

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА 6 - БИОХИМИЯ

Максимальное количество баллов 100

Длительность экзамена 90 минут

20 вопросов

ВВЕДЕНИЕ

ЦЕЛЬ

В этой практической работе вы будете анализировать кинетику ферментативной реакции в присутствии и в отсутствие ингибитора. Работа состоит из двух основных частей, каждая из которых включает три подчасти.

Часть 1 (57,5 баллов)

1.1. Введение в кинетику ферментативных реакций (теория) (0 баллов)

1.2. Эксперимент по кинетике промышленной α -галактозидазы при использовании синтетического аналога субстрата p NP-Gal (лабораторная работа). (Вопросы 1-2: 40 баллов)

1.3. Анализ результатов кинетики α -галактозидазы (Вопросы 4-11: 17,5 баллов)

Часть 2 (42,5 балла)

2.1. Введение в теорию ингибирования ферментов (Вопросы 11-13: 2 балла)

2.2. Эксперимент по ингибированию α -галактозидазы (Вопрос 14: 27 баллов)

2.3. Анализ результатов кинетики ингибирования α -галактозидазы

2.3 Анализ результатов кинетики ингибирования α -галактозидазы (Вопросы 15-20: 13,5 баллов)

Перед началом рекомендуем вам ознакомиться с полным содержанием работы. Так как наибольшее количество баллов предоставляется за лабораторную работу, **советуем вам вначале выполнить задания 1.2 и 2.2, прежде чем приступить к подсчетам и теоретическим вопросам** (Части 1.3, 2.1 и 2.3)

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Прежде всего, убедитесь, что все материалы и оборудование, перечисленные ниже, находятся перед вами.

Пожалуйста, поднимите вверх вашу розовую карточку немедленно, если что-то из перечисленного отсутствует - но не позднее чем через 15 минут после начала экзамена.

- A. 1 пипетка р200. Используйте эту пипетку для объемов 20-200 мкл, если нет других указаний
- B. 1 пипетка р1000. Используйте эту пипетку для объемов 201-1000 мкл, если нет других указаний
- C. 96 наконечников для пипетки р200 в коробке. После каждого пипетирования наконечник должен быть сброшен, если нет других указаний
- D. 96 наконечников для пипетки р1000 в коробке. После каждого пипетирования наконечник должен быть сброшен, если нет других указаний
- E. > 30 пробирок для микроцентрифуги (эппендорфов) объемом 1,5 мл
- F. 1 штатив для пробирок для микроцентрифуги
- G. 2 микропланшета, подписанные кодом страны + A или B
- H. 1 шаблон (рисунок) микропланшета
- I. 1 секундомер
- J. 1 карандаш
- K. 1 маркер
- L. 1 калькулятор
- M. 1 линейка
- N. Розовая карточка для контакта с ассистентами
- O. 9 мл 2 М (Молярная концентрация=моль/литр)стоп-раствора Na_2CO_3 (**Stop**)
- P. 6,5 мл 15 мМ (миллимолярная концентрация, milli= 10^{-3}) раствора pNP-

Gal (**Substrate**)

- Q. 15 мл деионизованной воды Milli-Q (**Water**)
 R 5 мл 1мМ pNP (**Standard**)
 S. 2 мл 0.024 мг/мл раствора фермента (**Enzyme**)
 T. 5 мл 0,5 М раствора ингибитора (**Inhibitor**)
 U. 1 стилус (экранная ручка) для планшета

1.1. ВВЕДЕНИЕ В ФЕРМЕНТАТИВНУЮ КИНЕТИКУ

α -Галактозидаза катализирует гидролиз концевой остатка галактозы у α -галактозидов. Обычно активность этого фермента определяют при использовании синтетического аналога субстрата пара-нитрофенил- α -галактозида (*para*-nitrophenyl- α -galactoside, *p*NP-Gal), который гидролизуется до галактозы (Gal) и пара-нитрофенола (*para*-nitrophenyl, *p*NP) (Рисунок 1.1). *p*NP-Gal это бесцветное вещество, тогда как его продукт *p*NP окрашен в желтый цвет и его концентрацию можно определить по поглощению A_{405} при 405 нм при помощи фотометра (ридера) для микропланшетов.

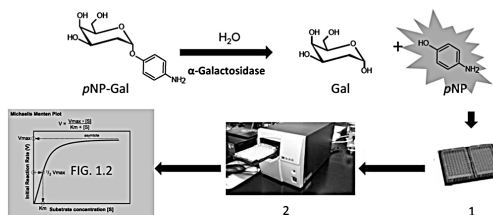


Рис 1.1: Схематическое изображение определения активности галактозидазы: содержание *p*NP определяется при помощи фотометра для микропланшетов (2), который измеряет поглощение (A) при 405 нм. Для определения ферментативной активности используется калибровочный график (стандартная кривая) зависимости поглощения от концентрации продукта. 1, микропланшет (Материал G).

В Части 1 будет исследоваться зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата. Для этого вам дается график Михаэлиса-Ментен (Рисунок 1.2), по которому Вы должны определить два важных параметра V_{max} и K_m (смотри подпись к Рисунку 1.2).

Начальную скорость реакции V_0 можно определить из соотношения $\Delta[P]/\Delta t$

Δt , которое отражает изменение концентрации продукта ($[P]$) за время (Δt).

v_0
↑

Рисунок 1.2. График Михаэлиса-Ментен: Зависимость начальной скорости реакции (v_0) от концентрации субстрата $[S]$. K_m - это концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной скорости, V_{max} , которая, в свою очередь, отражает насыщение активных центров фермента субстратом.

Значения V_{max} и K_m можно определить из графика Лайнвивера-Берка путем определения точек пересечения графика с осями Y и X, соответственно (Рисунок 1.3). График Лайнвивера-Берка (график в двойных обратных координатах) получают, откладывая значения обратной начальной скорости реакции ($1/v_0$) в зависимости от значений обратной концентрации субстрата ($1/[S]$).

1

Рисунок 1.3. График Лайнвивера-Берка: после определения V_o при разных концентрациях субстрата был построен график Лайнвивера-Берка. Через точки, соответствующие экспериментальным данным, проводят прямую линию, по которой определяют значения K_m в точке её пересечения с осью X , и V_{max} в точке пересечения прямой с осью Y . Точки пересечения вычисляются из уравнения прямой.

1.2 ЭКСПЕРИМЕНТ ПО КИНЕТИКЕ ПРОМЫШЛЕННОЙ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

1.2.1 КАЛИБРОВОЧНЫЙ ГРАФИК (СТАНДАРТНАЯ КРИВАЯ)

Начните с построения калибровочного графика, который затем будет использован для определения концентрации продукта (pNP) при проведении ферментативной реакции. Для его построения вам необходимо будет приготовить ряд разведений исходного стандартного раствора 1 мМ pNP (**Standard**) в стоп-растворе (**Stop**).



Q. 1

Схема приготовления разведений стандартного раствора

Стандартный исходный раствор **1 мМ pNP (Standard)** Вы должны развести (там, где это требуется) стоп-раствором (**Stop**). Рассчитайте необходимые объемы стандартного раствора и стоп-раствора, которые Вам нужно смешать, чтобы получить нужные концентрации в конечном общем объеме **500** мкл. Внесите рассчитанные Вами значения в таблицу ниже (Таблица 1.1).

Надпись на пробирке	St 1	St2	St3	St4	St5
Концентрация раствора [pNP] (мМ)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Объем стандартного исходного раствора (Standard) (мкл)					
Объем стоп-раствора (Stop) (мкл)					

Ход работы

- Пометьте с помощью маркера пять 1.5 мл пластиковых пробирок (эппендорфов) в соответствии с первым рядом в Таблице 1.1: от St1 до St5.
- Внесите разные объемы 1 мМ стандартного раствора pNP (**Standard**) в помеченные Вами пластиковые 1,5 мл пробирки согласно Вашим расчетам в Таблице 1.1. **Можно использовать один и тот же наконечник для пипетки!**
- Внесите разные объемы стоп-раствора (**Stop**) в помеченные Вами пластиковые 1.5 мл пробирки согласно Вашим расчетам в Таблице 1.1. **Хорошо перемешайте растворы** в пробирках, переворачивая их вверх ногами 5 раз.
- Внесите по 100 мкл деионизованной воды (**Water**) в лунки A1-B5 микропланшета (**используйте один и тот же наконечник для пипетки!**). Смотрите Рисунок 1.4 или используйте шаблон с нарисованным микропланшетом, которые должны помочь Вам внести раствор в правильные лунки

Внесите раствор в правые лунки (стоп-раствор).

- e. Перенесите по 50 мкл каждого из конечных разведений стандартного раствора *p*NP (Таблица 1.1) в соответствующие лунки в планшете.
- f. Внесите по 100 мкл стоп-раствора (**Stop**) в лунки A1-B5, используя пипетку на 1000 мкл. Как следует перемешайте содержимое каждой лунки, набирая смесь в носик и выпуская её обратно два раза.

Рисунок 1.4. Микропланшет A: St, стандартные растворы (см. Таблицу 1.1); S, реакционная смесь с различными концентрациями субстрата (см. Таблицу 1.2 ниже).

Продолжайте выполнять часть 1.2.2., в которой вы будете готовить в микропланшете реакционную смесь для проведения ферментативной реакции

Важная информация: ассистент не будет принимать микропланшеты в последние 10 минут проведения экзамена. Если вы увидите, что Вы не сможете завершить часть 1.2.2 вовремя, поднимите розовую карточку, чтобы ассистент измерил результаты Вашего калибровочного графика. Ваши результаты будут показаны в Задании 2.

1.2.2 ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКЕ

Ход работы

Приготовление разведений раствора субстрата *p*NP-Gal для эксперимента по кинетике

- a. Подпишите маркером пять пробирок (эппендорфов) объемом 1,5 мл

номнрами от S1 до S5 (Таблица 1.2).

- b. В подписанных Вами пробирках объемом 1,5 мл приготовьте разведения стандартного раствора субстрата *p*NP-Gal с исходной концентрацией 15 мМ *p*NP-Gal (**Substrate**) путем добавления воды Milli-Q (**Water**) (см. Таблицу 1.2 ниже). Разведенные растворы необходимо **тщательно перемешать**, переворачивая микроцентрифужные пробирки 5 раз вверх ногами.

Таблица 1.2. Схема приготовления разведений раствора субстрата для опыта по ферментативной кинетике

Надпись на пробирке	S1	S2	S3	S4	S5
Объем (мкл) 15 мМ раствора субстрата <i>p</i> NP-Gal (Substrate)	40	120	240	400	800
Объем (мкл) воды Milli-Q (Water)	960	880	760	600	200

- c. Перенесите по 50 мкл каждого разведения раствора субстрата (Таблица 1.2) и по 50 мкл воды Milli-Q (**Water**) в лунки G1-H5 в микропланшете А (см. Рисунок 1.4 и/или шаблон с нарисованным микропланшетом).
- d. Установите таймер на 5 минут и включите его, как только добавите раствор фермента в первую лунку для старта первой ферментативной реакции (S_I1), как описано ниже.
- e. Внесите пипеткой по 50 мкл фермента α-галактозидазы с концентрацией 0.024 мг/мл (**Enzyme**) в лунки G1-H5, начиная с S_I1 и S_{II}1, и продолжая в том же порядке и с теми же временными интервалами между внесением фермента в лунки до S_{II}5 для начала ферментативной реакции в каждой лунке (далее в тексте эта смесь называется “ ферментативная реакционная смесь”). Тщательного перемешивайте смесь в каждой лунке сразу после добавления фермента , набирая в носик и выпуская 50 мкл смеси. Наконечник пипетки должен быть заменен после каждого добавления фермента.
- f. После 5 минут инкубации добавьте при помощи р1000 пипетки по 100 мкл 2 М стоп-раствора Na₂CO₃ (**Stop**) в лунки G1-H5 для прекращения ферментативной реакции в каждой лунке в такой же последовательности и с теми же временными интервалами с

последовательности и с теми же временными интервалами, с которыми Вы вносили фермент. Хорошо перемешивайте содержимое после внесения стоп-раствора, набирая смесь в носик и выпуская её два раза. В каждой лунке реакция должна протекать ровно 5 минут!



Q. 2

Эксперимент по кинетике ферментативной реакции

Передайте ассистенту микропланшет с вашими образцами из **Части 1.2.1 и 1.2.2.**, подняв вашу розовую карточку. После измерения полученные данные автоматически появятся в таблице ниже.

Примечание: микропланшеты не будут приниматься для измерения в последние **10** минут проведения работа!

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1.3. АНАЛИЗ ДАННЫХ ПО КИНЕТИКЕ ФЕРМЕНТА

Сейчас Вам нужно определить кинетические параметры гидролиза субстрата α -галактозидазой.

Вначале Вам нужно составить уравнение линейной функции для продукта (pNP), используя данные из Таблицы 1.3.

Имеющиеся данные калибровочного графика позволяют вам подсчитать концентрацию продукта в реакционной смеси, что далее позволит Вам рассчитать начальную скорость реакции (V_0) для каждой концентрации субстрата.

Стандартный набор данных, соответствующий микропланшету А, представленный ниже (Таблица 1.3), должен быть использован Вами для расчетов. Это позволит избежать накопления ошибок при выполнении части 1.2. Однако ваши собственные результаты будут проанализированы и за них будет отдельно выставлена оценка.

Таблица 1.3: Данные измерения поглощения для проведения расчетов (столбцы 1-5 в формате микропланшета)

	1	2	3	4	5
A	0.882	1.681	2.473	3.251	3.964
B	0.858	1.657	2.449	3.227	3.940
⋮					
G	0.304	0.728	1.049	1.272	1.512
H	0.307	0.716	1.009	1.234	1.466



Q. 3

Среднее значение поглощения для стандартных растворов

Определите среднее значение для каждой пары измерений для калибровочного графика, взяв данные из Таблицы **1.3**. Результаты внесите с точностью **до третьего знака** после запятой

Надпись на пробирке	St 1	St2	St3	St4	St5
Концентрация [pNP] (мМ)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Среднее					

значение
 A_{405} нм для
двух
измерений



Q. 4

Линейная функция для калибровочного графика

На рисунке ниже (Рис. 1.5.) показан график зависимости поглощения при 405 нм (среднее значение абсорбции A_{405} при 405 нм, рассчитанное в Вопросе 3) от концентрации pNP (мМ)

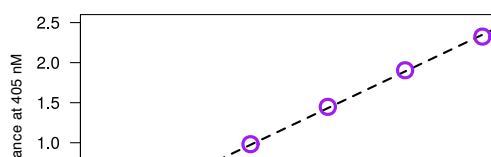


Рисунок 1.5. Гипотетический калибровочный график для продукта pNP . Фиолетовые кружки показывают средние значения для измеренного поглощения, а черная пунктирная линия представляет собой линейную регрессию для этих точек.

Рассчитайте математические значения **a** и **b** для функции линейной регрессии (смотри ниже), используя только средние значения поглощения для двух точек **St1** и **St5**. Результаты для **a** и **b** представьте с точностью **до трех знаков** после запятой.

A_{405} (поглощение при 405 nm в единицах оптической плотности)
= $a \cdot [pNP] \text{ (мМ)} + b$,
где **a** - это наклон прямой, а **b** - это пересечение с осью **Y**

a ($A_{405}/\text{мМ}$)	
b (A_{405})	

Объем смеси для проведения ферментативной реакции из Эксперимента в Части 1.2.2 составляет 150 мл



Q. 5

Время реакции

Переведите время реакции в секунды

Время реакции (сек.)	
----------------------	-------------------------------



Q. 6

Анализ данных по кинетике фермента в присутствии ингибитора

Используйте следующую уравнение для калибровочного графика для расчета концентрации продукта в каждой смеси ферментативной реакции:

$$\text{Поглощение } A_{405} = 2.29 \cdot [\text{pNP}] (\text{мМ}) + 0.058.$$

Начальную скорость реакции V_0 можно определить из соотношения $\Delta[\text{P}]/\Delta t$, т.е. изменение концентрации продукта ($[\text{P}]$) за отрезок времени (Δt). Результаты представьте с точностью до третьего знака после запятой.

Обозначение пробирок	S1	S2	S3	S4	S5
Объем исходного раствора субстрата (Substrate) (мкл) (из таблицы 1.2)	40	120	240	400	800
Объем исходного раствора субстрата (Substrate)					

(мкл) (из таблицы 1.2)					
Объем воды Milli-Q (Water) (мкл) (из таблицы 1.2) Объем воды Milli-Q (Water) (мкл) (из таблицы 1.2)	960	880	760	600	200
Концентрация субстрата [S] в разведенном растворе до внесения в реакционную смесь (мМ)					
Концентрация субстрата [S] в реакционной смеси (мМ)					
Среднее значение поглощения A_{405} , подсчитанное из Таблицы 1.3					
[Продукт среднее значение] (мМ)					
V_0 (мкМ/сек)					
$1/[S]$ (1/мМ)					
$1/V_0$ (сек/ мкМ)					



Q. 7

ПАРАМЕТРЫ Михаэлиса-Ментен (примерное определение по графику)

На рисунке 1.6 ниже представлен график Михаэлиса-Ментен (V_0 от $[S]$), отражающий данные для точек (S1–S5) в Таблице 1.3.

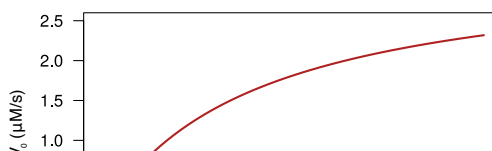


Рисунок 1.6. Теоретический график Михаэлиса-Ментен для опыта по кинетике фермента в отсутствие ингибитора

Определите по графику Михаэлиса-Ментен примерные значения для $V_{\max}$ и K_m (Рис. 1.6). Результаты представьте с точностью **до одного знака** после запятой.

$V_{\max}$ (мкМ/сек)	
K_m (мМ)	



Q. 8

График Лайнвивера-Берка

На рисунке 1.7. ниже показан график Лайнвивера-Берка ($1/V_0$ от $1/[S]$), отражающий данные точек (S1–S5) из Таблицы 1.3.





Рисунок 1.7. График Лайнвивера-Берка для кинетики фермента в отсутствие ингибитора

Определите линейную функцию для графика Лайнвивера-Берка (Рисунок 1.7), по показанной ниже математической форме, используя значения для двух точек **S1** и **S5**.

Значения **a** и **b** представьте с точностью **до трех знаков** после запятой.

$$1/[V_0] = a \cdot 1/[S] + b,$$

a (мМ·сек/мкМ)	
b (сек/мкМ)	



Q. 9

определение $V_{\max}$ и K_m

Используя данные, подсчитанные выше, (Q. 8), определите математически значения K_m и $V_{\max}$ в точках пересечения графика с осями координат. Результаты представьте с точностью трех знаков после запятой (**не надо изменять единицы измерения**).

$V_{\max}$	
K_m	



Q. 10

Концентрация фермента в реакционной смеси

Рассчитайте концентрацию фермента в реакционной смеси в мкМ, исходя из концентрации фермента в исходном растворе = **0.024** мг/мл и молекулярной массы фермента (**75 000** г/моль). Результаты представьте с точностью **до трех знаков** после запятой.

Исходный раствор фермента (мг/мл)	0,024
Концентрация фермента [E] в (мкМ) в реакционной смеси	

(микро=10⁻⁶)

Q. 11

Константа скорости (число оборотов) фермента

Константа каталитической скорости (число оборотов) фермента k_{cat} (скорость работы 1 молекулы фермента) выражается единицами 1/сек. и рассчитывается по следующей формуле:

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]}$$

Определите k_{cat} . Результаты представьте с точностью до **трех знаков после запятой**.

 k_{cat} (1/секунду)

2.1 ВВЕДЕНИЕ В ТЕОРИЮ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Ингибиторы - это соединения, специфически связывающиеся с ферментами и снижающие их активность, что приводит к значительным изменениям либо K_m , либо V_{max} , либо двух этих параметров сразу. Изменения кажущихся кинетических параметров можно определить при

помощи графика Лайнвивера-Берка при проведении ферментативной реакции в присутствии ингибитора. Обратимые ингибиторы могут быть в зависимости от механизма их связывания с соответствующими ферментами-мишенями конкурентными, неконкурентными или бесконкурентными.

Ингибирование активности фермента и кажущиеся изменения

кинетических параметров можно визуализировать на графиках Михаэлиса-Ментен и Лайнвивера-Берка (Рис.2.1).

Рисунок 2.1 Ингибирование ферментативной активности на графиках Михаэлиса-Ментен и Лайнвивера-Берка: Черные линии (курсив) получены в отсутствие ингибитора, а сплошные линии - в присутствии ингибитора. V_0 - начальная скорость ферментативной реакции.

Ингибиторы описываются их константой равновесия ингибирования K_i , которая определяется следующим образом

$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]}$$

где $[I]$, $[E]$ и $[EI]$ представляют концентрации свободного ингибитора, свободного фермента и комплекса фермент-ингибитор, соответственно.

В случае **конкурентного ингибирования**, параметр K_m в присутствии ингибитора обозначается как K_m^i . Константы химического равновесия для связывания субстрата (S) и ингибитора (I) с ферментом (E) показаны ниже. K_m и K_m^i связаны показанным ниже уравнением:

В случае **неконкурентного ингибирования** параметр V_{max} в присутствии ингибитора обозначается как V_{max}^i . V_{max}^i и V_{max} , связаны между собой согласно приведенному ниже уравнению:

В случае **бесконкурентного ингибирования** параметры K_m и V_{max} в присутствии ингибитора обозначаются как K_m^i и V_{max}^i , соответственно. Параметры K_m и V_{max} связаны с K_m^i и V_{max}^i следующим уравнением, как показано ниже:

Уравнение 2.1 Константы химического равновесия для связывания субстрата (S) и ингибитора (I) с ферментом (E) показаны в верхней части рисунка для разных типов ингибирования. В нижней части показаны уравнения, показывающие изменения кажущихся кинетических параметров в зависимости от концентрации ингибитора и константы равновесия.



Q. 12

Факторы, влияющие на ингибирование

Для **всех типов** ингибирования степень ингибирования, то есть снижение скорости ферментативной реакции, зависит от: (выберите внизу ответ, который подходит **лучше всего**)

1. КОНЦЕНТРАЦИИ ИНГИБИТОРА [I]

2. КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА [S]

3. K_i ИНГИБИТОРА

4. КОНЦЕНТРАЦИИ [ES]

5. 1, 2 и 3

6. 1 и 3



Q. 13

Характерная особенность
конкурентного ингибирования

Укажите, является ли следующее утверждение верным или неверным

ВЕРНО НЕВЕРНО

При конкурентном ингибировании увеличение концентрации субстрата $[S]$ снижает или полностью устраняет ингибирование



2В. ИНГИБИРОВАНИЕ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ (27 БАЛЛОВ)

Эта часть похожа по типу опытов на Часть 1b. Опыт по ингибированию активности α -галактозидазы будет проводится в присутствии 50 мкл ингибитора, исходная концентрация которого 0.5 М (моль/литр).

Ход работы

Приготовление субстрата для опыта по кинетике ингибирования

а. Приготовьте растворы субстрата соответственно Таблице 2.1. подобно тому, как вы это делали в Части 1b. Помните, что необходимо тщательно перемешать растворы переворачиванием пробирок 5 раз.

Таблица 2.1. Приготовление раствора субстрата для опыта по кинетике

Надпись на пробирке	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
Объем (мкл) исходного раствора субстрата (Substrate)	80	160	320	600	840
Объем (мкл) воды Milli-Q (Water)	920	840	680	400	160

б. Внесите 50 мкл ингибитора (Inhibitor) в лунки A1-B5 в микропланшете В, **используя один и тот же наконечник пипетки.** (см. Рис. 2.2 и/или шаблон с изображением микропланшета).

с. Внесите по 50 мкл каждого конечного разведения раствора субстрата (Таблица 2.1) в те же лунки микропланшета (A1 - A5 и B1 - B5).

Рисунок 2.2. Микропланшет В: IS, пробы реакционной смеси в присутствии ингибитора при разных концентрациях субстрата (см. Таблицу 2.1 выше)

d. Установите таймер на 5 минут и немедленно включите его после запуска первой ферментативной реакции добавлением раствора фермента в первую лунку (IS_I1) как описано ниже.

e. Добавьте по 50 мкл фермента α-галактозидазы (**Enzyme**) в лунки A1-B5, начиная с IS_I1 и IS_{II}1, и продолжая в том же направлении с одинаковым временным интервалом между лунками до лунки IS_{II}5 для начала ферментативной реакции в каждой лунке.

Тщательно перемешивайте содержимое лунок быстрым но аккуратным пипетированием 50 мкл смеси два раза сразу же после внесения раствора фермента в лунку.

f. Через 5 минут инкубации добавьте по 100 мкл стоп-раствора (**Stop**), при помощи пипетки р1000, для остановки ферментативной реакции в каждой лунке A1-B5 в том же порядке и с тем же временным интервалом, как при запуске реакции.

Перемешайте тщательно смесь пипетированием два раза после добавления стоп-раствора. В каждой лунке реакция должна протекать в течение 5 минут!



Q. 14

Эксперимент по кинетике ингибирования фермента

Передайте ваш микропланшет с пробами из части **2.2.** ассистенту, подняв вашу розовую карточку. После измерения результаты появятся в таблице ниже автоматически. Используйте пожалуйста для расчетов стандартные данные из представленной ниже Таблицы **2.2.**

Внимание : микропланшеты не будут приниматься для измерения в последние **10** минут до окончания экзамена!

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2.3 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ КИНЕТИКИ ИНГИБИРОВАНИЯ А-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

В этой части вы должны применить теоретические знания из части 2.1 и предоставленные данные по ингибированию из части 2.2b (см. Таблицу 2.2 ниже) для вычисления кинетических параметров в присутствии ингибитора.

A A A

0: RUS_final

ARNAT BALABIYEV



Берка для реакции с субстратом ингибированием, чтобы установить тип ингибирования. Когда вы определите тип ингибирования, вы будете использовать два уравнения Лайнвивера-Берка (предоставленное гипотетическое уравнение и уравнение в присутствии ингибитора) для определения изменений основных кинетических параметров и константы ингибирования (K_i).

Таблица 2.2. Предоставленные данные поглощения в опыте по ингибированию (два первых ряда и столбцы 1-5 соответствуют формату микропланшета)

	1	2	3	4	5
A	0.251	0.375	0.507	0.596	0.634
B	0.252	0.380	0.501	0.598	0.635

Проведите вычисления и заполните таблицу ниже. Чтобы рассчитать концентрацию продукта в мМ, используйте стандартное уравнение, данное в вопросе Q6:

$$\text{Поглощение } A_{405} = 2.29 \cdot [pNP] \text{ (mM)} + 0.058$$

Надпись на пробирке	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
Объем (мкл) исходного раствора субстрата (Substrate) (из таблицы 2.1)	80	160	320	600	840
Объем (мкл) воды Milli-Q (Water) (из таблицы 2.1)	920	840	680	400	160
Концентрация субстрата [S] в разведенном растворе перед добавлением в реакционную смесь (мМ)					
Концентрация субстрата [S] в реакционной смеси (мМ)					
Средняя величина поглощения при A_{405} из Таблицы 2.2					
[Продукт соединение]					

среднее значение (мМ)					
V_0 (мкМ/сек)					
$1/[S]$ (1/мМ)					
$1/V_0$ (секунды/мкМ)					

График Лайнуивера-Берка строится на основании данных по кинетике ингибирования (IS1-IS5) в таблице 2.2. Гипотетическое уравнение Лайнуивера-Берка в отсутствие ингибитора описывается уравнением: $1/[V_0] = 0.363 \cdot 1/[S] + 0.908$, и этот график показан на Рис. 2.3. Это уравнение должно быть использовано для вычислений ниже, а **НЕ то уравнение, которое вы определили в разделе 1.3 (Рис. 1.7)**

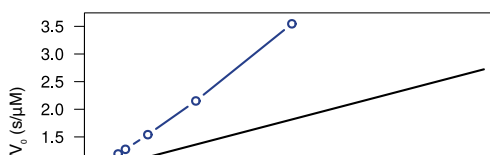


Рисунок 2.3. График Лайнуивера-Берка для данных по ингибированию и для гипотетических данных без ингибирования



Q. 16

Линейная функция Лайнуивера-Берка (реакция в присутствии ингибитора)

Определите математически линейную функцию для графика Лайнуивера-Берка (Рис. 2.3) в присутствии ингибитора в виде показанного ниже уравнения, используя только данные для точек **IS1** и **IS5**. Результаты для **a** и **b** представьте с точностью **до трех знаков после запятой**.

$$1/[V_0] = a \cdot 1/[S] + b,$$

a (мМ·сек/мкМ)	
b (секунды/мкМ)	



Q. 17

Кажущиеся кинетические параметры в присутствии ингибитора

Определите кажущиеся кинетические параметры в присутствии ингибитора из уравнения Лайнвивера-Берка в реакции ингибирования. Результаты представьте с точностью **до трех знаков** после запятой (**Не надо менять единицы измерения!**).

$V_{\max}$		
K_m^i		



Q. 18

Тип ингибирования

Какой тип ингибирования α -гликозидазы Вы обнаружили? Выберите наиболее вероятный тип ингибирования на основании характера изменений кинетических параметров фермента в присутствии ингибитора по сравнению с представленными Вам данными для фермента в отсутствие ингибитора

1. КОНКУРЕНТНОЕ

2. НЕКОНКУРЕНТНОЕ

3. БЕСКОНКУРЕНТНОЕ



Q. 19

Влияние концентрации субстрата

Исходя из типа ингибирования, который Вы выбрали выше, ответьте на вопрос, как увеличение концентрации субстрата будет влиять на ингибирование? Выберите одно из приведенных ниже утверждений:

1. ИНГИБИРОВАНИЕ УМЕНЬШИТСЯ

2. ИНГИБИРОВАНИЕ НЕ ИЗМЕНИТСЯ

3. ИНГИБИРОВАНИЕ УВЕЛИЧИТСЯ



Q. 20

Константа ингибирования

(2 балла) Определите константу ингибирования (K_i), если концентрация в **50** мкл ингибитора, добавленного к реакционной смеси, составляла **0,5** М. Результаты представьте с точностью **до трех знаков после запятой (Не надо менять единицы измерения!)**

Концентрация ингибитора в реакционной смеси (мМ)	
K_i (мМ)	

КОНЕЦ