

آزمایشگاه آموزشی
زیست و دومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

بیوشیمی

آنزیم.

روز پنجم
۹۸/۵/۷

اهداف آزمایش:

۱. ادامه یادگیری کار با دستگاه اسپکتوفتومتر و میکروپیپت
۲. یادگیری نحوه اندازه‌گیری پارامترهای کاتالیتیک و فعالیت آنزیم
۳. یادگیری محاسبات تئوری مربوط به بیوشیمی آنزیم و رسم نمودار لینیور - برگ

زمان آزمایش: ۹۰ دقیقه

طراح آزمایش: الهام پرند



این فایل به منظور آموزش عملی دانش‌پژوهان المپیاد زیست‌شناسی ایران گردآوری شده است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز

در این قسمت شما با آنزیم فسفاتاز کار می‌کنید. آنزیم فسفاتاز موجب آزاد شدن فسفات از ترکیبات فسفات‌دار می‌شود. در این جا سوبسترا ترکیب پارانیتروفنیل فسفات است که توسط آنزیم به ترکیب رنگی پارا فنول تبدیل می‌شود. در ۴۰۰ نانومتر جذب دارد و مقدار ضریب جذبی مولی آن $1/Mcm$ ۱۹۰۰۰ در محیط قلیایی می‌باشد. هدف محاسبه فعالیت آنزیم و فعالیت ویژه است.

روش کار

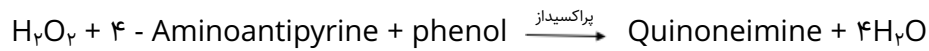
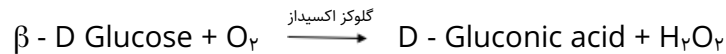
۱. در یک کووت مقدار ۰.۱۲ mL بافر استات را با ۰.۲۴ mL ترکیب PNPP بریزید. واکنش با ریختن ۰.۲۴ mL آنزیم آغاز می‌شود. برای نمونه بلنک موارد بالا را تکرار کرد و به جای سوبسترا آب بریزید.
۲. پس از گذشت ۱۰ دقیقه با ریختن مقدار ۰.۶ mL سود واکنش را متوقف کنید و جذب را بخوانید.

سوالات

- مقدار جذب را بنویسید.
- مقدار PNP غلظت را بر اساس ضریب جذب مولی حساب کنید.
- مقدار مول PNP را حساب کنید.
- مقدار فعالیت تام آنزیم بر حسب مول در دقیقه را حساب کنید.
- اگر غلظت آنزیم $0.24 mg/mL$ باشد فعالیت ویژه آنزیم را حساب کنید.

محاسبه پارامترهای کاتالیتیک آنزیم گلوکز اکسیداز

برای سنجش فعالیت گلوکز اکسیداز از روش واکنش همراه استفاده می شود. به این معنا که از آنزیم ثانویه ای استفاده می شود که سوبسترای آن محصول واکنش گلوکز اکسیداز می باشد.



Quinoneimine یک ترکیب قرمز رنگ است که در ۵۴۶nm حداکثر جذب را دارد و $\epsilon = 3.8 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ می باشد.

در این بخش شما با استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز پارامترهای کینتیکی آنزیم را محاسبه می کنید.

روش کار

- در کووت مقدار $200 \mu\text{l}$ نمونه بلانک (آب مقطر) ریخته، سپس $1800 \mu\text{l}$ از آنزیم ریخته و 30s صبر می کنیم و سپس دستگاه را بلانک می کنیم.
- همین کار را (نمونه) + (آنزیم $1800 \mu\text{l}$) و 30s و صبر برای موارد جدول تکرار کرده و جذب های به دست آمده را یادداشت کنید. (مقدار غلظت گلوکز اولیه 1g/mL)

آب مقطر	محلول گلوکز	غلظت گلوکز
۰	۲۰۰	۱
۱۰۰	۱۰۰	۲
۱۵۰	۵۰	۳
۱۷۵	۲۵	۴

۳. جدول مقابل را کامل کنید.

جذب	سرعت واکنش
۱	
۲	
۳	

۴. با نوشتن معادله نمودار لاینویور- برگ نمودار آن را رسم کنید و K_m و V_{max} را محاسبه کنید.

