

УДК 543.062.088.8

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ БУФЕРНОГО РАСТВОРА НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ИЗ ТОНКОЙ КИШКИ ГРЕНЛАНДСКОГО ТЮЛЕНЯ И ЕЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ ЦИНКА(II)

А.М. Жаворонкова, С.В. Мугинова, Т.Н. Шеховцова

(кафедра аналитической химии; e-mail: shekhov@analyt.chem.msu.ru)

Установлена зависимость каталитической активности щелочной фосфатазы из тонкой кишки гренландского тюленя в реакции гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, проводимой в буферных растворах различной природы (боратном, карбонатном, трис, глициновом), от их концентрации и рН среды. Исследована зависимость степени и селективности ингибирования фермента в неорганических и органических буферных растворах ионами цинка от их концентрации и присутствия посторонних ионов металлов. Показано, что наиболее перспективным для разработки чувствительной и селективной методики определения цинка(II) по его ингибирующему действию на фермент является боратный буферный раствор.

Буферный раствор – необходимый компонент любой биохимической реакции, чувствительной даже к незначительным изменениям рН среды. В ферментативных процессах компоненты буферных систем могут взаимодействовать с ферментом, субстратом, а также с ингибиторами и активаторами биокатализатора. Природа буферного раствора играет важную роль в разработке ферментативных методов определения металлов по их действию на ферменты или апоферменты.

До настоящего времени в практике химического анализа использовали преимущественно щелочные фосфатазы из кишечника телят и цыпленка. На основе ингибирующего или реактивирующего действия ионов металлов (свинца(II), цинка(II)) на каталитическую активность этих фосфатаз разработаны высокочувствительные и довольно селективные ферментативные методики их определения [1–3]. Щелочная фосфатаза, выделенная из тонкой кишки гренландского тюленя *Phoca Groenlandic*, наименее изучена с аналитической точки зрения.

Данная работа посвящена изучению влияния природы буферного раствора на каталитическую активность щелочной фосфатазы из тонкой кишки гренландского тюленя в реакции гидролиза *n*-нитрофенилфосфата с целью выбора буферной системы, оптимальной для разработки ферментативного метода определения цинка(II) – кофактора этого фермента.

Экспериментальная часть

Реагенты. Щелочную фосфатазу из тонкой кишки гренландского тюленя *Phoca Groenlandica* (далее щелочная фосфатаза из кишки тюленя) с активностью 13 уд. ед./мг (НПО “Биолар”, Латвия) использовали в виде гомогенного раствора в 2,5 М растворе сульфата аммония. Рабочие растворы фермента готовили непосредственно перед опытом последовательным разбавлением исходного 0,05 М трис-НСl-буферным раствором (рН 9,8).

Препарат шестиводной динатриевой соли *n*-нитрофенилфосфата (*n*-НФФ) производства фирмы “Sigma” (США) использовали без дополнительной очистки. Рабочие растворы субстрата готовили ежедневно растворением точной навески препарата в воде. Растворы фермента, а также препарат *n*-НФФ и его растворы хранили в холодильнике при 4°.

Использовали препараты трис(оксиметил)аминометана “ч.д.а.” (“Serva”, Германия), глицина “ос.ч.” (“Sigma”, США), а также тетрабората натрия и карбоната натрия “ч.д.а.” (“Реахим”, Москва), дважды перекристаллизованные из воды. Боратный, карбонатный, глициновый и трис-НСl-буферные растворы готовили, как описано в работе [4].

Исходные растворы цинка(II) с концентрацией 1,5 мг/мл готовили растворением точных навесок спектрально чистых металлов в НСl “ос.ч.”. Исходные растворы Со(II), Сu(II), Ni(II), Cd(II) (1,5 мг/мл) готовили растворением точных навесок их хлоридов

“ос.ч.” в воде, подкисленной HCl “ос.ч.” до установления pH 2,5. Растворы с меньшим содержанием ионов металлов готовили ежедневно последовательным разбавлением исходных растворов подкисленной водой. Для приготовления рабочих растворов $MgCl_2$ в качестве исходного использовали его стандартный раствор с концентрацией 200 мг/мл (“Sigma”, США). Исходный раствор (25 мг/мл) $CaCl_2$ готовили растворением точной навески $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ “ос.ч.” в воде. Растворы KCl и CsCl (160 и 400 мг/мл, соответственно) готовили по точным навескам этих солей “ос.ч.”

Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду, очищенную на установке “Millipore” (Франция).

Градуированные стеклянные пробирки с притертыми пробками предварительно очищали концентрированной HNO_3 “ос.ч.”, обрабатывали паром в течение 15 мин и тщательно промывали деионизованной водой.

Скорость щелочного гидролиза *n*-НФФ контролировали спектрофотометрически, регистрируя нарастание оптической плотности реакционной смеси во времени при $\lambda_{\text{эф}} = 400$ нм ($l = 1$ см, в качестве раствора сравнения использовали воду), соответствующей полосе максимального поглощения образующегося *n*-нитрофенолят-иона. Абсолютное значение начальной скорости ферментативной реакции (v_0 , мкМ/мин) рассчитывали по формуле:

$$v_0 = \Delta C / \Delta t = \Delta A / \Delta t (1/\epsilon) = \text{tg} \alpha / l \epsilon,$$

где C – концентрация *n*-нитрофенолята натрия (М), ϵ – молярный коэффициент поглощения последнего при 400 нм ($1,7 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [5], l – толщина кюветы (1 см), $\text{tg} \alpha$ – среднее значение тангенса угла наклона кинетических кривых, построенных в координатах оптическая плотность (A_{400}) – время (t , с) ($n = 5$).

Степень ингибирования щелочной фосфатазы ионами цинка(II) и других металлов (I , %) рассчитывали по формуле: I (%) = $100\% \cdot (v_0 - v_1) / v_0$, где v_0 и v_1 – начальные скорости индикаторной реакции в отсутствие и в присутствии иона металла соответственно. Относительную активность фермента (v_1/v_0) определяли, используя значения начальных скоростей.

Аппаратура. Оптическую плотность растворов измеряли на КФК-2 (Россия, $\lambda_{\text{эф}} = 400$ нм, $l = 1$ см). Измеряли pH водных растворов с точностью $\pm 0,005$ при помощи pH-метра иономера “Эконикс-Эксперт-001”, Россия.

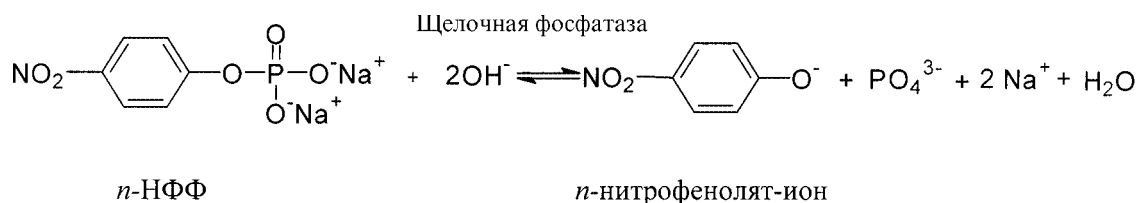
Методика эксперимента по изучению влияния природы буферного раствора (А) или ионов металлов (Б) на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя. В градуированную стеклянную пробирку с притертой пробкой

последовательно вводили 4,9 (А) или 4,8 (Б) мл буферного раствора (с определенными значениями pH и разными концентрациями), 0,1 мл 0,6 мкМ раствора фермента, 0,1 мл раствора иона металла в определенном интервале концентраций (Б), 1 мл раствора *n*-НФФ с соответствующей концентрацией. В момент введения последнего реакционный раствор перемешивали и переносили в кювету, одновременно включая секундомер. Оптическую плотность реакционного раствора измеряли каждые 15 с в течение 2 мин ($\lambda_{\text{эф}} = 400$ нм, $l = 1$ см). По полученным данным строили кинетические кривые в координатах оптическая плотность (А) – время (t , с) и рассчитывали величину v_0 (в отсутствие иона металла) или v_1 (в присутствии иона металла). По полученным данным рассчитывали степень ингибирования фермента (I , %) ионом металла.

Результаты и их обсуждение

Щелочные фосфатазы проявляют каталитическую активность при $\text{pH} > 7$, однако буферных систем, способных поддерживать постоянное значение pH в щелочной области, известно не так много. К ним относятся неорганические буферные растворы: боратный (pH 9,3–10,7), карбонатный (pH 9,2–10,8); органические: трис-HCl-буферный раствор (pH 7,2–10,2), глициновый (pH 8,6–10,6), диэтанолламин-HCl (pH 8,8–10,0) и веронал (pH 6,8–9,6) [4].

При работе со щелочными фосфатазами бактериального и животного происхождения чаще других используют трис-HCl-буферный раствор. Его применяют как для приготовления растворов фосфатаз, так и для проведения индикаторных реакций с участием различных субстратов [5]. Трис(оксиметил)аминометан (Трис), основной компонент трис-HCl-буферного раствора, выступает в роли акцептора фосфата [6]. Фосфат-ионы являются не только продуктом реакции гидролиза моноэфиров ортофосфорной кислоты, катализируемой щелочной фосфатазой, но и конкурентным ингибитором этого фермента. Кроме того, на примере щелочной фосфатазы из *E. coli* показано, что использование 1 М трис-HCl-буферного раствора подавляет диссоциацию активных димерных молекул фермента на неактивные мономеры, что способствует проявлению высокой каталитической активности биокатализатора [7]. Все вышесказанное обосновывает широкое использование трис-HCl-буферного раствора в биохимических исследованиях с участием щелочных фосфатаз различного происхождения. Следует отметить, что этот же буферный раствор применяли и авторы единичных публикаций, посвященных изучению строения и некоторых физико-химических



свойств щелочной фосфатазы из кишки тюленя [8–10]. До настоящего времени не проводили систематического изучения каталитической активности указанного фермента в различных буферных растворах.

Влияние природы буферного раствора на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя (в отсутствие и в присутствии цинка(II)) было изучено нами на примере четырех буферных систем – неорганической (боратный и карбонатный) и органической (трис-НСI, глициновый) природы. При выборе буферных растворов руководствовались литературными сведениями о применении различных буферных систем в биохимических исследованиях, а также данными о различной способности компонентов буферных растворов к взаимодействию с ионами металлов и в особенности с цинком(II); кроме того, принимали во внимание доступность компонентов буферных растворов.

В качестве индикаторной для контроля каталитической активности щелочной фосфатазы в выбранных буферных системах использовали реакцию гидролиза *n*-нитрофенилфосфата (*n*-НФФ), в результате которой

при pH>7 образуется окрашенный продукт – *n*-нитрофенолят-ион [11] (схема).

Полоса максимального поглощения водных растворов *n*-нитрофенолят-иона лежит в интервале длин волн 380–420 нм. Выбор данной индикаторной системы обусловлен тем, что ранее при изучении субстратной специфичности щелочной фосфатазы из кишки тюленя авторы работы [8] показали, что использование именно *n*-НФФ в качестве субстрата обеспечивает максимальную скорость ферментативной реакции в трис-НСI-буферном растворе.

С целью выяснения условий, при которых каталитическая активность фермента в каждом из выбранных буферных растворов максимальна, были изучены зависимости скорости индикаторной реакции от pH реакционной среды, а также от концентрации буферных растворов и *n*-НФФ. Работу проводили по методике, описанной в экспериментальной части.

В разных буферных растворах фермент проявляет наибольшую каталитическую активность практически в одном и том же диапазоне pH, но при разных

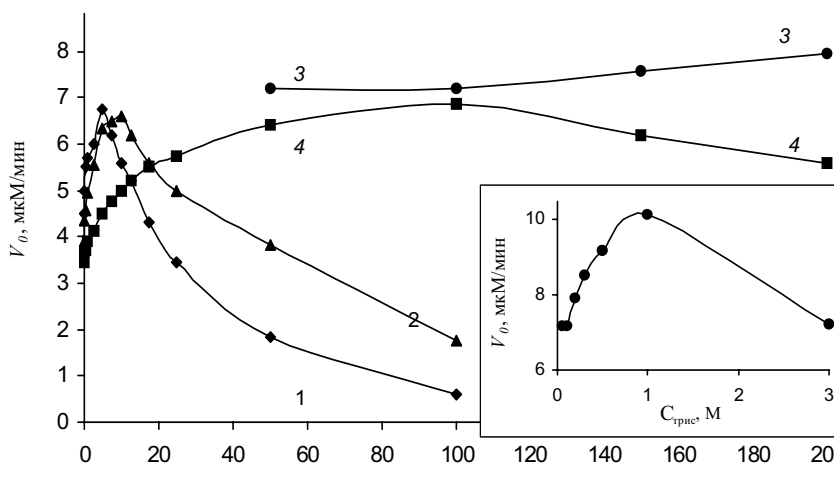


Рис. 1. Зависимости скорости гидролиза *n*-НФФ, катализируемого щелочной фосфатазой из кишки тюленя, от концентрации боратного (1), карбонатного (2), трис-НСI (3), глицинового (4) буферных растворов (концентрация фермента 10 нМ, концентрация *n*-НФФ 0,55 мМ)

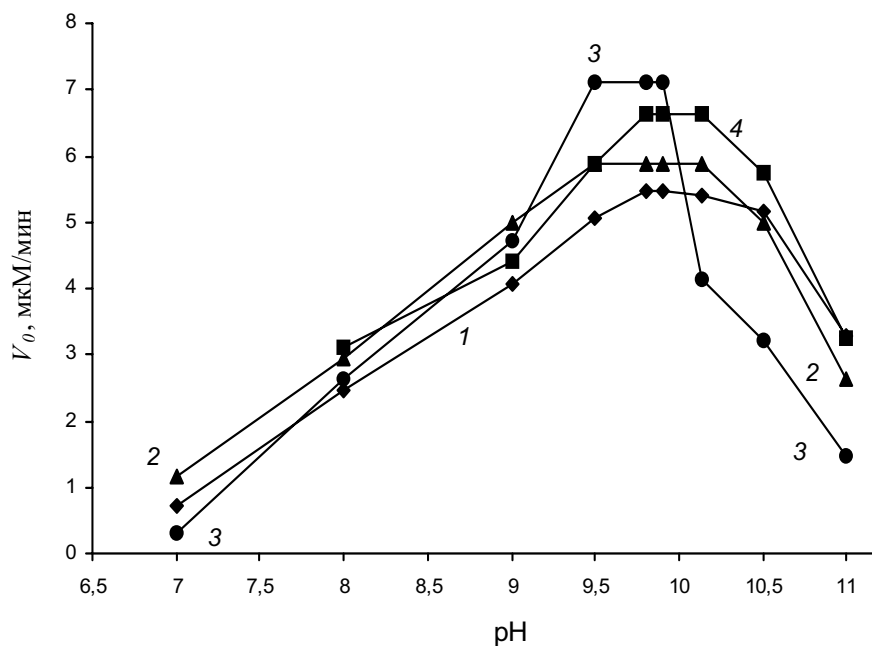


Рис. 2. Зависимости скорости гидролиза *n*-НФФ, катализируемого щелочной фосфатазой из кишки тюленя, от pH боратного (1), карбонатного (2), *трис*-НСl (3), глицинового (4) буферных растворов (концентрация фермента 10 нМ, концентрация *n*-НФФ 0,55 мМ)

Таблица 1

Оптимальные условия проведения реакции гидролиза *n*-НФФ, катализируемой щелочной фосфатазой из кишки тюленя (10 нМ), и константы Михаэлиса в различных буферных растворах

Буферный раствор	Концентрация буферного раствора, М	pH	$C(n\text{-НФФ})$, мМ	$K_{\text{м}}$, мкМ
Боратный	0,005	9,8–10	$\geq 0,25$	71,4
Карбонатный	0,01	9,8–10	$\geq 0,25$	71,4
Трис–НСl	0,05	9,5–9,8	$\geq 0,25$	34,5
Глициновый	0,1	9,5–10	0,25–0,55	38,5

концентрациях раствора (рис. 1, 2, табл. 1). При концентрациях буферных растворов, указанных в табл. 1, и при pH 9,8 детально изучена зависимость скорости индикаторной реакции от концентрации *n*-НФФ (рис. 3). При концентрации более 0,25 мМ полученные кривые выходят на плато, и далее скорость ферментативной реакции практически не зависит от количества вводимого субстрата.

С помощью данных, представленных на рис. 3, были построены зависимости в координатах Лайнуивера–Берка ($1/v_0 - 1/S$) и рассчитаны константы Михаэлиса, характеризующие сродство фермента к

субстрату в различных буферных системах. Из табл. 1 видно, что сродство фермента к субстрату в органических буферных растворах выше, чем в неорганических.

Таким образом, проведенное исследование показало, что независимо от природы буферного раствора оптимальные условия проведения реакции гидролиза *n*-НФФ, катализируемой щелочной фосфатазой из кишки тюленя, остаются одними и теми же: фермент проявляет максимальную каталитическую активность при pH $\approx 9,8$ и при одинаковой концентрации субстрата. Однако оптимальные концентрации буферных

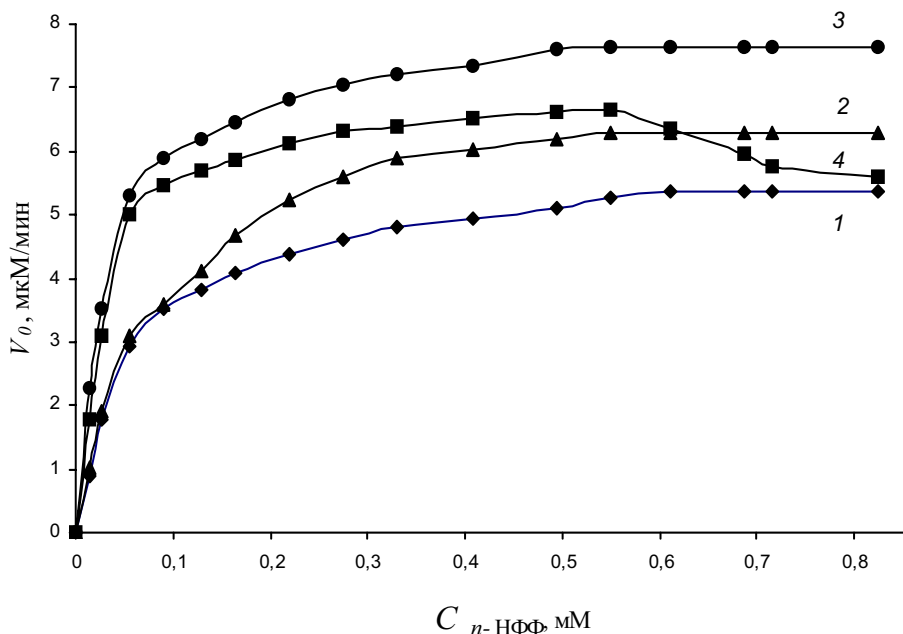


Рис. 3. Зависимости скорости гидролиза *n*-НФФ, катализируемого щелочной фосфатазой из кишки тюленя, от концентрации субстрата в боратном (1), карбонатном (2), *трис*-HCl (3), глициновом (4) буферных растворах (концентрация щелочной фосфатазы 10 нМ)

Т а б л и ц а 2

Концентрации цинка(II), при которых степень ингибирования составляет 50 % (I_{50} , %), и константы устойчивости комплексных соединений цинка(II) с компонентами буферных растворов

Компонент буферного раствора (L)	Концентрация Zn(II) при (I_{50} , %), мкг/мл	$\lg\{Zn-L\}$ [4]
Тетраборат-ион	0,04	—*
Карбонат-ион	0,25	3,9
Трис	1,5	7,6
Глицин	2,2	9,2

*Литературные сведения отсутствуют.

растворов различны: оптимальная концентрация тетрабората натрия в 10 и 20 раз меньше концентрации Трис и глицина соответственно. Было изучено влияние на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя в различных буферных растворах ионов цинка и ряда других металлов (Mg(II), Ce(II), K⁺, Cs⁺, Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II)). Выбор ионов металлов был обусловлен следующими причинами. Ионы щелочно-земельных металлов, в особенности магний и кальций, как правило, необходимы для проявления каталитической активности щелочных фосфатаз и часто усиливают действие их активаторов и ингибиторов [12]. Ионы калия часто присутствуют в физиологических растворах и активируют многие

ферментативные процессы. Ионы цезия совместно с ионами магния способны повышать чувствительность и экспрессность иммуноферментного определения самой щелочной фосфатазы [13]. Ионы кобальта, никеля, кадмия и меди имеют близкие к ионам цинка ионные радиусы и эффективные заряды и могут мешать его определению ферментативным методом [14].

Влияние указанных выше ионов металлов на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя во всех буферных растворах было изучено при установленных нами оптимальных условиях проведения индикаторной реакции (табл. 1). Обнаружено, что цинк(II) ингибирует фермент в исследуемых

Т а б л и ц а 3

Влияние ионов металлов на активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя (ЩФ) в различных буферных растворах в присутствии цинка(II) (оптимальные концентрации (мкг/мл): Zn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II) – 1 (мг/мл): Mg(II) – 0,02, Ca(II) – 0,04, K⁺ – 7, Cs⁺ – 70)

Состав реакционной смеси	Активность фермента, %			
	5 мМ боратный	М карбонатный	0,05 М трис-НСl	0,1 М глициновый
ЩФ	100	100	100	100
ЩФ+Zn	40±1	20±2	55±1	88±2
ЩФ+Zn+Co (Cu, Ni, Cd)	38±2	20±2	50±2	88±1(Co), 91±2(Cu) 87±3(Ni), 81±2(Cd)
ЩФ+Co (Cu, Ni, Cd)+Zn	41±1	21±2	50± 2	82±3(Co), 90±1(Cu) 85±2(Ni), 76±3(Cd)
ЩФ+Ca+Zn	45±1	25±1	71±1	97±2
ЩФ+Zn+Ca	42±3	23±1	70±2	98±1
ЩФ+Mg+Zn	43±1	24±4	70±1	97±1
ЩФ+Zn+Mg	41±3	23±4	70±1	94±3
ЩФ+Zn+Cs	51±3	37±4	77±2	92±2
ЩФ+Cs+Zn	54±1	32±2	78±1	94±2
ЩФ+K+Zn	57±2	33±4	71±2	99±1
ЩФ+Zn+K	58±1	37±1	72±2	97±2

буферных системах в различных диапазонах его концентраций (рис. 4). В неорганических (боратном и карбонатном) буферных растворах ингибирующее действие цинка(II) начинает проявляться при более низких его концентрациях (табл. 2) и в значительно большей степени (рис. 4, кривые 1 и 2). Наименее благоприятным буферным раствором для проявления ингибирующего действия цинка(II) является глициновый, в котором для достижения той же степени ингибирования, что и в боратном буферном растворе (~90 %), требуется почти в 2 раза большая концентрация цинка. При одной и той же (1 мкг/мл) концентрации цинка(II) степени ингибирования фермента в карбонатном и глициновом буферах различаются в 4 раза (табл. 3). Очевидно, это связано с тем, что равновесная концентрация иона металла в неорганических

буферных растворах выше, чем в органических (особенно глициновом), способных образовывать устойчивые комплексы с цинком(II) (табл. 2). Выход всех кривых зависимости на насыщение при концентрации цинка(II) ≥ 5 мкг/мл можно объяснить, на основании литературных данных, насыщением связывающих цинк центров фермента ионами данного металла при достаточно высоком его содержании в реакционной смеси.

Таким образом, результаты данного этапа исследования свидетельствуют о том, что в неорганических (боратном и карбонатном) буферных растворах можно определить цинк(II) по ингибирующему действию на щелочную фосфатазу из кишки тюленя с большей чувствительностью, чем в органических буферных растворах.

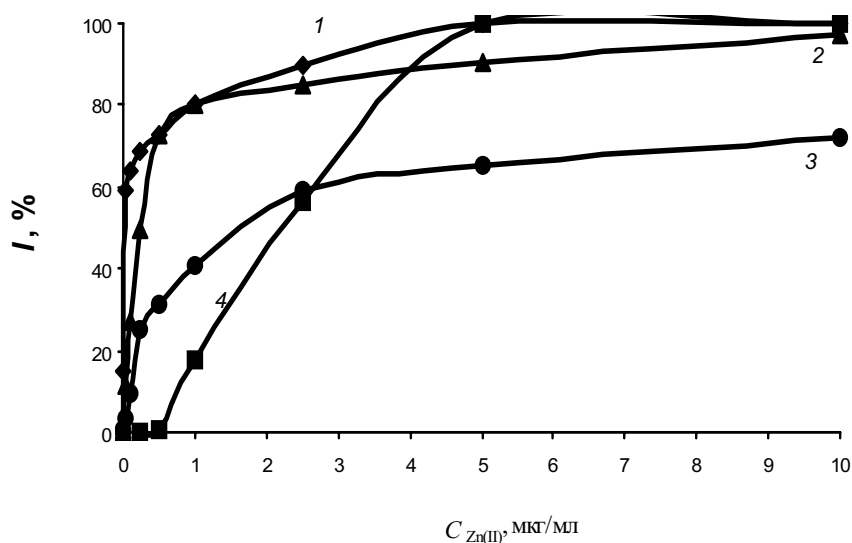


Рис. 4. Зависимость степени ингибирования (I , %) щелочной фосфатазы из кишки тюленя от концентрации цинка(II) в боратном (1), карбонатном (2), *трис*-НСl (3), глициновом (4) буферных растворах (оптимальные условия проведения индикаторной реакции)

Изучение зависимости скорости индикаторного процесса в присутствии цинка(II) от pH буферных растворов и времени инкубирования цинка(II) с ферментом показало, что различие в значениях скоростей ферментативного процесса в отсутствие и в присутствии цинка(II) максимально в области pH 9,5–9,8. От времени инкубирования цинка(II) с ферментом степень его ингибирующего действия не зависит.

Кроме того, нами установлено, что в исследуемых буферных растворах ионы магния, кальция, калия, цезия при концентрациях $\geq 0,02$; $0,04$; 7 и 70 мг/мл соответственно, а ионы кобальта, кадмия, никеля и меди при концентрациях ≥ 1 мкг/мл не влияют на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя.

Следующим этапом работы было исследование совместного влияния цинка(II) и других ионов металлов, которое проводили при различных порядках смешивания компонентов индикаторного процесса и концентрациях, указанных в табл. 3. Реагенты смешивали в порядке записи, а далее поступали согласно методике, описанной в экспериментальной части.

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что в неорганических буферных растворах ионы металлов (за исключением ионов калия и цезия) вне зависимости от последовательности их введения в индикаторный процесс не влияют на степень ингибирующего действия цинка(II). Активность фермента, ингибированного цинком(II), несколько возрастает (на $\sim 15\%$) только при введении ионов калия

или цезия в концентрациях, значительно превышающих концентрацию цинка(II). Вероятно, это связано с возрастанием ионной силы раствора [12].

При введении кобальта(II), никеля(II), меди(II) или кадмия(II) совместно с цинком(II) в индикаторную систему в *трис*-НСl-буферном растворе ингибирующее действие цинка(II) изменяется очень незначительно; в присутствии ионов щелочных и щелочно-земельных металлов активность фосфатазы значительно возрастает. В глициновом буфере активность фермента несколько падает при введении одновременно с ионами цинка ионов кобальта и практически полностью восстанавливается в присутствии ионов щелочных и щелочно-земельных металлов (табл. 3).

Таким образом, проведение индикаторной реакции в неорганических буферных растворах обеспечивает значительно более высокую селективность определения цинка(II) по его ингибирующему действию на щелочную фосфатазу из кишки тюленя. Наиболее перспективным для определения цинка(II) оказалось использование боратного буферного раствора, в котором щелочная фосфатаза проявляет наибольшую избирательную чувствительность к ингибирующему действию цинка(II).

Обнаруженное нами ингибирующее действие цинка(II) на щелочную фосфатазу из кишки тюленя было положено в основу ферментативной методики его определения в интервале концентраций $0,01$ – $0,1$ мкг/мл. Уравнение градуировочного графика имеет вид:

$$y = 1,34 - 4,58x,$$

где $y = v_0$ (мкМ/мин), $x = pC_{Zn(II)}$ (мкг/мл); $r = 0,9939$, $s_r = 0,14$ при $0,01$ мкг/мл ($n = 5$, $P = 0,95$).

Методика определения цинка(II)

В градуированную стеклянную пробирку с притертой пробкой последовательно вводили 4,8 мл 5 мМ боратного буферного раствора (рН 9,8), 0,1 мл 0,6 мкМ раствора щелочной фосфатазы, 0,1 мл раствора металла соответствующей концентрации. В последнюю очередь добавляли 1 мл 3,3 мМ раствора *n*-НФФ. Реакционную

смесь перемешивали, включая секундомер. Измерение оптической плотности проводили каждые 15 с в течение 2 мин ($\lambda_{эф} = 400$ нм, $l = 1$ см).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о влиянии природы буферного раствора на условия проявления каталитической активности щелочной фосфатазы из тонкой кишки гренландского тюленя, а также на степень и селективность ингибирующего действия на нее ионов кофактора – цинка(II).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Townshend A., Vaughan A. // *Talanta*. 1969. **16**. P. 929.
2. Townshend A., Vaughan A. // *Talanta*. 1970. **17**. P. 289.
3. Шеховцова Т.Н., Кучеряева В.В., Долманова И.Ф. // *ЖАХ*. 1985. **28**. С. 1810.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика М., 1991.
5. Fernley H.N. // *The enzymes*. N.Y., 1971. **4**. P. 417.
6. Barrett H., Butler R., Wilson I.B. // *Biochem*. 1969. **8**. P. 1042.
7. Hofstee V.H.J. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1955. **59**. P. 352.
8. Сахаров И.Ю., Макарова И.Е., Ермолин Г.А. // *Биохимия*. 1988. **53**. С. 974.
9. Sakharov I.Yu., Makarova I.E., Ermolin G.A. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1988. **90B**. P. 709.
10. Sakharov I.Yu., Makarova I.E., Ermolin G.A. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1989. **92**. P. 119.
11. Спиро Т.Г. // *Неорганическая биохимия* / Под ред. Г. Эйхгорна. М., 1978. С. 624.
12. Reid T.W., Wilson I.B. // *The enzymes*. N.Y., 1971. **4**. P. 373.
13. Miki Y., Toshima N., Tanaka K. // *Jpn. Kohai Tokkyo Koho*. JP 10042896 A2. Patent CA. 1998.
14. Крупяно В.И. // *Биохимия*. 1988. **53**. С. 905.
15. Hapold F.C., Beeckey R.B. // *Abstr. 15-th Biochem. Society symposium*. Great Britain. Leeds. 1958. P. 52.

Поступила в редакцию 10.09.02

EFFECT OF THE BUFFER SOLUTION NATURE ON THE CATALYTIC ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM SEAL SLIM INTESTINE AND ITS SENSITIVITY TO THE ZINC(II) ACTION

A.M. Zhavoronkova, S.V. Muginova, T.N. Shekhovtsova

(Division of Analytical Chemistry; e-mail: shekhov@analyt.chem.msu.ru)

The dependence of the catalytic activity of alkaline phosphatase from seal slim intestine in the reaction of hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate in buffer solutions of various nature (borate, carbonate, tris, glycine) on their concentration and pH, was stated. The dependence of the degree and selectivity of the enzyme inhibition with zinc(II) in inorganic and organic buffer solutions on its concentration and presence of other metal ions, was studied. It has been shown that the most perspective buffer solution for the development of a sensitive and selective procedure for zinc(II) determination based on its inhibitory effect on the enzyme is borate buffer.