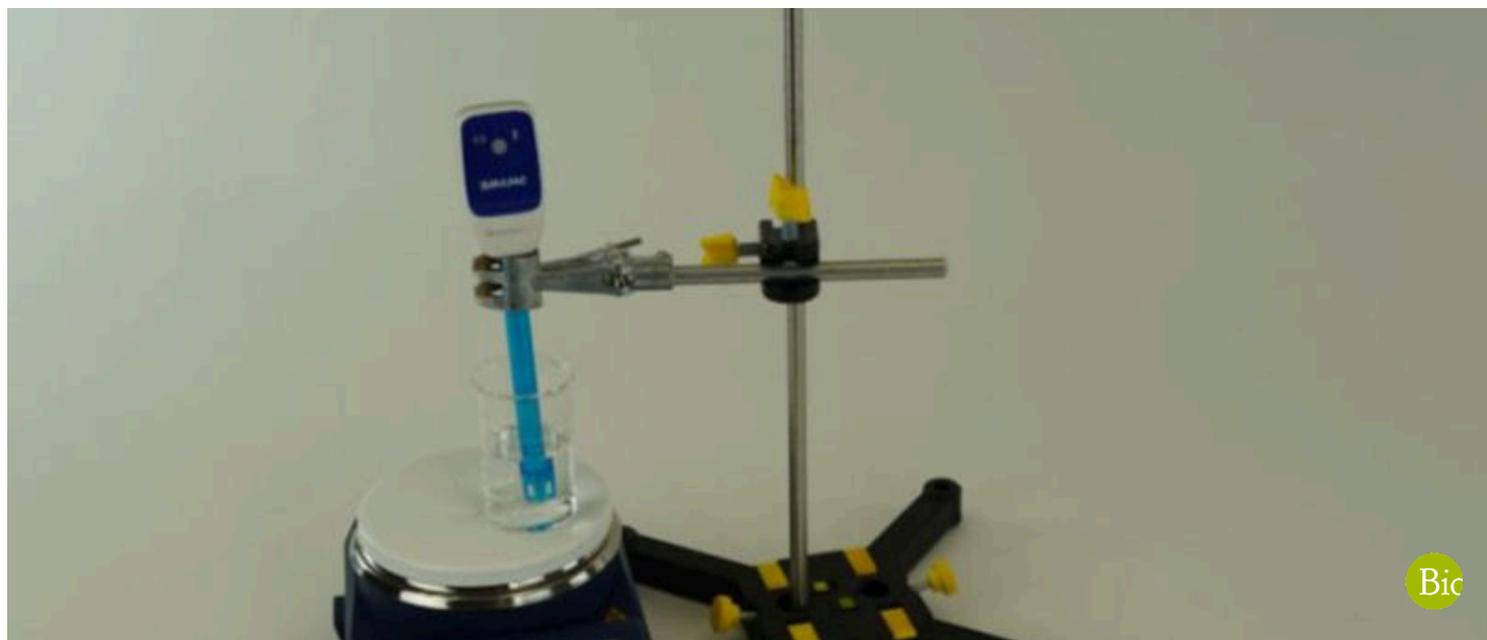


Определение константы Михаэлиса с помощью Cobra SMARTsense



Химия

Органическая химия

Биохимия

Биология

Биохимия

Прикладные науки

Медицина

Биохимия



Уровень сложности

средний



Размер группы

2



Время подготовки

10 Минут



Время выполнения

40 Минут

PHYWE
excellence in science

Общая информация

Описание

PHYWE
excellence in science

Экспериментальная установка

При ферментативном гидролизе мочевины в водном растворе получаю углекислый газ и аммиак. Ионы этих соединений увеличивают проводимость раствора. Измерения проводимости могут быть использованы для определения скорости гидролиза мочевины ферментом уреазы при различных концентрациях субстрата. Константа Михаэлиса может быть рассчитана на основе этих значений.

Дополнительная информация (1/7)

PHYWE
excellence in science

Предварительные

знания



Учащиеся и студенты должны быть знакомы с ферментно-субстратными комплексами, ферментативным гидролизом мочевины и принципом измерения проводимости.

Принцип



Константа Михаэлиса вычисляется на основе измерений проводимости.

Дополнительная информация (2/7)

PHYWE
excellence in science

Цель



Ученики и студенты должны узнать, как можно рассчитать константу Михаэлиса путем определения проводимости (путем гидролиза мочевины, которая поставляет углекислый газ и аммиак).

Задачи

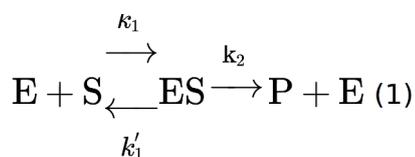


Ученики и студенты должны определить константу Михаэлиса по измеренным значениям, определенным в этом эксперименте.

Дополнительная информация (3/7)

Дополнительная информация об оценке и подготовке

- Для определения константы Михаэлиса значения проводимости в моменты времени 100 с и 200 с и их разность ΔY определяются и записываются для всех шести выполненных измерений.
- Механизм реакций, катализируемых ферментами, по Михаэлису-Ментену основан на комплексе фермент-субстрат ES , который образуется из фермента E и субстрата S в восходящей равновесной реакции и распадается на продукт P и неизменный фермент E .



$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k_1' c_{ES} - k_2 c_{ES} \approx 0 \quad (2)$$

Согласно принципу Боденштейна, изменение концентрации с течением времени равно $ES \approx 0$.

Дополнительная информация (4/7)

После преобразования с учетом концентрации ES получаем:

$$c_{ES} = \frac{k_1 c_E c_S}{k_1' + k_2} \quad (3)$$

Концентрация свободного субстрата C_s может быть приравнена к общей концентрации S , поскольку добавляется только немного фермента. Общая концентрация E , $C_{E,0}$ равна сумме концентраций свободного фермента C и фермент-субстратного комплекса C_{ES} :

$$C_{E,0} = C_E + C_{ES} \quad (4)$$

После преобразования и вставки уравнения (4) в уравнение (3) получаем:

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot (C_{E,0} - c_{ES}) c_S}{k_1' + k_2} \quad (5)$$

Таким образом, переход на C_{ES} обеспечивает:

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot C_{E,0} \cdot c_S}{k_1' + k_2 + k_1 c_S} \quad (6)$$

Дополнительная информация (5/7)

На стадии формирования продукта, закон времени гласит:

$$\frac{dc_p}{dt} = k_2 c_{ES} \quad (7)$$

Подставив выражение (6) вместо c_{ES} , получаем:

$$\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_1 k_2 c_{E,0} c_S}{k_1' + k_2 + k_1 c_S} \quad (8)$$

Коэффициент $\frac{k_1' + k_2}{k_1} = K_M$ (9) суммируется в константе Михаэлиса K_M . Следовательно, закон времени гласит:

$$\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_2 c_{E,0} c_S}{K_M + c_S} \quad (10)$$

Таким образом, скорость ферментации линейно зависит от концентрации фермента. Влияние концентрации субстрата более сложное. В случае $c_S > K_M$ уравнение (10) упрощается до

$$\frac{dc_p}{dt} = k_2 c_{E,0} \quad (11)$$

Дополнительная информация (6/7)

В этом случае реакция S нулевого порядка и ферментация имеет максимальную скорость при $k_2 c_{E,0}$. Если $c_S = K_M$, достигается половина максимальной скорости. Таким образом, константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой реакция протекает на половине максимальной скорости. В случае, если субстрата осталось совсем немного, т.е. $c_S < K_M$, это приводит к

$$\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_2}{K_M} \cdot c_{E,0} c_S \quad (12)$$

т.е. скорость образования P первого порядка согласно E и S .

Для оценки средней скорости энзимолитиза определяется между 100 и 200 секундами после начала. Следует рассчитать разницу между значениями проводимости через 100 и 200 секунд (ΔY) и разделить на 100 секунд. Эти скорости (в мкСм см⁻¹ с⁻¹) отложены в зависимости от концентрации мочевины (в ммоль / л). Концентрация субстрата c_S (в ммоль / л) определяется по формуле:

$c_S = (W10000)/M$ (13), где W – концентрация раствора мочевины в% и M – молярная масса мочевины = 60,06 г / моль.

Дополнительная информация (7/7)

Поскольку трудно определить концентрацию, соответствующую половине максимальной скорости, т. е. K_M , напрямую, используется график Лайнуивера-Берка.

При скорости реакции $v = dcP/dt$ и в обратном представлении из уравнения (10) получаем:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_M}{k_2} \cdot \frac{1}{c_S} \quad (14)$$

График зависимости $1/v$ от $1/c_S$ (см. Рис. 5), таким образом, дает k_2 (в степени -1) как сегмент ординаты ($1/c_S = 0$) и K_M/k_2 как наклон прямой линии. Сначала определяется отрезок ординаты и наклон прямой. Затем этот наклон делится на точку пересечения ординат, чтобы получить константу Михаэлиса. Расчет дает значение $4,86 \times 10^{-3}$ моль / л для константы Михаэлиса уреазы.

Небольшое значение K_M означает, что фермент имеет высокое сродство к своему субстрату.

Уреаза была первым ферментом, представленным в кристаллической форме (Самнер, 1926). В отличие от аллостерических ферментов, он относится к "нормальным" ферментам, удовлетворяющим механизму Михаэлиса-Ментьена.

Инструкции по технике безопасности



- К этому эксперименту применяются общие инструкции по безопасному проведению экспериментов при преподавании естественных наук.

Теория

Уреаза катализирует ферментативный гидролиз мочевины в воде, обеспечивая тем самым диоксид углерода и воду. С помощью датчика проводимости SMARTsense можно измерить проводимость полученного раствора. Это позволяет проследить, как ионы в соединении увеличивают проводимость.

Константа Михаэлиса указывает концентрацию субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости фермента.

Поскольку скорость гидролиза мочевины при различных концентрациях субстрата может быть определена путем измерения проводимости, константа Михаэлиса может быть рассчитана на основе этих значений.

Оборудование

Позиция	Материал	Пункт No.	Количество
1	Cobra SMARTsense - Проводимость, 0...20000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 0...100°C (Bluetooth)	12922-00	1
2	Манипулятор для магнитных мешалок	35680-03	1
3	Магнитная мешалка без подогрева для 3 л, 230 В	35761-99	1
4	Магнитная мешалка, цилиндрическая, 30 мм	46299-02	1
5	Портативные весы, OHAUS PS121, 300 г / 0,01 г	49241-93	1
6	Подставка для штатива Бунзена, 210x130 мм, h=750 мм	37694-00	1
7	Двойная муфта	02043-00	1
8	Универсальный зажим	37715-01	1
9	Мензурка, высокая, 100 мл	46026-00	6
10	Мензурка, низкая, 250 мл, пластмасса	36013-01	1
11	Колба Эрленмейера, 100 мл SB 19	MAU-EK17082002	6
12	Резиновая пробка, d=22/17 мм, без отверстия	39255-00	6
13	Мерная пипетка, 20 мл	36579-00	1
14	Мерная пипетка, 50 мл	36581-00	1
15	Шаровая пипетка	36592-00	1
16	Микролитровый шприц, 100 мкл	02606-00	1
17	Шпатель, спец. сталь, l=150 мм	33393-00	1
18	Промывалка, пластмасса, 500 мл	33931-00	1
19	Мочевина, 250 г	30086-25	1
20	Уреаза, глицериновый раствор, 50%, 10 мл	31924-03	1
21	Вода, дистиллирован., 5 л	31246-81	1
22	measureAPP - бесплатное измерительное программное обеспечение всех пр	14581-61	1

Дополнительные материалы

PHYWE
excellence in science

Позиция	Номер артикла	Назначение
---------	---------------	------------

1		мобильное устройство (смартфон/планшет)
2	14581-61	measureAPP

PHYWE
excellence in science

Подготовка и выполнение работы

Подготовка (1/5)

PHYWE
excellence in science

Для измерения проводимости необходимы датчик Cobra SMARTsense- Проводимость и приложение measureAPP. Проверьте, активирован ли «Bluetooth» на Вашем устройстве (планшете, смартфоне) (приложение можно бесплатно скачать в App Store - QR-коды ниже). Теперь откройте приложение measureAPP на своем устройстве



measureAPP для

операционных систем Android



measureAPP для

операционных систем iOS

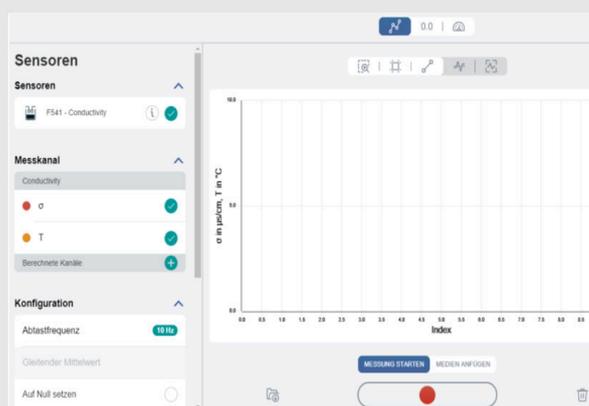


measureAPP для

Планшетов и ПК с Windows 10

Структура (2/5)

PHYWE
excellence in science



measureApp
в версии Windows 10

- Включите датчик проводимости SMARTsense, нажав и удерживая кнопку питания.
- Подключите датчик к устройству в приложении measureAPP в разделе «Измерение», как показано на рисунке слева.
- Датчик проводимости SMARTSense теперь отображается в приложении.

Подготовка (3/5)

PHYWE
excellence in science

Для проведения эксперимента требуются растворы с различными концентрациями мочевины. Они должны быть свежеприготовлены перед началом эксперимента:

- 0,4% раствор мочевины (основной раствор мочевины): 0,40 г мочевины отмеряют в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и растворяют в 99,6 г дистиллированной воды.
- 0,2% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,4% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,1% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,2% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,05 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,1% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

Подготовка (4/5)

PHYWE
excellence in science

- 0,025 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,05% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,0125 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,025% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

Примечание: раствор мочевины **всегда следует хранить** в холодильнике!

Подготовка (5/5)

PHYWE
excellence in science

- Соберите экспериментальную установку, как показано на рисунке.
- Закрепите универсальный зажим на штативном стержне подставки Бунзена с помощью двойной муфты.
- Закрепите датчик проводимости SMARTsense универсальным зажимом.



Выполнение работы (1/2)

PHYWE
excellence in science

- Добавьте 40 мл 0,0125% раствора мочевины (сначала самая низкая концентрация) в мензурку объемом 100 мл путем двойного пипетирования с помощью мерной пипетки объемом 20 мл, затем поместите в мензурку стержень для магнитной мешалки
- Поставьте мензурку на магнитную мешалку и погрузите зонд проводимости в раствор.
- Установите мешалку на среднюю скорость перемешивания. (Внимание: стержень магнитной мешалки не должен касаться датчика проводимости!).
- С помощью микролитрового шприца добавьте 50 мкл уреазного раствора и сразу начните измерение, нажав кнопку "Пуск".
- За ходом реакции можно визуальнo следить на мониторе.
- После завершения измерения сохраните данные для дальнейшей обработки.

Выполнение работы (2/2)

PHYWE
excellence in science

- Таким же образом проводятся измерения со всеми шестью приготовленными растворами мочевины (в порядке возрастания).
- При каждом отдельной измерении мензурка снимается с магнитной мешалки, а стержень магнитной мешалки удаляется из раствора с помощью стержня для удаления.
- Стержень магнитной мешалки необходимо тщательно промыть дистиллированной водой, ненадолго просушить бумажным полотенцем и поместить в следующий раствор.
- После каждого эксперимента зонд проводимости также следует промыть дистиллированной водой.

PHYWE
excellence in science

Протокол

Задача 1

Заполните пробелы в тексте

При ферментативном гидролизе мочевины в водном растворе получаю [] и аммиак. [] этих соединений увеличивают [] раствора. Измерения проводимости могут быть использованы для определения скорости гидролиза мочевины ферментом [] при различных концентрациях субстрата. [] может быть рассчитана на основе этих значений.

Ионы

уреазы

углекислый газ

проводимость

Константа Михаэлиса

 Проверить

Задача 2

Что означает небольшое значение константы Михаэлиса?

Небольшое значение константы Михаэлиса означает, что фермент имеет высокое сродство к своему субстрату.

Небольшое значение константы Михаэлиса означает, что фермент имеет низкое сродство к субстрату.

Небольшое значение константы Михаэлиса не имеет значения для ферментно-субстратных отношений.

Небольшое значение константы Михаэлиса означает, что фермент ничего не может сделать с субстратом, и необходимо выбрать другой фермент.

Задача 3

Выберите правильные утверждения.

- Константа Михаэлиса указывает концентрацию субстрата, при которой достигается максимальная скорость фермента.
- Константа Михаэлиса всегда равна 50.
- Константа Михаэлиса указывает концентрацию субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости фермента.

✓ Проверить

Слайд	Оценка/Всего
Слайд 23: Михаэльская константа	0/5
Слайд 24: Значение константы Михаэлиса	0/2
Слайд 25: Заявления по поводу Михаэлисской константы	0/1

Всего  0/8

👁 Решения

🔄 Повторить