تقدير قيم (Km) للأنزيمات المستخلصة كمياً باستخدام بيانات لينويفربوك الحديثة

محاضرة دكتور ضياء فالح الفكيكي

انزيمات متقدم

طلبة الدرسات العليا

غالباً ما يكون من المفيد التنبؤ بنشاط أنزيم ما عبر سلسلة من تراكيز المادة الأساس التييواجهها الأنزيم في الجسم وبالتالي يمكن دراسة الدور الفسيولوجي الذي يلعبه الأنزيم. فنستخدملهذا الغ رض 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.

$$E + P \quad ES \xrightarrow{K_2} E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}}$$

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

فان **Michaelis-Menten(Km)** منتن :-

$$Km = \frac{K_{-1}+K_2}{K_1}$$

معادلة **Michaelis-Menten** $Vi = \frac{Vmax\,[S]}{[S] + Km}$ .....(1)

يقصد بقيمة **(Km)** تركيز المادة الأساس عندما تكون سرعة التفاعل الذي يساعده الأنزيمقد بلغ نصف سرعته القصوى. لما كان الشكل الذي يمكن الحصول عليه عند رسم **Vi** م قابل **[S]** زائدي المقطع، كان من الصعب قياس السرعة العظمى **Vmax** ومن اجل تسهيل عمليةقياس الثوابت الحركية **Km** يفضل رسمها بشكل خطي اعتماداً على رسم لينويفربوك**Lineweaver-Burk** وبإعادة تنظيم معادلة **Michaelis-Menten** وجعلها بشكل خط مستقيم **y =**

mx + b فان :-

Vi = [S] ..... (1)

Vmax Km + [S]

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

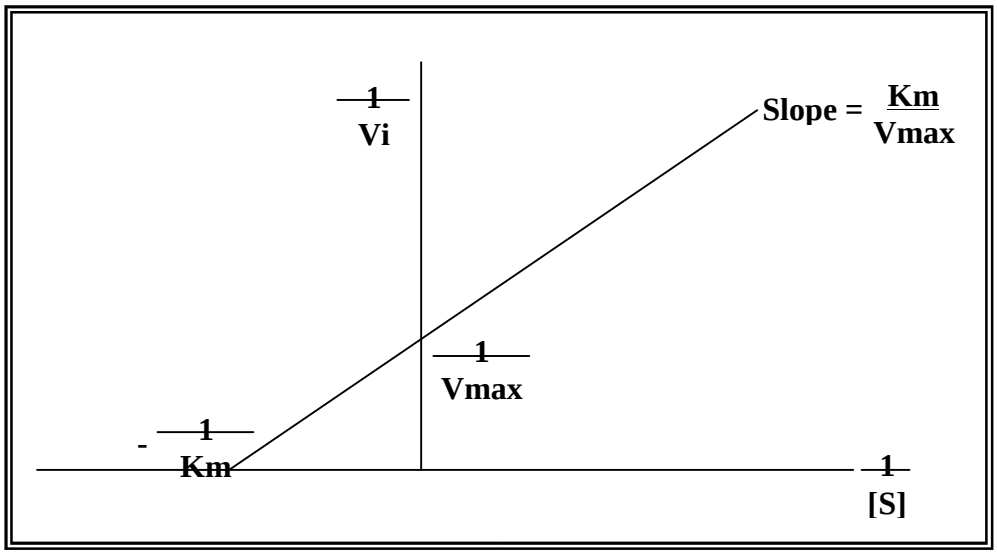
Vmax Km + [S]

Vi = [S]

1 / Vi = Km / Vmax X 1 / [S] + 1 / Vmax ..... (2) Lineweaver-Burk

Slope = Km / Vmax نحصل على الميل **Slope** **1 / [S]** ضد 1 /v لذا فعند رسم

وفي مخطط لينويفربيرك فان المحور **Y** يمثل **1 / Vi** والمحور **X** يمثل **1 / [S]** والقاطع للمحور **Y** يمثل **1 / Vmax** والقاطع للمحور **X** يمثل **-1 / Km**



شكل (16) رسم لينويفربوك Lineweaver-Burk plot

عندما تكون قيمة **1/Vi** = صفر ، فان **-1/Vmax** = **1/ [S]** ضرب **Km/Vmax** ويكون - **1/[S] = 1/Km** لذا تبلغ قيمة القاطع **-1/Km** على المحور X الذي يمثل **1/[S]** .

ان التراكيز المادة الأساس المختارة لتكوين الرسم العكسي **Reciprocal plot** يجب ان تكون قريبة إلى قيمة **Km** ، فإذا كانت التراكيز عالية جداً نسبة إلى قيمة **Km** أصبح الشكل البيانيأفقياً فيصعب قياس السرعة العظمى **Vmax** . وعندما يكون ميل الخط قريباً إلى الصفر يصعبقياس الشكل البياني قاطعاً كلا المحورين بصورة متقاربة من نقطة البداية ،عندئذ يمكن حسابقيمتي كل من **Km** و **Vmax** بصورة دقيقة.

مسألة:-

تم قياس السرعة الأولية **Vi** للتفاعل الأنزيمي عند استعمال تراكيز مختلفة من المواد الأساسويوضح الجدول التالي نتائج هذا التفاعل. احسب قيم كل من **Km** و **Vmax** من الشكل البياني الذييربط **1/Vi** ضد **1/[S]** حسب طريقة **Lineweaver-Burk**.

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

$2.5x10^{-5}$	30.8	$4\ x10^{4}$	$3.25\ x10^{-2}$
$3.3x10^{-5}$	36.2	$3\ x10^{4}$	$2.76\ x10^{-2}$
$5.0x10^{-5}$	44.5	$2\ x10^{4}$	$2.25\ x10^{-2}$
$1.0x10^{-4}$	57.2	$1\ x10^{4}$	$1.75\ x10^{-2}$
$2.0x10^{-4}$	66.7	$0.5\ x10^{4}$	$1.50\ x10^{-2}$

الحل:-

عندما يبلغ تركيز المادة الأساس $8.35x10^{-6}$ مول فان:-

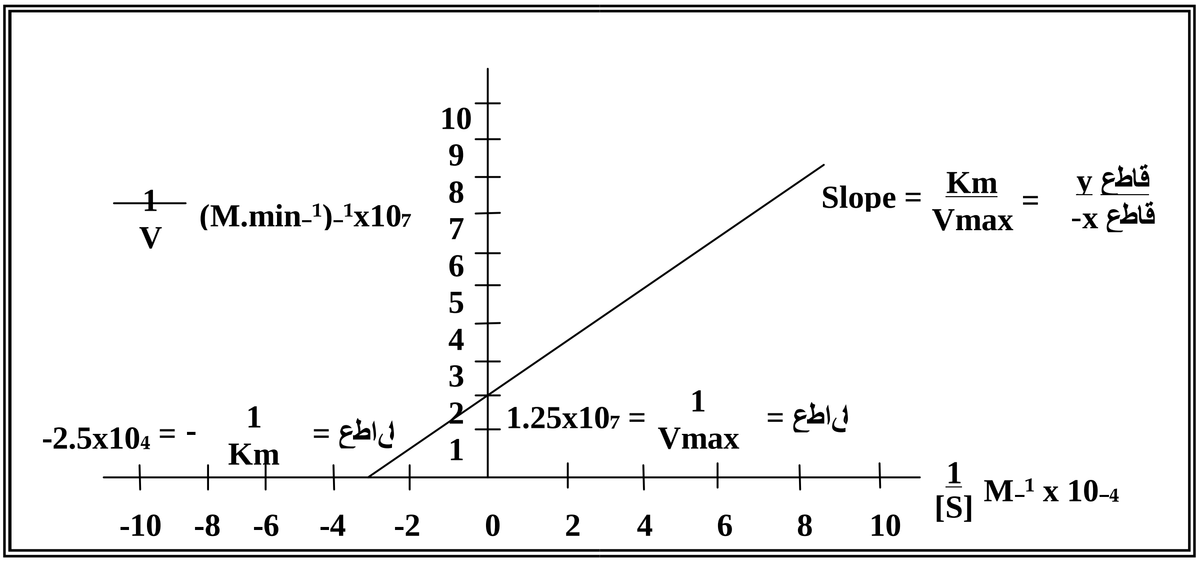
$$\frac{1}{[S]} = \frac{1}{8.35x10^{-6}}$$

$$= 0.12 \times 10^{6}$$

$$= 12 \times 10^{4}$$

وبالطريقة نفسها يمكن حساب قيمة **1/Vi** فمثلًا عندما يكون التركيز **[S] =** $5.0x10^{-6}$ مول تصبحقيمة **Vi = 5.44** ميكرومول/لتر/دقيقة.

$$\frac{1}{Vi} = \frac{1}{44.5} = 2.25x10^{-2} = 0.0225$$



شكل (17) الرسم البياني بطريقة Linewearver-Burk لتفاعل الأنزيمي بوجود تركيز مختلفة من المادة الأساس.

المحور 1/[S] يقصد به المولارية العكسية والعامل المضاف 10^{-4} يقصد بأنه كل قيمة من القيمالعكسية قد تم ضربها في القيمة 10^{-4} وحسب الشكل (17) فان:– القاطع $= \frac{1}{Vmax}$

10^{7} x1.25

$$Vmax = \frac{1}{1.25 \times 10^{7}}$$

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

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

أما $-\frac{1}{Km} = -2.5 \times 10^{4}$

القاطع $= \frac{1}{Km} = 2.5 \times 10^{4}$

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

$$= 4 \times 10^{-5}$$ **مول**