

НОВЫЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНДОПЕПТИДАЗ

Т. Н. АКОПЯН, Л. В. КАРАБАШЯН, А. А. АРУТЮНЯН, А. А. ГАЛОЯН

Предложен чувствительный флуоресцентный метод измерения эндопептидазной активности, основанный на применении в качестве субстрата фосфопиридоксильного аналога глобина. Определение активности эндопептидаз проводится путем измерения сигнала флуоресценции фосфопиридоксильных остатков ТХУ-растворимых пептидов, которые образуются в процессе ферментативного гидролиза. Предложенный метод позволяет определить не менее 10 пмоль превращения субстрата.

В настоящее время существует ряд методов определения активности протеолитических ферментов, имеющих эндопептидазную природу. Большинство из них, например, метод Аксона [1] или его модифицированный вариант [2], обладает малой чувствительностью. Другие методы, обладая относительно высокой чувствительностью [3—5], требуют отсутствия в инкубационной смеси соединений, содержащих аминоксигруппы. Между тем, в ряде случаев удаление таких соединений из реакционной смеси представляет трудоемкий процесс. Так, при исследовании спектра протеолитических ферментов методом изоэлектрической фокусировки фракции, собранные из колонки, содержат амфолиты (полиамино-поликарбоновые кислоты), для удаления которых необходимы длительный диализ или пропускание через колонку с сефадексом всех полученных фракций. В подобных случаях целесообразно использовать в качестве субстратов белки, обладающие чувствительной «сигнальной группой» — радиоактивной меткой [6], или флуоресцентным хромофором [7].

В настоящей работе описан чувствительный флуоресцентный метод измерения эндопептидазной активности, основанный на применении в качестве субстрата фосфопиридоксильного аналога глобина.

Материал и методика. В работе использовали: глобин (Олайнровский завод хим. реактивов), пиридоксаль-5-фосфат (пиридоксаль-Р) (фирма Reanal, ВНР), химотрипсин (фирма Worthington, США).

Получение фосфопиридоксильного производного глобина (Р-Рху-глобина). 4 г глобина растворяли в 300 мл воды, содержащей 3 М гуанидин хлорида, и рН смеси доводили до 9,8 добавлением 2 М NaOH. В этот раствор добавляли 600 мг пиридоксаль-Р и полученную смесь инкубировали при 37° в течение 2 час., затем постепенно добавляли боргидрид натрия до исчезновения ярко-желтой окраски. Через час реакционную смесь ставили на диализ против воды в течение 72 час. Полученный препарат использовали в качестве субстрата для протеолитических ферментов.

Измерение активности ферментов. Пробы для измерения активности пепсина и химотрипсина объемом 1 мл содержали 80 мкг Р-Рху-глобина, по 50 мкмоль цитратного (для пепсина) или фосфатного (для химотрипсина) буфера (рН 3.2 и 7.6 соответственно). После инкубации при 37° в течение часа в пробы добавляли 0.25 мл ТХУ, центрифугировали при 5000 g и рН надосадочной жидкости доводили до 5.5 добавлением 1 M лимоннокислого натрия. Интенсивность флуоресценции полученного раствора определяли на спектрофлуорометре Farrand (возбуждение 330 нм, испускание 410 нм). В качестве контроля служили образцы фермента и субстрата, инкубированные раздельно.

Результаты и обсуждение. Известно, что при щелочных значениях рН пиридоксаль-Р взаимодействует с ε-аминогруппами лизиновых остатков белков, образуя основание Шиффа, восстановление которого с помощью боргидрида натрия приводит к ковалентной сшивке этого хромофора с белком. Образующееся производное белка приобретает новые спектральные характеристики (поглощение—при 330 нм, флуоресценция—в области 410 нм), которые обусловлены оптическими свойствами фосфопиридоксильного остатка модифицированного белка и не перекрываются спектральными характеристиками ароматических остатков самого белка.

В качестве белкового субстрата, который был подвергнут модификации пиридоксаль-Р, нами был использован глобин, поскольку известно, что он расщепляется под действием широкого спектра эндопептидаз и содержит большое количество лизиновых остатков. Для обеспечения алкилирования возможно большего количества лизиновых остатков глобина модификацию проводили в присутствии значительного избытка пиридоксаль-Р в 3 M растворе гуанидин хлорида. Количество связанного с глобином пиридоксаль-Р определяли исходя из молярного коэффициента экстинкции фосфопиридоксиллизина, который в области рН 5—8 равен 10600 при 330 нм [8]. На рис. 1 представлен спектр погло-

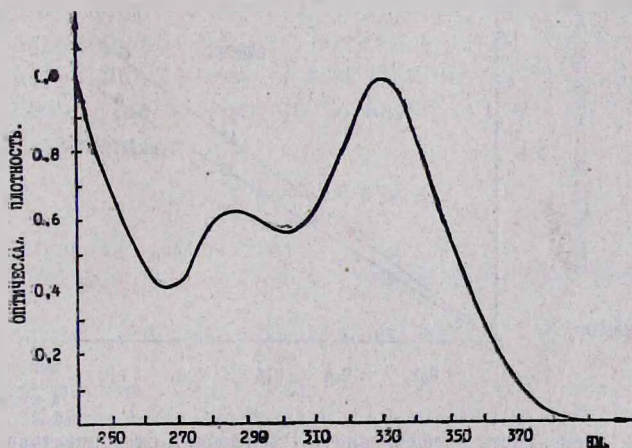


Рис. 1. Спектр поглощения Р-Рху-глобина. Концентрация белка 0,55 мг/мл.

жения Р-Рху-глобина. Сопоставление концентрации фосфопиридоксильного остатка и белка показывает, что на один моль белка приходится 10

моль фосфопиридоксильного остатка. Такой уровень модификации обеспечивает достаточно интенсивную флуоресценцию Р-Рху-глобина. На рис. 2 приведена зависимость сигнала флуоресценции Р-Рху-глобина от его концентрации. Видно, что существует прямолинейная зависимость интенсивности флуоресценции при концентрациях белка 0,1—25 мкг/мл. Величина сигнала флуоресценции пиридоксаминна, который

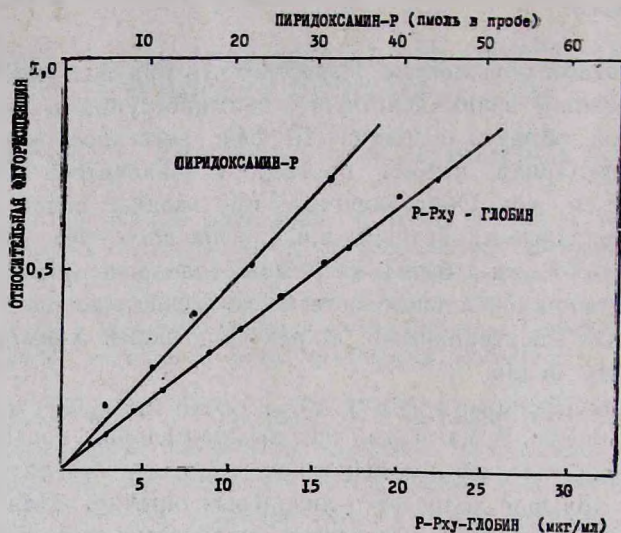


Рис. 2. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от концентрации Р-Рху-глобина и пиридоксамин—Р.

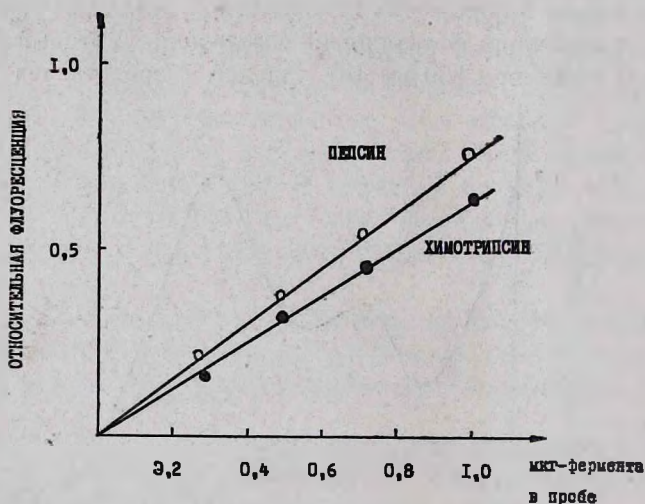


Рис. 3. Зависимость расщепления Р-Рху-глобина от концентрации пепсина и химотрипсина.

был использован в качестве модели фосфопиридоксильного остатка Р-Рху-глобина, указывает, что этим методом можно обнаружить.

Институт биохимии
АН АрмССР

ԼՆՌՈՊԵՊՏԻԴԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ
ՆՈՐ ԶԳԱՅՈՒՆ ՄԵԹՈՂ

Օգտագործելով պիրիդոքսալ-5-ֆոսֆատով մոդիֆիկացված գլոբինը որպես սուբստրատ, մշակվել է էնդոպեպտիդազաների ակտիվության որոշման նոր մեթոդ: Ակտիվությունը որոշվում է՝ չափելով թթվում լուծված ֆոսֆոպիրիդոքսալ պեպտիդների ֆլուորեսցենցիայի մեծությունը ֆերմենտների ազդեցությունից հետո:

A NEW SENSITIVE ASSAY FOR DETERMINATION OF ENDOPEPTIDASE ACTIVITY

A fluorescent method is described that permits the assay of endopeptidase on globin substrate modified by pyridoxal-5-phosphate. Determination of endopeptidase activity is carried out by means of measuring of the signal of fluorescence of acid soluble peptides after enzyme action. The described method permits to detect not less than 10 pmol of the substrate breakdown.

1. Anson M. L. J. Gen. Phys., 22, 79, 1938.
2. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
3. Perlmann G., Lorand L. Proteolytic Enzymes, Methods in Enzymology, 19, 534, 1970.
4. Schwabe C. Anal. Biochem., 53, 484, 1973.
5. Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Арутюнян А. А., Арзуманян А. А., Галоян А. А. Биологический журнал Армении, 30, 11, 57, 1977.
6. Bohley P., Mlehe C., Mlehe M., Ansorage S., Kirschke H., Langner J., Wiederanders B. Acta Biol. Med. Germ., 28, 323, 1972.
7. DeLumen B. O., Tappel A. L. Anal. Biochem., 36, 22, 1970.
8. Fisher E. H., Forey A. W., Hedrich I. L., Hughes R. C., Kant A. B., Krebs E. G. In Chem. and Biol. Aspect of Pyridoxal Catalysis., Pergamon Press., 234, 2963.