



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.361\*1 : 577.112.083.3

НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ПИРОФОСФАТАЗА!— НОВАЯ ФЕРМЕНТНАЯ  
МЕТКА ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Байков А. А., Кашио В. Н., Аваева С. М.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Ферментные метки получили широкое распространение в биохимическом анализе. С их помощью можно определять очень малые количества антигенов и антител, нуклеиновых кислот и других соединений [1–3]. Возможности такого анализа в значительной степени зависят от свойств фермента-маркера. В настоящее время в качестве маркеров чаще всего используют пероксидазу и щелочную фосфатазу, но методики с применением этих ферментов не лишены недостатков [4]. В частности, пероксидаза инактивируется бактериостатическими агентами, ее субстраты нестойки и обладают канцерогенным действием. Фосфатазную реакцию трудно детектировать визуально из-за слабой окраски ее продукта (*n*-нитрофенола).

Результаты наших исследований показали, что неорганическая пирофосфатаза *Escherichia coli* (КФ 3.6.1.1.) имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными ферментными метками. Пирофосфатаза и ее субстрат (пирофосфат) весьма стабильны. Чистый фермент с молекулярной активностью  $5400 \text{ с}^{-1}$  (рН 9; 37°С) легко получить в больших количествах [5].

Испытания пирофосфатазы как фермента-маркера проводили на примере твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Были разработаны тест-системы для определения ~30 различных соединений, в том числе возбудителей заболеваний человека, животных и растений, иммуноглобулинов,  $\alpha$ -фетопротейна, интерферона, Р-пептида и активатора плазминогена.

Для получения конъюгатов смесь фермента с антителами (по 1 мг/мл каждого) обрабатывали при рН 7,4 в течение 1 ч глутаровым альдегидом (0,05%) и отделяли непрореагировавшие вещества методом гель-фильтрации. Суммарная ферментативная активность конъюгатов составляла ~25% исходной активности пирофосфатазы. Растворы конъюгатов сохранялись по меньшей мере 2 года при 4°С и выдерживали инкубацию в течение 1,5 ч при 72°С.

Для проведения анализа использовали в основном 96-луночные микроплааты из полистирола. Типичная методика включала покрытие поверхности полимера антителами к определяемому веществу, последовательную адсорбцию определяемого вещества и конъюгата пирофосфатазы с антителами к нему и определение активности фермента, связанного с твердой фазой. В некоторых опытах применяли метод двойных антител [4].

Для измерения активности пирофосфатазы использовали модификацию цветной реакции на фосфат с малахитовым зеленым и молибдатом [6]. Для нее характерна интенсивная окраска конечного продукта (мо-

контрастный лиярный коэффициент поглощения  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при 630 нм), переход окраски (желтый/сине-зеленый), имеется возможность введения в раствор ингредиентов, необходимых для остановки ферментативной реакции. Чувствительность определения пирофосфатазы в ИФА этим методом составляла  $50 \cdot 10^{-18}$  моль ( $\Delta A_{630} = 0,1$ ). Реакционная среда для измерения активности пирофосфатазы содержала 0,03 мМ пирофосфат, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 0,05 М трис-НСI-буфер (рН 9). Реакцию останавливали прибавлением реактива на фосфат и измеряли поглощение при 630 нм.

Использование пирофосфатазы позволило значительно увеличить чувствительность ИФА. В сравнении с пероксидазными конъюгатами величины поглощения, регистрируемые фотометром, возрастали в 5–10 раз при использовании одних и тех же препаратов антител. Фоновые величины поглощения в опытах без антигенов обычно не превышали 0,1–0,12. Цветовой переход в случае пирофосфатазы весьма благоприятен для визуальной оценки и позволяет надежно регистрировать поглощение, превышающее фоновое всего на 0,1 оптической единицы. При детекции *p*-нитрофенола пороговая величина в несколько раз выше. Константа Михаэлиса, характеризующая пирофосфатазную реакцию, на три порядка ниже, чем для реакций пероксидазы и щелочной фосфатазы, что позволяет резко сократить расход субстрата. Благодаря высокой термостабильности пирофосфатазы ИФА можно проводить при температурах до 60° С, что в несколько раз сокращает продолжительность анализа и увеличивает его специфичность. Суммируя вышесказанное, можно рекомендовать пирофосфатазу для широкого использования в качестве ферментной метки при анализе биологических соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Engvall E., Perlmann P. // *Immunochemistry*. 1971. V. 8. № 9. P. 871–874.
2. Van Weemen B. K., Shuurs A. H. W. M. // *FEBS Lett*. 1971. V. 15. № 3. P. 232–236.
3. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. № 11. P. 6633–6637.
4. Blake C., Gould B. J. // *Analyst*. 1984. V. 109. № 1295. P. 533–547.
5. Jossé J. // *The Enzymes*, V. 4/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 499–527.
6. Itaya K., Ui K. // *Clin. chim. acta*. 1966. V. 14. № 3. P. 361–366.

Поступило в редакцию  
31.VII.1987

#### INORGANIC PYROPHOSPHATASE: A NEW ENZYME LABEL FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS

BAYKOV A. A., KASHO V. N., AVAEVA S. M.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,  
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Inorganic pyrophosphatase isolated from *Escherichia coli* has been proposed as a label in heterogeneous enzyme immunoassays. The enzyme is remarkably stable and insensitive to sodium azide. Enzyme-antibody conjugates were prepared with glutaraldehyde and purified by gel filtration. Enzyme activity was measured by means of a sensitive colour reaction between phosphomolybdate and malachite green. A 5-10-fold increase in sensitivity in terms of absorbance readings was observed compared to peroxidase-based assays. The colour change (yellow/greenish blue) inherent in the use of pyrophosphatase as the labelling agent is highly suitable for visual analysis.