1 Inleiding

Enzymen zijn biologische katalysatoren, die chemische reacties in cellen en weefsels tot 100.000x kunnen versnellen. Ze komen in zeer lage concentraties voor in de cellen, wat hun concentratiebepaling zéér moeilijk maakt. Bovendien is in veel gevallen de exacte molecuulmassa van het te bepalen enzym nog niet gekend. Men beperkt zich daarom – vaak noodgedwongen - tot de bepaling van de werking, oftewel de activiteit, van een enzym.

De meetbare activiteit van een enzym wordt in de praktijk veelal bepaald door toename of afname van een chromogeen product, dat spectrofotometrisch bepaald kan worden. Enzymactiviteit wordt uitgedrukt in units. Volgens de Internationale Commissie voor Biochemische Nomenclatuur is een **unit** die **hoeveelheid enzym die, onder welbepaalde omstandigheden** (o.a. buffer, temperatuur, substraatconcentratie)**, 1 µmol substraat omzet per minuut.**

2 Theoretische achtergrond: enzymkinetiek

Enzymatische reacties verlopen met een welbepaalde snelheid. Hieronder wordt de theorie herhaald die noodzakelijk is voor de verwerking van de resultaten.

Een enzym is een eiwit dat de omzetting van een substraat naar een product katalyseert.

$$\text{Substraat (S)} \xrightarrow{\text{enzym (E)}} \text{Product (P)}$$

Een enzym vormt een complex met het substraat (ES), en verlaagt zo de activatie-energie van de reactie S → P.

$$E + S \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k3} E + P$$

De reactiesnelheid v kan op elk ogenblik t gegeven worden door:

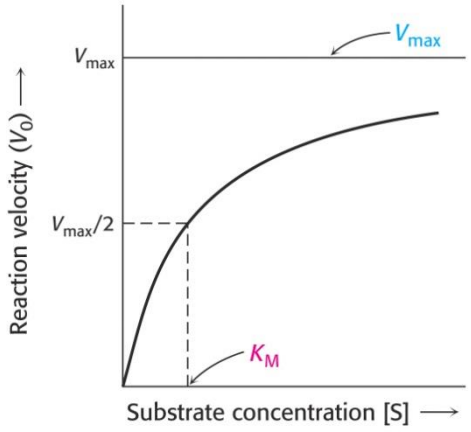
$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES]$$

Praktisch gezien worden enzymatische reacties gemeten onder steady-state voorwaarden, d.w.z. dat de vorming van ES per tijdseenheid gelijk is aan de verdwijning van ES per tijdseenheid. Dan is $\boxed{v = \frac{k_3[ES][S]}{K_M + [S]}}$

en met $V_{max} = k_3[E_t]$ is $\boxed{v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}}$

Dit is de **MICHAËLIS-MENTEN VERGELIJKING**. De reactiesnelheid volgt een hyperbool verloop i.f.v.. de substraatconcentratie (zie onderstaande grafiek).

- **V_{max}** is de snelheid waarbij het enzym volledig verzadigd is aan substraat, of, anders gezegd, waarbij alle actieve centra van het enzym bezet zijn.
- **K_M** is de Michaëlis-Menten constante, oftewel de substraatconcentratie waarbij de helft van de maximale reactiesnelheid bereikt wordt. K_M is bovendien ook een maat voor de affiniteit van een enzym voor het substraat: hoe hoger de affiniteit, hoe sneller V_{max} zal bereikt worden, of hoe kleiner K_M.



De **REACTIESNELHEID v** wordt gedefinieerd als de **hoeveelheid product** die **gevormd** wordt **per tijdseenheid,** en wordt standaard weergegeven in **mol/(l.min)**. Hoe berekenen we nu v, uitgaande van onze meetresultaten, nl. ΔE/min? Volg je de redenering hieronder mee:

$$E = \varepsilon_M . l . c$$

$$\text{en } \Delta E/min = \varepsilon_M . l . \Delta c/min$$

$$\text{dus } \Delta c/min = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon_M . l}$$

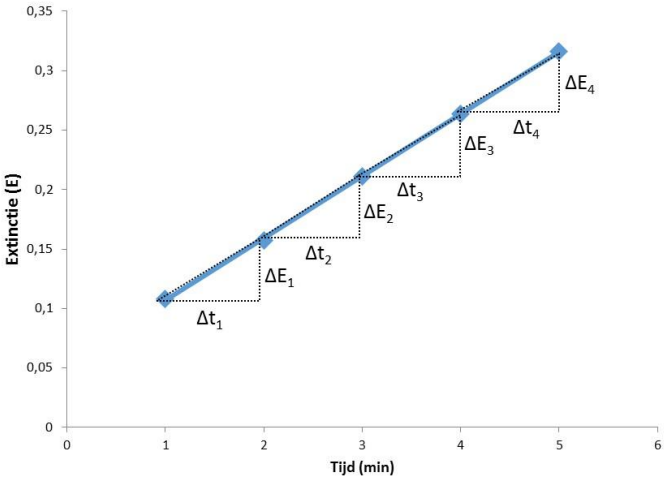
$$\text{En } v = \frac{\text{aantal mol/l gevormd product}}{min} = \frac{\Delta c}{min}$$

$$\text{Dus } \boxed{v = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon_M . l}}$$

Praktisch gezien, kan de reactiesnelheid worden bepaald door de vrijstelling van het reactieproduct, continu of discontinu, te volgen in functie van de tijd.

$$\text{Substraat (S)} \xrightarrow{\text{enzym (E)}} \text{Product (P)}$$

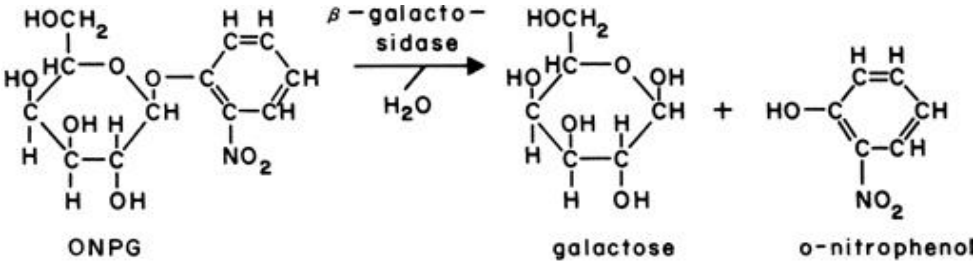
Als P een chromogeen product is, kan de gevormde hoeveelheid gemakkelijk spectrofotometrisch gevolgd worden in functie van de tijd. Wij hanteren de kinetische bepaling, waarbij de toename van E per tijdseenheid (min) gevolgd wordt gedurende 5 minuten. De uiteindelijke ΔE/min is dan een gemiddelde van ΔE_x/min, en kan praktisch in Excel bepaald worden als de rico van de lineaire trendlijn door de gegevenspunten (zie onderstaande grafiek).



TIP: Gebruik in excell de functie "richting" om de richtingscoëfficiënt te bepalen van een gegevensreeks y uitgezet i.f.v. een gegevensreeks x.

3 Experimenteel: het gebruikte testsysteem

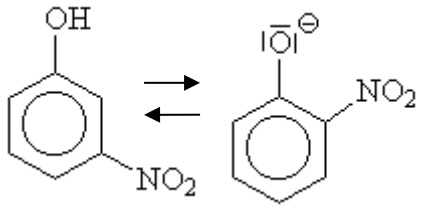
o-nitrofenyl β-D-galactoside (*o*-NF β-DG) wordt door het enzym β-D-galactosidase gesplitst in β-D-galactose en *o*-nitrofenol (*o*-NF). Het gedissocieerde *o*-NF is een chromogeen product en kan spectrofotometrisch bepaald worden. We spreken van een *continue methode*.



Als $v = \frac{\Delta E/min}{\varepsilon_M . l}$ dan "missen" we in deze vergelijking de waarde voor de molaire extinctiecoëfficiënt (ε_M).We weglengte van de cuvet (l) is immers gekend en ΔE/min is hetgeen we spectrofotometrisch bepalen.

4 Praktijkdeel 1: Bepaling van de molaire extinctiecoëfficiënt van o-nitrofenol.

Achtergrond: Orthonitrofenol (*o*-NF) met een pKa = 7.17 is bij pH 7.5 voor 69% gedissocieerd (reken na!). De gele kleur van het gedissocieerd fenol wordt gemeten bij λ_{max} (ong. 420nm, maar bepaal zelf!).



☞Absorbeert bij λmax ≈ 420nm

Beknopt protocol:

- Maak een stockoplossing (stock I) o-nitrofenol (*o*-NF) 1mmol/l in fosfaatbuffer 0,1 mol/l pH 7,5 met 1 mmol/l $MgCl_2$.
- Maak hieruit een verdunningsreeks in fosfaatbuffer+$MgCl_2$ met de concentratie o-NF tussen 50 en 500 µmol/l. Gebruik proefbuizen en werk met (gecalibreerde) micro-pipetten tot totaalvolumes van 5ml. Maak eventueel eerst een werkstockoplossing o-NF (stock II).
- Meet de extinctie van de verdunningen bij λ_{max}.

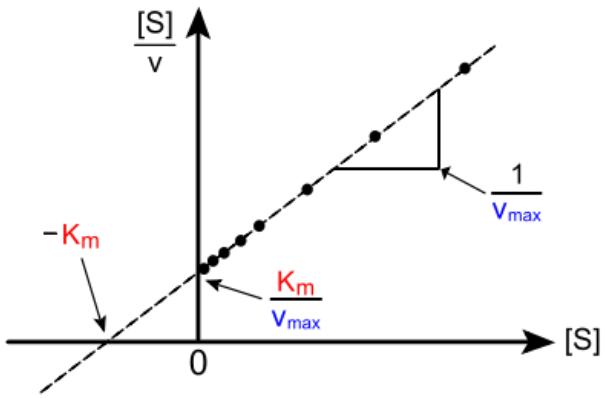
Resultatenverwerking:
Stel de standaardcurve, E in functie van de conc, op. Denk na hoe je hieruit nu de molaire extinctiecoëfficiënt kan afleiden.

5 Praktijkdeel 2: Experimentele bepaling van de enzymkinetische parameters V_{max} en K_M (v i.f.v. [S]).

Achtergrond: Wanneer gewerkt wordt bij een constante enzymconcentratie volgt de reactiesnelheid de Michaëlis-Mentenkinetiek. De enzymkinetische parameters K_M en V_{max} kunnen bepaald worden:

1) **Uit de Michaëlis-Mentengrafiek:** V_{max} is de snelheid waarbij het enzym volledig verzadigd is aan substraat, en is af te lezen op de Y-as. K_M is de substraatconcentratie waarbij 50% van V_{max} bereikt wordt, en wordt afgelezen op de X-as.

2) **Via lineaire transformaties** zoals **de Hanes-grafiek**: Voor een nauwkeuriger bepaling van V_{max} en K_m, worden linaire transformaties van de MM-vergelijking uitgevoerd. De Hanes-grafiek zet [S]/v uit in functie van [S]. De richtingscoëfficiënt van de best passende rechte door deze punten geeft ons $1/V_{max}$, terwijl het stuk op de Y-as gelijk is aan K_m/V_{max}. Zo kan ook K_m berekend worden



Reagentia:

- Stockoplossing orthonitrofenol-β-Dgalactopyranoside (*o*-NF-βDG) 3mmol/l in fosfaatbuffer + 1mmol/l $MgCl_2$ (zelf maken)
- 0.1mol/l fosfaatbuffer pH 7.5, met 1mmol/l $MgCl_2$ (zelf maken)
- Enzymstockoplossing +/- 50 U/l β-galactosidase (aanwezig in labo; de docent deelt de exacte enzymconc. mee)

Beknopt protocol:

- Leg een verdunningsreeks substraat (+/- tussen 0,10 en 3 mmol/l) aan uitgaande van de *o*-NF-βDG stockoplossing. Gebruik fosfaatbuffer+$MgCl_2$ als verdunningsvloeistof. Zorg dat je ong. 10 verdunningen maakt.
- Preïncubeer de oplossingen bij 37°C.
- Pipetteer in een wegwerpcuvet: 1.0 ml substraatoplossing (resp. uit de verschillende buizen) en 1.0 ml buffer
- Voeg als laatste per 1.0 ml enzymverdunning (ook bij 37°C) toe.

- Schud om met parafilm en plaats de cuvet direct na toevoegen van enzym in de spectrofotometer.
- Meet de extinctie elke minuut, gedurende 5 minuten. Bereken de uiteindelijke ΔE/min.

<u>Resultatenverwerking:</u>

- Bereken voor elke substraatsverdunning de reactiesnelheid v (mol *o*-NF/l.min) uit de gemeten ΔE/min. Gebruik de ε_M die je zelf bepaalde.

  ⓘ Werk in Excel: bereken ΔE/min door de functie "richting" te gebruiken.

- Bepaal de enzymkinetische parameters K_M en V_{max} aan de hand van de Michaëlis-Menten grafiek. Zet hiervoor v (mol $_o$-NF/min.l) uit in functie van [S] (M) en verbindt de punten met een lijn.

  ⓘ Géén trendlijn op goed geluk toevoegen in Excel! Excel kan geen hyperbole trendlijnen invoegen!

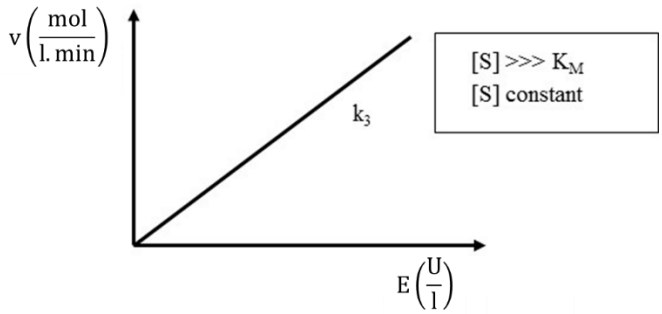
  Leid K_M en V_{max} **visueel** af uit deze grafiek.

- Bepaal de enzymkinetische parameters K_M en V_{max} aan de hand van de Lineweaver-Burke grafiek. Bereken hiervoor ook 1/v en zet deze waarde uit in functie van 1/[S]. Trek de best passende rechte door de punten, en leid K_M en V_{max} af.

  ⓘ Gebruik eenheden correct! Geef ze ook correct weer op de grafiek-assen!

6 Praktijkdeel 3: Experimentele bepaling van de enzymkinetische parameter k3 (v i.f.v. [E]).

Achtergrond: Bij een overmaat aan substraat (of $[S]>>>K_M$), is $v = V_{max} = k_3 \times [E_t]$. Onder deze omstandigheden is v dus recht evenredig met de totale enzymconcentratie.



De **reactiesnelheidsconstante k_3** kan dan bepaald worden als de rico van bovenstaande grafiek en wordt dan uitgedrukt **in mol/(min.U)**. Het is het aantal substraatmoleculen dat per unit enzym en per tijdseenheid wordt omgezet in product.

Reagentia:

- Stockoplossing orthonitrofenol-β-Dgalactopyranoside (*o*-NF-βDG) 8mmol/l in fosfaatbuffer met $MgCl_2$ (zelf bereiden)
- 0.1mol/l fosfaatbuffer pH 7.5, met 1mmol/l $MgCl_2$ (zelf bereiden)
- Enzymstockoplossing +/- 250 U/L β-galactosidase (aanwezig in het labo)
  ⓘ De exacte enzymconcentratie wordt door de lector in het labo opgegeven.
- 1 gelule Lactose-OK®

Beknopt protocol:

- Leg een verdunningsreeks enzym (+/- 10 tot 250 U/L) aan uitgaande van de enzymstockoplossing. Gebruik fosfaatbuffer+$MgCl_2$ als verdunningsvloeistof. Zorg dat je ong. 10 verdunningen maakt.
- Maak een gepaste verdunning/oplossing van de inhoud van de gelule Lactose-OK®.
- Preïncubeer de oplossingen bij 37°C.
- Pipetteer in een cuvet: 1.0 ml substraatoplossing en 1.0 ml buffer
- Voeg als laatste 1.0 ml enzymverdunning (resp. uit de verschillende buizen) toe. Schud om met parafilm en plaats ze direct in de spectrofotometer.
  ⓘ Voeg enzym pas als laatste toe, en start de metingen meteen.
- Meet de extinctie bij λ_{max} elke minuut, gedurende 5 minuten.

Resultatenverwerking:

- Bereken voor elke enzymverdunning de reactiesnelheid v (mol *o*-NF/l.min) uit de gemeten ΔE/min.
- Zet v (mol *o*-NF/min.l) uit in functie van $[E]_{cuvet}$ (U/l) en bereken uit de best passende rechte k_3 in mol/min.U.

- Bereken de hoeveelheid enzym in de gelule Lactose-OK®. Vergelijk met de theoretische inhoud. Kies zelf de eenheden waarin je de resultaten hiervan weergeeft.

7 Algemene richtlijnen

7.1 Werken met enzymen

Enzymactiviteit is sterk afhankelijk van de reactievoorwaarden. Daarom is een strikte controle van deze voorwaarden vereist om reproduceerbare resultaten te verkrijgen. Een eerste en uiterst belangrijke voorwaarde hierbij, is het gebruik van zeer zuiver startmateriaal (cuvetten, pipetten, proefbuizen, droge poeders, …). Het glaswerk (maatkolven, bekers, erlenmeyers, flesjes, proefbuizen, …) wordt daarom na gebruik grondig gereinigd met een milde zeepoplossing, gespoeld met kraantjeswater en finaal driemaal gewassen met gedeioniseerd water. Nadien wordt het glaswerk omgekeerd op het droogrek gehangen, of nog verder gedroogd in de oven.

7.2 Niet te missen opmerkingen

- Enzymatische reacties starten op het moment dat het enzym en substraat met elkaar in contact komen.
- Bij de start van de enzymatische reactie moeten alle reagentia, welke nodig zijn om de reactie op gang te brengen, vooraf op reactietemperatuur gebracht worden door ze afzonderlijk te pre-incuberen bij de juiste temperatuur. Dit gebeurt bij kamertemperatuur.
- Bij het samenbrengen van de reagentia moeten de componenten goed gemengd worden om een homogene reactie toe te laten.
- De reactie kan gestopt worden door toevoegen van stopoplossing, bv. een oplossing met een pH die sterk afwijkt van het pH-optimum.

7.3 Mogelijke foutenbronnen

- Onnauwkeurige verdunningen.
- Verkeerde verdunningsoplossing.
- Slechte pre-incubatie.
- Onvoldoende mengen van de reagentia bij het begin van de incubatie OF na toevoegen van de stopoplossing.
- Aanwezigheid van producten die met de reactie interfereren.
- Verkeerde aflezing van de extinctie OF foutief ingeven van de reactieparameters in het toestel.