



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

Βιοχημεία - Αρχές Βιοτεχνολογίας

Εργαστηριακές ασκήσεις

Γεώργιος Παπαδόπουλος, Καθηγητής Τμ. Τεχνολόγων Γεωπόνων Τ.Ε.

Άδειες Χρήσης

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons. Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.



Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Εργαστήριο 4^ο Ένζυμα: Αλκαλική φωσφατάση

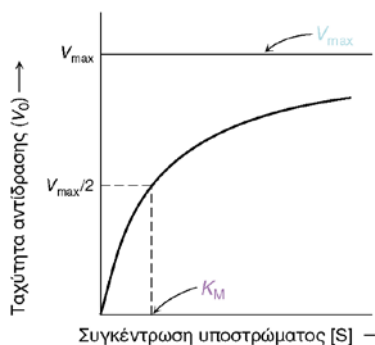
Βασιλική Καραγιάννη, Αγγελική Ζαρλαχά, Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος

Α. Γενικά για ένζυμα

Τα ένζυμα (εν τη ζύμη) είναι βιολογικοί καταλύτες οι οποίοι ανακαλύφθηκαν πρώτα σε εκχυλύσματα ζύμης (μαγιάς). Επιδεικνύουν *μεγάλη ταχύτητα, εξειδίκευση, και αναστολή από συγκεκριμένες ουσίες* (π.χ. διάφορα δηλητήρια!). Υπολογίζεται ότι η μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων στους ζωντανούς οργανισμούς κωδικεύει για ένζυμα. Από τις περίπου 23.000 γονίδια που περιέχουν οι ανώτεροι ζωντανοί οργανισμοί (φυτά, ζώα) υπολογίζεται ότι η πλειοψηφία τους κωδικεύει ένζυμα. Έτσι ώστε κάθε χημική αντίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς καταλύεται από ένα ειδικό ένζυμο, διαφορετικό από όλα τα άλλα. *Αυτή η κατάλυση σημαίνει επιτάχυνση της αντίδρασης σε σχέση με αυτή που δεν καταλύεται από ένζυμο κατά 1.000.000 μέχρι και 10^{17} , κάτι το πραγματικά ασύλληπτο. Χωρίς τα ένζυμα η ζωή όπως τη γνωρίζουμε δεν θα μπορούσε να υπάρχει!* Η πολύ μεγάλη πλειοψηφία των ενζύμων (>95 %) είναι πρωτεΐνες. Αυτό επέτρεψε να γίνουν σχετικά γρήγορα βήματα στη κατανόηση της λειτουργίας τους.

Η ταχύτητα αντίδρασης των ενζύμων επιδεικνύει *κορεσμό*, δηλαδή, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αντιδρώντων (που για τα ένζυμα ονομάζονται *υποστρώματα*), η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται ελάχιστα, όσο και να αυξηθεί η συγκέντρωση του υποστρώματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Η μέγιστη ταχύτητα του ενζύμου, σε άπειρη συγκέντρωση αντιδρώντων, ονομάζεται V_{max} . Η ταχύτητα του ενζύμου είναι στο μισό της V_{max} όταν $[S] = K_M$, όπου η σταθερά

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ 1 – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ



ΕΙΚΟΝΑ 8.11 Κινητική Michaelis-Menten. Ένα διάγραμμα της ταχύτητας (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υποκείμε στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) προσεγγίζεται ασυμπτωτικά. Η σταθερά Michaelis (K_M) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{max}/2$.

Εικόνα 1. Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας, V_0 , μιας ενζυμικής αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$. Η καμπύλη έχει τη μαθηματική μορφή υπερβολής, και η ασύμπτωτη τιμή στην οποία βαίνει σε πολύ μεγάλες τιμές $[S]$ ονομάζεται V_{max} .

K_M ονομάζεται σταθερά *Michaelis-Menten*, από τους δύο επιστήμονες που πρώτοι μελέτησαν σε βάθος τη δράση των ενζύμων, πριν από 100 και κάτι χρόνια, καταλήγοντας στη πιο κάτω εξίσωση που ονομάζεται εξίσωση *Michaelis-Menten*:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Η K_M αντιπροσωπεύει μια σύνθετη σταθερά διάστασης, και είναι πολύ βολικό να σκεφτόμαστε τη ως τη συγγένεια του ενζύμου για το υποστρώμα (μικρή τιμή K_M σημαίνει μεγάλη συγγένεια, δηλαδή ότι το ένζυμο έχει τη μισή από τη μέγιστη ταχύτητά του σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενώ μεγάλη τιμή K_M το αντίθετο).

Στην πιο πάνω εξίσωση συνειδητοποιούμε ότι α. αν $[S] \gg K_M$, τότε $V_0 \approx V_{\max}$, ενώ

β. αν $[S] = K_M$, τότε $V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$, όπως άλλωστε ορίστηκε η σταθερά K_M .

Τέλος, γ. αν $[S] \ll K_M$, τότε $[S] + K_M \approx K_M$, οπότε, $V_0 = V_{\max} \cdot [S]/K_M$. Αυτή η τελευταία περίπτωση αφορά τις μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου η μεταβολή της αρχικής ταχύτητας ως συνάρτηση της συκέντρωσης του υποστρώματος είναι σχεδόν γραμμική. Αν προσέξουμε τη καμπύλη στην Εικόνα 1 σε πολύ μικρές τιμές $[S]$ θα δούμε ότι όντως μοιάζει με ευθεία γραμμή που διέρχεται από το μηδέν σε εκείνη τη περιοχή.

Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι οι τιμές για τα διάφορα υποστρώματα ενός ενζύμου είναι κοντά στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων μέσα στα κύτταρα και τα εξοκτυταρικά υγρά των ζωντανών οργανισμών. Οπότε, σε φυσιολογικές καταστάσεις τα ένζυμα έχουν τουλάχιστον τη μισή της μέγιστης δυνατής ταχύτητάς τους.

Αρκετά ένζυμα απαιτούν προσθετικές ομάδες ή/και συνένζυμα ή/και συμπαράγοντες. Τα συνένζυμα είναι βιταμίνες ή παράγωγα βιταμινών απαραίτητα για τη λειτουργία συγκεκριμένων ενζύμων. Υπάρχουν επίσης ένζυμα που απαιτούν διάφορους άλλους συμπαράγοντες, κατά κύριο λόγο μεταλλικά κατιόντα, για να λειτουργήσουν.

α) Προσθετικές ομάδες : σταθερά συνδεδεμένες με την πρωτεΐνη, π.χ. στην αιμοπρωτεϊνική υπεροξειδάση η προσθετική ομάδα είναι η αίμη.

β) Συνένζυμα : μικρά μόρια σταθερά στην θέρμανση, χαλαρή σύνδεση. Το ολοένζυμο αποτελείται από το αποένζυμο και το συνένζυμο.

γ) Μεταλλικοί ενεργοποιητές : Δισθενή ή μονοσθενή ιόντα

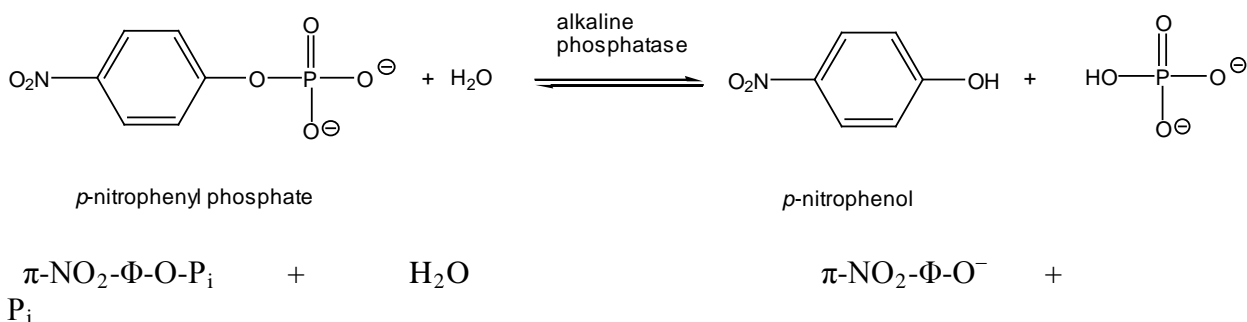
Το ένζυμο που θα χρησιμοποιήσουμε σήμερα έχει δύο απαραίτητους μεταλλικούς ενεργοποιητές, Zn^{+2} και Mg^{+2} , οπότε θα μελετήσουμε και τη δράση τους.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της άσκησης : Μελέτη του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης ως προς την επίδραση που ασκείται στην ταχύτητα της αντίδρασης όταν μεταβάλλεται η συγκέντρωση του ενζύμου ενώ η συγκέντρωση του υποστρώματος παραμένει σταθερή, καθώς και της αναστολής του ενζύμου από EDTA. Επίσης, θα μελετήσουμε τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου.

Χαρακτηριστικά του ενζύμου :

- Ανήκει στην κατηγορία των υδρολασών, δηλαδή, *χρησιμοποιεί μόριο ύδατος για να διασπάσει έναν εστερικό δεσμό φωσφορικού οξέος*.
- Καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης του παρα-νιτρο-φαινυλοφωσφορικού εστέρα ($\pi\text{-NO}_2\text{-}\Phi\text{-O-P}_i$) σε βασικό pH για τη παραγωγή ιοντισμένης π -νιτροφαινόλης και φωσφορικού.



Το ιόν της π -νιτροφαινόλης ($\pi\text{-NO}_2\text{-}\Phi\text{-O}^-$) έχει κίτρινο χρώμα και απορροφά έντονα στα 405 nm ($\epsilon_{405} = 18.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), πράγμα που είναι η βάση της παρακολούθησης της πορείας της αντίδρασης.

- Το προϊόν που σχηματίζεται κατά την συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση (πάντα σε βασικό pH) είναι έγχρωμο με απορρόφηση στα 405 nm.
- Το ένζυμο δεν βρίσκεται στους φυτικούς, αλλά στους ζωικούς οργανισμούς και σε μικροοργανισμούς. Το ένζυμο που θα χρησιμοποιήσουμε σήμερα προέρχεται από το λεπτό έντερο αγελάδας.
- Λειτουργεί σε αλκαλικό pH (10,3) και έχει αρκετό εύρος βέλτιστης λειτουργίας (από pH 8 μέχρι 11!).
- Είναι μεταλλοένζυμο με μεταλλικούς ενεργοποιητές τα Zn^{+2} και Mg^{+2} .

Σκεύη - Αντιδραστήρια

1. Ένζυμο (διάλυμα),
2. μικροσιφώνια 1-10 μL και σιφώνια 1 mL.
2. Υπόστρωμα (παρα-νιτρο-φωσφορικός εστέρας) σε ταμπλέτες
3. Ρυθμιστικό διάλυμα αιθυλενοδιαμίνης, pH = , 100 mL για όλα τα τμήματα.

Προσοχή! Το διάλυμα αυτό είναι διαβρωτικό. Όλα τα διαλύματα ενζύμου θα είναι σε τέτοιο διάλυμα οπότε δεν σηκώνει ραθυμία!

4. EDTA, διάλυμα 1 M
5. Φασματοφωτόμετρο

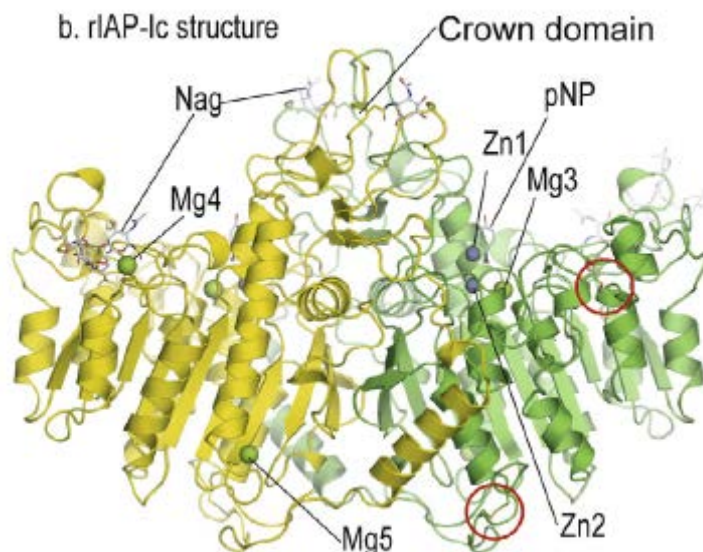
6. Υδατόλουτρο
7. Μαγνητικοί αναδευτήρες/θερμαινόμενες πλάκες
8. Δοκιμαστικοί σωλήνες

Πορεία εργασίας

Παρασκευή του υποστρώματος : Διάλυση μιας ταμπλέτας υποστρώματος σε 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα.

Προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων ενζύμου : 10 μ L, 20 μ L και 40 μ L ενζύμου (ή κάποιων άλλων που θα σας υποδειχθούν). Μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm τις διάφορες συγκεντρώσεις ανά 30 sec έως 8 min και καταγραφή των τιμών. **Κατασκευή γραφικής παράστασης** της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο για τις τρεις συγκεντρώσεις (στο ίδιο σύστημα).

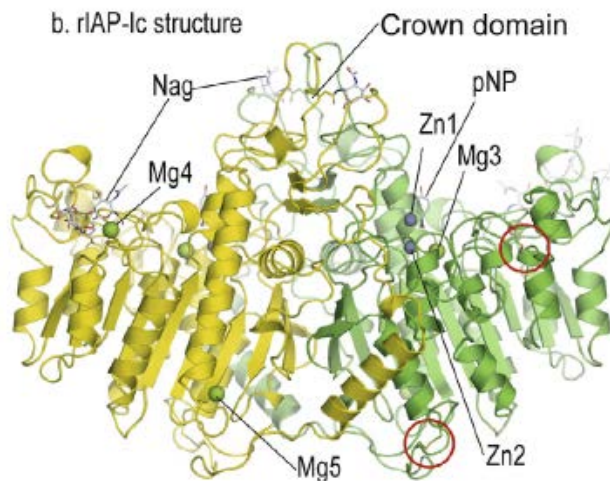
Προσθήκη διαλύματος EDTA 1M . Προσθέτουμε 1 μ L, 5 μ L και 25 μ L σε τρία μικρά πλαστικά σωληνάκια Eppendorf και διάλυμα με ένζυμο (20 μ L) και επώαση για 15'-20'. Στη συνέχεια προστίθεται υπόστρωμα (1.5 mL/σωλήνα), αναδεύεται καλά το περιεχόμενο και γίνεται καταγραφή της απορρόφησης ανά 30 sec. σε τρεις διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, ο κάθε ένας από τους οποίους περιέχει ένζυμο. Ένας τέταρτος σωλήνας περιέχει μόνο ίδια ποσότητα ενζύμου και ένας πέμπτος σωλήνας έχει υπόστρωμα χωρίς ένζυμο. Για τον 4^ο σωλήνα μπορείτε να πάρετε τα δεδομένα από συναδέλφους σας που χρησιμοποίησαν την ίδια ποσότητα ενζύμου. Μετράμε σε όλους τους σωλήνες την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης. Και πάλι θα γίνει γραφική παράσταση της πορείας της αντίδρασης (A_{405}) ως συνάρτηση του χρόνου



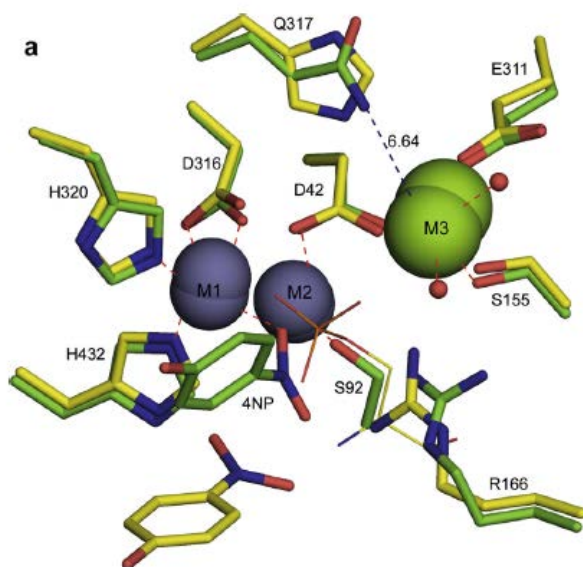
τες ενζύμου (π.χ. 20 μ L μαζί
κούς δοκιμαστικούς σωλήνες
($\sim 25^{\circ}\text{C}$), σε 37°C , 55°C και
εως των 100 mL στα οποία
είο ζέσεως προσθέτουμε νερό
ία την επιθυμητή τιμή και τότε
μετρούμε για επώαση 10' και
δωματίου. Προσθέτουμε στη
με την αντίδραση μετρώντας

Επιπλέον ύλη

Είναι γνωστή για τη τριδιάστατη δομή πολλών και διαφορετικών ενζύμων αλκαλικής φωσφατάσης. Παρακάτω παραθέτουμε τις δομές από πίθηκο και από επίμυ.



Εικόνα 2. Τριδιάστατη δομή αλκαλικής φωσφατάσης από πίθηκο. Το ένζυμο είναι διμερές, μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με κίτρινο και η άλλη με πράσινο. Κάθε αλυσίδα έχει μια θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, που ονομάζεται ενεργό κέντρο, και περιλαμβάνει εκτός από τα αμινοξέα που συμμετέχουν και τα μεταλλικά κατιόντα ψευδαργύρου και μαγνησίου. Είναι ευδιάκριτο το ένα ενεργό κέντρο με το ανάλογο υποστρώματος pNP (π-νιτροφαινόλη), τα δύο ιόντα ψευδαργύρου (μπλε) και το ένα ιόν μαγνησίου (πράσινο). Φαίνονται επίσης δύο υδατάνθρακες (Nag, N-ακετυλογλυκοζαμίνη).



Εικόνα 3. Υπέρθηση δύο ενεργών κέντρων από αλκαλική φωσφατάση επίμυος (πράσινοι άνθρακες) και πιθήκου (κίτρινοι άνθρακες). Οι μπλε σφαίρες είναι ιόντα ψευδαργύρου ενώ οι πράσινες ιόντα μαγνησίου, και οι μικρές κόκκινες μόρια ύδατος. Σημειώστε ότι μεταξύ των δύο ενζύμων υπάρχει μόνο μια διαφορά, στο αμινοξύ 317 (γλουταμίνη στον επίμυ και ιστιδίνη στον πιθήκο). 4NP = *p*-νιτροφαινόλη (προϊόν). Οι Εικόνες 2 και 3 από Gosh et al. *J Struct Biol* 184, 182-192, 2013.