

Т. Н. АКОПЯН, А. И. ОГАНИСЯН, А. А. АРУТЮНЯН,  
А. М. АРЗУМАНЯН, А. А. ГАЛОЯН

## ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНДОПЕПТИДАЗ С ПОМОЩЬЮ О-ФТАЛЬДИАЛЬДЕГИДА

Разработан чувствительный метод измерения активности эндопептидаз с помощью о-фталдигальдегида в присутствии 2-меркаптоэтанола, позволяющий определять образование 1 нм пептида. Показана возможность определения активности нейтральной протеиназы из бычьего гипоталамуса. В качестве субстрата использовали как яленированный гемоглобин, так и ЛРГ.

Классические методы измерения активности протеолитических ферментов, которые базируются в основном на определении высвобождающихся  $\alpha$ -аминогрупп аминокислот или пептидов (нингидриновый метод) [1], либо на определении тех или иных аминокислот в коротких, неосаждаемых ТХУ (трихлоруксусная кислота) пептидах (метод Ансона [2] и его модифицированный вариант [3]), имеют сравнительно малую чувствительность (порядка  $2,5 \cdot 10^{-8}$  М) и достаточно трудоемки. Синтетические субстраты, которые позволяют проводить более чувствительное определение эндопептидазной активности, как правило, содержат либо флуорофор, либо радиоактивную метку. Однако с помощью синтетических субстратов невозможно определить активность эндопептидаз неизвестной специфичности.

В последние годы в связи с появлением новых флуоресцирующих реагентов детекции  $\alpha$ -аминогрупп аминокислот, пептидов и белков чувствительность определения возросла в 50—100 раз. В настоящее время описаны методы определения аминокислот и пептидов, в которых в качестве реагента детекции  $\alpha$ -аминогрупп используется ДНС-Cl [4], флуорескамин [5], о-фталдигальдегид [6]. Один из этих реагентов (флуорескамин) уже нашел применение в измерении активности протеолитических ферментов [7]. В данной работе описан простой и чувствительный метод определения активности эндопептидаз при помощи о-фталдигальдегида.

*Материал и методика.* В работе использовали о-фталдигальдегид фирмы Schwarz Mann, дипептид—лейцилглицин фирмы Sigma, денатурированный гемоглобин фирмы Sigma, 2-меркаптоэтанол фирмы Merck.

Определение зависимости сигнала флуоресценции от количества пептида проводили следующим образом: 1, 2, 5, 7,5, 10 нмоль дипептида (лейцилглицин) растворяли в 20 мкл 0,025 М фосфатного буфера (рН 7,6), раствор переносили в кювету спектрофлуориметра Farrand (США), добавляли 0,1 мл 0,015% раствора о-фталдигальдегида в 0,8 М боратном буфере (рН 9,7), содержащем  $10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанола, и интенсивно перемешивали. Резво через 1 мин добавляли 3 мл воды и регистрировали сигнал флуоресценции при 450 нм (возбуждение при 345 нм).

Для определения оптимальной исходной концентрации о-фталдальдегида в реакционной смеси 10 нмоль дипептида детектировали описанным выше способом, используя разные концентрации о-фталдальдегида (0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,05%).

Влияние 2-меркаптоэтанола на образование флуорофора изучали при концентрации пептида 10 нмоль, о-фталдальдегида—0,015%. Реакцию проводили при концентрации 2-меркаптоэтанола  $2,5 \cdot 10^{-7}$  —  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М.

Для измерения эндопептидазной активности использовали нейтральную протенназу, выделенную из гипоталамуса быка. В каждую пробу, содержащую 10 нмоль ЛРГ (лютеинизирующий рилизинг гормон), или 200 мкг маленированного гемоглобина (маленирование гемоглобина проводили по методике, описанной в работе Батлера и др. [8]), добавляли 13 мкг фермента в 20 мкл 0,025 М фосфатном буфере (рН 7,6). После инкубации при 37° в течение 2 час. проводили определение высвобождающихся  $\alpha$ -аминогрупп описанным выше способом.

Контрольные пробы содержали или фермент, или субстрат и инкубировались, как опытные.

*Результаты и обсуждение.* При разработке метода определения протеолитической активности при помощи о-фталдальдегида первоначально была изучена реакция пептида лейцилглицина с о-фталдальдегидом.

С целью выяснения оптимальных условий проведения реакции пептида с о-фталдальдегидом мы изучали зависимость сигнала флуоресценции от концентрации пептида, о-фталдальдегида, 2-меркаптоэтанола и времени. Изучение влияния концентрации о-фталдальдегида на образование флуорофора показало (рис. 1), что для полноты

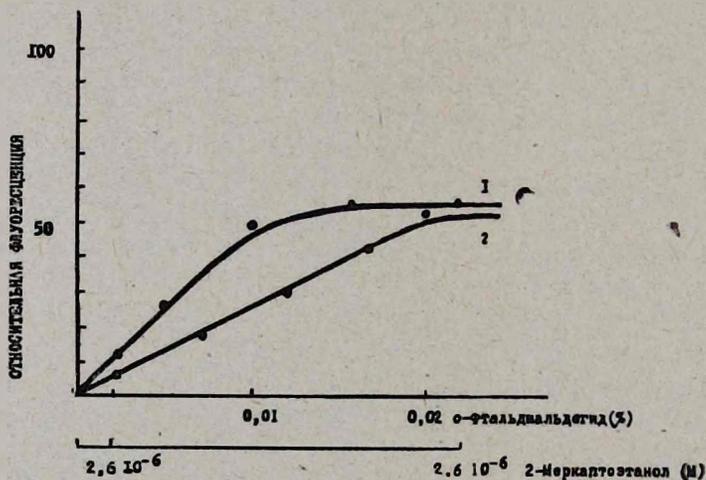


Рис. 1. Зависимость сигнала флуоресценции от концентрации о-фталдальдегида (кривая 1) и 2-меркаптоэтанола (кривая 2).

реакции она не должна быть ниже 0,01%. Причем уровень сигнала зависит также от времени. Опыты показали, что сигнал флуоресценции меняется во времени: достигает максимума, после чего начинает снижаться, по-видимому, из-за протекания реакции деструкции люминофора. Время, за которое сигнал достигает максимального значения,

зависит от исходной концентрации о-фталальдегида. Чем выше его концентрация, тем быстрее достигается максимум сигнала, однако при очень высоких концентрациях (более 0,03—0,05%) абсолютное значение максимума ниже, чем при концентрации 0,01—0,02%. При концентрации о-фталальдегида 0,015% сигнал достигает максимума через одну минуту. Именно эти условия мы считаем оптимальными.

С целью стандартизации условий измерения и предотвращения реакции деструкции мы использовали эффект разбавления реакционной смеси. При этом в течение первой минуты реакцию проводили в малом объеме (0,1—0,2 мл), после чего добавляли 3 мл воды. Сильное разбавление привело к резкому снижению скорости деструкции.

Образование флуорофора происходит только в присутствии 2-меркаптоэтанола. Добавление 2-меркаптоэтанола пропорционально повышает сигнал флуоресценции, который достигает максимума при концентрации  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М (рис. 1). Используя оптимальные условия реакции, мы проводили определение пептида лейцилглицина в пределах концентраций 1—10 нмоль. Как видно из рис. 2, имеет место доста-

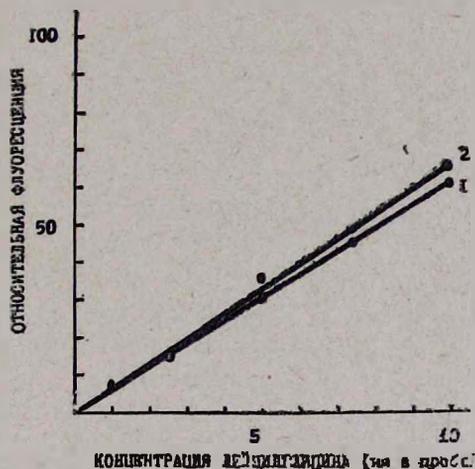


Рис. 2. Зависимость сигнала флуоресценции от концентрации лейцилглицина в отсутствие (кривая 1) и при наличии 200 мкг малеинированного гемоглобина (кривая 2).

точно прямолинейная пропорциональность между количеством пептида и сигналом флуоресценции (кривая 1). Кривая практически не изменяется и при наличии в пробе 200 мкг малеинированного гемоглобина (кривая 2).

Разработанный метод был использован для измерения эндопептидазной активности нейтральной протеиназы гипоталамуса быка. В качестве субстрата мы использовали пептидный гормон ЛРГ, который не имеет свободной концевой аминогруппы (в N-концевом положении находится остаток пироглутамила), или малеинированный гемоглобин. Применение малеинированного гемоглобина упрощает методику изме-

рения, так как этот субстрат по сравнению с денатурированным, но немалеинированным гемоглобином практически не реагирует с о-фталдигидридом (рис. 3), и тем самым отпадает необходимость осаждения непереваренного белка ТХУ. На рис. 4 приведена зависимость скорости гидролиза ЛРГ и малеинированного гемоглобина от концентрации очищенной в 100 раз нейтральной протеиназы.

Описанный метод в 100—150 раз чувствительнее метода Лоури [3] и в 50 раз превышает чувствительность метода определения по

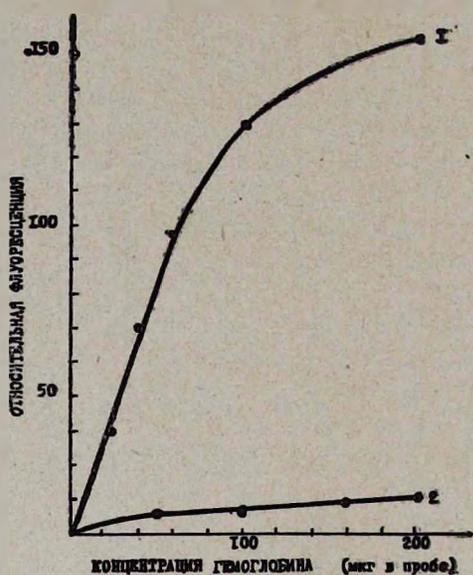


Рис. 3. Зависимость сигнала флуоресценции от концентрации гемоглобина (кривая 1) и малеинированного гемоглобина (кривая 2).

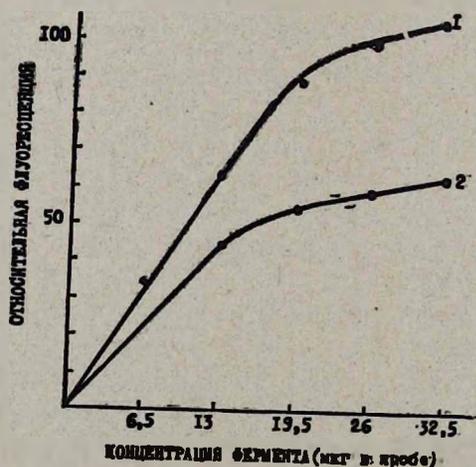


Рис. 4. Зависимость скорости распада малеинированного гемоглобина (кривая 1) и ЛРГ (кривая 2) от концентрации нейтральной протеиназы гипоталамуса.

нингидрину [1]. Следует указать также на нетрудоемкость и быстроту разработанного метода.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 13.VI 1977 г.

Թ. Ն. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Ա. Ի. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Ա. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ,  
Ա. Մ. ԱՐՁՈՒՄԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱՂՅԱՆ

ԷՆԴՈՊԵՊՏԻԴԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԶԳԱՅՈՒՆ  
ՄԵԹՈԴ Օ-ՖՏԱԼԻԻԱԼԻԵԶԻԴԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ

Ա մ փ ո փ ու մ

Մշակված է էնդոպեպտիդազների ակտիվության որոշման զգայուն մեթոդ, որը հնարավորություն է տալիս որոշել 1 նմոլ պեպտիդի առաջացումը: Օգտագործելով որպես սուբստրատ LRH և դենատուրացված հեմոգլոբին, որը նախապես ենթարկվել է մալեինացման, շահվել է հեպոթալամուսային նեյտրալ պրոտեինազայի ակտիվությունը:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Moore S. and Stein W. J. Biol. Chem., 192, 663, 1951.
2. Anson M. J. Gen. Phys., 22, 79, 1938.
3. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. and Randall. J. Biol., Chem., 193, 265, 1951.
4. Gray W. and Hartley B. Blochem. J., 89, 379, 1963.
5. Udenfried S., Stein S., Bohlen P., Dairman W., Lelmgruber W. and Welgle M. Science, 178, 871, 1972.
6. Benson I. and Hare P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2, 619, 1975.
7. Schwabe C. Analytic. Blochem., 53, 484, 1973.
8. Butler R., Harris J., Hartlay B. and Leberman R. Blochem. J., 103, 78P, 1976.