



УДК 577.152.111*17.07

© 1990 г.

*А. Н. Еремин, О. Г. Петруша, В. Д. Матвеевцев,
Д. И. Метелица*

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТЕРОИДНЫХ КОНЬЮГАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ РАЗНОГО СОСТАВА В ВОДНЫХ И МИЦЕЛЛЯРНЫХ СРЕДАХ

Институт биоорганической химии АН БССР, Минск

Синтезированы конъюгаты пероксидазы хрена с антителами барана против IgG кролика, кортизолом и прогестероном, содержащие от 9 до 40 молекул стероида на молекулу фермента. В водной среде все конъюгаты по своей каталитической активности в реакции окисления *o*-фенилендиамина уступают нативному ферменту. В обращенных мицеллах Аэрозоля ОТ в гептане конъюгаты с кортизолом и прогестероном, содержащие 12 и 9 молекул стероида соответственно, характеризуются каталитическими константами, в 2,6 и 2,7 раза превышающими их значения для немодифицированного фермента. Обсуждено влияние гидрофобизации пероксидазы при модифицировании на каталитические свойства фермента.

Направленное изучение влияния химической модификации на структуру, каталитическую активность и стабильность ферментов весьма актуально, так как оно определяет подходы к созданию высокоактивных и устойчивых растворимых ферментных препаратов, что представляет не только теоретический, но и значительный практический интерес [1]. Во-первых, химически модифицированные растворимые ферменты имеют некоторые преимущества по сравнению с иммобилизованными, в частности проявляют более высокую каталитическую активность и обладают меньшей антигенностью, что важно для медицины. Во-вторых, конъюгаты ферментов с антигенами, полученные химической модификацией, широко используются в иммуноферментном анализе и в этом случае особенно важно сохранение максимально возможной активности биокатализатора после его модификации [2].

Видное место в иммуноферментном анализе занимает определение стероидов (кортизола, прогестерона, тестостерона, эстрадиола и др.). В связи с этим мы проводим систематическое изучение химической модификации ферментов (пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы) активированными производными стероидов [3—6]. Ограниченная растворимость некоторых стероидов в воде заставляет исследователей искать возможности их иммуноферментного анализа в неводных средах, в частности в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях [6]. Принципиальная возможность таких определений была продемонстрирована обнаружением весьма эффективного взаимодействия антигенов с антителами в обращенных мицеллах Аэрозоля ОТ (АОТ) в гептане [7].

Особенно важно, что с помощью обращенных мицелл ПАВ можно конструировать гомогенные иммуноферментные аналитические системы, в которых характер взаимодействия стероидного конъюгата фермента и антител против стероида резко отличается от такого взаимодействия в водной среде [6].

Задачей настоящей работы явилось систематическое изучение каталитической активности конъюгатов пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7, далее пероксидаза) с прогестероном и кортизолом в буферных растворах и обращенных мицеллах АОТ в гептане с целью выбора оптимального способа модифицирования пероксидазы стероидами, приводящего к по-

Кинетические характеристики окисления *o*-фенилендиамина перекисью водорода при участии пероксидазы и ее конъюгатов в буферном растворе (А) и обращенных мицеллах Аэрозоль ОТ в гептане (Б) при 20° С *

Шифр	R в конъюгате пероксидазы —R _n	n	V · 10 ⁷ , М · с ⁻¹		K _m · 10 ⁴ , М		k _{кат} · с ⁻¹	
			А	Б	А	Б	А	Б
Е	—	—	52,0	0,42	8,40	5,40	2600	136
I	АТ	—	43,0	0,34	5,20	1,70	2150	120
II	Прогестерон	9	40,0	0,91	6,00	4,00	2400	370
III	Кортизол	12	38,0	1,02	7,50	1,40	1960	350
IV	Прогестерон	13	29,8	0,40	4,80	4,90	1550	140
V	»	26	28,5	0,12	6,20	0,60	1760	50
VI	»	32	1,45	0,10	2,90	0,60	780	50
VII	»	40	1,05	—	1,40	—	620	—

* Условия определения: А — 2,0 мМ *o*-фенилендиамин, 1,0 мМ H₂O₂, 2,0 мМ фермент или конъюгат в 0,05 М фосфатном буфере, рН 4,7; Б — 0,15 М АОТ, [H₂O₂]/[АОТ] = 22,2, 3,0 мМ *o*-фенилендиамин, 4,0 мМ H₂O₂, 0,2 мМ фермент или конъюгат, 0,05 М фосфатный буфер, рН 4,7.

лучению высокоактивных и устойчивых форм фермента. Фундаментальный аспект задачи состоял в установлении связи между растущей по мере увеличения степени модифицирования белка гидрофобизацией конъюгатов и их каталитической активностью в водной и обращенно-мицеллярной средах.

Для сравнительного кинетического изучения пероксидазного окисления *o*-фенилендиамина в водной среде и обращенных мицеллах АОТ в гептане были получены 6 конъюгатов пероксидазы с прогестероном и кортизолом (пероксидаза-R_n, таблица) и конъюгат фермента со вторыми антигенами (бараны антигена против кроличьих иммуноглобулинов (АТ)), отличающийся высокой растворимостью в воде. Известно, что при 22° С молекула пероксидазы имеет на своей поверхности 4 ε-NH₂-группы лизина и 30 HO-групп серина, треонина и углеводных остатков, а также одну HO-группу тирозина, доступные для химической модификации белка ангидридами, тринитробензолсульфокислотой и имидоэфирами [1, 8]. При 40° С молекула фермента «разрыхляется» и для модификаторов становятся доступными все 6 ε-NH₂-групп лизина, 30 HO-групп серина, треонина и углеводных остатков и две HO-группы тирозина [8].

Учитывая эти данные, мы получили конъюгат Е—АТ (I) (таблица) по известной методике периодатного окисления углеводных остатков пероксидазы с последующим восстановлением образовавшихся Шиффовых оснований боргидридом натрия [9]. Задача введения в молекулу фермента 9 и более молекул прогестерона или кортизола сложнее, так как использованные нами активированные производные стероидов — N-оксисукцинимидные эфиры 3-О-карбоксиметилэксимов прогестерона или кортизола при 20—22° С легко реагируют со свободными NH₂-группами лизина и гораздо труднее с HO-группами серина, треонина и углеводных остатков. Поэтому мы применили несколько приемов предварительного введения свободных аминогрупп в молекулу пероксидазы для ее дальнейшего модифицирования сукцинимидными эфирами стероидов с целью сохранения максимально возможной активности исходного фермента (см. «Экспер. часть»).

Конъюгаты (II) и (III), содержавшие 9 молекул прогестерона и 12 молекул кортизола, получали из исходного фермента без его предварительной модификации, т. е. при комнатной температуре в реакцию вступали 4 ε-NH₂-группы лизина и от 5 до 8 свободных HO-групп, что вполне возможно при тех соотношениях модификатор / фермент, которые мы выбрали на основе ранее полученных данных [3—6]. Для обеспечения связывания 13 молекул прогестерона с пероксидазой фермент предварительно модифицировали, вводя дополнительные аминогруппы путем реакции свободных COOH-групп с диаминобутаном в присутствии водорастворимого карбодимида.

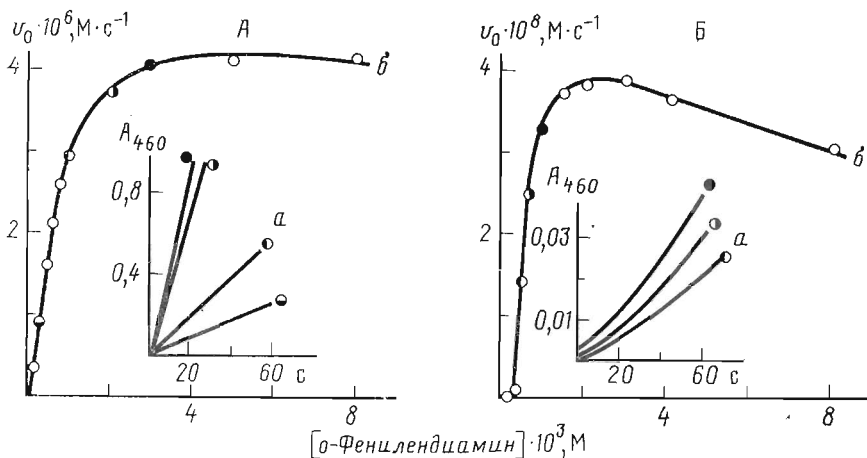


Рис. 1. Кинетика накопления продукта реакции (а) и зависимости начальной скорости пероксидазного окисления (б) *o*-фенилендиамина в водной среде (А) и обращенных мицеллах АОТ в гептане (Б) от концентрации субстрата при 20° С. Условия А и Б см. в примечании к таблице. Прямые на рисунках а отвечают исходным концентрациям *o*-фенилендиамина, обозначенным соответствующими точками на кривых б

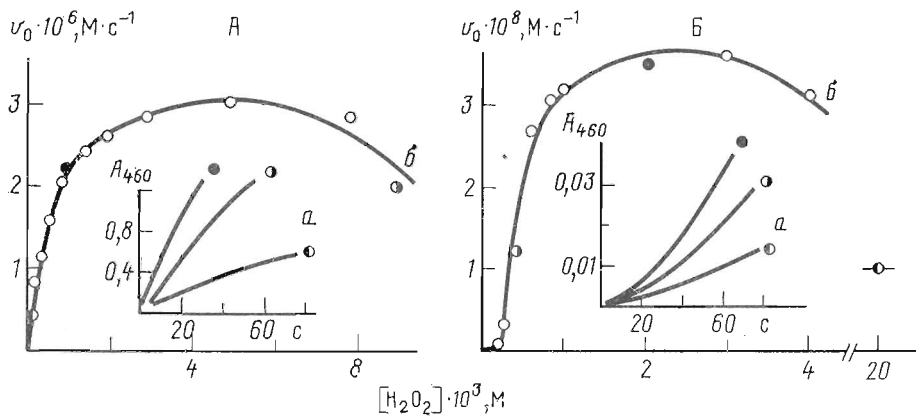


Рис. 2. Кинетика накопления продукта реакции (а) и зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-фенилендиамина (б) от начальной концентрации перекиси водорода в водной среде (А) и обращенных мицеллах АОТ (Б): концентрация *o*-фенилендиамина 2,0 (А) и 3,0 мМ (Б). Другие условия см. в подписи к таблице

Для получения конъюгата (V) дополнительные аминогруппы вводили в углеводную часть молекулы пероксидазы после ее периодатного окисления и реакции образовавшихся альдегидных групп с диаминобутаном.

В случае конъюгата (VI) фермент сначала модифицировали сукцинимидным эфиром прогестерона, затем вводили в него дополнительные аминогруппы реакцией COOH-групп с диаминобутаном в присутствии карбодимида и вновь модифицировали сукцинимидным эфиром прогестерона. Конъюгат (VII) получали после введения в белок новых аминогрупп по углеводному фрагменту и последующей модификации сукцинимидным эфиром стероида (см. «Экспер. часть»).

В результате были получены конъюгаты пероксидазы, содержащие 12 молекул кортизола и 9—40 молекул прогестерона на молекулу фермента.

Исходная пероксидаза и все полученные конъюгаты были использованы в качестве катализаторов окисления *o*-фенилендиамина в буферном растворе и обращенных мицеллах АОТ в гептане. Оптимальные значения рН, состав продуктов в обеих средах и особенности регуляции реакций в мицеллах АОТ определены нами ранее [10]. На рис. 1 представлены кинетические кривые роста оптического поглощения продукта окисления *o*-фенилендиамина в буферном растворе и обращенных мицеллах в при-

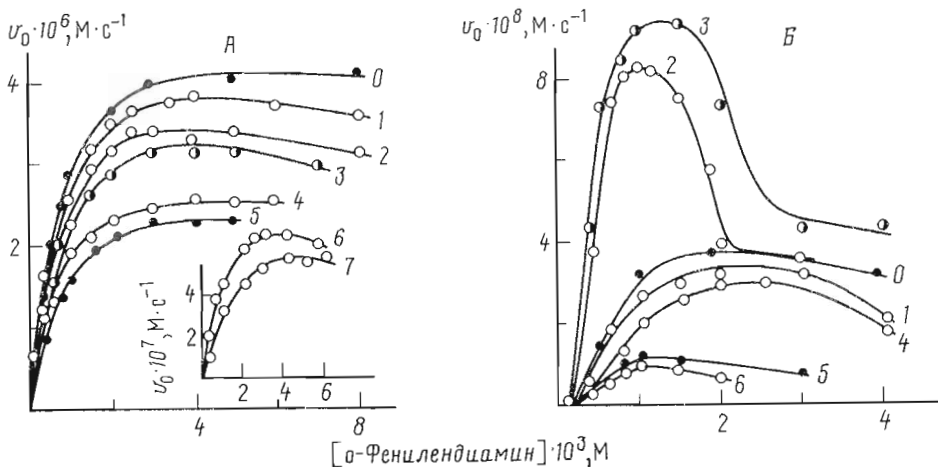


Рис. 3. Зависимости начальной скорости окисления *o*-фенилендиамина перекисью водорода от начальной концентрации субстрата в водной среде (А) и обращенных мицеллах АОТ (Б) в присутствии пероксидазы (0) и ее конъюгатов I (1), II (2), III (3), IV (4), V (5), VI (6) и VII (7). Условия см. в подписи к таблице

существовании пероксидазы. Здесь же приведены зависимости начальных скоростей окисления субстрата от его концентрации в буферном растворе (А) и мицеллах (Б). По методу Лайнуивера — Берка эти зависимости спрямлены и из них анаморфоз вычислены значения K_m и V для реакций в водной среде и обращенных мицеллах (таблица). Для мицеллярной системы уравнение Михаэлиса — Ментен описывает процесс только до концентраций *o*-фенилендиамина, равных 2,0 мМ. Большие концентрации субстрата ингибируют окисление его в мицеллах.

В присутствии H_2O_2 в больших концентрациях скорость окисления *o*-фенилендиамина пероксидазой и в водной среде и в обращенных мицеллах снижается (рис. 2), что характерно для пероксидазного катализа и связано с образованием ферментом неактивного в окислении так называемого комплекса (III) при избытке перекиси водорода [11].

На основании данных, представленных на рис. 1 и 2, выбраны оптимальные условия для окисления *o*-фенилендиамина, катализируемого пероксидазой, в водной среде (2,0 мМ субстрат и 1,0 мМ H_2O_2) и обращенных мицеллах (3,0 мМ субстрат и 4,0 мМ H_2O_2). В строго идентичных условиях получены зависимости начальных скоростей окисления *o*-фенилендиамина перекисью водорода от начальных концентраций субстрата при катализе реакции конъюгатами фермента в водной среде (А) и обращенных мицеллах АОТ (Б) (рис. 3). Все зависимости подчиняются уравнению Михаэлиса — Ментен и после их трансформации в координатах Лайнуивера — Берка были вычислены каталитические параметры процессов, приведенные в таблице. В мицеллярной системе для конъюгатов (II) и (III) наблюдается ингибирование избытком субстрата, поэтому в данных случаях уравнение Михаэлиса — Ментен применяли только до точек максимума начальной скорости окисления.

Из рис. 3 и таблицы следует, что все конъюгаты по своей каталитической активности в водной среде уступают немодифицированному ферменту. Ближе всего к нативной пероксидазе по своим каталитическим константам конъюгаты (I) — (III), так как в этих случаях фермент модифицируется или по углеводному фрагменту (I), или по $\epsilon-NH_2$ -группам лизина на поверхности белка (II, III) в отдалении от активного центра биокатализатора. Снижение активности конъюгатов с ростом числа модифицированных групп фермента можно объяснить несколькими причинами: 1) введение большого числа молекул прогестерона вызывает прогрессирующую необратимую инактивацию пероксидазы из-за возрастающей продолжительности контакта фермента с диметилформамидом (DMF), в котором растворен модификатор; 2) конформационные изменения белка

и его гидрофобизация возрастают с увеличением числа молекул стероида, введенных в фермент; 3) при растущем числе молекул прогестерона в белке они частично стерически блокируют доступ субстратов к активному центру пероксидазы. Оценить вклад каждой из трех причин в уменьшение активности конъюгатов пероксидазы в водной среде невозможно. Первая причина (необратимая инактивация белка из-за его контакта с растворителем) не является главной. Это подтверждается анализом активности конъюгатов в обращенных мицеллах (таблица).

В мицеллярной системе конъюгат (I), хорошо растворимый в воде, имеет меньшую каталитическую константу в сравнении с исходным ферментом. В то же время конъюгаты (II) и (III), при получении которых белок длительное время был в контакте с DMF, превышают по своей активности нативную пероксидазу в мицеллах в 2,7 и 2,55 раза соответственно. Это означает, что введение в пероксидазу 9 молекул прогестерона и 12 молекул кортизола вызывает конформационные изменения белка, благоприятно сказывающиеся на его каталитической функции в мицеллах, но не в водной среде. Дальнейшее увеличение степени модифицирования пероксидазы (конъюгаты (IV)—(VI)) приводит к падению ее каталитической активности в мицеллах. Таким образом, не отрицая возможной инактивации пероксидазы при модификации, можно утверждать, что связывание стероидов с белком существенно влияет на конформацию фермента.

Инактивирующее воздействие растворителя на пероксидазу не следует переоценивать, так как в ряде случаев в водно-диметилформамидных смесях активность ферментов возрастает [12, 13].

Что касается третьего фактора (стерических препятствий для субстратов), то он может сказываться только при введении в пероксидазу более 26 молекул прогестерона — конъюгаты (VI) и (VII). При получении конъюгатов (II)—(V) в соответствии с литературными данными [1, 8] модифицируются ϵ -NH₂- и HO-группы, находящиеся вдали от активного центра фермента.

В мицеллярной системе умеренная гидрофобизация биокатализатора (9—12 молекул модификатора) не только не снижает, но значительно увеличивает каталитическую активность конъюгатов, что можно объяснить расположением биокатализаторов на внутренней поверхности мицелл, а не внутри их, как это имеет место с самой пероксидазой или ее конъюгатом (I), хорошо растворимыми в полярной фазе мицелл.

Сравнение активности одних и тех же конъюгатов пероксидазы в водной среде и в обращенных мицеллах АОТ показывает значительное уменьшение их каталитических констант, однако не следует забывать, что использование мицелл открывает возможность регулирования скорости ферментативного процесса специальными добавками и изменением соотношения [H₂O] / [ПАВ] [10].

Проведенная работа показала перспективность изучения свойств гидрофобизированных конъюгатов пероксидазы в обращенных мицеллах не только для использования этих конъюгатов, но и при их возможном синтезе в мицеллярных системах.

Экспериментальная часть

В работе использовали кортизол и прогестерон (Sermed, ГДР), диаминобутан (Fegak, Зап. Берлин), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимида мето-*n*-толуолсульфонат (СМС), периодат натрия, натриевую соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ) (Serva, ФРГ), *o*-фенилендиамин отечественного производства (очищали возгонкой в вакууме), пергидроль (Союзреактив) (концентрацию определяли иодометрическим титрованием).

Антисыворотку барана (вторые антитела) против иммуноглобулинов кролика получали на Опытном производстве ИБОХ АН БССР (Минск), фракции вторых антител выделяли осаждением сульфатом аммония.

Концентрацию пероксидазы из корней хрена производства НПО «Биолар» (Олайне) (спектральный показатель чистоты $RZ = 2,67$) и ее конъюгатов определяли спектрофотометрически на приборе Spesord UV VIS (ГДР), используя коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{403} = 102 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [14].

N-Оксисукуцинимидные эфиры 3-О-карбоксиметилоскисом кортизола и прогестерона синтезировали по методике [15] с некоторыми модификациями. Органические растворители перед употреблением перегоняли, а буферные растворы готовили из солей, оснований и кислот марки х.ч. в бидистиллированной воде.

Синтез и характеристика конъюгатов пероксидазы. К 2,5 мл 89,0 мкМ раствора пероксидазы в воде приливали 0,08 мл 0,7 М раствора NaIO_4 , через 30 мин при 20° С добавляли 0,2 мл этиленгликоля, а еще через 20 мин 0,8 мл раствора фракции вторых АТ с содержанием белка 23,0 мг/мл. Начальное соотношение пероксидаза — АТ составляло 2 : 1. Смесь выдерживали 2,5 ч (20° С) при перемешивании, затем вносили 10 мг NaBH_4 и оставляли раствор на ночь при 4° С. Конъюгат (I) выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-150 (2 × 32 см), уравновешенным 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,4, +0,9 М NaCl , pH 7,4. По соотношению полос поглощения на длинах волн 280 и 403 нм рассчитывали состав конъюгата пероксидаза — АТ = 1 : 1. Конъюгат (I) хранили в водно-глицериновой смеси (1 : 1) при 4° С.

Конъюгаты (II) и (III), содержащие 9 и 12 молекул прогестерона и кортизола соответственно, синтезировали по методике [15]. Реакции проводили в смеси вода — DMF (1 : 1), содержащей 62,0 мкМ пероксидазу, 0,15 М NaHCO_3 и 3,1 мМ активированный эфир кортизола или 42,7 мкМ фермент, 0,1 М NaHCO_3 и 2,56 мМ активированный эфир прогестерона. Реакции проводили 4 ч (20° С) при перемешивании. Полученные конъюгаты диализовали против смеси дистиллированной воды и смеси вода — глицерин (1 : 1). Для определения числа связавшихся с ферментом молекул модификаторов снимали разностные спектры поглощения конъюгатов относительно немодифицированного фермента, уравнивая концентрации конъюгатов и пероксидазы по полосе Core (403 нм). Для расчета числа молекул модификатора на одну молекулу фермента использовали значение коэффициента молярного поглощения прогестерона (кортизола) $\epsilon_{250} = 16 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [16].

Для получения конъюгата (IV), содержащего 13 молекул прогестерона, фермент предварительно модифицировали диаминобутаном. Смесь, содержащую 0,1 М СМС, 48,0 мкМ пероксидазу и 0,1 М диаминобутан, выдерживали 3 ч при pH 5,5 и 20° С, затем диализовали против дистиллированной воды. К модифицированной пероксидазе (26,4 мкМ) в смеси вода — DMF (1 : 1) добавляли активированный эфир прогестерона до концентрации 1,32 мМ и NaHCO_3 (0,1 М), выдерживали 5 ч при перемешивании и 20° С, диализовали против воды и 50% глицерина. Состав конъюгата характеризовали методом разностной спектрофотометрии, как описано выше для конъюгатов (II) и (III).

Для получения конъюгата (V), содержащего 26 молекул прогестерона на молекулу белка, углеводные фрагменты пероксидазы предварительно окисляли периодатом натрия. К 1 мл раствора фермента (5 м) приливали 0,2 мл 0,1 М NaIO_4 и выдерживали смесь 25 мин при 20° С. К окисленной пероксидазе приливали 4,5 мл раствора, содержащего 0,3 М NaHCO_3 и 79 мМ диаминобутан. Спустя 2,5 ч добавляли 0,25 мл раствора NaBH_4 (4 мг/мл) и выдерживали смесь 1 ч при 4° С, диализовали против дистиллированной воды. Далее модифицировали фермент в смеси вода — DMF (1 : 1), содержащей модифицированную пероксидазу (6,2 мкМ), активированный эфир прогестерона (0,25 мМ) и 0,1 М NaHCO_3 . Реакции проводили 4 ч при 20° С. После диализа против дистиллированной воды и 50% глицерина конъюгат (V) характеризовали спектрально, как описано выше.

Для получения конъюгата (VI) фермент модифицировали в течение 4 ч при 20° С в 50% водном растворе DMF, содержащем 83,9 мкМ пероксидазу, 4,35 мМ активированный эфир прогестерона и 0,15 М NaHCO_3 . После диализа смесь из 0,1 М СМС, 31,4 мкМ модифицированной перо-

ксидазы и 0,1 М диаминобутана выдерживали 2 ч при pH 4,9 и 20° С, диализовали против дистиллированной воды и раствора полиэтиленгликоля 20 000 (для концентрирования препарата). На последней стадии к дважды модифицированному образцу пероксидазы (11,4 мкМ) добавляли эфир прогестерона и NaHCO₃ до концентрации 1,14 мМ и 0,1 М соответственно, выдерживали смесь 5 ч при 20° С. Препарат диализовали и хранили в 50% глицерина при 4° С.

Для получения конъюгата (VII) пероксидазу (5 мг в 1,2 мл) окисляли 25 мин периодатом натрия (4,3 мг). К смеси добавляли 4,5 мл раствора, содержащего 43 мкл диаминобутана и 148 мг NaHCO₃ и выдерживали ее 2,5 ч при 20° С, добавляли 0,25 мл раствора NaBH₄ (4 мг/мл) и выдерживали 1 ч при 4° С. Препарат диализовали против воды. К модифицированной пероксидазе (5,8 мкМ) добавляли раствор, содержащий эфир прогестерона и NaHCO₃ до концентраций 0,57 мМ и 0,1 М соответственно, и инкубировали смесь 4 ч при перемешивании (20° С). Конъюгат (VII) диализовали против воды и 50% глицерина.

За реакцией окисления *о*-фенилендиамина в водной среде и обращенных мицеллах (условия см. в примечании к таблице) следили спектрофотометрически по росту поглощения продукта окисления на длине волны 460 нм. При расчетах начальных скоростей реакции использовали молярный коэффициент поглощения 2,3-диаминофеназина (продукта реакции), равный 15 600 М⁻¹·см⁻¹ в буферном растворе с pH 4,7.

Авторы выражают благодарность Е. И. Карасевой (ИБОХ АН БССР, Минск) за синтез и характеристику конъюгата пероксидазы с вторыми антителами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутузова Г. А., Угарова Н. Н., Березин И. В. // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 11. С. 1852—1890.
2. Иммуноферментный анализ / Ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988. 444 с.
3. Карасева Е. И., Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 2. С. 198—203.
4. Еремин А. Н., Карасева Е. И., Метелица Д. И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1989. Т. 25. № 4. С. 524—531.
5. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1326—1333.
6. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Докл. АН БССР. 1989. Т. 33. № 10. С. 932—935.
7. Еремин А. Н., Савенкова М. И., Метелица Д. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 606—612.
8. Кутузова Г. Д. Влияние химической модификации функциональных групп ферментов на их структуру и стабильность (на примере пероксидазы хрена). Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1981. 17 с.
9. Wilson M. B., Nakane P. K. // J. Immunol. Meth. 1976. V. 12. № 1. P. 171—181.
10. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 1. С. 102—108.
11. Nakajima R., Yamazaki I. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 6. P. 2576—2581.
12. Viola R. E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 288. № 2. P. 415—424.
13. Карасева Е. И. Оптимизация использования глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в иммуноферментном анализе. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Тарту: Тартуский гос. университет, 1989. 21 с.
14. Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 9. P. 2166—2172.
15. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 1839—1842.
16. Blanford A. T., Wittman W., Stroupe S. D., Westphal U. // J. Steroid Biochem. 1978. V. 9. P. 187—189.

Поступила в редакцию
14.II.1990

CATALYTIC ACTIVITY OF VARIOUS STEROID-PEROXIDASE
CONJUGATES IN AQUEOUS AND MICELLAR MEDIA

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

The horseradish peroxidase (HRP) conjugates with the sheep antirabbit antibodies and cortisol (COR) or progesterone (PROG) containing 9 to 40 steroid molecules per HRP molecule were synthesized. In aqueous media all the conjugates have lower catalytic activity in the *o*-phenylenediamine oxidation than the native enzyme. In reversed Aerosol OT micelles in heptane the HRP — COR and HRP — PROG conjugates containing 12 and 9 steroid molecules, respectively, have catalytic constants 2.6 and 2.7 times higher than the unmodified enzyme. The influence of the HRP hydrophobisation and its inactivation on the course of modification on catalytic properties of the enzyme is discussed.