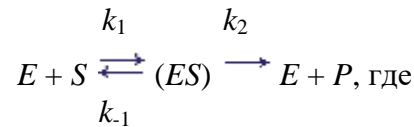


Самостоятельная практическая работа 7
по теме: «Модели с ограничениями по субстрату»
для студентов МБФ 2курс 4семестр специальность «биология»

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 τ_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 τ_E - это время оборота фермента, а константа k_2 называется числом оборотов фермента.

Характерное время τ_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 α -кетоглутурата по данным табл. 1. Определите тип ингибирования (конкуреннтное или неконкуреннтное).

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

Без ингибитора	$[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$	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
С ингибитором (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)							