



УДК 577.152.11*117(.042+.3)

БЕСКОНКУРЕНТНАЯ АКТИВАЦИЯ МЕЛАМИНОМ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ *o*-ФЕНИЛЕНДИАМИНА

© 2003 г. Е. И. Карасева, И. В. Наумчик, Д. И. Метелица[#]

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2, Беларусь

Поступила в редакцию 02.10.2001 г. Принята к печати 06.03.2002 г.

Пероксидазное окисление *o*-фенилендиамин (PDA) значительно активируется меламинам в 0.015 М фосфат-цитратном буфере при pH 6.0–7.4 по бесконкурентному типу: k_{cat} и K_m возрастают прямо пропорционально концентрации меламина. Активация пероксидазного окисления PDA количественно охарактеризована коэффициентом (степенью) α (M^{-1}), который также существенно возрастает с увеличением pH от 6.0 до 7.4. Меламин действует в пероксидажном процессе окисления PDA как катализатор нуклеофильной природы, взаимодействуя, по всей видимости, с сайтом пероксидазы с дистальной стороны гема. При pH 4.3 меламин ингибирует пероксидазное окисление PDA по бесконкурентному типу, так как в кислой среде активатор полностью теряет свои нуклеофильные свойства. На основе кинетики активации окисления PDA меламинам предложена аналитическая тест-система для количественного определения меламина в интервале концентраций 10^{-4} – 10^{-3} М, отличающаяся экспрессностью, высокой точностью и простотой исполнения (спектрофотометрическое определение продукта окисления PDA на длине волны 455 нм).

Ключевые слова: пероксидаза хрена; *o*-фенилендиамин; меламин; активация пероксидазы, ингибирование, ферментативное определение меламина, нуклеофильный катализ.

ВВЕДЕНИЕ

В современных высокочувствительных аналитических методах в качестве субстратов пероксидазы хрена (ПХ, КФ 1.11.1.7) наиболее часто используются растворимые ароматические амины – *o*-фенилендиамин (PDA), *o*-дианизидин (DA), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, 5-аминосалициловая кислота. Главные области аналитического применения ПХ – иммуноферментный анализ [1], иммуноцитохимия [2], хемилюминесцентный анализ [3], биосенсоры [4] и ферментативное измерение микроколичеств органических веществ разной природы [5]. Одним из основных путей повышения чувствительности всех перечисленных методов является активация (повышение эффективности) пероксидазного окисления указанных выше ароматических аминов.

Известно три принципиально различных способа активации пероксидазного окисления ароматических аминов. Исторически первый из них – введение в реакционную среду при pH > 6 азотсодержащих органических оснований (аммиак, имидазол и его производные, пиридин) [6, 7]. Эти активаторы действуют на ПХ как нуклеофилы, меняющие

основность функциональных групп фермента и расширяющие pH-оптимум каталитической активности пероксидазы: изучена кинетика пероксидазного окисления *n*-фенилендиамин и DA, активированного пиридином, имидазолом [6, 7] и его многочисленными производными [5, 8–10], а также 1,2,4-триазолом, 1,2,3-бензотриазолом и замещенными индолами [11].

Второй тип активации пероксидазного окисления ароматических аминов реализуется при их сопряженном превращении с замещенными фенолами и полифенолами. Окисление таких пар, как 4-аминоантипирин–фенолы [12–14] и люминол–фенолы [3, 4, 15–17], характеризуется большим (иногда 100–200 раз и более) ростом скорости окисления аминов. Однако при сопряженном окислении пар амин–фенолы может проявляться не только активация процесса трансформации аминов, но и его глубокое ингибирование, как правило, по конкурентному механизму [18–22].

Третий тип активации пероксидазного окисления может быть реализован при взаимодействии фермента с синтетическими полиэлектролитами, что проявляется в смещении pH-оптимума биокатализатора и существенно изменяет каталитические свойства фермента (величины K_m и k_{cat}). Показано, что скорости окисления люминола и *n*-йодфенола в сопряженном пероксидажном процессе возрастают прямо пропорционально концентрации вводимого в систему поли(*N*-этил-4-

Сокращения: МА – меламин (2,4,6-триамино-1,3,5-триазин); ПХ – пероксидаза хрена; poly(DSMA) – поли(дисульфид меламина); PDA – *o*-фенилендиамин; DA – *o*-дианизидин; РСВ – 0.015 М фосфат-цитратный буфер.

[#] Автор для переписки (факс: (375)-(172) 63-7274; эл. почта: metelitz@iboch.bas-net.by).

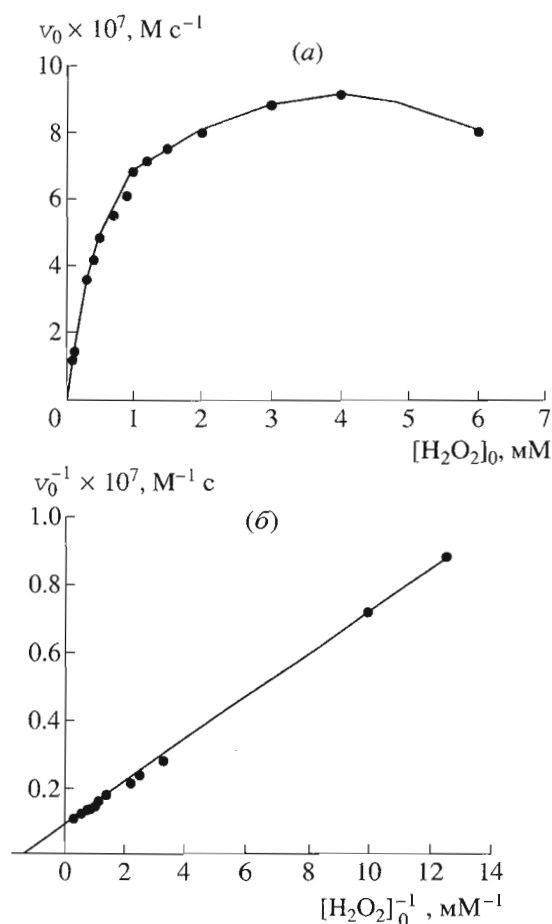


Рис. 1. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления PDA (1.0 mM) от начальной концентрации H₂O₂ в прямых (а) и в двойных обратных (б) координатах (рН 6.0).

винилпиридинийбромида) [23]. В самом общем виде предполагается, что электростатическое поле полимерной молекулы влияет на конформацию ПХ благоприятным для катализа образом, изменяя величину pK_a ионогенных групп в активном центре фермента. Сложность механизма активации ферментов в этом случае, в первую очередь, обусловлена структурой белков, представляющих собой полиамфолиты с неоднородным распределением заряженных групп в макромолекуле [23].

Критический анализ активации пероксидазного окисления ароматических аминов показывает, что механизмы этого процесса во всех трех случаях до конца не выяснены. По этой причине изучение активации пероксидазных реакций остается актуальной задачей ферментативного катализа.

Цель данной работы – кинетическое изучение активации пероксидазного окисления PDA (одного из самых используемых субстратов фермента) меламином (МА) – носителем основных свойств и потенциальным нуклеофильным агентом. Широ-

кое использование МА в разных отраслях требует наличия высокочувствительного метода его определения. До сих пор МА определяют весовым способом в виде солей циануровой или пикриновой кислот или спектрофотометрически в слабокислой среде по полосе поглощения $\sim 236 \text{ nm}$ [24]. Это не отвечает современным требованиям из-за низкой чувствительности анализа. Поэтому одной из задач нашего исследования было также создание аналитической ферментативной системы для определения МА в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} M .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика пероксидазного окисления PDA

При 20°C в РСВ (рН 6.0) начальная скорость окисления 2 mM PDA в присутствии 1 mM пероксида водорода прямо пропорциональна концентрации ПХ в интервале 0.2–2.0 нМ: при $[\text{ПХ}]_0 2.0 \text{ нМ}$ скорость пероксидазного окисления PDA равна $1.3 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$. Зависимость v_0 от начальной концентрации PDA описывается уравнением Михаэлиса–Ментен. Трансформация данной зависимости в координатах Лайнуивера–Берка позволяет вычислить кинетические параметры процесса – $k_{\text{cat}} = 1042 \text{ s}^{-1}$ и $K_m(\text{PDA}) = 0.39 \text{ mM}$ ($[\text{H}_2\text{O}_2]_0 2 \text{ mM}$). При фиксированной концентрации $[\text{PDA}]_0 (1 \text{ mM})$ изучена зависимость v_0 от начальной концентрации H₂O₂ (рис. 1а): до максимального значения v_0 зависимость описывается уравнением Михаэлиса–Ментен, из трансформации которой в двойных обратных координатах (рис. 1б) определены $k_{\text{cat}} = 1100 \text{ s}^{-1}$ и $K_m(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.7 \text{ mM}$. Различие значений k_{cat} , полученных в сериях зависимостей v_0 – $[\text{PDA}]_0$ и v_0 – $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$, является обычным для пероксидазных реакций и объясняется тем, что при повышенных концентрациях пероксида водорода наблюдается снижение стабильности ПХ, что свойственно и для многих других ферментов, функционирующих в присутствии H₂O₂ (каталазы, глюкозооксидазы, цитохромы Р-450 и др.) [25].

Максимальная скорость пероксидазного окисления PDA достигается при рН 4.0–4.8 (рис. 2, кривая 1), что близко к изоэлектрической точке кислой изоформы ПХ (рI 5.0 [26]). Влияние температуры на начальную скорость пероксидазного окисления PDA (рН 6.0) продемонстрировано на рис. 3. Низкая величина энергии активации ферментативной реакции (3.8 ккал/моль) отражает высокую реакционную способность PDA в пероксидажном окислении.

Введение в реакционную среду трудно растворимого полидисульфида poly(DSMA), а также возможное присутствие плохо растворимых в воде соединений, сопровождающих МА в ряде процессов (например, при производстве меламиноформальдегидных смол и клеёв), вызывает необ-

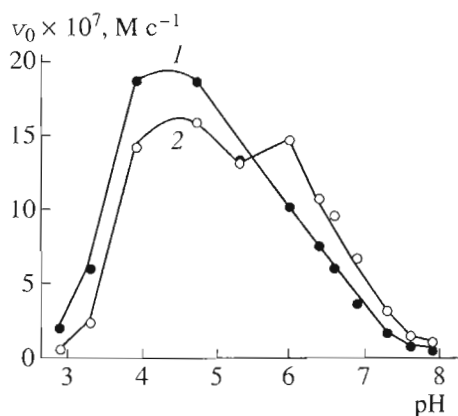


Рис. 2. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления PDA от pH РСВ в отсутствие (1) и в присутствии 0.6 мМ МА (2).

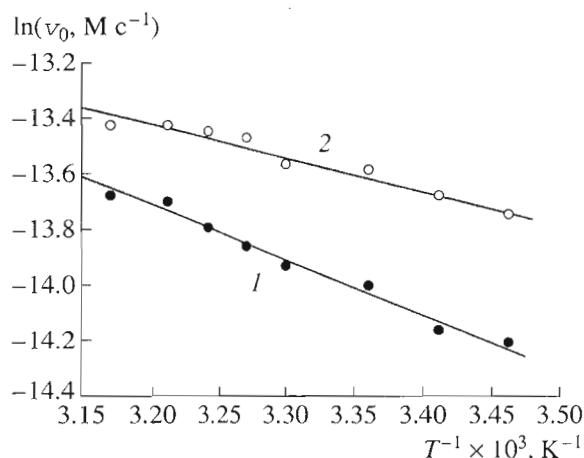


Рис. 3. Зависимости в координатах Аррениуса начальной скорости пероксидазного окисления PDA (pH 6.0) от температуры в отсутствие (1) и в присутствии 0.6 мМ МА (2).

ходимость исследования пероксидазного окисления PDA в водно-органических средах. По этой причине изучено влияние DMF (1) и DMSO (2) на начальную скорость пероксидазного окисления PDA при pH 4.0 (рис. 4а) и 6.0 (рис. 4б). Из рис. 4 следует, что DMSO при концентрациях выше 3–4 об. % вызывает снижение v_0 , более сильно выраженное при pH 4.0 (ср. кривые 2а и 2б). DMF проявляет большее инактивирующее действие на ПХ, чем DMSO, особенно при pH 4.0 (см. кривую 1а). Таким образом, при работе в водно-органических средах в качестве органической компоненты предпочтительнее использовать DMSO, поскольку вплоть до 5 об.% его наличие практически не сказывается на скорости пероксидазного окисления PDA. Ранее в нашей лаборатории показано, что органические соразтворители (DMF, изопропанол и др.) при окислении PDA влияют только на величину k_{cat} и не изменяют значений K_m [27].

Кинетика пероксидазного окисления PDA в присутствии МА

Три аминогруппы молекулы МА добавляют ей основные свойства, а нуклеофильность МА в сильной степени зависит от pH. Поэтому было изучено влияние МА на пероксидазное окисление PDA в интервале pH 3.0–8.0.

Из рис. 2 (кривая 2) виден двойственный характер влияния МА на процесс. В присутствии МА при pH < 5.5 начальная скорость пероксидазного окисления PDA снижается, а при pH > 5.5 увеличивается. Таким образом, МА меняет профиль pH-зависимости ПХ и вызывает появление второго максимума при pH 6.0.

Из зависимостей v_0 от концентрации PDA в двойных обратных координатах (рис. 5а) следует, что при pH 4.3 МА действует как ингибитор бесконкурентного типа (k_{cat} и K_m уменьшаются симбатно с ростом концентрации МА, рис. 5б, в); в то

же время при увеличении pH до 7.4 скорость пероксидазного окисления PDA в присутствии МА значительно возрастает (рис. 6). Четко проявляется бесконкурентная активация окисления PDA. Аналогичные зависимости получены для pH ≥ 6.0, 6.5 и 7.0 (данные не приведены). Таким образом, при pH ≥ 6 МА существенно активирует пероксидазное окисление PDA по бесконкурентному типу.

Оценка энергии активации пероксидазного окисления PDA при pH 6.0 в присутствии 0.6 мМ

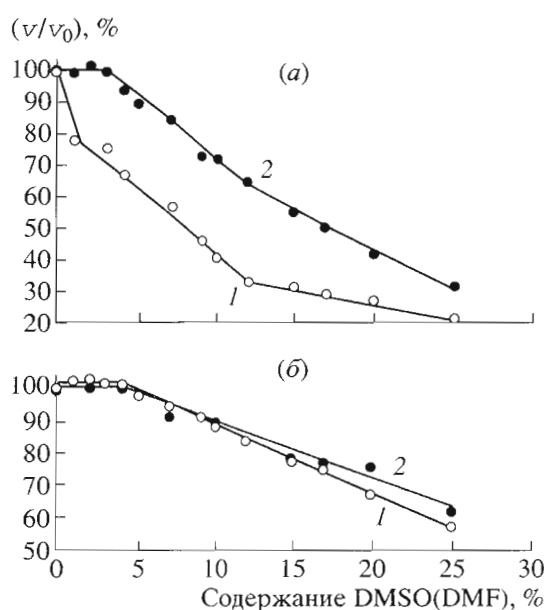


Рис. 4. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления PDA в смесях РСВ–DMF (1) и РСВ–DMSO (2) при pH 4.0 (а, [ПХ] 0.5 нМ) и 6.0 (б, [ПХ] 1 нМ).

МА (рис. 3, кривая 2) показывает, что ее величина (2.5 ккал/моль) в 1.5 раза ниже величины энергии активации в отсутствие МА (3.8 ккал/моль). Отдавая отчет в эффективном характере обеих величин, хотелось бы все же подчеркнуть, что МА в концентрации, в 3.3 раза меньшей концентрации субстрата (2.0 мМ), снижает энергетический барьер процесса в 1.5 раза, т.е. действует (формально) как катализатор пероксидазного процесса.

Зависимости k_{cat} и K_m окисления PDA от концентрации МА при pH 6.0 и 7.4 строго линейны (рис. 7), и обе величины меняются симбатно с ростом концентрации МА. На основании этих зависимостей влияние МА на величины k_{cat} и K_m в ак-

тивированном процессе при $\text{pH} \geq 6.0$ может быть выражено уравнениями

$$k_{\text{cat}}^{\text{MA}} = k_{\text{cat}}(1 + \alpha[\text{MA}]_0), \quad (1)$$

$$K_m^{\text{MA}} = K_m(1 + \alpha[\text{MA}]_0), \quad (2)$$

где α (M^{-1}) – коэффициент (степень) активации, характеризующий увеличение кинетического параметра в присутствии 1 М активатора.

Начальные скорости активированного пероксидазного окисления PDA при постоянной концентрации $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ могут быть адекватно описаны уравнением

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}}(1 + \alpha[\text{MA}]_0)[\text{ПХ}]_0[\text{H}_2\text{O}_2]_0[\text{PDA}]_0}{K_m(1 + \alpha[\text{MA}]_0) + [\text{PDA}]_0}. \quad (3)$$

При концентрации активатора $[\text{MA}]_0 = 0$ уравнение (3) трансформируется в обычную форму зависимости Михаэлиса–Ментен.

В таблице представлены величины k_{cat} и K_m , определенные при различных значениях pH (6.0–7.4) и концентраций МА. Величины коэффициента α , вычисленные из зависимостей $k_{\text{cat}}-[\text{MA}]$ и $K_m-[\text{MA}]$, хорошо соответствуют между собой и растут с увеличением pH среды. Зависимости коэффициентов $\alpha(k_{\text{cat}})$ и $\alpha(K_m)$ от pH (рис. 8) однозначно подтверждают, что активирующее действие МА в пероксидажном окислении PDA определяется нуклеофильностью активатора, возрастающей с увеличением $\text{pH} > 6$. При pH ниже 5.0 все три аминогруппы МА протонированы, и он теряет нуклеофильные свойства, превращаясь из активатора в ингибитор пероксидажного окисления PDA (см. рис. 5а, б). Таким образом, именно pH реакционной среды играет ключевую роль в активации МА окисления PDA.

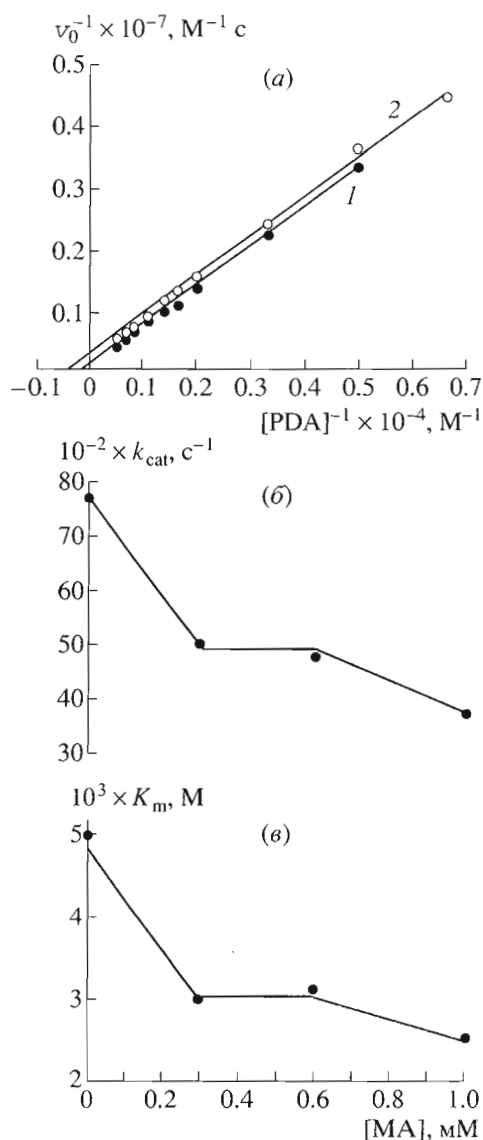


Рис. 5. Зависимости Лайнуивера-Берка для пероксидажного окисления PDA при pH 4.3 (а) в отсутствие (1) и в присутствии 1 мМ МА (2) и зависимости k_{cat} (б) и K_m (в) от концентрации МА.

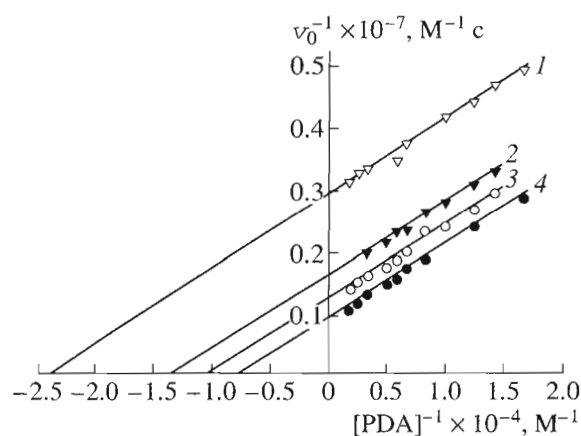


Рис. 6. Зависимости Лайнуивера-Берка для пероксидажного окисления PDA при pH 7.4 в отсутствие (1) и в присутствии 0.3 (2), 0.6 (3) и 1.0 (4) мМ МА ([ПХ] 3 нМ, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 1 мМ).

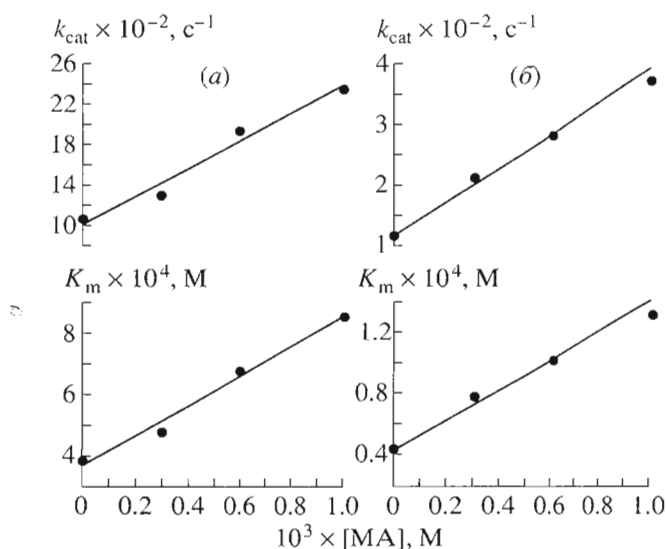


Рис. 7. Зависимости k_{cat} и K_m при пероксидазном окислении PDA от концентрации МА при рН 6.0 (а) и 7.4 (б). [ПХ] 3 нМ, [H₂O₂] 1 мМ.

Важная роль трех аминогрупп МА в нуклеофильной активации пероксидазного окисления PDA подтверждается при замене МА на poly(DSMA) (20°C, рН 6.0, 5 об.% DMSO). Poly(DSMA) также ускоряет окисление PDA по бесконкурентному типу, однако при концентрации 0.5 мМ poly(DSMA) ускорение составляет только 9.5%, т.е. в сравнении с МА его полидисульфид почти полностью потерял нуклеофильные свойства. Это связано с участием двух амино-

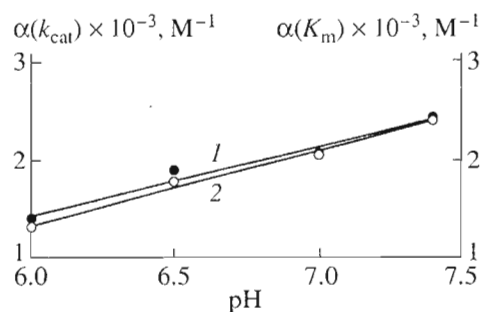


Рис. 8. Зависимости от рН среды коэффициентов активации МА (α) пероксидазного окисления PDA, вычисленных по значениям k_{cat} (1) и K_m (2), условия для каждого рН указаны в таблице.

групп мономера в поликонденсации и их превращении в группировки -NH-S-S- в составе poly(DSMA) при его синтезе. Как видим, такая трансформация МА сильно снижает его нуклеофильные свойства в составе полидисульфида, что сказывается на его поведении в пероксидазном процессе окисления PDA.

Несмотря на многочисленные исследования нуклеофильной активации пероксидазных реакций [5–11], ее механизм до сих пор остается невыясненным. Сомнений не вызывает только нуклеофильная природа активации некоторых пероксидазных процессов органическими азотсодержащими основаниями, что подтверждает экспериментально данная работа. Известно, что многие азотсодержащие основания взаимодействуют с ПХ не по гему [7, 28, 29]: этот факт подтверждается от-

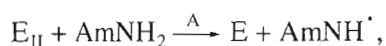
Кинетические характеристики пероксидазного окисления PDA при 20°C в присутствии МА при разных значениях рН PCB

Концентрации компонентов смеси, мМ			рН	[МА] × 10 ³ , М	k_{cat} , с ⁻¹	$\alpha(k_{cat}) \times 10^{-3}$, М ⁻¹	$K_m \times 10^4$, М	$\alpha(K_m) \times 10^{-3}$, М ⁻¹
ПХ	H ₂ O ₂	PDA						
1 × 10 ⁻⁶	2	0.15–1	6.0	0	1042	1.38	3.85	1.30
				0.3	1299		4.76	
				0.6	1923		6.70	
				1.0	2353		8.47	
1 × 10 ⁻⁶	2	0.1–0.8	6.5	0	645	1.88	2.00	1.76
				0.6	1513		4.55	
				1.0	1923		5.71	
3 × 10 ⁻⁶	2	0.06–0.6	7.0	0	333	2.04	1.50	2.03
				0.6	741		3.33	
3 × 10 ⁻⁶	1	0.06–0.6	7.4	0	115	2.41	0.42	2.37
				0.3	208		0.76	
				0.6	275		1.00	
				1.0	370		1.30	

сутствием спектральных изменений в пероксидазе и ее окисленных формах при взаимодействии с имидазолом и пиридином [7]. Использование метода ЯМР при изучении комплексообразования ПХ с производными имидазола также доказывает невозможность прямого контакта этих соединений с гемом [28]. Это означает, что полипептидная цепь ПХ имеет канал передачи электронов с субстрата на гемин и атом гемового железа. Нуклеофилы-активаторы, вероятно, взаимодействуют с этим каналом, что имеет благоприятные последствия для катализа.

Прогресс в области изучения первичной структуры пероксидазы и роли гомологичных участков в катализе позволяет конкретизировать влияющие активаторов-нуклеофилов на ПХ. В настоящее время считается, что определяющую роль в пероксидазном катализе имеют гомологичные сайты, координирующие гем в дистальной области (большой домен, остатки 40–50) и в проксимальной области (малый домен, остатки 160–170) [26]. Последовательность, координирующая дистальную область гема -Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val-, содержит функционально важный остаток гистидина и соответствует участку, ответственному за кислотно-основной катализ в молекуле ПХ. Можно с большим основанием предполагать, что именно с этим участком в гидрофобном канале фермента взаимодействуют активаторы-нуклеофилы.

Так как лимитирующей стадией пероксидазного процесса считается взаимодействие активной формы ПХ – соединения II (E_{II}) с молекулой восстанавливающего субстрата (амин или фенола) [30], можно предполагать, что активаторы-нуклеофилы ускоряют именно эту стадию:



где E – пероксидаза, $AmNH_2$ – ароматический амин. Дальнейшая детализация каталитического акта, к сожалению, в настоящее время невозможна из-за отсутствия прямых экспериментальных доказательств. Без сомнений можно утверждать следующее: в пероксидазном окислении PDA при $pH \geq 6$ МА действует активирующим образом по бесконкурентному типу, представляя собой типичный нуклеофильный катализатор, в 1.5 раза снижающий энергетический барьер процесса и существенно изменяющий его pH-профиль. При $pH < 5$ МА теряет свои активирующие свойства и становится слабым ингибитором пероксидазного окисления PDA.

Пероксидазная тест-система для количественного определения МА

Результаты по кинетике пероксидазного окисления PDA, активированного МА, положены нами в основу аналитической тест-системы для ко-

личественного определения МА в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} М. В качестве градуировочной зависимости можно использовать графики “ $k_{cat}(v_{max})-[MA]$ ” (см. рис. 7а, б). Анализ предпочтительно проводить в среде РСВ с pH 7.4, так как это обеспечивает максимальный коэффициент активации, равный 2.41 (см. таблицу). Для экспресс-анализа МА целесообразно использовать калибровочную зависимость в координатах “ $v_0-[MA]$ ”. Анализ проводится при 20°C с использованием простейших спектрофотометров (колориметров), способных регистрировать светопоглощение в области ~455 нм. Анализ отличается быстротой (1–3 мин без учета предварительной инкубации). Чувствительность анализа может быть повышена при увеличении концентрации ПХ.

Пероксидазная тест-система для количественного определения МА включает следующие компоненты: РСВ, pH 7.4; раствор пероксида водорода в РСВ, pH 7.4 (0.02 М); раствор *o*-фенилендиамина в РСВ, pH 7.4 (0.04 М); раствор ПХ в РСВ, pH 7.4 (60 нМ); растворы МА разных концентраций в РСВ для построения калибровочной зависимости (см. рис. 7).

Предложенная нами пероксидазная тест-система наряду с уже отмеченными достоинствами позволяет определение МА в присутствии труднорастворимых в воде примесей, так как пероксидазное окисление PDA можно проводить в бинарных водно-органических смесях РСВ–DMSO или РСВ–DMF (см. рис. 4). Во “Введении” отмечалось, что в практике используется прямое спектрофотометрическое определение МА в слабых средах по полосе поглощения ~236 нм, однако сопровождающие МА примеси часто интенсивно поглощают свет в УФ-области, что является большим недостатком этого метода.

В предложенной нами тест-системе на МА измерение светопоглощения проводится в области ~455 нм, где многие примеси оптически прозрачны. Недостатком нашей тест-системы является использование растворов PDA, которые неустойчивы на воздухе из-за аутоокисления этого диамина. Однако этот недостаток легко устраним при использовании таблетированных форм *o*-фенилендиамина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали кислую изоформу пероксидазы хрена (ПХ) марки А с оптическим показателем чистоты RZ 2.4 (НПО Биолар, Латвия). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения в максимуме полосы Сорс (403 нм), равный $102000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [31]. В качестве окислителя применяли разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектро-

фотометрически с использованием молярного коэффициента поглощения ϵ_{230} $72.1 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [32].

В качестве восстанавливающего субстрата ПХ применяли *o*-фенилендиамин (PDA) марки “ч.д.а.” (Харьковский химико-фармацевтический завод, Украина) после его очистки возгонкой в вакууме. Использовали меламина (МА) марки “х.ч.” (Реахим, Россия). УФ-спектр МА в дистиллированной воде характеризовался максимумом поглощения на длине волны 212 нм, а в РСВ, рН 6.0 – на длине волны 223 нм. Poly(DSMA) (средняя $M \sim 1500$ Да, ~ 8 мономерных звеньев) был получен по описанной ранее методике [33] и любезно предоставлен Ю.П. Лосевым (химический факультет БГУ, Минск).

Органические растворители DMSO и DMF перед употреблением перегоняли. Для приготовления буферных растворов использовали соли и основания марки не ниже “х.ч.” (Реахим, Россия).

Пероксидазное окисление PDA в присутствии МА и без него проводили на спектрофотометре “Specol-211” (Carl Zeiss, Германия) с термостатируемым кюветным отделением. Варьировали рН, температуру и концентрации ПХ, МА и субстратов. В типичных экспериментах реакционная смесь общим объемом 1 мл (20°C) содержала РСВ с заданным рН, 1 нМ ПХ, 2 мМ PDA, 2 мМ H_2O_2 и МА в заданных концентрациях.

Во всех случаях реакцию начинали добавлением H_2O_2 (перед добавлением H_2O_2 смеси выдерживали 3 мин при 20°C) и в течение 1–2 мин регистрировали величины оптического поглощения растворов на длине волны 455 нм, соответствующей максимуму поглощения продукта окисления PDA – 2,3-диаминофеназина [34]. Начальные скорости окисления PDA определяли по начальным прямолинейным участкам зависимостей A_{455} от времени, используя для расчета v_0 следующие значения коэффициентов молярного поглощения продукта окисления PDA [35]: ϵ , $\text{мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (рН) – 19.6 (4.5), 19.0 (5.0), 17.0 (5.5), 16.4 (6.6), 16.3 (6.9), 16.1 (8.0).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ю.П. Лосеву (химический факультет БГУ, Минск) за предоставление поли(дисульфида меламина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Enzyme-Immunoassays / Ed. E.T. Maggio. Boca Raton: CRC Press, 1983. 295 p.
2. Полак Дж., ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987. 74 с.
3. Гаврилова Е.М. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 3. Неизотопные методы иммуноанализа. М.: ВИНТИ, 1987. С. 6–55.
4. Rubtsova M.Yu., Kovba G.V., Egorov A.M. // Biosensors and Bioelectronics. 1998. V. 13. P. 75–85.
5. Угарова Н.Н. Кинетические закономерности катализа пероксидазой и люциферазой и проблемы использования этих ферментов для определения микроколичеств веществ. Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1982. 270 с.
6. Fridovich I. // J. Biol. Chem. 1963. V. 233. P. 3921–3928.
7. Claiborne A., Fridovich I. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 2327–2335.
8. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1372–1379.
9. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Курилина Т.А., Березин И.В. // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1577–1584.
10. Лебедева О.В., Домбровский В.А., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1978. Т. 43. С. 1024–1033.
11. Dolmanova I.F., Shekhovtsova T.N., Kutcheryaeva V.V. // Talanta. 1987. V. 34. P. 201–205.
12. Литвинчук А.В., Савенкова М.И., Метелица Д.И. // Кинетика и катализ. 1991. Т. 32. С. 535–540.
13. Metelitz D.I., Litvinchuk A.V., Savenkova M.I. // J. Molec. Catalysis. 1991. V. 67. P. 401–411.
14. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. // Изв. АН БССР. Сер. хим. наук. 1991. № 2. С. 75–82.
15. Vlasenko S.B., Arefyev A.A., Klimov A.D., Kim B.B., Gorovits E.L., Osipov A.P., Gavrilova E.M., Egorov A.M. // J. Biolum. Chemilum. 1989. V. 4. P. 164–176.
16. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 103–113.
17. Литвинчук А.В., Метелица Д.И., Савенкова М.И., Чередникова Т.В., Ким Б.Б., Писарев В.В. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 604–616.
18. Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1255–1263.
19. Карасёва Е.И., Никифорова Т.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 665–672.
20. Карасёва Е.И., Метелица Д.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 68–75.
21. Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 751–761.
22. Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биоорганич. химия. 2002. Т. 28. С. 147–155.
23. Горовиц Е.Л. Влияние синтетических полиэлектролитов на катализируемую пероксидазой хрена реакцию совместного окисления люминола и *p*-йодфенола перекисью водорода. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1991. 119 с.
24. Краткая химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1964. Т. 3. С. 108–109.
25. Метелица Д.И., Гирина Н.В., Карасёва Е.И., Савенкова М.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. С. 617–624.
26. Газарян И.Г. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов. М.: ВИНТИ, 1992. С. 4–54.
27. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Изв. НАН Беларуси. Сер. хим. наук. 1992. № 1. С. 78–83.

28. *Morishima J., Ogawa S., Inubushi T., Jonezawa T., Itsuka T.* // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 5109–5115.
29. *Ким Б.Б.* Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов. М.: ВИНТИ, 1992. С. 126–146.
30. *Метелица Д.И.* Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984. 293 с.
31. *Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. С. 116–124.
32. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Ленинград: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
33. *Захаров А.И., Лосев Ю.П., Лукьянец В.Г., Попов Д.С.* А.с. СССР 1690370 // Б.И. 1989.
34. *Tharcha P.J., Chu V.P., Whittern D.* // *Anal. Biochem.* 1987. V. 165. P. 230–233.
35. *Пучкаев А.В.* Реакции пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы в неводных средах. Дис. ... канд. хим. наук. Минск: Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 1993. 197 с.

Noncompetitive Activation of the Peroxidase-catalyzed Oxidation of *o*-Phenylenediamine by Melamine

E. I. Karaseva, I. V. Naumchik, and D. I. Metelitz[#]

[#] Fax: (375)-(172) 63-7274, e-mail: metelitz@iboch.bas-net.by

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

Peroxidase-catalyzed oxidation of *o*-phenylenediamine (PDA) is greatly activated with melamine (MA) in 15 mM phosphate–citrate buffer at pH 6.0–7.4 in a noncompetitive manner: k_{cat} and K_m increase in direct proportion to the MA concentration. An extent of the activation is quantitatively characterized with a coefficient α (in M^{-1}), which essentially increases along with the rise in pH from 6.0 to 7.4. MA acts as a nucleophilic catalyst in the oxidation process: it most likely affects the peroxidase active site from the distal position of heme. MA non-competitively inhibits the peroxidase oxidation of PDA at pH 4.3, since it completely loses its nucleophilic properties in acidic medium. A rapid, highly accurate, and simple analytical test system based on the kinetics of melamine-activated oxidation of PDA is proposed for the quantitative determination of melamine within the concentration range of 10^{-4} – 10^{-3} M. This test system uses the spectrophotometric determination of the PDA oxidation product at 455 nm. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: horseradish peroxidase, activation, inhibition; *o*-phenylenediamine; melamine, peroxidase activation, enzymatic assay; nucleophilic catalysis