

СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН ИНГИБИРУЕТ РЕАКЦИЮ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

Сухарев А.Е., Беда Н.А., Мамаева С.А., Москаленко Н.П., Ермолаева Т.Н.
Медико-юридическая консультация Астраханского филиала УРАО (г. Москва) и Саратовской государственной академии права; МУЗ ГКБ № 4; Городской клинический роддом № 2; Проект № 04-06-00309, поддержан грантом РГНФ (г. Москва); Астрахань, Россия

Энзимохимический метод применяется для определения ферментов биологических жидкостей после разделения их на фракции при электрофорезе в агаровом геле (Суринов В.П. и др., 1970).

С целью упрощения метода, мы предприняли попытку идентификации в сыворотках крови беременных женщин тотальной щелочной фосфатазы (ЩФ) и эстеразы (Э) в агаровом геле без электрофореза.

Образцы сывороток крови и стандартный контрольный раствор ЩФ (бутаноловый экстракт плаценты) вносили пипеткой в ряд отверстий, пробитых в пластинках 1% агарового геля, приготовленного на веронал-мединаловом буфере рН 8,6 (для ЩФ) и на 0,9% растворе хлористого натрия рН 7,0 (для Э). После радиальной диффузии образцов в гель в течение 1–3 часов, агаровые пластинки заливали соответствующими смесями реактивов (субстраты: нафтол-фосфат для ЩФ и нафтол-ацетат для Э, краситель – прочный синий соль В или РР) и выдерживали при 37° С в течение 1–1,5 часов. После этого отмечается синее окрашивание колец диффузии ЩФ в контроле и красновато-коричневое кольцо эстеразы в сыворотках крови, тогда как окрашивания на ЩФ в последних не наблюдается. В то же время, после электрофоретического разделения сывороток крови, соответствующие фракции окрашиваются на ЩФ. При добавлении в контрольные растворы ЩФ образцов тех же сывороток в диффузионном методе окрашивание ЩФ также угнетается.

В связи с этим, мы предположили наличие в сыворотках крови фактора, ингибирующего реакцию нафтол-фосфата (но не нафтол-ацетата) с прочным синим В или РР, что создает артефакт при выявлении ЩФ (но не эстеразы) в сыворотках крови методом диффузии в агаре. Для идентификации предполагаемого ингибитора образцы сывороток вновь подвергли электрофорезу в агаровом геле рН 8,6. После его завершения всю агаровую пластинку сразу же залили стандартным раствором ЩФ на 1 час для тотального её пропитывания и подвергли указанной выше процедуре окрашивания на ЩФ. В результате наступило полное окрашивание агаровой электрофореграммы, за исключением зон миграции альбумина, которые выглядели бесцветными пятнами на синем фоне. Другие белковые фракции сыворотки не влияли на реакцию ЩФ.

Таким образом, альбумин блокирует идентификацию ЩФ в сыворотке крови в методе радиальной диффузии в агаровом геле. Это ингибирование является обратимым, поскольку при электрофорезе альбумин мигрирует в сторону от фракции сывороточной ЩФ и, благодаря этому, его угнетающее воздействие на окрашивание ЩФ нафтол-фосфатом и прочным синим отменяется. Следует подчеркнуть, что на нафтол-ацетат альбумин такого влияния не оказывает, следовательно, мишенью альбумина является фосфатная группа субстрата.

Этот факт мы обнаружили впервые и рекомендуем учитывать его при гистохимических исследованиях щелочной фосфатазы в криостатных срезах тканей, где присутствие альбумина, вероятно, может способствовать ложно отрицательному результату.