



УДК 577.152.342.01 : 547.587.51

© 1990 г.

*В. Ф. Позднев, С. Э. Рабинович, Т. С. Пасхина***ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИДАЗНОЙ
АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
4-МЕТИЛКУМАРИЛ-7-АМИДНЫХ СУБСТРАТОВ***Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*

Показано, что 7-амино-4-метилкумарин (МС-амин), образующийся при ферментативном гидролизе 4-метилкумарил-7-амидных (МС-амидных) пептидных субстратов, можно определять не только флуориметрически, но и фотометрическим способом. Предложен фотометрический метод определения активности тканевого калликреина (КФ 3.4.21.35) и урокиназы (КФ 3.4.21.31) с использованием в качестве субстратов Z-Phe-Arg-NH-МС и Z-Gly-Gly-Arg-NH-МС соответственно. Кинетические параметры ферментативного гидролиза, полученные с фотометрической и флуориметрической регистрацией образующегося МС-амин, хорошо совпадают. Найдено, что разностный коэффициент молярного поглощения субстратов и МС-амин при 360 нм составляет $10\ 800\ \text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$.

При решении большого ряда практических задач в биохимии, клинической диагностике и промышленной энзимологии возникает необходимость в определении активности протеолитических ферментов в различных объектах. Как правило, при этом используют пептидные синтетические субстраты, содержащие детекторные группировки, отщепляющиеся при ферментативном гидролизе, в результате чего изменяются спектральные характеристики изучаемой системы [1]. В настоящее время наиболее применяемыми субстратами этого типа являются *n*-нитроанилиды аминокислот и пептидов. Образующиеся в результате ферментативного гидролиза *n*-нитроанилин определяют фотометрически при 405—410 нм, причем значение его молярного коэффициента поглощения (ϵ) в разных работах варьирует от 8800 до $10\ 600\ \text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$, что позволяет определять фермент в концентрации до 10^{-11} моль/мл [2]. Однако часто, особенно при определении ферментативной активности в биологических средах, такой чувствительности оказывается недостаточно. В связи с этим в последнее десятилетие стали применять субстраты, содержащие детекторные группировки, обладающие люминесценцией, что позволило существенно увеличить чувствительность определения. Среди субстратов такого типа наибольшее распространение получили 4-метилкумарил-7-амиды аминокислот и пептидов [1, 3]. Образующийся при их ферментативном гидролизе МС-амин обладает интенсивной флуоресценцией ($\lambda_{\text{возб}}$, 380 нм, $\lambda_{\text{исп}}$, 460 нм).

Однако флуоресцентный метод регистрации продукта ферментативной реакции имеет ряд ограничений. Так, при определении активности ферментов в неочищенных биологических объектах флуоресценция продукта может маскироваться содержащимися в них тушителями или флуоресценцией самой среды. С другой стороны, МС-амидные субстраты обладают довольно высокой собственной флуоресценцией, которая при высоких концентрациях может маскировать флуоресценцию МС-амин. Таким образом, каждый тип субстратов имеет свои достоинства и ограничения. В ре-

Сокращения: МС — 4-метилкумарил-7, DMF — диметилформамид, EMFO — диэтилсульфоксид, Z — бензильноксикарбонильный, DCC — диметилтетракарбодимид.

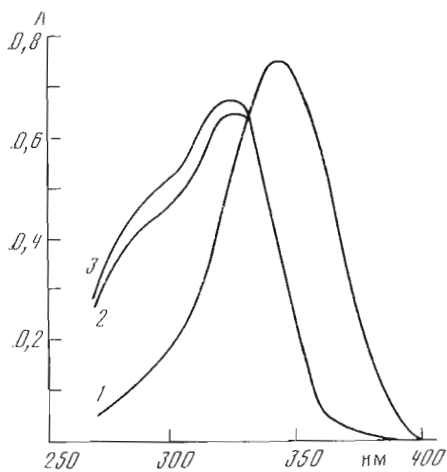


Рис. 1

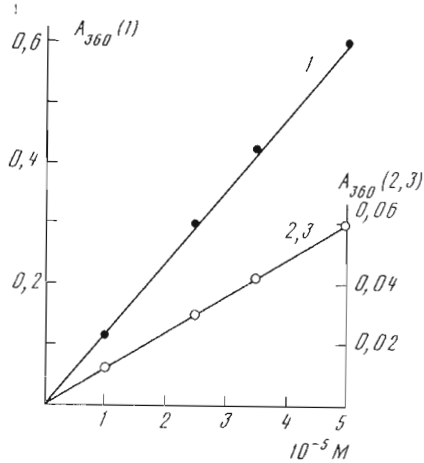


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения МС-амина (1), Z-Phe-Arg-NH-МС (2) и Z-Gly-Gly-Arg-NH-МС (3). Условия: 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 8,0, с 0,15 М NaCl, 25° С, концентрации МС-амина и субстратов $5 \cdot 10^{-5}$ М, в качестве контроля использовали тот же буфер

Рис. 2. Зависимость оптического поглощения от концентрации МС-амина (1), Z-Phe-Arg-NH-МС (2) и Z-Gly-Gly-Arg-NH-МС (3). Условия см. в подписи к рис. 1

зультате часто, в зависимости от специфики решаемых задач, при определении активности одного и того же фермента приходится использовать как минимум два ряда субстратов, идентичных по аминокислотному составу, но различающихся детектируемой группировкой. Это ведет к непроизводительным затратам и усложняет работу.

В этой связи вызывают интерес исследования, где показано, что спектральные характеристики МС-амина и МС-амидов различаются в меньшей степени, чем спектры *n*-нитроанилина и его амидов. В одной из первых публикаций по применению МС-амидных субстратов для определения пептидазной активности [4] приведены следующие данные: для МС-амина λ_{\max} 343 нм, ϵ 25 500 М⁻¹см⁻¹; для используемого субстрата Leu-NH-МС λ_{\max} 324 нм, ϵ 26 800 М⁻¹см⁻¹ в трис-НСl-буфере, рН 8,0. При этом отмечено, что при 365 нм разница в молярных коэффициентах поглощения ($\Delta\epsilon$) составляет 15 500 М⁻¹см⁻¹, что значительно выше, чем для *n*-нитроанилина при 405 нм. Однако в другой работе того же периода [5] разница в молярных коэффициентах поглощения МС-амина и МС-пептида при 370 нм определена только в 6200 М⁻¹см⁻¹. В этих работах ферментативный гидролиз МС-пептидов контролировали только флуориметрическим методом и фотометрические данные для этого не привлекали. Несколько позже, изучая ингибиторы эластазы лейкоцитов [6], авторы использовали наряду с другими и МС-пептидный субстрат, причем определение МС-амина вели как флуориметрически, так и фотометрическим методом при 360 нм ($\Delta\epsilon$ 6700 М⁻¹см⁻¹). Таким образом, хотя возможность фотометрической регистрации МС-амина, образующегося при ферментативном гидролизе МС-амидных субстратов, была обнаружена и использована ранее, специально этот вопрос не изучался и в опубликованных спектральных характеристиках МС-амина имеются значительные расхождения. Аналогичный подход был использован при определении ферментативной активности гликозидаз с 4-метилумбеллиферилловыми субстратами, когда продукт ферментативной реакции — 4-метилумбеллиферон определяли как флуориметрическим, так и фотометрическим методом [7, 8].

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы проверить возможность определения амидазной активности пептидгидролаз с помощью МС-амидных субстратов путем фотометрической регистрации МС-амина и затем на конкретных примерах сравнить кинетические характеристики ферментативного процесса при разных методах регистрации продукта.

Кинетические параметры гидролиза МС-амидных субстратов тканевым калликреином и урокиназой

Фермент	Субстрат	Метод регистрации продукта	Результаты настоящей работы		Литературные данные [9]	
			K_m , мМ	V_{max} , мкмоль/мин·мг	K_m , мМ	V_{max} , мкмоль/мин·мг
Калликреин	I	Флуориметрический	0,25	3,35	0,28	1,10
		Фотометрический	0,18	3,57	—	—
Урокиназа	II	Флуориметрический	0,30	1250	0,13	1600
		Фотометрический	0,28	1330	—	—

Примечание. Условия определения см. в «Экспериментальной части».

Прежде всего были изучены электронные спектры поглощения МС-пептидов и МС-амина в ближнем ультрафиолете (250—400 нм). В качестве объектов исследования были выбраны тканевый калликреин (КФ 3.4.21.35) и его субстрат Z-Phe-Arg-NH-МС (I) [9], а также урокиназа (КФ 3.4.21.31) и субстрат этого фермента Z-Gly-Gly-Arg-NH-МС (II) [9].

Общий вид полученных нами электронных спектров изучаемых субстратов и МС-амина аналогичен опубликованным ранее [5] (рис. 1): максимум поглощения в спектре МС-амина смещен в длинноволновую область относительно спектров субстратов и в области 360—370 нм имеется участок, где спектр МС-амина практически не перекрывается со спектрами субстратов. При этом в отличие от опубликованных данных МС-амин при 360 нм имеет ϵ , равный $12\ 000\ M^{-1}\text{см}^{-1}$, а ϵ субстратов при этой длине волны равны $1200\ M^{-1}\text{см}^{-1}$ (рис. 2). Таким образом, величина $\Delta\epsilon$ в дифференциальном спектре при 360 нм составляет $10\ 800\ M^{-1}\text{см}^{-1}$ и в числовом выражении совпадает или даже превышает величину ϵ поглощения *n*-нитроанилина при 405 нм [4]. Найденное значение $\Delta\epsilon$ для МС-амина далее было нами использовано для определения количества МС-амина, образующегося в результате ферментативного гидролиза изучаемых субстратов вышеуказанными ферментами. Параллельно эти же реакции контролировали и флуориметрическим методом.

Накопление МС-амина в процессе ферментативного гидролиза регистрировали спектрофотометрически при 360 нм или по показаниям флуориметра после остановки ферментативной реакции (см. «Экспериментальную часть»). Для обоих ферментов независимо от метода регистрации оно имеет линейный характер, что указывает на стационарность условий протекания самих ферментативных реакций. Полученные результаты приведены в таблице. Кинетические параметры гидролиза субстрата (I) под действием калликреина и субстрата (II) под действием урокиназы, полученные флуориметрическим и фотометрическим методами, имеют близкие значения и хорошо совпадают с опубликованными в литературе [9], полученными с использованием флуориметрического метода регистрации МС-амина (таблица).

Таким образом, МС-амидные субстраты амидгидролаз более универсальны, чем *n*-нитроанилиды аминокислот и пептидов, поскольку для регистрации реакции ферментативного гидролиза в этом случае можно использовать не только флуориметрический, но и фотометрический метод. Чувствительность фотометрической регистрации МС-амина при 360 нм не ниже, чем чувствительность регистрации *n*-нитроанилина при 405 нм. При необходимости использование флуориметра позволяет существенно повысить чувствительность определения.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли в открытых капиллярах и не исправляли. Удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer-241. Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках с силикагелем 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в следующих системах растворителей: хло-

роформ — метанол — уксусная кислота, 40 : 10 : 3 (А); хлороформ — метанол — 25% водный аммиак, 10 : 6 : 1 (Б). Детектирование проводили в УФ-свете, раствором нингидрина в *n*-бутиловом спирте и бензидиновым реактивом после хлорирования. Производные аргинина окрашивали по Сакагучи с использованнем 8-гидроксихинолина.

Использовали аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия). MS-амин синтезировали по методике [10].

Высокоочищенные препараты калликрина и урокиназы получены из мочи человека. Калликреин выделяли сорбцией фермента на хитозане с последующей элюцией NH_3 , дальнейшую очистку проводили по методике [11]. Полученный фермент имел молекулярную массу 40 000 Да и удельную активность 10 мкмоль/мин·мг белка (субстрат — *n*-нитроанилид *D*-Val-Leu-Arg [11]). Высокоочищенный препарат урокиназы с удельной активностью 140 000 МЕ/мг белка был любезно предоставлен проф. В. П. Торчилиным (ВКНЦ АМН СССР).

Z-Arg-NH-MS·HCl получали по методике [12] и перекристаллизовывали из спирта с добавлением конц. HCl до 5%. Выход 64%, т. пл. 209—210° С, $[\alpha]_D^{20} -19,0^\circ$ (*c* 1, CH_3OH); $-16,6^\circ$ (*c* 1, DMF), R_f 0,53 (А), УФ-спектр (водный метанол): λ_{max} 325 нм (ϵ 15 700 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

H-Arg-NH-MS·HBr. Раствор 3,1 г (6,1 ммоль) *Z*-Arg-NH-MS·HCl в 20 мл 2,5 М HBr в уксусной кислоте выдерживали 1 ч, причем образовывался белый рыхлый осадок. Смесь разбавляли эфиром, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и получали *H*-Arg-NH-MS·2HBr. Его растворяли в спирте, добавляли 2 мл триэтиламина и выдерживали при 0° С до окончания кристаллизации. Осадок отфильтровывали, промывали спиртом, эфиром и высушивали в вакууме над КОН и H_2SO_4 . Выход 1,9 г (76%), т. пл. 259—261° С, $[\alpha]_D^{20} +64,8^\circ$ (*c* 1; 80% уксусная кислота), R_f 0,31 (Б).

Z-Phe-Arg-NH-MS·HBr (*I*·HBr). К смеси 410 мг (1 ммоль) *H*-Arg-NH-MS·HBr и 0,6 г (1,3 ммоль) пентафторфенилового эфира *Z*-фенилаланина в 3 мл DMF добавляли 0,14 мл триэтиламина, перемешивали 16 ч. Смесь разбавляли эфиром до полного осаждения смолообразного осадка, раствор сливали, осадок дважды растирали с эфиром и кристаллизовали из хлористого метилена. Получали 0,66 г продукта, который хроматографировали на колонке с силикагелем (элюенты — хлороформ и смесь хлороформ — метанол — уксусная кислота, 150 : 50 : 1 (по объему)). Фракции, содержащие продукт (контроль ТСХ), объединяли, упаривали, остаток растворяли в метаноле, при необходимости фильтровали, разбавляли водой и выдерживали при 4° С. Кристаллический осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Выход 0,53 г (76%), т. разл. 130—135° С, $[\alpha]_D^{20} -27,8^\circ$ (*c* 1, CH_3OH), R_f 0,51 (А), УФ-спектр (водный метанол): λ_{max} 325 нм (ϵ 16 600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Z-Gly-Gly-Arg-NH-MS (*II*). К смеси 2,4 г (4,9 ммоль) *H*-Arg-NH-MS·2HBr, 1,3 г (5,0 ммоль) *Z*-Gly-Gly-OH, 0,7 г *N*-гидроксibenзотриазола в 15 мл DMF добавляли 0,7 мл триэтиламина, перемешивали 10 мин, охлаждали до 0° С, приливали охлажденный раствор 1,2 г (5,8 ммоль) DCC в 5 мл DMF, выдерживали 3 ч (0°), перемешивали 16 ч при 20° С. К реакционной смеси добавляли 3 мл 1 М раствора щавелевой кислоты в метаноле, перемешивали 30 мин, смесь фильтровали, осадок промывали небольшим количеством хлороформа, фильтрат разбавляли эфиром (50 мл), выдерживали при 4° С, смолообразный осадок дважды растирали с эфиром, с 1 М раствором аммиака (2 раза по 15 мл), с водой и кристаллизовали из изопропилового спирта. Кристаллический осадок отделяли, промывали изопропиловым спиртом, эфиром и высушивали. Выход 2,4 г (72%), т. разл. 125—130° С; $[\alpha]_D^{20} -22,4^\circ$ (*c* 0,5, CH_3OH), R_f 0,31 (А), УФ-спектр (водный метанол); λ_{max} 325 нм (ϵ 13 500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Растворы субстратов (I) и (II), а также MS-амин (Serva, ФРГ) готовили растворением навески в минимальном объеме DMSO с последующим разведением 0,1 М трис-HCl-буфером, pH 8,0, содержащим 0,15 М NaCl, с таким расчетом, чтобы конечная концентрация DMSO не превышала 2,5—5,0%.

Спектры поглощения снимали в кювете объемом 0,5 мл на спектрофотометре СФ-16.

Фотометрическое определение скорости ферментативного гидролиза исследуемых субстратов. Ферментативные реакции проводили непосредственно в термостатируемой кювете спектрофотометре СФ-16 в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 0,15 М NaCl, при концентрациях субстратов 10^{-4} — 10^{-3} М. Начинали реакции добавлением растворов ферментов в количестве 20—50 мкл; общий объем реакционной смеси составлял 0,5 мл. Прирост оптической плотности наблюдали при длине волны 360 нм при 37° С для калликрейна и при 25° С для урокиназы.

Флуориметрическое определение скорости ферментативного гидролиза исследуемых субстратов. Реакции проводили в тех же условиях, что и при фотометрическом определении активности. Общий объем 1 мл. После 10 мин инкубации реакции останавливали добавлением 1,5 мл 17% раствора уксусной кислоты. Величину флуоресценции образовавшегося МС-аминa измеряли на спектрофлуориметре Opton (ФРГ) при длине возбуждения 365 нм и эмиссии 470 нм. Концентрацию МС-аминa рассчитывали, исходя из калибровочного графика зависимости показаний флуориметра от концентрации МС-аминa (0—12,5 нмоль).

Кинетические параметры рассчитаны по начальным, стационарным скоростям реакций. За единицу ферментативной активности принимали активность такого количества ферментного белка, которое катализирует образование 1 мкмоль МС-аминa за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности, отнесенных к 1 мг белка, определенному методу Лоури и др. [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гершкович А. А., Кибирев В. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1461—1488.
2. Castillo M. J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J. C. // Anal. Biochem. 1979. V. 99. № 1. P. 53—64.
3. Zimmerman M., Yurewicz E., Patel G. // Anal. Biochem. 1976. V. 70. № 2. P. 258—262.
4. Saifuru K., Sekine T., Namihisa T., Takahashi T., Kanaoka Y. // Clin. chim. acta. 1978. V. 84. № 1. P. 85—91.
5. Iwanaga S., Morita T., Kato H., Harada T., Adachi N., Sudo T., Maruyama I., Takada K., Kimura T., Sakakibara S. // Adv. exp. med. Biol. 1979. V. 120. A. P. 147—163.
6. Baici A., Salgam P., Böni A. // Biochem. Pharm. 1981. V. 30. № 7. P. 707—708.
7. Rosenthal A. L., Saifer A. // Anal. Biochem. 1973. V. 55. № 1. P. 85—92.
8. Черноглазов В. М., Талейбаровская И. К., Джафарова А. Н., Клесов А. А. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 631—635.
9. Kettner C., Shaw E. // Meth. Enzymol. 1981. V. 80. P. 351—361.
10. Позднев В. Ф. Способ получения 7-амино-4-метилкумарина: А. с. 1325050 СССР // Б. И. 1987. № 27. С. 96.
11. Geiger R., Stuckstedt U., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1980. B. 361. № 7. S. 1003—1016.
12. Позднев В. Ф. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 538—589.
13. Kanaoka Y., Takahashi T., Nakayama H., Takada K., Kimura T., Sakakibara S. // Chem. Pharm. Bull. 1977. V. 25. № 11. P. 3126—3128.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.

Поступила в редакцию
3.VIII.1989

V. F. POZDNEV, S. E. RABINOVICH, T. S. PASKHINA

PHOTOMETRIC METHOD FOR ESTIMATION OF AMIDASE ACTIVITY OF PROTEASES USING 4-METHYLCOUMARYL-7-AMIDE SUBSTRATES

*Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

It was shown that 7-amino-4-methylcoumarin (MC-amin), resulted from the enzymatic hydrolysis of 4-methylcoumaryl-7-amide (MC-amide) peptide substrates, may be estimated not only fluorometrically but also photometrically. A photometric method for estimating activity of tissue kallikrein (EC 3.4.21.35) and urokinase (EC 3.4.21.31) is suggested using Z-Phe-Arg-NHMC and Z-Gly-Gly-Arg-NHMC, respectively, as substrates. Kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis, as obtained by photometric and fluorometric detection of the MC-amine formed, were in good agreement. The differential coefficient of molar extinction of the substrates and MC-amine at 360 nm was found to be $10\ 800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.