



УДК 577.112.4.083.3 : 577.152.111\*17

© 1990 г.

Б. Б. Ким, В. В. Писарев, С. Б. Власенко,  
А. М. Егоров

## ИССЛЕДОВАНИЕ И ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ *ARTHROMYCES RAMOSUS*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

В работе исследованы некоторые биохимические и каталитические свойства пероксидазы из *Arthromyces ramosus* (пероксидаза AR) в хемилюминесцентной реакции окисления люминола перекисью водорода. Методом остановленной струи определены константы скоростей второго порядка элементарных стадий. Показано, что, исходя из стационарного приближения, можно объяснить более высокую активность пероксидазы AR в реакции окисления люминола по сравнению с пероксидазой хрена. Изучена стационарная кинетика реакции и найдены оптимальные условия для количественного определения пероксидазы AR. Нижний предел детекции составил  $5 \cdot 10^{-13}$  М. На примере анализа человеческого IgG показана возможность применения пероксидазы AR в качестве фермента-маркера в методах иммуноферментного анализа.

В последние годы все большее распространение приобретают методы иммуноферментного анализа с хемилюминесцентной детекцией [1]. Широкое применение, в частности, нашла реакция усиленной хемилюминесценции — совместного окисления перекисью водорода люминола и второго, быстроокисляющегося субстрата (люциферина, *n*-иодфенола и т. п.), — катализируемая пероксидазой из корней хрена (пероксидаза HR). Эта система детекции имеет преимущества в скорости, а также точности и воспроизводимости получаемых результатов по сравнению с традиционными спектрофотометрическими методами [2]. Ранее нами был исследован механизм усиления хемилюминесценции при совместном окислении двух субстратов и предложено использование этой реакции в твердофазных и гомогенных методах иммуноферментного анализа (ИФА) [3].

В настоящей работе приведены результаты изучения стационарной и предстационарной кинетики реакции окисления люминола перекисью водорода, катализируемой пероксидазой из *Arthromyces ramosus* (пероксидаза AR), биохимические характеристики фермента; на примере анализа человеческого IgG показана возможность использования пероксидазы AR в качестве фермента-маркера в методе твердофазного ИФА.

**Биохимические и иммунохимические свойства пероксидазы AR.** Пероксидаза AR имеет спектр, типичный для гемсодержащих белков, с полосой Soret в области 350—425 нм и максимумом поглощения при 403 нм. Величина RZ (отношение оптических плотностей при 403 и 280 нм), которой принято характеризовать чистоту пероксидазы HR, составила для пероксидазы гриба 1,74. Определенный нами молярный коэффициент поглощения пероксидазы AR оказался равным  $102 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при длине волны 403 нм.

По данным высокоэффективной гель-фильтрации, препарат пероксидазы AR гомогенен и его молекулярная масса равна 41 кДа. При изоэлектрофокусировании пероксидазы AR (рис. 1) выявляются два компонента: основной, обладающий ферментативной активностью, с *pI* 3,6, представляющий собой пероксидазу, и минорный, с *pI* 3,8, не обладающий ферментативной активностью.

Использованные сокращения: AR- и HR-пероксидаза — пероксидаза из *Arthromyces ramosus* и пероксидаза хрена, ИФА — иммуноферментный анализ, IgG — иммуноглобулин G.

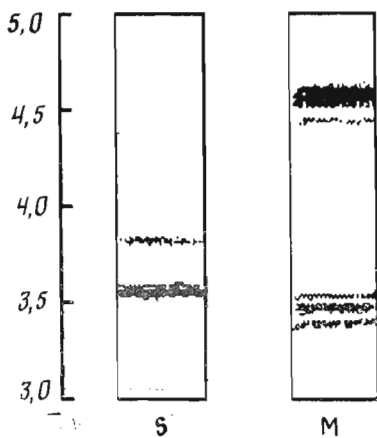


Рис. 1

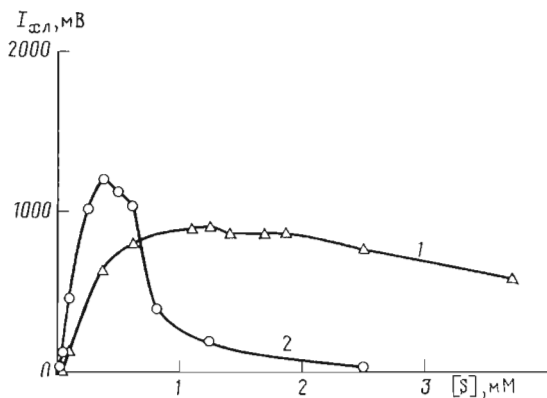


Рис. 2

Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата пероксидазы AR (S). M — маркеры рI. Слева — калибровочная шкала pH. Окрашивание по белку

Рис. 2. Зависимость максимальной интенсивности хемилюминесценции от концентрации люминола (1) (концентрации: пероксидазы AR —  $[E] 2 \cdot 10^{-10}$  M,  $[H_2O_2] 5 \cdot 10^{-4}$  M) и перекиси водорода (2) ( $[E] 2 \cdot 10^{-10}$  M, [люминол]  $5 \cdot 10^{-3}$  M)

Методом твердофазного ИФА было изучено взаимодействие пероксидазы AR с моноклональными (4 типа) и поликлональными антителами против пероксидазы HR. Пероксидаза гриба не связывалась ни с одним из клонов моноклональных антител, ни с поликлональными антителами против пероксидазы HR. По-видимому, антигенные структуры ферментов существенно различаются.

*Исследование стационарной кинетики действия пероксидазы AR.* Зависимость интенсивности хемилюминесценции реакции окисления люминола от pH в присутствии пероксидазы AR характеризуется максимумом в районе 8,8. По сравнению с реакцией усиленной хемилюминесценции, катализируемой пероксидазой HR (пик при pH 8,5 [3]), максимум несколько смещен в щелочную область, однако величина фоновой хемилюминесценции, т. е. хемилюминесценции в отсутствие фермента, и в этом случае невелика, что обеспечивает благоприятные условия для аналитического обнаружения пероксидаз AR и HR.

Как видно из рис. 2, пероксидаза AR ингибируется избытком перекиси водорода. Этот эффект, известный и для других пероксидаз, связывают с образованием в условиях избытка перекиси водорода непродуктивного комплекса, так называемого соединения III [4]. Относительно небольшие размеры плато на концентрационных зависимостях интенсивности хемилюминесценции отрицательно сказываются на воспроизводимости получаемых результатов.

Кинетика излучения света в реакции, катализируемой пероксидазой AR, зависит от концентрации субстратов и фермента. Стационарный участок сохраняется в течение по меньшей мере 2 мин, что позволяет обрабатывать сразу большое количество образцов с предварительным добавлением субстратов.

На рис. 3 представлены калибровочные кривые, построенные для пероксидазы AR и HR. В области низких концентраций обнаруживается нелинейный ход калибровочных кривых, вызванный, по-видимому, диссоциацией ферментов на гемин и апобелок, причем в случае грибной пероксидазы нелинейность выражена сильнее. Это понижает как чувствительность метода, так и точность определения фермента, особенно в области низких концентраций. Нижний предел детекции пероксидазы AR составил  $5 \cdot 10^{-13}$  M (не показан на рис. 3 в целях сохранения масштаба).

Важным параметром аналитической системы является также отношение специфического сигнала (в присутствии фермента) к фоновому (в от-

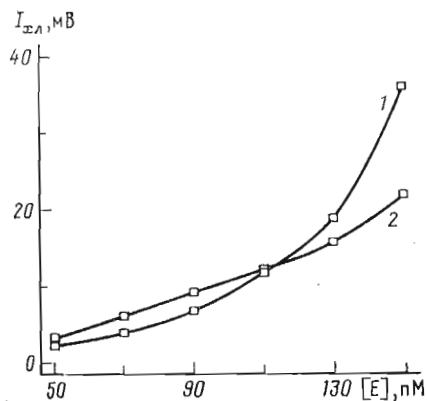


Рис. 3

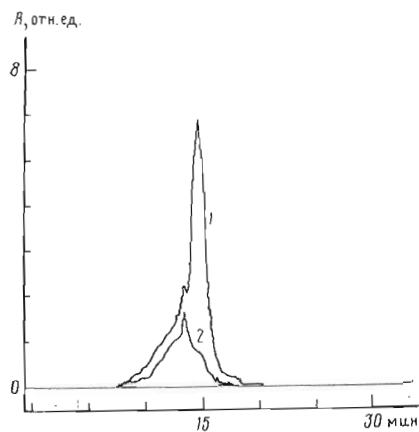


Рис. 5

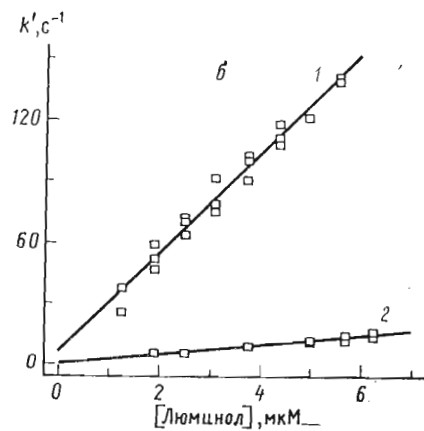
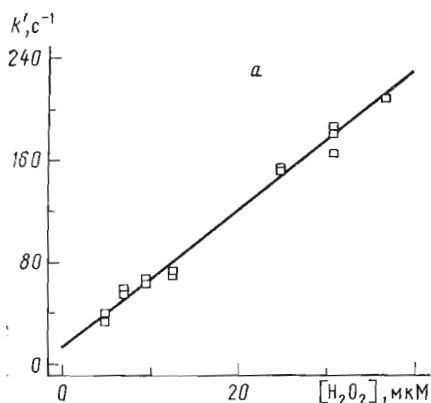


Рис. 4

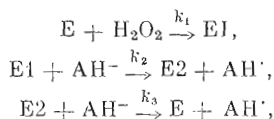
Рис. 3. Калибровочные кривые для определения пероксидазы AR в реакции окисления люминола (1) и пероксидазы HR в реакции усиленной хемиллюминесценции (2)

Рис. 4. Определение методом остановленной струи истинных констант скоростей реакций окисления пероксидазы AR перекисью водорода (а) и восстановления люминолом соединений I (1) и II (2) (б). По оси ординат — эффективные константы реакций псевдопервого порядка. Приведены результаты трех опытов

Рис. 5. Результаты гель-хроматографии конъюгата пероксидазы AR с антителами кролика против IgG человека. 1 — детекция при 403 нм, 2 — детекция при 280 нм. Другие условия — см. «Экспер. часть»

сутствие фермента). Для пероксидазы AR это отношение составило 10 : 1 при минимально детектируемой концентрации фермента.

*Исследование стационарной кинетики действия пероксидазы AR.* Полагая верным для пероксидазы AR механизм Чанса [4], предложенный для объяснения каталитического действия пероксидазы HR, можно записать следующую схему ферментативных стадий окисления люминола:



где E — фермент; E1 — соединение I фермента; E2 — соединение II фермента;  $AN^-$  — ионизированная форма люминола;  $AN^{\cdot}$  — радикал люминола;  $k_1, k_2, k_3$  — константы скоростей реакций второго порядка.

Нами было показано, что вид спектра и изобестическая точка (426 нм) продуктов окисления пероксидазы AR не отличаются от таковых для соединений I и II пероксидазы HR [3].

**Константы элементарных стадий и скорости генерации радикалов люминола для реакций окисления люминола и *n*-иодфенола перекисью водорода, катализируемых пероксидазой HR (HRP) [3] и пероксидазой AR**

Константа скорости, М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	HRP, щелочные изоферменты		АРД, кислые изоферменты
	люминол	<i>n</i> -иодфенол	люминол
$k_1$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$(5,32 \pm 0,07) \cdot 10^6$
$k_2$	$8,0 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^7$	$(2,39 \pm 0,09) \cdot 10^7$
$k_3$	$1,2 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^6$	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^6$
$I_{хл}^*$	1	—	106
$V_g^*, \text{АН}^{\cdot}$	1	—	100

\*  $I_{хл}$  — интенсивность хемлюминесценции,  $V_g, \text{АН}^{\cdot}$  — скорость генерации радикалов люминола. Для этих величин даны не абсолютные значения, а отношения к величине, найденной для пероксидазы HR.

На рис. 4а приведены результаты определения константы скорости второго порядка реакции окисления пероксидазы AR перекисью водорода. На рис. 4б показаны аналогичные данные для реакций восстановления соединений I и II фермента.

Использование метода остановленной струи позволяет прояснить вопрос о высокой активности пероксидазы AR в реакции окисления люминола. Для этого достаточно сравнить константы, характеризующие взаимодействие окисленных форм пероксидазы AR и пероксидазы HR с субстратами-восстановителями (таблица). Из приведенных данных видно, что величины  $k_2$  и  $k_3$  для реакции окисления люминола в присутствии пероксидазы AR существенно выше, чем для реакций, катализируемых пероксидазой HR, и близки к величинам, характеризующим окисление *n*-иодфенола. Таким образом, люминол сам по себе является «хорошим» субстратом для пероксидазы AR, и для его окисления не требуется присутствие второго субстрата-усилителя. Если исходить из предположения, что ферментативные стадии, а не постферментативные реакции превращения радикалов лимитируют скорость окисления люминола, то интенсивность хемлюминесценции должна быть прямо пропорциональна скорости генерации радикалов люминола, а отношение этих скоростей должно быть равно, при одинаковых концентрациях субстратов и фермента, отношению интенсивностей хемлюминесценции,  $I_{хл}$ . Последнее отношение может быть прямо получено из экспериментальных данных.

Скорость генерации радикалов люминола  $V_g$  можно рассчитать, задав величины констант элементарных стадий, по формуле

$$V_g = \frac{2k_1k_2k_3 [\text{АН}_2]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]_0 [\text{E}]_0}{k_2k_3 [\text{АН}_2]_0 + k_1(k_2 + k_3) [\text{H}_2\text{O}_2]_0},$$

где  $[\text{АН}_2]_0$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ ,  $[\text{E}]_0$  — начальные концентрации люминола, перекиси водорода и пероксидазы.

Как следует из таблицы, отношение скоростей генерации радикалов люминола оказалось равным отношению интенсивности хемлюминесценции в обеих системах. Таким образом, увеличение хемлюминесценции при окислении люминола пероксидазой гриба можно объяснить ее более высокой активностью в реакции окисления люминола, что вытекает из значений констант скоростей элементарных стадий.

*Иммуноаналитическое применение пероксидазы AR.* Возможность применения пероксидазы AR в твердофазном ИФА показана на примере определения IgG человека. Для связывания фермента с антивидовыми антителами был использован метод Накане [5]. Он основан на окислении углеводного компонента фермента с образованием альдегидных групп, которые затем вступают в реакцию с аминокруппами второго белка. Этот метод хорошо изучен и нашел широкое применение для получения конъюгатов пероксидазы HR с различными белками. Потенциальная сложность заключается в том, что пероксидаза AR содержит в 4 раза меньше углеводов, чем пероксидаза HR [6]. Тем не менее, ведя синтез по стандартным ме-

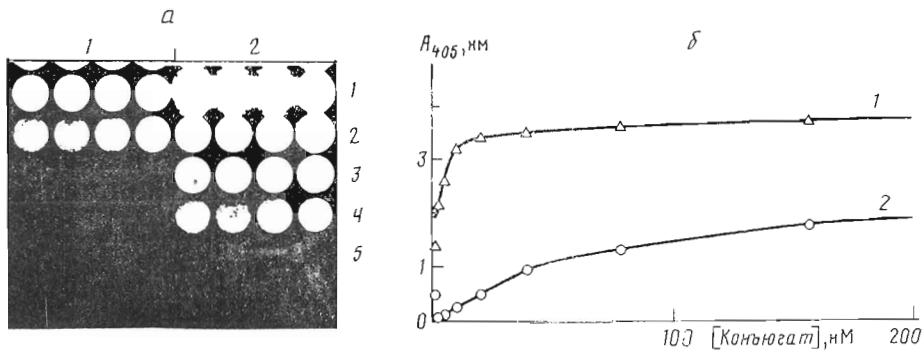


Рис. 6. Применение конъюгатов с пероксидазой HR (1) и AR (2) в твердофазном ИФА IgG человека с хемилюминесцентной (а) и спектрофотометрической детекцией (б). Концентрации конъюгатов в лунках: 1 —  $1,25 \cdot 10^{-7}$ , 2 —  $6,25 \cdot 10^{-8}$ , 3 —  $3,13 \cdot 10^{-8}$ , 4 —  $1,56 \cdot 10^{-8}$ , 5 —  $7,81 \cdot 10^{-9}$  М

тодикам, удастся и в этом случае получить препарат, обладающий ферментативной и иммунологической активностью. На рис. 5 показаны результаты гель-хроматографии полученного конъюгата. По данным хроматографии, в препарате отсутствует свободный фермент, а конъюгат представлен в виде нескольких полимерных форм с молекулярными массами от 300 до 1000 кДа.

Синтезированные нами конъюгаты были использованы для определения IgG человека. Активность связавшихся конъюгатов измеряли как спектрофотометрическим, так и хемилюминесцентным методами. Результаты показаны на рис. 6а, б. Нетрудно видеть, что конъюгат с пероксидазой AR во всех случаях демонстрирует более высокую активность по сравнению с конъюгатом с пероксидазой HR. Это, по-видимому, объясняется свойствами не самой грибной пероксидазы (так как предел детекции для обоих ферментов одинаков), а свойствами полученного конъюгата.

Исследование механизма действия пероксидазы AR показывает, что хемилюминесцентная реакция окисления люминола позволяет определять концентрацию фермента с той же чувствительностью, что и реакция усиленной хемилюминесценции — концентрацию пероксидазы HR. При этом нет необходимости в использовании второго субстрата-усилителя, что упрощает экспериментальную процедуру определения активности фермента. Конъюгаты белков с пероксидазой AR для применения в ИФА могут быть получены по стандартной методике Накане, разработанной для пероксидазы хрена.

Изложенное выше позволяет рассматривать пероксидазу из *A. ramosus* как альтернативный пероксидазе хрена маркер в методах ИФА с хемилюминесцентной детекцией.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы пероксидаза из корней хрена, RZ 3,0, отечественного производства, пероксидаза из *A. ramosus* (Suntory, Япония), люминол (Amersham, Англия), метапериодат натрия, орто-фенилендиамин (Sigma, США), Тритон X-100 (Ferk, Зап. Берлин), реактивы для изоэлектрофокусирования (Bio-Rad, США), *n*-иодфенол, синтезированный и очищенный на химическом факультете МГУ. Остальные реактивы производства фирмы «Союзреактив», марки ч. д. а.

Кроличьи антисыворотки против IgG человека, пероксидазы HR и моноклональные мышинные антитела против пероксидазы HR получали и очищали как описано ранее [7, 8].

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе DU 8B (Beckman, США).

При исследовании зависимости интенсивности хемилюминесценции от pH и концентраций субстратов использовали люминометр 1251-002 (LKB, Финляндия).

Для сканирования микропланшет использовали спектрофотометр  $V_{\max}$  (Molecular Devices, США) и Camera Luminometer (Dynatech, США).

Молекулярный состав конъюгатов и молекулярную массу пероксидазы AR определяли гель-фильтрацией на колонке TSK G 3000 SW (60 мм) с помощью системы FPLC (Pharmacia, Швеция) с двумя спектрофотометрическими детекторами — 280 нм (неспецифическое поглощение белков) и 403 нм (максимум поглощения протопорфирина IX — протестической группы пероксидазы HR и пероксидазы AR), скорость потока 1 мл/мин. Для калибровки колонки использовали белки-маркеры молекулярного веса фирмы Pharmacia.

Для хемилюминесцентного определения активности ферментов в случае пероксидазы HR использовали смесь люминола и *n*-иодфенола (конечные концентрации  $10^{-3}$  и  $5 \cdot 10^{-4}$  М соответственно) в трис-HCl-буфере, pH 8,5; в случае пероксидазы AR —  $10^{-3}$  М раствор люминола в 0,2 М боратном буфере, pH 8,8. Реакцию инициировали перекисью водорода (конечная концентрация  $5 \cdot 10^{-4}$  М). Спектрофотометрическое определение активности обоих ферментов проводили с помощью *орто*-фенилендиамина по стандартной методике [7].

Концентрации пероксидаз HR и AR определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты экстинкции  $\epsilon_{403} = 105$  [4] и  $\epsilon_{403} = 102$  (определено нами)  $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  соответственно. Концентрацию конъюгата определяли по содержанию пероксидазы HR или пероксидазы AR.

Для изоэлектрофокусирования использовали установку и реактивы Bio-Rad (США). Окрашивание в геле по белку и активности проводили по стандартным методикам [9]. Для сканирования результатов изоэлектрофокусирования использовали отражательный фотометр (Shimadzu CS 9000).

При исследовании взаимодействия пероксидазы AR с антителами против пероксидазы HR очищенные антитела сорбировали на микропланшете (Dynatech, 129 В), используя раствор концентрации 10 мкг/мл в калий-фосфатном буфере, pH 7,4. После инкубации ( $37^\circ \text{C}$ , 2 ч) и отмывки в лунки вносили растворы пероксидазы HR или пероксидазы AR в калий-фосфатном буфере с добавлением Тритона X-100. После инкубации в течение 2 ч и отмывки измеряли активность связавшихся ферментов.

Исследования предстационарной кинетики действия пероксидазы AR проводили методом остановленной струи на спектрофотометре модели RA-401 (Union Giken, Япония). Концентрация пероксидазы AR во всех экспериментах равнялась  $4 \cdot 10^{-7}$  М. При изучении реакции окисления пероксидазы AR следили за расходом нативного фермента при длине волны 403 нм. Концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  варьировали в пределах  $(1-8) \cdot 10^{-5}$  М. При изучении восстановления соединения I в соединение II использовали большой избыток перекиси водорода ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) по сравнению с пероксидазой AR. Измерения проводили при 426 нм, изобестической точке нативного фермента и соединения I. Реакцию восстановления соединения II в нативную пероксидазу исследовали в условиях эквимольного соотношения фермент —  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Концентрацию люминола варьировали в пределах  $(1,5-7) \cdot 10^{-6}$  М с тем, чтобы, с одной стороны, обеспечить условия псевдопервого порядка для реакции восстановления фермента, а с другой — не допустить протекания реакции за время, меньшее или сравнимое с «мертвым» временем прибора ( $\sim 15$  мс).

Для изучения спектральных свойств соединений  $E_1$  и  $E_2$  пероксидазы AR снимали спектры в диапазоне 380—480 нм в различные моменты времени реакции. Концентрация пероксидазы  $5 \cdot 10^{-6}$  М, люминола —  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М,  $\text{H}_2\text{O}_2$  —  $10^{-6}$ — $10^{-4}$  М. Все измерения проводили при постоянной температуре  $25^\circ \text{C}$  и pH 8,8 (0,2 М боратный буфер).

Конъюгаты кроличьих антител против IgG человека с пероксидазой HR и пероксидазой AR получали методом Накане [5] с некоторыми модификациями. Мольное отношение метапериодата натрия к ферментам составляло 7,5 : 1, время окисления углеводного компонента и реакции окисленной пероксидазы с антителами кролика 0,5 и 2 ч соответственно.

Конъюгаты ферментов с кроличьими антителами против IgG челове-

ка тестировали в твердофазном ИФА. Для этого в лунках микропланшета сорбировали очищенный IgG человека (3 мкг/мл), добавляли в первый ряд лунок растворы конъюгатов в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М (по ферменту) для спектрофотометрической детекции и  $1,25 \cdot 10^{-7}$  М для хемилюминесцентной детекции и титровали в 2-кратном разведении (рис. 6). Далее в лунки добавляли *орто*-фенилендиамин для спектрофотометрической детекции. При хемилюминесцентной детекции в лунки добавляли люминол и *n*-иодфенол (для пероксидазы HR) или только люминол (для пероксидазы AR) в стандартных концентрациях (см. выше).

Мы признательны д-ру Tetsuo Amachi (Suntory Ltd.) за предоставление препарата пероксидазы из *A. ramosus* и Н. В. Сорокиной за помощь в проведении ИФА.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власенко С. Б., Гаврилова Е. М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1989. Т. XXXIV. № 1. С. 24—30.
2. Ким Б. Б., Власенко С. Б., Гаврилова Е. М., Егоров А. М. // Биотехнология. 1989. Т. 5. № 1. С. 97—102.
3. Vlasenko S. B., Arefyev A. A., Klimov A. D., Kim B. B., Gorovits E. L., Osipov A. P., Gavrilova E. M., Yegorov A. M. // J. Biolum. Chemilum. 1989. V. 4. № 4. P. 164—176.
4. Chance B. // Science. 1949. V. 109. P. 204—208.
5. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084—1091.
6. Shinmen Y., Asami S., Amashi T., Shimizu S., Yamada H. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 241. № 4. P. 247—249.
7. Сорокина Н. В., Гаврилова Е. М., Егоров А. М., Донецкий И. А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1985. № 4. С. 73—76.
8. Колосова Л. В., Ким Б. Б., Чередникова Т. В., Садашова Г. Г., Гаврилова Е. М., Егоров А. М. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 11. С. 1858—1863.
9. Stott D. I. // J. Immunol. Methods. 1989. V. 119. P. 153—187.

Поступила в редакцию  
5.I.1990

B. B. KIM, V. V. PISAREV, S. B. VLASENKO, A. M. EGOROV

#### INVESTIGATION AND IMMUNOANALYTICAL APPLICATION OF PEROXIDASE FROM *ARTHROMYCES RAMOSUS*

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Some biochemical and catalytic properties of peroxidase from *Arthromyces ramosus* (EC 1.11.7.1) in chemiluminescent reaction of luminol oxidation by hydrogen peroxide were investigated. The second order rate constants were determined by the stopped-flow technique. Optimal conditions to quantify the enzyme were found, the detection limit being  $5 \cdot 10^{-13}$  M. The peroxidase was used as a marker in the human IgG immunoassay.