



УДК 577.152.321.088.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ β -ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПЛАСТИНАХ С ПОМОЩЬЮ
5-БРОМ-3-ИНДОЛИЛ- β -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИДА
В КОМБИНАЦИИ С СОЛЯМИ ТЕТРАЗОЛИЯ

Маржарян А. Н., Возный Я. В.*, Дзантиев Б. Б.,
Егоров А. М.**

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва;

*Институт биохимии Академии наук АрмССР, Ереван;

**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет

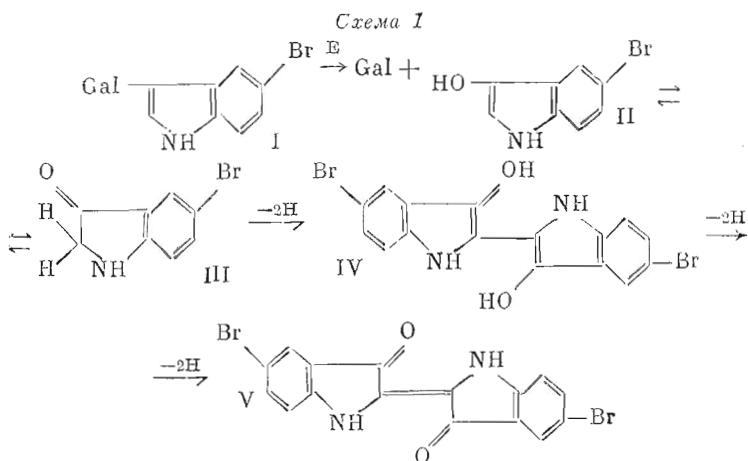
Перенос белков после электрофореза в геле на нитроцеллюлозную мембрану относится к числу стандартных процедур при идентификации разделенных полипептидных цепей и анализе их антигенных свойств [1]. Реакция антиген — антитело, протекающая на поверхности нитроцеллюлозной матрицы, обычно визуализируется радиоавтографией с помощью белка А или вторичных антител, меченных иодом. В последнее время, чтобы избежать применения радиоактивных изотопов, активно разрабатываются альтернативные методы на основе ферментных меток и нерастворимых продуктов их реакций [2—5]. Имеющиеся в литературе сведения о ферментах, используемых для выявления комплекса антиген — антитело на нитроцеллюлозных мембранах, в основном ограничиваются пероксидазой и щелочной фосфатазой [2—5]. Вместе с тем особого внимания заслуживает применение в этих целях β -галактозидазы *E. coli*, одной из наиболее чувствительных ферментных меток.

Продукты β -галактозидазного расщепления могут быть обнаружены в виде окрашенных осадков с помощью реакций азосочетания или окисления индоксильных производных в краситель индиго [6]. Индигогенный способ детекции фермента с помощью X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид) более чувствителен, чем метод, основанный на азосочетании [6]. Однако образование окрашенного индиго зависит от pH и уменьшается при переходе в щелочную область из-за образования бесцветного дигидроиндиго [7]. Поэтому определение β -галактозидазы *E. coli* с помощью индоксильного субстрата в области нейтральных pH и выше не очень эффективно; в то же время при pH 5 и ниже такое определение невозможно из-за инактивации фермента [8].

В настоящей работе для идентификации β -галактозидазной активности на нитроцеллюлозных пластинах впервые использовали BIG (5-бром-3-индолил- β -D-галактопиранозид) в комбинации с солями тетразолия. Выбор BIG в качестве субстрата определялся его большей доступностью по сравнению с X-Gal. Исходными соединениями для синтеза BIG явились 5-бром-3-О-бутирилindoксил и 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозилфторид. Константы синтезированного BIG (т. пл. 195°С, $[\alpha]_D = -70^\circ$) соответствовали описанному ранее для этого соединения [9].

Схема гидролиза BIG β -галактозидазой *E. coli* в отсутствие солей тетразолия представлена на схеме 1. Ферментативно отщепляемый 5-бром-индоксил (II) окисляется до синего индиго (V), который осаждается в виде нерастворимого красителя. Ранее эта реакция была использована в гистохимии для локализации кислых β -галактозидаз животного происхождения [10].

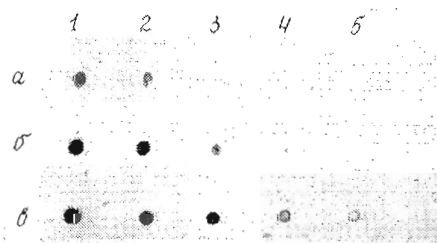
Совместное применение BIG и тетразолиевых солей в принципе долж-



но повысить чувствительность обнаружения β -галактозидазы *E. coli* благодаря вкладу двух красителей — индиго (V) и формазана (VII). В литературе описано использование тетразольного метода для определения щелочной фосфатазы [11, 12]. Ниже приведена общая схема восстановления солей тетразолия (VI) с осаждением формазана (схема 2).

Так как эффективному образованию формазанов (VII) способствуют щелочные значения pH [11], нами изучена pH-зависимость действия β -галактозидазы *E. coli* на смесь BIG с нитроголубым тетразолием (NBT). Как видно из рисунка, наибольшая чувствительность определения фермента на нитроцеллюлозе ($3 \cdot 10^{-15}$ моль за 30 мин при 20°C) достигается при pH 9,5. Несмотря на удаление этого значения от pH-оптимума β -галактозидазы (pH 7,2–7,4 [8]), тетразольный метод имеет преимущества: гидролиз BIG в отсутствие NBT при тех же условиях позволил определить лишь $2 \cdot 10^{-12}$ моль фермента. Все количественные определения β -галактозидазной активности проводились в присутствии 20–50% глицерина, так как нанесение фермента на нитроцеллюлозную мембрану в отсутствие глицерина почти на два порядка ухудшало чувствительность его обнаружения. Не исключено, что это связано со стабилизацией β -галактозидазы глицерином в щелочных условиях. Предлагаемый метод может быть использован также для определения других гликозидаз, устойчивых в щелочной среде.

К преимуществам описанного способа анализа относится высокая стабильность BIG и NBT в водных растворах: длительное выдерживание реакционной смеси не сопровождается неспецифическим осаждением и появлением фона на нитроцеллюлозной пластине. Быстрота, простота



pH-Зависимость β -галактозидазной активности, определяемой на нитроцеллюлозной пластинке с помощью NBT (0,6 мг/мл) и BIG (0,36 мг/мл) в 0,1 М трис-НСl: pH 7,5 (а), 8,5 (б), 9,5 (в). Точки 1–5 соответствуют нанесению $2 \cdot 10^{-13}$, $8,1 \cdot 10^{-14}$, $2,7 \cdot 10^{-14}$, $9 \cdot 10^{-15}$ и $3 \cdot 10^{-15}$ моль фермента

и высокая чувствительность детекции β -галактозидазы на нитроцеллюлозной пластинке делает метод перспективным для иммуноблоттинга, прямого скрининга моноклональных антител и иммуноферментного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 9, p. 4350-4354.
2. Blake M. S., Johnston K. H., Russell-Jones G. J., Gotschlich E. C. Anal. Biochem., 1984, v. 136, № 1, p. 175-179.
3. Knecht D. A., Dimond R. L. Anal. Biochem., 1984, v. 136, № 1, p. 180-184.
4. Suresh M. R., Milstein C. Anal. Biochem., 1985, v. 151, № 1, p. 192-195.
5. Theisen N., Lohoff E. S., von Figura K., Hasilik A. Anal. Biochem., 1986, v. 152, № 2, p. 211-214.
6. Lojda Z. Histochemistry, 1973, v. 37, № 4, p. 375-378.
7. Holt S. J. J. Histochem. and Cytochem., 1956, v. 4, № 6, p. 541-554.
8. Wallenfels K., Well R. In: The Enzymes/Ed. Boyer P. D., 3rd ed. N. Y.-L.: Acad. Press, 1972, v. 7, p. 617-663.
9. Anderson F. B., Leback D. H. Tetrahedron, 1964, v. 12, № 4, p. 236-239.
10. Lojda Z. Histochemistry, 1970, v. 23, № 3, p. 266-288.
11. McGadey J. Histochemistry, 1970, v. 23, № 2, p. 180-184.
12. Sinha P. J. Biochem. Biophys. Methods, 1985, v. 11, p. 327-340.

Поступило в редакцию
12.VI.1986
После доработки
4.IX.1986

DETERMINATION OF β -GALACTOSIDASE ACTIVITY ON NITROCELLULOSE SHEETS USING A MIXTURE OF 5-BROMOINDOL-3-YL- β -D-GALACTOPYRANOSIDE AND TETRAZOLIUM SALTS

MARKARYAN A. N.,* VOZNY Ya. V., DZANTIEV B. B.,** EGOROV A. M.

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; *Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Erevan; **Chemical Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A simple and convenient technique has been developed for detection of β -galactosidase from *E. coli* on nitrocellulose sheets using a mixture of 5-bromoindol-3-yl- β -D-galactopyranoside and nitro blue tetrazolium, which enables rapid detection of fmoles (10^{-15} mole) quantities of the enzyme at pH 9.5. The technique has the following advantages: the substrates are stable for a long period; reaction products give non-fading intense blue colour, resolution is extremely good with essentially no diffusion.