturacja peroksydazy Tak/nie	Uwagi
1'	Ślepa				
2'	Kontrolna				
3'	Działanie temperatury				
4'	Działanie zasady				
5'	Działanie kwasu				
6'	Działanie mocznika				

Przedstaw wnioski wynikające z eksperymentu:

- Podaj definicję denaturacji. Jakie czynniki denaturujące znalazłeś? Jak zinterpretujesz wyniki?

2. Kinetyka reakcji katalizowanej przez peroksydazę

A. Obliczanie stężenia tetragwajakolu powstałego w trakcie reakcji katalizowanej

a. Do Tabeli 1, Tabeli 2 i po przeliczeniu do Tabeli 3 wpisz stężenie nadtlenu wodoru w mieszaninach inkubacyjnych, obliczone w Tabeli A protokołu.

- Wpisz odczytane wartości absorbancji tetragwajakolu TG (produktu reakcji) przy długości fali 470 nm, **po odjęciu wartości dla czasu „zero do Tabeli 1**

B. Oblicz stężenie tetragwajakolu TG z prawa Lamberta Beera i wyniki dla każdej mieszaniny inkubacyjnej wpisz do Tabeli 1

TABELA 1. Krzywe kinetyczne

Czas reakcji [min]	Mieszanina inkubacyjna M1 mM H ₂ O ₂		Mieszanina inkubacyjna M2 mM H ₂ O ₂		Mieszanina inkubacyjna M3 mM H ₂ O ₂		Mieszanina inkubacyjna M4 mM H ₂ O ₂		Mieszanina Inkubacyjna M5 mM H ₂ O ₂	
	A ₄₇₀	C _{TG} [mM]	A ₄₇₀	C _{TG} [mM]	A ₄₇₀	C _{TG} [mM]	A ₄₇₀	C _{TG} [mM]	A ₄₇₀	C _{TG} [mM]
	0,5									
1,0										
1,5										
2,0										
2,5										
3,0										

Prawo Lamberta Beera:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Współczynnik absorpcji mili molowej tetragwajakolu: $\epsilon_{470\text{nm}}^{\text{TG}} = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Grubość warstwy mierzonego roztworu: $l = 1 \text{ cm}$

Stężenie tetra gwajakolu TG w próbce $C_{\text{TG}} = A_{470\text{nm}}/(\epsilon \cdot l)$

Narysuj i podpisz odpowiednio 5 krzywych kinetycznych (na wspólnej osi) na podstawie wyników w Tabeli 1 (w układzie współrzędnych: czas reakcji (oś x) i stężenie powstałego tetragwajakolu TG (oś y) oraz załącz do sprawozdania.

C. Obliczanie prędkości początkowej (v_o) reakcji, dla każdej mieszaniny

inkubacyjnej:

$$v_o = -k [S]_o$$

Z użyciem programu Excel oblicz współczynnik kierunkowy (k) stycznej do krzywej kinetycznej, gdy $t=0$, a następnie **prędkość początkową reakcji $v_o = -k [S]_o$** . Wynik obliczeń wpisz do Tabeli 2 oraz po przeliczeniu do Tabeli 3

D. Obliczanie stałych katalitycznych k_m , (v_{max}), k_{kat} i skuteczności, dla reakcji

katalizowanej przez peroksydazę chrzanową

- a. Do Tabeli 2 wpisz wartości początkowego stężenia nadtlenku wodoru oraz wartości prędkości początkowych reakcji katalizowanej v_o , obliczone z danych w Tabeli 1, dla mieszanin inkubacyjnych M1-M5

TABELA 2. Krzywa Michaelisa-Menten

Mieszanina inkubacyjna	Stężenie początkowe nadtlenku wodoru, $[S]_o$ [mM]	Prędkość początkowa reakcji, V_o [mM TG · min ⁻¹]
M1		
M2		
M3		
M4		
M5		

- b. Narysuj wykres Michaelisa-Menten z danych w Tabeli 2. Na wykresie **zaznacz obliczone stałe** katalizowanej reakcji (K_m , V_{max}). **Wykres dołącz do sprawozdania.**

- c. **Oblicz stałe katalityczne (K_m , V_{max} , k_{kat} i skuteczności), z równania Michaelisa-**

Menten, korzystając z programu komputerowego Excel i wpisz do Tabeli poniżej oraz do Tabeli Wyników.

Stała	Wartość stałej	Wymiar stałej
K_m		
V_{max}		

d. Oblicz pozostałe stałe katalityczne: k_{kat} i skuteczność, (znając stężenie enzymu) i wpisz do Tabeli poniżej oraz do Tabeli Wyników.

Stała	Wzór do obliczeń	Wartość stałej	Wymiar stałej
k_{kat}	$V_{max} / [E]$		
Skuteczność	k_{kat} / K_m		

e. Przelicz dane z Tabeli 2 i wstaw do Tabeli 3.

TABELA 3. Krzywa Lineweavera-Burka

Mieszanina inkubacyjna	$1/[S]_0$ [mM ⁻¹ H ₂ O ₂]	$1/V_0$ [mM ⁻¹ TG · min]
M1		
M2		
M3		
M4		
M5		

f. Narysuj wykres Lineweavera-Burka z danych w Tabeli 3 i zaznacz stałe $-1/K_m$ oraz $1/V_{max}$, obliczone podczas doświadczenia. Wykres dołącz do sprawozdania.