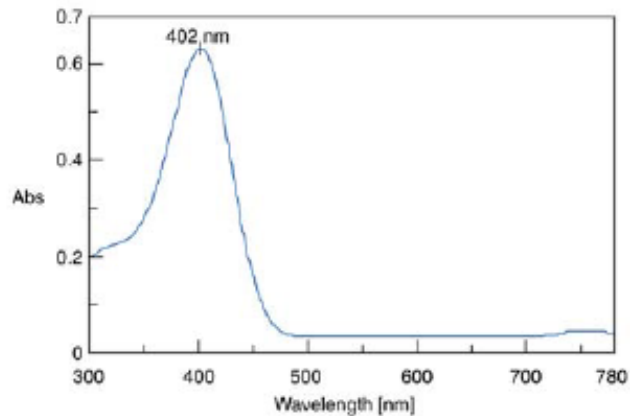


Kitináz enzim aktivitásának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel

Ebben a feladatban egy, az endokitinázok csoportjába tartozó enzim aktivitását és egyes gátlószereit vizsgáljuk spektrofotometriás módszerrel. Az endokitinázok az N-acetil-glükózamin egységekből álló polimer kitinmolekulákat bontják oligomerekre. A vizsgált enzim a *Chromobacterium violaceum* nevű baktériumból származik.

Az enzim vizsgálatára alkalmas assay-ben egy 4-Nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilkitotrióz nevű vegyületet használnak. A vizsgált endokitináz enzim ezt a vegyületet olyan módon bontja, hogy abból egy mol szubsztrát átalakulásakor 1 mol 4-nitrofenol keletkezik (NP). A 4-nitrofenol (NP) abszorpciós spektrumát a következő ábra mutatja:



Q1.1. Melyik hullámhosszon érdemes mérni spektrofotometriásan a 4-nitrofenol (NP) koncentrációját?

- A) kb. 300 nm
- B) kb. 350 nm
- C) kb. 400 nm
- D) kb. 470 nm
- E) kb. 500 nm

Helyes válasz betűjele:

C

Q1.2. Milyen színű lehet a 4-nitrofenol (NP)?

- A) kék
- B) sárga
- C) színtelen
- D) intenzív vörös
- E) fekete

Helyes válasz betűjele:

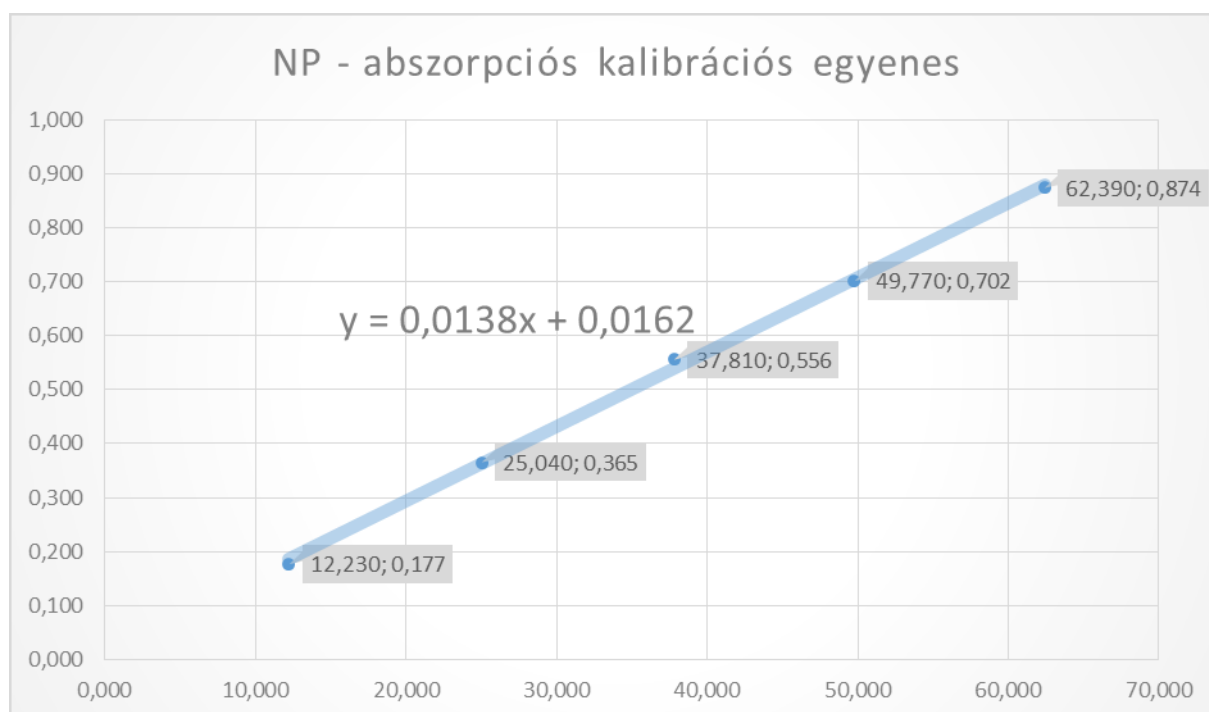
B

A kiválasztott hullámhosszon mérve elkészítettük a kalibrációs adatsort.

Q.1.4. Egészítse ki a hiányzó adatsort!

A csak oldószert tartalmazó oldat abszorpciója: 0.002		
A vakpróba abszorpciója: 0.042		
<i>(a vakpróba a 4-nitrofenolon kívül minden, az enzimreakcióhoz szükséges anyagot tartalmazó oldat)</i>		
[NP] (μmol/L)	mért abszorpció érték	vakpróbával korrigált abszorpció
12.23	0.219	0.177
25.04	0.407	0.365
37.81	0.598	0.556
49.77	0.744	0.702
62.39	0.916	0.874

Q1.5. Ábrázolja a fenti adatok alapján a 4-nitrofenol (NP) abszorpciójának kalibrációs egyenesét!



Az előkészítő mérések követően az enzim-kinetikai mérésekre kerül sor. A mérés során meghatározzuk a *Chrobocaterium violaceum*-ből izolált enzim K_m és v_{max} értékeit. A következő kísérleti elrendezést alkalmazzuk pufferrel együtt.

30 percig a megfelelő, savas pH-jú pufferben és megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk a szubsztrátot 1000 μL össztérfogatú oldatban, 1.000 μg enzim adagolása mellett. A 30 perc elteltével leállítottuk a reakciót és megmértük a keletkező oldat elnyelését a 4-nitrofenolnak megfelelő hullámhosszon.

[S] (mg/mL)	abszorpció értékek 30 perc inkubáció után
0.100	0.1218
0.300	0.2279
0.700	0.3821
0.900	0.4399
1.000	0.4654

Q2.1. A fenti adatok alapján töltsé ki az alábbi táblázatot! Az abszorpciós regressziós egyenes helyes értékét 4 értékes jeggyel használja!

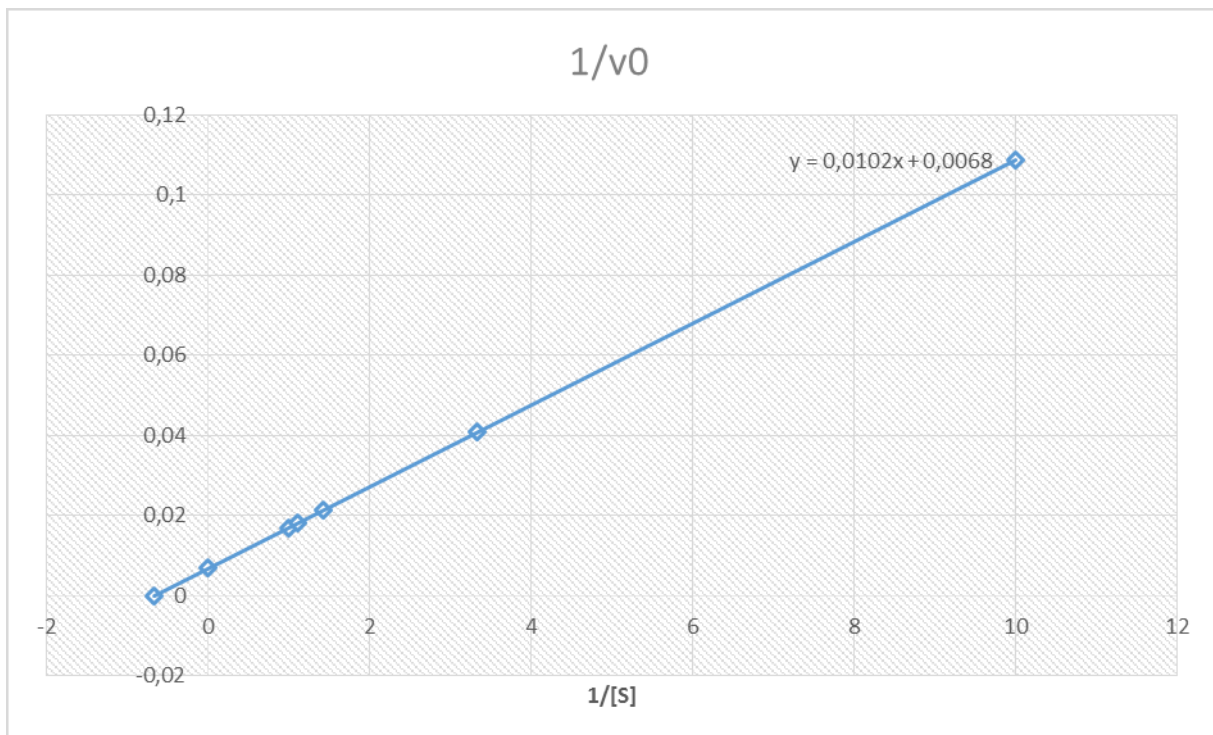
$$\text{abszorpció} = 0.01385 * [\text{NP}] + 0.0162$$

Feltételezzük továbbá, hogy a kiindulási oldatokban egyáltalán nem volt NP.

Írja fel a helyes sebességi egyenletet: $v = d[P]/dt$ (ahol a P a 4-nitrofenol terméket jelöli.)

[S] mg/mL	1/[S] mL/mg	abszorpció (30 perc)	$\Delta[\text{NP}]$ 60 percre	$v = \Delta[\text{NP}]/\Delta t$ $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$	1/v $\text{h} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$
0.100	10.00	0.1218	9.19	9.19	0.1088
0.300	3.333	0.2279	24.50	24.50	0.0408
0.700	1.429	0.3821	46.77	46.77	0.0214
0.900	1.111	0.4399	55.12	55.12	0.0181
1.000	1.000	0.4654	58.80	58.80	0.0170

Q2.2.a. Ábrázolja Lineweaver-Burk linearizációban a fenti adatokat az enzimre vonatkoztatva! É
Q2.2.b. Adja meg a Lineweaver-Burk egyenletet!



Q2.3. Adja meg a vizsgált enzim kinetikai paramétereit:

v_{max} : 147 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$ K_m : 1.500 mg/mL