

2015 年第廿六屆國際生物奧林匹亞競賽 --實作試題(4)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

簡介

目的

本測驗將分析在有無添加抑制劑時的酵素動力學。

本測驗將分成兩大部分，每個部分再分成三小部分。

第一部分（57.5 分）

- 1.1. 簡介酵素動力學（理論）（0 分）
- 1.2. 利用合成受質模擬物 pNP-Gal 在實驗室來分析工業用的 α -半乳糖苷酶酵素動力學實驗，（問題 1-2；40 分）
- 1.3. 關 α -半乳糖苷酶酵素動力學數據分析（問題 4-11；17.5 分）

第二部分（42.5 分）

- 2.1. 簡介酵素抑制劑（理論）（問題 11-13；2 分）
- 2.2. 有關 α -半乳糖苷酶抑制實驗（實驗室階段）（問題 14；27 分）
- 2.3. 有關 α -半乳糖苷酶抑制動力學數據的分析（問題 15-20；13.5 分）

開始進行前，我們建議您將整個題目從頭至尾瀏覽一遍。由於實驗操作部分佔最大的得分，我們建議您先行操作問題1.2 與2.2 後，再進行計算題與理論題部分。

材料與設備

首先，確認在你面前所有的材料項目是否完備。如果有任何缺損，請舉手。
實驗開始15分鐘後，將不予以補發。

- A. 一支p200微量吸管，範圍20-200 μ L
- B. 一支p1000微量吸管，範圍201-1000 μ L
- C. 一盒（96 支）p200微量吸管用的吸管尖
- D. 一盒（96 支）p1000微量吸管用的吸管尖
- E. 多過30個1.5 ml的微量離心管
- F. 一個微量離心管試管架
- G. 二個微量滴定盤，上面有註記你的國家碼+A或B
- H. 一個微量滴定盤位置表
- I. 一個計時器
- J. 一支鉛筆
- K. 一支簽字筆
- L. 一個計算機
- M. 一把尺
- N. 粉紅色卡紙，與試務人員聯絡用
- O. 9 ml 2M Na₂CO₃（停止液）
- P. 6.5 ml 15mM pNP-Gal（受質）
- Q. 15 ml 超純水（水）
- R. 5ml 1mM pNP（標準品）
- S. 2 ml 0.024 mg/ml（酵素）
- T. 5 ml 0.5 M（抑制劑）
- U. 一支平板電腦觸控筆

1.1. 簡介酵素動力學

α -半乳糖苷酶能催化水解 α -半乳糖苷上終端的半乳糖苷殘基的反應。可以使用合成受質模擬物 para-nitrophenyl- α -galactoside (pNP-Gal) 分析這些酵素的活性，酵素能將其分解成為半乳糖與 para-nitrophenyl (pNP) (圖 1.1)。pNP-Gal 是一無色物質，受分解後的 pNP 會呈現黃色，pNP 在 405 nm 具有一吸收峰。因此，能藉由微量滴定盤分析儀讀取在 405 nm 下的吸收值，進行酵素定量的測試。

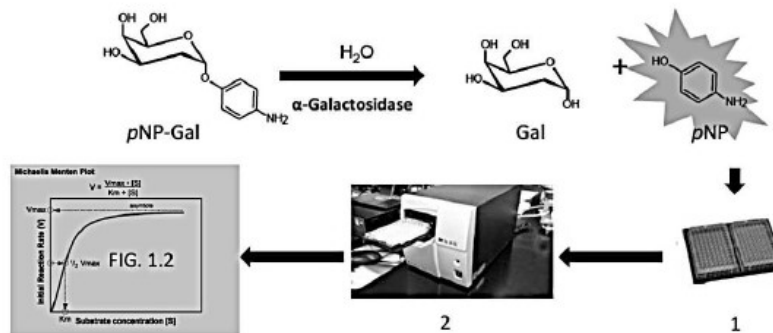


圖 1.1: α -半乳糖苷酶活性測試圖例。pNP 可以利用微量滴定盤分析儀(2) 在 405nm 波長下的吸收值進行定量分析。酵素活性測定可以藉由標準曲線的吸收值轉換成為濃度。實驗將在微量滴定盤(1) (材料G) 上進行。

在第一部分中，進行受質濃度與水解速率的研究。並用 Michaelis-Menten 曲線 (圖 1.2) 來描述兩個重要影響因子 V_{max} 與 K_m 的關係 (見圖 1.2 說明)。

起始反應速率 V_0 可以藉由 $\Delta [P] / \Delta t$ 來獲得。係指單位時間內 (Δt) 產物濃度的變化 ($[P]$)。

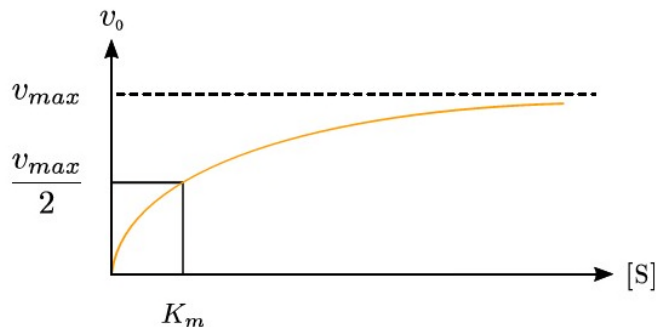


圖 1.2: Michaelis-Menten 曲線，係參考最初反應速率 V_0 與受質濃度 $[S]$ 的圖形。 K_m 是最大酵素反應速率一半時的受質濃度， V_{max} 則是反映了受質在飽和使用另一種 Lineweaver-Burk 曲線，可以從 X 與 Y 軸得截距算出 V_{max} 與 K_m 值 (圖 1.3)。Lineweaver-Burk 曲線可以由起始濃度 V_0 與受質濃度 $[S]$ 的倒數中 ($1/V_0$ 與 $1/[S]$) 繪得。

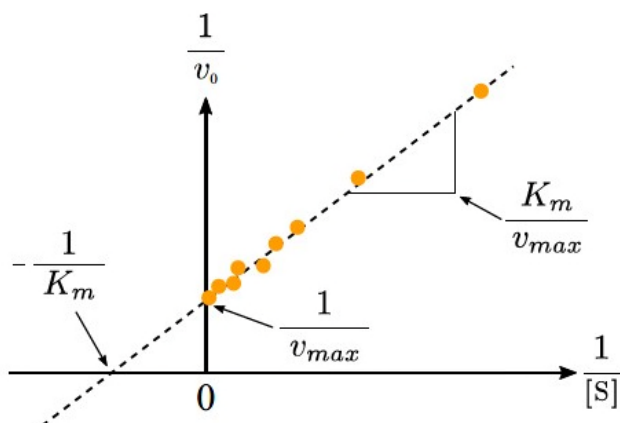


圖 1.3：Lineweaver-Burk 曲線，可以藉由不同受質濃度下的 V_0 來製作。 K_m 值可以藉由 X 軸截距的倒數獲得， V_{max} 值可以藉由 Y 軸截距的倒數獲得。這些截距的數值可以經由線性的公式計算後得到。

1.2 工業用 A-半乳糖苷酶的酵素動力學實驗

1.2.1 標準曲線

為了畫出標準曲線，稍後將進行酵素反應產物 pNP 的濃度測定。為了要得到標準曲線，利用（停止液）來稀釋 1mM pNP（標準品）。

Q1：標準曲線稀釋計畫

問題：利用（停止液）來稀釋 1mM pNP（標準品），以得不同濃度的標準樣本。請計算標準樣本總體積為 $500 \mu\text{l}$ 中 pNP（標準品）與（停止液）的體積，並將數據填入下表（表 1.1）。

表 1.1

Tube label	St1	St2	St3	St4	St5
[pNP] standard (mM)	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Volume of standard stock solution (Standard) (μl)					
Volume of stop reagent (Stop) (μl)					

標準曲線製備步驟：

- 取 5 支 1.5 ml 微量離心管，利用簽字筆參照表 1.1，分別標記上 St1 到 St5。
- 參照表 1.1 的計算結果，分別將不同體積的 1 mM pNP（標準品）加到上述的 1.5 ml 微量離心管（使用同一支吸管尖）中。
- 參照表 1.1 的計算結果，分別將不同體積的（停止液）加到上述的 1.5 ml 微量離心管中。請將這些標準液樣本的微量離心管蓋好，上下搖盪混合 5 次。
- 分別取 100 μ L 超純水（水）加到微量滴定盤 A 上 A1-B5 的位置（使用同一支吸管尖），參考圖 1.4 或利用微量滴定盤位置表協助你添加到正確的位置。
- 參照表 1.1 的計算結果，分別將 50 μ L 不同濃度的 pNP 標準液樣本加到同一個微量滴定盤的孔洞中。（下標 I 與 II 係代表相同的溶液，但是進行重複實驗，見圖 1.4）。
- 利用 p1000 微量吸管吸取 100 μ L（停止液）到 A1-A5 與 B1-B5 的每個 pNP 標準液樣本孔洞中。並利用上下吹吸溶液的方式進行混合，計兩次。

Plate A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St _I 1	St _I 2	St _I 3	St _I 4	St _I 5							
B	St _{II} 1	St _{II} 2	St _{II} 3	St _{II} 4	St _{II} 5							
C						Standard curve						
D												
E												
F						Kinetics experiment						
G	S _I 1	S _I 2	S _I 3	S _I 4	S _I 5							
H	S _{II} 1	S _{II} 2	S _{II} 3	S _{II} 4	S _{II} 5							

圖 1.4：微量滴定盤 A：St，標準液樣本（表 1.1）；S，不同受質濃度的反應混合物。（下表 1.2）

進行 1.2.2 部分。至此，你已經完成酵素溶液混合物在微量滴定盤中。

請注意，在考試結束前 10 分鐘將不接受任何的微滴定盤量量測。開始進行以下實驗，若你覺得無法及時完成實驗 1.2.2 時，可舉起你的粉紅色卡片，並提交滴定盤。結果將會顯示在問題 2 中。

1.2.2 酵素動力學實驗

步驟：

- 取5 支1.5 ml 微量離心管，利用簽字筆參照表1.2，分別標記上S1 到S5。
- 參照下表1.2 的說明，在1.5 ml 微量離心管進行操作。將15 mM pNP-Gal（受質）以超純水進行稀釋。製備好的受質稀釋溶液後，將微量離心管蓋好並上下搖盪混合5 次。

表1.2：動力分析實驗所使用的受質溶液稀釋表

Tube label	S1	S2	S3	S4	S5
Volume (μ l) of 15 mM pNP-Gal (Substrate)	40	120	240	400	800
Volume (μ l) of ultra pure water (Water)	960	880	760	600	200

- 參考表1.2，分別取50 μ L 受質稀釋溶液與50 μ L 超純水（水）加到微量滴定盤A 上G1-G5 與H1-H5 的孔洞位置（參考圖1.4 或利用微量滴定盤位置表協助你添加到正確的位置）。
- 將計時器設定在5 分鐘，當添加酵素溶液到第一個孔洞(SI1) 時，便立即按下計時器。請參照以下說明進行。
- 分別吸取50 μ L 的0.024 mg/ml α -半乳糖苷酶（酵素）到微量滴定盤A上G1-G5 與H1-H5 的孔洞位置，也就是SI1 到SII1，再以相似的次序與節奏，分別加到SII5。至此開始酵素反應（以下稱為酵素反應溶液）。操作過中，必須確認混合是否均勻，可以吸取50 μ l 的混合液，利用上下吹吸溶液的方式進行混合，計兩次。
- 經過5 分鐘的作用時間後，利用p1000 微量吸管吸取100 μ L 2 MNa₂CO₃（停止液），分別以相似的次序與節奏加入G1-G5 與H1-H5的孔洞中。利用上下吹吸溶液的方式進行混合，計兩次。

Q2：酵素動力學實驗

問題：當完成1.2.1 與1.2.2 的實驗後，請舉起你的粉紅色卡片，拿好你的微量滴定盤請助教進行測量。結果將會自動顯示於平板的表中。

請注意：助教將不會在考試結束前10 分鐘接受任何的微量滴定盤測量。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1.3 酵素動力學數據分析

你的問題將由 α -半乳糖苷酶水解受質的動力學參數來決定。首先利用表1.3進行產物 (pNP) 的標準曲線繪製。

利用標準曲線計算產物濃度，進一步將可以利用每個受質濃度獲得起始反應速率(V0)。有組類似的微量滴定盤A 的標準數據在表1.3，可以方便計算。這是用於避免在1.2 部分發生錯誤使用。然而，你親自做出來的數據才會用於計算結果並評估你的考試成績。

表1.3：提供的吸光值數據（1-5 行的排列仿微量滴定盤）

	1	2	3	4	5
A	0.882	1.681	2.473	3.251	3.964
B	0.858	1.657	2.449	3.227	3.940
⋮					
G	0.304	0.728	1.049	1.272	1.512
H	0.307	0.716	1.009	1.234	1.466

Q3：標準溶液的平均吸光值

計算表1.3 的平均值，並用於標準曲線的繪製。將答案填入表中，到小數點後三位。

Tube label	St1	St2	St3	St4	St5
[pNP] (mM)	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Mean A_{405} nm of duplicates					

Q4：標準曲線線性公式

如下圖（圖1.5），以pNP (mM) 濃度對吸光值（ A_{405} nm 平均值計算，如問題4）。

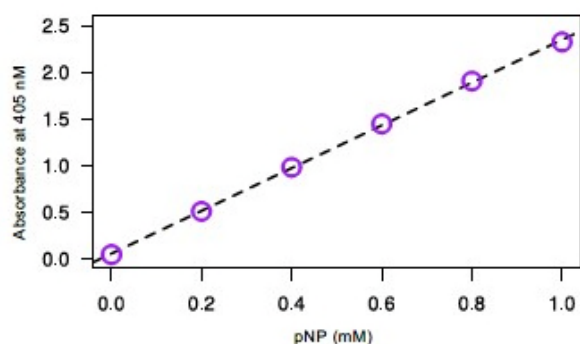


圖1.5：pNP 產物標準曲線。紫色圓圈代表平均吸光值，黑色虛線代表線性回歸結果。

問題：請利用兩組St1 到St5 的數值，利用數學方法計算標準吸光值線性公式中，a 與 b 的值。到小數點以下第三位。

A_{405} （波長405 nm 的吸光值單位）= a [pNP] + b，a 是斜率，b 是截距。

a (A_{405}/mM)	
b (A_{405})	

酵素反應混合物體積在實驗1.2.2 部分為 $150 \mu\text{l}$ 。

Q5：反應時間

問題：將反應時間單位轉換為秒。

Reaction time (seconds)	

Q6：分析動力學數據（未抑制酵素）

問題：利用下列標準曲線方程式分別計算每個反應混合物的產物濃度

反應初始濃度 V_0 可以被 $\Delta [P]/\Delta t$ 決定。即，單位時間內 (Δt) 所改變的產物濃度 $[P]$ 。

表 1.5：分析未抑制數據

Tube label	S1	S2	S3	S4	S5
Volume of Stock solution (Substrate) (μl) (from table 1.2)	40	120	240	400	800
Volume of ultra pure water (Water) (μl) (from table 1.2)	960	880	760	600	200
Substrate concentration [S] prior to adding into the reaction mixture (mM)					
Substrate concentration [S] in reaction mixture (mM)					
Mean A_{405} absorbance, calculated from Table 1.3					
$[\text{Product}_{\text{mean}}]$ (mM)					
V_0 ($\mu\text{M}/\text{second}$)					
$1/[S]$ (1/mM)					
$1/V_0$ (second/ μM)					

Q7：Michaelis-Menten 參數（圖形估測）

下圖（圖1.6）為Michaelis Menten 的理論圖（ V_0 與 $[S]$ ）雷同於表1.3 的S1-S5。

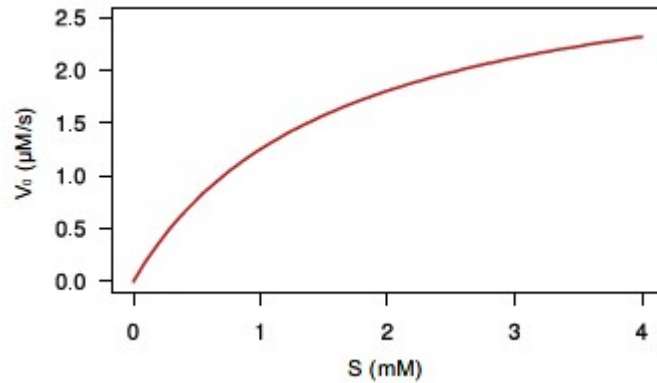


圖1.6：Michaelis Menten 的理論圖。為缺乏抑制劑的動力學實驗。

問題：利用Michaelis-Menten 圖形（圖1.6），推估 V_{\max} 與 K_m 的值。請計算到小數點後一位。

V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	
K_m (mM)	

Q8：Lineweaver-Burk 線性公式

下圖（圖1.7）為利用表1.3 S1-S5 所做出的Lineweaver-Burk 圖形（ $1/V_0$ 與 $1/[S]$ ）。

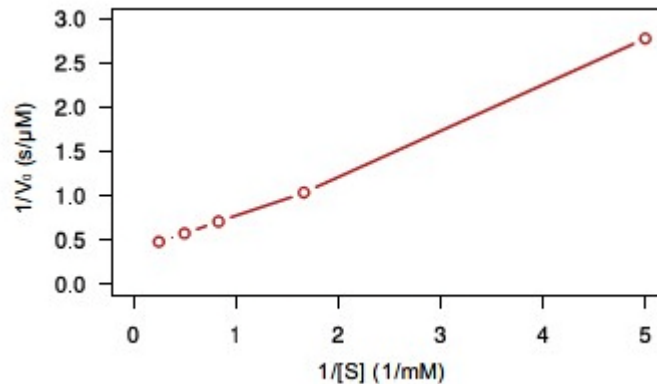


圖1.7：無抑制型酵素數據的Lineweaver-Burk 圖。

問題：請利用兩組S1 到S5 的數值，利用數學方法計算Lineweaver-Burk圖型的線性公式中，a 與b 的值。到小數點以下第三位。

$$1/[V] = a \cdot 1/[S] + b,$$

a (mM·s/μM)	
b (s/μM)	

Q9：V_{max} 與K_m 值的計算

問題：以軸的截距計算上述（問題8）的線性公式，並進行K_m 與V_{max}的計算。到小數點以下第三位。（本題無單位）。

V _{max}	
K _m	

Q10：反應混合物中的酵素濃度

計算酵素濃度（單位 μM），酵素濃度為0.024 mg/ml，酵素分子量為75000 gram/mole，到小數點以下第三位。

Enzyme stock (mg/ml)	0.024
[E] (μM) in reaction mixture (micro=10 ⁻⁶)	

Q11：轉換率常數

請以以下公式計算催化轉換常數k_{cat}（一個酵素分子的反應速率），單位為：單位／秒。

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]}$$

計算 k_{cat} ，到小數點以下第三位。

k_{cat} (1/second)	
----------------------	--

2.1 抑制劑的介紹

抑制劑是能專一性結合酵素因而降低其活性的化合物，會改變反應之 K_m 、 V_{max} 或二者。這些表觀動力參數的改變，可藉由酵素反應在抑制劑存在下的Lineweaver-Burk 作圖決定。可逆性的抑制劑可能是競爭性、非競爭性、或無競爭性，決定於它與目標酵素結合的方式。

酵素活性的抑制及動力參數的改變可由Michaelis-Menten 及Lineweaver-Burk 作圖看出(圖2.1)。

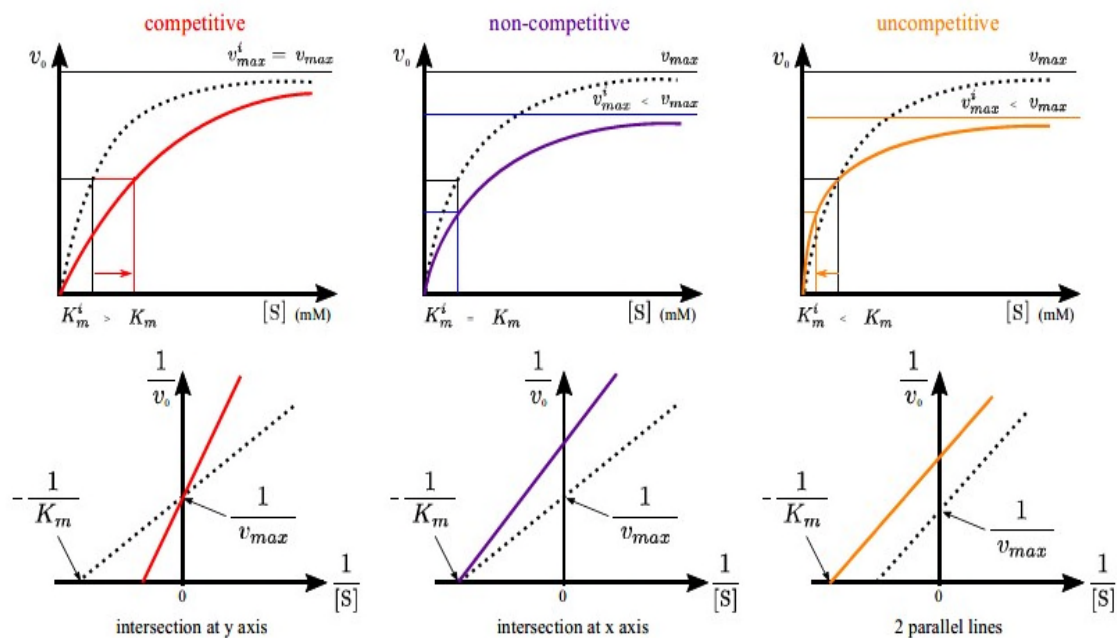


圖 2.1：Michaelis-Menten 及 Lineweaver-Burk 作圖與酵素活性的抑制。黑色的虛線為無抑制劑，實線為有抑制劑。 V_0 為起始反應速率。

抑制劑的特徵可以由各自的抑制平衡常數 K_i 來決定，其定義如下：

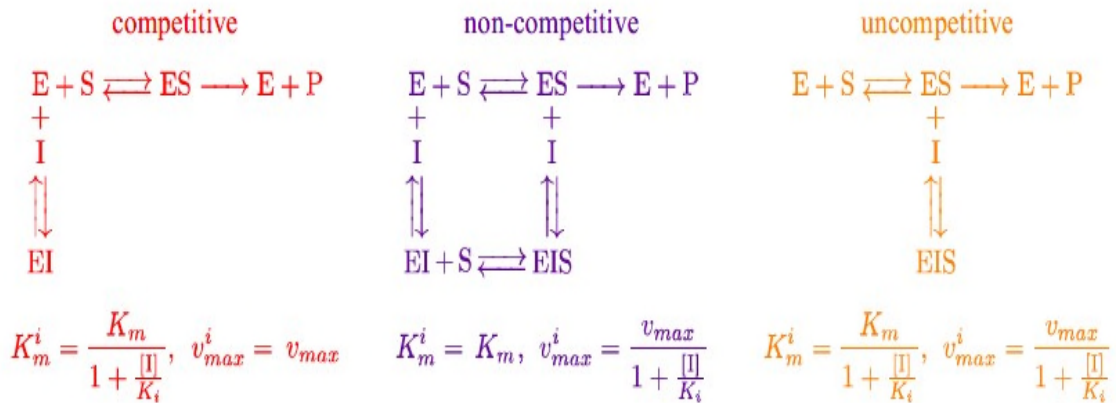
$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]}$$

此處 [I]、[E] 及 [EI] 分別代表游離抑制劑、游離酵素及酵素－抑制劑複體的濃度。

對競爭性抑制而言，抑制劑存在時的表觀 K_m 被定為 K_m^i 。受質 (S) 和抑制劑 (I) 結合到酵素 (E) 的化學平衡式如下所示。 K_m 與 K_m^i 的相關性根據下面的公式：

對非競爭性抑制而言，抑制劑存在時的表觀 V_{max} 被定義為與 V_{max}^i 。 V_{max}^i 與 V_{max} 的相關性根據下面的公式：

對無競爭性抑制而言，抑制劑存在時的表觀 K_m 及 V_{max} 被定義為與 K_m^i 與及 V_{max}^i 的相關性根據下面的公式：



公式 2.1：受質 (S) 和抑制劑 (I) 結合到到酵素 (E) 的化學平衡式，圖形上半部顯示在不同類型抑制圖。下半部分則顯示表觀動力參數變化與抑制劑濃度和抑制常數平衡方程式的關係。

【待 續】