



УДК 541.182:577.152.11[083.3+03]

**КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ С ПРОГЕСТЕРОНОМ В ВОДНЫХ И МИЦЕЛЛЯРНЫХ СРЕДАХ В ПРИСУТСТВИИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ПРОГЕСТЕРОНА***Ермин А. Н., Метелица Д. И.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

По реакции пероксидазы хрена с N-оксисукцинимидным эфиром 3-О-карбоксиметиллоксима прогестерона при 22 и 41°С получены конъюгаты фермента E-PRG-1 и E-PRG-2. Изучено взаимодействие этих конъюгатов и немодифицированной пероксидазы с антителами против прогестерона в фосфат-цитратном буфере с pH 3,6 и обращенных мицеллах Аэрозоль OT и Тритона X-45 в гептане. Показано, что в буферном растворе и обращенных мицеллах наблюдается рост каталитической активности при взаимодействии конъюгатов с антителами. Свободный прогестерон в обращенных мицеллах конкурирует с конъюгатом E-PRG-1 за связывание с антителами, что может быть положено в основу гомогенного иммуноферментного анализа прогестерона, зависящего от состава мицелл, концентрации антисыворотки и температуры.

Специфические и неспецифические белок-белковые взаимодействия в течение многих лет вызывают повышенный интерес исследователей [1, 2]. Особое место в этой проблеме занимают реакции антигенов с антителами, так как эти процессы важны в иммуноцитохимии [3] и иммуноферментном анализе [4]. В иммуноферментном анализе наиболее часто в качестве фермента-маркера применяют пероксидазу из хрена (КФ 1.11.1.7). Важно, чтобы конъюгаты пероксидазы с антигенами сохраняли свои каталитические свойства и иммунореактивность в условиях анализа. Так как качество иммуноферментного анализа существенно зависит от эффективности взаимодействия антител с антигеном, меченым ферментом, важно знать, как и в какой степени это взаимодействие в разных условиях сказывается на каталитических свойствах конъюгатов ферментов с антигеном.

Чтобы ответить на эти вопросы, мы изучили особенности взаимодействия антител против прогестерона (анти-PRG) с конъюгатами пероксидазы с прогестероном (E-PRG) и его влияние на каталитическую активность конъюгатов в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ (ПАВ) в гептане и водных растворах. Необходимость исследования взаимодействия антигена с антителом в обращенных мицеллах ПАВ продиктована потребностью в иммуноферментном анализе нерастворимых или трудно-растворимых в воде соединений.

Мы использовали конъюгаты пероксидазы с прогестероном двух типов — E-PRG-1 и E-PRG-2, содержащие 12 и 6 молекул стероида на молекулу фермента соответственно (см. «Экспериментальную часть»). Условия синтеза этих конъюгатов различаются используемыми концентрациями модифицированного прогестерона и диметилформамида и температурой процесса. Доступность боковых функциональных групп белка в пероксидазе сильно зависит от температуры [5]. При 20°С в растворитель экспонированы четыре остатка лизина, а 40°С — шесть остатков. Можно ожидать, что синтез E-PRG при комнатной температуре и 41°С даст конъюгаты с разным числом молекул связанного прогестерона. Как следствие этого воз-

Принятые сокращения: E-PRG — конъюгаты пероксидазы с прогестероном, E-PRG-1 и E-PRG-2 — конъюгаты пероксидазы с прогестероном, содержащие соответственно 12 и 6 молекул модификатора на 1 молекулу фермента E-1 и E-2 — контрольные препараты пероксидазы, обработанные в тех же условиях, как при получении соответственно E-PRG-1 и E-PRG-2, но в отсутствие активированного прогестерона. Анти-PRG — антитела к прогестерону. Анти-PRG: E-PRG — иммунные комплексы антител с конъюгатами пероксидазы. ПАВ — поверхностно-активное вещество.

можно различия каталитической активности иммунных комплексов [анти-PRG: E-PRG].

Оказалось, что конъюгат E-PRG-2, полученный при 41° С, действительно содержит 6 молекул прогестерона на одну молекулу фермента. Неожиданным было высокое содержание прогестерона в конъюгате E-PRG-1, который получен при 22° С. Скорее всего, высокое содержание диметилформамида и активированного прогестерона при синтезе E-PRG-1 способствует модифицированию NH<sub>2</sub>- и HO-группы белка. Другой причиной высокого содержания прогестерона в конъюгате может быть потеря гема в процессе синтеза E-PRG-1. В этом случае при определении числа связавшихся молекул стероида из разностного спектра (уравнивается поглощение опытного и контрольного образцов пероксидазы по полосе Core) результаты измерения могут быть завышены за счет апопероксидазы, содержащейся в препарате E-PRG-1.

Сравнение каталитической активности полученных конъюгатов при окислении *o*-фенилендиамина в смешанных обращенных мицеллах Аэрозоль OT и Тритона X-45 (1:1) показало, что E-PRG-1 в 5,2 раза активнее E-PRG-2 ( $k_{\text{эф}}=730,1$  и  $140,2$  с<sup>-1</sup> соответственно).

В присутствии антисыворотки против прогестерона (0,307 мг/мл) в смешанных мицеллах, содержащих 0,1 М Аэрозоль OT, 0,1 М Тритон X-45, 6% (объемных) 0,01 М фосфат-цитратного буфера с pH 3,6 и 3,0 иМ E-PRG-1, активность конъюгата значительно уменьшается. Мы считаем, что причиной снижения каталитической активности E-PRG-1 является образование в мицеллах иммунного комплекса, в котором фермент частично теряет свою активность. В тех же условиях немодифицированный фермент (E-1) в присутствии анти-PRG не меняет активности в течение ~40 мин. Однако дальнейшее инкубирование антисыворотки с E-PRG-1 или E-1 сопровождается монотонным уменьшением активности конъюгата и немодифицированного фермента, что связано с их частичной инактивацией в мицеллярной среде [6—8]. Поэтому мы проводили реакцию антигена с антителом в течение 10 мин.

Величина pH полярной фазы (в диапазоне 2,2—8,0) не влияла на взаимодействие антисыворотки с E-PRG-1 в обращенных мицеллах ПАВ. Разница между каталитической активностью E-1 и E-PRG-1 в присутствии антисыворотки не менялась в указанном диапазоне pH. Так как при низких pH скорость окисления *o*-фенилендиамина выше, чем при высоких [7], реакцию взаимодействия конъюгатов с антителами и определение каталитической активности иммунных комплексов проводили при pH 3,6.

Изменение объема полярной фазы (3—15%) смешанных обращенных мицелл в присутствии антисыворотки и E-PRG-1 влияет на активность фермента в иммунном комплексе. Наибольшая разница между скоростью окисления субстрата с участием E-1 и E-PRG-1 (3,0 иМ) после 10 мин их инкубирования с антисывороткой (0,041 мг/мл) в обращенно-мицеллярном растворе наблюдается при объеме полярной фазы мицеллы 6—12%.

На разницу активности фермента и конъюгата в присутствии анти-PRG влияет концентрация фосфат-цитратного буфера в мицеллах. При 0,03 М буфера в полярной фазе достигалось максимальное ингибирование активности E-PRG-1 в иммунном комплексе. При дальнейшем увеличении концентрации буфера (до 0,1 М) разница между каталитической активностью фермента и конъюгата уменьшается.

Анализ влияния концентрации антисыворотки против прогестерона на каталитическую активность пероксидазы и ее конъюгатов в разных средах показывает (рис. 1), что увеличение концентрации антисыворотки в обращенных мицеллах, содержащих E-1 или E-2, приводит сначала к незначительному активированию фермента, но при дальнейшем росте анти-PRG активность пероксидазы монотонно снижается (кривые 1 и 3). В отличие от пероксидазы активность конъюгатов E-PRG-1 и E-PRG-2 в обращенных мицеллах при увеличении концентрации антисыворотки меняется сложным образом (кривые 2 и 4). При малых концентрациях антисыворотки в мицеллярной среде наблюдается ингибирование активности E-PRG. В случае E-PRG-1 и E-1 разница между скоростями окисления *o*-фенилен-

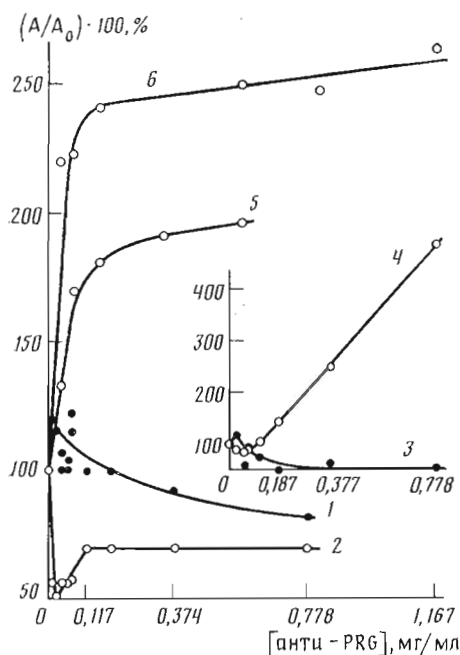


Рис. 1

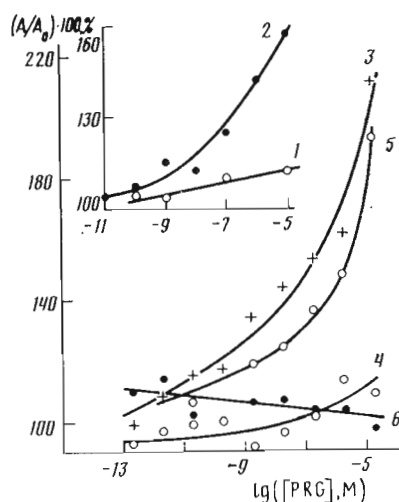


Рис. 4

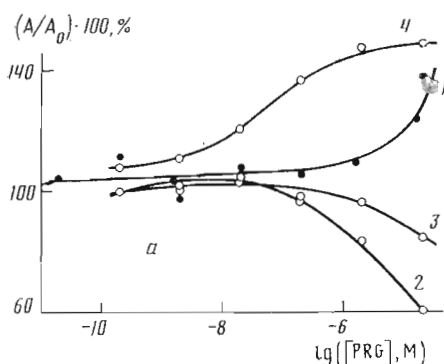


Рис. 2

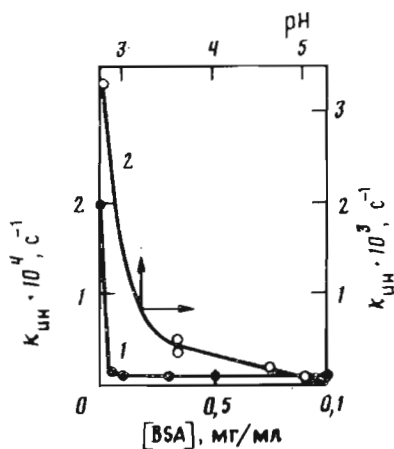


Рис. 3

Рис. 1. Влияние концентрации анги-PRG на каталитическую активность Е-1 (1), Е-2 (3), Е-PRG-1 (2) и Е-PRG-2 (4-6) при их инкубировании в течение 1 (6) или 10 мин (1-5) при 25° С в смешанных мицеллах 0,1 М Аэрозоля ОТ и 0,1 М Тритона Х-45 в гептане (1-4) или 0,05 М фосфат-цитратном буфере с рН 3,6 (5, 6). Пробы содержали 3,0 нМ пероксидазу или Е-PRG. Полярная фаза в мицеллярной системе составляла 6% (объемных) и включала 0,01 М фосфат-цитратный буфер с рН 3,6.  $A_0$  и  $A$  – каталитические активности конъюгатов в отсутствие и в присутствии анги-PRG.

Рис. 2. Зависимость каталитической активности 3,0 нМ Е-PRG-2 от концентрации прогестерона в присутствии 0,078 (2, 3), 0,280 (4) и 0,583 мг/мл (1) анги-PRG в 0,05 М фосфат-цитратном буфере с рН 3,6 (2, 4) и 5,0 (3) и в смешанных мицеллах 0,1 М Аэрозоля ОТ и 0,1 М Тритона Х-45 в гептане, содержащем 6% полярной фазы с 0,01 М фосфат-цитратным буфером, рН 3,6 (1) при 25° С

Рис. 3. Влияние BSA (1) и рН (2) на константу скорости инактивации Е-PRG-2 (3,0 нМ) в 0,05 М фосфат-цитратном буфере при 25 (2) и 40° С (1): 1 – рН 5,0

Рис. 4. Зависимость каталитической активности 3,0 нМ Е-PRG-1 от концентрации свободного прогестерона в присутствии анги-PRG в обращенных мицеллах 0,2 М Аэрозоля ОТ (1) или смешанных мицеллах 0,1 М Аэрозоля ОТ и 0,1 М Тритона Х-45 (2-6) в гептане при 18,5 (5), 25,0 (1-4) и 35,0° С (6). Концентрация анги-PRG: 0,041 (1, 2), 0,117 (3), 0,467 (4) и 0,078 мг/мл (5, 6); полярной фазы, содержащей 0,03 М фосфат-цитратный буфер с рН 3,6 – 8%

диаминна достигает ~50% (ср. кривые 1 и 2). Дальнейшее увеличение содержания анти-PRG в системе приводит к повышению каталитической активности конъюгатов, что особенно четко выражено для E-PRG-2 (ср. кривые 2 и 4). Изменение концентрации анти-PRG в водном растворе, содержащем E-PRG-2, также повышает каталитическую активность конъюгата примерно в 2,5 раза (кривая 6). Однако продолжительное инкубирование анти-PRG и E-PRG-2 в водной среде ослабляет активирующее влияние антисыворотки на конъюгат (кривая 5).

Влияние антисыворотки на конъюгат E-PRG-2 меняется во времени. При хранении E-PRG-2 в водно-глицериновом (1:1) растворе активирующее действие высоких концентраций антисыворотки в мицеллах элиминируется. Возможно, конформация E-PRG-2 изменяется со временем так, что прогестерон становится недоступным для антител против него.

Таким образом, антисыворотка против прогестерона влияет на активность модифицированной стероидом пероксидазы и немодифицированного фермента (рис. 1). Из полученных данных неясно, является ли взаимодействие сыворотки с конъюгатами специфическим, т. е. образуется ли иммунный комплекс [анти-PRG:E-PRG], или реализуется только неспецифическое белок-белковое взаимодействие, характерное для белков в растворе и приводящее к стабилизации ферментов. Для выяснения характера взаимодействия между антисывороткой и E-PRG в систему добавляли свободный прогестерон, который должен уменьшать разницу между активностями пероксидазы и E-PRG только в том случае, если в системе образуется иммунный комплекс.

С ростом концентрации свободного прогестерона в мицеллярной системе, содержащей антисыворотку и E-PRG-2 (рис. 2, 1), наблюдается увеличение, а не уменьшение активности конъюгата, как это можно было бы ожидать из анализа разницы между кривыми 3 и 4 (рис. 1). По-видимому, некоторое повышение активности E-PRG-2 при концентрации прогестерона выше 10 мкМ связано с влиянием стероида на мицеллообразование в системе. Ранее мы показали, что добавление к обращенным мицеллам Аэрозоль OT, содержащим пероксидазу, нейтральных ПАВ и спиртов приводит к значительному повышению активности фермента [7].

Увеличение концентрации прогестерона в водном растворе (рН 3,6), содержащем антисыворотку и E-PRG-2, ведет к уменьшению активности конъюгата (рис. 2, 2). Повышение рН среды до 5,0 снижает чувствительность системы к концентрации свободного стероида (кривая 3). Таким образом, в данных системах наблюдается специфическое взаимодействие анти-PRG с E-PRG-2, которое зависит не только от концентрации свободного стероида, но и от рН среды. В водном растворе при низких рН конъюгат, не связанный с антителами, сравнительно быстро инактивируется, что объясняет изменение активности E-PRG-2 в присутствии прогестерона. Зависимость констант скорости инактивации E-PRG-2 от рН (рис. 3, 2) подтверждает это.

При высокой концентрации анти-PRG в водном растворе (рис. 2, 4) и растущем содержании свободного прогестерона в системе активность E-PRG-2 повышается. По-видимому, в данной системе преобладает неспецифическое взаимодействие антисыворотки с конъюгатом, так как в случае конкуренции свободного прогестерона и конъюгата за специфическое связывание с анти-PRG каталитическая активность E-PRG-2 должна уменьшаться с ростом содержания стероида в среде (рис. 1, 5 и 6). Можно предположить, что избыток белка антисыворотки в системе действует подобно добавляемому бычьему сывороточному альбумину (рис. 3, 1), который стабилизирует E-PRG-2. Стероид в растворе может способствовать агрегации анти-PRG и E-PRG-2, так как гидрофобные молекулы в водной среде активно взаимодействуют с белковой глобулой [9].

Таким образом, изучение влияния свободного прогестерона на взаимодействие антисыворотки против стероида и E-PRG-2 в водной и обращенно-мицеллярной средах свидетельствует о преобладании неспецифических белковых взаимодействий в этих системах. При синтезе конъюгата E-PRG-2 происходят значительные конформационные изменения пероксидазы

вероятно, повышающие сродство измененной белковой глобулы фермента к поликлональной антисыворотке. Этим и объясняется стабилизация пероксидазы и повышение ее активности, что мы наблюдали на практике (рис. 1). Уменьшить неспецифическое взаимодействие антисыворотки с E-PRG-2 в водной среде можно путем снижения концентрации сыворотки и величины pH (рис. 2, 2). Однако использовать этот подход при конструировании иммуноферментных систем нереально, так как чувствительность системы к малым концентрациям свободного прогестерона весьма низка.

В отличие от E-PRG-2 взаимодействие конъюгата E-PRG-1 с антисывороткой против прогестерона в обращенных мицеллах зависит от концентрации свободного стероида в системе (рис. 4). Как и следовало ожидать, на характер зависимости активности конъюгата от концентрации свободного прогестерона сильно влияет содержание антисыворотки (рис. 4, 2—4). При высоких концентрациях анти-PRG в мицеллах изменение активности E-PRG-1 в зависимости от концентрации свободного стероида незначительно (кривая 4).

Использование однородных мицелл Аэрозоля OT снижает чувствительность системы к содержанию свободного прогестерона (рис. 4, 1, 2). Оболочка из молекул анионного Аэрозоля вокруг гидратированного белка препятствует конкуренции гидрофобного прогестерона с E-PRG-1 за связывание с анти-PRG. Добавление в систему нейтрального Тритона X-45 увеличивает солюбилизационную емкость мицелл и ускоряет происходящие в системе реакции [7].

Изучено влияние температуры на активность E-PRG-1 в присутствии анти-PRG и свободного стероида в обращенных мицеллах (рис. 4, 5, 6). Увеличение температуры приводит к резкому снижению чувствительности системы к присутствию свободного прогестерона. При 35° С прогестерон в широком диапазоне его концентраций не влияет на характер взаимодействия анти-PRG с E-PRG-1 (прямая 6).

Таким образом, в отличие от E-PRG-2 E-PRG-1 в обращенных мицеллах ПАВ специфически взаимодействует с анти-PRG. Для того чтобы показать это, необходимы низкая концентрация антисыворотки в мицеллах, составленных из нейтрального и анионного ПАВ, и узкий температурный диапазон.

Как можно представить себе процессы, происходящие в мицеллярной системе? Вследствие специфической реакции анти-PRG с E-PRG-1 образуется иммунный комплекс, в котором подвижность конъюгата и доступность активного центра для субстратов ограничены. Конформационная жесткость иммунного комплекса в ядре обращенной мицеллы обеспечивается тем, что мицеллы играют роль своеобразных «молекулярных тисков» [10]. Свободный прогестерон, добавленный в мицеллярную систему, конкурирует с E-PRG-1 за связывание с анти-PRG, и активность конъюгата восстанавливается до уровня, характерного для E-1. Однако обращенные мицеллы играют роль «молекулярных тисков» только в весьма ограниченном диапазоне соотношений между компонентами мицеллярной системы. С ростом концентрации антисыворотки в обращенных мицеллах уменьшается доля молекул ПАВ, приходящаяся на молекулу белка, и конформационная подвижность конъюгата в иммунном комплексе увеличивается, что сопровождается повышением каталитической активности фермента (рис. 1, 2, 4). Иммунный комплекс становится более доступным для гаптена. В отличие от систем, содержащих E-1 и E-2 (рис. 1, 1, 3), поливалентные конъюгаты в иммунном комплексе стабилизированы за счет связей с антителами.

Сравнение зависимостей 2 и 4 (рис. 1) свидетельствует, что активирующее влияние антисыворотки на конъюгаты (при ее высоких концентрациях в системе) зависит от степени изменения пероксидазы в ходе модифицирования белка прогестероном. Особенно ярко реактивирующее влияние антисыворотки выражено для E-PRG-2 (рис. 1, 4), который получен при 41° С, когда внутримолекулярные связи в белковой глобуле ослаблены и для растворителя становятся доступными ранее скрытые аминокислотные остатки [5]. Нами неоднократно показано, что активность

конъюгатов пероксидазы после их синтеза в среде органического растворителя при высокой температуре можно в значительной степени восстановить, инкубируя их с антисывороткой. Стабилизирующее и реактивирующее влияние антисыворотки на E-PRG-2 проявляется как в водном растворе, так и в обращенных мицеллах (рис. 1).

Характер влияния температуры на систему, содержащую обращенные мицеллы с анти-PRG и E-PRG-1, свидетельствует о довольно слабом взаимодействии анти-PRG с белковым компонентом конъюгата, следствием которого, как мы считаем, является некоторое изменение каталитической активности фермента. Взаимное влияние белков в иммунном комплексе реализуется только потому, что обращенные мицеллы стабилизируют связь между белками, подвижность которых сильно ограничена в ядре мицелл. Повышение температуры приводит к увеличению конформационной подвижности фермента и, следовательно, к росту доступности активного центра для субстратов. Связь анти-PRG со стероидными фрагментами конъюгата сохраняется, по-видимому, и при 35° С, но этого недостаточно для создания значительных стерических препятствий доступу низкомолекулярных субстратов к ферменту. В отличие от [анти-PRG: E-PRG] в иммунном комплексе анти-пероксидазы с пероксидазой в обращенных мицеллах реализуется сильное взаимодействие между белками, которое мало зависит от окружающих условий [6].

Таким образом, проведенная работа показала, что конъюгат E-PRG-2, полученный при 41° С, в присутствии анти-PRG восстанавливает свою каталитическую активность по крайней мере до уровня, характерного для конъюгата E-PRG-1, полученного при комнатной температуре. Взаимодействие антител с конъюгатами можно регулировать добавками свободного прогестерона лишь при определенных условиях. Для реализации специфического взаимодействия анти-PRG с E-PRG-1 необходимы обращенные мицеллы определенного состава, низкое содержание антисыворотки в системе, температура ~20° С. Специфическое взаимодействие E-PRG-2 с антителами удалось обнаружить лишь в водной среде при низкой концентрации сыворотки в системе и рН среды, равном 3,6. В других условиях взаимодействие конъюгатов с антисывороткой нечувствительно к добавкам свободного прогестерона.

### Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу из хрена производства НПО «Биолар» (Олайн) с  $RZ=2,67$ . Концентрацию пероксидазы и ее производных определяли спектрофотометрически на приборе Specord UV VIS (ГДР), используя коэффициент молярного поглощения  $\epsilon_{403}=102 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [11]. Субстрат пероксидазы, *o*-фенилендиамин, очищали возгонкой в вакууме. Антисыворотка анти-PRG имела константу ассоциации с  $^{125}\text{I}$ -прогестероном, равную  $1,0 \pm 0,4 \text{ нМ}$ .

*Получение конъюгатов пероксидазы с прогестероном.* Конъюгаты синтезировали по методике [12] с некоторыми модификациями. В воде с рН 8,35, содержащей 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ , 50% диметилформамид, растворяли 33,7 мкМ пероксидазу и 1,88 мМ N-оксисукцинимидный эфир 3-О-карбоксиметилксима прогестерона (соотношение модификатор/пероксидаза составляло 56) и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение 7 ч. Полученный конъюгат (E-PRG-1) освобождали диализом от непрореагировавшего модификатора и других компонентов. Конъюгат хранили в водном растворе с 50% глицерина в морозильном шкафу. Контрольный препарат пероксидазы (E-1) был обработан в тех же условиях, что и конъюгат, но в отсутствие активированного прогестерона. Спектральный показатель чистоты (RZ) контрольного фермента составил 2,40. Число связанных с пероксидазой молекул модификатора определяли из разностного спектра поглощения, уравнивая концентрации контрольного препарата E-1 и конъюгата E-PRG-1 по полосе  $\text{Core}$ . При расчете числа связанных с ферментом молекул прогестерона использовали коэффициент

молярной экстинкции  $\epsilon_{250} = 16 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [13]. E-PRG-1 содержал  $\sim 12$  молекул модификатора на молекулу фермента.

Конъюгат E-PRG-2 получен при  $41^\circ \text{C}$  и соотношении модификатор/пероксидаза, равном 39, в растворе с 35% диметилформамида при времени реакции, равном 6 ч. E-PRG-2 содержал 6 молекул прогестерона на молекулу белка. Контрольный препарат E-2 имел  $\text{RZ} = 2,31$ .

В качестве мицеллообразователей применяли натриевую соль ди-(2-этил)гексилевого эфира сульфоянтарной кислоты Аэрозоля ОТ (Serva, ФРГ) и Тритон X-45 (Sigma, США). Гептан перед употреблением переносили. Реакцию взаимодействия анти-PRG с конъюгатами и определение их пероксидазной активности проводили в смешанных обращенных мицеллах Аэрозоля ОТ и Тритона X-45 (1:1) в гептане и буферном растворе. Использовали фосфат-цитратный буфер с pH 3,6. Состав среды и конечные концентрации реагентов при инкубировании пероксидазы и E-PRG с анти-PRG указаны в подписях к рисункам и в тексте статьи. После 10 мин реакции антигена с антителом в обращенных мицеллах отбирали аликвоты по 0,1 мл и разводили их в 4,5 раза смесью, в состав которой входили гептан, 0,1 М Аэрозоль ОТ, 0,1 М Тритон X-45, 4,0 мМ *o*-фенилендиамин, 4,0 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6–8% (объемных) полярной фазы, содержащей 0,01 или 0,03 М фосфат-цитратный буфер с pH 3,6. За реакцией следили спектрофотометрически в течение  $\sim 1$  мин, регистрируя оптическую плотность продуктов окисления *o*-фенилендиамина при 369 нм.

После реакции анти-PRG с E-PRG-2 в буферном растворе отбирали аликвоты по 0,12 мл и разводили их в 15 раз 0,05 М фосфат-цитратным буфером с pH 3,6 (или 5,0), содержащим 2,0 мМ *o*-фенилендиамин, 1,0 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . За окислением *o*-фенилендиамина следили по изменению поглощения продуктов реакции при 457 нм.

Авторы выражают признательность канд. биол. наук Н. В. Пивень за предоставление антисыворотки против прогестерона и канд. хим. наук В. Д. Матвеевцу за предоставление N-оксисукцинимидного эфира 3-О-карбоксиметилокси прогестерона.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982. С. 354.
2. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972. С. 303–331.
3. Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987. С. 74.
4. Enzyme-Immunoassay / Ed. Maggio E. T. Boca Raton: CRC Press, 1983. P. 295.
5. Угарова Н. Н., Лебедева О. В., Савицкий А. П. Пероксидазный катализ и его применения. М.: МГУ, 1981. С. 92.
6. Еремин А. Н., Савенкова М. И., Метелица Д. И. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 606–612.
7. Метелица Д. И., Еремин А. Н. Успехи биол. химии. 1988. Т. 28. С. 145–173.
8. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 10. С. 1612–1623.
9. Еремин А. Н., Метелица Д. И., Сметан Г. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 6. С. 976–984.
10. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112–158.
11. Shannon L. M., Kay E., Lew I. Y. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 9. P. 2166–2172.
12. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 1839–1842.
13. Blanford A. T., Wittman W., Stroupe S. D., Westphal U. // J. Steroid Biochem. 1978. V. 9. P. 187–189.

Поступила в редакцию  
12.XII.1988  
После доработки  
27.II.1989

CATALYTIC ACTIVITY OF PEROXIDASE CONJUGATES WITH  
PROGESTERONE IN AQUEOUS AND MICELLAR MEDIA AT THE  
PRESENCE OF THE ANTIBODIES AGAINST PROGESTERONE

ERYOMIN A. N., METELITZA D. I.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian  
SSR, Minsk*

At 22 and 41°C the horseradish peroxydase (HRP) conjugates with progesterone, HRP-PROG-1 and IIRP-PROG-2, were obtained by HRP reaction with N-hydroxysuccinimide ester of 3-O-carboxymethyloxime of progesterone. The interaction of these conjugates and unmodified enzyme with antibodies against progesterone was studied in phosphate-citrate buffer pH 3.6 and in the reversed micelles of Aerosol OT and Triton X-45 in heptane. Catalytic function of conjugates in buffered solutions and in reversed micelles increases as result of the conjugates' interaction with antibodies. The free progesterone in reversed micelles competes with HRP-PROG-1 for antibody binding, which may be the basis for homogeneous enzyme-immunoassay of progesterone, depending on the micelle composition, the antibody concentration and temperature.