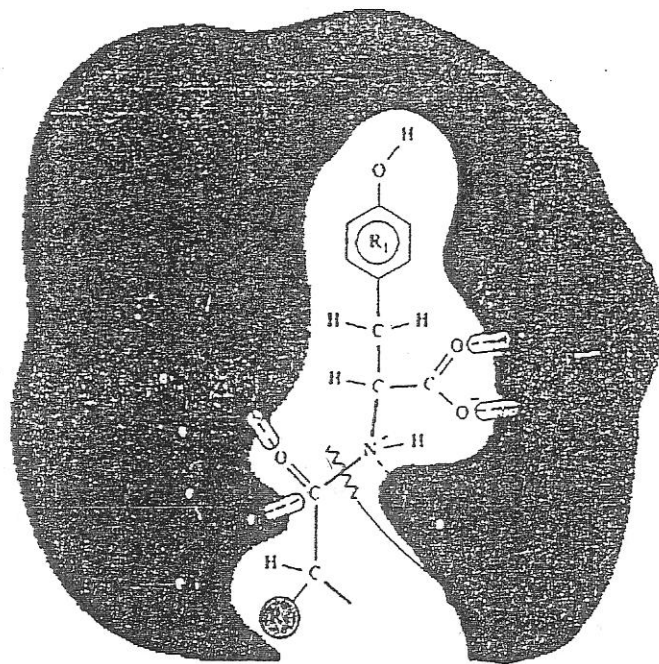


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

- Ενζυμολογία
- Κλινική Χημεία

- ## • Κλινική Χημεία



ΣΜΑΡΑΓΔΗ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ
Επίκουρος Καθηγήτρια

Επίκουρος Καθηγήτρια

ÀCHNA 1999

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός των συγκεκριμένων εργαστηριακών σημειώσεων, είναι να αποτελέσουν αφ' ενός μεν, διδακτικό βοήθημα για τους φοιτητές του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο γνωστικό αντικείμενο της Ενζυμολογίας, εμπλουτισμένο και με περιορισμένο αριθμό θεμάτων Κλινικής Χημείας, αφ' ετέρου δε, να βοηθήσουν κάθε ενδιαφερόμενο να ενημερωθεί και να κατανοήσει, τις βασικές και απαραίτητες γνώσεις της απομόνωσης, του τρόπου δράσης και της μελέτης των ενζύμων.

Η ανάγκη συγγραφής των σημειώσεων αυτών, προέκυψε από το γεγονός ότι, ενώ υπάρχουν στον Ελληνικό χώρο αξιόλογα Βιβλία Κλινικής Χημείας και Ενζυμολογίας – σε ελάχιστο αριθμό τα τελευταία –, δεν καλύπτουν τις εκπαιδευτικές ανάγκες των φοιτητών του Τμήματός μας και δεν περιλαμβάνουν παράλληλα με το θεωρητικό μέρος και εργαστηριακές ασκήσεις.

Έτσι, θεώρησα σκόπιμο να συγκεντρώσω το υλικό των σημειώσεών μου, από τη διδασκαλία μου των Εργαστηρίων Βιοχημείας, των προηγούμενων ετών στο Τμήμα μας και αξιοποιώντας τις αντιδράσεις – υποδείξεις των φοιτητών μου καθώς και την ερευνητική μου εμπειρία στο αντικείμενο, να προχωρήσω στη συγγραφή αυτών των σημειώσεων με δύο στόχους. Να καλυφθούν οι εκπαιδευτικές ανάγκες των φοιτητών του Τμήματός μας, αλλά και να συμπληρωθεί η βιβλιογραφία στον Ελληνικό χώρο, στο γνωστικό αντικείμενο της Ενζυμολογίας.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το περιεχόμενο του βιβλίου αυτού, αποτελείται από δύο γνωστικά αντικείμενα. Το ένα περιλαμβάνει θέματα Ενζυμολογίας και το άλλο, θέματα Κλινικής Χημείας. Και τα δύο όμως, πέρα από το θεωρητικό μέρος περιλαμβάνουν και εργαστηριακό μέρος.

Τα θέματα Ενζυμολογίας ξεκινούν με μία ιστορική αναδρομή της μελέτης των ενζύμων και του τρόπου ποσοτικού προσδιορισμού της δράσης τους. Στη συνέχεια, αναπτύσσονται οι μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού των ενζύμων καθώς και τα κριτήρια καθαρότητας αυτών. Επόμενο θέμα αποτελεί η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, στο οποίο εξετάζονται οι παράγοντες που επιδρούν στην αρχική ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων, οι διάφορες περιπτώσεις ενζυμικών αναστολέων και ενεργοποιητών καθώς επίσης και τα αλλοστερικά ένζυμα. Τέλος, ακολουθούν οι μηχανισμοί δράσης των ενζύμων, χωριστά για κάθε τάξη ενζύμων.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην ύλη του βιβλίου αυτού, δεν περιλαμβάνονται γενικές γνώσεις για τα ένζυμα, όπως κατάταξη-ονοματολογία ενζύμων, δομή συνενζύμων κ.λ.π., γιατί τα θέματα αυτά, καλύπτονται στο μάθημα της Βιοχημείας.

Το πειραματικό μέρος των θεμάτων της Ενζυμολογίας που ακολουθεί, αναφέρεται στην κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων και περιλαμβάνει το πειραμα-

τικό μέρος επτά εργαστηριακών ασκήσεων στις οποίες μελετάται η δράση της όξινης φωσφατάσης σε υπόστρωμα π-νιτρο-φαινυλο-φωσφορικό εστέρα, απουσία και παρουσία αναστολέων.

Στα θέματα Κλινικής Χημείας, έχουν επιλεγεί μερικά από εκείνα που έχουν μεγαλύτερη συνάφεια με το πρόγραμμα σπουδών του Τμήματός μας και θα τα συναντήσουν οι φοιτητές μας στο μέλλον. Συγκεκριμένα, γίνεται αναφορά στα είδη των βιολογικών δειγμάτων και στον τρόπο παραλαβής και διατήρησης αυτών.

Στη συνέχεια, περιγράφονται οι προσδιορισμοί των πρωτεϊνών, της ουρίας, της γλυκόζης, της βιταμίνης=A, του β-καροτένιου, της κρεατινίνης, της χοληστερόλης και των γλυκεριδίων και αναφέρεται για κάθε περίπτωση η κλινική σημασία της συγκεκριμένης ανάλυσης.

Θέλω να πιστεύω ότι οι αντιδράσεις-παρατηρήσεις των φοιτητών μου κατά τη διδασκαλία στο αμφιθέατρο και στο εργαστήριο, αλλά και οι εύστοχες υποδείξεις-βελτιώσεις των συναδέλφων της επιστημονικής κοινότητας, θα δράσουν καταλυτικά για μία μελλοντική προσπάθειά μου, με διορθώσεις και τροποποιήσεις του περιεχομένου του βιβλίου αυτού.

Αθήνα,
Σεπτέμβριος 1999

Σμαραγδή Αντωνοπούλου

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αρχή της μεθόδου

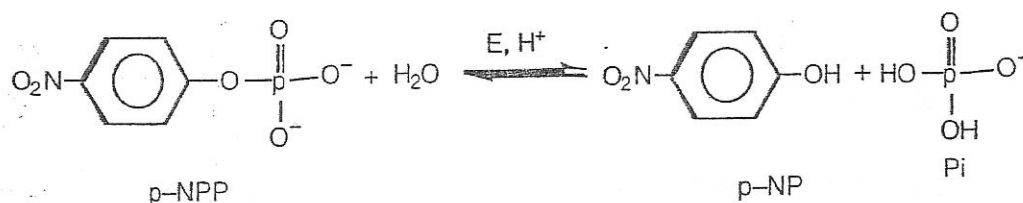
Οι φωσφατάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση φωσφορικών μονο-εστερικών δεσμών. Είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση και συνήθως εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση, με εξαίρεση μερικές φωσφατάσες, οι οποίες δρουν σε φωσφορικές ομάδες σακχάρων και οι οποίες εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση. Η φωσφατάση της 1,6-διφωσφο-φρουκτόζης, η οποία καταλύει την αντίδραση μετατροπής της 1,6-διφωσφο-φρουκτόζης σε 6-φωσφο-φρουκτόζη, με ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικού οξέος, εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση.

Οι φωσφατάσες διακρίνονται σε όξινες και αλκαλικές, ανάλογη με την περιοχή του pH, στην οποία εμφανίζουν τη βέλτιστη δράση τους. Αν και δρουν σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, δεν καταλύουν διεστέρες και τριεστέρες του φωσφορικού οξέος. Η κύρια διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη φωσφατάσων, αφορά την υδρόλυση θειεστερικών δεσμών. Οι αλκαλικές φωσφατάσες (σε αντίθεση με τις όξινες) μπορούν να υδρολύσουν S-υποκατεστημένους μονοεστέρες του φωσφοροθειϊκού οξέος. Από την άλλη πλευρά, οι όξινες φωσφατάσες (σε αντίθεση με τις αλκαλικές) μπορούν να υδρολύσουν O-υποκατεστημένα μονοεστερικά παράγωγα του φωσφοροθειϊκού οξέος. Τα παραπάνω δεδομένα, δείχνουν ότι οι αλκαλικές φωσφατάσες απαιτούν για την εκδήλωση της δράσης τους, την ύπαρξη δύο ελεύθερων υδροξυλομάδων στη φωσφορική ρίζα.

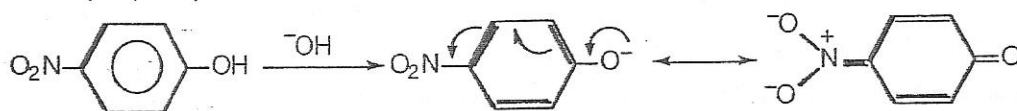
Οι αλκαλικές φωσφατάσες μπορούν να απομονωθούν σε καθαρή μορφή από διάφορες πηγές και υδρολύουν πολλά υποστρώματα όπως τη φωσφοκρεατίνη, το ανόργανο πυροφωσφορικό οξύ, το ATP και άλλα. Η εξειδίκευσή τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση των Mg^{++} , τα οποία δρουν σαν ενεργοποιητές του ενζύμου.

Και οι όξινες φωσφατάσες απομονώνονται σε καθαρή μορφή από διάφορες πηγές και εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση. Η όξινη φωσφατάση, που θα χρησιμοποιηθεί στις εργαστηριακές ασκήσεις, είναι απομονωμένη από σπόρους σιταριού ή από σπόρους άλλων φυτών. Στα φυτά αυτά, η όξινη φωσφατάση χρησιμεύει κυρίως για την υδρόλυση της φωσφορικής ομάδας από το φυτικό οξύ (εξαφωσφορικός εστέρας του ινοσίτη). Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να αντιδρά εύκολα με τεχνητά υποστρώματα όπως είναι ο π-νιτροφαινυλο-φωσφορικός εστέρας (p-NPP) προς σχηματισμό π-νιτροφαινόλης

(p-NP) και ανόργανου φωσφόρου (Pi). Η αντίδραση που καταλύει η όξινη φωσφατάση στις εργαστηριακές ασκήσεις, είναι η εξής:



Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη NaOH 0.1N, επειδή σε αλκαλικό περιβάλλον αναστέλλεται η δράση του ενζύμου. Επιπλέον, η δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος, μετατρέπει την π-νιτροφαινόλη που παράγεται σε σταθερό ανιόν (p-NP⁻), το οποίο απορροφά ισχυρά στην περιοχή των 400nm και δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικούς φωτομετρικούς προσδιορισμούς.



1ο Πείραμα: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς π-νιτροφαινόλης (p-NP)

Ο σκοπός του πρώτου πειράματος είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς, δηλαδή το διάγραμμα Abs=f(C), των απορροφήσεων συναρτήσει διαφόρων γνωστών συγκεντρώσεων του ανιόντος της π-νιτροφαινόλης. Η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται στα επόμενα πειράματα για την εύρεση της συγκέντρωσης της π-νιτροφαινόλης, που παράγεται κατά την αντίδραση ενζύμου (όξινη φωσφατάση) και υποστρώματος (π-νιτροφαινυλο-φωσφορικός εστέρας).

Αντιδραστήρια:

1. NaOH 0.1N και 0.02N
2. HCl 6N, 1N και 0.1N
3. Πρότυπο διάλυμα p-NP 120μM

Αρχικά παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα p-NP 12mM (M.B.:139.11), δηλαδή διαλύονται 0.167g p-NP σε 100mL NaOH 0.02N. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα p-NP 120μM, με αραιώση 1:100 του πυκνού διαλύματος p-NP με NaOH 0.02N. Τα διαλύματα p-NP φυλάσσονται σε σκοτεινόχρωμα δοχεία.

4. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) pH 4.8

Το ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει αιθυλενοδιαμίνη 0.15M και κιτρικό οξύ 0.1M. Η ρύθμιση της τιμής του pH στο 4.8 γίνεται με διάλυμα HCl.

Η σειρά εργασίας για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος είναι η εξής:

- α) Παρασκευή διαλύματος αιθυλενοδιαμίνης 1.5M (M.B.:60.10), δηλαδή διαλύονται 9.015g αιθυλενοδιαμίνης σε 100mL H₂O.
- β) Παρασκευή διαλύματος κιτρικού οξέος 1M (M.B.:210.14), δηλαδή διαλύονται 2.1g κιτρικού οξέος σε 100mL H₂O.
- γ) Αναμιγνύονται τα διαλύματα των σταδίων α και β σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL και στη συνέχεια προστίθενται 700mL H₂O.
- δ) Ρυθμίζεται η τιμή του pH, αρχικά με πυκνό διάλυμα HCl και στη συνέχεια με αραιό διάλυμα HCl, σε pH 4.8 και συμπληρώνεται ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος με H₂O μέχρι τα 1000mL (1L).

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 6 δοκιμαστικοί σωλήνες, από τους οποίους οι 5 ($\Sigma_1, \Sigma_2, \Sigma_3, \Sigma_4, \Sigma_5$) θα χρησιμοποιηθούν για τα διαλύματα p-NP διαφορετικών συγκεντρώσεων και ο 1 σωλήνας (T) για το τυφλό (blank).
2. Προστίθεται στους $\Sigma_1 - \Sigma_5$, ποσότητα 0.5mL, 1.5mL, 2mL και 2.5mL από το πρότυπο διάλυμα p-NP 120μM, αντίστοιχα.
3. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες $\Sigma_1 - \Sigma_5$ και στο T, προστίθενται 3mL NaOH 0.1N, στον καθένα.
4. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος, έτσι ώστε κάθε δοκιμαστικός σωλήνας να έχει τελικό όγκο 6mL.
5. Φωτομετρούνται τα δείγματα στα 405nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και διάγραμμα της πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση (μM) p-NP που περιέχεται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Κατασκευάζεται διάγραμμα $Abs=f(C \text{ p-NP})$.

Στα πειράματα που θα ακολουθήσουν στη συνέχεια, θα μελετηθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων, στην (αρχική) ταχύτητα της ενζυμικής αντί-

δρασης. Οι παράγοντες που θα μελετηθούν είναι:

α) η συγκέντρωση του ενζύμου

β) το pH

γ) η θερμοκρασία και

δ) η συγκέντρωση του υποστρώματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, η μελέτη της επίδρασης ενός παράγοντα στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, επιτυγχάνεται μόνο όταν όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες παραμένουν αμετάβλητοι και αλλάζει μόνο ο παράγοντας που εξετάζεται κάθε φορά. Επίσης, με το πείραμα της επίδρασης της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, γίνεται προσδιορισμός των σταθερών K_M και V_{max} .

Τέλος, θα ακολουθήσουν δύο πειράματα με διαφορετικούς αντιστρεπτούς αναστολείς της συγκεκριμένης ενζυμικής αντίδρασης όπου μετά από προσδιορισμό των σταθερών K_p και V_p , θα αναγνωρισθεί το είδος της αναστολής, που προκαλεί ο κάθε αναστολέας.

Σε όλα τα πειράματα της ενζυμικής κινητικής, για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, το μίγμα της αντίδρασης έχει όγκο 6mL.

2ο Πείραμα: Προσδιορισμός αρχικής ταχύτητας

(Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου και του χρόνου επώασης της ενζυμικής αντίδρασης)

Ο σκοπός του δεύτερου πειράματος είναι να προσδιορισθεί πειραματικά η αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του ενζύμου και ο χρόνος επώασης της αντίδρασης, που θα χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα.

Για τη μελέτη αυτή παρασκευάζονται μερικές αραιώσεις του ενζύμου, συνήθως μεταξύ της περιοχής 0.1–100mg ενζύμου/100mL διαλύματος, οι οποίες αντιδρούν με την ίδια ποσότητα p-NPP. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται το ποσό της παραγόμενης p-NP για κάθε συγκέντρωση του ενζύμου σε διαφορετικούς χρόνους επώασης της αντίδρασης. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα κατασκευάζεται το διάγραμμα $[p-NP]=f(t)$ για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου. Στη συνέχεια, υπολογίζονται οι αρχικές ταχύτητες σε διάφορες χρονικές στιγμές (εφαπτομένες της καμπύλης) και κατασκευάζεται το διάγραμμα $v=f([E])$ για τους διάφορους χρόνους. Από τη μορφή της καμπύλης του διαγράμματος $v=f([E])$, επιλέγεται η κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου και ο χρόνος επώασης της αντίδρασης, έτσι ώστε η σχέση αυτή να είναι γραμμική.

Αντιδραστήρια:

1. NaOH 0.1N
2. Πρότυπα διαλύματα p-NPP (υπόστρωμα)
Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα p-NPP 6mM (M.B.:263.11), δηλαδή διαλύονται 0.158g p-NPP σε 100mL H₂O. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα υπόλοιπα διαλύματα p-NPP με κατάλληλη αραίωση του 6mM με H₂O.
Συγκεκριμένα,
α) p-NPP 3mM:αραίωση 1:2
β) p-NPP 1.2mM:αραίωση 1:5
γ) p-NPP 0.6mM:αραίωση 1:10
δ) p-NPP 0.3mM:αραίωση 1:20
Τα διαλύματα p-NPP φυλάσσονται σε σκουρόχρωμα δοχεία.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.8
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 1ο Πείραμα.
4. Διαλύματα όξινης φωσφατάσης (0.8 units/mg)
Αρχικά παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα ενζύμου 0.6mg/mL, δηλαδή διαλύονται 0.06g E σε 100mL H₂O. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα υπόλοιπα διαλύματα ενζύμου με κατάλληλη αραίωση του 0.6mg/mL με H₂O.
Συγκεκριμένα,
α) E 0.12mg/mL:αραίωση 1:5
β) E 0.06mg/mL:αραίωση 1:10
γ) E 0.03mg/mL:αραίωση 1:20

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 4 δοκιμαστικοί σωλήνες, από τους οποίους οι 3 (Σ_1 - Σ_3) χρησιμοποιούνται για τα διαλύματα του ενζύμου διαφορετικών συγκεντρώσεων και ο άλλος δοκιμαστικός σωλήνας (T) για το τυφλό.
2. Προστίθεται στους Σ_1 - Σ_3 και στον T, ποσότητα 1mL p-NPP 6mM, στον καθένα.
3. Και στους 4 δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθεται από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος, στον καθένα.
4. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο 37°C για 5min.
5. Στο ίδιο υδατόλουτρο διατηρούνται τα διαλύματα του ενζύμου και 1 δοκιμαστικός σωλήνας με H₂O.
6. Μετά την προθέρμανση των 5min, στο Σ_1 προστίθεται 1mL E 0.03mg/mL, στο Σ_2 1mL E 0.06mg/mL και στο Σ_3 1mL E 0.12mg/mL. Στο τυφλό προστί-

θεται 1mL H₂O.

7. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στο ίδιο υδατόλουτρο (37°C) για 0.5min.
8. Μετά την επώαση του 0.5min, ποσότητα 3mL NaOH 0.1N προστίθεται σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
9. Φωτομετρούνται τα δείγματα στα 405nm.

Η παραπάνω διαδικασία (στάδια 1–9) επαναλαμβάνεται και για άλλους 16 δοκιμαστικούς σωλήνες και διαφοροποιείται ο χρόνος επώασης της αντίδρασης, δηλαδή το στάδιο 7.

Συγκεκριμένα :

- στο Σ₄ προστίθεται 1mL E 0.03mg/mL και επωάζεται για 2min στους 37°C
- στο Σ₅ προστίθεται 1mL E 0.03mg/mL και επωάζεται για 5min στους 37°C
- στο Σ₆ προστίθεται 1mL E 0.03mg/mL και επωάζεται για 10min στους 37°C
- στο Σ₇ προστίθεται 1mL E 0.03mg/mL και επωάζεται για 20min στους 37°C
- στο Σ₈ προστίθεται 1mL E 0.06mg/mL και επωάζεται για 2min στους 37°C
- στο Σ₉ προστίθεται 1mL E 0.06mg/mL και επωάζεται για 5min στους 37°C
- στο Σ₁₀ προστίθεται 1mL E 0.06mg/mL και επωάζεται για 10min στους 37°C
- στο Σ₁₁ προστίθεται 1mL E 0.06mg/mL και επωάζεται για 20min στους 37°C
- στο Σ₁₂ προστίθεται 1mL E 0.12mg/mL και επωάζεται για 2min στους 37°C
- στο Σ₁₃ προστίθεται 1mL E 0.12mg/mL και επωάζεται για 5min στους 37°C
- στο Σ₁₄ προστίθεται 1mL E 0.12mg/mL και επωάζεται για 10min στους 37°C
- στο Σ₁₅ προστίθεται 1mL E 0.12mg/mL και επωάζεται για 20min στους 37°C
- στο T₄ προστίθεται 1mL H₂O και επωάζεται για 2min στους 37°C
- στο T₅ προστίθεται 1mL H₂O και επωάζεται για 5min στους 37°C
- στο T₆ προστίθεται 1mL H₂O και επωάζεται για 10min στους 37°C
- στο T₇ προστίθεται 1mL H₂O και επωάζεται για 20min στους 37°C

Παρατήρηση: Το T₄ χρησιμοποιείται σαν τυφλό για τους Σ₄, Σ₈ και Σ₁₂.
Το T₅ χρησιμοποιείται σαν τυφλό για τους Σ₅, Σ₉ και Σ₁₃.
Το T₆ χρησιμοποιείται σαν τυφλό για τους Σ₆, Σ₁₀ και Σ₁₄.
Το T₇ χρησιμοποιείται σαν τυφλό για τους Σ₇, Σ₁₁ και Σ₁₅.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε

- δοκιμαστικό σωλήνα και διάγραμμα της πορείας της άσκησης.
- Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση p-NP που παράγεται με τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (0.03mg/mL, 0.06mg/mL και 0.12mg/mL) στους διαφορετικούς χρόνους επώασης της ενζυμικής αντίδρασης (0.5, 2, 5, 10 και 20min).
 - Κατασκευάζονται τα διαγράμματα $[p-NP]=f(t)$.
 - Με βάση τα διαγράμματα αυτά, υπολογίζονται οι αρχικές ταχύτητες για κάθε συγκέντρωση ενζύμου, σε διάφορες χρονικές στιγμές.
 - Κατασκευάζεται το διάγραμμα $v=f([E])$.
 - Γίνεται έλεγχος της γραμμικότητας της ενζυμικής αντίδρασης και επιλέγεται η κατάλληλη αραιώση ενζύμου και ο χρόνος επώασης για την αντίδραση.

3ο Πείραμα: Προσδιορισμός του βέλτιστου pH (pH_{opt})

Ο σκοπός του τρίτου πειράματος είναι να μελετηθεί η επίδραση του pH στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και να προσδιορισθεί εκείνη η τιμή του pH, στην οποία το ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα.

Η μελέτη αυτή επιτυγχάνεται με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφορετικού pH σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες παραμένουν σταθεροί. Οι τιμές του pH που συνήθως εξετάζονται βρίσκονται στην περιοχή pH 3 έως pH 8.

Αντιδραστήρια:

- NaOH 0.1N
- Πρότυπο διάλυμα p-NPP 6mM
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.
- Ρυθμιστικά διαλύματα
Παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στο 1ο Πείραμα και ρυθμίζονται σε διάφορες τιμές pH δηλαδή pH 3, 4, 5, 6 και 7 με προσθήκη HCl.
- Διάλυμα όξινης φωσφατάσης 0.06mg/mL
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.

Εκτέλεση:

- Αριθμούνται 5 δοκιμαστικοί σωλήνες για τα δείγματα ($\Sigma_1-\Sigma_5$) και άλλοι 5 δοκιμαστικοί σωλήνες για τα τυφλά (T_1-T_5).
- Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθεται από 1ml p-NPP 6mM.

3. Στη συνέχεια προστίθεται από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 3 στους Σ_1 και T_1 , από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4 στους Σ_2 και T_2 , από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 5 στους Σ_3 και T_3 , από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 6 στους Σ_4 και T_4 και τέλος, από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος στους Σ_5 και T_5 .
4. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο 37°C για 5min.
5. Στο ίδιο υδατόλουτρο διατηρούνται από 10mL ενζύμου και 10mL H_2O .
6. Μετά την προθέρμανση των 5min, στο Σ_1 προστίθεται 1mL E 0.06mg/mL και επωάζεται στο ίδιο υδατόλουτρο 37°C για 5min.
7. Μετά την επώαση των 5min, προστίθεται στο Σ_1 ποσότητα 3mL NaOH 0.1N.

Τα στάδια 6 και 7 επαναλαμβάνονται και για τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες. Συγκεκριμένα, στους $\Sigma_2 - \Sigma_5$ προστίθενται 1mL E 0.06mg/mL και στους T_1-T_5 προστίθεται 1mL H_2O .

8. Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 405nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάγραμμα της πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση p-NP που παράγεται στις διαφορετικές τιμές του pH.
3. Υπολογίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης για κάθε τιμή του pH και στη συνέχεια, υπολογίζεται η δραστικότητα του ενζύμου.
4. Κατασκευάζονται τα διαγράμματα $v=f(pH)$ και $\Delta=f(pH)$.
5. Από τη μορφή της καμπύλης του διαγράμματος $\Delta=f(pH)$, επιλέγεται εκείνη η τιμή του pH, στην οποία αντιστοιχεί η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου, δηλαδή η pH_{opt} . Η τιμή αυτή του pH θα χρησιμοποιηθεί στα επόμενα πειράματα.

4ο Πείραμα: Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας (θ_{opt})

Ο σκοπός του τέταρτου πειράματος είναι να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, να προσδιορισθεί εκείνη η τιμή της θερμοκρασίας, στην οποία το ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη

δραστικότητα (θ_{opt}) και τέλος να προσδιορισθεί η δόκιμη θερμοκρασία των επόμενων πειραμάτων ($\theta_{πειρ}$), η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρέπει να είναι μικρότερη από τη θ_{opt} .

Στο πείραμα αυτό, ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας με τα συστατικά της αντίδρασης επωάζεται σε διαφορετική θερμοκρασία για το ίδιο χρονικό διάστημα. Συνήθως, οι θερμοκρασίες που εξετάζονται είναι στην περιοχή των 20°C (θερμοκρασία δωματίου) έως και 70°C.

Αντιδραστήρια:

1. NaOH 0.1N
2. Πρότυπο διάλυμα p-NPP 6mM
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα
3. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.8
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 1ο Πείραμα.
4. Διάλυμα όξινης φωσφατάσης 0.06mg/mL
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 10 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 5 (Σ_1 - Σ_5) για τα δείγματα και οι υπόλοιποι 5 για τα τυφλά (T_1 - T_5).
2. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται από 1mL p-NPP 6mM και στη συνέχεια, από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.8, στον κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες Σ_1 και T_1 παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, οι Σ_2 και T_2 προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο 40°C για 5min, οι Σ_3 και T_3 σε υδατόλουτρο 50°C για 5min, οι Σ_4 και T_4 σε 60°C για 5min και τέλος οι Σ_5 και T_5 σε 70°C για 5min.
4. Σε υδατόλουτρο 37°C διατηρούνται 10mL ενζύμου και 10mL H₂O.
5. Μετά την προθέρμανση των 5min, στους δοκιμαστικούς σωλήνες Σ_1 - Σ_5 προστίθεται από 1mL E 0.06mg/mL και στους σωλήνες T_1 - T_5 από 1mL H₂O.
6. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες μετά την προσθήκη του ενζύμου ή του H₂O, επωάζονται για 5min στις ίδιες θερμοκρασίες, που αναφέρονται στο στάδιο 3.
7. Μετά την επώαση των 5min, η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 3mL NaOH 0.1N σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.

8. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυώσουν και στη συνέχεια φωτομετρούνται στα 405nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάγραμμα της πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση p-NP που παράγεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες.
3. Υπολογίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης για κάθε θερμοκρασία καθώς και η αντίστοιχη δραστικότητα του ενζύμου.
4. Κατασκευάζονται τα διαγράμματα $v=f(\theta)$ και $\Delta=f(\theta)$.
5. Από τη μορφή της καμπύλης του διαγράμματος $\Delta=f(\theta)$, επιλέγεται η θερμοκρασία, στην οποία αντιστοιχεί η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου, δηλαδή η θ_{opt} και συμπεραίνεται η δόκιμη τιμή θερμοκρασίας για τα επόμενα πειράματα, δηλαδή η $\theta_{πειρ}$.

5ο Πείραμα: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.
Προσδιορισμός των σταθερών K_M και V_{max} .

Ο σκοπός του πέμπτου πειράματος είναι να μελετηθεί η μεταβολή της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος σε καθορισμένο χρόνο αντίδρασης (5min) και με συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου (0.06mg/mL). Με βάση τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης αυτής, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση $v=f([S])$ της εξίσωσης Michaelis–Menten και η γραφική παράσταση $1/v=f([1/S])$ (διάγραμμα Lineweaver–Burk). Από το τελευταίο διάγραμμα, προσδιορίζονται οι σταθερές K_M και V_{max} .

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιούνται οι τιμές των παραμέτρων που έχουν προσδιορισθεί από τα προηγούμενα πειράματα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται συγκέντρωση ενζύμου 0.06mg/mL (E_{opt}), ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4.8 (pH_{opt}), θερμοκρασία αντίδρασης 37°C ($\theta_{πειρ}$) και χρόνος επώασης 5min. Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας δείγματος περιέχει διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος p-NPP, που κυμαίνεται από 0.3mM έως 6mM. Οι τελικοί όγκοι ρυθμίζονται όλοι στα 6mL με προσθήκη H_2O .

Αντιδραστήρια:

1. NaOH 0.1N
2. Πρότυπα διαλύματα p-NPP (0.3mM, 0.6mM, 1.2mM, 3mM, 6mM)
Παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.8
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 1ο Πείραμα.
4. Διάλυμα όξινης φωσφατάσης 0.06mg/mL
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 10 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 5 (Σ_1 - Σ_5) για τα δείγματα και οι άλλοι 5 για τα τυφλά (T_1 - T_5).
2. Στους Σ_1 και T_1 προστίθεται από 1mL p-NPP 0.3mM, στους Σ_2 και T_2 από 1mL p-NPP 0.6mM, στους Σ_3 και T_3 από 1mL p-NPP 1.2mM, στους Σ_4 και T_4 από 1mL p-NPP 3mM και στους Σ_5 και T_5 από 1mL p-NPP 6mM.
3. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθεται από 1mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.8.
4. Οι 10 δοκιμαστικοί σωλήνες προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο 37°C για 5min.
5. Στο ίδιο υδατόλουτρο φυλάσσονται 10mL E 0.06mg/mL και 10mL H₂O.
6. Μετά την προθέρμανση των 5min, προστίθεται από 1mL ενζύμου στους δοκιμαστικούς σωλήνες Σ_1 - Σ_5 και από 1mL H₂O στους δοκιμαστικούς σωλήνες T_1 - T_5 .
7. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στο ίδιο υδατόλουτρο 37°C για 5min, μετά το πέρας των οποίων διακόπτεται η ενζυμική αντίδραση, με προσθήκη 3mL NaOH 0.1N σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
8. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες αποσύρονται από το υδατόλουτρο και αφού αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου, φωτομετρούνται στα 405nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάγραμμα της πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση p-NP που παράγεται για κάθε διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος.
3. Υπολογίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος.

4. Υπολογίζονται οι τελικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
5. Κατασκευάζεται η καμπύλη $v=f([S])$ της εξίσωσης Michaelis-Menten. Με βάση την καμπύλη αυτή απορρίπτονται τα σημεία εκείνα, τα οποία ενώ αντιστοιχούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποστρώματος, δίνουν ίδια τιμή ταχύτητας με άλλα μικρότερης συγκέντρωσης υποστρώματος. Δηλαδή, είναι δυνατόν η V_{max} να έχει επιτευχθεί π.χ. με $[S]=3mM$ και η $[S]=6mM$ να δίνει ίδια τιμή ταχύτητας. Στην περίπτωση αυτή, απορρίπτεται το σημείο, που αντιστοιχεί σε $[S]=6mM$.
6. Με βάση τα επιλεγμένα σημεία από το διάγραμμα Michaelis-Menten, κατασκευάζεται το διάγραμμα Lineweaver-Burk.
7. Από το τελευταίο διάγραμμα υπολογίζονται οι σταθερές K_M και V_{max} .

6ο Πείραμα: Μελέτη της αναστολής της ενζυμικής αντίδρασης, από ανόργανα φωσφορικά ιόντα.

Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος, είναι να μελετηθεί η επίδραση των ανόργανων φωσφορικών ιόντων, στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Για τη μελέτη του πειράματος αυτού, προστίθεται διάλυμα φωσφορικού νατρίου στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης και ακολουθείται η διαδικασία του 5ου πειράματος. Κατασκευάζεται η καμπύλη κορεσμού $v=f([S])$ της εξίσωσης Michaelis-Menten και το διάγραμμα Lineweaver-Burk και υπολογίζονται οι νέες σταθερές K_p και V_p . Από τη σύγκριση των νέων σταθερών με τις σταθερές του 5ου πειράματος, βγαίνει το συμπέρασμα για το είδος της αντιστρεπτής αναστολής, που προκαλούν τα ανόργανα φωσφορικά ιόντα.

Αντιδραστήρια:

1. NaOH 0.1N
2. Πρότυπα διαλύματα p-NPP (0.3mM, 0.6mM, 1.2mM, 3mM, 6mM)
Παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.8
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 1ο Πείραμα.
4. Διάλυμα όξινης φωσφατάσης 0.06mg/mL
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.
5. Διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.03M (pH 4.8). (M.B.:138)
Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού διαλύονται 0.414g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ σε 80mL H_2O , στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH του διαλύμα-

τος στο 4.8 με προσθήκη NaOH και τέλος συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100mL.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 10 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 5 (Σ_1 - Σ_5) για τα δείγματα και οι άλλοι 5 για τα τυφλά (T_1 - T_5).
2. Στους Σ_1 και T_1 προστίθεται από 1mL p-NPP 0.3mM, στους Σ_2 και T_2 από 1mL p-NPP 0.6mM, στους Σ_3 και T_3 από 1mL p-NPP 1.2mM, στους Σ_4 και T_4 από 1mL p-NPP 3mM και τέλος στους Σ_5 και T_5 από 1mL p-NPP 6mM.
3. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες Σ_1 - Σ_5 προστίθεται ποσότητα 0.8mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.8 και από 0.2mL διαλύματος φωσφορικού νατρίου.
4. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες T_1 - T_5 προστίθεται επίσης ποσότητα 0.8mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.8 και από 0.2mL διαλύματος φωσφορικού νατρίου.
5. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται για προθέρμανση σε υδατόλουτρο 37°C για 5min.
6. Στο ίδιο υδατόλουτρο διατηρούνται 10mL E 0.06mg/mL και 10mL H₂O.
7. Μετά την προθέρμανση των 5min, προστίθεται από 1mL E στους δοκιμαστικούς σωλήνες Σ_1 - Σ_5 και από 1mL H₂O στους T_1 - T_5 .
8. Οι 10 δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στο ίδιο υδατόλουτρο 37°C για 5min, μετά το πέρας των οποίων διακόπτεται η ενζυμική αντίδραση, με προσθήκη 3mL NaOH 0.1N σε όλους τους σωλήνες.
9. Αποσύρονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες από το υδατόλουτρο και αφού αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου, φωτομετρούνται στα 405nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση p-NP που παράγεται για κάθε διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος, παρουσία φωσφορικών ιόντων.
3. Υπολογίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία φωσφορικών ιόντων, για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος.
4. Υπολογίζονται οι τελικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
5. Κατασκευάζεται η καμπύλη κορεσμού $v=f([S])$ της εξίσωσης Michaelis-Menten και στη συνέχεια το διάγραμμα Lineweaver-Burk, όπως

αναφέρεται και στο 5ο Πείραμα.

6. Από το διάγραμμα Lineweaver-Burk, υπολογίζονται οι νέες σταθερές K_p και V_p , οι οποίες συγκρίνονται με τις K_M και V_{max} του 5ου Πειράματος.
7. Με βάση τα δεδομένα των παραπάνω συγκρίσεων καθορίζεται το είδος της αναστολής, που προκαλείται από τα ανόργανα φωσφορικά ιόντα στη συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση.

7ο Πείραμα: Μελέτη της αναστολής της ενζυμικής αντίδρασης, από ιόντα φθορίου.

Ο σκοπός του τελευταίου αυτού πειράματος είναι ο ίδιος με εκείνον του 6ου Πειράματος, με μόνη διαφορά ότι σαν αντιστρεπτός αναστολέας χρησιμοποιούνται τα ιόντα φθορίου.

Αντιδραστήρια:

1. NaOH 0.1N
2. Πρότυπα διαλύματα p-NPP (0.3mM, 0.6mM, 1.2mM, 3mM, 6mM)
Παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.8
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 1ο Πείραμα.
4. Διάλυμα όξινης φωσφατάσης 0.06mg/mL
Παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 2ο Πείραμα.
5. Διάλυμα φθοριούχου νατρίου 0.003M (M.B.:42)
Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού, διαλύονται 12.6mg NaF σε 100mL H₂O. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή γιατί το NaF είναι τοξικό.

Εκτέλεση:

Όλα τα στάδια των εκτελέσεων του 7ου Πειράματος είναι ίδια με εκείνα του 6ου Πειράματος, μόνο που αντί 0.2mL φωσφορικού νατρίου, προστίθενται 0.2mL φθοριούχου νατρίου.

Συγκεκριμένα,

1. Αριθμούνται 10 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 5 (Σ_1 - Σ_5) για τα δείγματα και οι άλλοι 5 για τα τυφλά (T_1 - T_5).
2. Στους Σ_1 και T_1 προστίθεται από 1mL p-NPP 0.3mM, στους Σ_2 και T_2 από 1mL p-NPP 0.6mM, στους Σ_3 και T_3 από 1mL p-NPP 1.2mM, στους Σ_4 και T_4 από 1mL p-NPP 3mM και τέλος στους Σ_5 και T_5 από 1mL p-NPP 6mM.

3. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες $\Sigma_1-\Sigma_5$ προστίθεται ποσότητα 0.8mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.8 και από 0.2mL διαλύματος φθοριούχου νατρίου.
4. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες T_1-T_5 προστίθεται επίσης ποσότητα 0.8mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 4.8 και από 0.2mL διαλύματος φθοριούχου νατρίου.
5. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται για προθέρμανση σε υδατόλουτρο 37°C για 5min.
6. Στο ίδιο υδατόλουτρο διατηρούνται 10mL E 0.06mg/mL και 10mL H_2O .
7. Μετά την προθέρμανση των 5min, προστίθεται από 1mL E στους δοκιμαστικούς σωλήνες $\Sigma_1-\Sigma_5$ και από 1mL H_2O στους T_1-T_5 .
8. Οι 10 δοκιμαστικοί σωλήνες επάζονται στο ίδιο υδατόλουτρο 37°C για 5min, μετά το πέρας των οποίων διακόπτεται η ενζυμική αντίδραση, με προσθήκη 3mL NaOH 0.1N σε όλους τους σωλήνες.
9. Αποσύρονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες από το υδατόλουτρο και αφού αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου, φωτομετρούνται στα 405nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

Ακολουθούνται όλα τα στάδια που περιγράφονται στο 6ο Πείραμα και στο τέλος καθορίζεται το είδος της αναστολής, που προκαλείται από τα ιόντα φθορίου, στη συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση.

Συγκεκριμένα,

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση p-NP που παράγεται για κάθε διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος, παρουσία ιόντων φθορίου.
3. Υπολογίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία ιόντων φθορίου, για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος.
4. Υπολογίζονται οι τελικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
5. Κατασκευάζεται η καμπύλη κορεσμού $v=f([S])$ της εξίσωσης Michaelis-Menten και στη συνέχεια το διάγραμμα Lineweaver-Burk, όπως αναφέρεται και στο 5ο Πείραμα.
6. Από το διάγραμμα Lineweaver-Burk, υπολογίζονται οι νέες σταθερές K_p και V_p , οι οποίες συγκρίνονται με τις K_M και V_{max} του 5ου Πειράματος.
7. Με βάση τα δεδομένα των παραπάνω συγκρίσεων καθορίζεται το είδος της αναστολής, που προκαλείται από τα ανόργανα ιόντα φθορίου στη συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση.