

S3 酵素動力學

莊榮輝

酵素動力學 是以各種濃度的基質，添加固定量酵素進行催化，然後檢定所得到的生成物多寡，即可測定在各種不同基質濃度下，酵素的表現情形。酵素抑制劑會阻礙酵素的表現，也可由酵素動力學的行為觀察之。

3.1 背景知識

酵素與其基質之間，具有專一性的結合與催化關係，這種行為可以用動力學的方法描述之，求得此酵素的最高催化速率，以及酵素與基質間的親和力。

3.1.1 Michaelis-Menten 動力學公式

酵素轉化酶 invertase 很早就被發現，可以把蔗糖水解成葡萄糖及果糖，由於反應前後這幾種糖類的旋光度有很大改變，好像把旋光度整個轉化過去，因此稱為轉化酶。

Michaelis及Menten利用轉化酶為工具，添加不同濃度的蔗糖進行酵素的催化反應，然後觀察所產生單糖的速率如何。他們發現，當基質的量越高，轉化酶催化反應的速率就越高，最後到達飽和最高速率；他們並且把這個關係，以數學公式寫出來，稱為Michaelis-Menten公式，並由作圖推出一個常數 K_m (Michaelis-Menten常數)，可指示酵素與基質之間親和力的大小；同時，也可推得此酵素的最高催化速率 V_{max} 。請複習生物化學課程中的相關文字，試著自行寫出Michaelis-Menten公式並解釋其意義。

3.1.2 酵素抑制劑

酵素有其專一性抑制劑，其分子構形大多類似酵素的基質，酵素可以與之結合，但是無法完成正常的催化反應。

3.1.3 實驗大綱

本實驗分成幾個部份：(1) 決定最適當的酵素濃度、(2) 傳統的酵素動力學操作、(3) 決定最適當的抑制劑濃度、(4) 添加抑制劑的酵素抑制動力學。

S3 酵素動力學

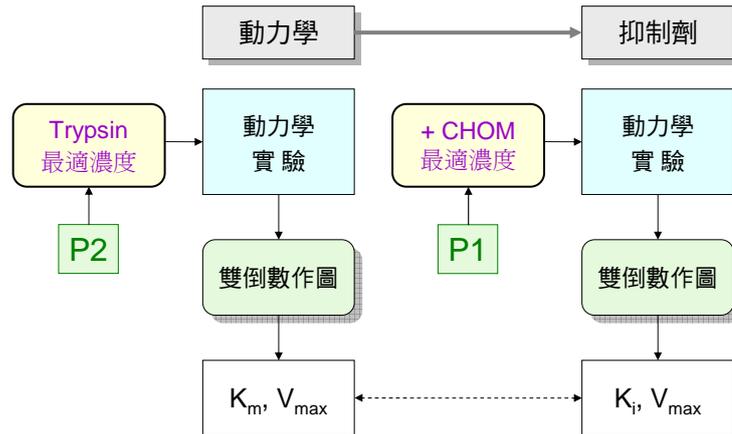


圖 S2-1 蛋白質轉印及免疫染色流程

3.2 酵素動力學

要先決定一個適當的酵素濃度，能夠產生足量的生成物以供測量，但又不會催化過度；然後固定使用此酵素濃度，加入各種不同量的基質，就可做出動力學曲線。

3.2.1 儀器設備

- a) ELISA 光度計。
- b) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate)。

3.2.2 藥品試劑

- a) Trypsin (由實驗 P2 所製備者，或者由助教提供)。
- b) Tris 緩衝液 (0.05 M, pH 8.2, 含 20 mM CaCl₂)。
- c) BAPNA 合成基質液：可被 trypsin 水解而呈黃色。

配製法：取 BAPA 43.5 mg 加入 1 mL DMSO 懸濁均勻，等約 1 h 完全溶解，慢慢滴入 100 mL Tris 緩衝液同時快速攪拌，讓兩者混合均勻。

3.2.3 實驗步驟：

決定最適酵素濃度

- 1) 取出你所製備的 trypsin，以 Tris 緩衝液做一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)；請加一空白組，直接以 Tris 緩衝液為樣本。
- 2) 在微量滴定盤上，每個濃度取樣 50 μL ，加入 200 μL BAPNA液，混合後反應 10 min，漸漸出現黃色，以ELISA光度計測吸光值 (A_{405})。
- 3) 取一酵素濃度，其 ELISA 吸光值最高，但又不超過 1 以上者，作為下面酵素動力學所指定的酵素濃度。

酵素動力學

- 4) 取 BAPNA 基質液，以 Tris 緩衝液作一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)。
- 5) 在微量滴定盤上，取上面指定濃度的酵素 50 μL ，加入BAPNA不同濃度稀釋液各 200 μL ，混合後反應 10 min，同法以ELISA光度計測吸光值 (A_{405})。

3.3 酵素抑制動力學

在反應中加入抑制劑，會改變酵素的動力學行為。同樣地，先決定一個最適的抑制劑濃度，可以抑制 50% 酵素活性，然後以此濃度進行抑制劑的動力學實驗。

3.3.1 儀器設備

同上一小節。

3.3.2 藥品試劑

- a) CHOM (由實驗 P1 所製備者)。
- b) 同上一小節。

3.3.3 實驗步驟：

決定最適 CHOM 濃度

- 1) 取出你所製備的 CHOM，以 Tris 緩衝液做一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)；請加一空白組，直接以 Tris 緩衝液為樣本。
- 2) 在微量滴定盤上，上述 CHOM 每個濃度取樣 10 μL ，加入 40 μL 指定濃度的 trypsin 溶液，混合均勻後，在室溫中靜置 10 min。
- 3) 加入 200 μL BAPNA液，混合後反應 10 min，漸漸出現黃色，以ELISA光度計測吸光值 (A_{405})。
- 4) 取一 CHOM 濃度，其 ELISA 吸光值最約為空白組吸光值的一半，作為下面酵素抑制動力學所指定的 CHOM 濃度。

酵素抑制動力學

- 5) 取 BAPNA 基質液，以 Tris 緩衝液作一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)。
- 6) 在微量滴定盤上，取上面指定濃度酵素 40 μL ，指定濃度 CHOM 10 μL ，混合均勻後在室溫靜置 10 min。
- 7) 同樣製作不加 CHOM 的反應，CHOM 以 Tris 緩衝液取代，如法操作。
- 8) 加入 BAPNA 不同濃度稀釋液各 200 μL ，混合後反應 10 min，同法以 ELISA 光度計測吸光值 (A_{405})。

3.4 結果與報告

3.4.1 酵素動力學

- a) 由動力學實驗得到一組數據，以基質濃度的改變為 x 軸，以所測得的吸光值為 y 軸直接作圖，應可得到一條動力學曲線。
- b) 一樣的數據，改以基質濃度的倒數為 x 軸，而以吸光值的倒數為 y 軸，得到雙倒數作圖，應該可得到一條直線。
- c) 由雙倒數直線，應該可推得 trypsin 的 K_m 及 V_{max} ，請注意兩者的單位為何。

3.4.2 酵素抑制動力學

- a) 由所得到的數據，同樣做出直接作圖，以及雙倒數作圖，但各有兩條線，其依為酵素的動力學曲線，另一為抑制劑的抑制曲線。
- b) 比較兩條雙倒數動力學曲線，並推得其 K_m 及 V_{max} 。

3.5 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 76~81

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.202-213