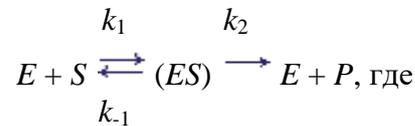


**Самостоятельная практическая работа 7**  
по теме: «Модели с ограничениями по субстрату»  
для студентов МБФ 2курс 4семестр специальность «биология»

Простейшая ферментативная реакция, в которой участвуют один субстрат ( $S$ ) и один фермент ( $E$ ) и появляется один продукт ( $P$ ) при распаде фермент-субстратного комплекса ( $ES$ ) имеет следующий вид:



$k_1, k_{-1}$  - константы скоростей прямой и обратной реакций образования фермент-субстратного комплекса;  $k_2$  - константа скорости образования продукта.

Эта система описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[S] \cdot [E] + k_{-1}[ES], \\ \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[S] \cdot [E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES], \\ \frac{d[ES]}{dt} &= -k_1[S] \cdot [E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES], \\ \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES] = v_p, \text{ где} \end{aligned} \quad (1)$$

$v_p$  - скорость образования продукта  $P$ ,

$[E], [S], [ES], [P]$  - концентрации соответственно фермента, субстрата, фермент-субстратного комплекса и конечного продукта.

Поскольку в системе сохраняется постоянной общая концентрация фермента  $E_0$ , то в любой момент времени сумма концентраций свободного и связанного фермента равна  $[E] + [ES] = E_0$ .

Характерное время  $\tau_E$  жизни переменных  $[E]$  и  $[ES]$  определяется наиболее быстрой стадией его распада с образованием продукта  $P$ , т.е. константой скорости  $v_p$  образования продукта:  $\tau_E = 1/k_2$ . Константа  $k_2$  соответствует числу актов катализа, т.е. числу актов распада  $ES$  и образования  $P$  в единицу времени. Время  $\tau_E$  - это время оборота фермента, а константа  $k_2$  называется числом оборотов фермента.

Характерное время  $\tau_S$  убыли  $S$  в системе и соответствующего появления  $P$  зависит от скорости образования продукта:  $\tau_S = S/v_p$ . Максимальная скорость образования продукта будет достигнута, когда весь фермент  $E_0$  находится в связанном состоянии:  $v_p^{\max} = k_2 \cdot E_0$ . Значит,  $\tau_S^{\max} = S/(k_2 \cdot E_0)$ . В обычных условиях концентрация субстрата  $S$  во много раз превышает концентрацию продукта, т.е.  $E/S \sim 10^{-4} \ll 1$ . Поэтому

$$\tau_S \gg \tau_E, \quad (2)$$

а это означает, что  $[E]$  и  $[ES]$  являются быстрыми переменными. Их изменения настолько быстры, что они пребывают все время около своих стационарных значений.

Следовательно, их можно описывать алгебраическими уравнениями, которые получаются путем приравнивания к нулю правых частей второго и третьего уравнения в модели (1):

$$\frac{d[E]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3).$$

При выполнении условий (2) и (3) получается известное в биохимии уравнение Михаэлиса-Ментен зависимости стационарной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

$$v_p = \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S}, \quad (4).$$

где  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  - константа Михаэлиса.

Рассчитайте максимальную скорость реакции, константу Михаэлиса  $K_M$  и константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор в реакции окисления N-метилглутамата, катализируемого N-метилглутамат-дегидрогеназой, в присутствии ингибитора  $\alpha$ -кетоглутурата по данным табл. 1. Определите тип ингибирования (конкуреннтное или неконкуреннтное).

**Таб. 1.** Начальная скорость реакции ( $v_0$ ) при разных начальных концентрациях субстрата ( $[S]_0$ )

|   |   |      |       |      |       |       |       |
|---|---|------|-------|------|-------|-------|-------|
| <b>Без ингибитора</b>   | $[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$                     | 1,00 | 0,625 | 0,50 | 0,417 | 0,264 | 0,200 |
|   | $v_0 \cdot 10^6, \text{ M} \cdot \text{МИН}^{-1}$ | 1,67 | 1,43  | 1,33 | 1,25  | 1,00  | 0,81  |
|   | $[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$                     | 1,00 | 0,625 | 0,50 | 0,417 | 0,264 | 0,200 |
| <b>С ингибитором</b><br>(концентрация $[I]_0 = 3 \cdot 10^{-3}$ ) | $[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$                     | 5,00 | 1,67  | 1,00 | 0,667 | 0,50  |       |
|   | $v_0 \cdot 10^6 \text{ M} \cdot \text{МИН}^{-1}$  | 1,56 | 1,00  | 0,77 | 0,57  | 0,45  |       |
|   | $[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$                     | 5,00 | 1,67  | 1,00 | 0,667 | 0,50  |       |

### Основные уравнения

При отсутствии ингибитора можно использовать такой вид уравнения Михаэлиса-Ментен

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

где  $v_0$  - начальная скорость ферментативной реакции,  $v_{\max}$  - максимальная скорость,  $K_M$  - константа Михаэлиса,  $[S]_0$  - начальная концентрация субстрата

В случае предложенных типов ингибирования:

*конкуреннтное ингибирование*

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]_0}{K_{M, \text{эфф}} + [S]_0}, \quad K_{M, \text{эфф}} = K_M \left( 1 + \frac{[I]_0}{K_I} \right);$$

*неконкуреннтное ингибирование*

$$v_0 = \frac{v_{\max, \text{эфф}} [S]_0}{K_M + [S]_0}, \quad v_{\max, \text{эфф}} = \frac{v_{\max}}{\left( 1 + \frac{[I]_0}{K_I} \right)};$$

где  $K_{M, \text{эфф}}$  и  $v_{\max, \text{эфф}}$  - эффективные параметры уравнения Михаэлиса-Ментен (в присутствии ингибитора),  $[I]_0$  - концентрация ингибитора,  $K_I$  - константа диссоциации комплекса фермент-ингибито

### Выполнение задачи

Задачу решают графически в программе «Excel».

Для этого на трёх диаграммах (тип - «Точечная», соединительные линии отсутствуют) строят по две зависимости (в отсутствие и в присутствии ингибитора):

1) на одной диаграмме

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (1.1)$$

$$\text{и} \quad \frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max, \text{эфф}}} + \frac{K_{M, \text{эфф}}}{v_{\max, \text{эфф}}} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (1.2)$$

2) на одной диаграмме

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{[S]_0}{v_{\max}} \quad (2.1)$$

$$\text{и} \quad \frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_{M, \text{эфф}}}{v_{\max, \text{эфф}}} + \frac{[S]_0}{v_{\max, \text{эфф}}} \quad (2.2)$$

3) на одной диаграмме

$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{[S]_0} \quad (3.1)$$

$$\text{и} \quad v_0 = v_{\max, \text{эфф}} - K_{M, \text{эфф}} \cdot \frac{v_0}{[S]_0} \quad (3.2)$$

Проводят для каждой зависимости линию тренда и по ней определяют параметры уравнений  $v_{\max}$  и  $K_M$  (в отсутствие ингибитора), а также  $v_{\max, \text{эфф}}$  и  $K_{M, \text{эфф}}$  - эффективные параметры уравнения Михаэлиса-Ментен (в присутствии ингибитора). Определяют тип ингибирования и рассчитывают  $K_I$  - константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор.

В этом случае в параметрах линии тренда следует отметить «показывать уравнение на диаграмме» и не помечать «пересечение кривой с осью Y в точке: 0»

Заполните табл. 2 (для всех величин привести размерности)

**Таблица 2.** Значения параметров уравнения Михаэлиса–Ментен и константы диссоциации комплекса фермент–ингибитор, рассчитанные по разным уравнениям

| Уравнения     | Без ингибитора |       |       | С ингибитором, тип ингибирования – ... |                     |       |       |
|---------------|----------------|-------|-------|--|---------------------|-------|-------|
|               | $v_{\max}$     | $K_M$ | $R^2$ | $v_{\max, \text{эфф}}$                 | $K_{M, \text{эфф}}$ | $K_I$ | $R^2$ |
| (1.1) и (1.2) |                |       |       |  |                     |       |       |
| (2.1) и (2.2) |                |       |       |  |                     |       |       |
| (3.1) и (3.2) |                |       |       |  |                     |       |       |