

УДК 543.55

О.В.Кислова, доц., канд.биол.наук
(КНУТД, Киев, Украина)

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИКАТОРА АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО СТАБИЛИЗАТОРА ФЕРМЕНТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ

Перспективным направлением развития электрохимических методов анализа является разработка и применение ферментативных биосенсоров. Главный компонент этих электронных аналитических устройств - биологический материал, который избирательно реагирует с исследуемым веществом. В результате этого взаимодействия генерируется электрический сигнал, пропорциональный концентрации аналита [1].

Принцип действия большинства электрохимических биосенсоров основан на окислительно-восстановительных реакциях ферментативного катализа, которые сопровождаются высвобождением или поглощением электронов. В этом случае субстрат или продукт ферментативной реакции может окисляться или восстанавливаться на электроде [2].

Биосенсоры позволяют быстро получать информацию о количестве различных веществ с высокой точностью. С их помощью можно контролировать качество технологических процессов и состояние окружающей среды, повышать точность медицинских анализов, оценивать состав пищевых продуктов. Основными преимуществами электрохимических биосенсоров являются высокая чувствительность и специфичность, широкий линейный диапазон измерений, простота использования, невысокая стоимость [1,2].

Среди большого числа ферментов широкое применение в аналитических методах исследования получили НАД⁺ - зависимые дегидрогеназы [1,2]. Электрохимический биосенсор на основе алкогольдегидрогеназы (АДГ, алкоголь : НАД⁺ - оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1) используют для определения концентрации этанола. Биологическая роль АДГ состоит в катализе процесса окисления спиртов с образованием альдегидов или кетонов с использованием в качестве кофактора реакции никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) [3].

При создании биосенсоров большое значение уделяется сохранению активности фермента в ходе его иммобилизации на поверхности электрода. Так, для успешной иммобилизации необходимо стабилизировать фермент и защитить функциональные группы его активного центра от ковалентного связывания с носителем и инактивации фермента. Для этого можно использовать обратимые ингибиторы ферментов. Основной целью данной работы было изучение влияния нового потенциального модификатора – замещенного бензамида - на активность АДГ.

Активность АДГ определяли спектрофотометрическим методом на приборе "Beckman DU-6" (США) при длине волны 340 нм при насыщающих концентрациях этанола или НАД^+ и выражали в нмоль $\text{НАДН} / (\text{мг белка} \cdot \text{мин})$ [4]. 2,4-дихлор-5-метилбензамид был синтезирован в Институте биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев. Для исследований использовали его раствор в диметилацетамиде в концентрациях 25-100 мкМ.

С точки зрения ферментативной кинетики реакция окисления спиртов является двухсубстратной (спирт и НАД^+) и протекает по упорядоченному механизму [3]. Присоединение НАД^+ приводит к изменению конформации фермента и способствует дальнейшему связыванию спирта. Использование обратимых ингибиторов активности АДГ дает возможность изменить кинетику ферментативной реакции и позволяет на некоторое время стабилизировать его структуру и минимизировать побочные реакции. В отличие от необратимых ингибиторов ферментов после полного удаления обратимых ингибиторов наблюдается образование эффективных фермент-субстратных комплексов и восстановление активности фермента.

Среди ряда исследованных производных амидов бензойной кислоты был обнаружен эффективный обратимый ингибитор активности АДГ - 2,4-дихлор-5-метилбензамид. Соединение уменьшало скорость реакции окисления этанола на 60%. Исследуемый амид обратимо взаимодействовал с ферментом, что подтверждалось стабилизацией активности АДГ в процессе преинкубации фермента с ингибитором после установления равновесия. В результате такого взаимодействия возникают нековалентные связи между модификатором и ферментом или фермент-субстратным комплексом. После удаления ингибитора фермент полностью восстанавливал свою активность.

Влияние замещенного бензамида на скорость ферментативной реакции определяли при постоянной концентрации одного из субстратов и переменных концентрациях другого.

Для углубленного анализа механизма взаимодействия фермента с ингибитором при насыщающих концентрациях НАД⁺ использовали графический метод Yoshino и Murakami [5] (рис.1). Графики зависимости относительной скорости ферментативной реакции от концентрации ингибитора при низких значениях концентрации спирта 1 мМ и 2 мМ проявляют неконкурентный характер с мнимой константой ингибирования 35 мкМ (прямые 1 и 2 на рис.1). Присоединение неконкурентного ингибитора изменяет конформацию молекулы фермента, нарушая взаимодействие субстрата с активным центром, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

При повышении концентрации спирта характер ингибирования изменялся на бесконкурентный (прямые 3 и 4 на рис.1). С увеличением концентрации субстрата наблюдается рост концентрации фермент-субстратного комплекса, а также усиливается связывание ингибитора с ним.

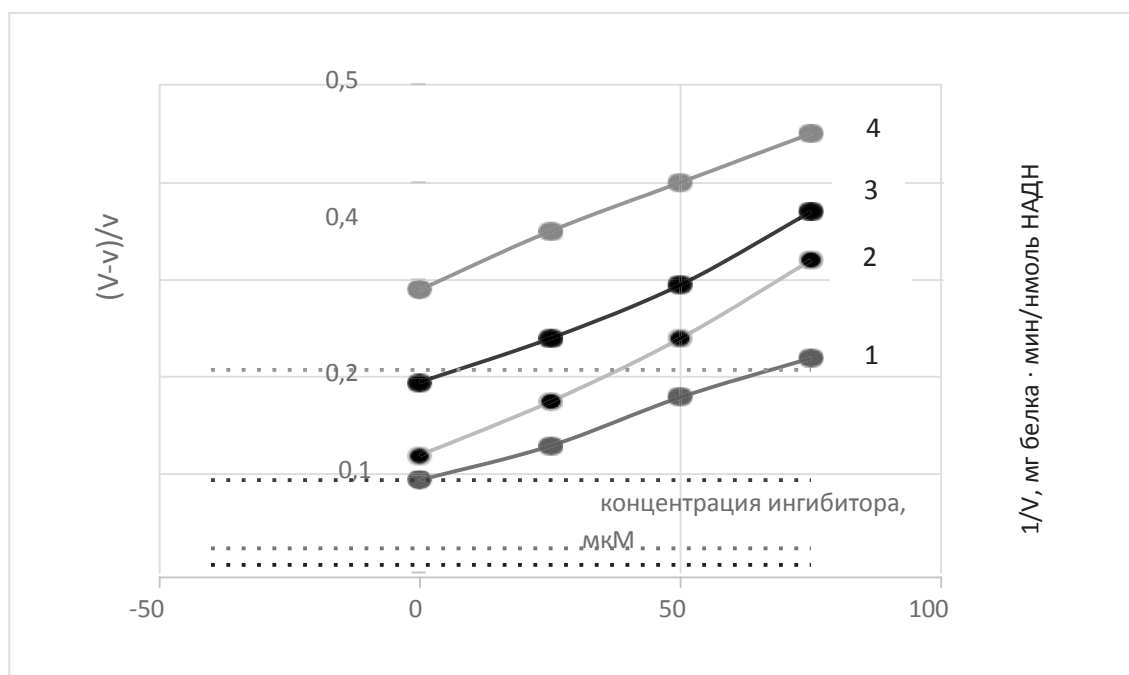


Рисунок 1 - Зависимость скорости АДГ реакции от концентрации 2,4- дихлор-5-метилбензамид при концентрациях этанола 1, 2, 4, 8 мМ для прямых 1-4 соответственно при насыщающих концентрациях НАД⁺ по методу Yoshino - Murakami.

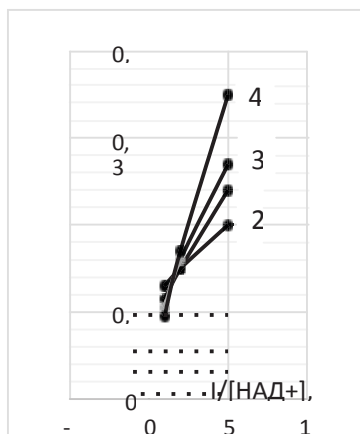


Рисунок 2 - Зависимость скорости АДГ реакции от концентрации НАД⁺ в присутствии 2,4-дихлор-5-метилбензамид в концентрациях 0, 12,5, 25, 50 мкм для прямых 1-4 соответственно при насыщающих концентрациях этанола по методу Lineweaver - Burk.

При насыщающих концентрациях этанола и изменении концентрации НАД⁺ наблюдалось псевдоингибирование (рис.2). Такой тип ингибирования характерен для сложных многосубстратных реакций. При этом ингибитор взаимодействует с ферментом на участке, который не является активным центром. Он может связываться или с ферментом, или фермент-субстратным комплексом, образуя неактивный комплекс, и нарушает взаимодействие субстрата с активным центром фермента.

Выводы. Определение концентрации спиртов с помощью биосенсоров основано на биоэлектроокислении этанола НАД⁺ - зависимой алкогольдегидрогеназой. Одной из проблем при разработке данного типа биосенсоров является потеря каталитической активности фермента в процессе иммобилизации и нестабильность активного комплекса АДГ- НАД⁺ на поверхности электрода.

Исследованный замещенный бензамид является обратимым ингибитором активности АДГ и уменьшает скорость реакции окисления этанола на 60%. Удаление ингибитора приводит к восстановлению активности фермента. Проведенные кинетические исследования показали, что ингибитор связывается преимущественно с фермент - субстратным комплексом и в условиях *in vitro* стабилизирует его. Дальнейшие исследования будут связаны с изучением влияния 2,4-дихлор-5-метилбензамида на активность АДГ в процессе

иммобилизации в качестве компонента электродной массы для электрохимического биосенсора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuswandi B, Ahmad M. Recent progress in alcohol biosensors // Alcohol. – 2014. – 18;2(1). – P. 1-8.
2. Salimi F., Negahdary M., Mazaheri G., Akbari-Dastjerdi H., Ghanbari- kakavandi Y., Javadi S. A novel alcohol biosensor based on alcohol dehydrogenase and modified electrode with ZrO₂ Nanoparticles. // Int. J. Electrochem. Sci. – 2012. – V. 7, 3. – P. 7225 – 7234.
3. Plapp B. V. Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – V. 493. – P. 3–12.
4. Walker JRL. Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH) // Biochemical Education. – 1992. – V. 20, Issue 1. – P. 42-43.
5. Yoshino M., Murakami K. A graphical method for determining inhibition constants // J. of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, – 2009. – V.24. 6. – P. 1288–1290.