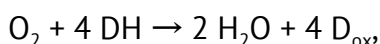


### **Вводные данные**

Цель эксперимента: Определить кинетические параметры ( $K_m$ ,  $V_m$ ) реакции, катализируемой лакказой из гриба *Trametes hirsuta*, из зависимости текущей концентрации субстрата/продукта от времени реакции при различных начальных концентрациях данного субстрата.

Катализируемая ферментом реакция:



где DH – восстановленная форма донора электронов,  $D_{ox}$  – окисленная форма донора электронов.

Условия проведения эксперимента:

Фермент: лакказа из гриба *Trametes hirsuta*.

Субстрат, концентрацию которого варьируют: донор электронов ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) аммониевая соль).

Условия проведения эксперимента: 20 мкл белка (лакказа С.с., молекулярная масса 63 кДа) концентрацией 0,01 мг/мл добавляли в спектрофотометрическую ячейку объемом 2,5 мл, содержащую 100 mM Na-Ас буферный раствор pH 4,5 и донор электронов ABTS в указанных концентрациях. Температура проведения реакции 25°C, концентрация кислорода в ячейке 270 мкМ. В результате измерения и преобразования данных получали зависимость концентрации продукта (окисленной формы донора электронов) от времени протекания реакции.

Концентрация фермента в реакционной ячейке:  $1.27 \cdot 10^{-9}$  М

## Задания

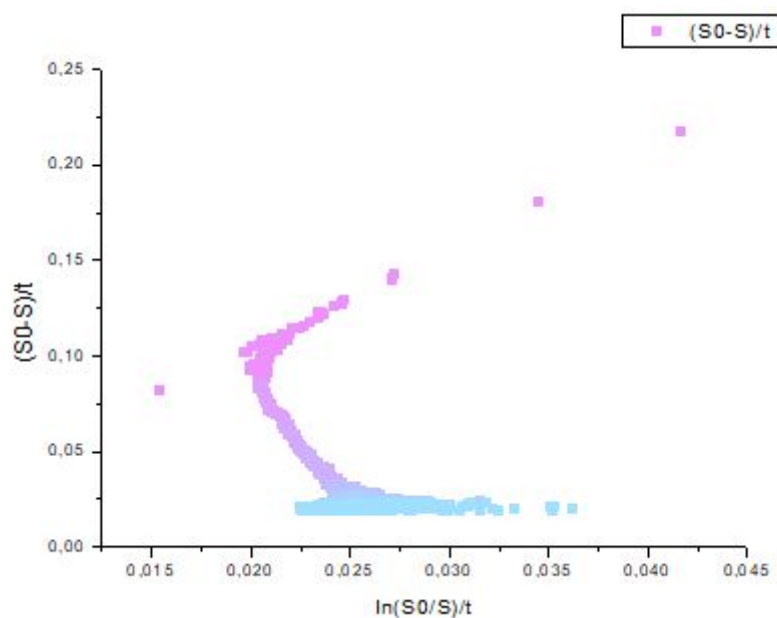
### Задание 1.

**Таблица 1.** Определение кинетических параметров в программе Origin в координатах Уокера-Шмидта с помощью различных методов аппроксимации.

Варьируемый субстрат	Аппроксимация	$S_0$ , мкМ	$V_m$ , мкМ/сек	$K_M$ , мкМ
ABTS	Линейная	5.26	1,27128	11.82026
		20.33	1.85184	14.21007
		33.43	1.19484	10.73025
	Методом нелинейной регрессии	5.26	0.87592	7.58702
		20.33	0.96496	9.64816
		33.43	0.92204	8.1757

*Почему (с Вашей точки зрения) интегральная кривая не линейна во всем диапазоне изменения аргумента?*

Интегральная кривая была окрашена мной, чтобы соответствовать изменению времени и можно было бы проследить динамику ее изменения.



Изучив полученный рисунок, я заметила, что интегральная кривая в координатах Уокера-Шмидта может быть визуально разделена на три части. Эти части довольно явно видны на графике.

Точки на графиках в координатах Уокера-Шмидта окрашены в соответствии с временной точкой  $t$ .

Для дальнейшей линейной аппроксимации был выбран светло-фиолетовый участок (срединный). Во-первых при рассмотрении крайних значений мы можем внести большую ошибку в результаты. Розовый участок не был использован для аппроксимации потому что, по всей видимости, в начале реакции уходит некоторое время на связывание фермента с субстратом и на установление стационарного состояния, поэтому эти данные нельзя считать репрезентативными. В конце же реакции (голубой участок), субстрат истощается и поэтому мы можем считать количество продукта неизменным. Вполне может быть так, что на конечном участке продукт может начать ингибировать реакцию. Таким образом конечные точки тоже выпадают из рассмотрения и мы считаем, что общий паттерн реакции описывается именно светло-фиолетовым участком.

## **Задание 2.**

Полученные значения в этом эксперименте гораздо более консистентны, чем те, которые мы получили в Практикуме 1. Тем не менее некоторые отличия все же наблюдаются. Например, все значения, полученные путем нелинейной аппроксимации, ощутимо выше, чем те, которые стали результатом линейной аппроксимации. Также эти значения в большей степени сходятся с полученными ранее (Практикум 1). Дополнительно можно заметить, что самые высокие результаты в обоих случаях получились при  $S_0 = 20.33$ . При этом при работе с координатами Уокера-Шмидта с помощью линейной аппроксимации при  $S_0 = 33.43$  значения довольно хорошо согласуются с наблюдаемыми ранее. Но наиболее всего значения согласуются при нелинейной аппроксимации и  $S_0 = 5.26$ . Из этого я могу сделать вывод, что самые достоверные результаты наблюдаются при малых значениях  $S_0$  нелинейной аппроксимацией и при больших значениях  $S_0$  при линейной аппроксимации.

### 3\*. Бонусное задание.

Сравнить значения параметров ( $V_m$  и  $K_M$ ), определённые двумя методами:

- из зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата (практикум 1)
- из интегральной кинетической кривой (зависимости текущей концентрации субстрата/продукта от времени реакции) (практикум 2)

Какой метод определения параметров, с Вашей точки зрения, более точный?

Какой из этих методов, на Ваш взгляд, удобнее использовать при выполнении эксперимента и анализе данных?

Сравним полученные данные:

**Таблица 1.**

Координаты	Способ вычисления скорости	$K_M$ , мкМ	$V_m$ , мкМ/сек	$k_2$ , сек <sup>-1</sup>
Прямые	$V = tg$	5.4847	0.92224	726.1733
Прямые	$V = dP/dt$	4.20968	1.2440	979.5276
Хейнса	$V = tg$	4.54221	0.86908	684.3150
Хейнса	$V = dP/dt$	0.62178	0.89908	707.9371
Иди-Хофсти	$V = tg$	6.61054	0.94752	746.0787
Иди-Хофсти	$V = dP/dt$	1.15638	0.89048	701.1654
Лайнуивера-Берка	$V = tg$	7.70716	1.00188	788.8819
Лайнуивера-Берка	$V = dP/dt$	9.30174	1.30652	1028.7559

**Таблица 2.** (выделены самые лучшие значения)

Варьируемый субстрат	Аппроксимация	$S_0$ , мкМ	$V_m$ , мкМ/сек	$K_M$ , мкМ
ABTS	Линейная	5.26	1,27128	11.82026
		20.33	1.85184	14.21007
		33.43	1.19484	10.73025
	Методом нелинейной регрессии	5.26	0.87592	7.58702
		20.33	0.96496	9.64816
		33.43	0.92204	8.1757

Значения  $V_m$  между результатами двух практикумов отличаются гораздо меньше, чем значения  $K_m$ , и в целом очень похожи. В случае  $K_m$  подход, который мы использовали в Практикуме 1 дает существенно меньшие значения.

В Практикуме 1 был сделан вывод о надежности результатов, полученных с помощью линейной аппроксимации. Также были названы предпочтительными координаты Хейнса.

В Практикуме 2 лучшими оказались результаты, полученные нелинейной аппроксимацией. Наиболее всего они согласуются с данными, рассчитанными с помощью координат Лайнуивера-Берка. Самыми репрезентативными стали данные, полученные нелинейной аппроксимацией с  $S_0 = 20.33$  и  $S_0 = 33.43$ .

Как мне кажется, подход Практикума 2 в целом более точен и удобен. Использование метода Уолкера-Шмидта в результате дает значения с меньшим разбросом. Также вместо использования множества аппроксимаций, мы определяем нужные нам параметры по одной кривой, что, предположительно значительно уменьшает вероятность увеличения средней ошибки. Таким образом, я бы отдала предпочтение именно методу из Практикума 2.