

Priimek in ime: smer študija: skupina:

Kinetika encimsko kataliziranih reakcij (varianta A)

(Teorija je v skriptih na straneh 56 – 66.)

Namen vaje: Določitev K_m in V_{max} za encimsko reakcijo med tripsinom in substratom BAPNA.

Uvod: so katalizatorji bioloških reakcij, torej povečajo reakcije. K_m in V , ki sta definirani kot $K_m = \dots$ in $V = \dots$, sta pomembni kinetični karakteristiki para encim -

Serinska proteinaza tripsin razgrajuje sintetični substrat BANA. Produkt β -naftilamin lahko neposredno zasledujemo z merjenjem fluorescence pri 415 nm ($\lambda_{vzbujanja} = 335$ nm). Tripsin razgrajuje tudi sintetični substrat BAPNA. Produkt p-nitroanilin lahko neposredno zasledujemo z merjenjem absorbance pri 410 nm.

Potek dela:

Priprava raztopin:

Pufer: 0,1 M TrisHCl, pH 8,48

Substrat*: 100 μM , 300 μM , 500 μM , 700 μM , 900 μM , 1100 μM , 1300 μM , 1500 μM BAPNA v pufru

Encim**: 2,60 μM tripsin v pufru

*Oznake 100, 300, 500, 700, 900, 1100, 1300 in 1500 μM substrata na epruvetah, iz katerih jemlješ po 0,75 mL raztopine, predstavljajo končne koncentracije substrata v reakcijski zmesi, torej po dodatku 0,25 mL encima. Dejanske koncentracije substrata v epruvetah so za faktor 1,00/0,75 višje.

**Oznaka 2,60 μM encim na epruveti, iz katere jemlješ po 0,25 mL raztopine, predstavlja končno koncentracijo encima v reakcijski zmesi, torej po dodatku 0,75 mL substrata. Dejanska koncentracija encima v epruveti je za faktor 1,00/0,25 višja.

Nastavitev spektrofotometra Ultrospec 1000E:

Valovna dolžina: 410 nm

Čas merjenja: 30 s

1. V kiveto odpipetiraj 0,75 mL raztopine BAPNA z oznako 100 μM in nastavi instrument na nič. Nato dodaj 0,25 mL tripsina in takoj začni zasledovati količino produkta z merjenjem absorbance pri 410 nm.
2. Ponovi postopek z drugimi koncentracijami substrata.
3. Odčitaj začetne hitrosti reakcij (v) iz eksperimentalno dobljenih premic $A_{410} = A(t)$ in jih vnesi v tabelo. Nariši Eadie-Hofsteejev diagram in določi K_m in V .
4. Uporabi program za prileganje krivulj Grafit za določitev K_m in V direktno iz Michaelis-Mentenove enačbe. V pravokotnik prilepi natiskan Michaelis-Mentenov diagram in na njem označi K_m in V .

Rezultati in odgovori na vprašanja:

1. Izpolni tabelo. Ne pozabi na enote!

št. meritve							
[S]							
v							
$v/[S]$							

2. Prilepi Michaelis-Mentenov diagram:

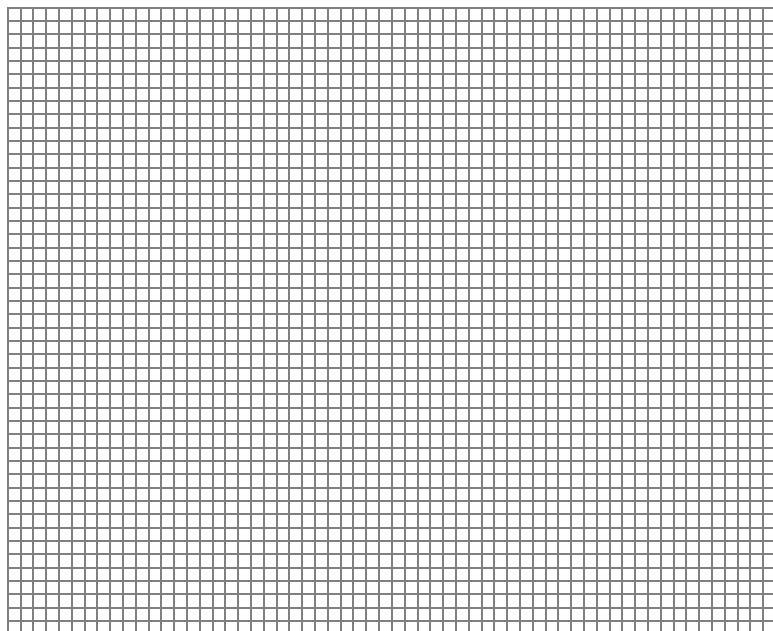


$$K_m = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$V = \underline{\hspace{2cm}}$$

3. Nariši Eadie-Hofsteejev diagram! Ne pozabi na enote! Določi vrednost K_m in V ! Napiši ustrezne račune!

Eadie-Hofsteejev diagram:



$$K_m = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$V = \underline{\hspace{2cm}}$$

4. Ali si iz obeh diagramov odčital enaki vrednosti K_m in V ? Komentiraj!

5. Kako bi se spremenila K_m in V , če bi meritve izvedli s tripsinom koncentracije 1,3 μM ?