



УДК 541.182 : 577.152.11 [083.3]

© 1991 г.

*А. Н. Еремин, Е. И. Карасева***СВОЙСТВА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ—ДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
И ЕЕ КОНЪЮГАТОВ С ПРОГЕСТЕРОНОМ В ВОДНОЙ  
И МИЦЕЛЛЯРНОЙ СРЕДАХ***Институт биоорганической химии АН БССР, Минск*

Изучено влияние состава конъюгатов глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы с прогестероном (PRG) на их каталитическую активность, термостабильность и характер взаимодействия с антисывороткой против прогестерона (анти-PRG) в водной среде и обращенных мицеллах, сформированных из Аэрозоля ОТ и тритона X-45 в гептане. Показано, что DMF является оптимальной добавкой в водную среду при синтезе конъюгатов. Модифицированный стероидом фермент по сравнению с исходным имеет повышенную каталитическую активность и стабильность. Константа инактивации конъюгатов возрастает с увеличением концентрации белка в водном растворе до ~0,02 мг/мл. Каталитическая активность конъюгатов, содержащих менее 15 молекул PRG на молекулу фермента, повышается в присутствии антисыворотки, а конъюгаты, содержащие 20 или 35 молекул стероида, эффективно ингибируются анти-PRG. В обращенных мицеллах ПАВ увеличивается эффективность действия анти-PRG на активность и скорость инактивации конъюгата E-PRG-20 по сравнению с водной средой. Присутствие в мицеллах свободного PRG существенно изменяет взаимодействие анти-PRG с E-PRG-20.

Метод иммуноферментного микроанализа нашел широкое применение в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии [1]. Ключевыми факторами при конструировании новых тест-систем являются изменение свойств ферментов-маркеров в процессе синтеза их конъюгатов с антигеном или антителом, особенности специфических и неспецифических взаимодействий в ходе реакции антиген—антитело и роль среды в этом процессе.

Среди множества антигенов — объектов анализа — важное место занимают неполярные гаптены, например стероиды, канцерогены, токсиканты окружающей среды. Мы считаем, что хорошие перспективы имеет проведение иммуноферментного анализа неполярных соединений в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ в органических средах [2—4]. Показано, что в обращенных мицеллах ПАВ взаимодействие антител с антигеном столь же эффективно, как и в водном растворе [2—7]. Кроме того, в органических средах оболочка из молекул ПАВ, окружающая белок, может изменять его конформационную подвижность [8—9]. Следовательно, в обращенных мицеллах можно регулировать действие антител на конъюгат гаптен—фермент, изменяя состав мицеллярной среды, как это показано, например, в случае исследования активности и стабильности ферментов в присутствии низкомолекулярных добавок и разных количеств воды в системе [8—11].

Задачей исследования было изучение влияния состава конъюгатов глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (Е, КФ 1.1.1.49) с прогестероном (PRG) на их каталитическую активность, стабильность и характер взаимодей-

Сокращения: Е — глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа, PRG — прогестерон, 3-PRG — N-оксисукцинимидный эфир 3-О-карбоксиметилоксиа прогестерона, анти-PRG — антитела к прогестерону, E-PRG-3, -5, -7, -10, -15, -20 и -35 — конъюгаты глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы с прогестероном, содержащие соответственно 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 35 молекул модификатора на 1 молекулу фермента, ПАВ — поверхностно-активное вещество, DMF — диметилформамид, TNBS — тринитробензолсульфокислота, Аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты.

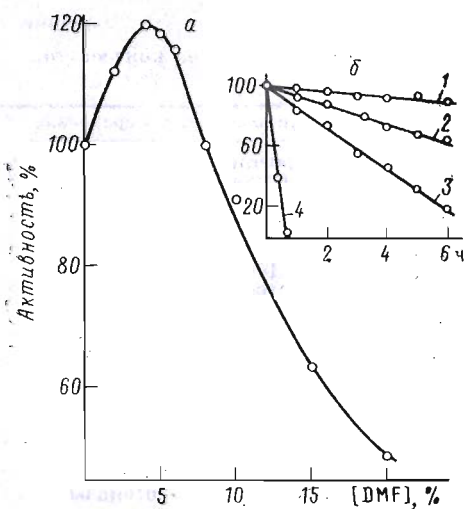


Рис. 1. Влияние диметилформамида на каталитическую активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (а) и ее стабильность (б): а —  $[E] = 10^{-4}$  мг/мл, [глюкозо-6-фосфат] = 1 мМ,  $[NADP^+] = 0,4$  мМ, 0,1 М глицин — NaOH-буфер (рН 9,1), 20° С; б —  $[E] = 1,5$  мг/мл, 2%  $NaHCO_3$ , содержащий 5 (1), 10 (2), 20 (3) и 30 (4) % по объему DMF, 25° С

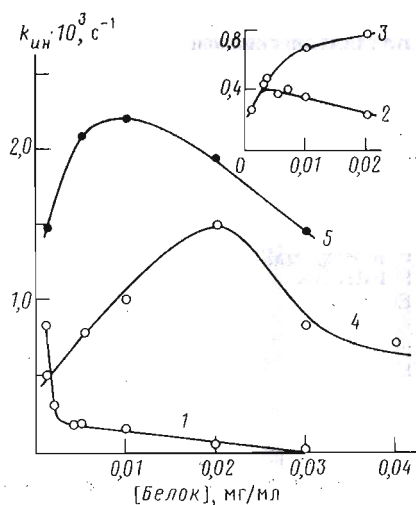


Рис. 2. Изменение эффективных констант скорости инактивации нативной глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (1) и предварительно обработанной в течение 2 ч в 10% растворе DMF (2) и ее конъюгатов E-PRG-7 (3) и E-PRG-35 (4, 5) в зависимости от начальной концентрации белка в среде при 45° С (1—4) и 47° С (5)

ствия с антисывороткой против прогестерона в водной среде и обращенных мицеллах Аэрозоля ОТ (АОТ) в гептане.

Прогестерон — сильно гидрофобный стероид, поэтому при синтезе его конъюгатов неизбежно присутствие в среде органического растворителя [12, 13]. Добавление в среду глицерина, этанола, пропанола, диоксана приводит к значительному уменьшению каталитической активности фермента [12]. Изучение влияния DMF на активность и стабильность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы показало, что при концентрациях растворителя до 5—6 об. % активность фермента несколько возрастает (рис. 1а), а при большем содержании DMF резко уменьшается. Однако присутствие даже 5% DMF отрицательно влияет на стабильность фермента (рис. 1б). Еще большие изменения активности фермента во времени наблюдаются при высоких концентрациях DMF в водной среде (рис. 1б, прямые 2—4). Тем не менее мы считаем, что DMF в концентрации до 10% — наиболее удобный органический компонент при синтезе конъюгатов E-PRG.

В результате инкубирования глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в 10% водном растворе DMF увеличивается число титруемых тринитробензолсульфокислотой (TNBS)  $NH_2$ -групп фермента. Так, при 25° С оно составляет около 40, а не 22, как это характерно для нативного фермента. Различие нивелируется при 45° С и выше, когда доступными для TNBS становятся практически все свободные аминокислотные группы фермента.

Присутствие в исследуемой системе N-оксисукцинимидного эфира 3-О-карбоксиметилокси прогестерона (3-PRG) усиливает инактивацию фермента при образовании конъюгатов: например, при соотношении 3-PRG/E-100 константа инактивации фермента увеличивается в 3,3 раза — от  $2,7 \cdot 10^{-5}$  (в контрольном образце) до  $8,8 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ .

При 20—100-кратном мольном избытке 3-PRG с ферментом связывается от 3 до 35 молекул стероида. В табл. 1 приведены кинетические характеристики конъюгатов и контрольных образцов фермента.

Подробное изучение термостабильности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и ее конъюгатов с прогестероном показало, что кинетические кривые изменения каталитической активности фермента описываются уравнением первого порядка до больших глубин процесса инактивации. Зависимости константы ингибирования ( $k_{ин}$ ) от начальной концентрации



Каталитические свойства глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы и ее конъюгатов с прогестероном

Glc6P-дегидрогеназа или ее конъюгат	Связывание Glc6P, $K_m \cdot 10^4$ , М	Связывание NADP <sup>+</sup> , $K_m \cdot 10^4$ , М	Активность, % * в сравнении с	
			ферментом, обработанным 10% DMF	нативным ферментом
Е в буфере	4,2—4,7	2,3—2,5	—	100
Е в 10% DMF	3,9—4,7	2,4—3,5	100	76—85
Е-PRG-3	4,2	3,4	98	83
Е-PRG-10	4,3	3,0	97	82
Е-PRG-15	7,7	3,3	75	61
Е-PRG-20	10,5	4,7	68	55
Е-PRG-35	10,5	3,2	58	47

Таблица 2

Влияние температуры и концентрации белка на константы скорости термической инактивации нативной глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы  
Приведены значения  $k_{ин} \cdot 10^6$ , с<sup>-1</sup>

°С	Концентрация фермента, мг/мл				
	бесконечное разбавление *	0,001	0,002	0,003	0,004
35	0,2	0,08	0,06	0,04	0,03
40	5,0	1,6	0,79	0,36	0,28
45	52,0	81,5	30,5	19,7	19,0
47	141,0	88,3	66,2	45,7	37,0

\* Значения получены экстраполяцией.

фермента (табл. 2) при всех значениях температуры описываются уравнением

$$k_{ин} = k_0 / (1 + ak_0 [E_2]_0),$$

где  $k_0$  — константа скорости инактивации при бесконечно большом разбавлении фермента,  $a$  — постоянная величина, зависящая от температуры и имеющая размерность обратной скорости ( $M^{-1} \cdot c^{-1}$ ),  $[E_2]_0$  — начальная концентрация фермента.

Температурный ход  $k_0$  для нативного фермента в интервале 35—47° С подчиняется уравнению Аррениуса, и энергия активации процесса термоинактивации ( $E_{акт}$ ) составляет 109,7 ккал/моль. С увеличением концентрации белка в растворе  $E_{акт}$  растет. Так, при  $[E_2]_0 = 0,005$  мг/мл  $E_{акт}$  составляет 143,6 ккал/моль.

Модифицирование глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы стероидом приводит к увеличению эффективных значений  $k_{ин}$  по сравнению с  $k_{ин}$  для исходного фермента. Кроме того, для конъюгатов Е-PRG в отличие от нативного фермента не наблюдается простой зависимости  $k_{ин}$  от начальной концентрации белка (рис. 2). Зависимости имеют максимум (кривые 2—5), положение которого определяется температурой (ср. кривые 4 и 5). Сложность рассматриваемых зависимостей не позволяет оценить величины  $k_0$  для конъюгатов при разных температурах. Однако температурный ход  $k_{ин}$  для каждой концентрации конъюгата описывается уравнением Аррениуса. Так, для Е-PRG-35 независимо от концентрации белка в диапазоне 0,001—0,02 мг/мл  $E_{акт} = 109,7$  ккал/моль. В табл. 3 приведены термодинамические активационные параметры инактивации для фермента и его конъюгата.

Изучение влияния специфической антисыворотки против прогестерона на каталитическую активность конъюгатов Е-PRG показало, что их можно разделить на две группы (рис. 3). Конъюгаты, содержащие 3—15 молекул прогестерона на молекулу Е, а также фермент, обработанный 10% DMF в течение 1 ч, увеличивают активность под действием антисыворотки (кривые 1—3). Если вместо специфической антисыворотки к пробам добавлять

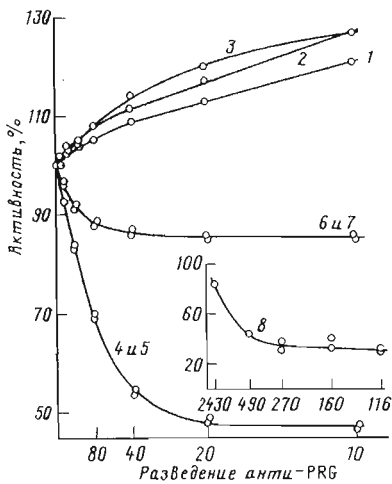


Рис. 3. Влияние концентрации анти-PRG на каталитическую активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, обработанной 10% DMF (1), и ее конъюгатов E-PRG-5 (2), E-PRG-10 (3), E-PRG-20 (4, 6, 8) и E-PRG-35 (5, 7) в физиологическом растворе с pH 7,4 (1—7) и смешанных обращенных мицеллах AOT и тритона X-45 (1:1) в гептане (8). [Неспецифическая антисыворотка] = 0 (1—5, 8) и 0—0,72 мг/мл (6, 7); время реакции 10 мин, 25° С

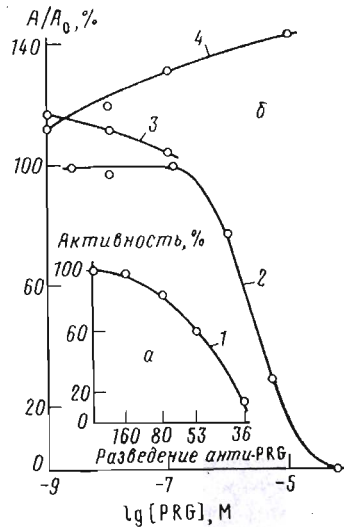


Рис. 4. Влияние концентрации анти-PRG на активность E-PRG-20 в обращенных мицеллах ПАВ в гептане (а) и зависимости отношения активностей фермента в присутствии (А) и в отсутствие (А<sub>0</sub>) прогестерона от концентрации свободного PRG (б). Условия определения: 0,1 М AOT, 0,1 М тритон X-45, 12 об. % (1, 2) или 6 об. % (3) полярной фазы в гептане; физиологический раствор, pH 7,4 (4). Время инкубации: 2 ч (1, 2) и 10 мин (3) при 35° С или 1 ч при 20° С (4). [E-PRG-20] = 4,5 · 10<sup>-4</sup> (1), 4,3 · 10<sup>-4</sup> (2), 8 · 10<sup>-5</sup> (3) и 4,2 · 10<sup>-4</sup> мг/мл (4); разведение анти-PRG-80 (2), 4,2 · 10<sup>-4</sup> (3, 4)

неспецифическую антисыворотку, активность таких конъюгатов также увеличивается. При содержании в конъюгатах 20—35 молекул PRG их активность ингибируется под действием анти-PRG (кривые 4 и 5). Любопытно, что добавление неспецифической сыворотки к специфической (общая концентрация белка во всех пробах равна 0,72 мг/мл) приводит к уменьшению глубины ингибирования активности конъюгатов с 20 и 35 молекулами PRG (ср. кривые 4, 5 с 6 и 7).

В смешанных обращенных мицеллах AOT и тритона X-45 в гептане анти-PRG также ингибирует активность конъюгата E-PRG-20 (рис. 3, 8). Однако этот эффект достигается при меньших концентрациях сыворотки и на большую глубину по сравнению с водным раствором (ср. кривые 4 и 8).

На глубину ингибирования активности конъюгата не влияет изменение соотношения тритон X-45/AOT в системе, но изменение концентрации воды в обращенных мицеллах сказывается на активности E-PRG-20 в присутствии антисыворотки. Так, при разведении анти-PRG в 440 раз и 6—7%

Таблица 3

Термодинамические активационные параметры инактивации глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и E-PRG-35 при 45° С

Фермент	Концентрация, мг/мл	$E_{\text{акт}}$	$\Delta H^*$	$\Delta S^*$ , ккал/моль · г	$\Delta G^*$ , ккал/моль
		ккал/моль			
Нативный	Бесконечное разбавление	109,7	109,0	269,1	23,4
»	0,005	143,6	143,0	374,0	24,0
E-PRG-35	»	109,7	109,0	270,1	23,1



(по объему) воды в обращенно-мицеллярном растворе наблюдается максимальное уменьшение активности E-PRG-20 (на 60%). Уменьшение (до 3%) и увеличение (до 12%) содержания воды в системе повышает активность конъюгата примерно на 20%.

Изучение инактивации E-PRG-20 в смешанных обращенных мицеллах АОТ и тритона X-45 в гептане в присутствии анти-PRG в разведении 140 раз показало, что конъюгат теряет активность в 2,6 раза быстрее, чем в случае использования неспецифического сывороточного белка в той же концентрации. Так, при объеме полярной фазы в мицеллярной системе, равном 12%, и 25°С  $k_{ин}$  конъюгата с концентрацией  $9,8 \cdot 10^{-4}$  мг/мл составляет  $1,8 \cdot 10^{-4}$  с<sup>-1</sup> в присутствии анти-PRG и  $6,8 \cdot 10^{-5}$  с<sup>-1</sup> в присутствии неспецифической сыворотки. Увеличение температуры, концентрации анти-PRG (рис. 4, а) и уменьшение объема полярной фазы в мицеллярной системе значительно усиливает инактивацию конъюгата: при разведении анти-PRG в 80 раз и 6,4% полярной фазы активность конъюгата за 2 ч инкубирования в обращенных мицеллах при 35° уменьшается в ~3,5 раза по сравнению с приведенным выше значением.

Было интересно выяснить, влияет ли свободный прогестерон на изменение каталитической активности конъюгатов в присутствии анти-PRG. На рис. 4б приведена такая зависимость (2), из которой следует, что в присутствии свободного PRG в мицеллярной среде уменьшается активность конъюгата. Аналогичное действие производит свободный прогестерон при изменении объема полярной фазы в системе (от 12 до 6%) и времени инкубирования (от 2 ч до 10 мин) (кривая 3).

В водном растворе, содержащем E-PRG-20 и анти-PRG, напротив, каталитическая активность конъюгата растет пропорционально увеличению концентрации свободного PRG (рис. 4б, 4). Следует отметить, что после синтеза конъюгата его антигенные свойства в водном растворе очень быстро теряются. В обращенно-мицеллярной системе наблюдается такой же эффект, но конъюгат значительно дольше сохраняет свои антигенные свойства и способность реагировать на присутствие в среде свободного прогестерона.

Таким образом, добавление DMF в среду при синтезе конъюгатов E-PRG приводит к увеличению числа доступных NH<sub>2</sub>-групп белка, изменяет каталитическую активность (рис. 1, табл. 1) и стабильность фермента и его конъюгатов (рис. 1, табл. 2 и 3). Полученные конъюгаты способны взаимодействовать с анти-PRG (рис. 3), и это взаимодействие изменяется в присутствии свободного стероида (рис. 4).

Для проявления каталитической активности глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа должна содержать по крайней мере две субъединицы [14, 15]. Присутствие в среде DMF приводит к разрыхлению белковой глобулы фермента (низкие концентрации DMF), а также способствует диссоциации олигомеров фермента на субъединицы (высокие концентрации DMF). Это подтверждается изменением каталитической активности, стабильности и увеличением числа доступных NH<sub>2</sub>-групп фермента. На инактивацию фермента влияет модификатор 3-PRG, молекула которого является амфифильной. Известно, что природные амфифилы (жирные кислоты, коэнзим А и его производные) уже в концентрации 0,1—10 мкМ вызывают диссоциацию E на мономеры [16], так что снижение каталитической активности глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы и ее конъюгатов в процессе их синтеза вполне объяснимо.

На поверхности исследуемого фермента имеются две «ключевые» NH<sub>2</sub>-группы. Модифицирование галтеном одной из них позволяет антителам практически полностью ингибировать каталитическую активность такого конъюгата [17]. Из наших данных (табл. 1, рис. 3) следует, что модифицирование ключевой аминокислотной группы достигается лишь в том случае, когда с ферментом связано более 15 молекул стероида. В этом случае резко изменяется  $K_m$  фермента, а антитела к PRG эффективно ингибируют активность конъюгата.

Наличие на поверхности E связанных молекул PRG усиливает неспецифические взаимодействия модифицированного фермента. Белок агрегирует, и, как следует из данных по термостабильности (рис. 2, табл. 3),

в агрегатах увеличивается инактивация белка. Чем больше стероида иммобилизовано на поверхности фермента и выше концентрация белка в системе, тем сильнее неспецифическое взаимодействие между субъединицами и выше  $k_{ин}$  конъюгатов. Следовательно, в отличие от нативного фермента конъюгаты не стабилизируются увеличением концентрации белка в среде.

Весьма значительно неспецифическое взаимодействие конъюгатов E-PRG с белками крови (рис. 3). Конъюгаты неспецифически связываются с белками сыворотки и становятся менее доступными для взаимодействия с анти-PRG.

Неспецифическое взаимодействие E-PRG с белками по-разному отражается на каталитической активности и стабильности конъюгатов. Взаимодействие конъюгатов с сывороточными белками приводит в первую очередь к повышению каталитической активности фермента (рис. 3, 1—3, 6, 7). По-видимому, в формируемом ассоциате «белок — димер E или E-PRG» так изменяется активный центр фермента, что облегчается катализ процесса дегидрирования глюкозо-6-фосфата. Аналогичную картину мы наблюдали в случае добавок в среду DMF (рис. 1).

Использование обращенных мицелл в качестве среды для взаимодействия антител с конъюгатом позволяет уменьшить отрицательное влияние неспецифических белков сыворотки на реакцию (рис. 3, 8). Для максимального ингибирования активности конъюгата требуется примерно в 13 раз меньше антисыворотки, чем в водной среде. Вероятно, в обращенных мицеллах стероидные фрагменты на поверхности E сольватированы молекулами ПАВ и органического растворителя и нет необходимости изолировать их от воды внутри белкового агрегата, как в случае водного раствора.

Ослабление неспецифического белок-белкового взаимодействия в обращенных мицеллах облегчает конкуренцию свободного прогестерона и E-PRG за связывание с анти-PRG (рис. 4). В отличие от водной среды в мицеллах удается получить ярко выраженную зависимость активности от концентрации свободного PRG (ср. кривые 2 и 4). Уменьшение в 2 раза объема полярной фазы в мицеллярном растворе повышает чувствительность системы к свободному PRG (ср. ход зависимостей 2 и 3 при концентрациях прогестерона 1 нМ — 0,1 мкМ). При малом содержании воды в системе люменальная поверхность мицеллы соприкасается с поверхностью белковой глобулы [9] и вся вода находится в связанном состоянии. В то же время при «избытке» полярной фазы в системе в ядре мицелл имеется свободная вода. Следовательно, при взаимодействии водонасыщенных мицелл, содержащих в своих ядрах антитела, конъюгат и свободный PRG, возможно, затруднен обмен молекулами стероида между белками и мицеллами и в этом случае необходимы достаточно высокие концентрации свободного стероида, чтобы повлиять на реакцию антиген—антитело. Недостатком обращенно-мицеллярной среды является то, что в мицеллах по сравнению с водной средой увеличивается скорость инактивации конъюгата, особенно при высокой концентрации белка в системе (рис. 4, 7), что, безусловно, требует тщательного поиска оптимальных соотношений между компонентами системы.

### Экспериментальная часть

В работе использовали глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназу из микроорганизмов *Leuconostoc sp* 5<sub>8</sub> (400 МЕ/мг, НПО «Фермент», Вильнюс), антисыворотку против прогестерона с константой ассоциации [<sup>125</sup>I]прогестероном, равной  $(1,0 \pm 0,4)$  нМ (ХОП ИБОХ АН БССР, Минск), глицин, глюкозо-6-фосфат, NADP<sup>+</sup> (Reanal, Венгрия), прогестерон (Germed, ГДР), N-оксисукцинимидный эфир 3-О-карбоксиметилглюксима прогестерона (ИБОХ АН БССР, Минск), тринитробензолсульфокислоту и натриевую соль ди-(2-этил)гексилевого эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ, Serva, ФРГ), тритон X-45 (Sigma, США), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция). Остальные реагенты были отечественного производства и имели марку х. ч.

Конъюгаты E-PRG получали по модифицированным методикам [12, 13]. Синтез проводили в 2% растворе NaHCO<sub>3</sub> с рН 8,35, содержащем 10%



диметилформамида, в течение 2 ч при 25° С. Мольное соотношение Е/3-PRG в реакционной смеси меняли от 1 : 20 до 1 : 100. От непрореагировавшего модификатора избавлялись диализом смеси против NaOH-глицинового буфера с рН 8,3. Количество связавшихся с Е молекул PRG определяли методом разностной спектрофотометрии: регистрировали спектры поглощения конъюгатов относительно немодифицированного фермента, уравнивая растворы в кюветках по концентрации белка. По интенсивности поглощения при 250 нм рассчитывали число связавшихся с ферментом молекул стероида, используя коэффициент молярного поглощения PRG, равный  $1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [18].

При изучении влияния анти-PRG на фермент или конъюгат последние в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  мг/мл выдерживали 1 ч с антисывороткой в физиологическом растворе с рН 7,4 при 25° С, а затем определяли остаточную ферментативную активность. Способ определения ферментативной активности Е описан в работе [19]. Влияние анти-PRG на Е-PRG-20 в мицеллярной среде изучали следующим образом: в «сухом» растворе АОТ (0,1 М) и тритона X-45 (0,1 М) в гептане при интенсивном встряхивании в течение 15 с солюбилизировали водные растворы Е-PRG-20 ( $3 \cdot 10^{-5}$  мг/мл), анти-PRG в разной концентрации и воду до объема 6%. Пробы выдерживали 10 мин при 25° С, а затем к ним добавляли 0,3 мМ глюкозо-6-фосфат и 0,1 мМ NADP<sup>+</sup> и следили за реакцией по росту поглощения при 340 нм. В качестве контроля использовали мицеллярную систему, содержащую вместо анти-PRG неспецифическую сыворотку.

Термоинактивацию Е и конъюгатов Е-PRG изучали в интервале температур 35—47° С в бидистиллированной воде или смешанных обращенных мицеллах 0,1 М АОТ и 0,1 М тритона X-45 в гептане. Препараты термостатировали и определяли активность фермента во времени в реакции окисления глюкозо-6-фосфата при 20° С для количественной характеристики констант скорости инактивации ( $k_{ин}$ ), которые вычисляли из полулогарифмических анаморфоз кинетических кривых «lg (A/A<sub>0</sub>)—время», где А и А<sub>0</sub> — ферментативная активность исходного и частично инактивированного биокатализатора соответственно.

Авторы выражают благодарность Н. В. Пивень и В. Д. Матвеевцу (ИБОХ АН БССР) за предоставление антисыворотки против прогестерона и активированного производного прогестерона, а также профессору Д. И. Метелице за участие в обсуждении полученных результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммуноферментный анализ / Ред. Нго Т. Т., Ленхофф Г. М.: Мир, 1988. 444 с.
2. Еремин А. Н., Савенкова М. И., Метелица Д. И. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 606—612.
3. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Тез. докл. XIV Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Ташкент, 1989. Т. 1. С. 433.
4. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Докл. АН БССР. 1989. Т. 33. № 10. С. 932—935.
5. Кабанов А. В., Хруцкая М. М., Будавари М. И., Еремин С. А., Клячко Н. Л., Левашов В. А. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. № 5. С. 1253—1256.
6. Kabanov A., Khrutskaya M., Eremin A., Klyachko N., Levashov A. // Anal. Biochem. 1989. V. 181. № 1. P. 145—148.
7. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1326—1333.
8. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 10. С. 1612—1623.
9. Левашов В. А. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112—158.
10. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 1. С. 102—108.
11. Еремин А. Н., Казилонене Б. М., Вайткявичюс Р. К., Метелица Д. И. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 5. С. 856—862.
12. Карасева Е. И., Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 2. С. 198—203.
13. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 1839—1842.
14. Rosemeyer M. A. // Cell Biochem. and Funct. 1987. V. 5. № 2. P. 79—95.
15. Levy M. R. // Adv. Entomol. 1979. V. 48. P. 97—192.
16. Col E. L., Hsu L.-H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 1. P. 66—69.
17. Ullman E. F., Maggio E. T. // Enzyme-Immunoassay / Ed. Maggio E. T. Boca Raton: CRC Press, 1983. P. 105—134.

18. Blanford A. T., Wittman W., Stroupe S. D., Westphal U. // *J. Steroid. Biochem.* 1978 V. 9. P. 187—189.
19. Карасева Е. И., Еремун А. Н., Метелуца Д. И. // *Изв. АН БССР. Сер. хим. наук.* 1986. № 4. С. 76—80.

Поступила в редакцию  
20.VI.1990

A. N. ERYOMIN, E. I. KARASYOVA

THE PROPERTIES OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE  
AND ITS CONJUGATES WITH PROGESTERONE IN AQUEOUS  
AND MICELLAR MEDIA

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

Effects of the composition of the glucose-6-phosphate dehydrogenase conjugates with progesterone (E-PRG) on their activity, thermostability and interaction with antibodies against progesterone (Anti-PRG) in water and reversed micelles of Aerosol OT and Triton X-45 in heptane were kinetically studied. It is shown that dimethylformamide is an optimal additive to the buffered solutions at the enzyme modification by progesterone. The activity and thermostability of the modified enzyme decreases as compared with the initial enzyme.

Unlike the rate constants of the native enzyme inactivation, their values for the enzyme conjugates increase with the growth of the protein concentration up to 0,2 mg/ml.

The catalytic activity of conjugates, containing 15 molecules of progesterone per an enzyme molecule, increases in the presence of antiserum against progesterone whereas the activity of the enzyme conjugates, containing 20 or 45 steroid molecules, is effectively inhibited by Anti-PRG. The efficiency of Anti-PRG inhibiting action and of the thermoinactivation alterations for the conjugate E-PRG-20 in the reversed micelles of surfactants increases as compared with that in buffered solutions. Free progesterone in the micelles affects the E-PRG-20 interaction with the specific antiserum.