

## BIM labor BSc

### 1. gyakorlat Enzimkinetika és enzim-inhibíciós kinetika

**A gyakorlat célja,** hogy a hallgatók a BIM előadásokon tanult elméleti enzimkinetikai ismereteiket saját kezűleg elvégzett mérésekkel és számításokkal támasszák alá.

**Felkészüléshez ajánlott anyagrészek:** BIM jegyzet enzimkinetika fejezete (24-77 oldal), A beugró három kérdésből áll:

1. Az enzimkinetikai modellek alapfeltételezései.
2. Az enzimkinetikai paraméterek definíciói (3 db).
3. Inhibíciók bemutatása linearizált diagramo(ko)n.

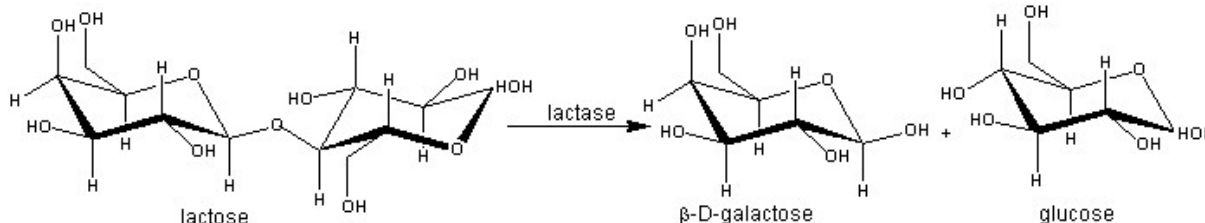
#### **Balesetvédelem:**

A laboratóriumban az általános munkavégzési szabályok érvényesek. Ártalmatlan vizes oldatokkal, illetve enyhén mérgező és irritatív kémiai anyagok kis mennyiségeivel kell dolgozni. Tűz- és robbanásveszély, biohazard, radioaktivitás nincs.

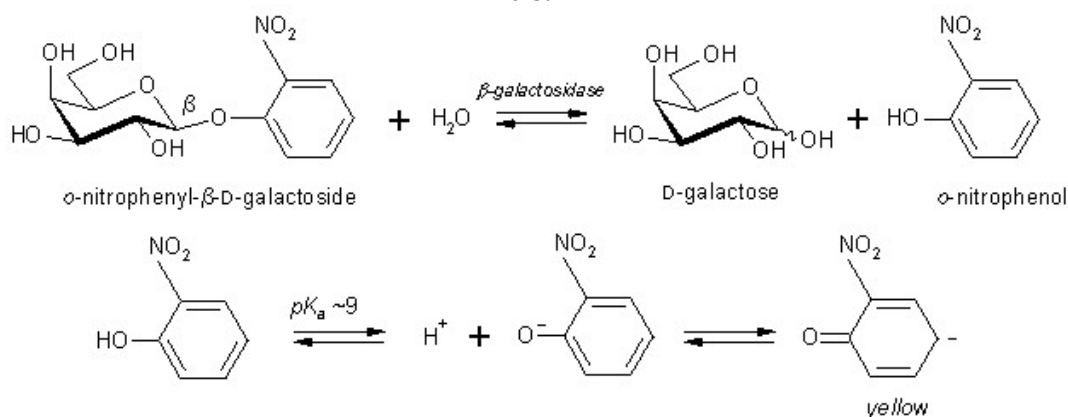
#### **Elméleti alapok**

A mérések során modellként az *Aspergillus oryzae* penész törzs által termelt  $\beta$ -galaktozidáz (laktáz) enzimet vizsgáljuk, amellyel jól bemutatható az enzimek általános működése. Ez az enzim di- és oligosaccharidokban az 1 szénatom béta térállású glikozidos kötésével kapcsolódó galaktóz egységet ismeri fel, és ezt a kötést hidrolizálva galaktózt szabadít fel. Leggyakoribb szubsztrátja a tejcukor (laktóz), amely galaktóz(1 $\rightarrow$ 4)glükóz diszacharid, amely a hidrolízis során galaktózra és glükózra bomlik.

Az ábrán az is jól megfigyelhető, hogy a két aldohexóz szerkezete nagyon hasonlít egymáshoz, a mindössze a 4 szénatomon lévő OH csoport térállása különbözik, a glükóznál ekvatoriális, a galaktóznál axiális.



A laktáz biológiai fontossága az emlősöknél az anyatej laktóz-tartalmának emésztésében van. A fermentációval előállított enzimet nagy mennyiségben alkalmazzák a tejiparban, egyrészt a sajtgyártás melléktermékeként keletkező tejsavó laktóz-tartalmának hidrolízisére, másrészt a laktóz intoleranciában szenvedők számára előállított „laktóz-mentes” tej gyártásában.



A kinetikai vizsgálatokhoz először a reakciósebesség mérését kell megoldani. Ez történhet a szubsztrát fogyásának, vagy a termék felhalmozódásának mérésével. Esetünkben a kiindulási és termékmolekulák túlságosan hasonlítanak egymáshoz (cukrok), emiatt nehéz lenne szelektív kémiai reakcióval analizálni. Az általános gyakorlat szerint a méréshez szubsztrátként laktóz helyett egy másik  $\beta$ -galaktozidot használnak, amely színes(sé tehető) funkciós csoportot (kromofórt) tartalmaz. Kémiai neve orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (ONPG), az enzim hidrolízis hatására a galaktóz mellett orto-nitrofenol keletkezik. A fenolos OH csoport erősen lúgos közegben disszociál, és fenolát anion keletkezik, amely sárga színű, fotométerrel koncentrációja meghatározható.

A reakciósebességet az adott körülmények között, ismert idő alatt termelődött o-nitrofenol mennyiségéből számítjuk.

### **Szükséges oldatok:**

Alappuffer: pH = 4,5 (0,1 n foszfát puffer, amely 10 mM KCl-ot és 1 mM MgCl<sub>2</sub>-ot tartalmaz) (500 ml-re: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8 g, KCl 0,3725 g, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,2165 g)

Szubsztrát oldat: 13,29 mM-os ONPG, a fenti pufferben oldva (200 mg/50 ml)

Enzim oldat: 0,65 Unit/ml  $\beta$ -galaktozidáz (*Aspergillus oryzae*, SIGMA) (5 mg poralakú preparátum (névleges aktivitás 6,5 U/mg)/ 50 ml alappuffer)

Leállító oldat: 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (53 g vízmentes nátrium-karbonát/ 500 ml-re oldva d. vízzel)

Inhibitor oldatok (ismeretlenként kiadva): I1, I2 (koncentrációk a mintajegyzőkönyvben)

### **A mérési feladat:** enzim inhibíció kinetikai vizsgálata

Külön területe az enzimkinetikának az inhibitorok hatásának vizsgálata. A mérés során állandó mennyiségű (aktivitású) enzim jelenlétében felvesszük a szubsztrát koncentráció - reakciósebesség görbét inhibitor nélkül (ez a klasszikus enzimkinetika alapja), majd vizsgáljuk a katalizált reakció sebességét különböző szubsztrát és inhibitor koncentrációk esetén. A szükséges szubsztrát-, inhibitor- és puffer bemérések (mikroliterben):

Szubsztrát, $\mu$ l	Inhibitor $\mu$ l			
	0	200	400	600
100	1100	900	700	500
200	1000	800	600	400
300	900	700	500	300
400	800	600	400	200
500	700	500	300	100
600	600	400	200	0

### **A reakciósebesség mérése:**

1 cm-es műanyag küvettában összemérjük a megadott mennyiségű oldatokat, 1,20 cm<sup>3</sup> végtérfogattal. A küvettákat 30 °C-os termosztátba állítjuk és kb. 5 perc melegítés után hozzáadjuk a 200  $\mu$ l enzim oldatot. A reakciót pontosan 5 percig futtatjuk, majd 2x1,00 cm<sup>3</sup> nátrium-karbonát oldattal leállítjuk. A reakcióban felszabadult o-nitrofenol (ONP) ezen a pH-n erős sárga színt ad, amelynek intenzitását 420 nm-en fotométerrel mérjük. Az abszorbanciából a megadott kalibrációval kiszámítjuk a reakció sebességét  $\mu$ mól ONP/percben. Vak oldatként használjuk a nátrium-karbonát oldatot.

Az ONP mérés kalibrációs egyenlete:

$$\text{ONP koncentráció (mM/l)} = 0,258 * E_{420} + 0,0052$$

$$\text{ONP mennyisége (}\mu\text{mol)} = 3,4 * (0,258 * E_{420} + 0,0052)$$

$$\text{Reakciósebesség (}\mu\text{mol ONP/perc)} = 3,4 * (0,258 * E_{420} + 0,0052)/5$$

A kapott értékeket kétféleképpen értékeljük ki:

1. Egy tetszőlegesen megválasztott, nem-lineáris regresszió számítására alkalmas programcsomaggal hiperbolát illesztünk az adatokra és vizsgáljuk a kapott paramétereket.
2. Linearizálással: táblázatosan kiszámítjuk a  $v$ ,  $1/v$ ,  $S/v$  és  $v/S$  értékeket. Az  $S$  és  $I$  koncentrációk a mintajegyzőkönyvben találhatóak.

Ábrázoljuk a Michaelis-Menten összefüggést diagramon ( $v - S$ )!

A mért adatsorokra egyeneseket illesztünk, és megvizsgáljuk az elrendeződésüket:

- Lineweaver-Burk ábrázolásban ( $1/v - 1/S$ )
- Hanes-Langmuir ábrázolásban ( $S/v - S$ )
- Hofstee ábrázolásban ( $v/S - v$ )
- Dixon ábrázolásban ( $1/v - I$ )

#### Beadandók:

A mérést két csoportban külön végzik el a hallgatók, mindkét csoport más inhibitorot kap. Mindkét team a saját méréséről külön jegyzőkönyvet készít a letölthető mintához hasonló formátumban, ezek külön jeggyel kerülnek értékelésre.

A jegyzőkönyv tartalmazza:

- a mérési előíratot lemásolni nem kell, elég hivatkozni rá, az esetleges eltéréseket viszont fel kell tüntetni;
- a mért és számított értékeket táblázatos formában;
- az adatok grafikus megjelenítése, diagramok;
  - ábrázolják a Michaelis-Menten hiperbolákat egy tetszőlegesen választott, nemlineáris regresszió számítására alkalmas program segítségével. Adják meg a program nevét, a kinyomtatott görbéket és a program által megadott paramétereket.
  - ábrázolják az adatokat mind a négy tanult linearizálási módszerrel. Ezt javasolt, de nem kötelező Excel programmal elvégezni.
  - A Lineweaver-Burk ábrázolás adataiból készítsenek másodlagos ábrázolást ( $t_{90} - I$ )!
  - Ügyeljenek a diagramok szemléletes megszerkesztésére! (Ne használjanak pontozott vonalat, töltsék ki a felületet, mutassák meg a jellemző pontokat, pl. a metszéspontokat.)
- szöveges értékelés:
  - Látható-e olyan eltérés, ami mérési hibára utal? Célszerű-e egy-két nyilvánvalóan hibás pontot elhagyni?
  - Mi észlelhető a linearizálásokkal kapott egyenesek elrendeződésén? Milyen mértékben egyeznek a kapott képek az elméletivel?
  - Melyik típusba sorolható be az inhibíció? (indoklás)
  - Mennyinek adódik a  $v_{\max}$  és  $K_M$  értéke a különböző kiértékelésekkel? Milyen az egyezés a nem-lineáris regresszióval kapott és a linearizálásokkal kapott paraméterek között?
  - Mennyinek adódik a  $K_i$  értéke a másodlagos ábrázolásból?
  - Mennyi lehet az enzim maximális váltásszáma (a vizsgálat körülményei között), ha a móltömege 105 kDa, és a bemért poralakú enzimpreparátumnak csak 15 %-a aktív fehérje? A számoláshoz használják a kiértékelésnél kapott  $v_{\max}$  értékek átlagát!
  - A névlegeshez képest mennyi a szilárd enzim preparátum fajlagos aktivitása Unit/mg-ban? A számoláshoz használják a kiértékelésnél kapott  $v_{\max}$  értékek átlagát!