

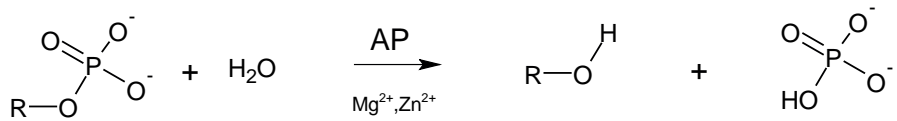
Alkalisk fosfatase i undervisningen

LARS BJARNE NIELSEN, Brøndby Gymnasium, MARIANNE SCHOU NIELSEN og MARIE EILAND, Køge Gymnasium

Kendskab til metoder og teorier inden for bioteknologi fylder mere og mere i undervisningen i gymnasiet. Katalysatorer og makromolekyler er en del af det obligatoriske stof i biologi, kemi og ikke mindst det nye fag bioteknologi. I biologi på højniveau og i bioteknologi kræves der kendskab til enzymkinetik. Der er derfor behov for simple, billige og hurtige metoder til målinger af enzymer og deres aktivitet. Især metoder, der kan tilpasses elevforsøg. KemiForlaget udgav for et par år siden hæftet ”Enzymkinetik”, der indeholder en grundig og fyldestgørende behandling af emnet, men de praktiske eksempler var få og især knyttet til Beta-galaktosidase (Lactase, Lactozym®). Det har imidlertid vist sig, at der er en del problemer ved arbejdet med enzymet, især stabilitetsproblemer. Derfor har vi ledt efter et alternativ. For at et enzym kan anvendes til elevøvelser skal det være robust, og det selv og de kemikalier, der indgår, skal være relativt billige. Basisk fosfatase (i det følgende AP for *Alkaline Phosphatase*) har i mange år været anvendt til bl.a. bioteknologisk forskning, og da det opfylder ovennævnte krav, er det velegnet i undervisningsøjemed.

Vi har derfor udviklet elevforsøg med AP fra kalve tarmepitel for elever på Biologi A, Kemi A eller Bioteknologi, der kan demonstrere en række vigtige pointer for enzymer: Enzymkinetik, betydningen af K_m og V_{max} , regulering af enzyms aktivitet samt anvendelse af enzymer som sygdomsmarkører. Dette kan evt. danne udgangspunkt for en række elevopgaver, hvorfor vi har henvisninger til nogle gode danske referencer, der kan anvendes i denne forbindelse. Som udgangspunkt har vi anvendt vejledninger med mere fra Biologisk Institut, Københavns Universitet (5).

Vi præsenterer i det følgende enzymet AP og dets muligheder i undervisningen sammen med nogle praktiske råd og anvisninger. Vi lægger mere udførlige vejledninger på adressen, der er nævnt til slut.

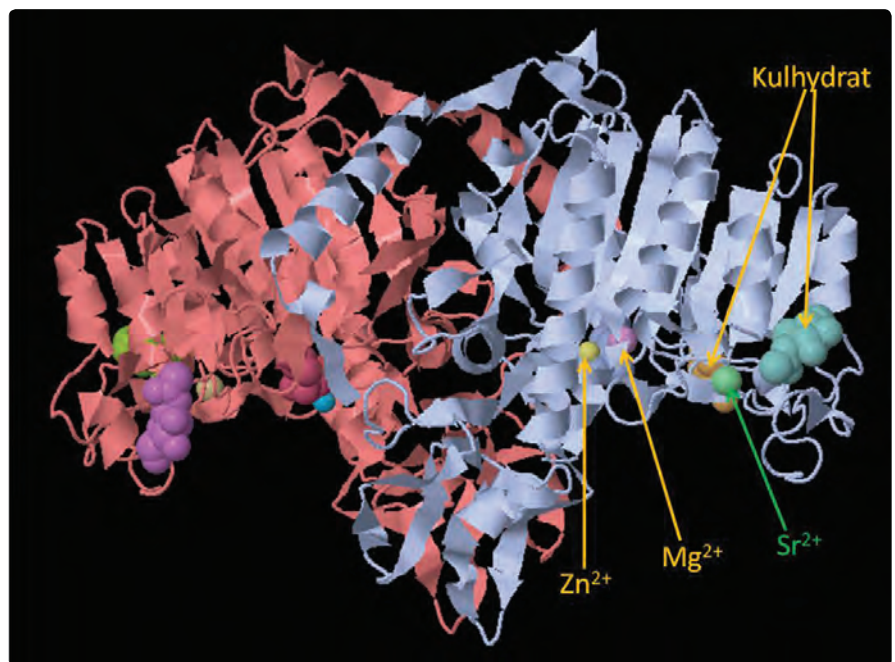


Alkalisk fosfatase er et relevant enzym at beskæftige sig med

AP, med det systematiske enzymnummer EC 3.1.3.1, er et enzym, der katalyserer hydrolyse af fosforsyreester-grupper, hvorved der dannes en alkohol- og en fosfatforbindelse, figur 1. Som det ses, er AP et metalloenzym, der kræver tilstedeværelse af divalente metalioner, Zn^{2+} og Mg^{2+} . Hvis R i figur 1 er 4-nitrofenyl, kan reaktionen følges ved fremkomst af det gulfarvede 4-nitrofenol (fosfatesteren er farveløs).

I den levende organisme kan AP som substrat anvende bl.a. DNA, små molekyler som fosfoethanolamin, uorganisk pyro-

Figur 2
Alkalisk fosfatase fra humant tarmepitel (PDB-fil nr. 2GLQ, hentet via PDBePISA). Enzymet er opbygget af to ens peptidkæder, der er markeret hhv. rød og blå. Placeringen af oligosakkarider samt zink- og magnesiumioner i det aktive enzym er vist for den ene peptidkæde. (Strontium hører ikke til proteinet i naturlig tilstand, men er indlejret i krystallen som markør).

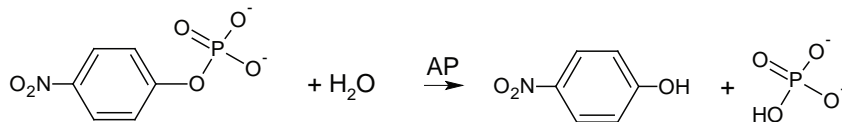


Figur 1
Hydrolyse af fosfatester med enzymet AP. R kan fx være en 4-nitrofenylgruppe.

fosfat (PP_i , som bl.a. frigives fra ATP) og pyridoxal-5'-fosfat.

AP findes overalt i bl.a. dyr og bakterier. I pattedyr er der flere isoenzymer, men vi begrænser os til omtalen af det vævsuspecifikke isoenzym, ALPL, og tarmepitelisoenzymet. AP syntetiseres i alle væv, men hos pattedyr herunder mennesker især i galde, lever, nyre, knogler og placenta (moderkagen). Den fysiologiske funktion af AP er ikke helt klarlagt, men det har blandt andet betydning i pattedyr for dannelse af knoglestrukturer ved at fjerne pyrofosfat, der hæmmer denne dannelse (8). Der er forhøjede værdier af serum-AP ved visse sygdomme, hvorfor det måles rutinemæssigt i forbindelse med visse lægelige undersøgelser.

AP har som navnet antyder basisk pH-optimum. Bakteriell AP har pH-optimum omkring pH 8,0, mens de to isoenzymer

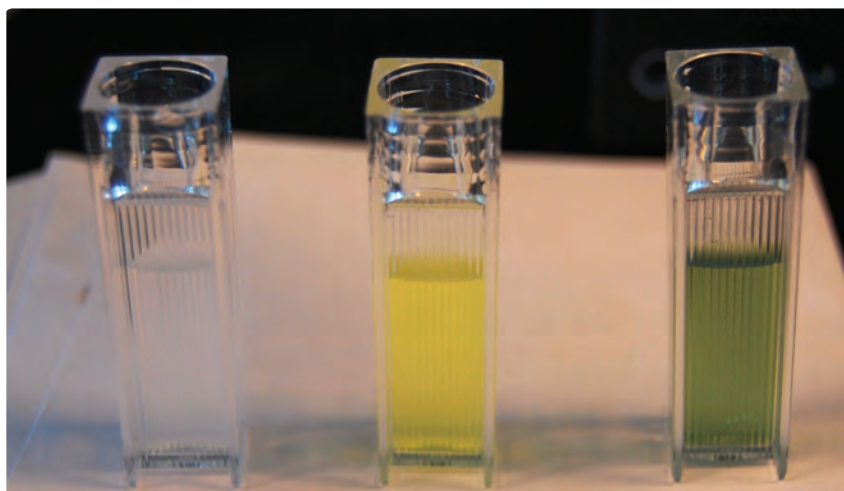


Figur 3
Hydrolyse af 4-nitrofenylfosfat (pNPP)
med enzymet AP.

fra pattedyr har optimum ved pH 9,8. Bemærk dog, at pH-optimum er afhængigt af såvel buffer som substrat. Bovint (kalve-) AP er opbygget som hos de øvrige pattedyr. Det er et glykoprotein, dvs. indeholdende kulhydrat. Figur 2 viser AP fra mennesker: Det er en dimer af to enzympolypeptidkæder. Hver peptidkæde har en molarmasse på 69000 g/mol (69 kDa) og indeholder to kulhydratenheder på hvert peptid ("N-glykosylering") samt en zink- og en magnesiumion. Under strukturoptegnelsen er enzymet derudover krystalliseret sammen med strontiumioner, der er indlejret i krystallen som markører.

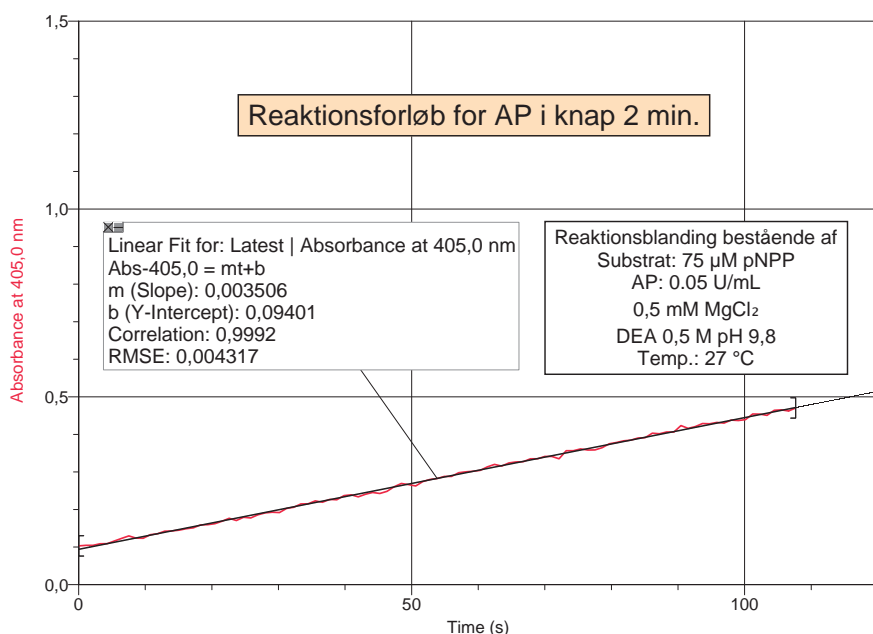
AP er et robust og termostabilt enzym, der er nemt at håndtere i laboratoriet. Det bruges i bioteknologien bl.a. til at fjerne fosfat fra proteiner og fra DNA for at undgå selvligering (ringslutning) og som markørenzym i enzymkoblede immunokemiske målemetoder, bl.a. ELISA. Her kan det anvendes til at synliggøre antigen-antistofreaktioner, idet det kan kobles til antistoffer ved hjælp af kovalente bindinger. Der findes en række farvedannende substrater til AP, der herefter kan påvise antistoffet.

Paranitrofenylfosfat, 4-nitrofenylfosfat eller pNPP er et velegnet substrat til at måle APs aktivitet ved pH 9,8, figur 3.



Figur 4
Reaktionen forløber i kuvetter med $v = 1,5$ mL. Det passer til en reaktionsblanding på 1 mL slutvolumen. Til venstre ses reaktionsblandingen før tilsætning af AP, i midten reaktionsproduktet, pNP, og til højre resultatet af tilsætning af Cu(II)-ioner. Den grønne farve skyldes en blanding af det blå diaminkompleks, der dannes af Cu(II) og amingruppen i DEA, og det gule pNP.

Figur 5
Reaktionsforløb for AP (Sigma-Aldrich # P6774) under forhold, der sikrer, at produktet dannelse foregår lineært over tid, her 2 min. Man siger, at reaktionen forløber i "Steady State". Enzym, substrat og buffer blev blandet i de forhold, der er angivet i boksen. Reaktionen forløb ved 27 °C.



pNPP spaltes af AP til 4-nitrofenol (pNP) og fosfat. pNP er gult, figur 4, med absorptionsmaximum ved 405 nm og en ekstinktionskoefficient ved pH 9,8 på $\epsilon_{405\text{nm}} = 18600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dannelsen af pNP kan derfor måles spektrofotometrisk ved at følge absorptionsændringen, ΔA , ved 405 nm, figur 5.

Måling af enzymer

Mængden af enzymer kan naturligvis angives ved massen i gram, men normalt anvendes enzymets aktivitet som mængdeangivelse. Denne er knyttet til forsøgsomstændighederne, og man kan ikke sammenligne to enzymeres aktivitet, hvis de ikke er bestemt på præcis samme måde, dvs. samme buffer, substrat, pH, temperatur, osv. Da hastigheden aftager, når substratkoncentrationen falder, bestemmes enzymaktivitet ud fra starthastigheden i reaktionens begyndelse, og den kaldes initialhastigheden, v_0 .

Kommercielt tilgængeligt alkalisk fosfatase karakteriseres gerne ved dets DEA-enheder, DEA-units. DEA er bufferen 0,5 M diethanolamin, 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8. Generelt gælder det, at 1 unit af et enzym er den mængde enzym, der på et minut danner et μmol produkt under forsøgsbetingelserne. Det forudsættes, at $[S] \gg [E]$.

1 DEA-unit AP er således den mængde alkalisk fosfatase der i DEA-buffer ved 37 °C danner 1 μmol 4-nitrofenol (pNP) ud fra substratet 4-nitrofenylfosfat (pNPP) (1).

Enzymets koncentration angives i U/L, mens reaktionens hastighed angives i den analoge enhed $\mu\text{M}/\text{min}$. Kan man (som vi) ikke arbejde i termostaterede kuvetter ved 37°C , skal man angive den aktuelle temperatur under forsøget.

Demonstration af reaktionens forløb og beregning af initialhastigheden, v_0

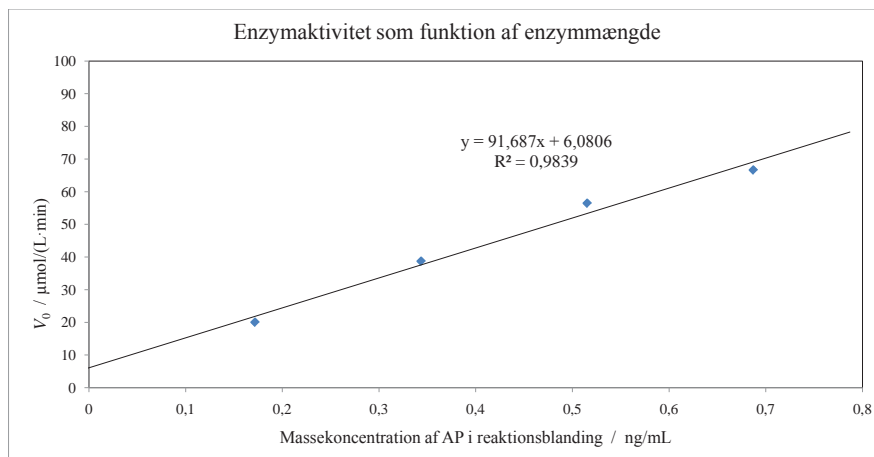
Nogle enzymer opfylder Michaelis-Mentens model for enzymreaktioner (7, 9). Et substrat, S , bindes til enzymet, E . Herved dannes et kompleks mellem enzym og substrat, ES , der fører til, at substratet omdannes til produktet, P , i reaktionen. Produktet frigives, og enzymet kan binde sig til et nyt substrat.



Bemærk, at modellen antager, at den første reaktion er reversibel, mens den anden er praktisk taget irreversibel. Modellen antager, at $[ES]$ er konstant under reaktionen, og at al enzym findes som E eller ES . Man siger, at reaktionen forløber i "Steady State" og den er praktisk taget en 0.-ordensreaktion. Dette opnås i praksis ved at sikre, at $[S] > [E]$. Når al enzym findes som ES , dvs. $[E] \ll [S]$, har vi nået V_{max} , som er den højeste opnåelige reaktionshastighed for reaktionen (ved de givne forhold).

Når man arbejder i "Steady State, $[S] > [E]$, vil reaktionsforløbet være lineært, hvorfor reaktionshastigheden kan bestemmes ud fra hældningen til et lineært fit for reaktionen, se figur 5. Her ses AP (fra Sigma-Aldrich # P6774), fortyndet til $0,05 \text{ U/mL}$, reagere med pNPP i koncentrationen $75 \mu\text{M}$ i DEA. Alle koncentrationer er slutkoncentrationer i kuvetten. Det ses, at reaktionen forløber praktisk taget lineært over ca. 2 min., og at et lineært fit giver en god model for forløbet og en forklaringsgrad på 0,9992. I det lineære område forløber reaktionen hurtigst under de givne betingelser. Denne reaktionshastighed kaldes initialhastigheden, v_0 .

Hvis reaktionen får lov at løbe videre, falder reaktionshastigheden, efterhånden som substratet opbruges. Grafen bøjer af. En grundig indføring i dette område gives i "Enzymkinetik" (7). Til første læsning kan anbefales Kend Kemien 3 (9). Hældningen på tangenten til kurven, der



Figur 6

Standardkurve for sammenhængen mellem enzymmængde og reaktionshastighed. På 1.-aksen ses slutkoncentrationen i reaktionsblandingen for tilsat AP i ng/mL , og på 2.-aksen ses den aflæste initialhastighed i U/L. Substratkoncentrationen er $1200 \mu\text{M}$ i reaktionsblandingen. Buffer er DEA + MgCl_2 , pH 9,8. $T = 27^\circ\text{C}$.

findes som $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ på det lineære stykke i begyndelsen af reaktionsforløbet (se figur 5), er et mål for reaktionshastigheden. $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ kan ved hjælp af ekstinktionskoefficienten omsættes til initialhastigheden, v_0 , i $\mu\text{M}/\text{min}$.

Initialhastigheden beregnes som

$$v_0 = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t}}{\epsilon_\lambda \cdot l}$$

For AP med pNPP som substrat og en lysvej på 1 cm fås derfor omregningen

$$v_0 = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t}}{\epsilon_\lambda \cdot l} = \frac{\text{Starthældning} \left(\text{s}^{-1} \right) \cdot 60 \left(\frac{\text{s}}{\text{min}} \right) \cdot 10^6 \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{M}} \right)}{18600 \left(\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right) \cdot 1 \text{ cm}} = \text{Starthældning} \cdot 3226 \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{min}} \right), \text{ ved 1 cm lysvej}$$

Eksemplet i figur 5 giver således $v_0 = 0,003506 \cdot 3226 \mu\text{M}/\text{min} = 11,3 \mu\text{M}/\text{min}$ eller $0,0113 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$.

Den tilsatte enzymkoncentration var $0,05 \text{ U/mL}$, så man kunne forvente, at $v_0 = 0,05 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$. Forskellen skyldes to ting: Temperaturen i reaktionsblandingen var 27°C , ikke 37°C , og substratkoncentrationen var ikke så høj, at al enzym var på formen ES . Vi arbejdede ikke ved V_{max} .

Man kan undre sig over, at reaktionen i figur 5 er lineær over så lang tid, da substratforbruget ændrer forholdet mellem $[E]$ og $[S]$, hvilket skulle sænke reaktionshastigheden. Der sker nok det, at kuvetten opvarmes i spektrofotometeret, hvilket øger hastigheden. Man skal derfor i praksis arbejde med kortere reaktionsforløb.

Bestemmelse af enzymmængder i prøver til for eksempel diagnoser

Når $[S] \gg [E]$, er v_0 proportional med $[E]$. Enzymmængden i en prøve med ukendt mængde enzym kan derfor bestemmes ud fra en (lineær) standardkurve med reaktionshastighed som funktion af kendte enzymmængder. I figur 6 ses et eksempel på en standardkurve, hvor forskellige mængder AP er tilsat reaktionsblandinger, der hver indeholder $1,2 \text{ mM}$ pNPP i DEA + MgCl_2 , hvorefter reaktionen er forløbet, og v_0 er bestemt for hver enkelt reaktion.

Det ses i figur 6, at der er en lineær sammenhæng mellem tilsat enzymmængde og den beregnede aktivitet indtil der er tilsat $0,5 \text{ ng/mL}$ AP. Og med en vis usikkerhed gælder det op til ca. $0,7 \text{ ng/mL}$. I dette område vil man altså i denne opsætning ($T = 27^\circ\text{C}$, $[S] = 1200 \mu\text{M}$) kunne aflæse enzymmængden i en prøve. Er man interesseret i at kunne bestemme større enzymkoncentrationer, skal prøven fortyndes yderligere før reaktionen. Man kan arbejde med højere substratkoncentrationer, hvilket udvider det lineære område.

Man kan naturligvis omregne enzymkoncentrationen fra massekoncentration til

aktivitet, når man kender den specifikke aktivitet for enzymet. Den er i dette tilfælde 2911 U/mg.

Denne metode har en praktisk anvendelse hos mennesker (6, 10), idet AP bestemmes rutinemæssigt i forbindelse med medicinske diagnoser, hvor AP tjener som markør for en række sygelige tilstande. Normalværdien for summen af aktiviteterne for alle isoenzymer AP i blodplasma er 35 – 105 U/L hos voksne. Værdien er højere hos børn i vækst samt hos gravide pga. udskillelse fra moderkagen. Forhøjede værdier i øvrigt kan skyldes en række sygdomme, fx blokering af galdevejene (fx galdesten), D-vitaminmangel, leverkræft, leverbetændelse, knoglemetastaser fra fx prostatakræft eller sygelige knogleforandringer (Pagets Sygdom). Der findes en mere udtømmende gennemgang i Lægehåndbogen (6).

Bestemmelse af K_M og V_{max} ved fit til Michaelis–Mentens ligning

Der er imidlertid en begrænsning i at bestemme enzymmængder ved substratkoncentrationer, der lader reaktionen forløbe ved V_{max} . Det kan både være dyrt i kemikalier og umuligt at opnå de meget høje substratkoncentrationer, der skal til for at bestemme V_{max} direkte.

Følger enzymet Michaelis–Mentens model, gælder Michaelis–Mentens ligning. Derfor kan man bruge Michaelis–Mentens ligning til at bestemme V_{max} indirekte. Herved får man også bestemt K_M . For en nærmere gennemgang af dette, se ”Enzymkinetik” (7) og ”GymnasieBIOS 2” (3).

K_M er groft sagt et mål for, hvor godt enzymet binder sig til substratet, mens V_{max} er et udtryk for, hvor hurtigt et enzym arbejder. K_M tjener desuden som udgangspunkt for, hvilken substratkoncentration man skal op på for at arbejde tæt på V_{max} , idet K_M er den substratkoncentration, der giver den halve maksimale reaktionshastighed. Jo højere K_M , jo højere substratkoncentration skal man arbejde ved. Michaelis–Mentens ligning angiver reaktionshastigheden, v , som funktion af substratkoncentrationen. Den kan skrives

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

hvor v_0 er initialhastigheden (begyndelses-hastigheden) for reaktionen, $[S]$ er substratkoncentrationen, V_{max} enzymets maksimale hastighed, og K_M er den substratkoncentration, der giver $v_0 = \frac{1}{2} V_{max}$. Dette ses af, at hvis $[S] = K_M$, bliver nævneren $= 1 + K_M/K_M = 2$, og v_0 bliver da $V_{max}/2$.

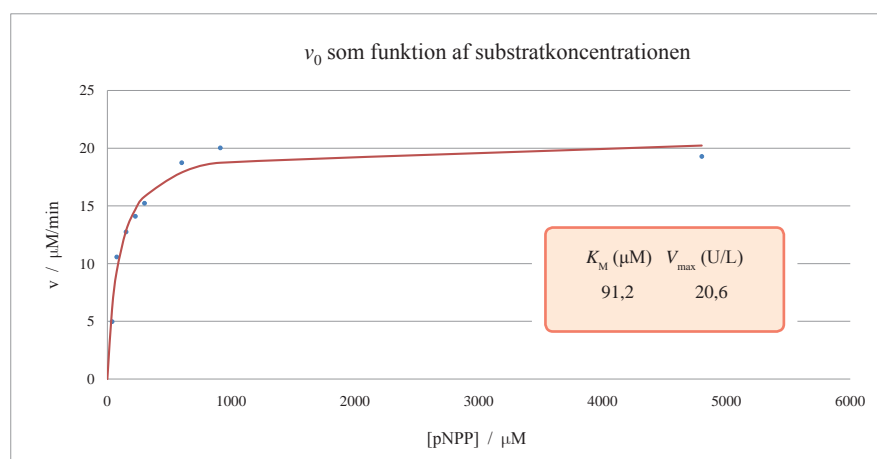
I øvrigt gælder det, at

- hvis $[S] \ll K_M$, går nævneren mod uendelig, og v_0 går derfor mod 0.
- hvis $[S] \gg K_M$, bliver nævneren $1 + 0$, og reaktionshastigheden, v_0 , bliver lig V_{max} . Reaktionen forløber som 0.-ordensreaktion.
- Når $[S] = ca. K_M$ følger reaktionen 1.-ordenskinetik.

Det ses af ovenstående, at v_0 er en funktion af $[S]$ med værdimængde mellem 0 og V_{max} .

K_M og V_{max} bestemmes ved en række målinger af initialhastigheden for reaktionen, hvor man varierer $[S]$ og holder alt andet konstant. Enzymet skal have en sådan koncentration, at der er et lineært reaktionsforløb i starten, så v_0 kan bestemmes sikkert. Efter målingerne er optaget, kan man enten tilpasse resultaterne til Michaelis–Mentens ligning i fx Excel eller Logger Pro eller til en af de lineære transformationer (fx Lineweaver–Burke eller Eddie–Hofstee).

Figur 7
Bestemmelse af K_M og V_{max} ved tilpasning til Michaelis–Mentens ligning i Excel. Summen af kvadraterne på afvigelse fra måledata til værdierne på kurven er minimeret ved hjælp af ”Problemløser”-værktøjet i Excel. AP var fortyndet til 50 U/L i reaktionsblandingen. $T = 27^\circ\text{C}$.



I figur 7 ses et eksempel fra Excel, hvor konstanterne er fundet ved tilpasning af måledata til de forventede værdier, når data antages at følge Michaelis–Mentens ligning. V_{max} blev fundet til ca. 21 $\mu\text{M}/\text{min}$. Der blev anvendt enzym svarende til 50 U/L. En væsentlig grund til afvigelsen skyldes, at der blev arbejdet ved 27°C og ikke 37°C . Derudover må pipetteringsusikkerhed spille ind. K_M kan enten aflæses på kurven (det er lidt svært her!), eller aflæses som en af fundne konstanter i tilpasningen. Den er her 91 μM . K_M for kalve–AP er rapporteret til 270 μM i glycine–buffer (2). K_M for human AP ligger i 1000 μM –området (4). Det er således muligt relativt enkelt at foretage en troværdig bestemmelse af K_M for kalve–AP i DEA–buffer.

Af kurven i figur 7 fremgår det, at man skal have $[S] = 10 \cdot K_M$ for at arbejde ved 90 % af V_{max} . For at arbejde ved 98 % af V_{max} skal man op på $[S] = ca. 50 \cdot K_M$. I forsøget med at danne en standardkurve, der er vist i figur 6, arbejdede vi ved $[S] = 13 \cdot K_M$, hvilket ikke er tilstrækkeligt ved de høje enzymmængder.

Diskussion af repeterbarhed og nøjagtighed

Forsøget er blevet afprøvet i flere elevforsøg. Der er en god overensstemmelse og reproducerbarhed fra forsøg til forsøg, selv om man deler serierne ud mellem forskellige elevgrupper, Tabel 1, og samler resultaterne efterfølgende. Det skal bemærkes, at de pågældende elever var utrænede i bioteknologiske forsøg. Det eneste, de behøver i forvejen, er et kursus i anvendelse af mikropipetter og indføring i betjening af spektrofotometeret. Selv om der selvfølgelig er en vis variation i elevresultaterne, er det

bemærkelsesværdigt, at der i alle tilfælde opnås brugbare resultater i første forsøg. Der er endvidere fundet god overensstemmelse mellem forskellige enzymleverancer (batch'es).

Gruppe	V_{\max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M (μM)
1	51	128
2	52	83
3	50	197

Tabel 1. Resultater for 3 elevgrupper. AP var fortyndet til 100 U/L i reaktionsblandingen. $T = 22^\circ\text{C}$.

Andre muligheder og begrænsninger

AP er velegnet til at demonstrere kontrol af enzymaktivitet, idet det hæmmes kraftigt af fosfationer, figur 8. Her er tilsat stigende mængder Na_2HPO_4 til reaktionsblandingen (AP: 50 U/L, $T = 27^\circ\text{C}$). Hæmningen ved x mM fosfat er beregnet som $\% \text{Hæmning} = (1 - v_{0,x\text{mM}}/v_{0,0\text{mM}}) \cdot 100\%$, så hæmningen af enzymet i en reaktionsblanding uden tilsat fosfat ($x = 0$ mM)

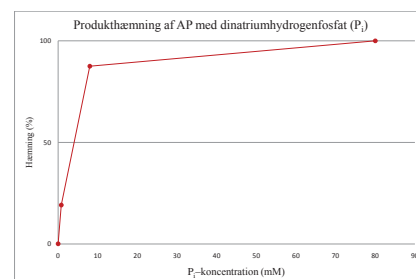
er 0 %. Følgelig er hæmningen 100 %, når al aktivitet er væk ($v_0, x \text{ mM} = 0$). Se Biologisk Instituts vejledning for forslag til yderligere undersøgelser (5).

8 mM fosfat hæmmer altså APs aktivitet med 88 %. Der må være tale om produktinhibition af fosfat på enzymet og ikke (alene) mindskelse af aktiviteten ved kompleksbinding af metallerne, da tilsætning af 10 mM af den endnu stærkere kompleksdanner, EDTA, kun hæmmer aktiviteten med 18 %.

Enzymet er altså underlagt produktinhibition. Dette gælder ligeledes mange enzymer i glykolysen, hvorfor AP kan benyttes som modelenzym for at illustrere kontrol af glykolysen og dermed energiforbrugets indflydelse på cellens omsætning af glukose.

I gennemgang af enzymeres funktion fremhæves ofte aminosyrernes betydning for den 3-dimensionelle struktur og det ak-

tive site i enzymet. Det er populært at måle enzymaktiviteten som funktion af pH. Her tjener aktivitetens afhængighed af pH som illustration af sure, basiske og neutrale aminosyrers betydning, og det giver en god kobling mellem kemi og biologi. Man skal imidlertid tage sig i agt med dette enzym. For det første



Figur 8 Fosfationer hæmmer AP. I forsøget blev AP fortyndet til 50 U/L i reaktionsblandingen. Dinatriumhydrogenfosfat blev tilsat til reaktionsblandingen til enten 0 mM, 0,8 mM, 8 mM eller 80 mM. $T = 27^\circ\text{C}$. $[pNPP] = 1200 \mu\text{M}$.

ligger det optimale pH in vitro så højt (pH = 9,8), at det er svært at finde buffere, der tillader at komme på et stabilt pH væsentligt over dette. Man skal helst fremstille en polybuffer, der dækker området pH 4 – 10. Her kræves imidlertid lidt udviklingsarbejde. Man skal sikre, at der er aminogruupper som fosfat-acceptor, der skal være ensartet, høj ionstyrke, og man skal måle absorbansen af produktet pNP ved 405 nm ved de forskellige pH, man agter at måle ved. På grund af fenolgruppens relativt lave $pK_a = 9,9$, er ekstinktionskoefficienten afhængig af pH. Og sidst, men ikke mindst, skal man undgå fosfatbufre, pga. fosfationernes hæmning af aktiviteten.

Det kan være instruktivt at vise betydningen af cysteins HS-grupper for bevarelse af aktiviteten. Tungmetaller binder sig med høj affinitet til HS-grupper, og sidder disse fx i det "active site", vil man se hæmning af enzymaktiviteten.

Det er imidlertid svært at måle tungmetallers indflydelse på aktiviteten af AP under standardbetingelserne, pga. mulig kompleksdannelse til bufferen. Ved til sætning af fx Cu^{2+} -ioner ses således en kraftig blåfarvning som følge af kobberkompleksdannelse med DEA, og aktiviteten hæmmes ikke. Derfor skal man erstatte DEA med en ikke-aminholdig buffer, hvis man vil måle virkningen af tungmetaller, der danner komplekser med aminogruupper, se figur 4.

Det er klart, at enzymprojekter lægger op til samarbejde mellem kemi og biologi og evt. kemi/biologi og idræt på B-niveau. Desuden er der ligeledes gode muligheder for meningsfyldt samarbejde mellem biologi/kemi eller bioteknologi og matematik, idet der er mange værdifulde matematiske overvejelser såvel i omsætningen mellem model og genstandsområde i Michaëlis-Mentenkinetikken, i omskrivninger til udtryk med lineære grafer som i reaktionskinetikens differentialigninger. Eller blot i håndteringen af udtrykket for v_0 som en funktion af $[S]$

Råd og vink

Med de nævnte begrænsninger er AP et stabilt og nemt enzym at arbejde med. Dog er der et par råd, der vil kunne lette arbejdet. DEA har smeltepunkt på 28 °C, og det er derfor som regel et fast stof, når man modtager det. Det kræver, at man varmer det let op, inden fortynding. Dette kan tage en times tid i vandbad (brug en plastikpose til at undgå vand på etiketten). Det kan anbefales at smelte en god portion og dele denne ud i mindre portioner til senere brug, så man ikke hver gang skal smelte flere hundrede gram. DEA er ustabil i vandige opløsninger ved højt pH (!), og bliver gulfarvet ved henstand, så man skal ikke fremstille mere buffer, end man skal bruge inden for et par måneder. Substratet, pNPP, kan købes som piller á 5 mg. Dette letter besværet ved afvejning af de relativt små mængder, man skal bruge, og kan anbefales. Dog skal de stå under omrøring i mindst en time for, at al stof er opløst. I modsat fald får man IKKE reproducerbare resultater fra forsøg til forsøg! Inden man går i gang med elevforsøg, skal man sikre sig, at man arbejder ved en enzymfortynding og substratkoncentration, der giver 0.-ordenskinetik (rette linjer under reaktionerne). Man skal instruere eleverne i brug af automatpipetter og indarbejde en rutine til at sikre sig, at man gemmer hvert forsøgsresultat under sit eget navn. Man kan nemt komme til at gemme nye forsøg oven i de gamle i forvirringen!

Øvelsesvejledning

En elevudgave af vejledningen til bestemmelse af enzymaktivitet, K_m og V_{max} ligger på brondby-gym.dk/undervisning/fag/biologi/ samt i *Kemi STXFAG* på Skolekom.

Taksigelser

Vi vil gerne takke Gert Dandanell på Biologisk Institut for materialer, hjælp og råd, Susanne Andresen fra Klinisk Biokemisk Afdeling, Køge Sygehus, der sørgede for at eleverne fik en praktisk vinkel på emnet via rundvisning og foredrag samt vore skoler for at stille materialer og udstyr til rådighed.

Referencer

- 1) Sigma Aldrich: *Phosphatase, Alkaline*. From Bovine Intestinal Mucosa: sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P6774|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC; 17/7 2011.
- 2) Oreste Brenna m.fl.: *Affinity Chromatography. Purification of Alkaline Phosphatase from Calf Intestine*; *Biochem. J.* 151, 291–296; 1975
- 3) Kim Bruun og Per Godske Petersen: *GymnasieBIOS, Grundbog 2*, side 74 – 75; Gyldendal, 2008.
- 4) Patricia M. Crofton og A. F. Smith: *Alkaline Phosphatase of High and Low Molecular Mass in Human Serum and Bile: A Comparative Study of Kinetic Properties*; *CLIN. CHEM.* Vol. 26 nr. 3, 45 1–456; 1980
- 5) Gert Dandanell; Michael Riis Hansen: *Biostruktur og Funktion* (vejledning); plbio.life.ku.dk/Formidling/Gymnasielaererkursus/Marts_2011/~media/Plbio/formidling/Gymnasielaererkursus/Science_vejledning_2011.ashx; 2011
- 6) Ulrik Gerdes; m.fl.: *Basisk fosfatase*; laegehaandbogen.dk/prover-og-svar/klinisk-biokemi/basisk-fosfatase-2941.html; 2010
- 7) Hans Chr. Jensen; Jakob Schiødt; Ulla Christensen: *Enzymkinetik: Introduktion til Enzymkinetik*; KemiForlaget 2005
- 8) W. Charles O'Neill: *Pyrophosphate, alkaline phosphatase, and vascular calcification*; *Circ Res.* Jul 21, 99:e2;2006
- 9) Henrik Parbo; Annette Nyvad; *Kend Kemien 3*, side 31–34; Gyldendal 2010
- 10) Bodil Poulsen: *S-basisk phosphatase, enzk.*; *Dansk kemi*, Årg. 74, nr. 12, side 18 – 23; 1993