

УДК 577

КАК ПОВЫСИТЬ ТОЧНОСТЬ ОЦЕНКИ НАЧАЛЬНОЙ СКОРОСТИ  
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИН. М. Малыгина<sup>1,2</sup>, Т. А. Петрова<sup>1</sup>, А. Ю. Лянгузов<sup>1,\*</sup>,  
член-корреспондент РАН А. М. Иванов<sup>2</sup>

Поступило 04.04.2019 г.

Предложен новый алгоритм расчёта начальной скорости ферментативной реакции в начальный момент времени, который позволяет свести к минимуму систематическую ошибку измерений, оценивать скорость реакции независимо от уровня активности разных образцов фермента, а также существенно сократить время анализа. Исследования выполнены на примере альфа-амилазы слюны и стандартного набора реагентов. Метод не следует применять в случае, если в аналитическую процедуру включены сопряженные системы ферментов, поскольку на кинетической кривой имеется длительная начальная лаг-фаза.

*Ключевые слова:* ферментативная кинетика, начальная скорость реакции, альфа-амилаза слюны.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524882225-228>

При стандартных прямых кинетических измерениях активности ферментов скорость реакции определяется как среднее значение за достаточно протяжённый промежуток времени. Однако из теории следует, что скорость, максимальная в начальный момент, неуклонно уменьшается в связи с расходом субстрата, и это происходит тем быстрее, чем выше активность фермента. В результате появляется систематическая ошибка, подчас грубая, которую невозможно ни оценить, ни скорректировать.

В настоящей работе приведён новый алгоритм расчёта начальной скорости ферментативной реакции, который позволил свести к минимуму эту систематическую ошибку, с одинаковой точностью измерять скорость реакции независимо от уровня активности разных образцов фермента, а также существенно сократить время анализа.

Исследования выполнены на примере альфа-амилазы слюны и стандартного набора реагентов (SpinReact, Испания). Метод основан на прямом фотометрическом определении активности амилазы в кинетическом режиме с использованием хромогенного субстрата (CNP3), когда через 30 с от начала реакции фиксируется время, затем в течение 3 мин каждые 60 с делают измерение поглощения инкубационной среды и рассчитывают среднее изменение поглощения раствора за минуту [1, 2].

На рис. 1 представлены кинетические кривые амилазной реакции образцов слюны шести из 20 участников эксперимента с низкими, средними и высокими уровнями активности фермента. В отличие от стандартного протокола изменение поглощения инкубационной среды регистрировали ежесекундно (спектрофотометр PerkinElmer Lambda 35 с перемешиванием и термостатированием).

Техническую сложность представляет начальный участок кинетической кривой, который, собственно, и должен использоваться для расчета максимальной начальной скорости реакции с целью последующего вычисления ферментативной активности [3]. Момент добавления образца фермента к субстратной смеси может резко исказить форму кривой на самых первых секундах от начала реакции (рис. 2).

Эту проблему удалось решить путём аппроксимации начального участка кинетической кривой (в пределах 10–40 с) квадратичным уравнением вида  $y = a + b \cdot x + c \cdot x^2$ , где  $x$  – регистрируемое время. Пересечение аппроксимированной кривой с “нулевым” уровнем реакции определяет истинный момент начала ферментативного процесса (рис. 2). Все расчёты и графики выполнены с использованием скриптов, написанных нами на языке программирования R [4].

Скорость реакции – первая производная аппроксимированной кривой – определяется уравнением  $y' = b + c \cdot x$ . Экстраполяция значения скорости на момент старта реакции (скорректированное значение  $x$ ) представляет собой искомую начальную скорость реакции. На графике – это жирная точка в левом верхнем углу (рис. 3, точка 4).

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

\* E-mail: [andrey.lyanguzov@spbu.ru](mailto:andrey.lyanguzov@spbu.ru), [andy\\_1@lya.spb.ru](mailto:andy_1@lya.spb.ru)

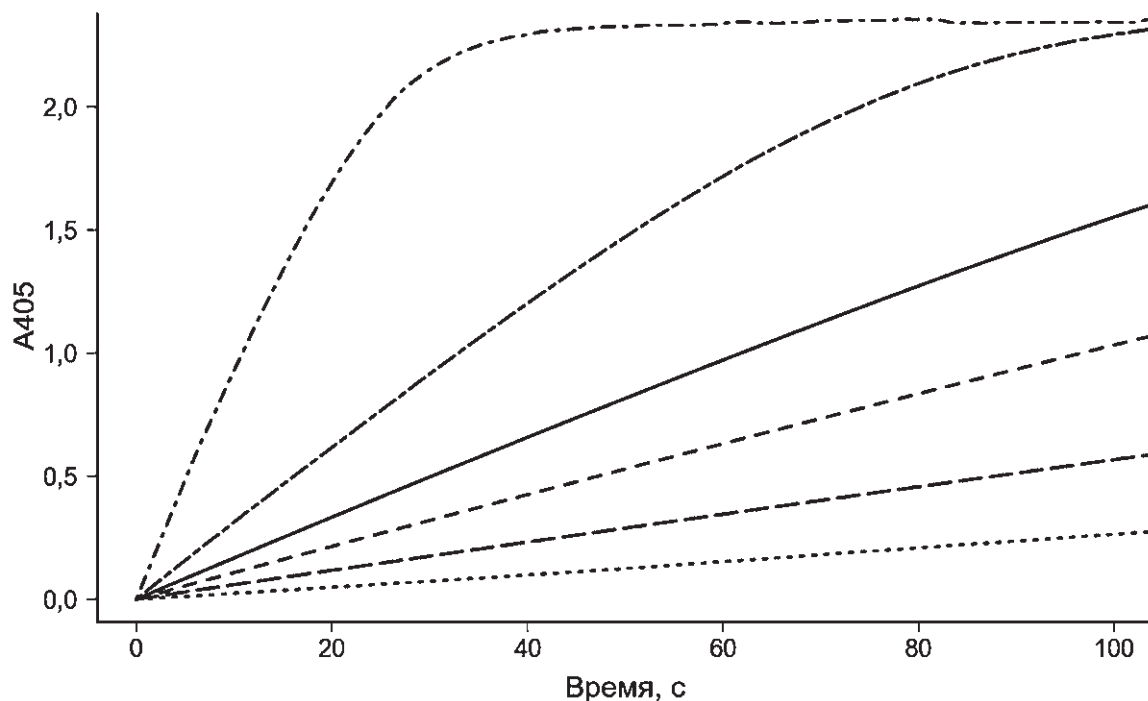


Рис. 1. Кинетические кривые амилазной реакции образцов слюны шести из 20 участников эксперимента с низкими, средними и высокими уровнями активности фермента.

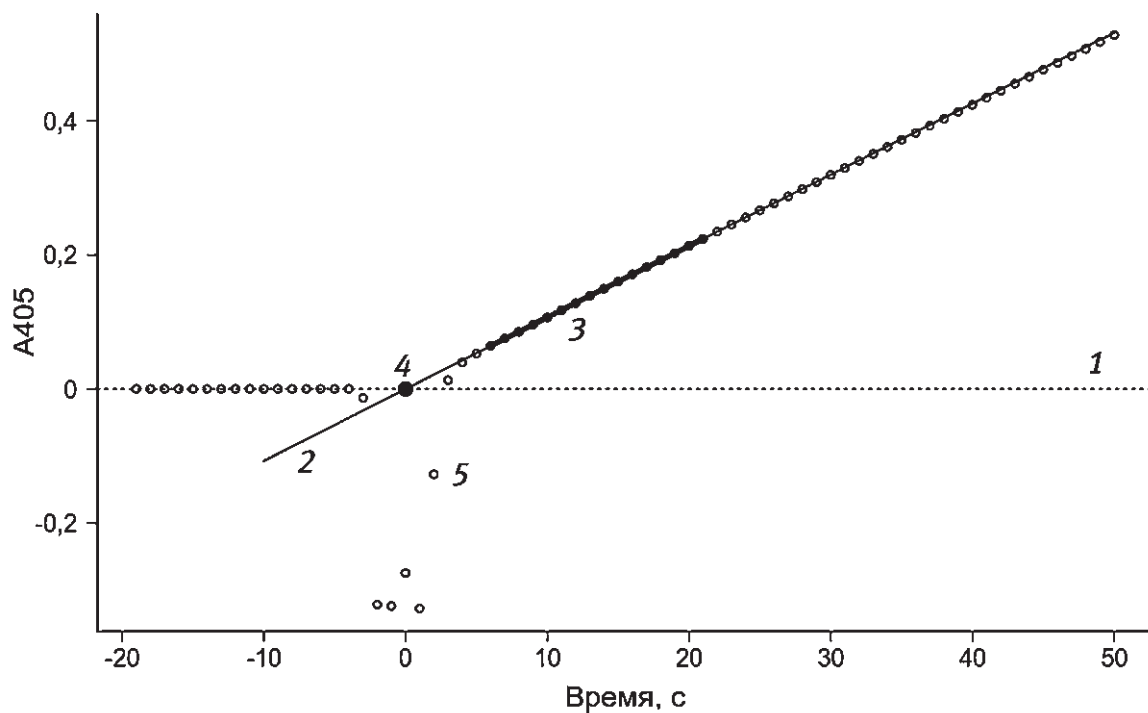
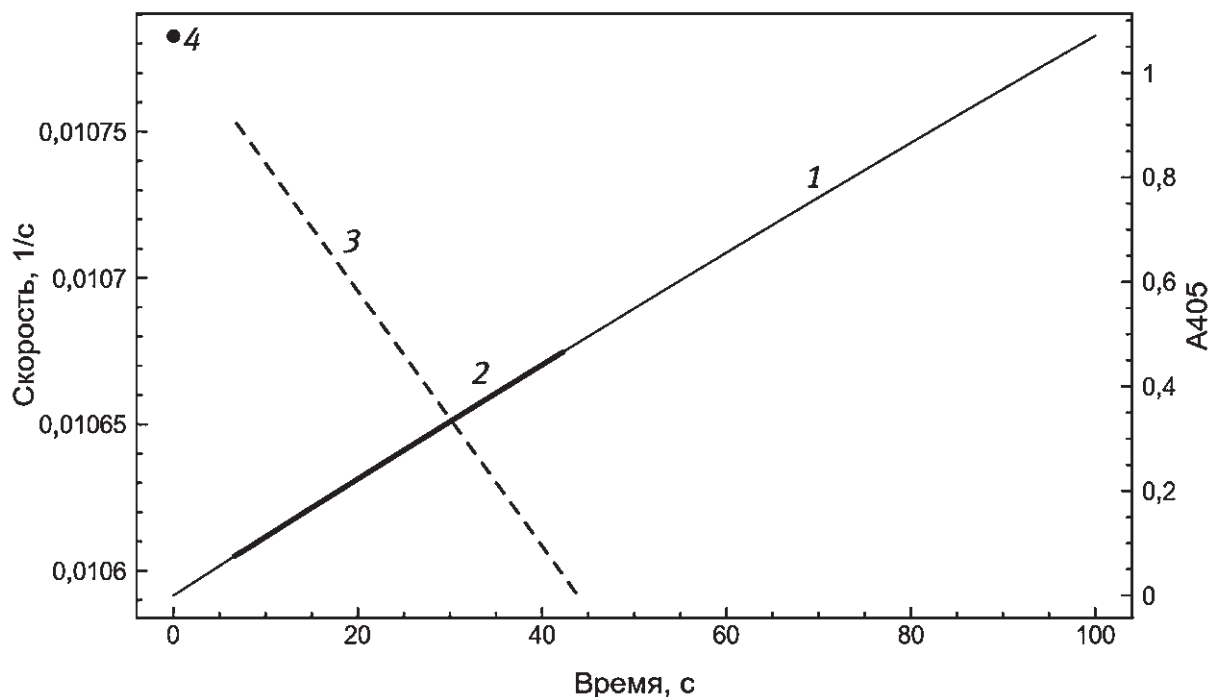


Рис. 2. Расчёт координаты точки начала реакции: аппроксимация квадратичной моделью начального участка кинетической кривой. 1 – “нулевая” реакция; 2 – кинетическая кривая; 3 – участок кинетической кривой, выбранный для расчёта аппроксимации; 4 – расчётное время начала реакции; 5 – ежесекундные измерения поглощения.



**Рис. 3.** Расчёт начальной скорости реакции. 1 — изменение поглощения в ходе реакции; 2 — аппроксимированный квадратичной моделью начальный участок кинетической кривой; 3 — скорость реакции в этом интервале (первая производная скорректированной кинетической кривой); 4 — оценка значения начальной скорости реакции.

Предлагаемая нами аппроксимация квадратичным уравнением начального участка кинетической кривой и его численное дифференцирование сделали возможным оценивание “истинной” точечной начальной скорости вместо усредненной. В случае высокой активности фермента это точечное значение могло на порядок превышать общепринятое усредненное.

Таким образом, внесённые нами изменения в стандартный протокол позволяют расширить диапазон измеряемых скоростей ферментативной реакции, с одинаковой точностью определять начальную скорость независимо от уровня активности фермента, а также минимизировать время выполнения анализа.

Наши рекомендации можно распространить и на исследования других ферментов в области биологии, экспериментальной и клинической медицины, ветеринарии, биотехнологии и в иные сферы, где анализируются или используются ферменты.

Предлагаемый алгоритм нельзя применять в случае, если в аналитическую процедуру включены сопряженные системы ферментов, поскольку на кинетической кривой имеется длительная начальная лаг-фаза [5].

**Благодарности.** Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ “Обсерватория экологической безопасности” в рамках соглашения с Военно-медицинской академией им. С.М. Кирова.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. SpinReact: [http://www.spinreact.com/files/Inserts/Bioquim\\_ica/BEIS27-AMILASA-LQ-02-2016.pdf](http://www.spinreact.com/files/Inserts/Bioquim_ica/BEIS27-AMILASA-LQ-02-2016.pdf)
2. Foo Y. A., Bais R. // Clin. Chim. Acta. 1998. V. 272. P. 137–147.
3. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. L.: Portland Press, 1995. 343 p.
4. R Project: <https://www.r-project.org/>
5. Lyangusov A. Yu., Petrova T.A., Stefanov V.E. // Dokl. Biochem. and Biophys. 2009. V. 424. № 1. P. 49–52.

## AN APPROACH TO BETTER ESTIMATION OF THE INITIAL VELOCITY OF ENZYME REACTIONS

**N. M. Malygina<sup>1,2</sup>, T. A. Petrova<sup>1</sup>, A. Y. Lianguzov<sup>1</sup>,**  
**Corresponding Member of the RAS A. M. Ivanov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Military Medical Academy of S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russian Federation*

Received April 4, 2019

A new algorithm for computation of initial velocity of enzyme reaction at the time zero is proposed. This algorithm makes it possible to reduce systematic error of measurements to the minimum, to estimate reaction velocity in testing samples regardless of the enzyme activity levels and to minimize assay time. The study is illustrated by an example of salivary alpha-amylase and standard reagent kit. The algorithm should not be applied if conjugated enzyme systems are used because there is a long initial lag-phase in the kinetic curve.

*Keywords:* enzyme kinetics, initial reaction velocity, salivary alpha-amylase.