



Ферментативная кинетика

Котова Дарья, Янина Елена, Пивнюк Анастасия, Лашкевич Злата, Лысенко Роман

∂t

Лаборатория количественной биологии

Летняя школа молекулярной и теоретической биологии, Пущино, 2012

Введение

Ферменты являются основой жизнедеятельности организма благодаря своей способности значительно ускорять биохимические реакции в условиях живой системы.

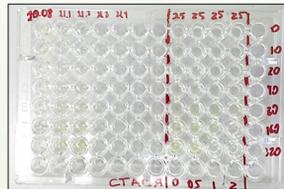
В ходе выполнения проекта был проведен ряд экспериментов по изучению каталитических характеристик фермента на примере тромбина.

В организме человека тромбин является ключевым белком в системе свертывания крови.

Материалы и методы

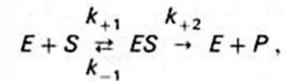
Материалы: хромогенный субстрат Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, (Кардиологический центр, Москва), человеческий альфа-тромбин, ингибитор тромбина PPACK (Phe-Pro-Arg-chloromethylketone) (Haematology Tech.)

Измерение оптической плотности проводилось на планшетном ридере ThermoMax (Molecular Devices) на 96-луночном планшете. Реакция проводилась в фосфатном буфере с добавлением 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина.



Теория

Простейшая ферментативная реакция описывается следующей схемой:



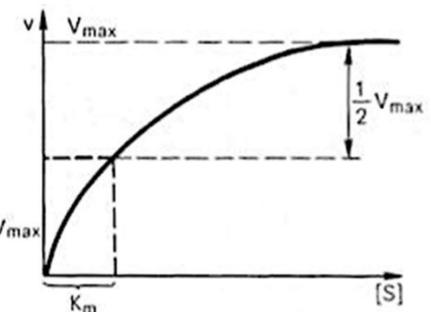
где E – фермент, S – субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс,

k_{-1}, k_{+1}, k_{+2} – константы скоростей.

Поведение такой системы описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$v = k \frac{[E][S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max} = k[E]$$



Константа Михаэлиса K_m характеризует сродство фермента к субстрату и чем она меньше, тем быстрее ферментативная реакция достигает своей максимальной скорости. Константа скорости k характеризует количество каталитических актов, которое способен осуществить фермент за единицу времени. Данные постоянные являются характеристиками каталитической эффективности фермента, и их значение не зависит от концентрации субстрата.

Результаты

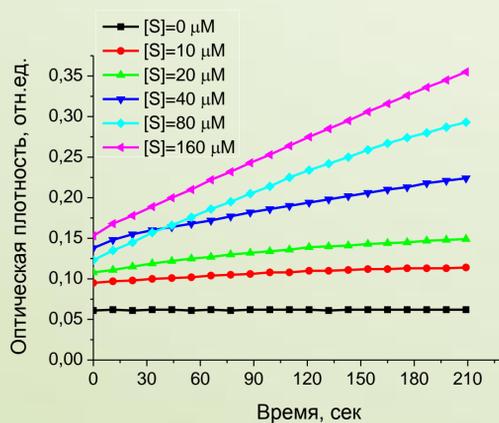


Рис.1. Зависимость оптической плотности раствора от времени при разных концентрациях субстрата. Концентрация тромбина 2 нМ.

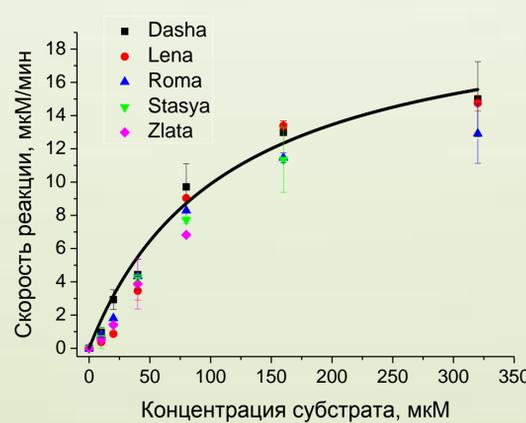


Рис.2. Зависимость скорости наработки продукта от концентрации субстрата. Данные по 5 независимым измерениям. Сплошной линией показана аппроксимация гиперболой

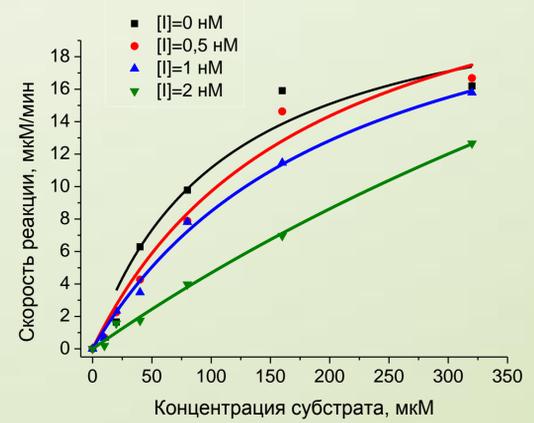


Рис.3. Зависимость скорости наработки продукта от концентрации субстрата для различных концентраций ингибитора.

Концентрация pNA рассчитывается из оптической плотности путем калибровки на известную концентрацию. Скорость наработки продукта считается как угол наклона графика зависимости концентрации продукта от времени.

$K_m, \mu\text{M}$	$K_{cat}, \text{сек}^{-1}$
121 ± 30	$191,7 \pm 20$

Таблица 1. Значения кинетических констант, полученные из аппроксимации гиперболой экспериментальных данных (рис.2)

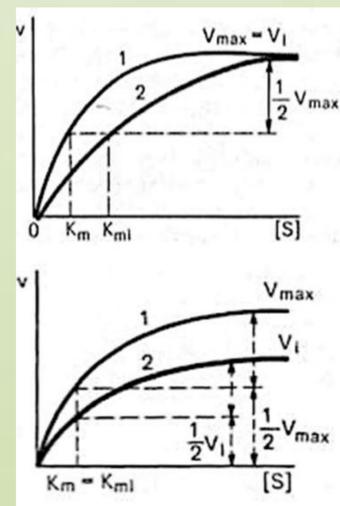


Рис.4. График теоретической зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при конкурентном ингибировании (2) и при отсутствии ингибитора (1) [1]

Рис.5. График теоретической зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при неконкурентном ингибировании (2) и при отсутствии ингибитора (1)

Выводы

- 1) Расщепление альфа-тромбином субстрата Tos-Gly-Pro-Arg-pNA описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, с константой Михаэлиса, равной $121 \pm 30 \mu\text{M}$, и константой скорости, равной $191,7 \pm 20 \text{сек}^{-1}$
- 2) Исследуемый ингибитор PPACK ингибирует тромбин по конкурентному механизму.