



УДК 577.112.083.3:577.152.361*1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ
В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ*Байков А. А., Гаши В. Н., Евтушенко О. А.,
Аваева С. М.**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Описана методика гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) на основе нового фермента-маркера — неорганической пирофосфатазы. Для количественной оценки продукта реакции использован окрашивающий реактив, содержащий триарилметалловый краситель и молибденовую кислоту. Цветовой переход индикатора (слабо-желтый/сине-зеленый) весьма удобен для визуальной оценки и в ряде случаев позволяет обойтись без регистрирующей аппаратуры. Чувствительность ИФА с пирофосфатазой в 4–10 раз выше, чем с пероксидазой. К достоинствам пирофосфатазы как маркера относятся также ее исключительная термостабильность, нечувствительность к азиду натрия, устойчивость субстрата и низкое значение его константы Михаэлиса. Приведены примеры использования нового фермента в тест-системах для определения α -фетопротена и иммуноглобулинов G человека.

Способность иммуноглобулинов находить в сложной смеси веществ соответствующие антигены и образовывать с ними очень прочные комплексы легла в основу целого ряда методов определения биологически активных веществ. Для повышения чувствительности анализа в иммуноглобулины или антигены вводят метки. Вначале для этой цели использовали радиоактивные изотопы [1], а затем и нерадиоактивные метки, в том числе флуоресцентные красители, стабильные радикалы, ингибиторы и кофакторы ферментов, металлы и др. [2]. В последнее время широкое развитие получили методы анализа, основанные на ферментных метках [3, 4]. Каталитическая активность молекулы фермента обычно такова, что она может превратить за 1 ч 10^6 и более молекул субстрата. Это обеспечивает высокую чувствительность иммуноферментного анализа (ИФА), которая в некоторых случаях даже выше, чем при радиоиммунологическом анализе [5]. К достоинствам ферментных меток относятся безопасность для здоровья и возможность длительного хранения меченых соединений.

Возможности ИФА в значительной степени определяются свойствами фермента-маркера. Желательно, чтобы фермент имел высокую активность, был устойчив и доступен в больших количествах в чистом виде, а также легко вступал в реакцию со сшивающими агентами, сохраняя при этом свою активность. Кроме того, крайне важна возможность простого и чувствительного измерения ферментативной активности. В литературе можно найти сведения об использовании в ИФА более десятка разных ферментов [6, 7]. Наибольшее применение нашли пероксидаза, щелочная фосфатаза и β -D-галактозидаза, так как они лучше других удовлетворяют выдвинутому комплексу требований. Однако и эти ферменты не лишены недостатков. Низкое содержание свободных аминогрупп в пероксидазе усложняет получение ее конъюгатов с антигенами. Кроме того, она инактивируется азидом натрия, используемым для консервации растворов, ее субстраты нестойки в растворе и обладают канцерогенным действием. Щелочная фосфатаза и β -D-галактозидаза довольно дороги и недостаточно устойчивы при хранении. Их субстраты (*n*-нитро-

Использованное сокращение: ИФА — иммуноферментный анализ.

фениловые эфиры) также легко разлагаются, и их гидролиз трудно детектировать визуально из-за слабой окраски *p*-нитрофенола. Исходный материал для получения пероксидазы и щелочной фосфатазы представляет собой ценное сырье для пищевой промышленности. Поиск новых ферментов-маркеров остается актуальной задачей.

Целью настоящего исследования была разработка принципов ИФА на основе неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1). Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата (PP_i) с образованием фосфата (P_i), который можно обнаружить с помощью высокочувствительной цветной реакции. Наиболее благоприятные свойства имеет пирофосфатаза *Escherichia coli*. Прежде всего необходимо отметить ее исключительную стабильность — она сохраняет активность в течение нескольких лет при комнатной температуре и выдерживает кратковременное нагревание до 82°C [8]. Субстрат пирофосфатазы также очень устойчив. Молекулярная активность пирофосфатазы при 37°C составляет 2700 с^{-1} (для сравнения с другими ферментами эту величину надо удвоить, так как гидролиз одной молекулы субстрата дает две молекулы продукта). Пирофосфатазу *E. coli* можно получать в больших количествах в электрофоретически индивидуальном состоянии [8]. Для испытания пирофосфатазы был выбран «сэндвич-вариант» ИФА, в котором используют конъюгат антител с ферментом и отделяют иммунный комплекс адсорбцией на поверхности твердой фазы. Результаты испытаний указывают на ряд преимуществ пирофосфатазы по сравнению с известными ферментами-маркерами (предварительное сообщение см. [9]).

Получение и стабильность конъюгатов пирофосфатазы с иммуноглобулинами. Чаще всего для введения ферментных меток в иммуноглобулины используют глутаровый альдегид, реагирующий со свободными аминогруппами белков. Один из самых простых способов состоит в обработке этим сшивающим агентом смеси антител и фермента и отделении непрореагировавших веществ гель-фильтрацией. Этот способ и был взят за основу в настоящей работе.

По данным работы [10], одна из аминогрупп пирофосфатазы *E. coli* входит в активный центр фермента. Для ее защиты от модификации в реакционную смесь вводили пирофосфат и ионы Ca^{2+} , которые образуют комплекс CaPP , обладающий высоким родством к активному центру пирофосфатазы [11]. Наибольшая чувствительность определения антигенов достигалась, если реакцию с 0,05% глутаровым альдегидом проводили 1 ч. В этом случае в присутствии CaPP сохранялось около 50% активности фермента (рис. 1). В отсутствие антител кривые инактивации пирофосфатазы глутаровым альдегидом не изменялись; следовательно, сам факт присоединения антител не влиял на активность фермента.

Отделение свободных антител и фермента от конъюгатов проводили с помощью гель-фильтрации (рис. 2). Примесь свободных антител в конъюгате снижает чувствительность анализа, так как они конкурируют с мечеными антителами за антиген. Примесь свободного фермента увеличивает фоновое значение оптического поглощения и поэтому также нежелательна. Молекулярные массы иммуноглобулинов G и пирофосфатазы примерно одинаковы, что благоприятствует очистке конъюгата методом гель-фильтрации. В отдельных опытах было обнаружено, что 90% свободных антител и фермента элюируются в этих условиях во фракциях 33—41, причем пик фермента сдвинут вправо на две фракции по отношению к пикам антител. Суммарная ферментативная активность конъюгата во фракциях, отмеченных на рис. 2 штриховкой, составляла около 25% исходной активности пирофосфатазы.

Для препаративного получения конъюгатов объем реакционной смеси увеличивали до 8 мл, не изменяя состава, а хроматографию проводили на колонке объемом 0,4 л. Картина элюции при этом практически не изменялась. Суммарная ферментативная активность конъюгата, получаемого за одно разделение, составляла обычно около 1000 МЕ. Этого количества достаточно для 10—20 тыс. определений.

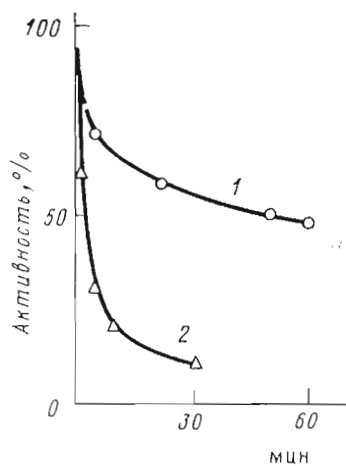


Рис. 1

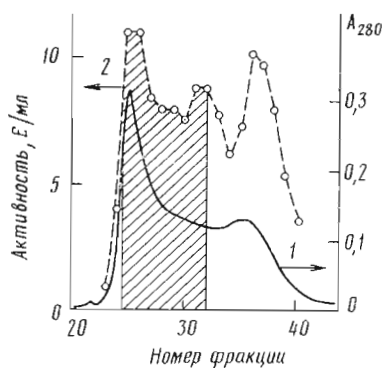


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация пирофосфатазы глутаровым альдегидом в процессе ее конъюгации с иммуноглобулинами G кролика в присутствии 0,2 мМ CaCl_2 и 0,2 мМ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (1), без добавок (2). Условия см. «Экспер. часть»

Рис. 2. Хроматография на сефакириле S-300 реакционной смеси после конъюгирования пирофосфатазы с иммуноглобулинами G кролика. 1 — A_{280} , 2 — активность фермента. Штриховкой отмечены объединенные фракции конъюгата. Условия см. «Экспер. часть»

Раствор конъюгата антител с пирофосфатазой полностью сохранял ферментативную активность в течение по меньшей мере 2 лет при 4°C . При 45°C активность не изменялась в течение 1 мес. При этом чувствительность анализа уменьшалась на 30%, вероятно, за счет частичной инактивации антител. Даже при 72°C активность пирофосфатазного конъюгата не изменялась в течение 1,5 ч, тогда как аналогичный конъюгат с щелочной фосфатазой инактивировался с полупериодом около 5 мин (рис. 3). Таким образом, высокая термостабильность пирофосфатазы сохранялась и в составе конъюгата с антителами.

Измерение ферментативной активности. Конечная стадия ИФА состоит в измерении активности фермента. В случае пирофосфатазы оно основано на определении фосфата, образующегося при гидролизе пирофосфата. Известно множество цветных реакций на фосфат, и практически все они могут быть использованы для измерения активности пирофосфатазы, но самой подходящей для ИФА оказалась цветная реакция с красителем малахитовым зеленым и молибдатом [12]. Эта реакция имеет по меньшей мере три важных достоинства: высокую интенсивность окраски конечного продукта (коэффициент поглощения $90\,000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), контрастный цветовой переход (желтый/сине-зеленый) и возможность объединить все ингредиенты в одном растворе, который к тому же останавливает ферментативную реакцию.

Спектры системы для измерения активности (см. «Экспер. часть») после прибавления реактива на фосфат приведены на рис. 4. В отсутствие фосфата максимум поглощения находится при 450 нм и визуально смесь имеет слабо-желтую окраску. В присутствии фосфата появляется интенсивный пик поглощения при 630 нм и окраска становится сине-зеленой. Калибровочная кривая в координатах A_{630} — концентрация P_i в анализируемом растворе была линейной в диапазоне 0–30 мкМ.

Благодаря контрасту цветового перехода использование пирофосфатазы очень удобно для визуального ИФА. Человеческий глаз, как известно, лучше всего различает желтый и синий цвета и позволяет надежно фиксировать превышение светопоглощения всего в 0,1 ОЕ над уровнем фона. Исходя из этой величины, можно рассчитать, что порог детекции пирофосфатазы при проведении реакции гидролиза пирофосфата в объеме 0,2 мл в течение 1 ч при 37°C составляет всего 50 амоль.

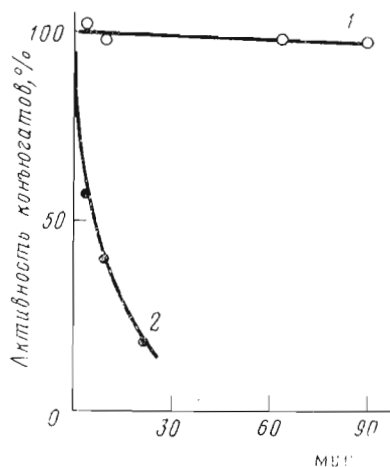


Рис. 3

Рис. 3. Сравнение устойчивости конъюгатов иммуноглобулинов G кролика с пирофосфатазой (1) и щелочной фосфатазой кишок теленка (2) при 72° С. (Использован фосфатазный конъюгат из набора фирмы Boehringer (ФРГ) для определения вируса Y картофеля.) Условия: 0,05 М трис-HCl-буфер, pH 7,5 (1) или 8,0 (2), 1% альбумин сыворотки быка, 1 мМ MgCl₂, 0,02% NaN₃, 0,05 мМ ZnCl₂ (только для кривой 2), концентрация конъюгатов 10 (1) или 40 (2) МЕ/мл. Значения pH измерены при 25° С

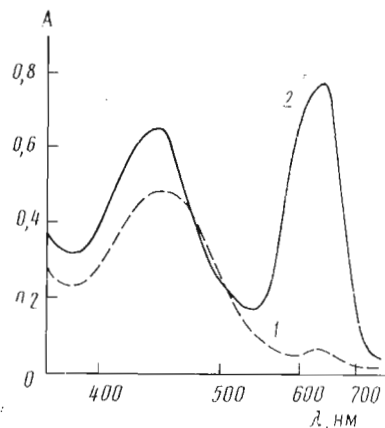


Рис. 4

Рис. 4. Спектры смеси малахитовый зеленый – молибдат – кислота – детергент в отсутствие (1) и в присутствии (2) 10 мкМ фосфата

Можно отметить, что к настоящему времени описано более десятка вариантов определения фосфата с малахитовым зеленым. Различия касаются главным образом состава и способа приготовления окрашивающего реактива. Принципиальное отличие нашего варианта (см. «Экспер. часть») состоит в использовании повышенной концентрации кислоты (5 н. вместо 1 н. в исходной методике [12]). В результате резко улучшилась растворимость малахитового зеленого и отпала необходимость фильтровать раствор. Кроме того, это позволило готовить более концентрированный окрашивающий реактив и получить выигрыш в чувствительности определения за счет меньшего разбавления анализируемого раствора.

Роль детергента твина 20, присутствовавшего в субстратной смеси, состояла в сохранении оптической прозрачности системы после прибавления окрашивающего реактива. В отсутствие детергента скорость развития окраски возрастала на порядок, но при концентрации фосфата в анализируемом растворе более 10 мкМ образовывался осадок, делавший невозможными количественные определения. Детергент можно ввести в состав окрашивающего реактива, что, правда, несколько снижает стабильность последнего.

Определение антигенов и антител. Конъюгаты пирофосфатазы с антителами были испытаны в нескольких вариантах гетерогенного ИФА. Этот тип анализа получил наибольшее распространение в практике благодаря высокой чувствительности и возможности одновременной обработки многих образцов; его использование позволяет определять как антигены, так и антитела к ним.

В качестве примера на рис. 5 представлены калибровочные графики для измерения содержания α -фетопротейна человека. Такой анализ используют для диагностики рака. Методика включает адсорбцию α -фетопротейна из анализируемого раствора на поверхности полистирола, предварительно покрытой специфическими иммуноглобулинами, адсорбцию конъюгатов иммуноглобулинов с пирофосфатазой или пероксидазой и измерение активности ферментов, связанных с твердой фазой. Для первичного покрытия микроплат и приготовления конъюгатов с ферментами используют препарат иммуноглобулинов G кролика к α -фетопротейну

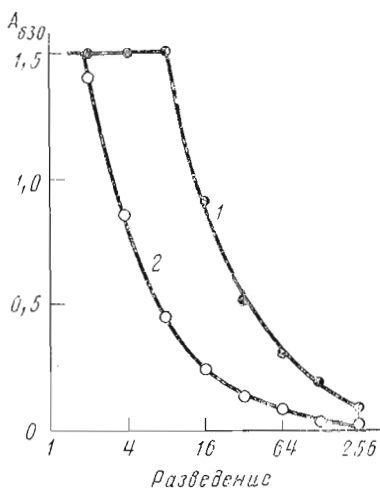


Рис. 5

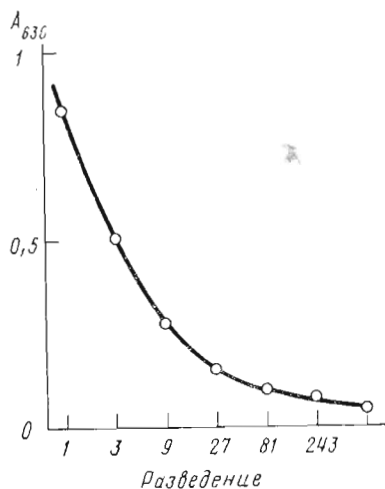


Рис. 6

Рис. 5. Калибровочные кривые для определения α -фетопротейна человека методом ИФА с пирофосфатазой (1) и пероксидазой (2). Исходная концентрация раствора α -фетопротейна 50 $\mu\text{г/мл}$, концентрация конъюгатов ферментов 0,5 $\mu\text{кг/мл}$ (0,06 МЕ/мл)

Рис. 6. Калибровочная кривая для определения иммуноглобулина G человека методом ИФА с пирофосфатазой. Исходная концентрация иммуноглобулина G 1 $\mu\text{кг/мл}$, концентрация конъюгата 0,5 $\mu\text{кг/мл}$ (0,06 МЕ/мл)

человека. Данные приведены за вычетом фоновых значений поглощения в аналогичных опытах без антигена и конъюгатов. Как видно, величины поглощения для пирофосфатазного конъюгата были значительно выше, чем соответствующие величины для конъюгата с пероксидазой. Следует отметить, что оба вида конъюгатов были получены из одних и тех же антител, чтобы исключить влияние их аффинности на результаты анализа. Аналогичные результаты были получены при анализе ряда других антигенов.

Рис. 6 иллюстрирует возможность использования пирофосфатазы для определения антител, в данном случае иммуноглобулинов G человека. Для первичного покрытия микроплат брали сыворотку овцы против иммуноглобулинов G человека, разбавленную в 20 раз. Затем проводили инкубации с растворами иммуноглобулинов G человека различной концентрации и раствором конъюгата пирофосфатазы с антителами кролика против γ -цепи иммуноглобулинов G человека, очищенными аффинной хроматографией. Поскольку эта методика предназначалась для скрининга популяций лимфоцитов B человека, иммуноглобулины G человека разводили в среде RPMI-1640 (GIBCO, США), в которой проводили культивирование лимфоцитов. Сравнительно низкая чувствительность определения IgG объясняется невысоким титром препарата антител.

Хотя во всех приведенных выше примерах был использован фермент из *E. coli*, источником пирофосфатазы для ИФА могут служить и многие другие объекты. По имеющимся данным, пирофосфатазы самого различного происхождения весьма сходны. Сравнительные опыты показали, в частности, что пирофосфатаза дрожжей обеспечивает такую же чувствительность анализа, что и фермент *E. coli*, но уступает последнему по термостабильности. В этой связи могут представлять интерес пирофосфатазы термофильных организмов, одна из которых устойчива даже при 100° C [13].

Важной характеристикой тест-системы для ИФА служит фоновая величина оптического поглощения в опыте без антигена. В случае пирофосфатазы она обычно не превышала 0,10–0,12 ОЕ. Значительное возрастание этого параметра возможно из-за слишком высокой концентрации конъюгата в анализе, неудовлетворительного качества антител при

загрязнении аналитических растворов фосфатом. Две первые причины являются общими для всех ферментов-маркеров. Качество антител можно повысить, очищая их на аффинном сорбенте или применяя для их получения гибридную технику. С целью снижения неспецифической сорбции конъюгата весьма желательным использовать для покрытия микропласты и приготовления конъюгата антитела, полученные из животных разных видов. Для предохранения от загрязнения фосфатом окрашивающий реактив и субстратный буфер следует хранить в отдельной посуде, не используемой для растворов фосфата. Одним из источников загрязнения могут быть электроды рН-метров, для настройки которых часто применяют фосфатный буфер. Коммерческие реактивы, используемые в ИФА на основе пиррофосфатазы, не содержат сколько-нибудь значительных количеств фосфата. Требования к качеству воды в этой связи минимальны. Устойчивость пиррофосфатазы позволяет использовать для приготовления всех растворов водопроводную воду.

Высокая термостабильность пиррофосфатазы *E. coli* позволяет проводить ИФА при температуре до 60° С. В результате время инкубации с мечеными антителами и субстратом можно сократить в 3—4 раза и получить при этом такое же значение оптического поглощения, что и при 25—37° С. В ряде случаев повышением температуры удавалось повысить специфичность определения. Примером может служить диагностика эхинококкоза, для которой удалось снизить число «ложноположительных» ответов, связанных с другими паразитарными заболеваниями, в 3 раза*.

Приведенные данные показывают, что использование пиррофосфатазы в ИФА действительно дает ряд преимуществ. Прежде всего она обеспечивает большую чувствительность определения при спектрофотометрическом методе анализа. Это объясняется высокой молекулярной активностью фермента и интенсивной окраской анализируемого в конечном итоге продукта. При одной и той же концентрации определяемого антигена величина оптического поглощения при использовании пиррофосфатазы в 4—10 раз выше, чем при использовании пероксидазы, и в 2 раза выше, чем при использовании щелочной фосфатазы. Цветовой переход в случае пиррофосфатазы наиболее благоприятен для визуальной оценки результатов анализа и позволяет надежно регистрировать светопоглощение, превышающее фоновое на 0,1 ОЕ. При детекции *n*-нитрофенола (щелочная фосфатаза и β -D-галактозидаза) пороговая величина в несколько раз выше. Важными достоинствами пиррофосфатазы являются низкая стоимость и устойчивость субстрата. Сухой пиррофосфат натрия можно хранить при комнатной температуре неограниченное время, а в виде раствора — не менее полугодом при 4° С. Константа Михаэлиса для взаимодействия пиррофосфатазы с этим субстратом составляет всего 5 мкМ, что позволяет резко сократить расход субстрата.

К настоящему времени в сотрудничестве с различными организациями разработаны тест-системы на основе пиррофосфатазы для ИФА около 30 соединений, в том числе вирусов растений, возбудителей заболеваний человека и животных, иммуноглобулинов, α -фетопротейна, интерферона и активатора плазминогена.

Авторы выражают глубокую благодарность А. В. Кулиничу (Институт общей генетики АН СССР), П. Эссеру (фирма «Nunc», Дания) и В. В. Куликову (Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной молекулярной биологии и генетики).

Экспериментальная часть

Неорганическую пиррофосфатазу с уд. акт. 500—600 МЕ/мг (25° С, рН 9) выделяли из *E. coli* (штамм МРЕ-600) упрощенным методом Уонга и др. [14]. Чистота фермента, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, составляла не менее 90%. Раствор фермента в концентрации 5 мг/мл в 0,01 М калий-фосфатном буфере,

* Данные получены Б. Я. Шевелевым (Центральный институт усовершенствования врачей).

pH 7,5, содержащим 0,15 М NaCl, хранили при -25°C . Активность пирофосфатазы измеряли при 25°C с помощью автоматического анализатора [15] в среде следующего состава: 0,1 М трис-НСl-буфер (pH 9), 0,1 мМ $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 5 мМ MgCl_2 . За единицу активности принимали активность такого количества фермента, взаимодействие которого с субстратом приводит к высвобождению 2 мкмоль P_i за 1 мин.

В ИФА использовали иммуноглобулины G кролика к α -фетопротейну человека и их конъюгат с пероксидазой фирмы Dakopatts (Дания). Кроличьи антитела к γ -цепи иммуноглобулина G человека были любезно предоставлены В. В. Куликовым (ИИМБ МЗ СССР).

Концентрацию белковых растворов измеряли по связыванию кумасси G-250 [16], используя в качестве стандарта альбумин сыворотки быка.

Получение конъюгатов пирофосфатазы с антителами. К 1 мл смеси фермента и иммуноглобулинов (по 1 мг каждого) в 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl, прибавляли по 10 мкл 20 мМ растворов CaCl_2 и $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ и 10 мкл 5% водного раствора глутарового альдегида (Serva). Смесь инкубировали 1 ч при 20°C , если не оговорено особо, и подвергали гель-фильтрации при $2-4^{\circ}\text{C}$ на колонке (1,8×30 см) с сефакрилом S-300 (Pharmacia). Элюцию проводили 0,05 М трис-НСl-буфером, pH 7,5, содержащим 0,05 М NaCl, 1 мМ MgCl_2 и 0,02% NaN_3 , со скоростью 15 мл/ч; объем фракций 1,5 мл. Выход белков регистрировали с помощью увикорда UA-5 (ISC) при 280 нм. В элюатах измеряли активность пирофосфатазы; фракции, содержащие конъюгат антител и фермента, объединяли и прибавляли к ним альбумин сыворотки быка (Serva) в концентрации 10 мг/мл [17].

Проведение ИФА с пирофосфатазой. В полистироловую 96-луночную микроплату для ИФА последовательно помещали растворы (0,2 мл) следующего состава (время инкубации и температура ($^{\circ}\text{C}$) указаны в скобках): А) 0,05 М натрий-карбонатный буфер, pH 9,6, антитела (5–10 мг/л) к определяемому антигену (18 ч, 4°); Б) 0,1% поливинилпирролидон, 0,01 М трис-НСl-буфер, pH 7,4, содержащий 0,05 М NaCl, 0,1% тритон X-100 (15–30 мин, 20°); В) анализируемый раствор антигена, разбавленный при необходимости раствором Б (2 ч, 37°); Г) раствор Б, содержащий конъюгат антител и фермента (1 ч, 37°); Д) 0,05 М трис-НСl-буфер (pH 9,0), 0,03 мМ PP_i , 5 мМ MgCl_2 , 0,05% твин 20 (30 мин, 37°). В промежутках между инкубациями платы промывали 3–4 раза раствором Б и один раз водой. Затем, не удаляя раствор субстрата, прибавляли по 0,05 мл окрашивающего реактива и через 15 мин измеряли оптическое поглощение при 630 нм с помощью фотометра для ИФА (Dunotech).

Стадия Б необходима для блокирования центров связывания, оставшихся свободными после присоединения антител на стадии А. Вместо поливинилпирролидона можно использовать альбумин в концентрации 0,1–0,5%. В этом случае поливинилпирролидон можно не добавлять в раствор для последующей промывки.

Проведение ИФА с пероксидазой. Анализ проводили как описано выше для случая с пирофосфатазой с тем лишь изменением, что раствор Д содержал 0,05 М цитрат-фосфатный буфер (pH 5,0), 3,5 мМ *o*-фенилендиамин и 5 мМ H_2O_2 . Ферментативную реакцию останавливали прибавлением 0,15 мл 2 н. H_2SO_4 и измеряли оптическое поглощение при 490 нм.

Окрашивающий реактив для определения неорганического фосфата. К 300 мл воды осторожно прибавляли при перемешивании 57 мл конц. H_2SO_4 , затем давали смеси остыть и растворяли в ней 0,44 г малахитового зеленого (Merck). Осадок, если он образовывался, отделяли декантацией или центрифугированием. Полученный раствор оранжевого цвета устойчив не менее 1 года при комнатной температуре. К 10 мл этого раствора прибавляли при перемешивании 2,5 мл 7,5% раствора молибдата аммония. Конечная смесь устойчива при комнатной температуре несколько дней, причем образование небольшого осадка при стоянии не мешает определению P_i .

ЛИТЕРАТУРА

1. Yallow R. S., Berson S. A. // Nature. 1959. V. 184. Suppl. № 21. P. 1648–1649.
2. Shall R. F., Jr., Tenoso H. I. // Clin. Chem. 1981. V. 27. № 4. P. 1157–1164.
3. Engvall E., Perlmann P. // Immunochemistry. 1971. V. 8. № 9. P. 871–874.
4. van Weemen B. K., Schuur A. H. W. M. // FEBS Lett. 1971. V. 15. № 3. P. 232–236.
5. Itagawa M., Yoshitake S., Ishikawa E., Niitsu Y., Urushizaki I., Kanazawa R., Tachibana S., Nakazawa N., Ogawa H. // Clin. and chim. acta. 1982. V. 121. № 2. P. 277–289.
6. Дзангилев Б. Б., Егоров А. М. // Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. 27. № 4. С. 82–89.
7. Blake C., Gould B. J. // Analyst. 1984. V. 109. № 1295. P. 533–547.
8. Josse J. // The Enzymes. V. 4./Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 499–527.
9. Байков А. А., Камо В. Н., Аваева С. М. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 12. С. 1681–1682.
10. Burton P. M., Josse J. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 17. P. 4358–4364.
11. Ridlington J. W., Butler L. G. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 22. P. 7303–7307.
12. Itaya K., Ui K. // Clin and chim. acta. 1966. V. 14. № 3. P. 361–366.
13. Tominaga N., Mori T. // J. Biochem. 1977. V. 81. № 2. P. 477–483.
14. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 17. P. 4335–4345.

15. Baykov A. A., Avaeva S. M. // Anal. Biochem. 1981. V. 116. № 1. P. 1—4.
16. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.
17. Атабеков И. Г., Аваева С. М., Байков А. А., Кулинич А. В., Мизенина О. А. Способ гетерогенного иммуноферментного анализа антигена: А. с. 1158933 СССР // Б. И. 1987. № 41. С. 257.

Поступила в редакцию
23.III.1988

USE OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE AS A MARKER IN ENZYME IMMUNOASSAYS

BAYKOV A. A., KASHOV N., EVTUSHENKO O. A., AVAEVA S. M.

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

A technique of heterogeneous enzyme immunoassay with the *E. coli* inorganic pyrophosphatase as marker enzyme and Malachite green dye and acidic molybdate as color reagent is developed. Color change (light-yellow/greenish blue) is extremely suitable for visual perception, in some cases making unnecessary the measuring device. Assays with pyrophosphatase are 5—10 times more sensitive than with peroxidase. Further advantages of pyrophosphatase include high thermostability, insensitivity to sodium azide, low value of Michaelis constant (5 μM), substrate stability. Examples are given of use of the pyrophosphatase for assays of human α -fetoprotein and immunoglobulin.