

Pracownia biochemiczna

– arkusz zadań z miejscami do udzielenia odpowiedzi

Zanim zaczniesz rozwiązywać zadania, wpisz swoje imię i nazwisko oraz nr PESEL.

Imię i nazwisko

PESEL

Informacje dotyczące pracowni biochemicznej

Zanim zaczniesz rozwiązywać zadania, zastąp „nnnnnnnnnnn” w nazwie tego pliku swoim numerem PESEL. Po zakończeniu egzaminu niezwłocznie prześlij ten plik opiekunowi.

Zadanie 1. (30 pkt)

Identyfikacja typu inhibicji reakcji enzymatycznej oraz wyznaczenie stałej inhibitorowej K_i .

Wprowadzenie

Badano wpływ związku X na aktywność enzymu dehydrogenazy alkoholowej. Stwierdzono, że związek X jest inhibitorem badanego enzymu. W celu określenia mechanizmu działania inhibitora oraz wyznaczenia stałej inhibitorowej K_i , zmierzono szybkość początkową reakcji enzymatycznej dla różnych stężeń początkowych substratu (od 0,5 do 10 mM) w obecności rosnących stężeń związku X (od 0,05 do 1 mM).

Twoim zadaniem jest analiza danych pomiarowych w celu określenia typu inhibicji oraz stałej K_i dla związku X.

Aby poprawnie rozwiązać zadanie należy najpierw wyznaczyć wartości parametrów kinetycznych K_M i V_{max} stosując metodę Lineweavera-Burka, która polega na przekształceniu równania Michaelisa-Menten do postaci liniowej (równanie prostej $y = ax + b$), dla wszystkich stężeń związku X:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

gdzie: V_0 – szybkość początkowa reakcji [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]; V_{max} – szybkość maksymalna reakcji [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]; $[S]_0$ – stężenie początkowe substratu [mM]; K_M – stała Michaelisa [mM].

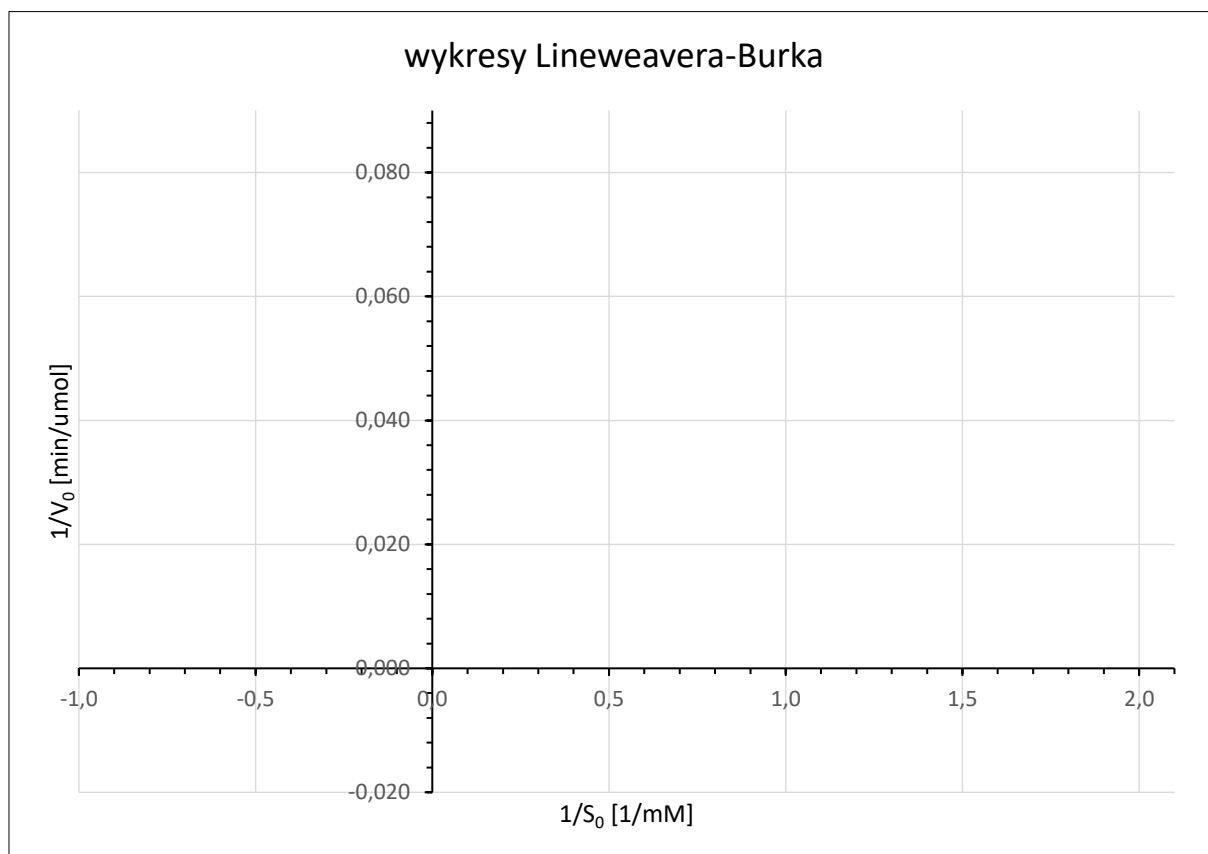
W celu wyznaczenia wartości stałej K_i należy wykonać wykres:

- 1) K_{MP} w zależności od stężenia inhibitora – w przypadku inhibicji współzawodniczej,
- 2) $1/V_{maxP}$ w zależności od stężenia inhibitora – w przypadku inhibicji niewspółzawodniczej,
- 3) $1/K_{MP}$ w zależności od stężenia inhibitora – w przypadku inhibicji awspółzawodniczej.

Wartości K_{MP} i V_{maxP} oznaczają, odpowiednio, wartości stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej w obecności inhibitora (tak zwane wartości pozorne K_M i V_{max}). Po naniesieniu punktów na układ współrzędnych należy dopasować do nich linię prostą. Przecięcie linii prostej z osią X odpowiada wartości – K_i .

Zadanie 1.1. (10 pkt)

Na podstawie danych z tabeli 1. (patrz ostatnia strona tego pliku; dane są dostępne także w pliku „bioch-dane.csv”) oblicz w poniższym układzie współrzędnych równania prostych Lineweavera-Burka dla reakcji enzymatycznych przeprowadzonych bez substancji X oraz przy wzrastających stężeniach tej substancji. Wartości współczynnika kierunkowego prostej i punktu przecięcia z osią rzędnych podaj z dokładnością do czterech miejsc po przecinku.



Stężenie związku X [mM]	Współczynnik kierunkowy prostej	Punkt przecięcia z osią rzędnych
0		
0,05		
0,1		
0,5		
1		

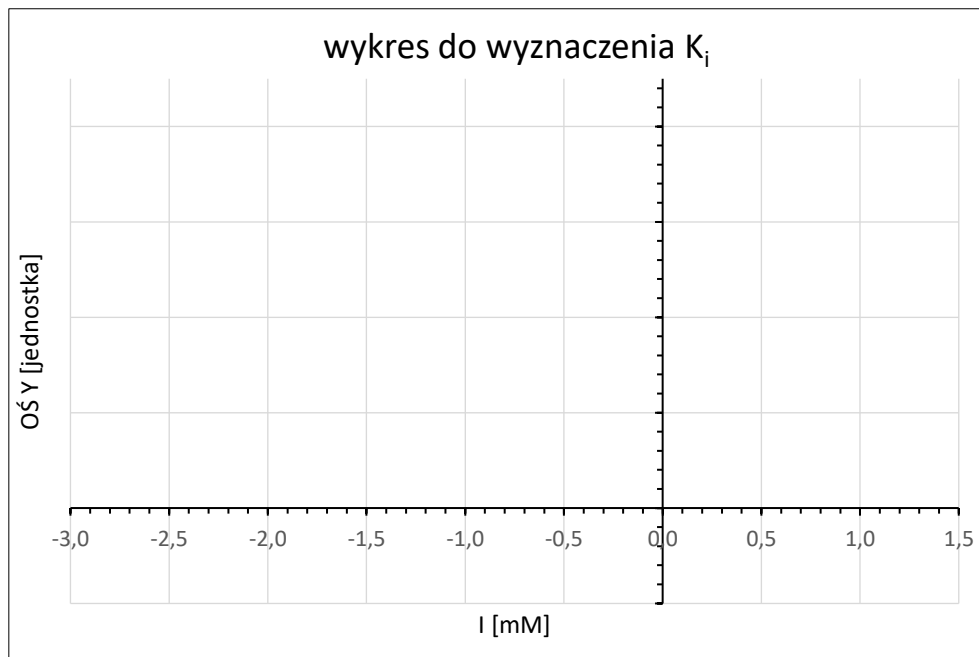
Zadanie 1.2. (16 pkt)

Wykorzystując wykresy Lineweavera-Burka z zadania 1.1., wypełnij tabelę i wyznacz wartości K_M i V_{max} oraz K_{MP} i V_{maxP} (wszystkie z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku) dla reakcji enzymatycznej przy braku, jak i w obecności wzrastających stężeń substancji X, a następnie określ rodzaj inhibicji, który wykazuje substancja X.

Stężenie związku X [mM]	Punkty przecięcia prostych (z dokładnością do trzech miejsc po przecinku)		K_M	V_{max}
	z osią X	z osią Y		
0				
 	 	 	K_{MP}	V_{maxP}
0,05				
0,1				
0,5				
1				
Substancja X wykazuje inhibicję (określ typ inhibicji jednym słowem)				

Zadanie 1.3. (4 pkt)

Wykorzystując wartości K_{MP} i V_{maxP} z zadania 1.2. oraz informacje ze wstępu do zadania, oblicz w poniższym układzie współrzędnych równanie prostej konieczne do wyznaczenia wartości K_i .



Zadanie 1.3.1.

Określ parametr, którego wartość na osi Y należy odczytać w celu wyznaczenia wartości K_i .

- A. K_{MP}
- B. $1/V_{maxP}$
- C. $1/K_{MP}$

Zadanie 1.3.2.

Podaj równanie prostej konieczne do wyznaczenia wartości K_i oraz wartość K_i dla związku X z dokładnością do jednego miejsca po przecinku wraz z jednostką.

Równanie prostej konieczne do wyznaczenia wartości K_i	
Wartość K_i wraz z jednostką	

Tabela 1. Wartości szybkości początkowych reakcji dla różnych stężeń początkowych substratu w obecności wzrastających stężeń związku X.

Stężenie związku X [mM]	Stężenie początkowe substratu ($[S]_0$) [mM]	Szybkość początkowa reakcji (V_0) [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
0	0,5	25,05
	2,875	65,85
	5,25	77,93
	7,625	83,73
	10	87,13
0,05	0,5	24,14
	2,875	64,74
	5,25	77,08
	7,625	83,05
	10	86,57
0,1	0,5	23,3
	2,875	63,66
	5,25	76,24
	7,625	82,37
	10	86,01
0,5	0,5	18,22
	2,875	56,21
	5,25	70,14
	7,625	77,37
	10	81,8
1	0,5	14,31
	2,875	49,03
	5,25	63,76
	7,625	71,91
	10	77,08