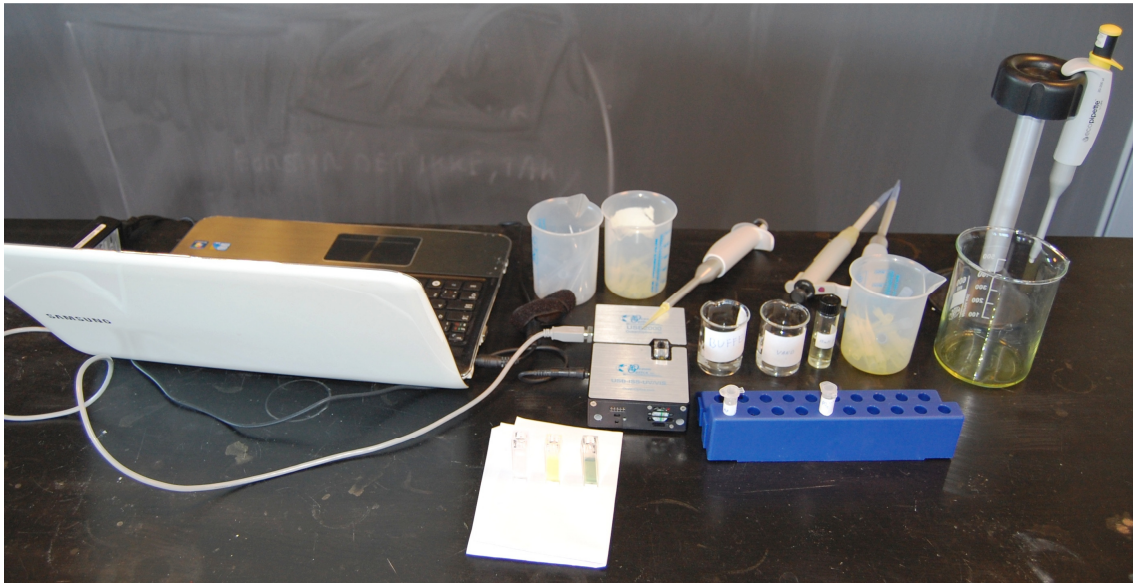


## Enzymkinetik for enzymet 'alkalisk fosfatase'

Marianne Schou Nielsen, Marie Eiland, Køge Gymnasium og Lars Bjarne Nielsen, Brøndby Gymnasium



### Til læreren

Denne vejledning er skrevet på baggrund af de forsøg, vi har omtalt i artiklen "Alkalisk fosfatase i undervisningen", LMFK-bladet 4/2011 side 63-66. Vejledningen består af denne introduktion til læreren, ekevejledning og to bilag:

Bilag 1: Indkøbsliste

Bilag 2: Eksempel på resultat i Logger Pro fra eget forsøg.

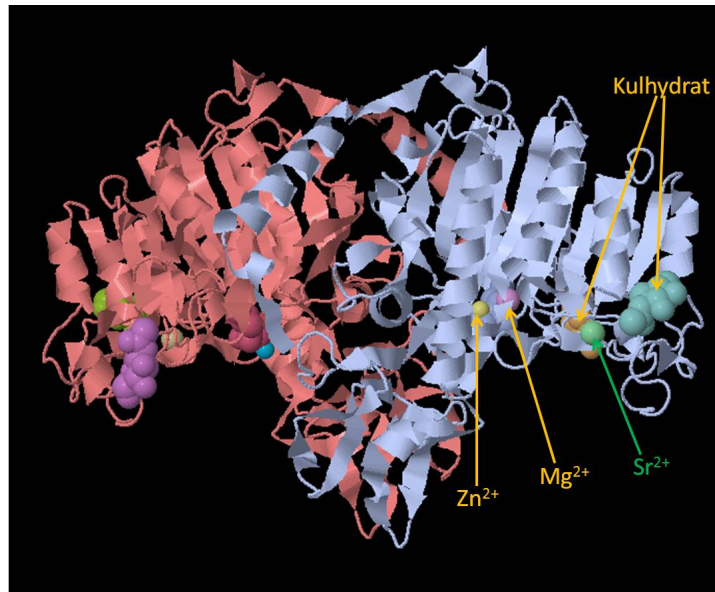
I bilag 1 kan man se, hvilke materialer man skal anskaffe, med priser pr marts 2011, samt forhandlerliste. Bilag 2 viser "rådata", altså absorptionsændringer optaget i Logger Pro under et enzymforsøg. Dette var ikke med i artiklen i LMFK-bladet, men vi synes, det er rart at kunne relatere sine egne forsøg til andres, når man udfører dem første gang. Desuden kan man se, hvordan Logger Pro præsenterer lineær regression.

## Elevvejledning til "Enzymkinetik for enzymet 'alkalisk fosfatase'".

**Formål:** At bestemme  $K_M$  og  $V_{max}$  for et enzym.

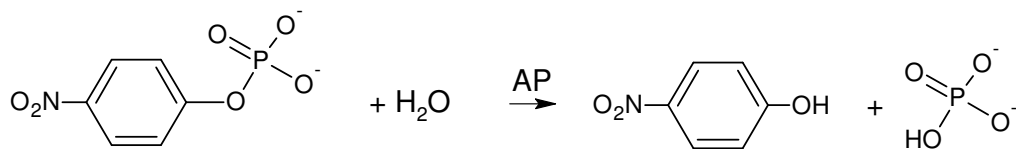
### Teori:

Alkalisk fosfatase (Alkaline Phosphatase, AP) defosforer især DNA, RNA og proteiner (dvs. fjerner fosfatgrupper). AP har som navnet antyder basisk pH-optimum. AP findes overalt i bl.a. dyr og bakterier. Det findes i alle væv, men hos pattedyr især i galde, lever, nyre, knogler og placenta (moderkagen). I medicinsk sammenhæng er det en blodmarkør for bl.a. galdesten og kræftsygdomme som knogle- og prostatakræft.



Figur 1. Alkalisk fosfatase fra humant tarmepitel

Bovint (kalve-) AP er et glykoprotein, dvs. indeholdende kulhydrat. Det er en dimer, og hver peptidmonomer har en molar masse på 69000 g/mol og indeholder metalionerne zink og magnesium. Det spalter fosfatestre (se figuren herunder) under medvirken af vand. Reaktionen er altså en hydrolyse og enzymet er en hydrolase. I laboratoriet anvendes følgende reaktion som mål for AP-niveaue:



Substratet 4-nitrophenylfosfat spaltes af enzymet AP til 4-nitrophenol og fosfat. Produktet 4-nitrophenol er gult, og dannelsen af det kan måles spektrofotometrisk ved 405 nm. Hvis der er meget substrat gælder det, at jo mere produkt der dannes jo større har enzymmængden været, idet absorptionsen for NP følger Lambert-Beers lov med ekstinktionskoefficienten  $18600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ved 405 nm.

(Substratet kaldes også **para-nitrophenylphosphat (pNPP)**, og produktet kaldes **para-nitrophenol (pNP)**).

Enzymer karakteriseres ved deres effektivitet til at spalte substrater. Ofte anvende Michaëlis-Menten kinetik til karakteriseringen, og da vil  $K_M$  og  $V_{max}$  være parametre for enzymets evne til at omdanne substrat.

Michaëlis-Menten ligningen kan skrives på to måder:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \quad \text{og} \quad v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M}$$

hvor  $v$  er initialhastigheden (begyndeshastigheden) for reaktionen,  $[S]$  er substratkoncentrationen,  $V_{max}$  enzymets maksimale hastighed og  $K_M$  er den substratkoncentration, der giver den halve  $V_{max}$ .

Dvs.  $K_M$  og  $V_{max}$  bestemmes ved en række målinger af initialhastigheden for reaktionen, hvor man varierer  $[S]$  og holder alt andet konstant. Enzymet skal have en sådan koncentration, at der er et lineært reaktionsforløb i starten, så  $v$  kan bestemmes sikkert.

**Hypotese:** Alkalisk fosfatases reaktion med pNPP følger Michaëlis-Menten kinetik

**Materialer:**

Tris: 10 mM Tris-HCl pH 8

DEA-buffer: 1 M Diehtanolamin (DEA), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8

Enzym: Alkalisk Fosfatase fra Kvæg-tarmepithel, Sigma P6774, 5 DEA U/mL

Substrat: 15 mM pNPP Sigma S0942 i Tris

Automatpipetter: 2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL

Spidser: gule og blå

Spektrofotometer: Ocean Optics

Plastickuvetter: 1 mL<sup>1</sup>

Computer med LoggerPro

**Forberedelse inden forsøget:**

11 piller substrat (pNPP) à 5 mg opløses i 10 mL Tris under omrøring i mindst 1 time i mørke. Substratet kan opbevares i køleskab ca. 1 uge eller fryses.

Substratet bør lagres mørkt ved neutralt pH, p.g.a. risiko for autohydrolyse. (Substratpiller opbevares i fryser v. -18 °C).

Der bør køres forforsøg for at finde den bedste enzymkoncentration: Med substratkoncentration på 75 µM skal absorbansen vokse lineært i mere end 1 minut. Enzymet leveres som 40.000 DEA U/mL og man kan fortynde en lille del 400 gange (2,5 µL i 1000 µL 10 mM Tris, pH 8) til 100 U/mL, hvorfra yderligere fortynding til 5 U/mL kan foretages. (Enzymet skal opbevares i køleskab).

Elever skal være instrueret i brug af automatpipetter.

**Forsøgets udførelse:**

HUSK:

Det er vigtigt at arbejde rent og skifte spidser.

MAN MÅ IKKE KOMME ENZYM I SUBSTRATET VED EN FEJL: SKIFT SPIDS VED DEN MINDSTE TVIVL.

Prøveblandingen skal være godt blandet før målingen startes. Rør rundt med en pipettespids. Man kan godt være nogle sekunder om det. Pas dog på ikke at få skabt luftbobler i kuetterne. Det forstyrrer målingen!

---

<sup>1</sup> Husk, at 1 mL-kuvetterne er de "snævre". Bruger man de brede 2 mL-kuvetter, skal alle volumener i Tabel 1 fordobles

### **Fremgangsmåde:**

#### **Forberedelse af spektrofotometer:**

Spektrofotometret tilsluttes computer og tændes. (UV-spektrofotometret skal tilsluttes strømforsyningen inden det forbindes med computeren og det skal varme op i 10 min). Logger Pro startes. Der kalibreres med demineraliseret vand, bølgelængden sættes til 405 nm og der vælges tidsbaseret måling med 1 måling pr. sekund i 100 s.

1. DEA-buffer, vand og substrat blandes i kuvetten efter Tabel 1.
2. Spektrofotometret nulstilles.
3. Enzymet tilsættes og der blandes grundigt ved at røre rundt med pipetten nogle sekunder.
4. Målingen startes. Efter 100 sekunder stoppes målingen.
5. Der tilføjes en tangent til kurvens første lineære stykke og hældningen noteres i resultatskemaet.
6. Målingen gemmes med angivelse af substratkoncentration og evt. forsøgsnummer.
7. En ny kuvette rengøres, og der tilsættes vand, DEA-buffer og substrat til den næste måling – fortsæt fra pkt. 2

OBS! Det iagttages hver gang, om kurverne under forsøget stiger jævnt og uden hakker. Det iagttages, om der er luft i kuvetterne (kræver nyt forsøg), og om farven ser "fornuftig" ud.

**Tabel 1. Blandeskema til forsøg.**

Prøve nr.	DEA-buffer μL	Vand μL	Substrat, 15 mM μL	Enzym, 5 U/mL μL	Substrat- koncentration μM
1	500	487,5	2,5	10	37,5
2	500	485	5	10	75
3	500	480	10	10	150
4	500	475	15	10	225
5	500	470	20	10	300
6	500	450	40	10	600
7	500	410	80	10	1200
8	500	170	320	10	4800

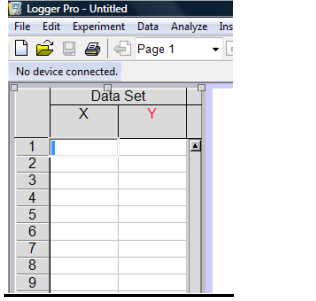
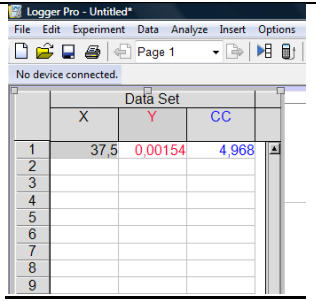
Substratkoncentrationerne er beregnet efter formlen:

$$c(S) = \frac{n}{V} = \frac{c_1 \cdot V_1}{V} = \frac{15 \cdot 10^3 \mu\text{M} \cdot V_1}{1000 \mu\text{L}} \quad \text{dvs.} \quad c(S) = 15 \frac{\mu\text{M}}{\mu\text{L}} \cdot V_1$$

## Resultater:

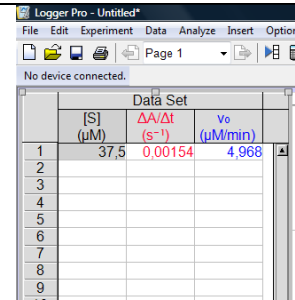
Prøve nr.	Koncentration af substrat $\mu\text{M}$	Initialhastighed (hældning= $\Delta A/\Delta t$ ) $\text{s}^{-1}$	Evt. kommentarer
1	37,5		
2	75		
3	150		
4	225		
5	300		
6	600		
7	1200		
8	4800		

## Databehandling i Logger Pro.

<p>1. <b>Åbn en ny fil!</b> Indskriv resultatskemaet som datasæt i Logger Pro, med substratkoncentrationen som X og absorptionsændring pr. sekund som Y.</p>	 <p>The screenshot shows the Logger Pro interface with a menu bar (File, Edit, Experiment, Data, Analyze, Ins) and a toolbar. Below the toolbar, it says "No device connected." A "Data Set" window is open, showing a table with columns X and Y, and rows 1 through 9.</p>
<p>2. Omregn Y til initialhastigheden, <math>v_0</math>, (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>), ved at gange med 3226. Resultatet kommer i en ny søjle, CC : Vælg <i>Data</i>→<i>New Calculated Column</i>, i feltet <i>equation</i> indskrives formelen: "<math>Y</math>"*3226. <b>(Husk gåseøjne om Y: "Y")</b></p>	 <p>The screenshot shows the Logger Pro interface with a menu bar (File, Edit, Experiment, Data, Analyze, Insert, Options) and a toolbar. Below the toolbar, it says "No device connected." A "Data Set" window is open, showing a table with columns X, Y, and CC, and rows 1 through 9. The values in row 1 are 37,5 for X, 0.00154 for Y, and 4.968 for CC.</p>
<p>3. Plot <math>v_0</math> som funktion af substratkoncentrationen: Klik på graffeltet, vælg <i>Options</i>→<i>Graph Options</i> og vælg <i>Calculated Column</i> som Y-kolonne</p>	

4. Lav kurvefitning til Michaelis-Mentens ligning, og beregn derved  $K_M$  og  $V_{max}$ . Tegn regressionskurven:  
*Analyze* → *Curve Fit* indskriv ligningen ved *Define Function* →  $V \cdot x / (x + K)$  og beregn med *Try Fit*. Tryk *OK*, så tegnes kurven med resultatboks.

5. Skriv passende overskrifter til data i tabellen:  
Højreklik på feltet  $X$ , vælg *Column Options* → *Data Set* |  $X$  og indsæt navn og enhed.



The screenshot shows the Logger Pro software interface. A data table is displayed with the following columns and values:

	[S] ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta A / \Delta t$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$v_0$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
1	37,5	0,00154	4,968
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			