

ביוכימיה - מעבדה

קטיון יוקה
Fe

איון פפא

ממפיס

דו"ח מעבדה

ביוכימיה - מעבדה מס' 4

קינטיקה של אינברטאז משמרים

מטרות הניסוי :

- א. הפקת האנזים.
- ב. קביעת הפעילות האנזימאטית של אינברטאז בשיטת סאמנר.
- ג. השפעת טמפרטורה על פעילות האנזים.

ביצוע הניסוי

חלק א – הפקת האנזים

בוצע כנדרש, ערכים נרשמו בפרק ריכוז התוצאות

חלק ב – קביעת הפעילות האנזימאטית של אינברטאז בשיטת סאמנר

טבלה מס. 1: עקומת כיוול לסוכר מחזר בשיטת סאמנר.

מס' מבחנה	תמיסה של סוכר מחזר 0.5mg/ml [ml]	תמיסה של גלוקוז 0.5mg/ml [ml]	תמיסה של פרוקטוז 0.5mg/ml [ml]	מים מזוקקים [ml]	ריכוז סוכר מחזר [mg/ml]	ריאגנט סאמנר [ml]	O.D. 550nm	מיהול תמיסה מרוכזת	O.D של תמיסה לאחר מיהול
1	0.0			2.0	0	2.0	0.000		
1'	0.0			2.0	0	2.0	0.030		
2	0.4			1.6	0.2	2.0	0.148		
2'	0.4			1.6	0.2	2.0	0.145		
3	0.8			1.2	0.4	2.0	0.162		
3'	0.8			1.2	0.4	2.0	0.174		
4	1.2			0.8	0.6	2.0	0.248		
4'	1.2			0.8	0.6	2.0	0.265		
5	1.6			0.4	0.8	2.0	0.312		
5'	1.6			0.4	0.8	2.0	0.328		
6	2.0			0.0	1	2.0	1.21	1: 2	0.657
6'	2.0			0.0	1	2.0	1.19	1: 2	0.622
7		0.6		1.4	0.3	2.0	0.550		
7'		0.6		1.4	0.3	2.0	0.637		
8		1.2		0.8	0.6	2.0	0.762		
8'		1.2		0.8	0.6	2.0	0.778		
9			0.6	1.4	0.3	2.0	1.248	1: 2	0.572
9'			0.6	1.4	0.3	2.0	1.256	1: 2	0.593
10			1.2	0.8	0.6	2.0	2.312	1: 5	0.600
10'			1.2	0.8	0.6	2.0	2.363	1: 5	0.635

בהתאם לשאלה בחוברת (עמ' 68 סעיף 6) : הגלוקוז אמור להיות הסוכר שייתן תגובה חיובית בריאקצית סאמנר . פרוקטוז איננו סוכר מחזר .

אך מכיוון שאנו ערכנו את ניסוי 3 , למבחנות עקומת הכיוול הוספנו NaOH , ולכן בתנאים בסיסיים מתרחשת טאוטומריה, נצפה לראות גם תגובה חיובית במבחנות הפרוקטוז.

חלק ג' – השפעת הטמפרטורה על מידת פעילות האנזים

הכנת מיהול אנזים 1: 200 :

הכנת מיהול האנזים לניסוי 3

דוגמת חישוב כמות אנזים במבחנה :

ריכוז האנזים מהמיהול 1: 10 : $4.545 \frac{mg}{ml}$

לכן יש למהול מיהול זה פי 20 כדי להגיע למיהול המבוקש (1: 200) !
חישוב הריכוז החדש :

$$C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2} = \frac{4.545 \frac{mg}{ml} \times 1_{ml}}{20_{ml}} = 0.227 \frac{mg}{ml}$$

נפח מים להשלמה – 19 מ"ל.

כמות אנזים במבחנות הריאקציה האנזימטית, בכל מבחנה הכנסנו 1 מ"ל של תמיסת אנזים, לכן – כמות האנזים במבחנה :

$$m = C \cdot V = C_2 = 0.227 \frac{mg}{ml} \times 1_{ml} = 0.227_{mg}$$

טבלה מס' 2: השפעת הטמפרטורה על מידת פעילות האנזים

O.D.	אנזים [מ"ל]	זמן אינקובציה	אנזים [מ"ל]	סובסטרט [מ"ל]	טמפ' מעשית [מעלות צלזיוס]	טמפ' רצויה [מעלות צלזיוס]	מס' מבחנה
0.205		10 דקות אינקובציה בטמפ' המתאימה	1	1	0	0	.1
0.195	1			1			.2
0.248			1	1	20	20	.3
0.223	1			1			.4
0.354			1	1	37	37	.5
0.254	1			1			.6
0.260			1	1	50	50	.7
0.197	1			1			.8
0.188			1	1	60	60	.9
0.197	1			1			.10
0.163			1	1	70	70	.11
0.197	1			1			.12
0.208			1	1	100	100	.13
0.222	1			1			.14
0.187						בקרה	.15

ריכוז התוצאות

חלק א – הפקת האנזים

ריכוז האנזים יחושב ע"פ משקל השמרים !

משקל השמרים – 0.5_g

נפח המים : 11_{ml}

ריכוז התמצית המקורית :

$$[E] = \frac{0.5_g}{11_{ml}} = \frac{500_{mg}}{11_{ml}} \cong 45.45_{mg/ml}$$

ריכוז המיהול 1:10 :

$$C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2} = \frac{45.45_{mg/ml} \times 1_{ml}}{10_{ml}} = 4.545_{mg/ml}$$

חלק ב – קביעת הפעילות האנזימאטית של אינברטאז בשיטת סאמנר

טבלה מס. 3: עקומת כיוול לסוכר מחזר ותגובת סאמנר עם חז סוכרים

O.D. ממוצע	O.D. 550 _{nm}	כמות סוכר מחזר [mg]	ריכוז סוכר מחזר [mg/ml]	תמיסה של סטנדרטית של פרוקטוז 0.5mg/ml [ml]	תמיסה של סטנדרטית של גלוקוז 0.5mg/ml [ml]	תמיסה של סוכר מחזר 0.5mg/ml [ml]	מס' מבחנה
0.015	0.000	0	0			0.0	1
	0.030	0				0.0	1'
0.147	0.148	0.4	0.2			0.4	2
	0.145					0.4	2'
0.168	0.162	0.8	0.4			0.8	3
	0.174					0.8	3'
0.257	0.248	1.2	0.6			1.2	4
	0.265					1.2	4'
0.320	0.312	1.6	0.8			1.6	5
	0.328					1.6	5'
0.640	0.657	2	1			2.0	6
	0.622					2.0	6'
0.594	0.550	0.6	0.3		0.6		7
	0.637				0.6		7'
0.700	0.762	1.2	0.6		1.2		8
	0.778				1.2		8'
0.583	0.572	0.6	0.3	0.6			9
	0.593			0.6			9'
0.618	0.600	1.2	0.6	1.2			10
	0.635			1.2			10'

- שוב נציין כי בגלל התנאים הבסיסיים חלה טאוטומריה ונצפה לראות תגובה חיובית גם במבחנות הפרוקטוז !
- כמויות הסוכר נקבעו בהתאם לנפח העבודה (2 מ"ל).

חלק ג' – השפעת הטמפרטורה על מידת פעילות האנזים

להלן טבלת התוצאות כנדרש בתדריך :

טבלה מס' 4: השפעת הטמפרטורה על מידת פעילות האנזים

$\Delta O.D.$	O.D. 550 _{nm}	אנזים [מ"ל]	אנזים [מ"ל]	טמפ' [מעלות צלזיוס]	מס' מבחנה
0.01	0.205		1	0	.1
	0.195	1			.2
0.025	0.248		1	20	.3
	0.223	1			.4
0.1	0.354		1	37	.5
	0.254	1			.6
0.053	0.260		1	50	.7
	0.197	1			.8
0.034	0.197		1	60	.9
	0.163	1			.10
0.009	0.197		1	70	.11
	0.188	1			.12
-0.014	0.208		1	100	.13
	0.222	1			.14
	0.187			בקרה	.15

ניתן לראות כי הפרש העכירות הגדול ביותר התרחש בטמפ' של 37°

חלק ב – קביעת הפעילות האנזימאטית של אינברטאז בשיטת סאמנר

חישבנו את כמות הסוכר בכל מבחנה וחישבנו ערכי בליעה ממוצעים לדופליקטים.

טבלה מס. 5: נתונים סופיים עבור עקומת כיוול לסוכר מחזור

O.D. ממוצע	כמות סוכר מחזור [mg]	ריכוז סוכר מחזור [mg/ml]	תמיסה סטנדרטית של סוכר מחזור 0.5mg/ml [ml]	מס' מבחנה
0.015	0	0	0.0	1
	0		0.0	1'
0.147	0.4	0.2	0.4	2
			0.4	2'
0.168	0.8	0.4	0.8	3
			0.8	3'
0.257	1.2	0.6	1.2	4
			1.2	4'
0.320	1.6	0.8	1.6	5
			1.6	5'
0.640	2	1	2.0	6
			2.0	6'
			תמיסה סטנדרטית של גלוקוז 0.5mg/ml [ml]	
0.594	0.6	0.3	0.6	7
			0.6	7'
0.700	1.2	0.6	1.2	8
			1.2	8'
			תמיסה סטנדרטית של פרוקטוז 0.5mg/ml [ml]	
0.583	0.6	0.3	0.6	9
			0.6	9'
0.618	1.2	0.6	1.2	10
			1.2	10'

דוגמת חישוב לכמות סוכר :

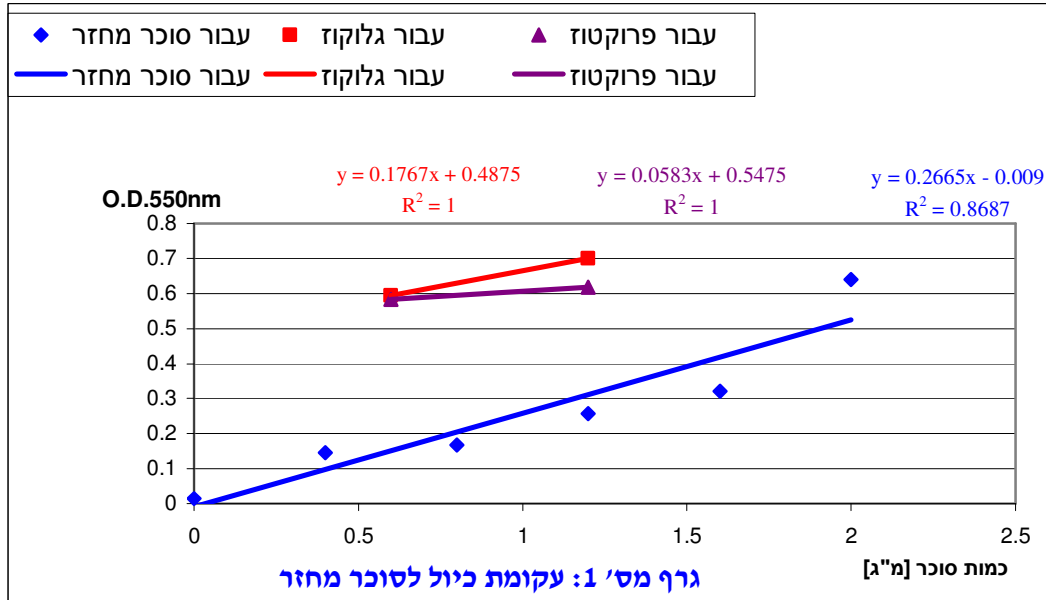
$$C_2 = 0.2 \frac{mg}{ml}$$

נפח כולל במבחנה – 2 מ"ל

כמות אנזים במבחנות הריאקציה האנזימטית, בכל מבחנה הכנסנו 1 מ"ל של תמיסת אנזים, לכן – כמות האנזים במבחנה :

$$m = C \cdot V = C_2 = 0.2 \frac{mg}{ml} \times 2_{ml} = 0.4_{mg}$$

נשרטט גרף של עכירות התמיסה כנגד כמות הסוכר המחזר, הגלוקוז, והפרוקטוז.
להלן הגרף שמתקבל :



חלק ג' – השפעת הטמפרטורה על מידת פעילות האנזים

מגרף מס' 1 נוכל לחשב את כמות הסוכר שהופקה ע"י האנזים ע"י שימוש במשוואות קווי המגמה, ובנתוני $\Delta O.D.$ של טבלה מס' 4, כאשר $\Delta O.D.$ מציין את ההפרש בעכירות בין מבחנות שבהם עבר האנזים האינקובציה לבין המבחנות בהן לא עבר האנזים אינקובציה. , ערך זה מציין למעשה את מידת פעילות האנזים, ערך שמתקבל שלילי מוגדר – כחוסר פעילות, דהיינו אפס.

טבלה מס' 6: חישובי מהירות ריאקציה ופעילות ספציפית אנזימטית

פעילות ספציפית (SA) [מ"ג סוכר מחזר למ"ג שמרים] $\cdot 10^{-5}$	מהירות ריאקציה [כמות מ"ג סוכר מחזר בדקה]	כמות סוכר מחזר מעקומת הכיול [מ"ג]	$\Delta O.D.$	טמפי הדגרה [מעלות צלזיוס]	מס"ד
1.678	0.0084	0.084	0.01	0	.1
3.002	0.0150	0.150	0.025	20	.2
9.625	0.0481	0.481	0.1	37	.3
5.475	0.0274	0.274	0.053	50	.4
3.797	0.0190	0.190	0.034	60	.5
1.589	0.0079	0.079	0.009	70	.6
0	0	0	-0.02	100	.7

דוגמת חישוב (עבור טמפי 0°) :

$$y = 0.2665 \cdot x - 0.009$$

משוואת הגרף שהתקבלה עבור סוכר מחזר :

$$m_{sugar [mg]} = \frac{[\Delta O.D. + 0.009]}{0.2665}$$

לכן נסדר את המשוואה ונוסחת העבודה תהיה :

$$m_{sugar[mg]} = \frac{[\Delta O.D. + 0.009]}{0.2665} = \frac{[0.01 + 0.009]}{0.2665} = 0.084_{mg} \quad \text{ועבור טמפי' } 0^{\circ}C :$$

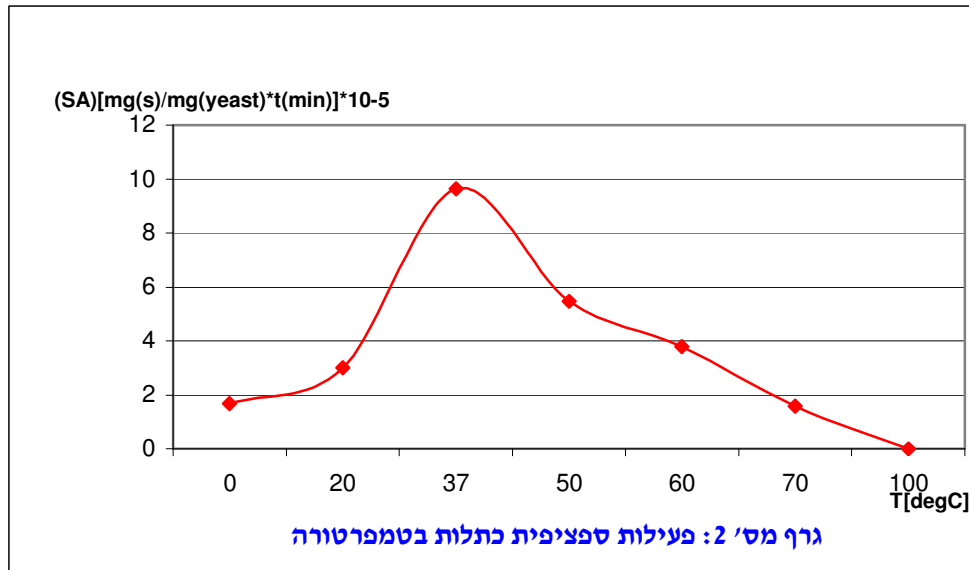
כלומר בטמפי' הזו נוצרו 0.084 מ"ג ב-10 דקות.

$$v = \frac{[m_{sugar}]_{mg}}{t_{[min]}} = \frac{0.084_{mg}}{10_{min}} = 0.0084_{mg/min} \quad \text{מהירות הריאקציה} :$$

פעילות ספציפית (SA) :

$$[SA] = \frac{m_{sugar}}{t_{min} \cdot m_{Yeast}} = \frac{0.084_{m_{sugar}}}{10_{min} \cdot 500_{m_{Yeast}}} = 1.68 \cdot 10^{-5} \frac{m_{sugar}}{m_{Yeast}}$$

נשרטט גרף של הפעילות הספציפית של האנזים בתלות בטמפרטורה [ציר ה-Y בגרף הוא בפקטור של 10^{-5} לצורך נוחות מתמטית], להלן הגרף שהתקבל :



אנו רואים כי בטווח הטמפרטורה של 20-37 מעלות צלזיוס, לגרף יש צורה ליניארית, נחשב את השיפוע בתחום זה כאשר שיפוע זה יהיה למעשה קצב הריאקציה :

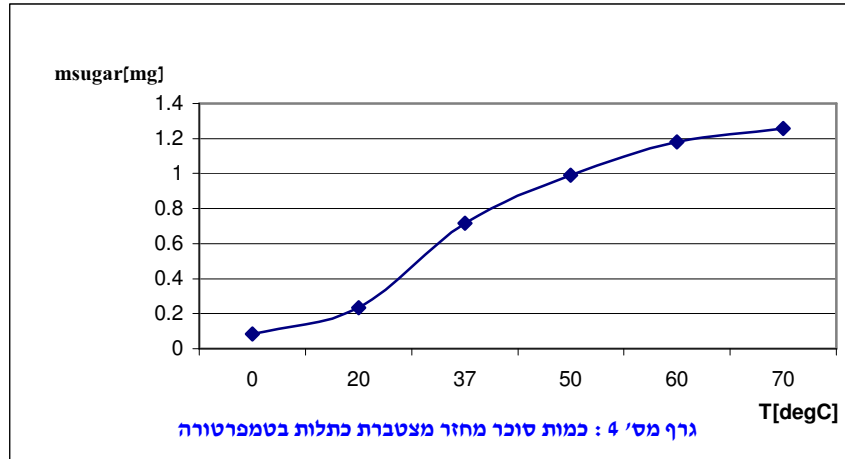
$$K = \frac{SA_{37} - SA_{20}}{37^{\circ}C - 20^{\circ}C} = \frac{9.625 - 3.002}{37 - 20} \cdot 10^{-5} \cong 4 \cdot 10^{-6} \frac{mg_{sugar}}{mg_{Yeast} \cdot min \cdot T^{\circ}C}$$

נחשב כמות סוכר מצטברת עבור טווחי הטמפרטורה השונים :

טבלה מס' 7: כמות סוכר מחזור מצטברת כתלות בטמפרטורה

כמות סוכר מצטברת [מ"ג]	טווח טמפרטורה [מעלות צלזיוס]
0.084	0-20
0.234	20-37
0.715	37-50
0.989	50-60
1.179	60-70
1.258	70-100

נשרטט גרף ע"פ טבלה מס' 7 :

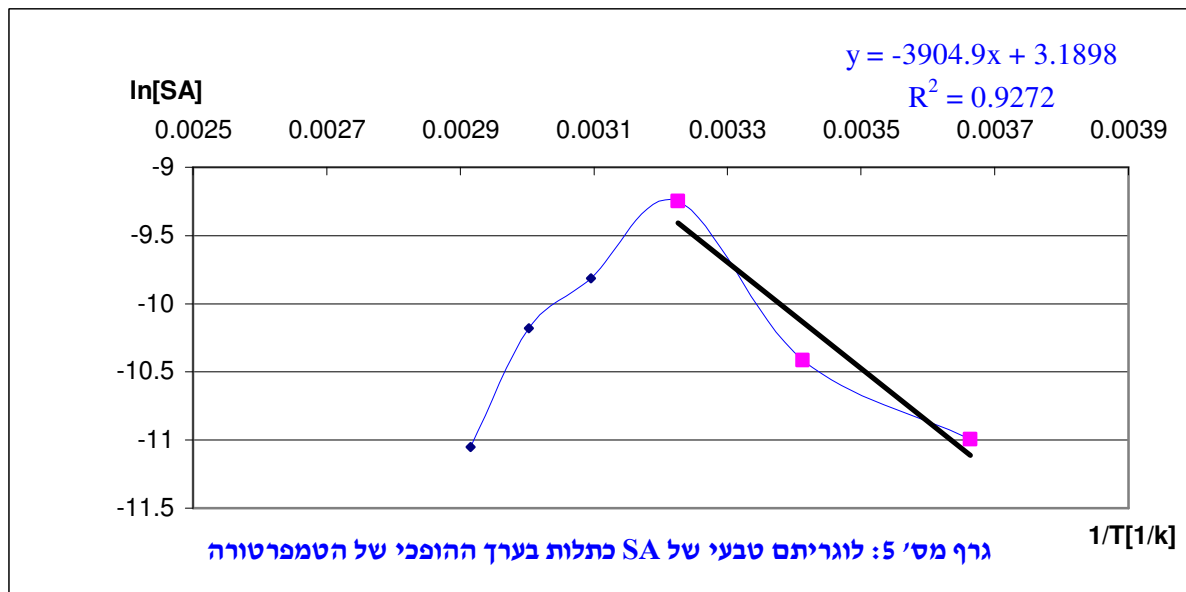


ניכר בבירור כי שיפוע הגרף המקסימאלי, כלומר קצב פעילות האנזים (פירוק הסוכר), הוא בטמפ' של 37°C נבצע מניפולציה מתמטית לגרף כמתואר בתדריך [כאשר נתעלם מהטמפ' 100°C שכן אין לה משמעות מתמטית וגם לא ביוכימית]:

טבלה מס' 8: חישוב ערכים לוגריתמיים לצורך חישוב אנרגיית שפעול

Ln[SA]	פעילות ספציפית (SA) $\cdot 10^{-5}$ [מ"ג סוכר מחזור למ"ג שמים]	$T[^{\circ}\text{K}]^{-1}$	$T[^{\circ}\text{K}]$	מהירות ראקציה [כמות מ"ג סוכר מחזור בדקה]	טמפ' הדגרה [מעלות צלזיוס]	מס"ד
-4.78089	1.678	0.0037	273	0.0084	0	.8
-4.19897	3.002	0.0034	293	0.0150	20	.9
-3.03398	9.625	0.0032	310	0.0481	37	.10
-3.5982	5.475	0.0031	323	0.0274	50	.11
-3.96413	3.797	0.0030	333	0.0190	60	.12
-4.83496	1.589	0.0029	343	0.0079	70	.13
	0	0.0027	373	0	100	.14

נשרטט גרף של Ln[SA] כתלות ב- $T[^{\circ}\text{K}]^{-1}$ כדי לחשב את אנרגיית האקטיבציה כאשר הערכים שמעניינים אותנו הן הערכים בטמפרטורות של $0^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$ שם יש ליניאריות שמתנהגת ע"פ כלל ארהניוס, שכן בטמפ' גבוהות יותר האנזים עובר דה-נטורציה. להלן הגרף שהתקבל:



$$K = Ae^{\frac{-\Delta G}{RT}} \quad \ln k = \frac{-\Delta G}{RT} + \ln A \quad \text{נוסחאות העבודה :}$$

חישוב אנרגיית האקטיבציה :

נציב נקי' מן הגרף (בטמפ' 37 מעלות צלזיוס) ונחלץ את האנרגיה :

$$\ln k = \frac{-\Delta G^{++}}{RT} + \ln A$$

$$-3.03398 = \frac{-\Delta G^{++}}{RT} + 3.1898$$

$$-\frac{\Delta G^{++}}{RT} = 6.22378$$

$$\Delta G^{++} = -6.22378 \cdot RT = -6.22378 \times 1.982 \times 310 \cong -3824_j \approx -3.8_{KJ}$$

אנרגיה חופשית מהספרות :

hydrolysis of sucrose	Sucrose + H ₂ O --> glucose + fructose	$\Delta G^{++} = -7.0 \text{ Kcal} = -1.673 \text{ KJ}$
-----------------------	---	---

חישוב אחוז סטייה :

$$\left| \frac{-3.8 - (-1.673)}{-1.673} \right| \times 100 \cong 127\%$$

התקבלה סטייה גדולה, אך לנוכח תנאי הניסוי, טעויות מיהול אפשריות והעובדה כי בניסוי שהשתמשנו בנייר פראפילם במקום בגולות שמחק לנו את הרישום מהמבחנות, דבר שיצר בלבול רב, עצם העובדה כי קיבלנו ערך אנרגיית שפעול שהוא **באותו סדר גודל של הערך מהספרות**, מוכיח כי הגענו לערך אמפירי מקורב של אנרגיית השפעול של הידרוליזת סוכרוז ע"י אינברטאז.

דיון ומסקנות

עקומת כיוול לסוכר מחזר

- ניתן לראות כי העקומה עבור סוכר מחזר ועבור גלוקוז הם בעלות שיפוע דומה. שיפוע עבור פרוקטוז שונה, שכן העקום הפוי היה אמור להיות מקביל לציר האופקי שכן פרוקטוז איננו מחזר ולכן לא היה מגיב עם ראגנט סאמנר, אך מכיוון שעשינו את ניסוי 3 והוספנו בסיס, התרחשה טאוטומריה, והפרוקטוז הותמר לסוכר מחזר וכן התרחשה תגובה, אך בשיעור קטן יותר מהגלוקוז והסוכר המחזר.
- העקומות ליניאריות, רק עקומת הסוכר המחזר מאבדת את הליניאריות מעבר לכמות סוכר של 1.6 מ"ג, ככל הנראה התמיסה עכורה מדי וקריאת בליעת האור כבר איננה אינדיקציה לצורך עקומת כיוול.
- כדי לקבוע את רמת הדיוק נוכל להשתמש בפונקציה ה-LINEST של הגיליון האלקטרוני עבור קן המגמה של עקומת הכיוול של הסוכר המחזר :
להלן התוצאות :

נקודת חיתוך	שיפוע	
-0.0090	0.2665	ערך
0.0627	0.0518	שגיאה

כלומר הדיוק בקביעת העקומה הוא $\Delta = (0.27 \pm 0.05)$

$$\frac{0.05}{0.27} \cdot 100 = 18\%$$

שגיאה באחוזים :

אם היינו משמיטים את הנקודה של שבה כמות הסוכר היא 2 מ"ג, היינו מקבלים תוצאה טובה יותר.

בדיקת פעילות אנזים כתלות בגורמים קינטיים שונים

1. מבחנה מס' 15 שימשה כבקרה, בליעת האור הייתה נמוכה מאוד שכן לא הייתה בה פעילות אנזימטית.
2. כמות הסוכר ההתחלתית היא בעודף, זה איננו מקרה שכן אנו צריכים למהול ריכוז התחלתי זה פי 200, ומרווח הטעויות כאן די גדול, כך שאם כמות הסוכר ההתחלתי לא הייתה מעט בעודף, סביר להניח שלא היינו מבחינים בשינויים, עוד פרמטר לעודף הסוכר הוא לעודד את תהליך הפירוק לפעול ע"פ עקרון לה שטליה. שכן אינברטאז רק מהווה זרז לתהליך.
3. ריכוז האנזים מתאים לתהליך, שכן אכן קיבלנו תוצאות פעילות אנזימטית בדיוק כפי שציפינו, הפעילות האנזימטית הייתה נמוכה בטמפ' קרות, מקסימאלית בטמפ' הגוף, ודעכה ככל שהטמפ' עלתה מעבר לכך, ובטמפ' רתיחה, לא הובחנה פעילות אנזימטית.

השפעת טמפרטורה על פעילות האנזים

1. צורת הגרף של הפעילות האנזימאטית תואמת את הציפיות, ואת התיאוריה, כאשר הפעילות המקסי' היא בטווח טמפ' הגוף, טמפ' מעבר לכך מעידות על פעילות נמוכה יותר, וטמפ' גבוהות מראות על חוסר פעילות כתוצאה מדה-נטורציה.
2. טמפ' מקסי' עבור פעילות אנזים - 37°C
3. טמפ' מיני' - 100°C
4. גרף הצטברות הסוכר מראה כי הסוכר ממשיך להצטבר ככל שהטמפ' עולה, קצב הצטברות עולה ומגיע לשיא בתחום טמפ' של 37°C מעבר לטמפ' זו הקצב הולך ודועך.
5. כאמור, כאשר קצב היווצרות התוצר הוא מקסימאלי, זו הנקודה בה נמצאת הטמפ' האופטימאלית של האנזים.
- 6-7. תשובות לחלק זה ניתנו בריכוז התוצאות.

קיוכיאיה - מצבקה

הפקה

אביב

אינהפא

משפ"ס

דו"ח מצבקה

מטרות הניסוי

1. הפקה וניקוי אינברטאז משמרים, תוך שימוש בשיטות הבאות:
 - א. ניקוי ראשוני ע"י שיקוע האנזים בן ריכוזי 20-60% ריווי אמוניום סולפט.
 - ב. הפרדת אינברטאז מאמוניום סולפט ע"י כרומוטוגרפיית מסננת מולקולארית עם ספקס G-25.
2. השוואה בין יעילות שיטות הפרדה אלו.

ריכוז תוצאות**טבלה מס' 1: הפקת אינברטאז משמרים**

כמות השמרים [מ"ג]	נפח המים [מ"ל]	ריכוז שמרים בתמיסה [mg/ml]	נפח התמצית [מ"ל]	ריכוז שמרים בתמצית [mg/ml]
2000	10	200	5.4	370.4

משקל השמרים שנמדד:

$$2.0000 \text{ g} = 2000 \text{ mg}$$

חישוב ריכוז השמרים בתמיסה:

$$\frac{2000 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = 200 \text{ mg/ml}$$

הפרדת התערובת המכילה אמוניום סולפט ואנזים

פרקצייה מספר 18 בהפרדה בכרומוטוגרפיית מסננת מולקולארית הפסקנו את ההפרדה בשל הופעת אורתו-ניטרופנול (צבע צהוב).

בדיקות ספקטופוטומטריות**טבלה מס' 2: קביעת ריכוז חלבון בפרקציות שונות בעזרת שיטת בראדפורד**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	פרקצייה 1	פרקצייה 2	פרקצייה 3	פרקצייה 4	פרקצייה 5	פרקצייה 6	פרקצייה 7	פרקצייה 8	פרקצייה 9	פרקצייה 10	BSA	בופר אלוציה
F	פרקצייה 11	פרקצייה 12	פרקצייה 13	פרקצייה 14	פרקצייה 15	פרקצייה 16	פרקצייה 17	פרקצייה 18	תמיסה מקורית 60%	תמיסת אנזים 60%	BSA	בופר אלוציה

טבלה מס' 3: ערכי ה-O.D של הפרקציות השונות בשיטת בראדפורד

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	0.101	0.100	1.345	0.585	0.111	0.106	0.110	0.118	0.124	0.108	0.121	0.108
F	0.119	0.120	0.120	0.119	0.122	0.126	0.136	0.126	0.119	0.127	0.127	0.119

ריכוז החלבון בשיטת בראדפורד בוצע בעזרת מכשיר Eliza. הפרקציות המודגשות בצהוב הן אלו שנבחרו ע"י המרצה להמשך עבודה.

קביעת פעילות אנזימתית של אינברטאז בשיטת סאמנר

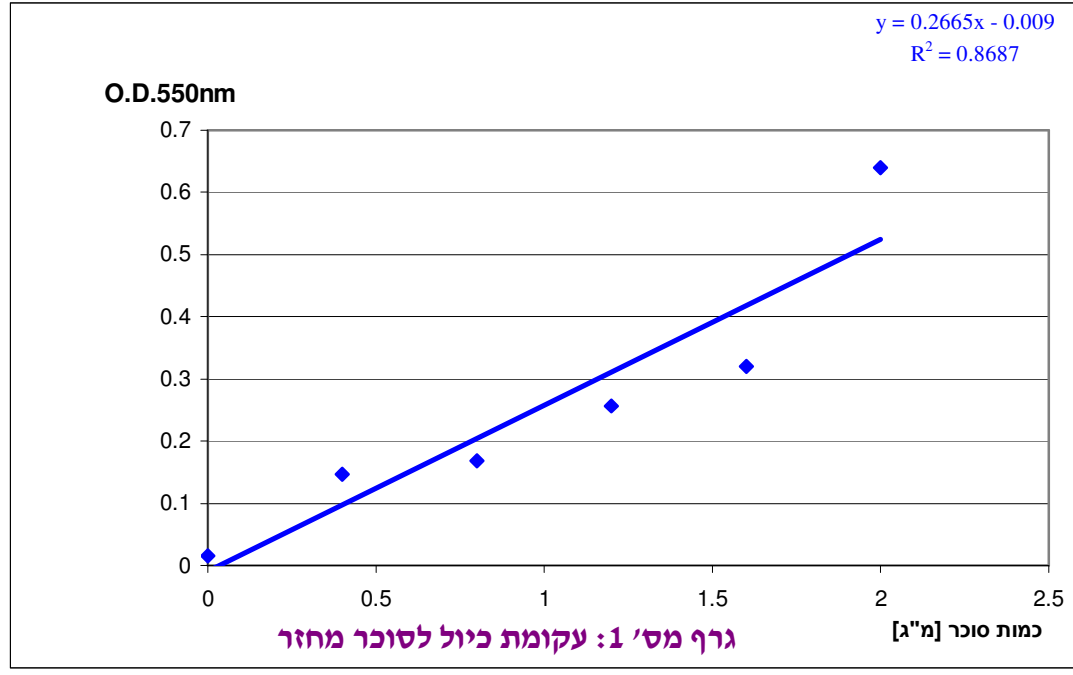
טבלה מס 4: קביעת פעילות אינברטאז ע"י הידרוליזה אנזימתית של סוכרוז

O.D [540nm] סופי	O.D [540nm] (קריאה שנייה)	מיהול לפני קריאה שנייה	O.D [540nm]	סובסטרט [מ"ל]	אנזים [מ"ל]	מים מזוקקים [מ"ל]	אפיון תכולת המבחנה	מס' מבחנה
			0.000			2	ביקורת ריאגנטים	.1
			0.008		0.1	1.9	ביקורת אנזים תמצית מקורית	.2
			0.003	1	0	1	בקורת סובסטרט	.3
11.575	0.463	1: 25	גדול מ-2	1	0.1	0.9	תמיסת אנזים מקורית	.4
1.156	0.289	1: 4	גדול מ-2	1	0.5	0.5	תמיסת אנזים לאחר שיקוע ב-60% AS	.5
			0.242	1	1		פרקצייה 1	.6
			0.495	1	1		פרקצייה 2	.7
26.6	0.665	1: 40	גדול מ-2	1	1		פרקצייה 3	.8
10.14	0.507	1: 20	גדול מ-2	1	1		פרקצייה 4	.9
			0.419	1		1	סוכר מחזר 1	.10
			0.586	2			סוכר מחזר 2	.11

הערות :

- * מבחנות 2 ו-3 לא הוכנו, נעשה שימוש בגרף כיול מוכן ממעבדה קודמת.
- * במבחנות בהן קריאת ה-O.D הייתה גבוהה מ-2, בוצע מיהול כנדרש, ובוצעה קריאה חוזרת.
- * בתדריך המעבדה לא כתוב כמה מ"ל ריאגנט סאמנר יש להוסיף, ולכן שמענו לעצת הזוג שלידינו (אורן ושרית) ושמונו 1 מ"ל ריאגנט סאמנר במקום 2 מ"ל, אך מכיוון שמדובר בפרופורציה למידת העכירות, לא ציפינו לקבל תגובות שונות מהצפוי ובתמיכת המרצה כמובן !

להלן גרף עקומת הכיול שהוכן בהתאם למעבדה מס' 4 :



סיכום התוצאות

טבלה מס' 5: סיכום התוצאות

ניצולת הפקת אנזים	ניקוי יעילות	ספציפיות פעילות [enzyme-units protein _{mg}]	כמות כלל חלבון בדגימה [mg]	ריכוז כלל חלבון בדגימה [mg/ml]	כמות אנזים יחידות	ריכוז אנזים יחידות למייל	סוכרוז שהתפרק [μmole]	ריכוז סוכר מחזר [mg/mole]	התמיסות הנבדקות	מס' מבחנה
		6.622	1.920	0.960	12.710	6.355	127.097	21.734	תמיסת אנזים מקורית	
105.900	0.095	0.630	2.032	1.020	1.280	0.640	12.782	2.186	תמיסת אנזים לאחר שיקוע ב-60% AS	
84.034	0.026	0.171	1.613	0.810	0.276	0.138	2.754	0.471	פרקצייה 1	2
1130.252	0.004	0.026	21.700	10.847	0.553	0.277	5.530	0.946	פרקצייה 2	3
491.597	0.467	3.094	9.436	4.718	29.195	14.597	291.948	49.923	פרקצייה 3	4
93.280	0.940	6.220	1.800	0.895	11.135	5.568	111.353	19.041	פרקצייה 4	5

כל דוגמאות החישוב עבור פרקצייה מס' 1 :

1. ריכוז התמיסה הסטנדרטית של BSA בה השתמשנו הוא 1 mg/ml חישוב ריכוז החלבון בתמיסות הנבדקות יעשה לפי הנוסחה :

$$[protein] = \frac{O.D._{(sample)}}{O.D._{(standard)}} \cdot [B.S.A.]$$

[Protein] מציין את ריכוז החלבון בדגימה

דוגמה לחישוב ריכוז חלבון :

$$[protein] = \frac{0.100}{0.124} \cdot 1 \frac{mg}{ml} = 0.806 \frac{mg}{ml}$$

• הערך 0.124 הינו ממוצע קריאות ה-O.D בין שתי דגימות הסטנדרט (טבלה מס' 3).

נפח הדגימה הינו 2 מ"ל בכל המבחנות לכן חישוב כמות החלבון בתמיסות הנבדקות יבוצע ע"י מכפלת הריכוז בנפח הדגימה.

$$0.806_{\text{mg/ml}} \times 2_{\text{ml}} = 1.612_{\text{mg}} \quad \text{דוגמה לחישוב כמות חלבון :}$$

חישוב כמות הסוכר המחזר בתמיסות הנבדקות תחושב בעזרת גרף הכיול.
נוסחת קו המגמה הינה : $O.D = 0.2665 \cdot W_{\text{sugar}} - 0.009$

$$W_{\text{sugar}} = \frac{O.D. + 0.009}{0.2665} \quad \text{כמות הסוכר המחזר במ"ג :}$$

בחילוק התוצאה ב- 2ml נקבל את הריכוז.

במקרה בו היינו צריכים למהול את התמיסה, נכפול את ערך ה-O.D בפקטור המיהול.
דוגמה לחישוב ריכוז הסוכר המחזר :

$$W_{\text{sugar}} = \frac{0.242 + 0.009}{0.2665} \cong 0.942_{\text{mg}}$$

ריכוז הסוכר :

$$[\text{sugar}] = \frac{0.942_{\text{mg}}}{2_{\text{ml}}} = 0.471_{\text{mg/ml}}$$

כמות הסוכר המחזר שהשתחרר בריאקציה ביחס ישר לכמות הסוכרוז שהתפרקה.

כדי לחשב את כמות הסוכרוז במיקרו-מול, נשתמש בנתון כי :

$$M.W._{(\text{sucrose})} = 342_{\text{g/mole}} = 342000_{\text{mg/mole}} = 0.342_{\text{mg}/\mu\text{mole}}$$

דוגמה לחישוב כמות הסוכרוז במיקרו-מול :

$$\frac{0.942_{\text{mg}}}{0.342_{\text{mg}/\mu\text{mole}}} = 2.754_{\mu\text{mole}}$$

חישוב יחידות אנזים - כמות האנזים המפרקת מיקרו-מול סוכרוז בדקה בתנאי הריאקציה :

$$\frac{2.754_{\mu\text{mol}}}{10_{\text{min}}} = 0.2754_{\mu\text{mol}/\text{min}}$$

חישוב ריכוז יחידות האנזים - נחלק בנפח הדגימה - 2 מ"ל :

$$\frac{0.2754_{\mu\text{mol}/\text{min}}}{2_{\text{ml}}} = 0.1377_{\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}}$$

חישוב פעילות ספציפית - חילוק כמות האנזים בכמות החלבון :

$$\frac{0.2754_{\text{Enzyme units}}}{1.612_{\text{mg protein}}} \cong 0.171_{\text{Enzyme units}/\text{mg protein}}$$

חישוב מידת הניקוי - לפי הנוסחה : מידת הניקוי = $\frac{\text{פעילות ספציפית בפרקציה}}{\text{פעילות ספציפית בתמצית}}$

$$\frac{0.1707}{6.6219} = 0.0258$$

חישוב הניצולת - לפי הנוסחה : ניצולת = $\frac{\text{כמות חלבון בפרקציה}}{\text{כמות חלבון בתמצית}} \times 100$

$$\frac{1.6219_{\text{mg}}}{1.9194_{\text{mg}}} \times 100 \cong 84.5\%$$

דיון ומסקנות

- מהטבלה ניתן לראות כי מידת הניקוי הגבוהה ביותר התקבלה בפרקצייה מס' 6, בשיטת ההפרדה בעזרת כרומטוגרפיית מסננת מולקולארית מידת ניקוי נמוכה ביותר התקבלה לאחר שיקוע ב-60% אמוניום סולפט מכאן ששיטת ההפרדה בעזרת כרומטוגרפיית מסננת מולקולארית יעילה יותר לניקוי האנזים.
- תגובת השיקוע אפקטיבית יותר בבידוד האנזים אינברטאז משאר החלבונים בתמיסה ולא למטרת קבלתו בצורה נקייה.
- כמו כן ניתן לראות בטבלה מס' 5 כי פרקצייה מס' 5 היא בעלת הפעילות הספציפית, יעילות הניקוי והניצולת בין הגבוהות ביותר. פרקצייה זו מכילה את האנזים בצורתו האפקטיבית והנקייה ביותר מבין כל הפרקציות שהתקבלו.
- ניצולת מקסימאלית התקבלה בשיטת השיקוע באמוניום סולפט – דבר זה אינו מפתיע, כי בדגימה זו לא כל החלבון בפרקצייה הוא האנזים אינברטאז.

סיכום

- ניתן להפיק אנזים אינברטאז משמרים ותוך כדי כך (גם לשמור על פעילותו) ע"י שימוש במס' שיטות שבחלקן השתמשנו בניסוי זה .
- עם זאת, מתוך התוצאות ניתן לראות, קבלת ערכים לא מדויקים ו/או שגויים (למשל : ניצולות גבוהות מ-100%), ככל הנראה מקור שגיאות אלו במכלול של גורמים, שביניהם, הוספת 1 מ"ל ריאגנט סאמנר ולא 2 מ"ל עקב טעות שצוינה קודם, אי עמידה בזמנים בהוספת האנזים למבחנות אלה וכד' .
- שיטה יעילה לבידוד חלבונים – **שיקוע באמוניום סולפט**
- שיטה יעילה לניקוי חלבון ספציפי- **כרומטוגרפיית מסננת מולקולארית**

קיוכיאיה - מצבקה מס' 6

השם עת פייכאן

הסאבסאקט

אנאכאן אעב

על העעילאן

על פייבסין

קו"ח מצבקה

מעבדה מס' 6

נושא המעבדה:

השפעת ריכוז הסובסטרט ונוכחות מעכב על הפעילות של טריפסין

מטרות הניסוי

1. השפעת ריכוז הסובסטרט על פעילות האנזים טריפסין וחישוב ערכי V_{max} ו- K_m .
2. השפעת ריכוזים שונים של הסובסטרט בנוכחות המעכב PABA על מהירות הריאקציה, קביעת אופי העיכוב וחישוב K_i .

ריכוז תוצאות

טבלה מס' 1: השפעת ריכוז הסובסטרט על פעילות הטרפסין

O.D. 410nm	חומצת חומץ 30 % (ml)		טריפסין 300µg/ml (ml)	HCl 0.002 M (ml)		בופר טריס pH 7.8 0.14M (ml)	נפח סובסטרט (ml)	ריכוז LPNA (M)	מס' מבחנה
0.235	0.5	20 דקות אינקובציה ב- 30°C	0.3	-	5 דקות פרהאינקובציה ב- 30°C	2	0.05	0.002	.1
0.205	0.5		0.3	-		2	0.05	0.002	.2
0.000	0.5		-	0.3		2	0.05	0.002	.3
0.568	0.5		0.3	-		2	0.05	0.005	.4
0.873	0.5		0.3	-		2	0.05	0.005	.5
0.016	0.5		-	0.3		2	0.05	0.005	.6
1.068	0.5		0.3	-		2	0.05	0.01	.7
1.094	0.5		0.3	-		2	0.05	0.01	.8
0.003	0.5		-	0.3		2	0.05	0.01	.9
1.631	0.5		0.3	-		2	0.05	0.015	.10
1.565	0.5		0.3	-		2	0.05	0.015	.11
0.005	0.5		-	0.3		2	0.05	0.015	.12
1.609	0.5		0.3	-		2	0.05	0.02	.13
1.460	0.5		0.3	-		2	0.05	0.02	.14
0.006	0.5		-	0.3		2	0.05	0.02	.15

טבלה מס' 2: - השפעת המעכב על פעילות הטרופסין

O.D. 410nm	חומצת חומץ 30% (ml)	20 דקות אינקובציה ב- 30°C	טרופסין 300µg/ ml (ml)	HCl 0.002 M (ml)	5 דקות פרהאינקובציה ב- 30°C	PABN 0.001 M (ml)	נפח סובסטרט (ml)	ריכוז LPNA (M)	מס' מבחנה
0.241	0.5		0.3	-		2	0.05	0.002	.16
0.263	0.5	0.3	-	2	0.05	0.002	.17		
0.014	0.5	-	0.3	2	0.05	0.002	.18		
0.222	0.5	0.3	-	2	0.05	0.005	.19		
0.293	0.5	0.3	-	2	0.05	0.005	.20		
0.002	0.5	-	0.3	2	0.05	0.005	.21		
0.333	0.5	0.3	-	2	0.05	0.01	.22		
0.293	0.5	0.3	-	2	0.05	0.01	.23		
0.005	0.5	-	0.3	2	0.05	0.01	.24		
0.350	0.5	0.3	-	2	0.05	0.015	.25		
0.332	0.5	0.3	-	2	0.05	0.015	.26		
0.008	0.5	-	0.3	2	0.05	0.015	.27		
0.411	0.5	0.3	-	2	0.05	0.02	.28		
0.527	0.5	0.3	-	2	0.05	0.02	.29		
0.008	0.5	-	0.3	2	0.05	0.02	.30		

טבלה מס' 3: - ריכוז התוצאות

SA/[S] (liter/mgE·min)	1/SA (mgE·min/ µmol)	1/[S] (1/mM)	SA (µmol/mgE·min)	[S] (mM)	ΔO.D. _{410nm}	מס' מבחנה
0.819	28.683	23.500	0.035	0.043	0.235	1
0.715	32.880	23.500	0.030	0.043	0.205	2
0.770	12.211	9.400	0.082	0.106	0.552	4
1.195	7.865	9.400	0.127	0.106	0.857	5
0.743	6.329	4.700	0.158	0.213	1.065	7
0.761	6.178	4.700	0.162	0.213	1.091	8
0.756	4.145	3.133	0.241	0.319	1.626	10
0.725	4.321	3.133	0.231	0.319	1.56	11
0.559	4.205	2.350	0.238	0.426	1.603	13
0.507	4.636	2.350	0.216	0.426	1.454	14
0.791	29.694	23.500	0.034	0.043	0.227	16
0.868	27.070	23.500	0.037	0.043	0.249	17
0.307	30.638	9.400	0.033	0.106	0.22	19
0.406	23.163	9.400	0.043	0.106	0.291	20
0.229	20.550	4.700	0.049	0.213	0.328	22
0.201	23.404	4.700	0.043	0.213	0.288	23
0.159	19.709	3.133	0.051	0.319	0.342	25
0.151	20.804	3.133	0.048	0.319	0.324	26
0.141	16.726	2.350	0.060	0.426	0.403	28
0.181	12.987	2.350	0.077	0.426	0.519	29

ΔO.D._{410nm} - ההפרש בין המבחנה הנבדקת ומבחנת הבקרה שלה.

טבלה מס' 4: ריכוז ממוצע קריאות דופליקטים לצורך הצגה גראפית

SA/S (liter/mgE·min)	1/SA (mgE·min/ μmol)	1/[S] (1/mM)	SA (μmol/mgE·min)	S (mM)	ΔO.D _{410nm} ממוצע	ΔO.D _{410nm}	מס' מבחנה
0.653	30.638	23.500	0.033	0.043	0.220	0.235	1
						0.205	2
0.261	9.568	9.400	0.105	0.106	0.705	0.552	4
						0.857	5
0.131	6.253	4.700	0.160	0.213	1.078	1.065	7
						1.091	8
0.087	4.231	3.133	0.236	0.319	1.593	1.626	10
						1.56	11
0.065	4.410	2.350	0.227	0.426	1.529	1.603	13
						1.454	14
0.653	28.321	23.500	0.035	0.043	0.238	0.227	16
						0.249	17
0.261	26.381	9.400	0.038	0.106	0.256	0.22	19
						0.291	20
0.131	21.884	4.700	0.046	0.213	0.308	0.328	22
						0.288	23
0.087	20.242	3.133	0.049	0.319	0.333	0.342	25
						0.324	26
0.065	14.621	2.350	0.068	0.426	0.461	0.403	28
						0.519	29

ΔO.D_{410nm} - ההפרש בין המבחנה הנבדקת ומבחנת הבקרה שלה.

• **דוגמאות חישוב עבור מבחנה 1 :**

חישוב ריכוז תוצר :

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

$$\varepsilon = 8.8 \text{ } \mu\text{mol/ml}\cdot\text{cm} ; l = 1 \text{ cm}$$

$$0.235 = C \cdot 8.8 \cdot 1$$

$$C = 0.0267 \text{ } \mu\text{mol/ml}$$

חישוב כמות תוצר (במולים) :

$$Q_{sf} = C \cdot V$$

$$Q = 0.0267 \text{ } \mu\text{mol/ml} \cdot 2.35 \text{ ml} \cong 0.063 \text{ } \mu\text{mol}$$

כמות האנזים במבחנה הייתה :

$$Q_E = C \cdot V = 300 \text{ } \mu\text{g/ml} \cdot 0.3 \text{ ml} = 90 \text{ } \mu\text{g} = 0.09 \text{ mg}$$

פעילות ספציפית מוגדרת ככמות הסובסטרט ביח' μmol שהתפרק ע"י מ"ג אנזים בדקה, זמן הריאקציה היה 20 דקות לכן הפעילות הספציפית :

$$SA = 0.063 \text{ } \mu\text{mol} / 0.09 \text{ mg} \cdot 20 \text{ min} = 0.035 \text{ } \mu\text{mol/mgE}\cdot\text{min}$$

חישוב ריכוז סובסטרט בתערובת הריאקציה במבחנות -

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

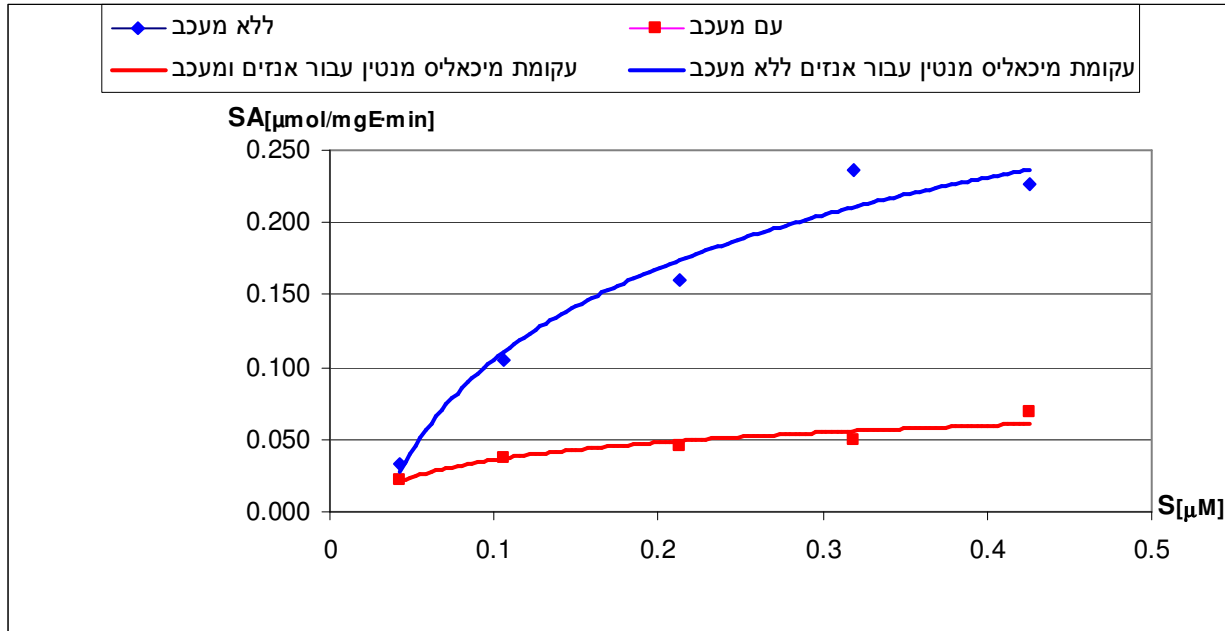
$$C_2 \cdot 2.35 = 0.002 \cdot 0.05$$

$$C_2 = 4.3 \cdot 10^{-5} \text{ } M = 0.043 \text{ mM}$$

1/S, 1/SA הם פשוט הערכים ההופכיים של SA, S ו-SA/S היא פשוט המנה המתמטית של S, SA ולכן לא תוצגנה דוגמאות חישוב ל-3 ערכים אלו.

הצגה גראפית של תלות הפעילות הספציפית בריכוז הסובסטרט, בנוכחות ובהעדר מעכב, בשלושת השיטות הבאות:

שיטה מס' 1 – עקומת מיכאליס מנטין



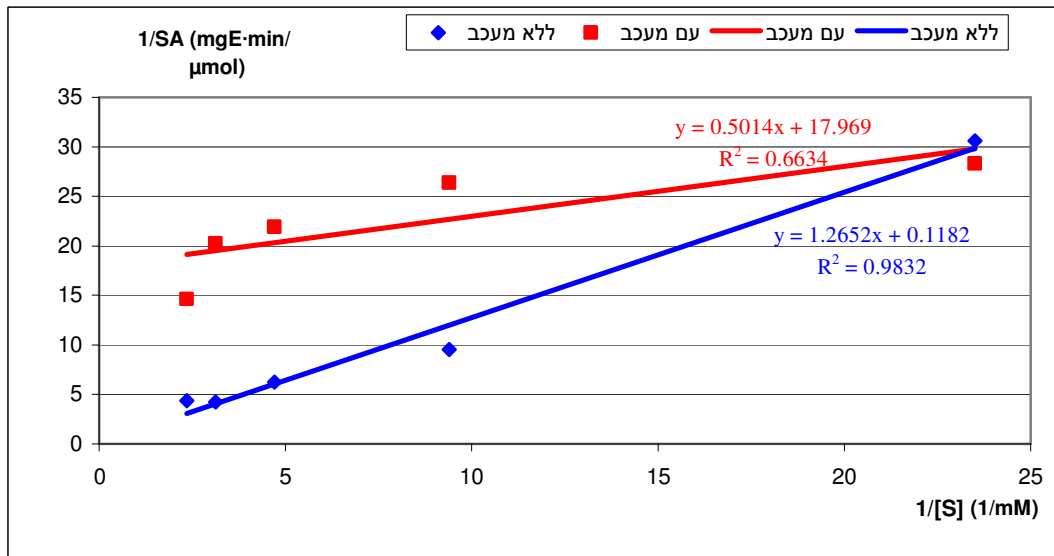
גרף מס' 1: עקומת מיכאליס מנטין עבור פעילות טריפסין ללא מעכב ובנוכחות מעכב

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

הגרף מתואר ע"י משוואת מיכאליס מנטין -

בעקומה שהתקבלה בשיטה זו אין מעבר לסדר אפס, ריכוזי הסובסטרט בהם השתמשנו לא אפשרו קבלת מהירות מקסימאלית ולכן לא ניתן לחשב את ערכי K_m ו- V_{max} בשיטה זו.

שיטה מס' 2 – עקומת לינוואייר - ברק



גרף מס' 2: עקומת לינוואייר ברק

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_{max}}$$

גרף 2 מתואר ע"י משוואת לינוואייר ברק:

חישוב ערכי K_m ו- V_{max} ללא מעכב:

חישוב המהירות המקסימאלית (הערך ההופכי של נקודת החיתוך של משוואת הגרף עם ציר ה-Y):

$$\frac{1}{V_{\max}} = 0.1182$$

$$V_{\max} = 8.46 \mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min}$$

חישוב קבוע מיכאליס מנטין (הערך ההופכי השלילי של נקודת החיתוך של משוואת הגרף עם ציר ה-X) :

$$y = 1.2652x + 0.1182 \Rightarrow x = \frac{y - 0.1182}{1.2652} \Rightarrow$$

$$x_{(y=0)} = \frac{1}{K_m} = -\left(-\frac{0.1182}{1.2652}\right) = 0.093$$

$$K_m = 10.7_{mM}$$

חישוב ערכי K_m ו- V_{\max} בנוכחות מעכב :

חישוב המהירות המקסימאלית (הערך ההופכי של נקודת החיתוך של משוואת הגרף) :

$$\frac{1}{V_{\max}} = 17.969$$

$$V_{\max} \cong 0.055 \mu\text{mol}/(\text{mgE}\cdot\text{min})$$

חישוב קבוע מיכאליס מנטין (הערך ההופכי השלילי של נקודת החיתוך של משוואת הגרף עם ציר ה-X) :

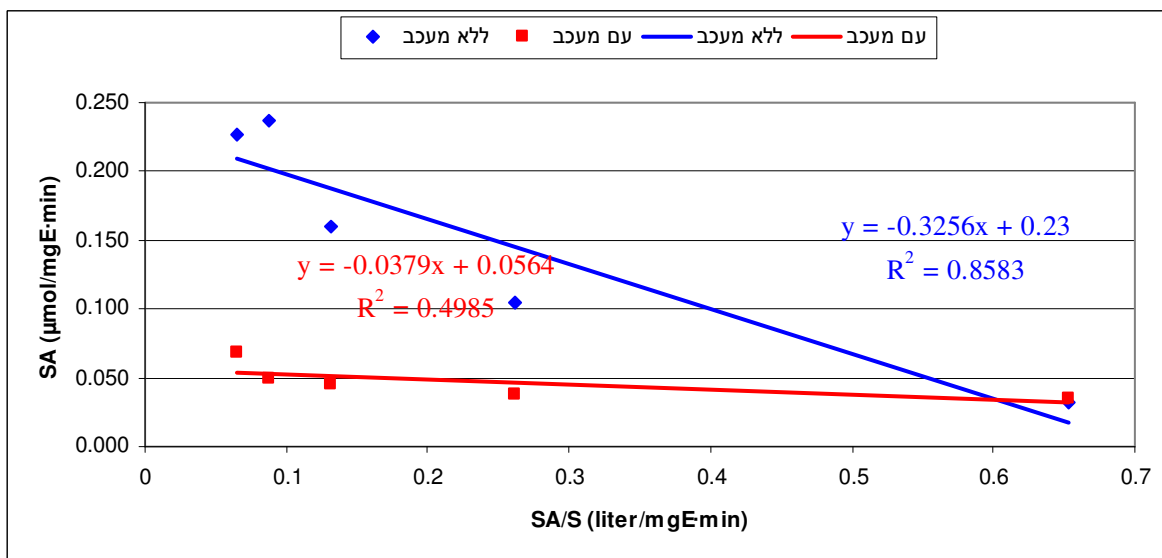
$$y = 0.5014x + 17.969 \Rightarrow x = \frac{y - 17.969}{0.5014} \Rightarrow$$

$$x_{(y=0)} = \frac{1}{K_m} = -\left(-\frac{17.969}{0.5014}\right) \cong 35.83$$

$$K_m \cong 0.028_{mM}$$

עפ"י משוואת לינוואיר ברק ניתן לראות כי ערכי V_{\max} ו- K_m קטנים בנוכחות מעכב ולא באותו היחס, מכאן ניתן להסיק כי אופי המעכב הנבדק, PABA, הינו עיכוב **תחרותי**.

שיטה מס' 2 – עקומת אדי-הופסטט



גרף מס' 3: עקומת אדי הופסטט

הגרף מתואר ע"י משוואת אדי הופסטט :

$$\frac{V}{S} = -\frac{V}{K_m} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$

חישוב ערכי K_m ו- V_{max} ללא מעכב :

$$V_{max} = 0.23_{\mu mol / mgE \cdot min}$$

$$K_m = \frac{0.23}{0.3256} = 0.7064_{mM}$$

חישוב ערכי K_m ו- V_{max} בנוכחות מעכב :

$$V_{max} = 0.0564_{\mu mol / mgE \cdot min}$$

$$K_m = \frac{0.0564}{0.0379} = 1.49_{mM}$$

לאחר הצגת התוצאות במשוואת לינוואייר-ברק, ניתן להסיק כי המעכב הינו מעכב תחרותי, מאחר ו- V_{max} הינו ערך קבוע, בקירוב, ורק ערכו של- K_m משתנה בהתאם לריכוז המעכב.

ע"פ המבנה הכימי של המעכב-PABA ניתן להסיק כי קיימת התאמה מבנית בין אופי עיכוב לבין מבנה הכימי של המעכב. למעכב קיימת טבעת בנוזית כמו לסובסטרט LPNA, השוני כימי היחיד הוא בשייר הצדדי. המעכב PABA יכול להקשר במקום הסובסטרט עכב הדמיון הרב במבנה הכימי. לכן המעכב הינו מעכב תחרותי.

טבלה מס' 6: ריכוז תוצאות K_m ו- V_{max} בשיטות השונות

$K_{m[mM]}$		$V_{max} \mu mol / mgE \cdot min$		שיטה
עם מעכב	ללא מעכב	עם מעכב	ללא מעכב	
-	-	-	-	מיכאליס מנטין
0.028	10.7	0.055	8.46	לינוואייר ברק
1.49	0.7064	0.0564	0.23	אדי הופסטט

מציאת ריכוז סופי של המעכב:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$0.001 \cdot 2 = C_1 \cdot 2.35$$

$$I = C_2 = 8.5 \cdot 10^{-4} M = 0.85_{mM}$$

חישוב את ערכו של הקבוע K_i :

בכדי לחשב את ערכו של הקבוע K_i נמצא תחילה את ערכו של- α :

$$a = \frac{\alpha \times k_m}{V_{max}}$$

a-שיפוע הגרף, ערכי K_m ו- V_{max} ידועים וכבר חושבו.

נחשב לפי עקומת לינוואייר-ברק :

$$0.5014 = \frac{\alpha \times 0.028}{0.055}$$

$$\alpha \cong 0.0008$$

כעת נציב את הערכים המתקבלים :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$0.008 = 1 + \frac{[0.00085]}{K_i}$$

$$K_i = 0.856_{mM}$$

$$-0.0379 = \frac{\alpha \times 0.0564}{0.3369}$$

$$\alpha = 0.00072$$

$$0.0072 = 1 + \frac{[0.00085]}{K_i}$$

$$K_i = 0.916_{mM}$$

$$K_i = 0.000856_M$$

$$K_m = 0.0686_{(\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min})}$$

$$I = 0.00085_M$$

$$K_{mapp} = 0.0686 \times \left(1 + \frac{[0.00085]}{0.000856} \right)$$

$$K_{mapp} = 0.136_M$$

$$K_i = 0.000916_M$$

$$I = 0.00085_M$$

$$K_m = 0.00149_M$$

$$K_{mapp} = 0.00149 \times \left(1 + \frac{[0.00085]}{0.000916} \right)$$

$$K_{mapp} = 0.00028_M$$

נחשב לפי עקומת אדי-הופסטט :

כעת נציב את הערכים המתקבלים :

חישוב K_{mapp} התבצעה לפי הנוסחה הבאה :

חישוב לפי עקומת לינוואיי-ברק :

חישוב לפי עקומת אדי-הופסטט :

חישוב מספר המחזור של הריאקציה :

מספר המחזור (K_3) הינו מספר מולקולות סובסטרט שהתפרקו ע"י מולקולת אנזים בשנייה שזוהי גם המהירות המקסימאלית.

$$1_{\mu\text{mol-trypsin}} \rightarrow 24_{mg}$$

$$X \rightarrow 0.09_{mg}$$

$$E_T = X = 0.00375_{\mu\text{mol trypsin}}$$

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T} \left[\frac{1}{\text{sec}} \right]} = \frac{V_{max}}{0.00375} \left[\frac{1}{\text{sec}} \right]}$$

בשיטת לינוואיי-ברק ללא מעכב :

$$V_{max} = K_3 = 0.055_{(\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min})}$$

$$K_{cat} = 0.055_{(\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min})} \cdot 24_{\text{mg}/\mu\text{mol}} = 14.67_{\text{units}/\text{min}} = \mathbf{0.24}_{\text{units}/\text{sec}}$$

בשיטת לינוואייר ברק בנוכחות מעכב :

$$V_{\max} = K_3 = 0.055 (\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min})$$

$$K_{\text{cat}} = 0.055 (\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min}) \cdot 24 \text{mg}/\mu\text{mol} = 14.67 \text{units}/\text{min} = \mathbf{0.24 \text{units}/\text{sec}}$$

בשיטת אדי הופסטט ללא מעכב :

$$V_{\max} = K_3 = 0.23 (\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min})$$

$$K_{\text{cat}} = 61.33 \text{units}/\text{min} = \mathbf{1.02 \text{units}/\text{sec}}$$

בשיטת אדי הופסטט בנוכחות מעכב :

$$V_{\max} = K_3 = 0.0564 (\mu\text{mol}/\text{mgE}\cdot\text{min})$$

$$K_{\text{cat}} = 15.04 \text{units}/\text{min} = \mathbf{0.2506 \text{units}/\text{sec}}$$

דיון בתוצאות, סיכום ומסקנות :

תשובות לשאלות בחוברת :

- מבחנות הבקרה בניסוי הן המבחנות שלהן לא הוסף האנזים טריפסין ובהן לא התרחשה הריאקציה, לכל זוג מבחנות זהות הייתה מבחנת בקרה (מבחנות מס' 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30).
- תפקידן של מבחנות הביקורת – לצורך הפרש ערך ה-O.D. של המבחנות הנבדקות מהבליעה של מבחנת הבקרה.
- השוואת התוצאות שנתקבלו עבור ערכי V_{\max} ו- K_m בשיטות השונות תעשה ע"י חישוב אחוז סטייה :

שיטה	$K_m \mu\text{mol}/\text{ml}$	$K_{\text{cat}} [\text{units}/\text{sec}]$	$K_I \mu\text{mol}/\text{ml}$
מיכאליס מנטין	-	-	-
לינוואייר ברק	0.055	0.24	0.856
אדי הופסטט	0.0564	0.2506	0.916
שגיאה	2.545%	4.417%	6.550%

- בעקומה מיכאליס – מנטין שהתקבלה בשיטה זו אין מעבר לסדר אפס, כלומר המהירות לא הגיעה לערכה המקסימאלי ולכן לא ניתן לחשב דרכה את ערכי K_m ו- V_{\max} .
- אופי העיכוב של PABA שנמצא בניסוי הינו עיכוב תחרותי.
- ידוע כי המעכב PABA הינו מעכב תחרותי, ע"ב הנתונים של הניסוי אותו ביצענו אכן הגענו למסקנה כי הוא אכן מעכב תחרותי, לכן הריכוזים שבהם השתמשנו מתאימים.
- המעכב מכיל טבעת ארומאטית בעלת קב' אמינו בסיסיות וידוע כי האנזים טריפסין ספציפי לחומצות אמיניות בסיסיות ובמבנה ה"כיס" שיריסם טעונים שלילית ולכן המעכב, המקבל מטען חיובי בתמיסה, יוכל להיקשר ל"כיס" של האנזים ולעכב את הריאקציה. מכאן שקיימת התאמה בין מבנה המעכב לאופי העיכוב.
- השוואה בין K_i לבין K_m :

אם נעשה ממוצע של 2 ערכי K_m ב-2 השיטות ונשווה אותו לממוצע של 2 ערכי K_i נקבל :

$$\bar{K}_m = \frac{0.7064 + 1.49}{2} = 1.092_{mM}$$

$$\bar{K}_I = \frac{0.916 + 0.856}{2} = 0.886_{mM}$$

מתברר שערכו של K_m גבוה יותר ולכן לאנזים יש יותר אפיניות לו אך מכיוון שערכו של K_i אינו רחוק ממנו, מכאן נובעת התחרות האופיינית של המעכב.

סיכום ומסקנות :

- למדנו להכיר מנגנון עיכוב אנזימטי.
- התנסינו בחישובי מהירות ריאקציה, קבועי מיכאליס מנטין, קבועי מעכב ומספרי מחזור.
- בדקנו השפעות ריכוזי מעכב על מהירות הריאקציה, וקבענו את אופי העיכוב.

היוכימיה - מצבדה מס' 7

פרקציוניזציה של התא
ומיצור עיליות
אנזימאטיות
בכבד של
העליות חיים

דו"ח מצבדה

ביוכימיה מעבדה מס' 7

נושא המעבדה: פרקציונציה של התא ומידור פעילויות אנזימטיות בכבד של בעלי חיים

מטרות הניסוי :

1. הפקת אברונים שונים מרקמת כבד.
2. בדיקת פעילות האנזימים במיקומם בתא.

ריכוז תוצאות :

טבלה מס' 1: בדיקת פעילות אנזימתית של האנזימים MDH ו-LDH בפרקציות השונות

O.D. (450 nm)	HCl [מ"ל]	קוקטייל [מ"ל]	מים [מ"ל]	לקטט [מ"ל]	מאלט [מ"ל]	מיטוכונדריות מומסות [מ"ל]	מיטוכונדריות [מ"ל]	ציטוזול [מ"ל]	מס' מבחנה
0.032	4	2	0.2	-	-	-	-	0.2	1
0.091	4	2	-	-	0.2	-	-	0.2	2
0.207	4	2	-	0.2	-	-	-	0.2	3
0.032	4	2	0.2	-	-	-	0.2	-	4
0.364	4	2	-	-	0.2	-	0.2	-	5
0.054	4	2	-	0.2	-	-	0.2	-	6
0.03	4	2	0.2	-	-	0.2	-	-	7
0.357	4	2	-	-	0.2	0.2	-	-	8
0.061	4	2	-	0.2	-	0.2	-	-	9
0.029	4	2	0.4	-	-	-	-	-	10

מקרא

מספרי מבחנות המסומנים באפור – ביקורת

מספרי מבחנות המסומנים בשחור – איפוס

נתוני התחלה :

משקל הכבד : 6.8 ג'

משקל דגימת הכבד שנלקחה להמגון : 1.001 ג' = 1001 מ"ג

נפח הנוזל העליון : 4.5 מ"ל

נפח פרקציית החלקיקים : 7 מ"ל

נפח פרקציית החלקיקים המומסים : 2 מ"ל

חישוב נפח הסובסטרט בכל מבחנה : 0.2 מ"ל (חוץ ממבחנת האיפוס)

$$C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2} = \frac{0.04 \times 2.4}{0.5} \cong 0.2_{ml}$$

חישוב ריכוז הכבד בפרקציות שונות:

טבלה מס' 2: תוצאות חישוב ריכוז כבד בפרקציות השונות

ריכוז כבד [מ"ג/מ"ל]	פרקצייה אחרי מיהול	פרקצייה לפני מיהול
222.4		ציטוזול
143		מיטוכונדריות
130		מיטוכונדריות מומסות
4.448		ציטוזול
14.3		מיטוכונדריות
13		מיטוכונדריות מומסות

דוגמת חישוב עבור ריכוז הכבד בנוזל הציטוזול:

משקל הכבד-1001 מ"ג

נפח נוזל הציטוזול-4.5 מ"ל

$$C = \frac{m}{V} \Rightarrow C = \frac{1001}{4.5} = 222.4 \frac{mg}{ml}$$

דוגמת חישוב ריכוז הכבד בנוזל הציטוזול המהול:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \Rightarrow C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2}$$

החישוב בוצע לפי הנוסחה:

C_1 = ריכוז כבד התחלתי, C_2 = ריכוז כבד סופי, V_1 = נפח התחלתי, V_2 = נפח סופי

$$C_1 = 222.4 \text{ mg/ml}, V_1 = 0.5 \text{ ml}, V_2 = 25 \text{ ml}$$

$$C_2 = \frac{222.4 \times 0.5}{25} = 4.448 \text{ mg/ml}$$

חישוב כמות הכבד בכל אחת ממבחנות הריאקציה:

טבלה מס' 3: תוצאות חישוב כמות כבד במבחנות הריאקציה

מבחנות ריאקציה	כמות כבד [מ"ג]
1-3 (ציטוזול)	0.8896
4-6 (מיטוכונדריות)	2.86
7-9 (מיטוכונדריות מומסות)	2.6
10 (איפוס)	0 (ללא כבד)

דוגמת חישוב עבור מבחנות 1-3 - נוזל מהציטוזול:

$$C = \frac{m}{V} \text{ : החישוב בוצע ע"פ הנוסחה}$$

$$V = 0.2 \text{ ml}, C = 4.448 \text{ mg/ml} \Rightarrow C = \frac{m}{V} \Rightarrow m = 0.2 \times 4.448 = 0.8896 \text{ mg}$$

טבלה מס' 4: ריכוז תוצאות חישובי פעילות האנזימים בפרקציות השונות

פעילות ספציפית $\frac{\Delta A}{g \text{ liver}}$		פעילות אנזים $\frac{\Delta A}{m \text{ in}}$		משקל כבד $[g \text{ liver}]$	$\Delta A(450nm)$	מבחנה מס'
לקטט	מלאט	לקטט	מלאט			
	66.322		0.0118	8.896×10^{-4}	0.059	2
196.718		0.035		8.896×10^{-4}	0.175	3
	116.084		0.0664	2.86×10^{-3}	0.332	5
7.692		0.0044		2.86×10^{-3}	0.022	6
	193.377		0.0654	1.691×10^{-3}	0.327	8
18.332		0.0062		1.691×10^{-3}	0.031	9

דוגמאות חישוב לפי מבחנה 2:

חישוב ΔA :

$$\Delta A = O.D. \text{ מבחנה} - O.D. \text{ ביקורת מבחנה}$$

$$\Delta A = 0.091 - 0.032 = 0.059$$

$$t = 5 \text{ min}$$

חישוב פעילות אנזים (עבור זמן אינקובציה של 5 דקות):

$$\frac{\Delta A}{t} = \frac{0.059}{5} = 0.0118 \left[\frac{\Delta A}{\text{min}} \right]$$

חישוב פעילות ספציפית:

$$\frac{\Delta A}{g_{liver}} = \frac{0.059}{8.896 \times 10^{-04}} = 66.322 \frac{1}{g_{liver}}$$

חישוב סך כל הפעילות הספציפית של כל אנזים בתא :

לחישוב זה בחרנו את פרקציית נוזל הציטוזול ואת פרקציית נוזל המיטוכונדריות המומסות. בחרנו את פרקציית המיטוכונדריות המומסות כיוון שרצינו לכלול גם את הפעילות שמתרחשת בתוך המיטוכונדריה.

חישוב עבור LDH:

$$196.718 + 18.332 = 215.05 \frac{\Delta A}{g_{liver}}$$

חישוב עבור MDH:

$$66.322 + 193.377 = 259.699 \frac{\Delta A}{g_{liver}}$$

התחלקות יחסית של האנזימים בתא

האנזימים מתחלקים לשלוש קבוצות עיקריות, האנזימים שמרחפים בציטוזול, האנזימים שעל ממברנת התא, והאנזימים הנמצאים במטריקס המיטוכונדריאלי.

חישוב התחלקות יחסית:

טבלה מס' 5: ריכוז תוצאות חישוב התחלקות יחסית

התחלקות יחסית [%]	פרקצייה	אנזים
17.65	ציטוזול	MDH
30.89	מיטוכונדריות	
51.46	מיטוכונדריות מומסות	
88.32	ציטוזול	LDH
3.45	מיטוכונדריות	
8.23	מיטוכונדריות מומסות	

דוגמת חישוב עבור MDH בפרקציית הציטוזול:

$$\frac{E_i}{E_T} \times 100 = \%$$

$$\frac{66.322}{66.322 + 116.084 + 193.377} \times 100 = 17.65\%$$

חישוב סך כל הפעילות הספציפית של האינזימים MDH+LDH בכל אחת מהפרקציות:

טבלה מס' 6: תוצאות חישוב סך פעילות אנזימטית בפרקציות השונות

ריכוז יחסי $\left[\frac{\Delta A}{g_{liver}} \right]$	פרקצייה
263.040	ציטוזול
123.776	מיטוכונדריות
211.709	מיטוכונדריות מומסות

$$66.322 + 196.718 = 263.04 \frac{\Delta A}{g_{liver}}$$

דוגמת חישוב עבור פרקציית הציטוזול:

חישוב הריכוזים היחסיים של האנזימים בציטוזול ובמטריקס :

טבלה מס' 7: תוצאות חישוב ריכוזי אנזימים יחסיים

ריכוז יחסי [%]	פרקצייה	אנזים
25.54	ציטוזול	MDH
29.76	מטריקס מיטוכונדריאלי	
91.15	ציטוזול	LDH
4.95	מטריקס מיטוכונדריאלי	

דוגמת חישוב עבור MDH בפרקציית הציטוזול:

$$\frac{66.322}{66.322 + 116.084 + (193.377 - 116.084)} \times 100 = 25.54\%$$

דין :

מבחנות הביקורת

מבחנות הביקורת מתחלקות לשתי קבוצות, קבוצה אחת מכילה את מבחנות 1,4,7. וקבוצה שנייה מבחנה 10. תפקידן של מבחנות 1,4,7 הינו להראות את כמות ה-NADH אשר הייתה בתא לפני תחילת הריאקצייה, וכך ניתן להסביר איך נוצר NADH גם בהעדר האנזים המתאים. תפקידה של מבחנה 10 הינו להראות את כמות הבליעה של המאלט/לקטט והקוקטייל, או במילים אחרות זוהי מבחנת האיפוס שבה השתמשנו.

תוצאות הבליעה במבחנות הביקורת הינן נמוכות, וזאת כיוון שבמבחנות אלה ריכוז ה-NADH הינו נמוך מאד.

השפעת הטריטון :

הטריטון הינו דטרגנט הגורם להמסת ממברנת המיטוכונדריה, הדבר מתבטא בירידת ערכי ה-O.D. – והצטללות התמיסה.

כאשר ממברנת המיטוכונדריה מומסת, האנזים מלאט דהידרוגנאז יוצא מהמטריקס המיטוכונדריאלי ומגיב עם ה- NAD^+ מהקוקטייל ולא רק עם ה- NAD^+ המיטוכונדריאלי.

מסקנות :

- ניתן לראות כי כל אנזים פועל בחלק אחר של התא.
- MDH פועל בעיקרו במיטוכונדריה (75%)
- ה-LDH פועל בעיקר בציטוזול (91%)
- אין נגישות לחלק ממשותפי מעגל הגליקוליזה אל תוך המיטוכונדריה, ולכן היא מתבצעת אך ורק בציטוזול, ריאקציית מעגל החומצה הציטרית (מעגל קרבס) מתרחש במיטוכונדריה, תוצאות הניסוי שלנו תואמות את הנ"ל הידוע לנו מהספרות.