

Nazwisko.....

Data

Kierunek

Imię.....

Dzień tyg.

Godzina

Ćwiczenie B33

Kataliza enzymatyczna – badanie kinetyki katalazy przy użyciu czujnika tlenu

Temperatura w laboratorium $t = \dots\dots\dots$ °C, $T = \dots\dots\dots$ K

Tabela I: Obliczanie prędkości początkowych reakcji z udziałem katalazy

Pomiar	Różnica stężeń tlenu [%] $\Delta C = C_2 - C_1$	$\Delta t = t_2 - t_1$	Szybkość początkowa reakcji [%/s] $V_0 = \frac{\Delta C}{\Delta t}$
z 0,25% H ₂ O ₂			
z 0,5% H ₂ O ₂			
z 0,75% H ₂ O ₂			
***z 1% H ₂ O ₂			

*** zapytaj prowadzącego, które stężenia wykorzystać w ćwiczeniu

Tabela II: Zamiana stężenia procentowego C_p H₂O₂ na stężenie molowe [S]

Stężenie procentowe C_p H ₂ O ₂ [%]		Stężenie molowe [S] H ₂ O ₂ [mol/dm ³]
0,25	$[S] = \frac{C_p * d}{M * 100\%}$	
0,5		
0,75		
1		

*gdzie M – masa molowa H₂O₂ = 34,0147 g/mol, d – gęstość H₂O₂ = 1,45 g/cm³

Tabela III: Parametry reakcji katalitycznej

$\frac{K_m}{V_{max}} = a$	$\frac{1}{V_{max}} = b$	Prędkość maksymalna reakcji enzymatycznej V_{max}	Stała Michaelisa-Menten K_m

Ćwiczenie B33: Kataliza enzymatyczna – badanie kinetyki katalazy przy użyciu czujnika tlenu

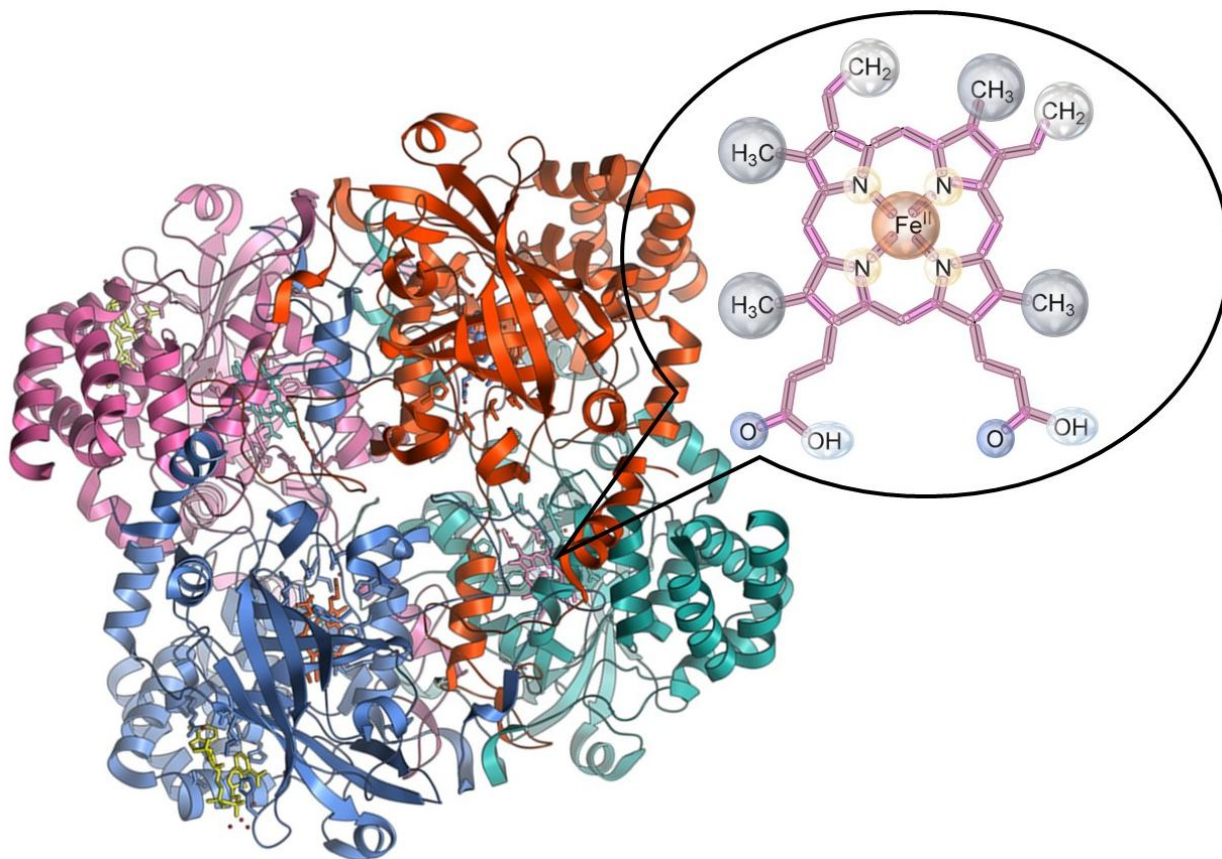
CEL

Ideą ćwiczenia jest zbadanie kinetyki enzymatycznej katalazy poprzez analizę szybkości rozkładu nadtlenu wodoru (H_2O_2). W tym celu, wykorzystując czujnik tlenu stosowany do ilościowego pomiaru tlenu molekularnego, należy wyznaczyć stałą Michealisa-Menten (K_m) i maksymalną prędkość reakcji katalitycznej (V_{\max}).

TEORIA

Katalaza jest jednym z najbardziej istotnych i wydajnych enzymów występujących w żywych organizmach. Pełni kluczową rolę w zakresie ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym, a w szczególności przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu (ROS – reactive oxygen species). W wyniku szeregu reakcji biochemicznych, zwłaszcza tych związanych z oddychaniem komórkowym (np. fosforylacja oksydacyjna, utlenianie w peroksysomach) powstają potencjalnie szkodliwe wolne rodniki oraz nadtlenek wodoru. H_2O_2 może ulegać dalszym przekształceniom do bardziej reaktywnych rodników hydroksylowych ($\bullet\text{OH}$) np. w reakcji Fentona. Katalaza w sposób szybki i efektywny chroni przed tym zagrożeniem, katalizując proces rozkładu nadtlenu wodoru na wodę i tlen.

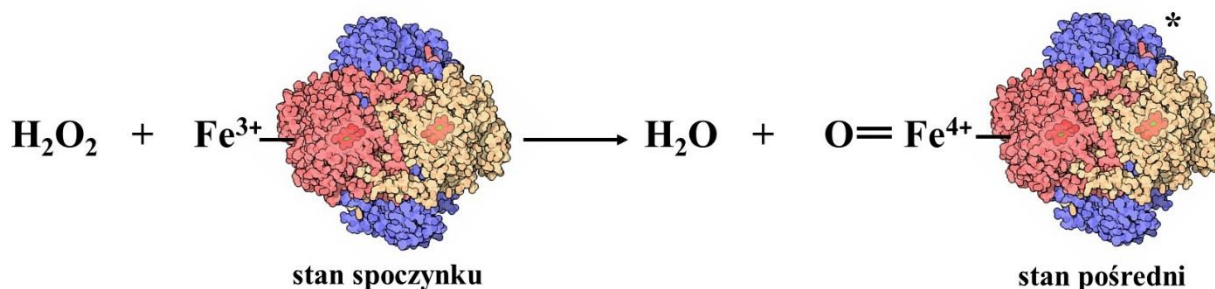
Katalaza jest tetrameryczną hemoproteiną, co oznacza, że składa się z czterech identycznych podjednostek, z których każda zawiera w swojej strukturze otoczoną białkiem (apoenzymem) grupę hemową z centralnie położonym atomem żelaza, kluczową dla aktywności tego biokatalizatora. Grupa hemowa jako grupa niebiałkowa, tzw. prostetyczna, występuje również w hemoglobinie, gdzie odpowiedzialna jest właśnie za wiązanie i aktywację nadtlenu wodoru.



Rys. 1 Czwartorzędowa katalaza oraz struktura żelazoporfiryny tzw. hemowej grupy prostetycznej znajdującej się w centrum aktywnym enzymu.

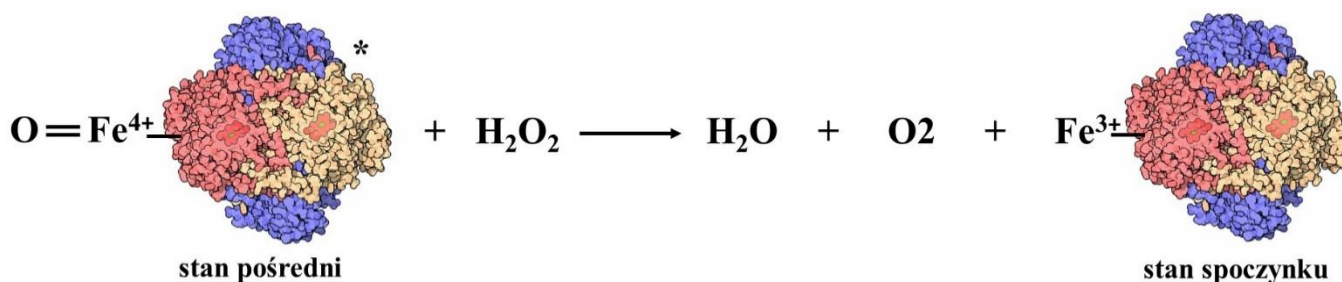
W katalitycznym mechanizmie katalazy można wyróżnić dwa etapy główne:

- I. W **pierwszym** etapie procesu zgodnie z rysunkiem 2, cząsteczka nadtlenu wodoru (substratu) przyłącza się do centrum aktywnego enzymu w wyniku czego grupa hem przechodzi w stan pośredni, zwany oksyhemem. W tej fazie jedna cząsteczka H_2O_2 ulega rozkładowi, tworząc cząsteczkę wody i tlenu atomowego, który pozostaje związany z atomem żelaza w grupie hemowej.



Rys. 2 Schemat pierwszego etapu mechanizmu katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę. W stanie spoczynku katalazy atom żelaza grupy hem występuje na 3 stopniu utlenienia. W stanie pośrednim atom tlenu wiąże się z grupą hemową, a stopień utlenienia atomu żelaza rośnie na +4.

- II. W **drugim** etapie procesu zgodnie z rysunkiem 3, kolejna cząsteczka nadtlenu wodoru reaguje z kompleksem oksyhemowym. Następuje jego redukcja, w wyniku której powstaje woda i tlen cząsteczkowy (O_2), a katalaza wraca ponownie do stanu spoczynku.



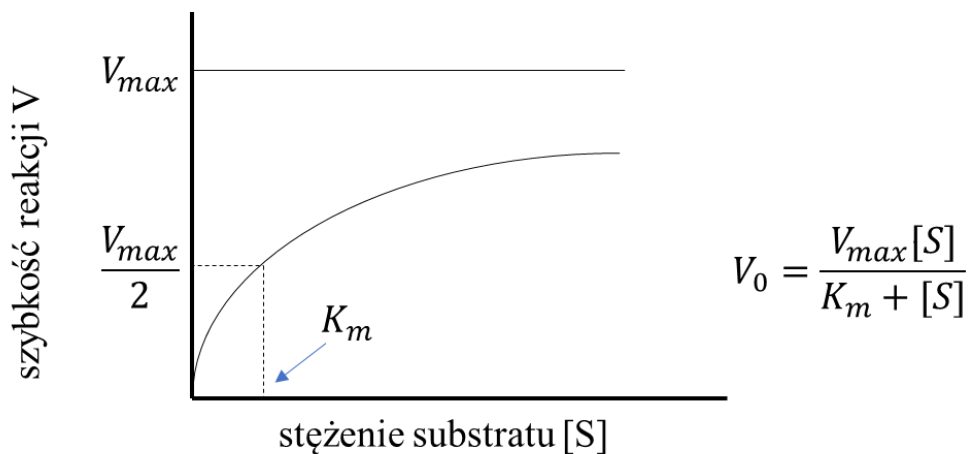
Rys. 3 Schemat drugiego etapu mechanizmu katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę.

Cały proces zachodzi niezwykle szybko – katalaza jest w stanie przekształcić miliony cząsteczek H_2O_2 na sekundę, co czyni ją jednym z najbardziej efektywnych enzymów znanych w biologii. Ponadto reakcja katalityczna ma charakter redoks, ponieważ zarówno nadtlenek wodoru jak i grupa hemowa enzymu ulegają utlenianiu i redukcji. Właśnie dlatego katalaza należy do grupy enzymów zwanych oksydoreduktazami.

Reakcje enzymatyczne, takie jak ta katalizowana przez katalazę, mogą być obrazowane za pomocą kinetyki Michealisa-Menten. Stanowi ona podstawowy model matematyczny używany do opisu prędkości reakcji enzymatycznych w zależności od stężenia substratu. Zależność kinetyki oraz równanie Michaelisa-Menten przedstawia rysunek 4, gdzie:

- V_0 to początkowa prędkość reakcji, czyli szybkość reakcji na początku procesu, gdy stężenie substratu jest jeszcze wysokie,
- V_{\max} to maksymalna prędkość reakcji, która zostaje osiągnięta, gdy wszystkie cząsteczki enzymu są zaangażowane w proces, a dalszy wzrost stężenia substratu nie powoduje zwiększenia prędkości reakcji,

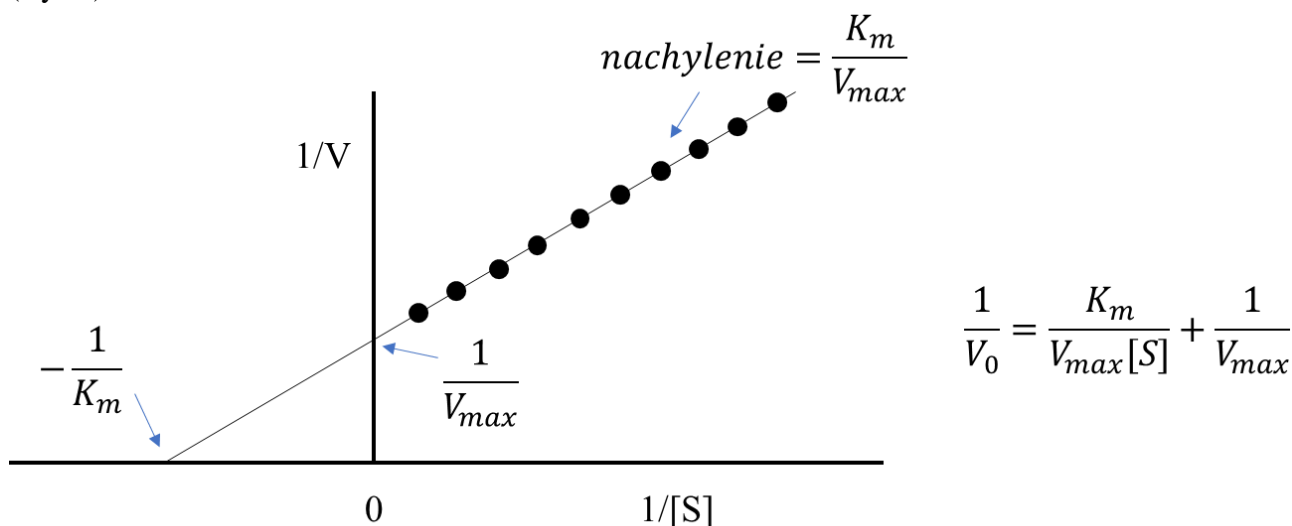
- $[S]$ to stężenie substratu,
- K_m to stała Michaelisa-Menten, która odzwierciedla powinowactwo enzymu do substratu, a dokładnie wyraża takie stężenie substratu, przy którym prędkość reakcji osiąga połowę V_{max} .



Rys. 4 Zależność kinetyczna prędkości procesu V od stężenia substratu $[S]$ oraz równanie Michaelisa-Menten.

Stała Michaelisa-Menten K_m odnosi się do tego, jak silnie i specyficznym enzym wiąże się z substratem. Wysokie powinowactwo (niskie K_m) oznacza, że cząsteczki enzymu bardzo łatwo wchodzi w reakcję z substratem, nawet przy niskich stężeniach substratu, natomiast niskie powinowactwo (wysokie K_m) sugeruje, że enzym wymaga wyższych stężeń substratu, aby skutecznie się z nim związać.

Stałą Michaelisa-Menten K_m i maksymalną prędkość procesu katalitycznego V_{max} można wyznaczyć dopasowując zależność prędkości zachodzącego procesu V_0 od stężenia substratu $[S]$ do równania Michaelisa-Menten. Jednak bardziej praktycznym podejściem jest zastosowanie wykresu Lineweavera-Burka, który jest przekształceniem równania Michaelisa-Menten do postaci liniowej (Rys.5):



Rys. 5 Zależność kinetyczna oraz równanie Lineweavera-Burka.

Ciekawostka

Leki biopodobne często mają za zadanie działać w sposób analogiczny do endogennych białek lub enzymów i wykazywać równoważną skuteczność terapeutyczną jak lek referencyjny. Eksperymenty kinetyczne wykonywane w niniejszym ćwiczeniu mogą służyć do porównania ich aktywności z naturalnymi odpowiednikami.

Przykładem może być *Enbrel* – biologiczny lek immunosupresyjny zawierający substancję czynną etanercept, stosowany do leczenia ciężkiego, czynnego i postępującego reumatoidalnego zapalenia stawów. Jego tańszym biopodobnym odpowiednikiem dostępnym na rynku jest *Benepali* – wysoce podobny w zakresie struktury, skuteczności, bezpieczeństwa i jakości.

WYKONANIE ĆWICZENIA

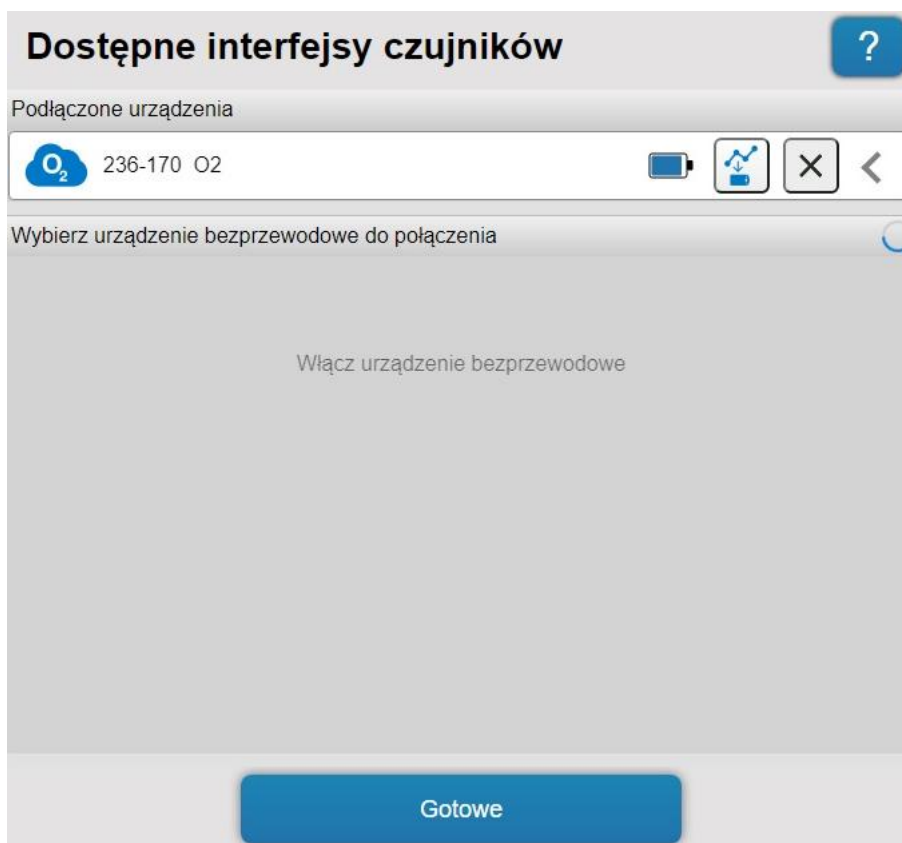
Ćwiczenie B33: Kataliza enzymatyczna – badanie kinetyki katalazy przy użyciu czujnika tlenu

POTRZEBNE WYPOSAŻENIE	
<ul style="list-style-type: none"> • Komputer z oprogramowaniem „SPARKvue” 	<ul style="list-style-type: none"> • Mieszadło magnetyczne z mieszadełkiem
<ul style="list-style-type: none"> • Czujnik O₂ - PASCO wireless O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Butelka szklana, cylinder miarowy, łyżeczka plastikowa
<ul style="list-style-type: none"> • Butelka plastikowa z kranikiem 	<ul style="list-style-type: none"> • Katalaza (proszek)
<ul style="list-style-type: none"> • Strzykawka z rurką 	<ul style="list-style-type: none"> • Roztwory wodne nadtlenu wodoru

Zapisz wszystkie dane i obliczenia w tabeli i opracowaniu.

Przygotowanie komputera – nie zapisuj zmian w plikach (DON'T SAVE)

1. Włącz zasilanie stołu (patrz deska rozdzielcza stołu – przy Twojej lewej nodze gdy siedzisz na wprost komputera) – przekręć czerwoną „gałkę” w kierunku strzałek (powinna wyskoczyć), przekręć kluczyk jak w samochodzie i puść. Włącz komputer.
2. Automatycznie uruchomi się system operacyjny *Windows*. Zaloguj się naciskając ikonę użytkownika **B33**. Podłącz czujnik PASCO O₂ kablem micro-usb bezpośrednio do komputera. Na środku pulpitu znajduje się skrót B33 – uruchamia program „SPARKvue”. Rozwiń okno do pełnego ekranu.
3. Naciśnij ikonę Bluetooth (prawy górny róg okna) i sprawdź czy czujnik O₂ (236-170 O2) jest dostępny. Prawidłowe podłączenie czujników przedstawia rysunek 6. **Innych czujników nie podłączaj!**



Rys. 6 Okno połączenia bezprzewodowego czujnika tlenowego Pasco

Okno ćwiczenia B33

Okno podstawowe „**Pomiar stężenia tlenu**” (Rys. 7) zawiera przyciski sterowania, wykres zależności stężenia O_2 (%) od czasu (s). Zakresy na osiach będą zmieniały się automatycznie podczas pomiarów.



Rys. 7 Podstawowe okno pomiarowe „Pomiar stężenia tlenu”.

Kalibracja czujnika PASCO wireless O₂ (236-170 O₂).

1. Naciśnij pasek „Stężenie tlenu” (lewy dolny róg okna „SPARKvue”).
2. Wybierz „Skalibruj pomiar”, a następnie „Kontynuuj”.
3. W 2 punkcie kalibracji czujnika, w polu „Standardowa wartość” wpisz wartość 20,9, a następnie naciśnij „Odczytaj z czujnika” i zatwierdź „Ok”. Wartość 20,9% to stężenie tlenu w atmosferze.

Przygotowanie układu pomiarowego

1. Poproś prowadzącego o fiołki z wodnymi roztworami nadtlenu wodoru o różnych stężeniach procentowych (0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%).
2. Przygotuj wodny roztwór katalazy. Na wadze analitycznej odważ 5 g katalazy – wykorzystaj w tym celu plastikową łyżeczkę i kartkę papieru. Wsyp odważoną katalazę do szklanej butelki, a następnie wlej do niej 200 ml zimnej wody. Wymieszaj zawartość butelki do pełnego rozpuszczenia enzymu, pamiętając by wcześniej zakręcić butelkę.
3. Do plastikowej butelki z kranikiem wlej ostrożnie 15 ml roztworu nadtlenu wodoru o najmniejszym stężeniu procentowym (0,25%), a następnie osusz jej górną część ręcznikiem papierowym.
4. Do butelki z roztworem nadtlenu wodoru włóż mieszadełko magnetyczne.
5. Zamknij butelkę z nadtlentem wodoru od góry czujnikiem tlenu PASCO i zabezpiecz układ wykorzystując uchwyt statywu.



Rys. 8 Prawidłowo przygotowany układ pomiarowy.

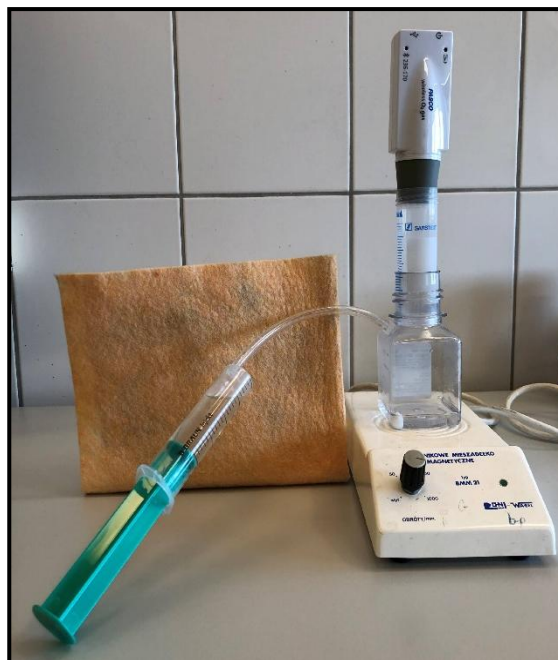
Przebieg i rejestracja pomiarów

Samoistny rozkład nadtlenu wodoru

1. Podczas eksperymentu butelka zamknięta czujnikiem powinna stać stabilnie, pionowo na blacie stołu laboratoryjnego. W tym celu wykorzystaj uchwyt statywu.
2. Poczekaj 5 minut w celu ustabilizowania warunków pomiarowych.
3. Naciśnij zielony przycisk „START” (gdy jest aktywne zbieranie danych wyświetla się czerwony kwadrat i odliczany jest czas). Pomiar będzie trwał 7 minut i zakończy się automatycznie.
4. Jeżeli po 7 minutach eksperyment nie zakończy się automatycznie, przerwij go manualnie naciskając czerwony kwadrat „STOP”.
5. Zachowaj przygotowany układ pomiarowy do następnego eksperymentu i postępuj zgodnie z instrukcją poniżej.

Rozkład nadtlenku wodoru w obecności katalazy

1. Przygotowany układ pomiarowy ustaw stabilnie, pionowo na mieszadło magnetycznym wykorzystując uchwyt statywu.
2. Podłącz kabel zasilający mieszadła magnetycznego do prądu i ustaw mieszadło na maksymalne obroty. Spróbuj ustawić butelkę tak by mieszanie było jednostajne.
3. Pobierz do plastikowej strzykawki 15 ml wodnego roztworu katalazy (aby ułatwić sobie pobieranie, przelej roztwór enzymu do zlewki – aby uwzględnić objętość rurki zaciągnij najpierw 5 ml powietrza, a następnie roztwór katalazy do poziomu 20 ml), a następnie nałóż na końcówkę strzykawki rurkę i połącz ją z kranikiem butelki.
4. Naciśnij zielony przycisk „START”. Pomiar będzie trwał 7 minut i zakończy się automatycznie. **UWAGA! W 2 minucie pomiaru wstrzyknij do butelki (szybko ale płynnie przez ok. 4s) 15 ml roztworu katalazy.**
5. Jeżeli po 7 minutach eksperyment nie zakończy się automatycznie, przerwij go manualnie naciskając czerwony kwadrat „STOP”.
6. Po zakończonym pomiarze, odłącz strzykawkę wyjmij czujnik tlenu z butelki i wylej jej zawartość. Następnie dokładnie przepłucz butelkę dwukrotnie zimną wodą z kranu i osusz jej górną część ręcznikiem papierowym.
7. Poczekać, aż czujnik tlenowy pokaże wartość wykrywanego tlenu na poziomie 20,9%.
8. Powtórz eksperyment z katalazą z użyciem 0,5%, 0,75% i 1% roztworów nadtlenku wodoru (w tym celu ponownie skorzystaj z instrukcji zatytułowanej „Rozkład nadtlenku wodoru w obecności katalazy”).



Rys. 9 Układ pomiarowy potrzebny do przeprowadzenia eksperymentów w obecności katalazy.

Analiza danych

1. Na podstawie zarejestrowanych zależności stężenia tlenu od czasu podczas rozkładu H_2O_2 w obecności katalazy, wyznacz prędkość początkową reakcji V_0 dla wszystkich badanych roztworów nadtlenku wodoru. W tym celu wybierz prosty, liniowy fragment krzywej oznaczający nagły wzrost stężenia tlenu (od ok. 2 minuty pomiaru).
2. Wykorzystaj przycisk „Scale to fit” do dopasowania otrzymanych danych do okien.
3. Z wyselekcjonowanego liniowego fragmentu zależności wybierz myszką dwa punkty (Rys. 10) oznaczone jako (t_1, C_1) i (t_2, C_2) i zapisz ich wartości, gdzie:
 - t_1 i t_2 to wartości czasu dla tych punktów
 - C_1 i C_2 to wartości stężenia procentowego tlenu
4. Oblicz nachylenie liniowego fragmentu krzywej, które odpowiada prędkości początkowej reakcji V_0 wykorzystując poniższą zależność:

$$\text{nachylenie} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1}$$

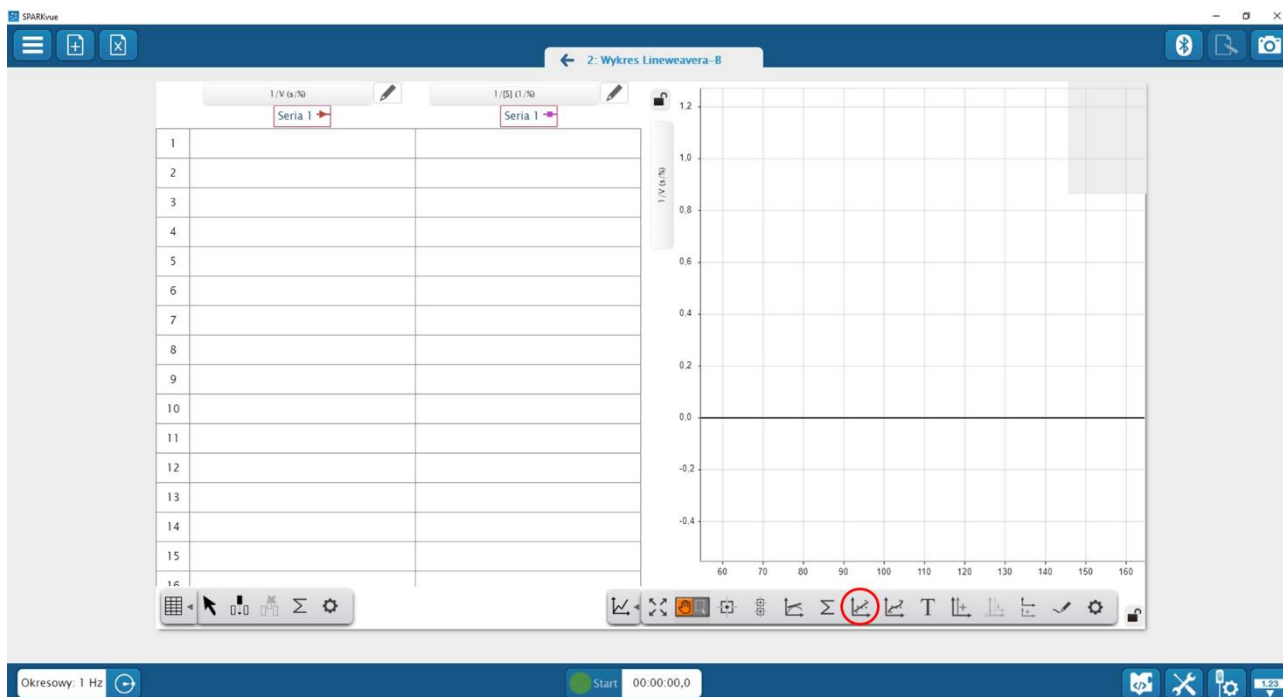


Rys. 10 Wybór punktów pomiarowych potrzebnych do wyznaczenia prędkości początkowej reakcji.

- Obliczenia prędkości początkowej V_0 wykonaj dla wszystkich zarejestrowanych krzywych (dla wszystkich stężeń nadtlenku wodoru) i wpisz je tabeli pomiarowej „Obliczanie prędkości początkowej reakcji z udziałem katalazy”.
- Wykorzystując wyznaczone prędkości początkowe V_0 sporządź wykres Lineweavera-Burka i dopasuj do powstałej zależności prostą zgodnie z rysunkiem 5.
- W tym celu zmień kartę w aplikacji klikając strzałkę zaznaczoną żółtym kółkiem (Rys. 10).
- Korzystając z poniższej zależności przelicz stężenia procentowe (0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%) nadtlenku wodoru na stężenia molowe $[S]$ wiedząc, że gęstość d H_2O_2 wynosi $1,45 \text{ g/cm}^3$, a masa molowa M jest równa $34,0147 \text{ g/mol}$:

$$C_{m[S]} \left[\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right] = \frac{C_p [\%] * d \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]}{M \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] * 100}$$

- W okienku widocznym na rysunku 11 wpisz w odpowiednie kolumny tabeli odwrotności wyznaczonych prędkości początkowych ($1/V_0$) i odpowiadające im odwrotności stężeń nadtlenku wodoru ($1/[S]$), a następnie dopasuj równanie prostej klikając ikonę zaznaczoną czerwonym kółkiem (Rys. 11) w aplikacji. Wyznaczony współczynnik kierunkowy „a” dopasowanej prostej „ $y = ax + b$ ” jest równy stosunkowi K_m/V_{max} .



Rys. 11 Tabela i okno wykresu Lineweavera-Burka.

10. Wyznacz punkt przecięcia dopasowanej prostej z osią Y (wartość tego punktu wynosi $1/V_{\max}$ i jest równa wyrazowi wolnemu „b” z równania „ $y = ax + b$ ”) i oblicz maksymalną prędkość reakcji katalitycznej V_{\max}
11. Wyznacz punkt przecięcia dopasowanej prostej z osią X (wartość tego punktu wynosi $-1/K_m$) i wyznacz stałą Michaelisa-Menten K_m jako wartość dodatnią.
12. Wykresy Lineweavera-Burka i zależności prędkości początkowej V_0 od stężenia molowego substratu $C_{m[S]}$ (hiperbola Michaelisa-Menten) sporządź w domu wykorzystując oprogramowanie typu Excel lub na papierze milimetrowym i dołącz je do sprawozdania. Na wykresach zaznacz punkty charakterystyczne t.j. maksymalna prędkość katalizowanej reakcji V_{\max} , stała Michaelisa-Menten K_m , a także $1/K_m$, $1/V_{\max}$ i K_m/V_{\max} zgodnie z rysunkami 4 i 5.

Pytania do dyskusji:

1. Jak zmienia się prędkość początkowa reakcji V_0 w zależności od stężenia nadtlenu wodoru i jaki sens eksperymentalny ma uzyskana wartość prędkości maksymalnej reakcji katalitycznej V_{\max} ?
2. W jakich jednostkach wyraża się stałą Michaelisa-Menten K_m i co ona oznacza w kontekście przeprowadzonego eksperymentu?
3. Jakie parametry i aspekty mogą wpływać na niedokładność pomiarów eksperymentu?