БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по учебной работе

Белорусского государственного

университета

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ А.Л. Толстик

\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_­­­­­­­­\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2013 г.

Регистрационный № УД 3647/уч.

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА**

**Учебная программа для специальности:**

1-31 01 02 Биохимия,

специализаций: 1-31 01 02-01 Аналитическая биохимия и

1-31 01 02-02 Биохимия лекарственных средств

2013 г.

**СоставителЬ:**

Семак Игорь Викторович, заведующий кафедрой биохимии Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент.

**Рецензенты:**

Алексей Викторович Янцевич, зав. лабораторией белковой инженерии государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», кандидат химических наук;

Наталия Павловна Максимова, заведующая кафедрой генетики Белорусского государственного университета, доктор биологических наук, профессор.

**РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ В КАЧЕСТВЕ УЧЕБНОЙ:**

Кафедрой биохимии Белорусского государственного университета

(протокол № 3 от 11.03. 2013 г.);

Учебно-методической комиссией биологического факультета Белорусского государственного университета

(протокол № от 2013 г.);

Научно-методическим советом Белорусского государственного университета (протокол № от 2013 г.)

Ответственный за редакцию: Игорь Викторович Семак.

Ответственный за выпуск: Игорь Викторович Семак.

**ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА**

Ферментативная кинетика является одним из наиболее активно развивающихся направлений биохимии как в нашей стране, так и за рубежом. Полученные знания могут быть использованы для успешного решения целого ряда биохимических, биотехнологических и фармакологических задач прикладного и фундаментального характера.

Теоретические положения лекционного курса развиваются и закрепляются на лабораторных занятиях, при выполнении которых студенты приобретают навыки подбора оптимальных условий протекания ферментативных реакций, а также учатся анализировать результаты кинетического эксперимента.

**Цель** настоящего курса – дать представление о возможностях ферментативной кинетики как метода исследования механизма каталитического действия ферментов, разобрать принципы и подходы к изучению кинетики реакций различных типов, кинетики инигибирования и активации ферментов, научить трактовать результаты кинетического анализа.

**Задачи курса:**

* освоение студентами основных принципов ферментативной кинетики;
* закрепление теоретических положений лекционного курса на лабораторных занятиях.

В результате изучения дисциплины обучаемый должен:

***знать****:*

- основные закономерности и принципы ферментативной кинетики;

- механизмы каталитического действия ферментов;

- особенности ингибирования, активирования и аллостерической регуляции ферментов;

- современные информационные технологии, используемые для анализа ферментативной кинетики;

- методические приемы постановки кинетического эксперимента;

- новейшие достижения и перспективы развития ферментативной кинетики.

***уметь:***

- разрабатывать и ставить кинетический эксперимент;

- трактовать результаты кинетического анализа;

- использовать методы кинетического анализа в биохимии;

- пользоваться специализированными компьютерными базами данных и ресурсами Интернета.

При чтении лекционного курса необходимо применять наглядные материалы в виде слайдов, презентаций, таблиц.

Эффективность самостоятельной работы студентов целесообразно проверять в ходе текущего и итогового контроля знаний в форме устного опроса и тестовых заданий по темам курса. Для общей оценки качества усвоения студентами учебного материала рекомендуется использование рейтинговой системы. Учебный курс рассчитан на 84 часа, из них аудиторных 42: лекционных – 26, лабораторных – 16, КСР – 2.

**ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №разделови тем | Наименование разделов и тем | Аудиторные часы | Самост. работа |
| Лекции | Лабора-торные занятия | КСР |
| 1 | Введение | 1 | - | (По всем темам дисциплины) |  |
| 2 | Скорость ферментативной реакции и способы ее количественного выражения | 4 | 6 |  | 8 |
| 3 | Стационарные процессы | 4 |  |  | 4 |
| 4 | Классификация ферментативных реакций по количеству субстратов (S), по стадийности, по направленности | 4 |  |  | 6 |
| 5 | Влияние температуры на скорость ферментативной реакции | 1 | 4 |  | 2 |
| 6 | Термодинамическая вероятность ферментативной реакции | 2 |  |  | 4 |
| 7 | Влияние рН на скорость ферментативной реакции | 1 | 2 |  | 2 |
| 8 | Ингибирование ферментативных реакций | 4 | 4 |  | 8 |
| 9 | Аллостерическая регуляция активности ферментов | 2 |  |  | 4 |
| 10 | Применение компьютерных технологий в ферментативной кинетике | 1 |  |  | 4 |
|  | ИТОГО: | **24** | **16** | **2** | **42** |

**СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА**

**1. Введение**

Кинетика ферментов – как один из методов изучения механизма их действия. Основные закономерности и принципы химической кинетики, применяемые в ферментативной кинетике: закон действия масс, порядок и молекулярность реакций, размерности констант скоростей и способы их определения для реакций «0», 1 и 2 порядков.

**2. Скорость ферментативной реакции и способы ее количественного выражения**

Понятие начальной скорости ферментативной реакции (V0). Основные правила подбора экспериментальных условий, обеспечивающих определение V0. Способы выражения скорости ферментативной реакции и активности ферментов. Единицы активности.

Построение и анализ зависимости накопления продукта реакции (Р) от времени (t).

**3. Стационарные процессы**

Условия стационарности реакции. Стационарная скорость реакции и условия отклонения стационарности.

Зависимость V0 от [S] (кривая насыщения фермента субстратом). Уравнение Михаэлис-Ментен и Бригс-Холдейна. Понятие о максимальной скорости ферментативной реакции (Vmax). Константа Михаэлиса (Кm), ее физический смысл, размерность, значимость для характеристики ферментативной реакции.

**4. Классификация ферментативных реакций по количеству субстратов (S), по стадийности, по направленности**

Односубстратные односторонние реакции. Простейшая схема реакции. Анализ зависимости скорости от концентрации фермента (V от [Е]). Определение порядка реакции и его изменение в ходе ферментативного процесса.

Односубстратные двусторонние реакции. Условия определения V и Кm.

Двусубстратные реакции. Классификация реакций в зависимости от механизма присоединения субстратов: неупорядоченное, упорядоченное связывание, механизм «пинг-понга». Кажущиеся V и Km. Получение V и Km для двусубстратных реакций. Частный случай кинетики двусубстратных реакций (гексокиназная реакция).

Односубстратные односторонние многостадийные реакции. Уравнение скорости реакции. Определение количества стадий реакции.

**5. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции**

Понятие об энергии активации (Еа). Изменение энергии активации в ходе ферментативной реакции при различных соотношениях К+1, К-1, К+2. Уравнение Аррениуса и его использование для определения энергии активации и числа стадий ферментативной реакции. Уравнение Вант-Гоффа и его использование для определения изменения энтальпии и энтропии для стадии образования фермент-субстратного комплекса.

**6. Термодинамическая вероятность ферментативной реакции**

Изменение свободной энергии (ΔG) для реакций разных типов. Условия протекания термодинамически невыгодных ферментативных реакций.

**7. Влияние рН на скорость ферментативной реакции**

Понятие об рН-оптимуме. Практические подходы к изучению рН-зависимости скорости ферментативной реакции (определение V, Km или Кs).

**8. Ингибирование ферментативных реакций**

Понятие «ингибитор», классификация ингибиторов. Обратимое и необратимое ингибирование. Критерии необратимости ингибирования. Ингибиторные константы (Кi). Кинетика необратимого ингибирования. Кинетика обратимого ингибирования.

Конкурентное ингибирование. Уравнение скорости реакции, графический анализ. Недопустимость использования величины I50 для оценки эффективности действия конкурентного ингибитора. Кинетическая неразличимость конкурентного ингибирования с полным и частичным эффектами торможения.

Неконкурентное ингибирование. Схема реакций, графическое представление результатов. Определение Кi и Vi. Полный и частичный эффекты. Причины изменения К+2 в условиях действия неконкурентного ингибитора.

Смешанный тип торможения. Схема реакции и графический анализ. Бесконкурентный тип торможения. Схема реакции, уравнение скорости реакции и графический анализ экспериментальных данных.

Субстратное торможение как частный случай ингибирования. Возможные механизмы. Уравнение скорости, графическое представление данных, анализ хода кривой. Условия определения V и Km.

**9. Аллостерическая регуляция активности ферментов**

Прямая и косвенная регуляция. S-образная зависимость V от [S]. Определение числа взаимодействующих центров (уравнение Хилла).

**10. Применение компьютерных технологий в ферментативной кинетике**

Использование ресурсов *Internet*. Компьютерные базы данных. *EMP, BRENDA, WIT, SWISS-PROT*. Обработка результатов кинетического анализа с помощью компьютерных программ *GraphPad Prizm и Enzfitter*.

Некоторые замечания и рекомендации по изучению кинетики и активности ферментов.

**Литература**

**Основная:**

1. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики /Т. Келети. М.: Мир, 1990

2. *Бендер М.* Биоорганическая химия ферментативного катализа /М. Бендер, Р. Бергерон, М. Комияма. М.: Мир, 1987.

3. *Варфоломеев С.Д.* Биокинетика. Практ. курс: Учеб. пособие для хим. биолог. и мед. спец. Вузов / Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. М.: Фаир-Пресс, 1999.

4. *Семиохин И.А.* Кинетика химических реакций /И.А. Семиохин, Б.В. Страхов, А.И. Осипов. Изд. МГУ, 1995.

5. *Березин И.В.* Основы физической химии ферментативного катализа /И.В. Березин, К. Мартинек М:Высшая школа, 1977.

6. *Уолтер Ч.* Кинетика ферментативных реакций /Ч. М. Уолтер. М: Мир, 1969.

**Дополнительная:**

1*. Selkov E., Galimova M., Goryanin I. et al.* // The metabolic pathway collection: an update. Nucl. Acids Res., 1997. –25, –Р. 37-38.

2. *Overbeek R., Larsen N., Pusch G.D. et al.* // Nucl. Acids Res., 2000.

–28. –Р. 123-125.

3. *Schomburg I., Chang A., Schomburg D*.// Nucl. Acids Res. 2002. –30. – Р. 47-49.

4. http://isir.ras.ru/ - Интегрированная Cистема Информационных Ресурсов Российской Академии Наук.

5. http://www.viniti.msk.su/ - Всероссийский Институт Научной и Технической Информации (ВИНИТИ РАН).

6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed - База научных данных в области биомедицинских наук.

7. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb - Биохимическая классификация и номенклатура ферментов. Свободный доступ на сайте Международного союза биохимии и молекулярной биологии.

8. www.molbiol.ru, www.nature.ru - Учебники, научные монографии, обзоры, лабораторные практикумы в свободном доступе на сайтах практической молекулярной биологии.

9. http://igweb.integratedgenomics.com/EMP/.

10. http://wit.mcs.anl.gov/WIT2/.

11.http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/biochemie/ds/dsbren\_e.htm.

12. http://us.expasy.org/sprot/sprot-top.html.