

УДК 577.15

БИОХИМИЯ

Б. И. КУРГАНОВ, А. И. ДОРОЖКО, Э. М. СИНЕЛЬНИКОВА, З. С. КАГАН  
**ОЦЕНКА ОШИБКИ ПЕРЕМЕННОГО КОЭФФИЦИЕНТА ХИЛЛА,  
ИСПОЛЬЗОВАННОГО ДЛЯ АНАЛИЗА НЕОБЫЧНОГО  
КИНЕТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ «БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ»  
L-ТРЕОНИНДЕГИДРАТАЗЫ**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 5 VII 1971)

В работах (<sup>1-3</sup>) для характеристики зависимости начальной скорости ферментативной реакции, катализируемой регуляторным ферментом, от концентрации субстрата был использован переменный коэффициент Хилла ( $n$ ), рассчитываемый «разностным методом» (<sup>4</sup>):

$$n = \frac{\lg [(1/v' - 1/v)/(1/v - 1/v'')]}{\lg \kappa}; \quad (1)$$

$v$ ,  $v'$  и  $v''$  — значения скорости ферментативной реакции при концентрациях субстрата, равных  $[S]_0$ ,  $[S]_0/\kappa$  и  $\kappa[S]_0$  соответственно ( $\kappa$  — постоянный множитель;  $\kappa > 1$ ). В случае выполнимости уравнения Хилла

$$v = V \frac{([S]/[S]_{0,5})^n}{1 + ([S]/[S]_{0,5})^n} \quad (2)$$

( $V = \lim_{[S]_0 \rightarrow \infty} v$  и  $[S]_{0,5}$  — концентрация субстрата, при которой  $v = V/2$ )

«разностный метод» приводит к тем же значениям  $n$ , что и обычный метод представления кинетических данных в координатах  $\{\lg [v/(V-v)]; \lg [S]_0\}$ . Если же уравнение Хилла не выполняется, то зависимость переменного показателя степени при концентрации субстрата  $n$ , рассчитываемого по формуле (1), от величины  $v/V$ , характеризующей степень насыщения фермента субстратом, может быть использована для характеристики формы кривых зависимости  $v$  от  $[S]_0$  и для сопоставления экспериментальных результатов с предсказаниями теоретических моделей регуляторных ферментов. В работах (<sup>5, 6</sup>) переменный коэффициент Хилла для аллостерического эффектора был использован для проверки выполнимости модели Моно, Уаймена и Шанижэ (<sup>7</sup>).

Будем считать, что ошибка в оценке  $n$  при помощи формулы (1) связана только с ошибкой в измерении  $v$ , поскольку обычно  $[S]_0$  определяется с гораздо большей точностью, чем  $v$ . Таким образом,  $n$  является функцией трех независимо измеряемых величин ( $v$ ,  $v'$  и  $v''$ ). Абсолютная ошибка измерения величины  $n$  ( $\Delta n$ ) связана с абсолютными ошибками измерений величин  $v$ ,  $v'$  и  $v''$  ( $\Delta v$ ,  $\Delta v'$  и  $\Delta v''$  соответственно) следующим образом (считается, что ошибка мала по сравнению с измеряемой величиной):

$$\Delta n = \sqrt{\left(\frac{\partial n}{\partial v} \Delta v\right)^2 + \left(\frac{\partial n}{\partial v'} \Delta v'\right)^2 + \left(\frac{\partial n}{\partial v''} \Delta v''\right)^2}. \quad (3)$$

Допустим, что  $\Delta v = \Delta v' = \Delta v''$ . В таком случае

$$\Delta n = \frac{\Delta v}{2,3 \lg \kappa} \sqrt{\left[\frac{a^2(b-c)}{(b-a)(a-c)}\right]^2 + \left[\frac{b^2}{b-a}\right]^2 + \left[\frac{c^2}{a-c}\right]^2}, \quad (4)$$

$$a = 1/v, b = 1/v', c = 1/v''.$$

Для удобства анализа этого выражения перейдем к безразмерной скорости ферментативной реакции  $r$  ( $r = v/V$ ):

$$\Delta n = \frac{\Delta r}{2,3 \lg \kappa} \sqrt{\left[ \frac{\alpha^2 (\beta - \gamma)}{(\beta - \gamma)(\alpha - \gamma)} \right]^2 + \left[ \frac{\beta^2}{\beta - \alpha} \right]^2 + \left[ \frac{\gamma^2}{\alpha - \gamma} \right]^2} = R \Delta r, \quad (5)$$

$$\alpha = 1/r, \beta = 1/r', \gamma = 1/r''; r' = v'/V, r'' = v''/V$$

и  $\Delta r = \Delta v/V$ ,  $R$  — множитель перед  $\Delta r$ . В случае выполнимости уравнения (2) относительная ошибка оценки  $n$  зависит от  $r$ ,  $\kappa$  и  $n$  так:

$$\frac{\Delta n}{n} = \frac{R}{n} \Delta r = \frac{\sqrt{(\kappa^n)^2 (\kappa^n + 1)^2 + (\kappa^n)^2 [\kappa^n - r(\kappa^n - 1)]^4 + [1 + r(\kappa^n - 1)]^4}}{2,3r(1 - r)\kappa^n(\kappa^n - 1) \lg(\kappa^n)} \Delta r. \quad (6)$$

Параметры  $n$  и  $\kappa$  входят в выражение для  $\Delta n/n$  в виде величины  $\kappa^n$ . Следовательно, относительные ошибки в определении  $n$  для кривых, подчиняющихся уравнению (2), с  $n = 0,5$ ; 1; 2 и 4 будут одинаковы в том случае, если логарифмы множителей  $\kappa$  для этих кривых выбраны с таким расчетом, что они соотносятся между собой как 2:1:0,5:0,25 (например, 0,6; 0,3; 0,15 и 0,075).

Зависимости величины  $R/n$  от  $r$  при  $\kappa^n = \sqrt{2}$ ; 2 и 4 представлены на рис. 1. Ошибка в определении  $n$  резко увеличивается при приближении  $r$  к нулю и к единице.

Увеличение множителя  $\kappa$  приводит к уменьшению ошибки в определении  $n$ , однако при этом, очевидно, уменьшается интервал значений  $r$ , для которых может быть рассчитан  $n$ . Выбор множителя  $\kappa$  определяется ошибкой в определении  $v$  и формой кривой зависимости  $v$  от  $[S]_0$ : чем выше точность измерения  $v$  и чем отчетливее выражено положительное взаимодействие активных центров (т. е. чем выше значение  $n$ ), тем меньший множитель  $\kappa$  может быть использован для расчета  $n$ . Строго говоря, для кривых зависимости  $v$  от  $[S]_0$  с высокой степенью S образности необходимо учитывать ошибку не только в измерении  $v$ , но и в измерении  $[S]_0$ .

Следует отметить, что в качестве  $v$ ,  $v'$  и  $v''$  в формуле (1) могут быть использованы интерполированные значения для плавной кривой, проведенной через экспериментальные точки. Такая операция при достаточно большом количестве экспериментальных точек позволяет уменьшить ошибку в измерении  $v$ ,  $v'$  и  $v''$ .

В (2) указывалось, что при невыполнимости уравнения (2) значения  $n$ , рассчитываемые при помощи формулы (1), зависят от выбранных величин множителя  $\kappa$ . Следует, однако, подчеркнуть, что сопоставление экспериментальных результатов и теоретических кривых может быть проведено при любом значении  $\kappa$ .

Оценка ошибки при расчете  $n$  «разностным методом» была проведена нами на примере анализа кривой зависимости от скорости реакции, катализируемой «биосинтетической» *L*-треопиндегидратазой из клеток бактерии *Escherichia coli*, от концентрации *L*-треонина при pH 10. Источником фермента служил экстракт клеток после отделения структур центрифугированием при 14 000 *g* в центрифуге с охлаждением. Клетки разрушали ультразвуком в виде суспензии в 1 *M* К-фосфатном буфере, pH 8,2, содержащем  $1 \cdot 10^{-3}$  *M* восстановленный глутатион.

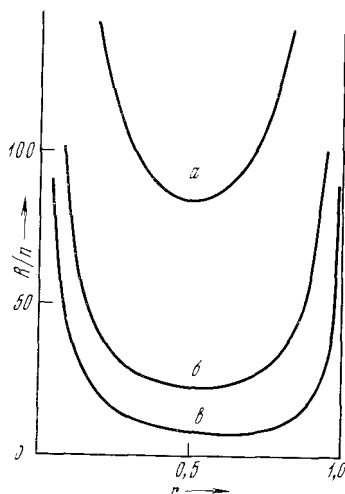


Рис. 1. Зависимость величины  $R/n$ , определяющей относительную ошибку в оценке коэффициента Хилла, от  $r = v/V$  при  $\kappa^n = \sqrt{2}$  (а); 2 (б) и 4 (в)

Для определения ферментативной активности 0,2 мл экстракта инкубировали в течение 10 мин. при 26° в 0,25 *M* фосфатно-карбонатном буфере, pH 10, в конечном объеме 3 мл, содержащем пиридоксаль-5'-фосфат (фирмы «Fluka», Швейцария) в концентрации 10 мкг/мл, и *L*-треонин (фирмы «Reanal», Венгрия) в заданной концентрации. Реакцию останавливали добавлением 0,075 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с последующим выдерживанием в течение 5 мин. на кипящей водяной бане. Выпавший осадок белка отделяли центрифугированием. 2,5 мл надосадочной жидкости нейтрализовали 10 *N* КОН с таким расчетом, чтобы после доведения объема 0,5 *M*

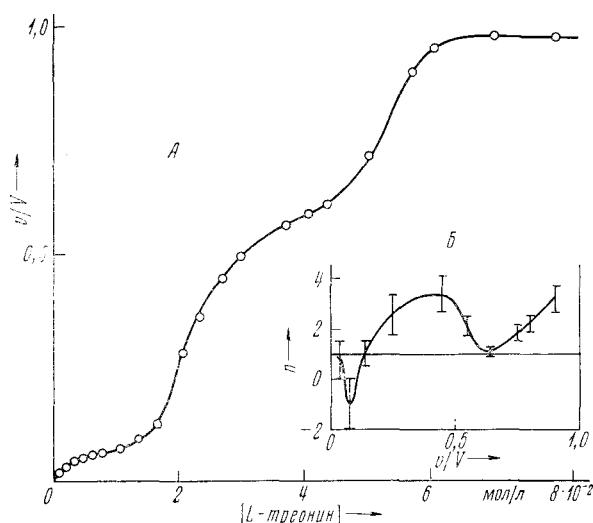


Рис. 2. Зависимость безразмерной скорости ( $v/V$ ) реакции, катализируемой «биосинтетической» *L*-треониндегидратазой из *Escherichia coli*, от концентрации *L*-треонина при pH 10 (А) и зависимость коэффициента Хилла ( $n$ ) от  $v/V$ , рассчитанная при помощи формулы (1) для  $\kappa = 2$  (Б). Вертикальными отрезками на рис. 2Б указана ошибка в оценке  $n$ , рассчитанная при помощи выражения (5)

фосфатным буфером, pH 6,5, до 5 мл реакционная смесь имела pH 6,5—6,7. Содержание в реакционной смеси  $\alpha$ -кетомасляной кислоты, образующейся в результате *L*-треониндегидратазной реакции, определяли ферментативным методом, используя лактатдегидрогеназу из мышц свиньи (фирмы «Reanal», Венгрия) в качестве вспомогательного фермента. Для этого к 5 мл нейтрализованной реакционной смеси добавляли 0,1 мл раствора НАД-Н<sub>2</sub> (фирмы «Reanal», Венгрия), имеющего концентрацию 16,5 мг/мл. В контрольную кювету спектрофотометра вносили 2,2 мл этой реакционной смеси, а в опытной кювете к 2,2 мл смеси добавляли 0,05 мл суспензии препарата лактатдегидрогеназы. Убыль НАД-Н<sub>2</sub> определяли по уменьшению оптической плотности при 340 мμ на спектрофотометре СФ-4А. Отсчет оптической плотности проводили, когда она достигала постоянного значения. При расчете удельной активности *L*-треониндегидратазы учитывали все указанные выше разведения, а также содержание в определяемой смеси возможных субстратов лактатдегидрогеназы, присутствующих в экстракте клеток бактерий, для чего проводили контрольный опыт без *L*-треонина; результаты этого определения вычитали из результатов определения в опытной кювете. Скорость *L*-треониндегидратазной реакции ( $v$ ) выражали в данном случае в единицах оптической плотности за 10 мин. Среднеарифметическая ошибка  $\Delta v$  в определении  $v$  была рассчитана на основании 9 опытов при каждой из трех использованных концентраций *L*-треонина ( $2,5 \cdot 10^{-3}$ ;  $4,3 \cdot 10^{-3}$  и  $6,0 \cdot 10^{-2}$  мол/л) и оказалась равной 0,005.

На рис. 2А представлена кривая зависимости безразмерной скорости реакции  $v/V$  от концентрации  $L$ -треонина. Кривая имеет сложный вид и характеризуется четырьмя точками перегиба. Зависимость переменного коэффициента Хилла ( $n$ ) от  $v/V$  была рассчитана нами при помощи формулы (1) для  $\kappa = 2$  (рис. 2Б). Оценка в ошибке  $n$  была рассчитана на основании выражения (5) при  $\Delta r = 0,01$ . Как и следовало ожидать (рис. 1), ошибка в расчете  $n$  растет при приближении  $v/V$  к нулю или к единице. Тем не менее оценка ошибки позволяет сделать вывод, что сильное снижение величины  $n$  при начальном значении  $v/V$  («отрицательная кооперативность») и рост  $n$  при значениях  $v/V$ , больших 0,7, являются достоверными. Ошибка в оценке  $n$  при значениях  $v/V$ , равных 0,25; 0,50 и 0,75, составляет 33; 21 и 14% соответственно.

В заключение отметим, что ошибки в расчете переменного коэффициента Хилла «разностным методом» могут быть уменьшены в тех случаях, когда за кинетикой ферментативной реакции удается следить непрерывно, используя высокочувствительные регистрирующие приборы.

Всесоюзный научно-исследовательский  
витаминовый институт  
Москва

Поступило  
29 VI 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> З. С. Каган, Д. А. Хашимов, Б. И. Курганов, Биохимия, 35, 937 (1970).
- <sup>2</sup> Б. И. Курганов, В сборн. Аллостерическая регуляция действия ферментов. Итоги науки, 1969, сер. биол. хим., М., 1971, стр. 57.
- <sup>3</sup> В. I. Kurganov, Z. S. Kagan, Enzymologia, in press.
- <sup>4</sup> Г. В. Силонова, Н. Б. Ливанова, Б. И. Курганов, Молекулярная биология, 3, 768 (1969).
- <sup>5</sup> Б. И. Курганов, В. А. Яковлев, VII Международн. симпозиум по химии природных соединений. Тез. докл. А79, Рига, 1970.
- <sup>6</sup> Б. И. Курганов, В. А. Яковлев, Молекулярная биология, 6, 113 (1972).
- <sup>7</sup> J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, J. Molec. Biol., 12, 88 (1965).