

# تقدير قيم (Km) للأنزيمات المستخلصة كميًا باستخدام

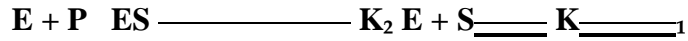
## بيانات لينوفربوك الحديثة

محاضرة دكتور ضياء فالح الفيكلي

انزيمات متقدم

طلبة الدراسات العليا

غالباً ما يكون من المفيد التنبؤ بنشاط أنزيم ما عبر سلسلة من تراكيز المادة الأساس التيواجهها الأنزيم في الجسم وبالتالي يمكن دراسة الدور الفسيولوجي الذي يلعبه الأنزيم. فنستخدم لهذا الغرض التي تصف اعتماد سرعة التفاعل على تركيز المادة الأساس [S] إذا افترضنا انالتفاعل الذي حفزه الأنزيم يمتزجا معاً ليشكل مركب معقد من الأنزيم ومادته الأساس [ES] الذي يتحلل فيما بعد أما إلى الأنزيم والمادة الأساس أو الأنزيم والمادة الناتجة.



K-1

يمكن وصف المعدل الذي تحصل فيه التفاعلات الجزئية لهذا النموذج بواسطة معدل ثوابت السرعة Rate constants ( $K_2, K-1, K_1$ ) وحسب هذا النموذج فان الزيادة في السرعة الأولية initial velocity ( $V_i$ ) التي نلاحظ مع الزيادة في [S] ترجع إلى الزيادة في كمية المعقد [ES] الناتج. وعند السرعة القصوى  $V_{max}$  يكون الأنزيم بأجمعه مرتبط على شكل معقد ES وبموجب هذه المصطلحات وبالتعويض عن ثوابت السرعة Velocity constants بثابت ميكالس

:- فان Michaelis-Menten(Km) منتن

$$K_m = \frac{K-1+K_2}{K_1}$$

$K_1$

$$Vi = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \dots\dots\dots(1)$$

Michaelis-Menten

يقصد بقيمة ( $K_m$ ) تركيز المادة الأساس عندما تكون سرعة التفاعل الذي يساعده الأنزيم قد

بلغ نصف سرعته القصوى. لما كان الشكل الذي يمكن الحصول عليه عند رسم  $V_i$  م قابل  $[S]$  زائدي المقطع، كان من الصعب قياس السرعة العظمى  $V_{max}$  ومن أجل تسهيل عملية قياس الثوابت الحركية  $K_m$  يفضل رسمها بشكل خطي اعتماداً على رسم لينويغربوك **Lineweaver-Burk** وبإعادة تنظيم معادلة **Michaelis-Menten** وجعلها بشكل خط مستقيم  $y =$

:- فان  $mx + b$



$$\frac{V_i}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{K_m + [S]} \quad (1) \dots\dots\dots$$

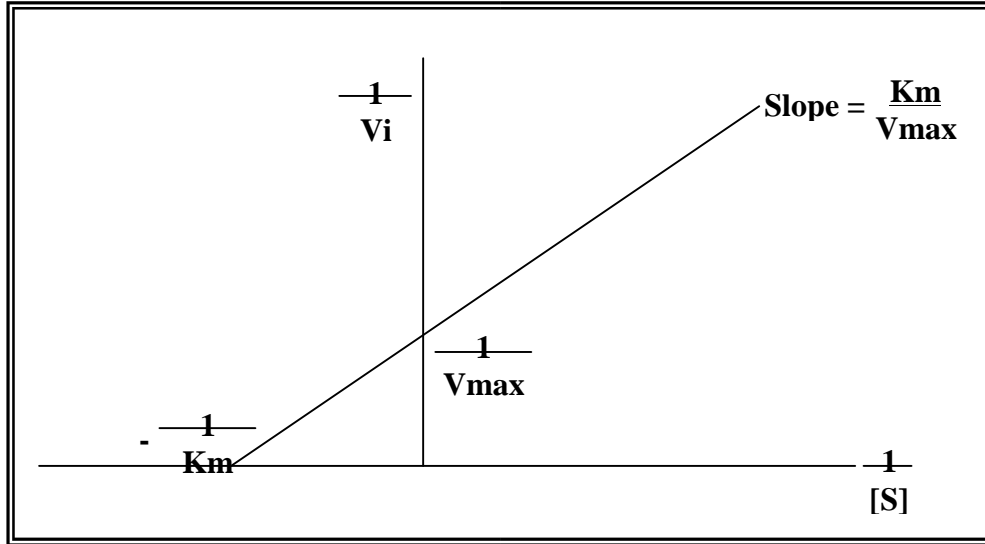
بعكس المعادلة (1) وضرب حدي المعادلة نحصل على المعادلة (2)

$$\frac{K_m + [S]}{[S]} = \frac{V_{max}}{V_i}$$

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2) \text{ Lineweaver-Burk} \dots\dots\dots$$

Slope =  $\frac{K_m}{V_{max}}$  Slope نحصل على الميل  $1/[S]$  ضد  $1/V_i$  لذا فعند رسم

وفي مخطط لينويغربوك فان المحور Y يمثل  $1/V_i$  والمحور X يمثل  $1/[S]$  والقاطع للمحور Y يمثل  $1/V_{max}$  والقاطع للمحور X يمثل  $-1/K_m$



شكل (16) رسم لينويفربوك Lineweaver-Burk plot

- عندما تكون قيمة  $1/V_i = 0$  صفر ، فان  $1/[S] = -1/V_{max}$  ضرب  $K_m/V_{max}$  ويكون -  
 $1/[S] = 1/K_m$  لذا تبلغ قيمة القاطع  $-1/K_m$  على المحور X الذي يمثل  $1/[S]$  .

ان التراكيز المادة الأساس المختارة لتكوين الرسم العكسي **Reciprocal plot** يجب ان تكون قريبة إلى قيمة  $K_m$  ، فإذا كانت التراكيز عالية جداً نسبة إلى قيمة  $K_m$  أصبح الشكل البياني أفقياً فيصعب قياس السرعة العظمى  $V_{max}$  . وعندما يكون ميل الخط قريباً إلى الصفر يصعب قياس الشكل البياني قاطعاً كلا المحورين بصورة متقاربة من نقطة البداية ، عندئذ يمكن حساب قيمتي كل من  $K_m$  و  $V_{max}$  بصورة دقيقة.

#### مسألة:-

تم قياس السرعة الأولية  $V_i$  للتفاعل الأنزيمي عند استعمال تراكيز مختلفة من المواد الأساسويوضح الجدول التالي نتائج هذا التفاعل. احسب قيم كل من  $K_m$  و  $V_{max}$  من الشكل البياني الذي يربط  $1/V_i$  ضد  $1/[S]$  حسب طريقة **Lineweaver-Burk**.

[S]	$V_i$	$1/[S]$	$1/V_i$
M	Moles/liter min		
$8.35 \times 10^{-6}$	13.8	$12 \times 10^4$	$7.24 \times 10^{-2}$
$1.00 \times 10^{-5}$	16.0	$10 \times 10^4$	$6.25 \times 10^{-2}$
$1.25 \times 10^{-5}$	19.1	$8 \times 10^4$	$5.23 \times 10^{-2}$
$1.67 \times 10^{-5}$	23.8	$6 \times 10^4$	$4.20 \times 10^{-2}$
$2.0 \times 10^{-5}$	26.7	$5 \times 10^4$	$3.75 \times 10^{-2}$

$2.5 \times 10^{-5}$	30.8	$4 \times 10^4$	$3.25 \times 10^{-2}$
$3.3 \times 10^{-5}$	36.2	$3 \times 10^4$	$2.76 \times 10^{-2}$
$5.0 \times 10^{-5}$	44.5	$2 \times 10^4$	$2.25 \times 10^{-2}$
$1.0 \times 10^{-4}$	57.2	$1 \times 10^4$	$1.75 \times 10^{-2}$
$2.0 \times 10^{-4}$	66.7	$0.5 \times 10^4$	$1.50 \times 10^{-2}$

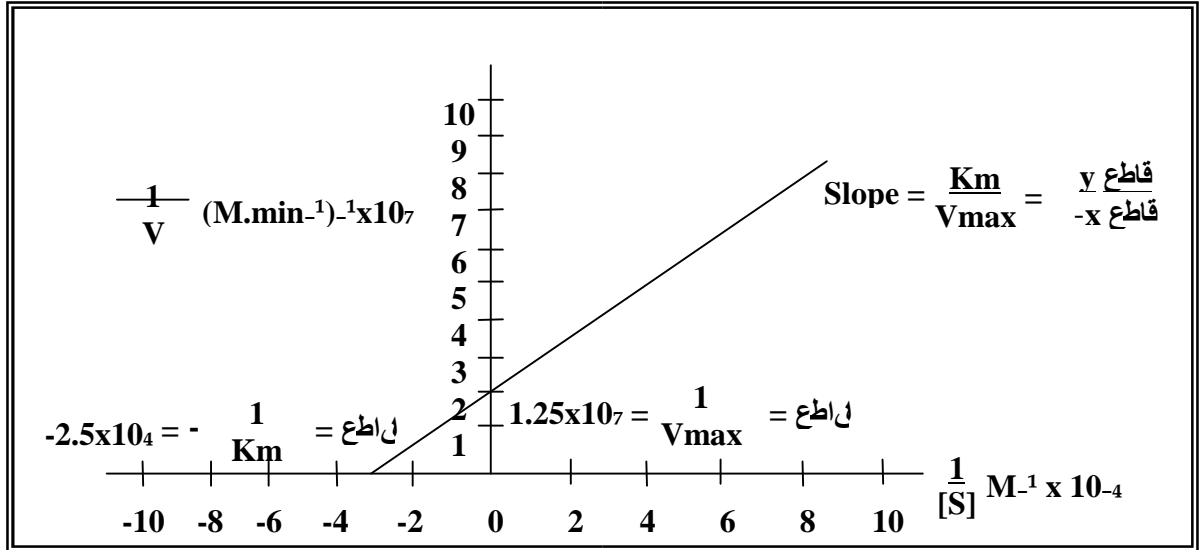
الحل:-

عندما يبلغ تركيز المادة الأساس  $8.35 \times 10^{-6}$  مول فان:-

$$\begin{aligned}
 & \frac{1}{8.35 \times 10^{-6}} = \frac{1}{[S]} \\
 & = 0.12 \times 10^6 \\
 & = 12 \times 10^4
 \end{aligned}$$

وبالطريقة نفسها يمكن حساب قيمة  $1/V_i$  فمثلاً عندما يكون التركيز  $[S] = 5.0 \times 10^{-6}$  مول تصبح قيمة  $V_i = 5.44$  ميكرومول/لتر/دقيقة.

$$= 0.0225 = 2.25 \times 10^{-2} \quad V_i^1 = 44.5^1$$



شكل (17) الرسم البياني بطريقة Lineweaver-Burk لتفاعل الأيزوبي بوجود تركيز مخفية من المادة الأساس.

المحور  $1/[S]$  يقصد به المولارية العكسية والعامل المضاف  $10^{-4}$  يقصد بأنه كل قيمة من

القيما العكسية قد تم ضربها في القيمة  $10^{-4}$  وحسب الشكل (17) فان: - القاطع  $\frac{1}{V_{max}}$

$$10^7 \times 1.25$$

$$= V_{max} \times 10^7 \times 11.25$$

$$= 10^{-7} \times 0.80$$

$$= 10^{-9} \times 80 \text{ مول / لتر. دقيقة}^{-1}$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 10^{-7} \times 11.25 \text{ أما}$$

$$= 10^{-4} \times 2.5 \text{ القاطع}$$

$$K_m$$

$$= 10^{-4} \times 0.4$$

$$= 10^{-5} \times 4$$

مول