

## 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Mieszanina inkubacyjna M2 ... .. mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Mieszanina inkubacyjna M3 ... .... mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Mieszanina inkubacyjna M4 ... .... mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Mieszanina Inkubacyjna M5 ..... mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	A <sub>470</sub>	C <sub>TG</sub> [mM]	A <sub>470</sub>	C <sub>TG</sub> [mM]	A <sub>470</sub>	C <sub>TG</sub> [mM]	A <sub>470</sub>	C <sub>TG</sub> [mM]	A <sub>470</sub>	C <sub>TG</sub> [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 <sup>-1</sup> ]
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 <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	$1/V_0$ [mM <sup>-1</sup> 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.