

2015 年第廿六屆國際生物奧林匹亞競賽 --實作試題(5)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

Q12：影響抑制的因素

問題：對於所有的抑制類型，抑制的程度(即酵素反應速度的降低)是依賴。於下列何者：(選擇下面最好的答案)。

1. INHIBITOR CONCENTRATION [I]
抑制劑的濃度 [I]

2. SUBSTRATE CONCENTRATION [S]
受質濃度 [S]

3. K_i OF THE INHIBITOR
抑制劑的 K_i

4. CONCENTRATION OF [ES]
[ES] 的濃度

5. STATEMENTS 1, 2 AND 3
敘述 1, 2 及 3

6. STATEMENTS 1 AND 3
敘述 1 及 3

Q13：競爭性抑制特徵

指出下列的敘述正確或錯誤。

在競爭性抑制作用，受質濃度[S] 增加時會減少或克服抑制效果。

正確() 錯誤()

2.2 ALPHA-半乳糖苷酶的抑制(27 分)

這部分實驗與Part 1b相似。在50 μ L抑制劑存在下進行 α -半乳糖苷酶抑制動力學實驗，其濃度為0.5 M (mole/Liter)。

步驟

抑制動力學實驗受質的製備

- 根據表2.1 製備受質溶液，與你做的1.2.2 部分相似。記住要左右顛倒轉動試管5 次混合溶液。

表2.1：動力學分析的受質稀釋計畫

Tube label 編號	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
Volume (μ l) of substrate stock solution (Substrate) (受質) 體積 (μ l)	80	160	320	600	840
Volume (μ l) of ultra pure water (Water) 超純水(水) 體積 (μ l)	920	840	680	400	160

- 使用相同的吸管尖，在微量滴定盤B 的A1到A5和B1到B5各孔洞中加入50 μ L 的(抑制劑)。(參考圖2.2 或利用微量滴定盤位置表協助添加到正確的位置)。
- 將每個最後受質溶液50 μ L 加入到相同孔洞位置(A1-A5 和B1-B5)中(表2.1)。

滴定盤 B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IS _I 1	IS _I 2	IS _I 3	IS _I 4	IS _I 5							
B	IS _{II} 1	IS _{II} 2	IS _{II} 3	IS _{II} 4	IS _{II} 5							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

圖 2.2：微量滴定盤B：IS為樣本為在不同受質濃度的抑制劑存在下的反應混合物(見上述的表2.1)。

- d. 將計時器設定在5 分鐘，當添加酵素溶液到第一個孔洞(ISI1) 時，便立即按下計時器。請參照以下說明進行。
- e. 分別吸取50 μL 的 α -半乳糖苷酶(酵素)到微量滴定盤A 上A1 到A5 和B1到B5 的孔洞位置，也就是ISI1 到ISII1，再以相似的次序與節奏，分別加到ISIII5。至此開始酵素反應。

加入酵素後，立即將50 μL 的混合物以快速但溫柔的上下吹吸兩次，以確保均勻的混合。

- f. 經過5 分鐘的作用時間後，利用p1000 微量吸管吸取100 μL (停止液)停止各酵素反應，分別以相似的次序與節奏加入A1 到A5 和B1到B5 的孔洞中。利用上下吹吸溶液的方式進行混合，計兩次。

Q14：酶抑制動力學實驗

問題：舉起你的粉紅色卡片，繳交含有你2.2 部分樣品的微量滴定盤。測量過後，所得的數值將自動顯示在平板的表中。請使用下表所給的標準資料（表2.2）計算。

注意：考試的最後10 分鐘內將不再接受微量滴定盤！

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

2.3 有關A-半乳糖苷酶的抑制動力學數據分析

本小節將利用理論部分2.1 與來自實驗部分2.2 的抑制數據（見下表2.2）計算在添加抑制劑下酵素動力學的參數。

Lineweaver-Burk 公式的抑制數據將與題目所提供的假設無抑制反應下演繹之抑制類型的理論Lineweaver-Burk 公式進行比較。

當要確定抑制類型時，你將會使用兩個Lineweaver-Burk 公式（假設的環境為無抑制並添加抑制劑）進行動力參數以及抑制平衡參數(K_i) 的測定。

表2.2：抑制實驗的吸光值數據（前兩行與列雷同於微量滴定盤上的數據）

	1	2	3	4	5
A	0.251	0.375	0.507	0.596	0.634
B	0.252	0.380	0.501	0.598	0.635

Q15：抑制動力學數據分析

問題：計算並填入下表。為了計算產物濃度(mM)，請使用問題6 的標準公式。

$$\text{Absorbance } A = 2.29 * [\text{pNP}] \text{ (mM)} + 0.058$$

Tube label	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
Volume (μl) of Stock solution (Substrate) (from table 2.1)	80	160	320	600	840
Volume of (μl) ultra pure water (Water) (from Table 2.1)	920	840	680	400	160
Substrate concentration [S] prior to adding into the reaction mixture (mM)					
Substrate concentration [S] in reaction mixture (mM)					
Mean A_{405} absorbance from table 2.2					
[Product] _{mean} (mM)					
V_0 ($\mu\text{M}/\text{second}$)					
$1/[S]$ (1/mM)					
$1/V_0$ (second/ μM)					

利用表 2.2 中 IS1-IS5 的數據進行 Lineweaver-Burk 圖形的繪製。未抑制反應下的假設 Lineweaver-Burk 公式為 $1/[V_o] = 0.363 \cdot 1/[S] + 0.908$ ，圖形請見圖 2.3。所提供的公式僅供以下計算使用，並不能作為題目部分 1.3 的測定（圖 1.7）。

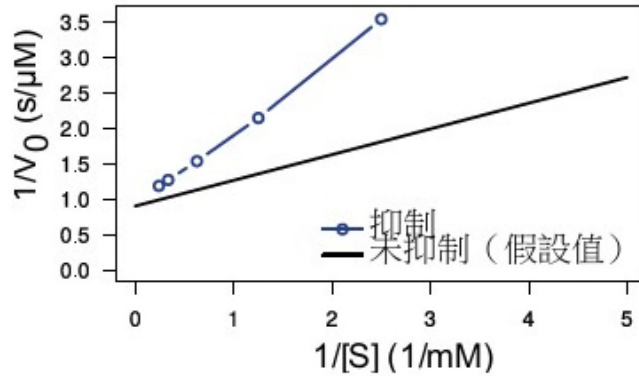


圖 2.3：Lineweaver-Burk 圖形，抑制數據與假設抑制數據。

Q16：Lineweaver-Burk 線性公式（抑制反應）

問題：利用 IS1 到 IS5 的數據，有抑制劑存在的條件下，以數學方式計算出 Lineweaver-Burk 圖形的線性方程式。求出 a 與 b 的值，到小數點後第三位。

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

a (mM·s/μM)	
b (s/μM)	

Q17：添加抑制劑的表觀動力學參數

問題：自 Lineweaver-Burk 圖形中測量添加抑制劑的表觀動力學參數。請到小數點後三位。（本題無單位）

V_{max}^i		
K_m^i		

Q18：抑制的類型

問題：有關 α -半乳糖苷酶抑制劑屬於何種類型？基於有抑制劑參與時動力參數的改變，並與未被抑制酵素的理論值進行比較，選出最類似的抑制類別。

1. COMPETITIVE 競爭型

2. NON-COMPETITIVE 非競爭型

3. UNCOMPETITIVE 無競爭型

Q19：受質濃度的影響

問題：基於上述所選擇的抑制類型，當受質濃度增加時，對於抑制效果的影響為何？請自以下敘述中選出正確答案。

1. LESS INHIBITION 輕微抑制

2. NO CHANGE 沒有改變

3. MORE INHIBITION 嚴重抑制

Q20：抑制常數

問題：測定抑制常數(K_i)，假設抑制劑體積為 $50 \mu\text{L}$ 並加入反應混合物為 0.5M 。請到小數點後三位。(本題無單位)

Inhibitor concentration in the reaction mixture (mM) 反應混合物的起始濃度 (mM)	<input type="text"/>
K_i (mM)	<input type="text"/>

【完】