



УДК 577.152.1.042 + 577.152.3 + 577.158.42.02

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАЗОЛА И ЕГО АМИНОПРОИЗВОДНЫХ НА КИНЕТИКУ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ

© 2004 г. Е. И. Карасева*, П. Н. Гапоник**, Д. И. Метелица**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купrevича, 5/2, Беларусь;

**Белорусский государственный университет, химический факультет, Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 10.01.2003 г. Принята к печати 03.07.2003 г.

Пероксидазное окисление 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолидин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS), *o*-фенилендиамина (PDA) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) активируется тетразолом и 5-аминотетразолом (АТ) и слабо ингибируется 1,5-диаминотетразолом. Активирующее действие тетразола и АТ на окисление PDA и ТМВ носит четко выраженный бесконкурентный, а на окисление ABTS – неконкурентный характер. Для трех субстратов и двух активаторов определены коэффициенты (степени) активации α , зависящие от типа субстрата, природы буфера и возрастающие с увеличением значения pH от 6.4 до 7.2. Пероксидазное окисление ABTS характеризуется меньшими величинами α , равными 145 и 58 M⁻¹ для тетразола и АТ. Максимальные величины α при окислении PDA равны 4140 и 800 и при окислении ТМВ – 3570 и 540 M⁻¹ для АТ и тетразола соответственно. Активация пероксидазного окисления использованных субстратов тетразолом и АТ при pH \geq 5.4 объясняется нуклеофильной природой активаторов, взаимодействующих с аминокислотными остатками активного центра пероксидазы по механизму кислотно-основного катализа.

Ключевые слова: 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолидин-6-сульфоновая кислота), *o*-фенилендиамин, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; пероксидаза хрена, активация пероксидазы; тетразол, 5-аминотетразол, нуклеофильный катализ.

ВВЕДЕНИЕ

Пероксидаза хрена (ПХ, КФ 1.11.1.7) и ее хромогенные субстраты – 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолидин-6-сульфоновая кислота) (ABTS), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) и *o*-фенилендиамин (PDA) – широко используются в биоаналитических методах – иммуноцитохимии [1], иммуноферментном анализе [2, 3], биосенсорах [4]. Одним из способов повышения чувствительности названных методов является активация ферментативной реакции. Краткий анализ принципиально различающихся способов активации пероксидазного окисления разных субстратов проведен в наших предыдущих работах [5–7].

Ускорение пероксидазного окисления аминов может быть достигнуто введением в реакционную среду азотсодержащих органических основа-

ний. Аммиак, пиридин, имидазол и его производные при pH \geq 6.5 активируют ПХ как нуклеофилы, меняющие рК функциональных групп активного центра пероксидаз и расширяющие pH-оптимум их каталитической активности. Ранее изучена кинетика активации пероксидазного окисления *o*-дианилидина и *n*-фенилендиамина пиридином, имидазолом [8, 9] и его многочисленными производными [10–12], а также замещенными индолами, 4-аминопиридином и 1,2,3-триазолом [13].

Недавно нами показано сильное активирующее влияние поли(5-аминодисульфида салициловой кислоты) (poly(ADSSA)) на пероксидазное окисление ТМВ [5], а также меламин и 2-аминотриазола – на окисление PDA [6] и ТМВ [7]. Эффект активации количественно охарактеризован нами коэффициентом (степенью) активации α (M⁻¹), означаящим увеличение кинетических параметров k_{cat} и K_m в присутствии 1 M активатора. Анализ литературы [5–7] показывает, что механизмы активации пероксидазного окисления ароматических аминов органическими основаниями до конца не выяснены и поиск новых эффективных активаторов остается актуальной задачей пероксидазного катализа. По этой причине в данной работе в качестве потенциальных активаторов пероксидазного окисления диаминов (PDA и

Сокращения: ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолидин-6-сульфоновая кислота) диаммониевая соль; АТ – 5-аминотетразол; DAT – 1,5-диаминотетразол; Tetg – тетразол; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; PDA – *o*-фенилендиамин; PB – 0.06 M фосфатный буфер; PCB – 0.06 M фосфат-цитратный буфер; ПХ – пероксидаза хрена; poly(ADSSA) – поли(5-аминодисульфид салициловой кислоты).

Автор для переписки (факс: (375)-(172) 63-72-74; эл. почта: metelitz@iboch.bas-net.by).

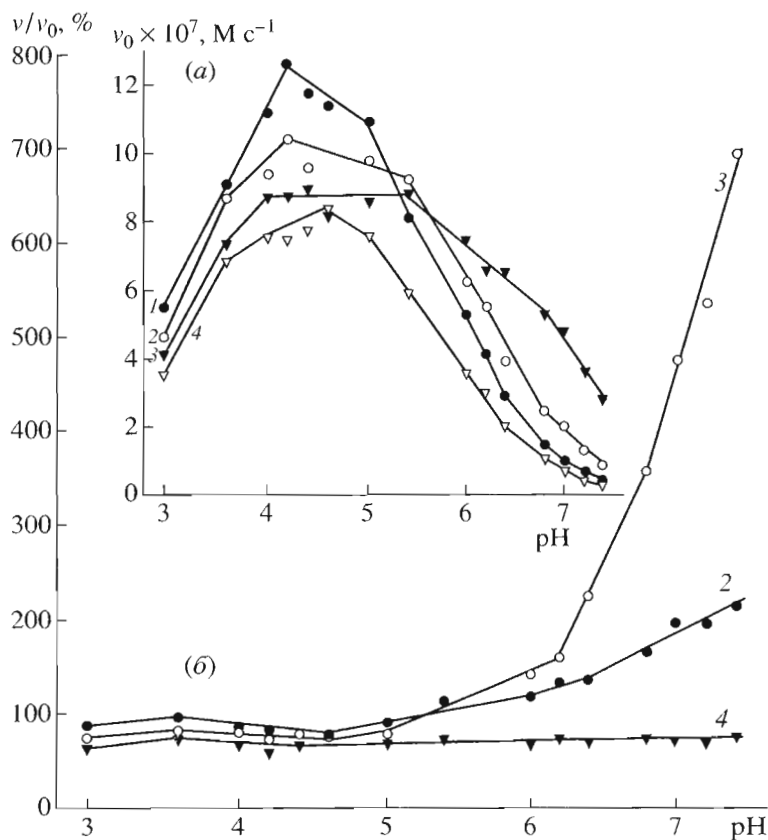


Рис. 1. Зависимости абсолютных (а) и относительных (б) начальных скоростей пероксидазного окисления ТМВ (1 мМ) от рН в отсутствие тетразолов (1) и в присутствии 2.0 мМ Tetr (2), АТ (3) или DAT (4). Концентрация ПХ 0.6 нМ.

ТМВ), а также АВТС, впервые использованы тетразол (Tetr), 5-аминотетразол (АТ) и 1,5-диаминотетразол (DAT).

Выбор тетразолов в качестве потенциальных активаторов связан с их структурой и амбидентными свойствами как нуклеофилов: Tetr и АТ имеют ароматический характер и являются NH-кислотами средней силы и одновременно слабыми основаниями, как и DAT при $\text{pH} \geq 7$. Выбор субстратов – АВТС, PDA и ТМВ – определяется в первую очередь их большим практическим значением в биоаналитических методах [1–4].

Цель данной работы – кинетическое изучение пероксидазного окисления АВТС, PDA и ТМВ в присутствии тетразола и его аминокпроизводных – АТ и DAT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика пероксидазного окисления ТМВ в присутствии тетразола и его аминокпроизводных. Из рН-зависимостей абсолютных (а) и относительных (б) начальных скоростей пероксидазного окисления ТМВ (1 мМ) в отсутствие и в присутствии тетразолов (рис. 1) видно, что максимальные величины v_0 достигаются во всех случаях при

рН от 4.2 до 4.6, что соответствует оптимальной каталитической активности кислой изоформы ПХ, имеющей значение pI 5.0 [14]. До значений $\text{pH} \leq 5.2$ тетразол и АТ снижают величину v_0 , а при $\text{pH} \geq 5.4$ существенно повышают ее (рис. 1б), в то время как DAT снижает начальную скорость окисления ТМВ во всем изученном диапазоне рН.

Таким образом, Tetr и АТ являются активаторами пероксидазного окисления ТМВ при $\text{pH} \geq 5.4$, а DAT – слабый ингибитор окисления этого субстрата. Во всех случаях зависимости v_0 от начальной концентрации ТМВ описываются уравнением Михаэлиса–Ментен как в присутствии тетразолов, так и без них. Характер зависимостей v_0 от $[\text{TMB}]_0$ в двойных обратных координатах в присутствии возрастающих концентраций тетразола и АТ (рис. 2) отвечает бесконкурентному типу активации. Как показано нами ранее, в таком случае зависимости кинетических параметров процесса от концентрации активатора $[\text{A}]_0$ (каталитической константы k_{cat}^a и константы Михаэлиса K_m^a) описываются эмпирическими уравнениями (1) и (2) [5–7]:

$$k_{\text{cat}}^a = k_{\text{cat}}(1 + \alpha[\text{A}]_0), \text{ с}^{-1} \quad (1)$$

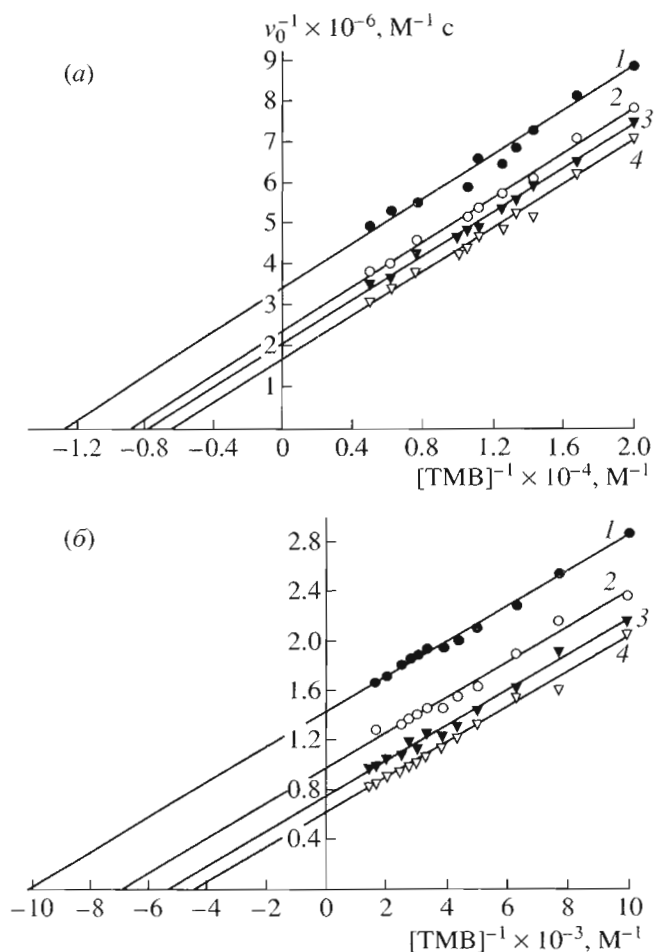


Рис. 2. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления от концентрации ТМВ (0.06 М РСВ) в двойных обратных координатах в отсутствие активаторов (1), а также в присутствии Тетр (а): 0.8 (2), 1.2 (3), 2.0 мМ (рН 7.2) (4) или АТ (б): 0.2 (2), 0.4 (3) и 0.6 мМ (рН 6.4) (4).

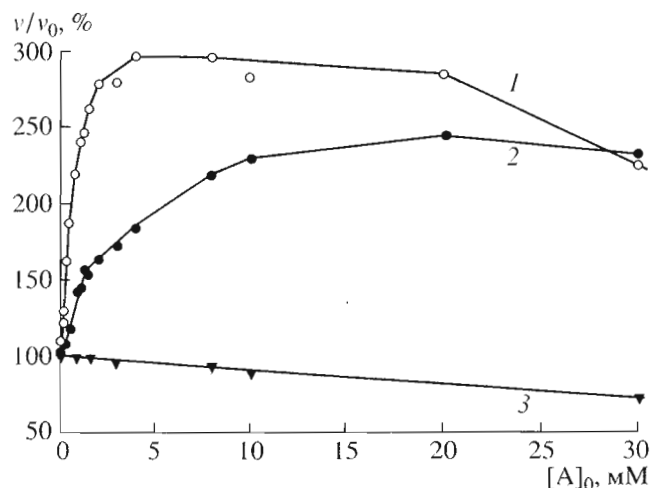


Рис. 3. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления PDA (2 мМ) в 0.06 М РСВ рН 6.4 от концентрации АТ (1), Тетр (2) и DAT (3).

$$K_m^a = K_m(1 + \alpha[A]_0), \text{ М.} \quad (2)$$

Начальная скорость активированного пероксидазного окисления ТМВ при постоянной концентрации H_2O_2 адекватно описывается уравнением (3):

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

В отсутствие активатора ($[A]_0 = 0$) уравнение (3) трансформируется в обычную форму зависимости Михаэлиса–Ментен.

Пероксидазное окисление ТМВ в присутствии разных концентраций Тетр и АТ было подробно изучено при рН 6.4 и 7.2 в различных буферных растворах. Во всех случаях из зависимостей v_0 от $[\text{ТМВ}]_0$ в двойных обратных координатах определяли величины k_{cat}^a и K_m^a и по уравнениям (1) и (2) вычисляли коэффициенты α .

Из приведенных в табл. 1 и 2 данных следует, что как в отсутствие активаторов, так и в их присутствии величины k_{cat} в среде РСВ выше, чем в РСВ. Во всех случаях значения k_{cat} и K_m увеличиваются прямо пропорционально концентрации активатора. Величины коэффициента активации α зависят от рН и природы буфера: в РСВ α выше, чем в РВ, а при рН 7.2 выше, чем при рН 6.4, то есть α возрастает с увеличением нуклеофильности активатора с ростом рН. При переходе от Тетр к АТ величина коэффициента α возрастает почти на порядок.

Таким образом, при рН > 5.4 тетразол и АТ – активаторы пероксидазного окисления ТМВ, в то время как DAT в широком интервале рН (3.0–7.4) слабо ингибирует пероксидазное окисление ТМВ (рис. 1).

Кинетика пероксидазного окисления PDA в присутствии тетразола и его аминопроизводных. Как видно из рис. 3, ингибирование пероксидазного окисления PDA (0.06 М РСВ, рН 6.4) прямо пропорционально концентрации DAT. Тетразол и АТ активируют окисление PDA, но при высоких концентрациях их промотирующее влияние снижается. Зависимости v_0 от $[\text{PDA}]_0$ в двойных обратных координатах (рис. 4) однозначно свидетельствуют о бесконкурентном характере активации пероксидазного окисления PDA в присутствии Тетр и АТ.

Из табл. 3 следует, что активирующий эффект АТ на пероксидазное окисление PDA (коэффициент α) приблизительно в 5 раз превышает влияние на эту реакцию тетразола. В отличие от активированного окисления ТМВ (табл. 1 и 2), в случае пероксидазной трансформации PDA коэффициент α снижается с ростом концентрации обоих активаторов, однако промотирующее действие тетразолов всегда сохраняется.

Таким образом, при pH 6.4 тетразол и АТ эффективно активируют пероксидазное окисление PDA по бесконкурентному типу, в то время как DAT слабо ингибирует этот процесс.

Кинетика пероксидазного окисления ABTS в присутствии тетразола и его аминопроизводных. На рис. 5 показано влияние тетразолов на относительные начальные скорости пероксидазного окисления ABTS. Как и при пероксидажном окислении диаминов, DAT слабо ингибирует окисление ABTS (зависимость 5), в то время как Tetg и АТ активируют эту реакцию. Активирующий эффект резко возрастает в присутствии 5% DMF в среде до 10 раз в случае Tetg и до 6 раз в случае АТ. Из данных рис. 6 следует, что характер активации пероксидазного окисления ABTS в присутствии Tetg и АТ принципиально отличается от процессов окисления TMB (рис. 2) и PDA (рис. 4): в данном случае величина K_m не меняется, а значение k_{cat} возрастает с увеличением концентрации активаторов, т.е. активация является неконкурентной.

Зависимости k_{cat} от концентрации активаторов при пероксидажном окислении ABTS показаны на рис. 7. В интервале концентраций 0–10 мМ коэффициенты активации α равны 1.45×10^2 для Tetg и $0.58 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ для АТ, т.е. тетразол в 2.5 раза эффективнее, чем АТ в процессе активации пероксидазного окисления ABTS. Излом зависимости в случае Tetg (рис. 7, 1) можно объяснить двумя сайтами связывания тетразола в активном центре пероксидазы, что проявляется при увеличении его концентрации в растворе выше 10 мМ. Если это так, то для АТ вплоть до концентрации 20 мМ характерен только один сайт связывания с ПХ (рис. 7, 2).

Сравнительный анализ влияния активаторов на пероксидазное окисление хромогенных субстратов. Использование коэффициента α в качестве количественного параметра активации пероксидажного окисления хромогенных субстратов дало возможность сопоставить эффективность разных активаторов в данном процессе (табл. 4). Видно, что активированное окисление ABTS отличается от превращения обоих ароматических диаминов (PDA и TMB) более низкой степенью активации. Меняется и характер процесса: активация в случае ABTS происходит по неконкурентному типу (рис. 6), т.е. возрастает значение k_{cat} , а величина K_m постоянна, в то время как активация окисления PDA и TMB всех активаторов носит бесконкурентный характер, т.е. величины k_{cat} и K_m симбатно возрастают (рис. 2 и 5). Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что ABTS и ароматические диамины (PDA и TMB) связываются в активном центре ПХ по разным сайтам.

Проблема связывания субстратов пероксидаз с их активными центрами далека от своего решения [15], однако прогресс в области белковой инженерии пероксидаз и расшифровка их третич-

Таблица 1. Влияние тетразола на кинетические характеристики пероксидазного окисления TMB

pH	Среда	[Tetr], мМ	k_{cat} , c^{-1}	$\alpha(k_{cat}) \times 10^{-2}$, M^{-1}	$K_m \times 10^4$, M	$\alpha(K_m) \times 10^{-2}$, M^{-1}
6.4	PCB	0	1098	–	1.04	–
		0.4	1337	5.45	1.26	5.37
		0.8	1562	5.28	1.48	5.32
	PB	1.2	1798	5.31	1.71	5.4
		0	1323	–	0.97	–
		0.8	1772	4.23	1.30	4.23
7.2	PCB	1.2	1990	4.20	1.46	4.20
		0	292	–	0.79	–
		0.4	351	5.26	0.90	5.29
		0.8	417	5.35	1.13	5.29
	PB	1.2	483	5.45	1.31	5.42
		2	598	5.24	1.61	5.14
		0	328	–	0.82	–
		0.4	389	4.65	0.99	5.02
		0.8	459	4.99	1.16	5.05
		2	633	4.65	1.64	4.93

Таблица 2. Влияние АТ на кинетические характеристики пероксидазного окисления TMB

pH	Среда	[AT], мМ	k_{cat} , c^{-1}	$\alpha(k_{cat}) \times 10^{-3}$, M^{-1}	$K_m \times 10^4$, M	$\alpha(K_m) \times 10^{-3}$, M^{-1}
6.4	PCB	0	1157	–	0.98	–
		0.2	1692	2.31	1.43	2.29
		0.4	2207	2.27	1.89	2.32
	PB	0.6	2705	2.21	2.31	2.26
		0	1298	–	1.29	–
		0.2	1667	1.42	1.67	1.47
7.2	PCB	0.4	2083	1.51	2.06	1.49
		0	285	–	0.71	–
		0.4	692	3.57	1.69	3.47
	PB	0	320	–	0.83	–
		0.4	705	3.01	1.83	3.03

ных структур [16–18] позволяют более определенно, чем раньше, говорить о механизмах превращения H_2O_2 и связывании восстанавливающих субстратов в активном центре ПХ. Дистальные остатки His42 и Arg38 играют важную роль при гетеролизе H_2O_2 , координированной гемовым железом. Доступ субстратов и эффекторов в активный центр пероксидаз растений определяется размерами гидрофобного канала в дистальной области, в формировании которого участвует последовательность 138-LPAPFF-143

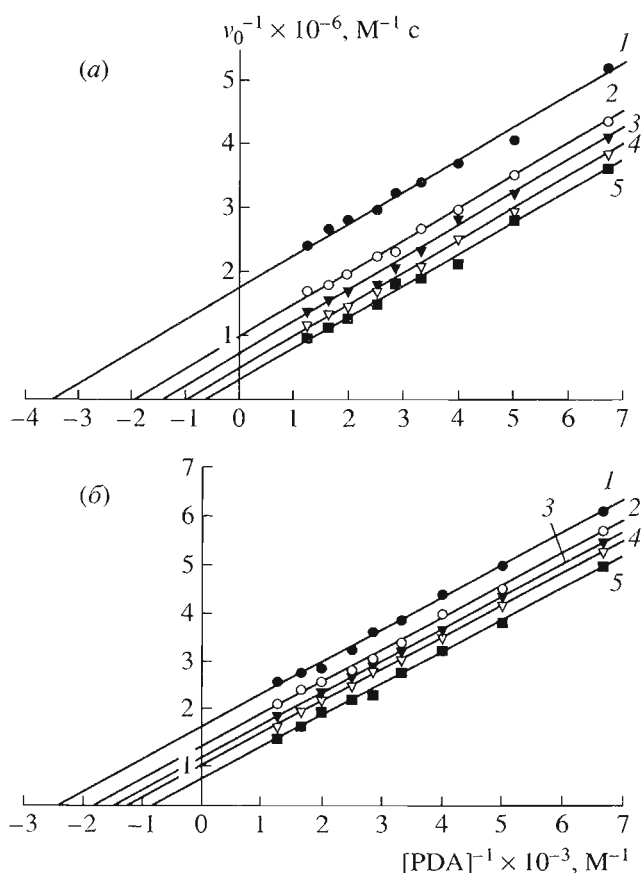


Рис. 4. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления от концентрации PDA в двойных обратных координатах в отсутствие активаторов (1), а также в присутствии Tetr (а): 0,4 (2), 0,8 (3), 1,2 (4) и 3,0 мМ (5) или AT (б): 0,2 (2), 0,4 (3), 0,8 (4) и 3,0 мМ (5). Условия как на рис. 3.

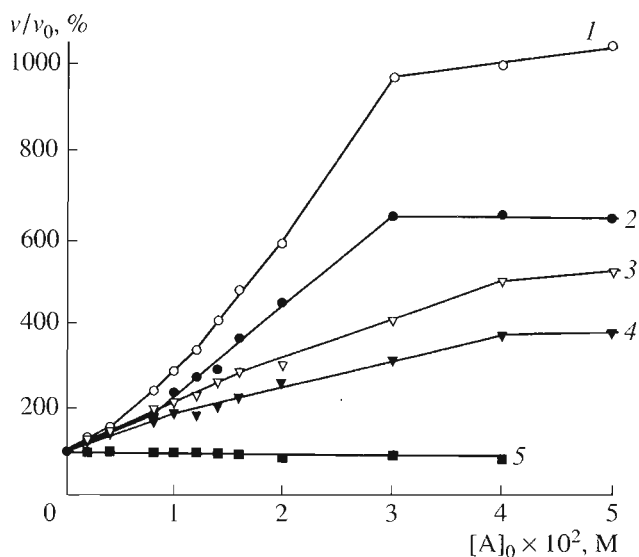
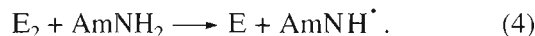


Рис. 5. Зависимости относительных начальных скоростей пероксидазного окисления 5 мМ АВТС (0,06 М РСВ рН 6,4) от концентрации Tetr (1, 2), АТ (3, 4) и DAT (5). Кривые (1) и (3) сняты в присутствии 5% DMF в среде.

(номера остатков пероксидаз хрена и арахиса) [16]. Можно предположить, что PDA и TMB связываются с этой областью гидрофобного канала, в то время как АВТС связывается с другой областью в активном центре ПХ, что предопределяет различие пероксидазного окисления АВТС и ароматических диаминов в присутствии активаторов (см. табл. 1–4).

Как следует из табл. 4, максимальная степень активации ($\alpha = 2.44 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) достигается при пероксидажном окислении TMB в присутствии poly(ADSSA) [5], однако в этом случае механизм активации принципиально отличается от действия других активаторов: poly(ADSSA) образует комплекс с ПХ при нековалентном взаимодействии этого полиэлектролита с белком-амфолитом, что благоприятным образом сказывается на каталитической активности пероксидазы. Все прочие указанные в табл. 4 активаторы действуют только при $\text{pH} \geq 5.4$, как нуклеофилы, взаимодействующие с аминокислотными остатками активного центра ПХ и меняющие их кислотно-основные характеристики, что повышает реакционную способность промежуточных активных форм пероксидазы – Соединений I и II.

Считается, что в большинстве случаев лимитирующей стадией пероксидажного окисления аминов является реакция взаимодействия Соединения II (E_2) с субстратом (AmNH_2) с регенерацией исходной формы ПХ (E) [15]:



Если бы активаторы-нуклеофилы не влияли на эту стадию процесса, их действие не проявлялось бы кинетически. По нашему мнению, промотирующее действие приведенных в табл. 4 соединений на окисление диаминов следует связывать с влиянием активаторов как нуклеофилов именно на реакцию (4). Нет никаких оснований предполагать, что активаторы-нуклеофилы могут воздействовать на первую стадию пероксидажного процесса, в которой образуется Соединение I (E_1) при взаимодействии H_2O_2 с железо-протопорфирином IX:



Активирующее действие при пероксидажном окислении PDA уменьшается в последовательности: 5-аминотетразол > 2-аминотиазол > меламина > > тетразол, а при окислении TMB в ряду: 5-аминотетразол > меламина > 2-аминотиазол > тетразол (см. табл. 4). Учитывая, что сравниваются величины α при разных рН, а нуклеофильность активаторов растет с увеличением рН среды, можно считать, что ряд активаторов по их эффективности практически одинаков для обоих субстратов. Аномально выглядит большая активность тетразола в сравнении с АТ при пероксидажном окислении АВТС, которое существенно отличается от окисления PDA и TMB: отличия касаются не

только разных сайтов связывания ABTS и ароматических диаминов с активным центром ПХ, но и механизмов пероксидазного окисления ТМВ [19], с одной стороны, и ABTS [20] – с другой, на которых мы не останавливаемся, отсылая читателя к работам [19, 20].

Неожиданным и трудно объяснимым оказалось ингибирующее действие DAT на пероксидазное окисление всех трех субстратов, так как нуклеофильность этого соединения при $\text{pH} \geq 5.4$ не может вызывать сомнений. Уровень ингибирования при пероксидажном окислении с участием DAT не высок, но аномальный характер его влияния на процесс очевиден.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали пероксидазу хрена марки А с оптическим показателем чистоты RZ 2.4 (НПО “Биолар”, Латвия). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения в максимуме полосы Сорэ (403 нм), равный $102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [21]. В качестве окислителя применяли разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{230} 72.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [22].

В качестве восстанавливающих субстратов ПХ применяли ABTS в виде диаммониевой соли (Sigma, США), ТМВ (Serva, Германия) и PDA марки “ч. д. а.” Харьковского химико-фармацевтического завода (Украина) после его очистки возгонкой в вакууме.

Тетразол синтезировали по описанной ранее методике [23]. УФ-спектр тетразола в дистиллированной воде имел максимум поглощения на 206 нм ($\epsilon 150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), а в 0.06 М РСВ, pH 6.4 – на 218 нм ($\epsilon 8.3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5-Аминотетразолгидрат производства Реахим (Россия) очищали перекристаллизацией из воды. УФ-спектр АТ в дистиллированной воде имел максимум поглощения на 219 нм ($\epsilon 2400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), а в 0.06 М РСВ, pH 6.4 – на 225 нм ($\epsilon 1760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

1,5-Диаминотетразол получали по ранее описанной методике [24]. УФ-спектр DAT в дистиллированной воде имел максимум поглощения на 223 нм ($\epsilon 2580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); а в 0.06 М РСВ, pH 6.4 – на 228 нм ($\epsilon 2360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Использовали свежеперегнанный DMF, а также Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 и лимонную кислоту марки “х. ч.” производства Реахим (Россия) для приготовления РВ и РСВ. Исходные растворы буферов готовили в дистиллированной воде, растворы PDA, ABTS, Tetr, АТ, DAT, H_2O_2 – в РСВ или РВ, а растворы ТМВ – в DMF.

Спектрофотометрические измерения проводили при 20°C на спектрофотометре Spacol-211

Таблица 3. Влияние тетразола и АТ на кинетические характеристики пероксидазного окисления PDA (0.06 М РСВ, pH 6.4)

Активатор (А)	$[A]_0$, мМ	k_{cat} , с ⁻¹	$\alpha(k_{\text{cat}}) \times 10^{-3}$, М ⁻¹	$K_m \times 10^4$, М
Tetr	0	606		4.1
	0.4	800	0.8	5.41
	0.8	990	0.792	6.62
	1.2	1176	0.784	7.87
	3.0	1754	0.631	11.9
АТ	0	576		2.89
	0.2	1053	4.14	5.26
	0.4	1471	3.88	7.46
	0.8	2128	3.37	10.63
	3.0	3333	1.595	16.67

Таблица 4. Характеристики активации пероксидазного окисления хромогенных субстратов

Субстрат	Активатор	pH	$10^3 \alpha$, М ⁻¹	Литературный источник
ABTS	Тетразол	6.4	0.145*	**
	5-Аминотетразол	6.4	0.058*	**
PDA	5-Аминотетразол	6.4	4.14	**
	2-Аминотиазол	6.2	3.54	[7]
	Меламин	7.4	2.41	[6]
	Тетразол	6.4	0.80	**
ТМВ	poly(ADSSA)*	7.0	2.44	[5]
	5-Аминотетразол	7.2	3.57	**
	Меламин	7.4	2.12	[7]
	2-Аминотиазол	6.2–6.8	1.90	[7]
	Тетразол	7.2	0.54	**

* Коэффициент α получен только из зависимостей k_{cat} от концентрации активаторов.

** Результаты данной работы.

(Carl Zeiss, Германия) с термостатируемым кюветным отделением.

При исследовании пероксидазного окисления хромогенных субстратов реакцию начинали добавлением H_2O_2 (перед добавлением H_2O_2 смесь выдерживали 3 мин при 20°C) и в течение 1–2 мин регистрировали рост поглощения продукта окисления при соответствующей длине волны. Значения v_0 определяли по начальным, строго линейным участкам кинетических кривых.

За пероксидажным окислением ТМВ в присутствии тетразолов и без них следили при 655 нм

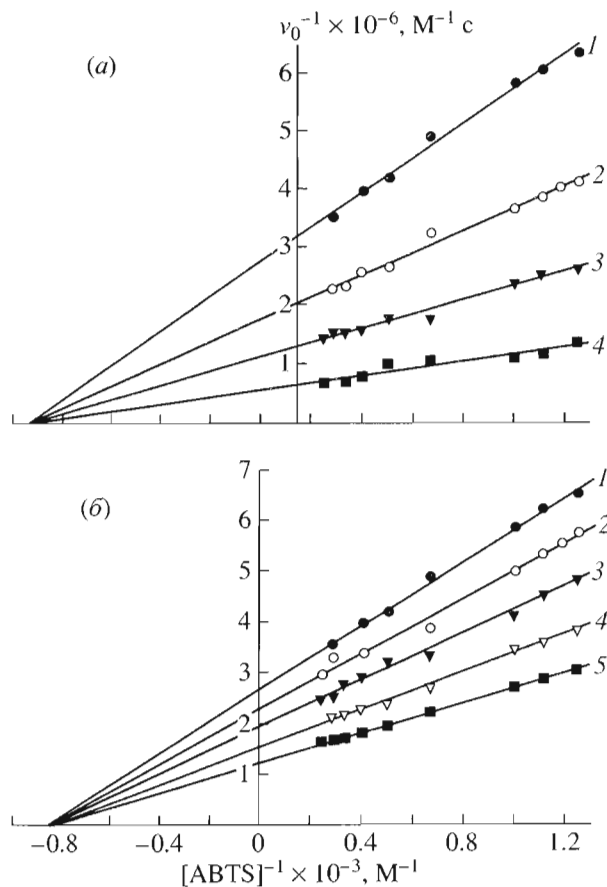


Рис. 6. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления от концентрации ABTS в двойных обратных координатах в отсутствие активаторов (1) и в присутствии 4 (2), 10 (3) и 20 mM Tetr (a) и 4 (2), 6 (3), 10 (4) и 20 (5) mM AT (б).

(ϵ 39000 $M^{-1}cm^{-1}$ [21]). Варьировали состав среды (0.06 M РСВ или РСВ), величину pH раствора (6.4 или 7.2), концентрацию ТМВ (0.05–1 mM), концентрацию тетразолов (0–2 mM). Во всех случаях реакционная смесь содержала 5% по объему DMF, концентрация H_2O_2 составляла 1.0 mM. Использовали ПХ в концентрации 0.6 нМ при pH 6.4 и 1 нМ при pH 7.2.

За пероксидазным окислением PDA в присутствии тетразолов и без них следили при 455 нм (0.06 M РСВ, pH 6.4, ϵ 16400 $M^{-1}cm^{-1}$ [25]). Варьировали концентрацию PDA (0.1–2 mM) и тетразолов (0–30 mM). Концентрация H_2O_2 составляла 2.0 mM, концентрация ПХ – 1 нМ.

За пероксидазным окислением ABTS в присутствии тетразолов и без них следили при 414 нм (0.06 M РСВ, pH 6.4, ϵ 31100 $M^{-1}cm^{-1}$ [26]). Варьировали концентрацию ABTS (0.8–5 mM) и тетразолов (0–50 mM). Концентрация H_2O_2 составляла 0.2 mM, концентрация ПХ – 2 нМ. При изучении влияния DMF на пероксидазное окисление ABTS в реакционную среду вводили 5% DMF.

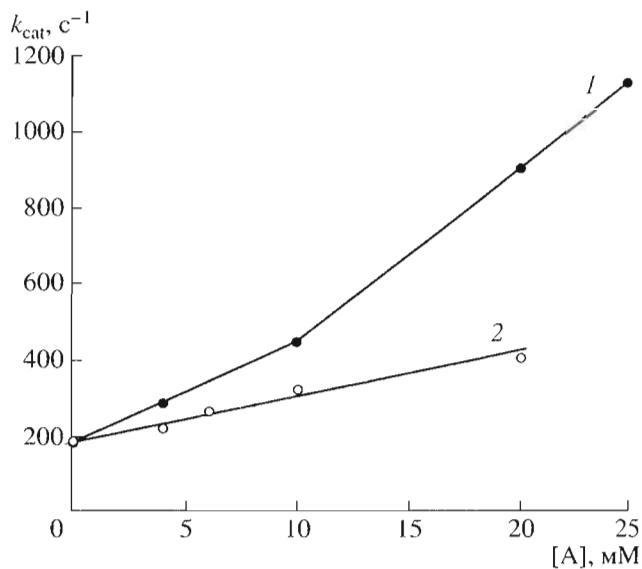


Рис. 7. Зависимости эффективных каталитических констант пероксидазного окисления ABTS от концентрации Tetr (1) и AT (2).

Очень важно отметить, что тетразолы в указанных условиях не являются субстратами пероксидазы, а их спектры поглощения не перекрываются с полосами поглощения продуктов окисления ТМВ, PDA и ABTS. Поэтому мониторинг продуктов пероксидазного окисления субстратов обеспечивал корректное определение начальных скоростей реакций во всех случаях.

Авторы благодарят С.В. Войтеховича (НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета) за помощь в приготовлении тетразолов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полак Дж., ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987. 74 с.
2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
3. Гаврилова Е.М., Дзантиев Б.Б., Осипов А.П. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 3. Неизотопные методы иммуноанализа. М.: ВИНТИ, 1987. С. 6–116.
4. Rubtsova M.Yu., Kovba G.V., Egorov A.M. // Biosensor and Bioelectronics. 1998. V. 13. P. 75–85.
5. Метелица Д.И., Карасева Е.И. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1265–1272.
6. Карасева Е.И., Наумчик И.В., Метелица Д.И. // Биоорганическая химия. 2003. Т. 29. С. 49–56.
7. Карасева Е.И., Наумчик И.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 66–75.
8. Fridovich I. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 3921–3928.
9. Claiborne A., Fridovich I. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 2327–2335.

10. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1372–1380.
11. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Курилина Т.А., Березин И.В. // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1577–1584.
12. Лебедева О.В., Домбровский В.А., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1978. Т. 43. С. 1024–1033.
13. Dolmanova I.F., Shekhovtsova T.N., Kutcheryaeva V.V. // Talanta. 1987. V. 34. P. 201–205.
14. Газарян И.Г. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов. М.: ВИНТИ, 1992. С. 4–54.
15. Ким Б.Б. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов. М.: ВИНТИ, 1992. С. 126–146.
16. Schuller D.J., Ban N., van Huystee R.B., Mc Pherson A., Poulos T.L. // Structure. 1996. V. 4. P. 311–321.
17. Gajede M., Henriksen A., Schuller D.J., Poulos T.L., Smith A.T. Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. Abst. IV Int. Symp. 1996, July 6–10, Vienna, Austria.
18. Газарян И.Т., Упоров И.В., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Мареева Е.А., Лагримини Л.М. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 708–715.
19. Josephy P.D., Eling T., Mason R.P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 3669–3675.
20. Rodrigez-Lopes J.N., Gilabert M.A., Tudela J., Thorneley R.N.F., Garcia-Canovas F. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 13201–13209.
21. Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. С. 116–124.
22. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Ленинград: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
23. Гапоник П.Н., Ивашкевич О.А., Красицкий В.А., Тузик А.А., Лесникович А.И. // Журн. общ. химии. 2002. Т. 72. С. 1546–1551.
24. Гапоник П.Н., Каравай В.П. // Химия гетероцикл. соед. 1984. № 12. С. 1683–1686.
25. Пучкаев А.В. Реакции пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы в неводных средах. Дис. ... канд. хим. наук. Минск: ИБХ НАН Беларуси, 1993. 197 с.
26. Re R., Pellegrini N., Pannala A., Yahg M., Rice-Evans C. // Free Radicals Biol. and Med. 1999. V. 26. P. 1231–1237.

The Effect of Tetrazole and Its Amino Derivatives on the Kinetics of Peroxidase Oxidation of Chromogenic Substrates

E. I. Karaseva*, P. N. Gaponik**, and D. I. Metelitsa**

Fax: 375 (172) 63-7274, e-mail: metelitsa@iboch.bas-net.by

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

**Faculty of Chemistry, Belarussian State University,
ul. Leningradskaya 14, Minsk, 220080 Belarus

The peroxidase-catalyzed oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), *o*-phenylenediamine (PDA), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was found to be activated by tetrazole and 5-aminotetrazole (AT) and weakly inhibited by 1,5-diaminotetrazole. The activating action of tetrazole and AT on the PDA and TMB oxidation was clearly discompetitive and that on ABTS was non-competitive. The coefficients (degrees) of activation α were determined for three substrates and two activators; they depended on the substrate type and the buffer nature and increased along with the pH growth from 6.4 to 7.2. For AT and tetrazole, the maximal α values were 4140 and 800 M⁻¹, respectively, upon the PDA oxidation and 3570 and 540 M⁻¹, respectively, upon the TMB oxidation. Lower α values (145 and 58 M⁻¹ for tetrazole and AT, respectively) were characteristic of the peroxidase oxidation of ABTS. The activation of peroxidase oxidation of the substrates by tetrazole and AT at pH \geq 5.4 was explained by the nucleophilic nature of the activators interacting with the amino acid residues in the peroxidase active site according to the mechanism of acid–base catalysis. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: 5-aminotetrazole, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), horseradish peroxidase, nucleophilic catalysis, peroxidase activation, *o*-phenylenediamine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, tetrazole