

УДК 541.124

Т. С. СУКИАСЯН

ДИСПЕРСИЯ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ КОНКУРЕНТНОМ СВЯЗЫВАНИИ ИНГИБИТОРА С ФЕРМЕНТОМ

В работе вычислена дисперсия скорости реакции иммобилизованных ферментов при конкурентном связывании ингибитора с ферментом. Показано, что при малых концентрациях субстрата с увеличением концентрации дисперсия линейно растет, а при больших концентрациях субстрата – уменьшается. Показано также, что наличие ингибитора не влияет на величину максимальной дисперсии, но сдвигает координату максимума в сторону больших концентраций субстрата.

Введение. В настоящее время иммобилизованные ферменты успешно применяют во многих областях науки и техники. Наиболее впечатляющие успехи связаны с их применением в биосенсорах [1–3]. Полезный сигнал биосенсора возникает в результате обратимого связывания субстрата с иммобилизованным ферментом. Важным параметром биосенсора является его размер. Если он мал, то следует учесть влияние флуктуации числа комплексов субстрата с иммобилизованным ферментом [4] на полезный сигнал биосенсора. Надо отметить, что помимо субстрата в среде может быть и ингибитор, который, связываясь с активным центром иммобилизованного фермента, влияет как на уровень полезного сигнала биосенсора, так и на величину флуктуаций сигнала. Данная работа посвящена теоретическому исследованию влияния конкурентного ингибитора на дисперсию скорости реакции иммобилизованных ферментов.

Теоретическая часть. Примем, что фермент иммобилизован на носителе, в то время как свободные субстрат, продукт и ингибитор находятся в растворе. Рассмотрим случай, когда вначале устанавливается быстрое равновесие между фермент-субстратным комплексом, свободным ферментом и субстратом, а затем наступает медленная стадия реакции – распад фермент-субстратного комплекса на продукт и свободный фермент. В этом случае скорость реакции иммобилизованных ферментов определяется количеством фермент-субстратного комплекса на носителе и скоростью его распада на продукт и свободный фермент. Расчет дисперсии скорости

ферментативной реакции сводится к расчету дисперсии количества фермент-субстратного комплекса на носителе. По аналогии с работой [5] можно определить вероятности того, что активный центр свободен (p_0), занят субстратом (p_s) или занят ингибитором (p_i), следующими формулами:

$$p_0 = \frac{1}{1 + K_S[S_0] + K_I[I]}, \quad p_s = \frac{K_S[S_0]}{1 + K_S[S_0] + K_I[I]}, \quad p_i = \frac{K_I[I]}{1 + K_S[S_0] + K_I[I]}, \quad (1)$$

где K_S и K_I – константы связывания субстрата и ингибитора с иммобилизованным ферментом соответственно, $[S_0]$ и $[I]$ – концентрации субстрата и ингибитора в растворе вблизи активного центра фермента. Считаем, что иммобилизованные ферменты не взаимодействуют друг с другом. В этом случае связывание субстрата с ними подчиняется вероятностной схеме Бернулли и, согласно ей, среднее число комплексов иммобилизованного фермента с субстратом $\overline{N_S}$ и его дисперсия $\overline{\Delta N_S^2}$ определяются по известным формулам [5]:

$$\overline{N_S} = Np_s, \quad (2)$$

$$\overline{\Delta N_S^2} = Np_s(1 - p_s), \quad (3)$$

где N – максимальное количество иммобилизованного фермента, которое обычно обозначают через $[E_0]$. Поскольку скорость ферментативной реакции V определяется произведением количества фермент-субстратного комплекса N_S на константу скорости распада этого комплекса на свободный фермент и продукт k_2 , т.е. $V = k_2 N_S$, то, учитывая (2) и (3), можно написать следующие окончательные выражения для средней скорости ферментативной реакции V (чтобы не вводить дополнительных обозначений среднюю скорость ферментативной реакции обозначим через V) и ее дисперсии $\overline{\Delta V^2}$ при конкурентном ингибировании в виде

$$V = \frac{V_{\max}[S_0]}{K_M + [S_0] + ([I]K_M / K_I)}, \quad (4)$$

$$\overline{\Delta V^2} = \frac{V_{\max}^2 [S_0] (K_M + [I]K_M / K_I)}{N(K_M + [S_0] + ([I]K_M / K_I))^2}, \quad (5)$$

где $V_{\max} = k_2[E_0]$, K_M – константа Михаэлиса, в нашем случае $K_M = K_S^{-1}[6]$, K_i – константа ингибирования, которая определяется как $K_i = K_I^{-1}$.

Результаты и их обсуждение. Для анализа полученных результатов перепишем формулу (5) в виде

$$\overline{\Delta V^2} = \frac{V_{\max}^2 [S_0] K_M^1}{N(K_M^1 + [S_0])^2}, \quad \text{где } K_M^1 = K_M(1 + [I]/K_i). \quad (5a)$$

Сопоставление формулы (5a) с соответствующей формулой из работы [7] показывает, что если в (5a) заменить $K_M(1 + [I]/K_i)$ на K_M , то получится

результат работы [7]. Наличие конкурентного ингибитора формально приводит к переопределению константы Михаэлиса. Как и следовало ожидать, если $[I]=0$, то формула (5a) переходит в соответствующую формулу из работы [7]. Из (5a) видно, что дисперсия скорости ферментативной реакции при малых концентрациях субстрата пропорциональна $[S_0]$, а при больших концентрациях – уменьшается как $1/[S_0]$. Максимальная дисперсия $V_{\max}^2/(4N)$ достигается при $[S_0] = K_M(1 + [I]/K_i)$.

Таким образом, в данной работе вычислена дисперсия скорости реакции иммобилизованных ферментов при наличии конкурентного ингибитора и показано, что его присутствие качественно не меняет зависимость дисперсии скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Величина максимальной дисперсии тоже не меняется, однако координата максимума становится равной $[S_0] = K_M(1 + [I]/K_i)$.

Кафедра биофизики

Поступило 11.07.2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Mason M.J. – Assoc. Anal. Chem., 1983, v. 66, p. 981–984.
2. Биосенсоры, основы и приложения. Ред. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. М.: Мир, 1992, с. 614.
3. Кулис Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс: Мокслас, 1981, с. 200.
4. Arakelyan V.B., Simonyan A. and Wild J. – Biosensors and Bioelectronics, 1998, v. 13, № 1, p. 55–59.
5. Arakelian V.B. – Membr. Cell. Biol., 1996, v. 10, p. 477–482.
6. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990, с. 350.
7. Arakelian V.B., Simonyan A.L., Gevorkyan E.S., Sukiasyan T.S., Arakelyan A.V., Grigoryan B.A., Gevorkyan A.E. – Electronic Journal of Natural Sciences, 2004, v. 3, p. 43–45.

S. U. ՍՈՒՔԻԱՅԱՆ

ԻՍՏՈՐԻԿԻՉԱՅՎԱԾ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՌԵԱԿՑԻԱՅԻ ԱՐԱԳՈՒԹՅԱՆ
ԴԻՍՊԵՐՍԻԱՆ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ԵՎ ԻՆՀԻԲԻՏՈՐԻ ՄՐՅԱԿՑԱՅԻՆ
ԿԱՊՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ամփոփում

Աշխատանքում հաշվարկված է իմնորիլիզացված ֆերմենտների ռեակցիայի արագության դիսպերսիան ինհիբիտոր–ֆերմենտ մրցակցային կապման դեպքում: Ցույց է տրված, որ սուբստրատի ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում դիսպերսիան գծայնորեն աճում է սուբստրատի կոնցենտրացիայի ավելացման հետ, իսկ սուբստրատի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում դիսպերսիան փոքրանում է: Ցույց է տրված նաև, որ ինհիբիտորի առկա-

յությունը չի ազդում դիսպերսիայի առավելագույն արժեքի վրա՝ համեմատած այն դեպքի հետ, երբ այն բացակայում է: Ինհիբիտորի առկայությամբ դիսպերսիայի մաքսիմումը տեղաշարժվում է դեպի սուբստրատի մեծ կոնցենտրացիաները:

T. S. SUKIASYAN

DISPERSION OF REACTION RATE OF IMMOBILIZED ENZYMES DURING ENZYME INHIBITOR CONCURRENT BINDING

Summary

In this paper the dispersion of reaction rate of immobilized enzymes during enzyme inhibitor concurrent binding was calculated. It is shown that in substrate small concentration the dispersion grows linearly with increasing of that concentration, and when the number of substrates is huge the dispersion is decreasing. It's also shown that the presence of inhibitor doesn't affect on maximal dispersion value in comparison with the case when there is no inhibitors. Inhibitor moves the maximum coordinate to the side of big concentration.