



УДК 577.152.1103:577.175.534.083.3:541.182

© 1992 г. *Е. И. Карасев, А. Н. Ережин, Д. И. Метелица***КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ
ПЕРОКСИДАЗЫ И ЕЕ КОНЬЮГАТОВ С КОРТИЗОЛОМ
В ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ АЭРОЗОЛЯ ОТ***Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск*

В результате реакции пероксидазы хрена с N-оксисукцинимидным эфиром 3-О-карбоксиметилноксима кортизола (Cог*) получены конъюгаты, содержащие 1, 6, 11 молекул кортизола на молекулу фермента. Изучена активность конъюгатов пероксидазы хрена и их иммунокомплексов с антителами против кортизола при окислении о-фенилендиамина в обращенных мицеллах аэрозоля ОТ в гептане при различной степени гидратации мицелл (w_0). Показано, что каталитическая активность пероксидазы и ее конъюгатов, с одной стороны, и иммунокомплексов пероксидазы с антипероксидазой или конъюгатов с антителами против кортизола, с другой — сильно различается и различным образом зависит от степени гидратации мицелл АОТ. Эти различия стали основой методики гомогенного иммуноферментного анализа кортизола в среде обращенных мицелл АОТ в гептане.

Направленное изучение влияния химической модификации на структуру, каталитическую активность и стабильность ферментов определяет подходы к созданию высокоактивных и устойчивых растворимых ферментных препаратов, что представляет не только фундаментальный, но и значительный практический интерес [1]. Например, конъюгаты ферментов с антигенами широко используются в иммуноферментном анализе (ИФА) [2]. Видное место в ИФА принадлежит определению стероидных гормонов. В связи с этим мы проводим систематическое изучение химической модификации ферментов (пероксидаза, каталаза, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа) активированными производными стероидов [3–6]. Плохая растворимость некоторых стероидов в воде вынуждает исследователей искать возможность их иммуноферментного определения в неводных средах, в частности в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях. Показано, что взаимодействие конъюгатов антиген — фермент с антителами против определяемого антигена в обращенных мицеллах изменяется в зависимости от состава мицелл, объема полярной фазы, температуры, концентрации белка в системе [6–9]. Специфическое поведение иммунных комплексов в обращенных мицеллах АОТ положено в основу гомогенных методов ИФА прогестерона [6, 7] и тироксина [9].

В работах [6–9] иммунные комплексы получали путем взаимодействия антигенов с антителами непосредственно в среде обращенных мицелл АОТ в органическом растворителе. Целью настоящей работы является

Сокращения: Cог — кортизол; Cог* — N-оксисукцинимидный эфир 3-О-карбоксиметилноксима кортизола; аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты; ПАВ — поверхностно-активное вещество; AS и fAS — антисыворотка и фракционированные из нее антитела против пероксидазы; AB и fAB — антисыворотка и фракционированные из нее антитела против кортизола; PDA — о-фенилендиамин; DMF — диметилформамид. ИФА — иммуноферментный анализ.

исследование каталитических свойств иммунных комплексов пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7, далее пероксидаза), а также иммунных комплексов конъюгатов этого фермента с кортизолом разного состава, полученных в водной среде и перенесенных в обращенно-мицеллярные системы АОТ в гептане. Исследованы иммунные комплексы пероксидазы с антисывороткой против нее (AS) или с фракционированными из антисыворотки антителами (fAS) и иммунные комплексы конъюгатов пероксидазы с кортизолом (I, II, III), содержащие 1,6 или 11 молекул кортизола соответственно, с антисывороткой против кортизола (AB) или с фракционированными антителами из этой сыворотки (fAB).

Иммунные комплексы фермента обозначаются далее как [E:AS] или [E:fAS]. Иммунные комплексы конъюгатов (I–III) обозначаются по той же схеме: [I:AB], [II:AB], [III:AB] или [I:fAB], [II:fAB] и [III:fAB].

Каталитическая активность всех полученных иммунных комплексов была исследована в реакции пероксидазного окисления *o*-фенилендиамина (PDA) в среде обращенных мицелл АОТ в гептане в зависимости от параметра $w_0 = [H_2O]/[АОТ]$, определяющего размеры и физико-химические свойства обращенных мицелл, а также функциональное состояние включенных в мицеллы белков [10, 11].

Известно, что в зависимости от условий пероксидаза имеет на поверхности белковой глобулы до 6 ϵ -аминогрупп лизина и 30 HO-групп серина, треонина, углеводных остатков, которые могут быть доступны для ковалентной модификации ангидридами, тринитробензолсульфокислотой и имидоэфирами [12]. Вследствие этого конъюгаты, содержащие от 1 до 11 молекул кортизола на молекулу белка, получали, изменяя соотношение между количествами пероксидазы и ее модификатора, N-оксисукцинимидного эфира 3-O-карбоксиметилоксима кортизола (Cor'), а также содержание DMF в реакционной среде. Отношение [E]/[кортизол] вычисляли из разностных спектров поглощения конъюгатов относительно немодифицированной пероксидазы, используя коэффициент молярного поглощения для кортизола $\epsilon_{250} = 16 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13]. Оказалось, что при начальном соотношении [Cor']/[E], равном 4, и содержании DMF в среде, равном 5%, к молекуле фермента, по среднестатистическим данным, присоединяется 1,2 молекулы модификатора [конъюгат (I)]; при соотношении реагентов, равном 20 и 10% DMF — 5,6 молекулы [конъюгат (II)], а при соотношении 50 и 50% DMF — 11,1 молекулы [конъюгат (III)].

Для пероксидазы и ее конъюгатов с кортизолом были измерены начальные скорости окисления PDA перекисью водорода в водном растворе и обращенных мицеллах АОТ в гептане. Полученные значения отнесены к начальным концентрациям биокатализаторов и вычислены условные каталитические константы, приведенные в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что при малой степени модифицирования пероксидазы наблюдается активация фермента как в водной среде, так и в мицеллах. С ростом степени модифицирования фермента его активность в обеих средах снижается, что связано с гидрофобизацией поверхности белка [14]. Активность самой пероксидазы и ее конъюгатов в мицеллах АОТ в оптимальных условиях существенно ниже, чем в водной среде.

Одним из важнейших способов регуляции каталитической активности ферментов в обращенных мицеллах является изменение соотношения воды и ПАВ (w_0) [10, 11]. На рис. 1 представлены данные зависимости начальной скорости окисления PDA от w_0 для пероксидазы, иммунного комплекса [E:fAS] и смесей фермента с неспецифическими антителами к кортизолу. Зависимость для фермента имеет обычный вид и характеризуется максимумом в области $w_0 \approx 16$ –17.

Каталитическая активность пероксидазы хрена и ее конъюгатов с кортизолом при 25° С в буферном растворе (А) и в обращенных мицеллах аэрозоля ОТ в гептане (Б)

Биокатализатор	А		Б	
	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	активность, %	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	активность, %
Е	2500	100	523	100
I	4075	163	666	127
II	2100	84	266	50
III	740	30	186	36

Условия определения: 0,1—10,0 мМ PDA, А — 1,0 мМ H_2O_2 , 0,5 нМ фермент или конъюгат в 0,05 М фосфат-цитратном буфере, pH 4,6; Б — 0,2 М АОТ, $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 19,44$, 2,0 мМ H_2O_2 , 0,3 нМ фермент или конъюгат, 0,05 М фосфат-цитратный буфер, pH 4,6.

Между радиусом мицелл и отношением w_0 установлена эмпирическая связь [15]:

$$r_m(A) = 4 + 1,5w_0. \quad (1)$$

По уравнению (1) можно оценить радиус мицеллы, содержащей белок сферической формы. В случае пероксидазы $w_0 = 17$, а $r_m = 29,5$ А. Полученная величина хорошо соответствует радиусу молекулы пероксидазы, равному 31,1 А [16], т. е. размер мицеллы близок к размеру содержащейся в ней пероксидазы.

Антитела против пероксидазы сильно ингибируют ее активность в мицеллах и вызывают появление еще четырех максимумов на зависимости скорости реакции, катализируемой иммунным комплексом $[E:fAS]$ от w_0 (рис. 1, 2). Для сферических белков показано, что значение w_0 связано с молекулярной массой солибилизованного белка (M) эмпирическим соотношением [17]:

$$w_0 = (0,083 \pm 0,008) \sqrt{M}. \quad (2)$$

По уравнению (2) можно оценить оптимальную величину w_0 для фермента Е (табл. 2). Такая оценка для иммунного комплекса с соотношением компонентов 1:1 дает $w_0 \approx 36$, что хорошо соответствует одному из максимумов на рис. 1, 2, т. е. первый максимум на этой зависимости относится собственно к пероксидазе, а последний — к ее иммунному комплексу с антителами против фермента. Строгое сопоставление второго, третьего и четвертого максимумов с определенными белковыми агрегатами затруднительно: не исключено, что такие агрегаты могут образовывать фрагменты антител, распадающихся в мицеллах, или примесные белки, присутствующие во фракции антител против пероксидазы. Неспецифические антитела (fAB) и антисыворотка против кортизола (AB) сильно воздействуют на зависимость скорости пероксидазного окисления PDA от w_0 (рис. 1, 3 и 4), т. е. пероксидаза способна образовывать весьма устойчивые в мицеллах агрегаты с другими белками.

Существенно, что иммунному комплексу пероксидазы с двумя молекулами антител против нее $[E:(fAS)_2]$ должен соответствовать максимум при значении $w_0 \approx 48$, однако экспериментально такого максимума не получено (рис. 1, 2), что означает отсутствие в мицеллах иммунного комплекса такого состава.

На рис. 2 сопоставлены зависимости начальной скорости окисления PDA в обращенных мицеллах при катализе реакции конъюгатами перок-

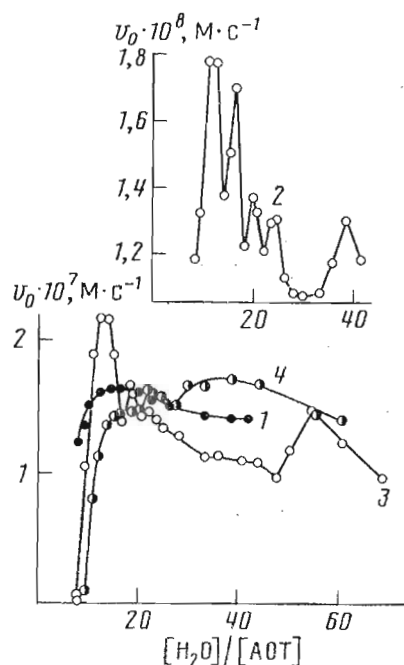


Рис. 1. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления PDA при 25°C от соотношения $[H_2O]/[AOT]$ при катализе реакции пероксидазой (1), ее иммунокомплексом [E:fAS] (2) и смесями пероксидазы с fAB (3) и AB (4). Условия см. в «Экспер. части» и в подписи к табл. 2

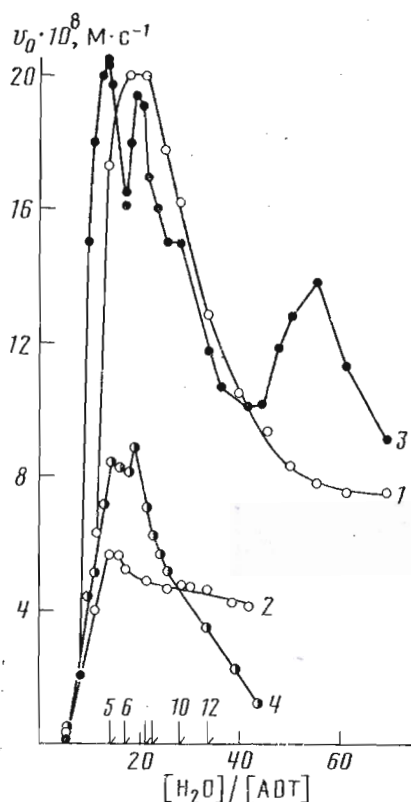


Рис. 2. Зависимость начальной скорости окисления PDA от w_0 при катализе реакции конъюгатами пероксидазы с кортизолом (I) и (III) (кривые 1 и 2 соответственно) и их иммунокомплексами [I:AB] (3) и [III:fAB] (4). Условия см. в «Экспер. части» и в подписи к табл. 2

сидазы с кортизолом и их иммунными комплексами. В случае конъюгата (I) рассчитанная величина $w_0 = 16,7$ близка к экспериментальной, равной 20, с учетом возможной неспецифичности модифицированного белка. В случае конъюгата (III) экспериментальная величина 13,5 несколько ниже расчетной (17,5). Иммунные комплексы конъюгата (I) с антителом против кортизола характеризуются сложным профилем зависимости начальной скорости реакции от w_0 : имеются три четко выраженных максимума (рис. 2, 3 и табл. 2), второй из которых может соответствовать самому конъюгату, а третий — его иммунокомплексу.

В случае конъюгата (III) образование иммунокомплекса также сильно меняет характер зависимости начальной скорости реакции от w_0 (рис. 2, 2 и 4). Большее число максимумов на зависимости 3 в сравнении с зависимостью 4 может быть связано с использованием цельной сыворотки (AB) в первом случае и фракционированных антител (fAB) во втором.

Наиболее существенная особенность зависимостей скорости реакции пероксидазного окисления PDA от w_0 для иммунных комплексов конъюгатов фермента с кортизолом в сравнении с той же зависимостью для самих конъюгатов — наличие областей, в которых ферментативная актив-

Таблица 2

Расчитанные и экспериментальные значения ν_0 при пероксидном окислении PDA в обращенных мицеллах AOT в гептане

Каталитическая система	Mг	Значения ν_0					
		расчитанные *			экспериментальные		
E	40 000	16,6			17,0		
Иммунокомплекс [E:fAB]	190 000		36,2 (1:1)	48,4 (1:2)	12,0	24,0	39,0
Смесь E+fAB					13,0		
Конъюгат (I)	40 500	16,7			18,1		55,5
Иммунокомплекс [I:fAB]	195 000				13,9		
Конъюгат (II)	42 335	17,1			15,5		55,5
Иммунокомплекс [II:fAB]	192 335		36,4 (1:1)	48,6 (1:2)	13,9	26,4	
Конъюгат (III)	44 629	17,5			13,5		
Иммунокомплекс [III:fAB]	194 629		36,6 (1:1)	48,7 (1:2)	13,9	19,0	

Условия определения: 0,2 M AOT; $[H_2O_2]/[AOT] = 1,1-69,44$; 4 мм PDA; 2 мм H_2O_2 ; 0,3 mM фермент (конъюгат); разведение AB, fAB, fAS — 1:10 000; 0,05 M фосфат-цитратный буфер; pH 4,6; 25° C.

* В скобках приведено молярное соотношение компонентов в комплексе.

ность иммунокомплекса сильно отличается от активности конъюгата (рис. 2). В случае конъюгата (I) активность его иммунокомплекса в области $w_0 \approx 53$ почти в 2 раза выше активности самого конъюгата. Для конъюгата (III) такая область находится при $w_0 \approx 20$. В то же время имеются области, где зависимость активности обращается: так, при $w_0 \approx 40$ активность конъюгата (III) много выше активности его иммунокомплекса.

Таким образом, можно модулировать активность конъюгатов пероксидазы в составе иммунокомплексов в противоположных направлениях, меняя влажность обращенных мицелл. Регуляция активности пероксидазы в надмолекулярных структурах, образованных самим ферментом или его конъюгатами с антителами против фермента (или определяемого антигена), создает основу для конструирования гомогенных методов иммуноферментного анализа, что было использовано при ИФА-определении прогестерона [6, 7] и тироксина [9].

Важным фактором, воздействующим на характер зависимости пероксидазной активности иммунокомплексов от w_0 , является температура. На примере иммунокомплекса [II: IAB] видно (рис. 3), что с ростом температуры наблюдается снижение уровня первого максимума, сдвиг значений максимумов и значительный рост скорости реакции, связанный как с увеличением температуры, так и с разрушением обращенных мицелл при ее повышении. Сильное влияние температуры на характер зависимости активности иммунокомплексов от w_0 необходимо учитывать при конструировании гомогенных ИФА-систем в обращенных мицеллах.

В практике ИФА очень важен выбор оптимальной концентрации антител. Учитывая сильное влияние степени гидратации обращенных мицелл на каталитическую активность иммунных комплексов (рис. 2, 3), мы систематически изучали зависимость каталитической активности иммунных комплексов двух конъюгатов (I) и (III) от концентрации антител IAB в условиях возрастающей гидратации мицелл (рис. 4). Из приведенных данных следует, что при низких степенях гидратации активность иммунных комплексов обоих конъюгатов возрастает с увеличением концентрации антител, а затем достигает предельного значения (рис. 4, I и I'). Иммунный комплекс конъюгата (I) при 7,5% полярной фазы мало меняет свою активность с ростом содержания антител в мицеллярной системе. При большей степени гидратации (выше 8% полярной фазы) каталитическая активность обоих иммунных комплексов уменьшается с ростом содержания антител, достигает минимума, а затем снова увеличивается при дальнейшем росте концентрации IAB. Концентрации антител, соответствующие минимуму каталитической активности иммунных комплексов, целесообразно использовать, конструируя гомогенные ИФА-системы.

С учетом этого обстоятельства изучено влияние свободного кортизола на взаимодействие конъюгатов (II) и (III) с антителами против кортизола в обращенных мицеллах АОТ в гелтане (рис. 5). Исследование проведено при средней увлажненности мицелл (a) и высокой степени их гидратации (б).

Из рис. 5 видно, что при малой степени гидратации мицелл (a) каталитическая активность системы снижается с ростом концентрации свободного кортизола. С повышением температуры этот эффект сглаживается и исчезает совсем при 46 и 52° С (3, 4). Влияние свободного кортизола более эффективно сказывается на каталитических свойствах иммунокомплекса конъюгата (III) (рис. 5а, 5). В этом случае при малой влажности мицелл каталитическая активность обоих конъюгатов ниже каталитической активности их иммунокомплексов. Поэтому кортизол в растущих концентрациях вытесняет конъюгаты (II) и (III) из имму-

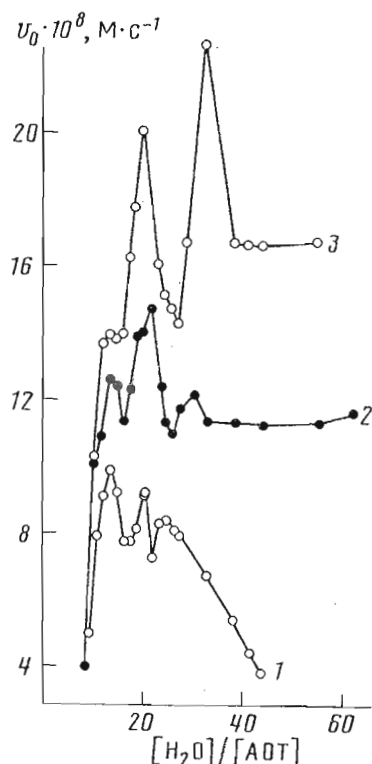


Рис. 3. Зависимость начальной скорости окисления PDA от w_0 в катализе реакции иммунокомплексом [II:fAB] при температуре 25 (1), 46 (2) и 52°С (3). Условия см. в «Экспер. части» и в подписи к табл. 2

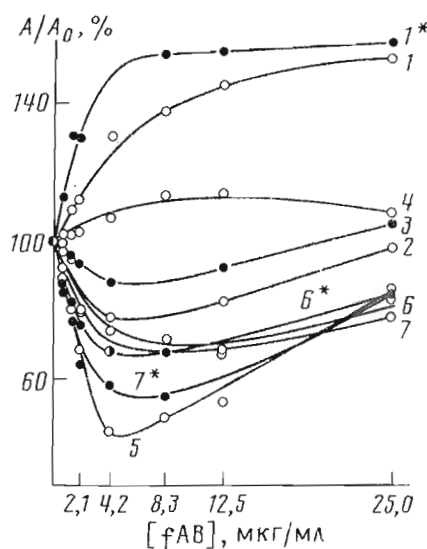


Рис. 4. Зависимость каталитической активности иммунокомплексов [I:fAB] (1, 2, 4-7) и [II:fAB] (1*, 3, 6*, 7*) в окислении PDA в обращенных мицеллах AOT в гептане от начальной концентрации антител fAB при получении иммунокомплексов. Содержание полярной фазы в %: 1, 1* — 5,06; 2 — 6,0; 3 — 6,5; 4 — 7,5; 5 — 8,0; 6, 6* — 10,0; 7, 7* — 12,0. Другие условия см. в «Экспер. части» и в подписи к табл. 2

нокомплексов и, таким образом, снижает общую пероксидазную активность системы. При повышении температуры мицеллы разрушаются и не модулируют больше активность иммунных комплексов, которая не отличается от активности конъюгатов, входящих в их состав. Поэтому при 46 и 52°С свободный кортизол практически не меняет общей пероксидазной активности системы.

При большой степени гидратации мицелл AOT (б) наблюдается противоположная картина. В этих условиях активность конъюгатов много выше активности иммунных комплексов, включающих эти конъюгаты. Поэтому свободный кортизол, вытесняющий конъюгаты из иммунных комплексов, способствует повышению общей каталитической активности мицеллярной системы. Для обоих конъюгатов мы наблюдаем зависимость A/A_0 от свободного кортизола, обратную той, что получена при малых степенях гидратации мицелл. Разрушение мицелл при 46 и 52°С приводит к отсутствию влияния кортизола на общую пероксидазную активность мицеллярной системы (рис. 5б, 3 и 4), так как исчезает модулирующее воздействие мицелл на иммунный комплекс.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что модифицирование пероксидазы и его степень, с одной стороны, и надмо-

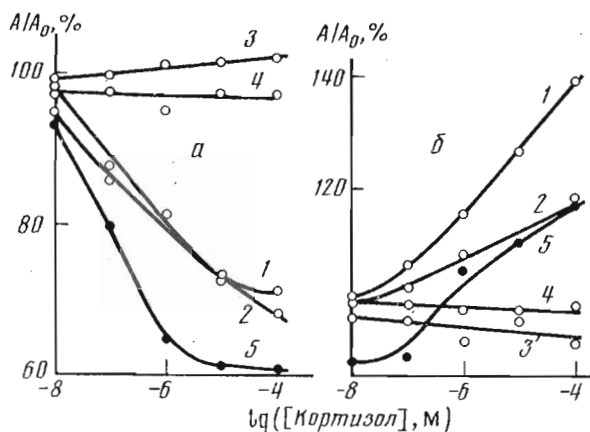


Рис. 5. Влияние свободного кортизола на суммарную пероксидазную активность мицеллярных систем, включающих в себя конъюгаты (II) (1-4) и (III) (5) и их иммунокомплексы с ПАВ при содержании полярной фазы 5% (а) и 12% (б): 1 и 5 — 25, 2 — 36, 3 — 46, 4 — 52° С. Другие условия см. в «Экспер. части» и в подписи к табл. 2

лекулярная организация иммунных комплексов пероксидазы или ее конъюгатов в обращенных мицеллах, с другой — существенно сказываются на начальных скоростях пероксидазного окисления PDA и их зависимости от степени гидратации мицелл AOT. Модифицированная пероксидаза, иммунокомплексы самого фермента или его конъюгатов являются новыми биокатализаторами по двум причинам.

Во-первых, изменяется геометрический размер биокатализатора, что само по себе меняет условия его оптимального функционирования в мицеллах [10, 11].

Во-вторых, мицеллы разной влажности в различной степени влияют на каталитические свойства конъюгатов или надмолекулярных структур их иммунокомплексов и это влияние может быть противоположным по своему направлению. Важная роль надмолекулярной организации белков в мицеллах доказана на примерах изменения каталитической активности в зависимости от влажности мицелл для таких субъединичных ферментов, как лактатдегидрогеназа [18] и γ -глутамилтрансфераза [19]. Олигомерные ферменты характеризуются несколькими максимумами на зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ, которые соответствуют, например, мономеру, димеру, тетрамеру и октамеру из субъединиц лактатдегидрогеназы [18]. Гетеродимерный фермент (γ -глутамилтрансфераза) обнаруживает на зависимости активности от w_0 максимумы, соответствующие массам разных субъединиц фермента, которые могут менять свою специфичность [19].

Результаты нашей работы и исследований других авторов [9, 18, 19] свидетельствуют о больших возможностях регуляции активности ферментов и их надмолекулярных структур в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях.

Как указывалось выше, на зависимостях скорости пероксидазного окисления, катализированного пероксидазой, ее конъюгатами и их иммунокомплексами, от w_0 имеются максимумы, соответствующие молекулам разной массы (табл. 2). При объяснении различий между рассчитанными значениями w_0 и их экспериментальными величинами следует иметь в виду возможные отклонения молекул солиubilизированных белков от сферической формы, а также их возможное ассоциирование с при-

месными белками антисыворотки или фракционированных антител. Наши данные (рис. 1, 3 и 4) подтверждают устойчивость неспецифических комплексов пероксидазы с антителами против кортизола.

Можно уверенно сказать, что в мицеллах не имеется иммунных комплексов пероксидазы или ее конъюгатов с двумя молекулами антител (табл. 2). Однозначно трудно объяснить природу максимума $w_0 \approx 12-13,9$, который обнаруживается в большинстве систем. Скорее всего он может принадлежать одному из доменов фермента, который образуется в мицеллах вследствие деструкции [20] и имеет гем, ответственный за каталитическую активность фрагментированной пероксидазы, тогда как целой молекуле должен соответствовать максимум активности в мицеллах с $w_0 \approx 16,6-17,0$ (табл. 2).

Сильное влияние гидратации мицелл на активность конъюгатов пероксидазы и их иммунных комплексов служит основой для разработки метода гомогенного ИФА кортизола (рис. 5). Однако следует отметить высокую лабильность этой ИФА-системы, так как на суммарную пероксидазную активность исследованных соединений влияют состав полярной фазы и ее объем, температура и другие условия, что затруднит стандартизацию определения антигена в сыворотке крови или в других биологических жидкостях, содержащих белки, которые несомненно будут влиять на общий уровень пероксидазной активности мицеллярной системы, забирая на себя часть воды внутри мицелл или образуя ассоциаты с конъюгатом и его иммунокомплексом.

Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7) производства «Биолар» (Олайне) со спектральным показателем чистоты $RZ=2,7$. Концентрацию фермента и его конъюгатов определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции полосы Core (403 нм), равный $102 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [21]. В качестве субстрата применяли о-фенилендиамин Харьковского химико-фармацевтического завода, в качестве окислителя — разбавленный пергидроль («Союзреактив»), определяя концентрацию пероксида водорода иодометрическим титрованием. Использовали кортизол и аэрозоль ОТ фирмы Serva (ФРГ).

Антисыворотку против кортизола (АВ) получали с Опытного производства ИБОХ АН Беларуси (Минск). Константа ассоциации АВ с радиоактивно меченным кортизолом (^{125}I -Cor) равнялась при комнатной температуре 10^{-10} М^{-1} . Из АВ фракционированием сульфатом аммония выделяли антитела против кортизола (fAB).

N-Оксисукцинимидный эфир 3-О-карбоксиметил оксима кортизола (Cor*) получали по методикам [22, 23].

Синтез конъюгатов пероксидазы с кортизолом проводили по методике [23] с некоторыми модификациями. Водный раствор, содержащий $0,3 \text{ М}$ NaHCO_3 (рН 8,35), от 5 до 50% DMF, $0,134 \text{ мМ}$ пероксидазу и от $0,736$ до $9,2 \text{ мМ}$ Cor*, выдерживали 4 ч при $22-24^\circ \text{ С}$ и постоянном перемешивании. Полученные конъюгаты диализовали против дистиллированной воды, а затем против $0,1 \text{ М}$ фосфатного буфера, рН 7,4, содержавшего 40% (весовых) глицерина.

Иммунные комплексы пероксидазы или ее конъюгатов получали и их включение в обращенные мицеллы АОТ в гептане проводили следующим образом. Смесь, содержащую 72 нМ пероксидазу или конъюгатов (I—III), $0,97 \text{ мкг/мл}$ (разведение 1:50) антисыворотки против кортизола или 25 мкг/мл fAB в 1 мл воды, выдерживали 1 ч при 25° С . Затем отбирали аликвоты по 5–7 мкл и солибилизировали их в растворе АОТ

(0,2 М) в свежеперегнанном гептане, содержащем от 2 до 25% (v/v) полярной фазы.

При проведении пероксидазного окисления PDA в мицеллах полярная фаза включала в себя 4,0 мМ PDA и 2,9 мМ фосфат-цитратный буфер, pH 4,6.

Мицеллярные системы выдерживали 5 мин при 25°С и начинали реакцию в них добавлением пероксида водорода в конечной концентрации 2,0 мМ. Пероксидазное окисление PDA в обращенных мицеллах АОТ характеризовали начальными скоростями накопления продукта реакции 2,3-диаминофеназина с максимумом поглощения при 460 нм ($\epsilon=15\,600\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [24]). За реакцией следили спектрофотометрически на приборе КФК-2-УХЛ 4,2.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук В. П. Мартинович за синтез Сог* и канд. биол. наук М. И. Савенковой (ИБОХ АН Беларуси) за предоставление антисыворотки против пероксидазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутузова Г. Д., 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. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1236–1333.
6. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Докл. АН БССР. 1989. Т. 33. № 10. С. 932–935.
7. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // XIV Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Ташкент, 1989. Т. 1. С. 433.
8. Еремин А. Н., Савенкова М. И., Метелица Д. И. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 606–612.
9. Кабанов А. В., Хруцкая М. М., Будавари М. И., Еремин С. А., Клячко Н. Л., Левашов А. В. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. № 5. С. 1253–1256.
10. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112–158.
11. Метелица Д. И., Еремин А. Н. // Успехи биол. химии. 1988. Т. 28. С. 145–173.
12. Угарова Н. Н., Лебедева О. В., Савицкий А. П. Пероксидазный катализ и его применения. М.: Изд. МГУ, 1981. С. 92.
13. Blanford A. T., Wittman W., Stroupe S. D., Westphal U. // J. Steroid Biochem. 1978. V. 9. № 1. P. 187–189.
14. Карасева Е. И., Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1990. Т. 26. № 3. С. 341–348.
15. Eicke H.-F., Rehak J. // Helv. chim. acta. 1976. V. 59. P. 2883–2891.
16. Sandwick R. K., Schray K. J. // J. Colloid and Interface Sci. 1987. V. 115. № 1. P. 130–138.
17. Курганов Б. И., Цетлин Л. Г., Малахова Э. А., Чеботарева Н. А., Ланкин В. З., Левашов А. В., Глебова Г. Д., Березовский В. М., Мартишек К., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 5. С. 1263–1267.
18. Клячко Н. Л., Мерхер Ш., Вакула С. В., Иванов М. В., Березин И. В., Мартишек К., Левашов А. В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 1479–1481.
19. Kabanov A. V., Nametkin S. N., Evtuschenko G. N., Chernov N. N., Klyachko N. L., Levashov A. V., Martinek K. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 966. № 1. P. 147–152.
20. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 10. С. 1612–1613.
21. Shanon L. M., Kay E., Lew J. Y. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 9. P. 2166–2172.
22. Janovski A. H. // Steroids. 1974. V. 23. № 1. P. 49–59.
23. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 8. P. 1839–1842.
24. Метелица Д. И., Савенкова М. И., Курченко В. П. // Прикл. биохимия и микробиол. 1987. Т. 22. № 1. С. 116–124.

Поступила в редакцию
26.II.1991

После доработки
8.X.1991

**CATALYTIC ACTIVITY OF IMMUNE COMPLEXES OF PEROXIDASE
AND ITS CONJUGATES WITH CORTISOL IN REVERSED MICELLES
OF AEROSOL OT**

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Byelarus, Minsk

Conjugates containing 1, 6 or 11 cortisol molecules per peroxidase molecule were obtained by the reaction of the N-hydroxysuccinimide ester of cortisol 3-O-carboxymethyloxime (COR) with horse-radish peroxidase (HRP). Activities of the peroxidase conjugates and their immunocomplexes with antibodies against cortisol in the ortho-phenylenediamine oxidation in reversed Aerosol OT micelles in heptane at various hydration degrees of the micelles (w_0) were studied. Catalytic activities of HRP and its conjugates, on one hand, and of the immunocomplexes of HRP with anti-HRP and the conjugates with antibodies against cortisol, on the other hand, differed significantly and depended in a different manner on the hydration degree of AOT micelles. These differences became the basis of a homogeneous enzyme-immunoassay of cortisol in the reversed micelles of AOT in heptane.