

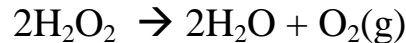
Kinetikforsøg med enzymet catalase

- hvilke faktorer kan påvirke enzymers aktivitet?

Jørgen Braad Jørgensen/2005

Introduktion

Spaltning af hydrogenperoxid til vand og oxygen kan katalyseres af enzymet catalase:



Enzymet findes i alle levende organismer, som bruger ilt, hvor det tjener til at fjerne det giftige stof H_2O_2 . Hydrogenperoxid dannes som biprodukt i forbindelse med oxidationsprocesser i peroxysomer (se MolBio s.18-19).

I denne øvelse skal du prøve, at måle enzymers aktivitet i praksis og prøve at undersøge hvilke faktorer, som kan påvirke enzymers aktivitet. Disse faktorer kunne være pH, temperatur, substratkoncentration, enzymgifte, enzymregulatorer, men måske også andre faktorer. På baggrund af din viden om proteiners struktur og kemi skal du endvidere prøve at forklare den biokemiske baggrund for virkningerne.

Analyseprincip

Reaktionshastigheden følges ved at måle rumfanget af den dannede oxygen som funktion af tiden. Reaktionen udføres i en burette på 50 mL og startes ved at blande enzym og substrat i bunden af buretten ved samtidig indsprøjtning fra to sprøjter (stop flow teknik). Ved at tilsætte reaktionsblandingen et passende detergent (sæbe) dannes en stabil skumsøjle, således at produktmængden direkte kan aflæses på burettens skala.

Materialer

50 mL burette, sprøjter (5 el. 10 mL), slangestykker, T-bøsninger, stopur, vandluftpumpe, 100 mL bægerglas (2 pr hold), målepipetter på 1 mL, 5 mL og 10 mL. pH-meter. Desuden vandbade til temperaturforsøg.

Hydrogenperoxidopløsninger på 2M, 1M og 0,2M, vandopløselige salte af tungmetaller (Cd, Hg, Pb), Tris base, ethansyre, maleinsyre (til fremstilling af pufferopløsninger pH 2 – 10 (interval på ca 1 pH) som ikke fælder med tungmetaller, cystein, skumdanner (Texapon, hårshampoo, skumbad el.lign), catalase (sælges bl.a. af Boehringer og bestilles hos Ercopharm A/S, men kan også udvindes fra passende biologisk materiale: lever, kartofler, selleri, gær m.v.). En passende enzymopløsning fås ved at blande 1 mL Catazyme (NOVOZYMES) med 1 mL skumbad til 100 mL dest.. Vand.



Sikkerhed!!

Hydrogenperoxid (dihydrogendioxid) er ætsende ved høje koncentrationer. Brug derfor konsekvent beskyttelseshandsker og beskyttelsesbriller under alle eksperimenter (det kunne jo også være naboen, som sprøjtede).

Fremgangsmåde - generel

Der arbejdes i hold på tre personer (tidtager, forsøgsleder, sekretær).

1. Substratopløsning (H_2O_2) og enzymopløsning (catalase) i de rigtige koncentrationer overføres hver for sig til 100 mL bægerglas.
2. Herefter suges 5 mL enzym og substrat op i hver sin sprøjte.
3. Til tiden 0 (tidtager starter stopur) sprøjter forsøgslederen ind i buretten, og skumsøjlen aflæses om muligt hver 5 sekund af forsøgslederen (husk at skalaen på buretten vender omvendt). Sekretæren noterer aflæsningerne

NB: Det er vigtigt, at du til alle forsøg bruger samme bægerglas og samme sprøjte til enzymopløsning og substrat (afmærkning)

Rengøring af burette

Rensningen foretages mest bekvemt ved at forbinde den ene af sprøjtestudsene i bunden af buretten med en vandluftpumpe. Herefter kan indholdet af buretten hurtigt vaskes ud med en sprøjteflaske

Resultatbehandling - generelt

1. Beregn produktrumfang ud fra de aflæste rumfang:
 $V_{\text{produkt}} = 50 \text{ mL} - \text{aflæst rumfang (mL)}$.
2. Rumfanget af produkt (skumsøjlen) afsættes som funktion af tiden på millimeterpapir eller i regneark.
3. Enzymaktiviteten ($\text{mL O}_2/\text{sekund}$) måles som kurvens hældning til tiden 0 (starthastigheden = initialhastigheden).
4. I et nyt koordinatsystem afsættes de målte initialhastigheder som funktion af den faktor, du har påvirket enzymet med (substratkoncentration, pH, temperatur osv)

Affaldsbehandling

Alle restopløsninger bortset fra forsøg med tungmetaller må hældes i vasken. Tungmetalopløsninger hældes i beholder med basisk uorganisk affald

Fremgangsmåde de enkelte forsøg

Ændring af substratkoncentration

Alle forsøg foregår ved stuetemperatur

I enzyrbægerglasset overføres ca. 10 mL enzymopløsning med sæbeskum

I substratbægerglasset afpipetteres med stangpipetter vand og stamopløsning af hydrogenperoxid efter følgende skema:

Fremstilling af H₂O₂ substratopløsninger til kinetikforsøg med catalase

Slutrumfang = 10 mL

Forsøg	Stamopløsning koncentration M	Tilsæt stam- opløsning mL	Tilsæt vand mL	Slut- koncentration mM
1	2	9	1	1800
2	2	7	3	1400
3	2	5	5	1000
4	2	3	7	600
5	2	1	9	200
6	0,2	8	2	160
7	0,2	6	4	120
8	0,2	4	6	80
9	0,2	2	8	40
10	0,2	1	9	20

Ændring af temperatur

Ca. 10 mL 1M hydrogenperoxidopløsning overføres til substratbægerglas, og ca. 10 mL enzymopløsning med sæbe overføres til enzym- og substratbægerglas.

For at opnå en konstant temperatur placeres bægerglas, sprøjter og bunden af buretten i et vandbad ca. 5 min.

Start med ved stuetemperatur, og gentag herefter forsøget ved lavere og højere temperaturer med intervaller på ca.. 10 grader Celsius. Mål temperaturen med elektrisk termometer lige inden substrat og enzym blandes. Brug isterninger eller kogende vand til at opnå passende temperaturer.

Ændring af pH

10 mL enzymopløsning blandes med 10 mL pufferopløsning med pH ca 7 i enzyrbægerglasset og pH måles med et pH-meter

10 mL 1 M hydrogenperoxidopløsning overføres til substratbægerglasset.

Forsøget udføres herefter på sædvanlig vis og gentages med nye pufferopløsninger med værdier over og under 7.

Påvirkning med tungmetaller

10 mL enzymopløsning blandes med 10 mL opløsning af tungmetaller (f.eks. 100 mg/L Hg(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂, Cd(NO₃)₂) i enzyrbægerglasset

10 mL 1 M hydrogenperoxidopløsning overføres til substratbægerglasset.

Forsøget udføres efter de generelle retningslinier og gentages med de udleverede tungmetalopløsninger

Andre forsøg

Ændring af enzyemmængde. Enzym fra forskellige organismer (eks. temperaturltilpasning og enzymer fra pattedyr og fra organismer, der kan leve ved lave temperaturer (f. eks vintergækker).