

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ
МИКРОАНАЛИЗ.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В
МИКРОАНАЛИЗЕ
ФЕРМЕНТНЫХ
ЭЛЕКТРОДОВ**

•Ферментативный микроанализ

- Ферменты используются для обнаружения и количественного определения различных *веществ*:
- Металлов (Ag, Cu, Hg, Zn и т. д)
- Органических и неорганических соединений
- Мутагенов
- Канцерогенов
- Метаболитов

Детекция количеств, недоступных определению с помощью большинства физико-химических методов.

Методы детекции: электрохимический, спектрофотометрический, флуоресцентный, биолюминесцентный.

Почему используют E в ферментативном микроанализе

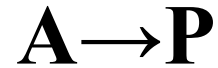
- ***Специфичность по отношению к S*** (определение S в многокомпонентной смеси, без ее предварительного разделения на составляющие)
- ***Высокая каталитическая активность***
(катализируют реакции химического превращения субстрата даже при его низких концентрациях, можно определять микроколичества вещества).
- ***Ферментативный микроанализ простой и быстрый*** (не надо разделять смеси или концентрировать анализируемый образец, высокая скорость биокатализа)
- ***Многообразие веществ, которые определяются***
(либо субстраты, либо его эффекторы)

• Ферментативный микроанализ

• *Пример:*

- Щелочной фосфатазы используется для детекции нг количеств бериллия.
- Алкогольдегидрогеназа - ионы серебра (10 пг/мл).
- Пероксидаза и уреаза - ртуть.
- Холинэстераза или карбоксилэстераза - фосфорсодержащие пестициды определяют п
- Бактериальная люцифераза - инсектициды (ДДТ, пентахлорфенол).

Кинетическая основа ферментативного микроанализа



Начальная скорость этой реакции ϑ_0 пропорциональна концентрации исходного вещества $[A]$.

$$\vartheta_0 = k[A],$$

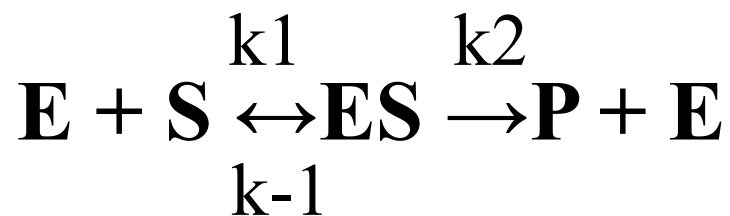
где k —константа скорости реакции.

- Чем выше концентрация вещества $[A]$, тем больше ϑ_0
- Концентрацию вещества A определяют с помощью предварительно построенного калибровочного графика, отражающего зависимость ϑ_0 от $[A]$).

Кинетическая основа ферментативного микроанализа

- Ферментативную реакцию останавливают через определенное время. Зная концентрацию A и измерив концентрацию образовавшегося P , можно построить калибровочный график, описывающий зависимость $[P]$ от $[A]$.
- *Пределы обнаружения* анализируемых соединений определяются не только каталитической активностью фермента, но и другими кинетическими параметрами индикаторной реакции.

• Кинетическая основа ферментативного микроанализа при определении концентрации S



• где E – фермент, S – субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, P – продукт.

• При $[E] \ll [S]_0$ начальная стационарная скорость такого рода реакции описывается уравнением Михаэлиса–Ментен

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m}$$

• Кинетическая основа ферментативного микроанализа при определении концентрации S

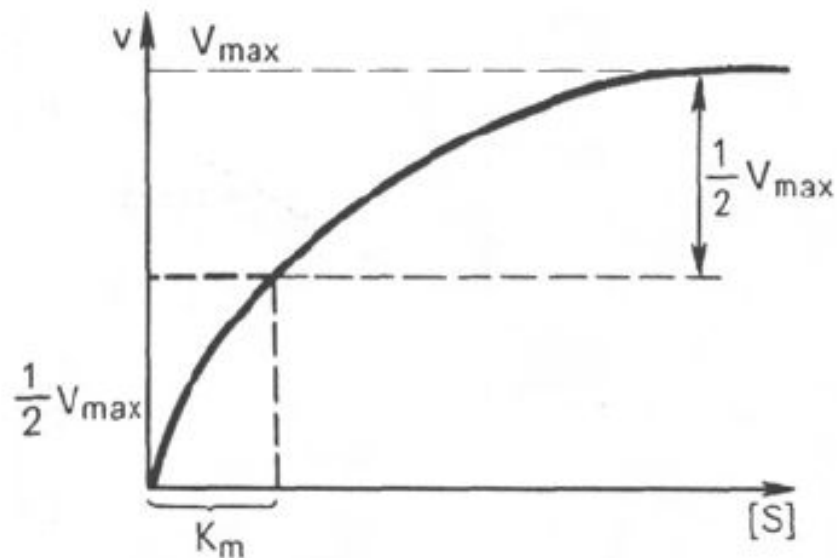
$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m}$$

• Согласно уравнению Михаэлиса–Ментен, концентрация субстрата $[S]_0$ будет пропорциональна v_0 только при условии, когда $[S]_0 \ll K_m$.

Верхняя граница определения $[S]$ ограничена величиной K_m .

Нижняя граница зависит от чувствительности метода регистрации.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата



Уравнение Михаэлиса-Ментен

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость данной ферментативной реакции составляет половину от максимальной.

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{или} \quad K_m + [S] = 2[S], \quad \text{откуда} \quad K_m = [S].$$

Уравнение Лайнуивера-Бэрка



$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

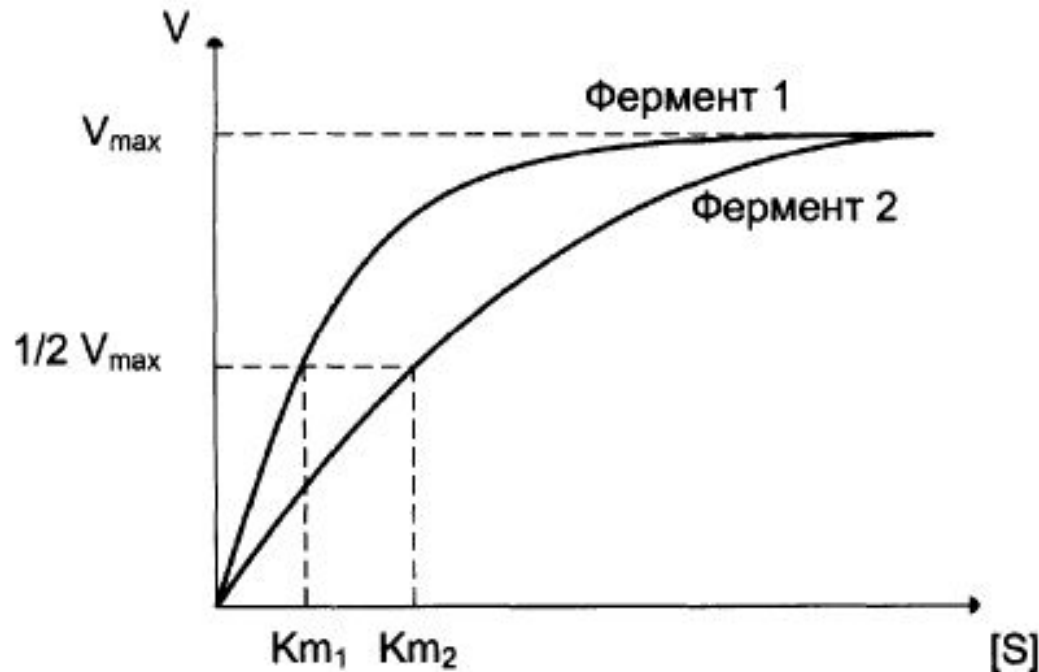
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = ax + b.$$

Константа Михаэлиса

- Константа Михаэлиса хар-т сродство фермента к субстрату и не зависит от концентрации фермента.
- У какого фермента сродство к субстрату выше?
=)



Кинетическая основа ферментативного микроанализа

при определении эффекторов.

Типы ингибирования

```
graph TD; A[Типы ингибирования] --> B[Необратимое ингибирование]; A --> C[Обратимое ингибирование]; C --> D[Неконкурентное]; C --> E[Конкурентное];
```

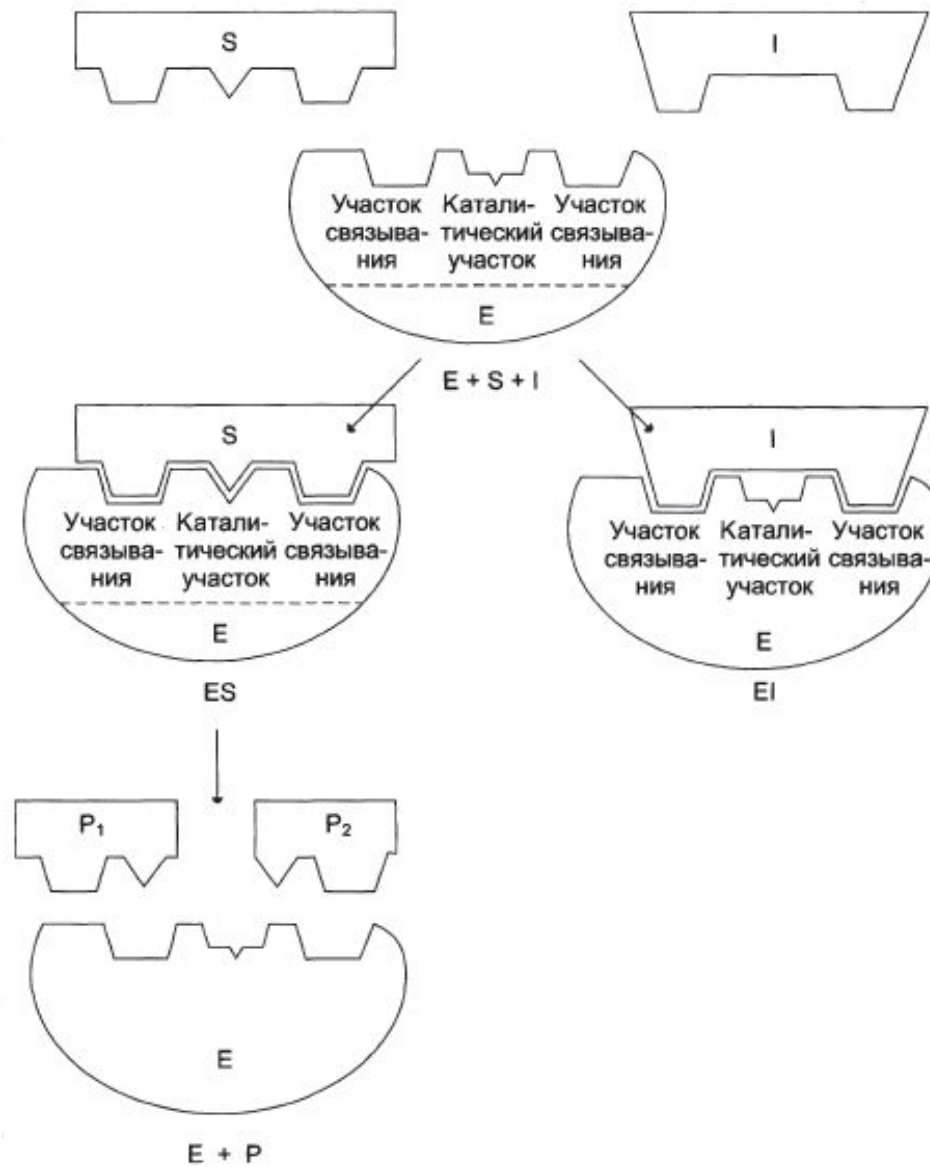
Необратимое ингибирование – тип ингибирования, при котором ингибитор вызывает стойкие изменения пространственной третичной структуры молекулы фермента или модификацию функциональных групп фермента

Обратимое ингибирование

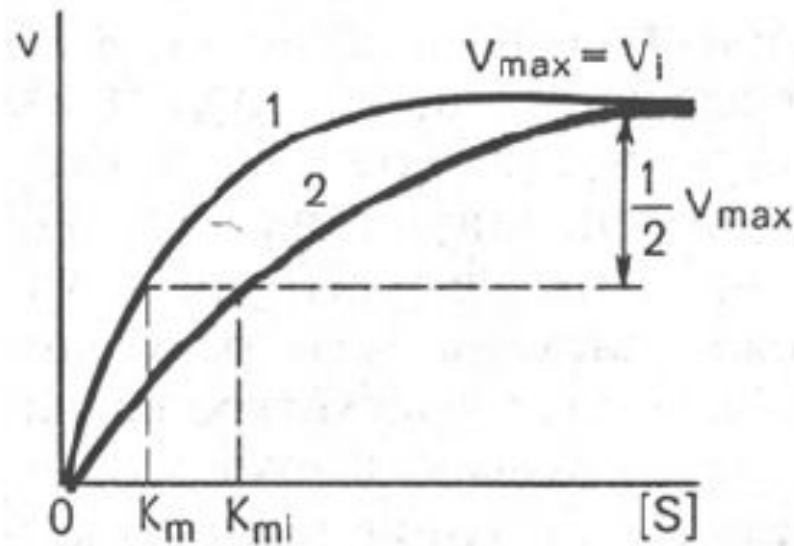
Неконкурентное

Конкурентное

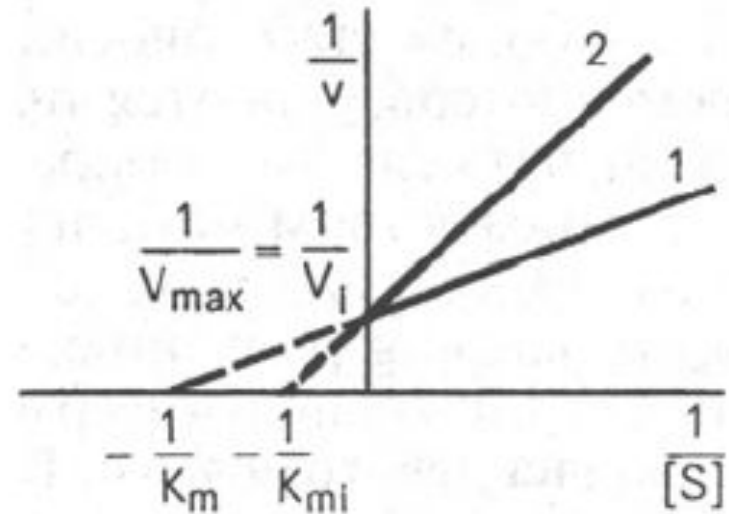
Конкурентное ингибирование



Конкурентное ингибирование



а



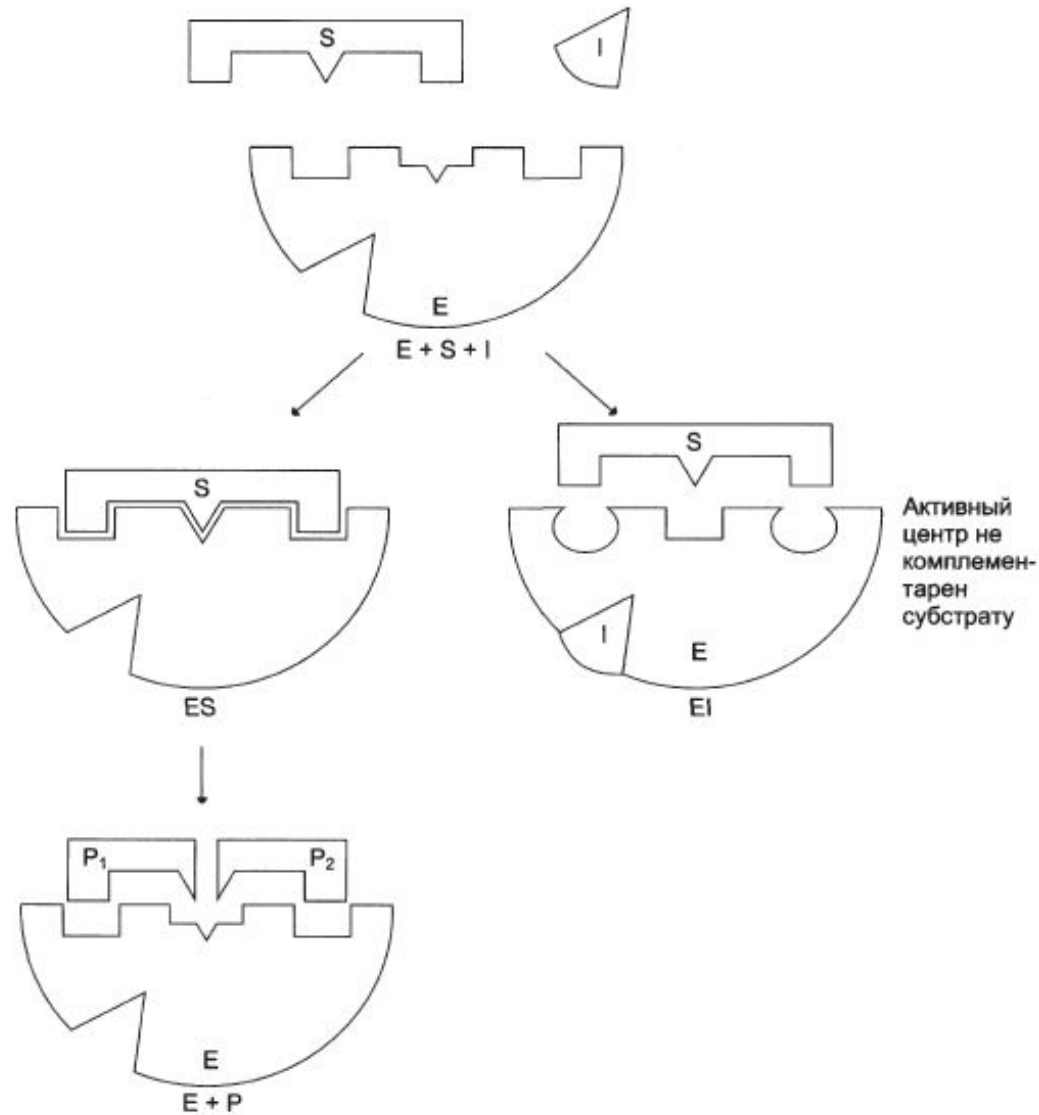
б

. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора.

а - в координатах v от $[S]$; б - в координатах $1/v$ от $1/[S]$; V_{\max} и V_i - максимальные скорости реакции; K_m и K_{mi} - константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора.

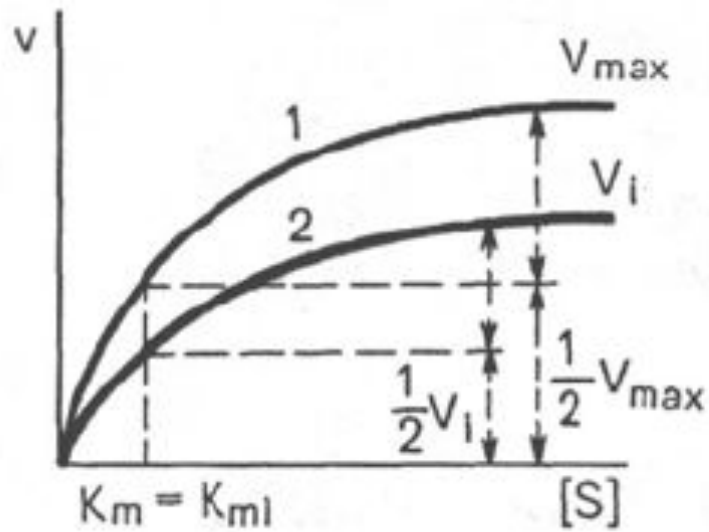
Обратимое ингибирование

Неконкурентное ингибирование



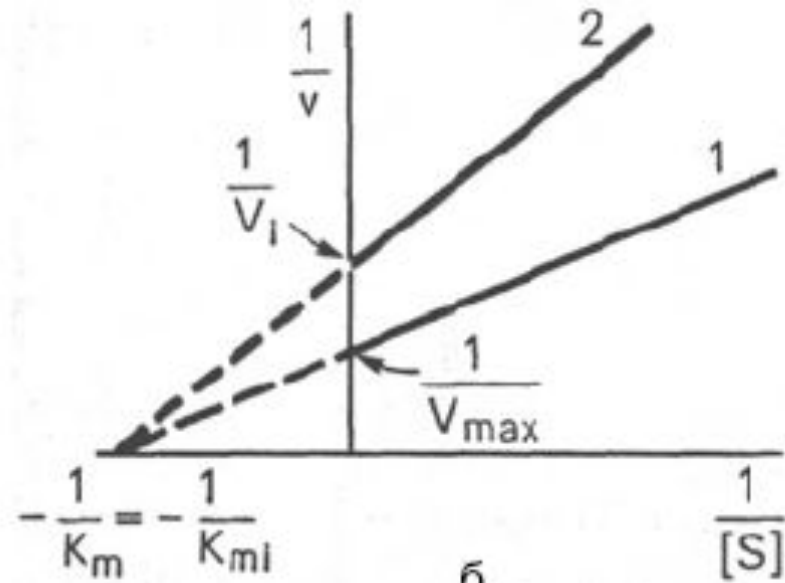
Обратимое ингибирование

Неконкурентное ингибирование



а

а

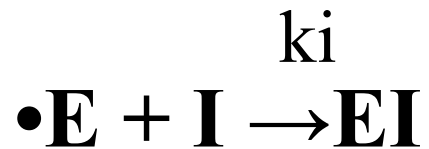


б

б

Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора.

- **Кинетическая основа ферментативного микроанализа при определении эффекторов.**
- Верхняя граница детектируемых концентраций обратимых ингибиторов определяется величиной k_i .
- Взаимодействие с ферментом обратимых неконкурентных ингибиторов можно описать в виде следующей схемы:

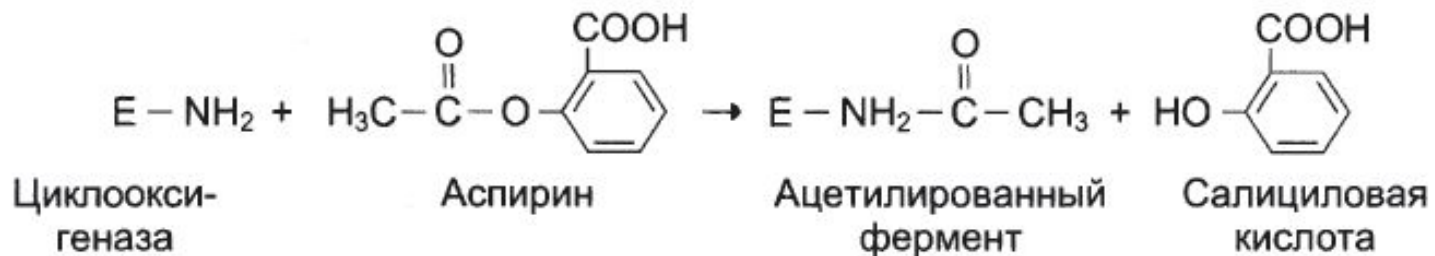


• где I – ингибитор, $k_i = [\text{EI}]/([\text{E}][\text{I}])$.

Необратимое ингибирование

Наблюдается в случае образования ковалентных стабильных связей между молекулой ингибитора и фермента. Чаще всего модификации подвергается активный центр.

- **Пример:**
- Ионы тяжелых металлов (ртути, серебра, мышьяка), которые в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра.
- Аспирин (противовоспалительный нестероидный препарат) – ингибирует фермент циклооксигеназу, катализирующий реакцию образования простагландинов.



Для необратимых ингибиторов:



Уменьшение активности фермента $\Delta[E]$ будет пропорционально концентрации ингибитора:

$\Delta[E] = n[I]$, где n – число молекул ингибитора, взаимодействующих с одной молекулой фермента.

Использование в микроанализе сопряженных ферментативных систем:

Использование сопряженных ферментативных систем увеличивает чувствительность микроанализа.

В живой клетке многие ферментативные процессы тесно взаимосвязаны между собой, т. е. Р одной реакции является S другой.

Использование в микроанализе сопряженных ферментативных систем:

Надо измерить содержание сахарозы в опытном образце.

1. сахароза \rightarrow глюкоза + фруктоза (Е-сахараза)

**2. глюкоза + $O_2 + H_2O \rightarrow$ глюконовая кислота + H_2O_2
(Е- глюкозооксидаза)**

Для определения содержания пероксида можно использовать полярографический метод

Или

**3. $H_2O_2 + o$ -дианизидин \rightarrow окрашенный продукт
(Е-пероксидаза)**

Чувствительность анализа повышается в 100–1000 раз