



УДК 577.152.342*4'135 : 543.866 : 577.112.7

СИНТЕЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМОФОРНЫХ
ДИНИТРОФЕНИЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЛюблинская Л. А., Ваганова Т. И., Остерман А. Л.,
Чикиндас С. Е., Степанов В. М.Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Описаны новые хромофорные субстраты металлопротеиназ (КФ 3.4.24) — 2,4-динитрофенилпроизводные тетрапептидов с остатками основных аминокислот на С-конце: Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH, Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH и Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH. После отщепления С-концевого дипептида от этих субстратов металлопротеиназой свободный Dnp-Gly-Gly-OH может быть количественно отделен от негидролизованного тетрапептидного производного либо фильтрацией через колонку с катионитом, либо экстракцией органическим растворителем. Количество Dnp-Gly-Gly-OH, пропорциональное содержанию металлопротеиназы, можно определить путем измерения поглощения при 360 нм ($\epsilon_{360} = 15\,000$). Эти субстраты, позволяющие определять 0,1–20,0 мкг термозина, были успешно использованы для определения металлопротеиназ из *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*

Для определения активности протеолитических ферментов, в частности металлопротеиназ (КФ 3.4.24), наиболее удобно использовать низкомолекулярные синтетические хромофорные субстраты. За ходом гидролиза этих соединений можно следить спектрофотометрически, что существенно упрощает технику анализа, особенно при исследовании большого числа образцов.

Металлопротеиназы атакуют почти исключительно истинные пептидные связи, и для их определения не удастся использовать аналоги пептидов. Специфичность ферментов этого класса такова, что они гидролизуют пептидные связи, образованные аминокислотными остатками гидрофобных аминокислот, в частности изолейцина, лейцина, валина, фенилаланина [1]. Ранее мы предложили тетрапептид Dnp-Gly-Gly-Val-Arg-OH в качестве субстрата для определения активности металлопротеиназ [2, 3]. Ферменты этого класса расщепляют в данном пептиде связь глицилвалин, что приводит к освобождению динитрофенилированного дипептида Dnp-Gly-Gly-OH, который отличается по своим физико-химическим свойствам от субстрата и может быть количественно отделен от последнего.

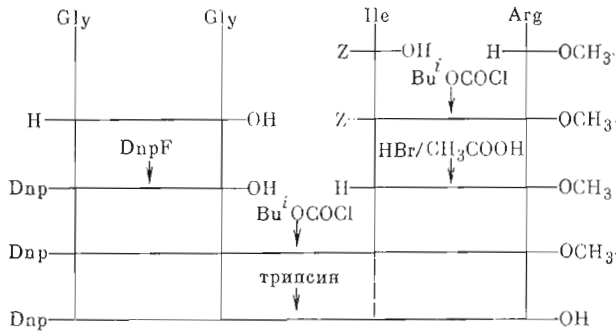
Субстраты такого же типа были синтезированы для определения активности других протеиназ, в том числе карбоксипептидаз [4–6]. Аналогичный подход был разработан для хромогенных субстратов коллагеназы [7].

Накопленный в нашей и ряде других лабораторий в последние годы опыт подтвердил, что N²-(2,4-динитрофенил)тетрапептидные субстраты удобны для определения металлопротеиназ. Эти субстраты были использованы при выделении внесклеточных и внутрисклеточных металлопротеиназ из ряда бактерий: *Bacillus subtilis* [8, 9], *Thermoactinomyces vulgaris* [10], *Legionella pneumophila* [11], а также из несовершенного гриба *Aspergillus oryzae*. С их помощью обнаружена металлопротеиназа в культуральной жидкости *B. thuringiensis* [12]. В связи с этим мы сочли необходимым опубликовать методы синтеза таких субстратов, а также попыток опыт их использования для определения металлопротеиназ.

Синтез субстратов проводили по схеме 1.

Все аминокислоты L-ряда. Dnp — 2,4-динитрофенил, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, SuNOH — N-гидроксисукцинимид.

Схема 1



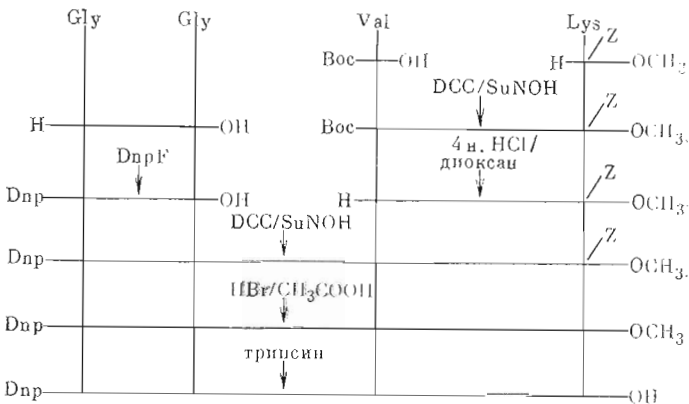
Z-Пе-Arg-OCH₃·HCl с выходом 94% был получен методом смешанных ангидридов исходя из бензилоксикарбонилизолейцина и дихлоргидрата метилового эфира аргинина. Для очистки соединения использовали многократную экстракцию кислого водного раствора эфиром и *n*-бутиловым спиртом. Отщелчение бензилоксикарбонильной группы бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте привело к H-Пе-Arg-OCH₃·2HBr с выходом 96%.

Для получения Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OCH₃ смешанный ангидрид Dnp-Gly-Gly-OH и изобутилового эфира угольной кислоты сочетали с H-Пе-Arg-OCH₃·HBr. Последовательной экстракцией кислого водного раствора эфиром и *n*-бутиловым спиртом с 54% выходом выделили Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OCH₃·HCl. Для удаления эфирной группы использовали гидролиз трипсином в 50% этиловом спирте при pH 7,8. Выход Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH составил 92%.

Таким же путем был синтезирован Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OCH₃ (выход 65,5%), омылением которого был получен Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH (выход 96%).

Синтез Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH проводили по схеме 2.

Схема 2



Вос-Val-Lys(Z)-OCH₃ синтезировали карбодимидным методом с прибавлением 2 экв. N-гидроксисукцинимидом (выход 91,3%). После удаления *tert*-бутилоксикарбонильной группы обработкой 4 н. HCl в диоксане H-Val-Lys(Z)-OCH₃·HCl сочетали с Dnp-Gly-Gly-OH тем же методом. Выход полностью защищенного тетрапептида составил 66%. N^ε-Бензилоксикарбонильную группу удаляли действием бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. Для омыления эфирной группы, как и в случае аргининовых пептидов, использовали гидролиз трипсином в водном этиловом спирте при pH 7,8. Выход Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH составил 93%.

Полученные тетрапептиды практически полностью расщеплялись термолизином и металлопротеиназой *B. subtilis* по связям, образованным аминогруппами изолейцина, фенилаланина и валина, за 12 ч при pH 7,3.

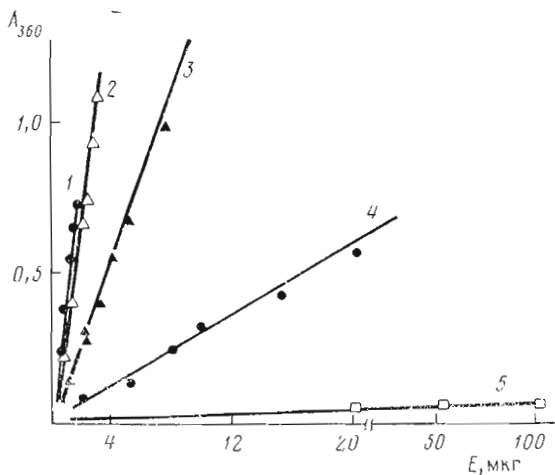


Рис. 1

Рис. 1. Гидролиз термוליзином N^{α} -Dnp-тетрапептидов Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH (1), Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH (2), Dnp-Gly-Gly-Val-Arg-OH (3), Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH (4) и Dnp-Gly-Gly-Val-NH(CH₂)₃-N(CH₃)₂ (5). Образующийся Dnp-Gly-Gly-OH отделяли методом экстракции (см. «Экспер. часть»)

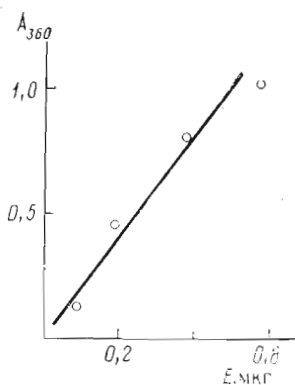


Рис. 2

Рис. 2. Гидролиз Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH термוליзином. Образующийся Dnp-Gly-Gly-OH отделяли сорбционным методом (см. «Экспер. часть»)

и 37° С с образованием Dnp-Gly-Gly-OH и соответствующих дипептидов, что было подтверждено электрофорезом на бумаге при pH 5,6. При определении активности ферментов образовавшийся в результате гидролиза субстрата Dnp-Gly-Gly-OH количественно отделяли от нерасщепившегося субстрата и C-концевых дипептидов (H-Ile-Arg-OH, H-Phe-Arg-OH или H-Val-Lys-OH) одним из двух методов. В первом случае инкубационную смесь, подкисленную HCl, экстрагировали этилацетатом, содержащим 10% этанола, с последующей экстракцией органического слоя 1% раствором бикарбоната натрия. Этот прием позволил избежать спектрофотометрирования летучей органической фазы, что могло снизить точность при серийных определениях активности. Водную фазу спектрофотометрировали при 360 нм.

Во втором варианте использовали ионообменную хроматографию на SP-сефадексе С-25, уравновешенном 1 М уксусной кислотой. Нерасщепившийся субстрат и C-концевые дипептиды в этих условиях прочно сорбировались на колонке, а Dnp-Gly-Gly-OH элюировали той же кислотой и измеряли оптическое поглощение элюата при 360 нм. Впервые применение этого метода для разделения продуктов гидролиза динитрофенильных субстратов было описано для карбоксипептидазы Т [43].

Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH и Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH гидролизуются термוליзином с одинаковой скоростью и дают возможность определять от 0,5 до 2 мкг фермента в пробе (рис. 1). Наиболее достоверные результаты получаются при измеряемых значениях оптической плотности (A_{360}) от 0,4 до 1,0.

Dnp-Gly-Gly-Val-Arg-OH гидролизуется термוליзином в 2,5 раза медленнее, чем производные, содержащие Ile и Phe. Тем не менее с помощью этого субстрата можно определить 1–8 мкг термוליзина в пробе. Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH гидролизуются в 5 раз медленнее, чем аргининовый аналог, но и в этом случае наблюдается линейная зависимость между количеством образующегося Dnp-Gly-Gly-OH и содержанием фермента в пробе (2–20 мкг). Полученные результаты не зависят от метода отделения Dnp-Gly-Gly-OH, экстракционного или сорбционного, однако преимуществом последнего является уменьшения объема инкубационной смеси до 400 мкл, что повышает чувствительность метода. В этом случае удастся надежно определить ~0,1 мкг фермента в пробе (рис. 2). Сорбционный метод удобен и при анализе больших серий образцов.

Удельная активность * металлопротеиназ из *Asp. oryzae* и *B. subtilis*

| Субстраты | <i>Asp. oryzae</i> | <i>B. subtilis</i> [8] | <i>B. subtilis</i> [9] внутриклеточная |
|------------------------|--------------------|---------------------------|--|
| | внеклеточная | | |
| Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH | 0,203 | — | — |
| Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH | 0,968 | — | 0,200 |
| Dnp-Gly-Gly-Val-Arg-OH | 0,224 | 0,820 | 1,000 |
| Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH | 0,100 | — | — |

* Удельная активность внеклеточных ферментов выражена в мкмоль/(A₂₃₀·мин), а внутриклеточного — в мкмоль/(мг·мин).

Исследование предложенных субстратов позволяет количественно определять различные металлопротеиназы (табл. 1). При этом присутствие сериновых протеиназ не мешает определению, поскольку они не обладают карбоксипептидазной активностью.

Однако метод имеет ограничения. Карбоксипептидазы, продуцируемые некоторыми бактериями, грибами и дрожжами, могут отщеплять от 2,4-динитрофенилтетрапептидов С-концевую аминокислоту, аргинин или лизин. Образующийся в этом случае трипептид подобно Dnp-Gly-Gly-OH может экстрагироваться органическим растворителем, а при использовании сорбционного метода элюироваться с SP-сефадекса 1 М уксусной кислотой. Поэтому при использовании субстратов этого типа для обнаружения протеиназ в новых источниках требуется предварительный анализ продуктов гидролиза электрофорезом на бумаге или аминокислотным анализом для определения присутствия свободных С-концевых аминокислот. В ряде случаев удается подобрать условия, обеспечивающие раздельное определение карбоксипептидазы и металлопротеиназы.

Так, ранее было показано, что *Asp. oryzae* продуцирует как кислую сериновую карбоксипептидазу, так и металлопротеиназу [6]. Аминокислотный анализ продуктов инкубации Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH с карбоксипептидазой при pH 5,6 показал, что фермент за 1 ч отщепляет практически полностью лизин и только 1,2% следующей аминокислоты — валина. При pH 7,0, т. е. в условиях определения активности металлопротеиназ, карбоксипептидаза *Asp. oryzae* практически не гидролизует этот субстрат. Таким образом, Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH можно использовать для определения активности металлопротеиназы *Asp. oryzae* в присутствии карбоксипептидаз, проводя реакцию при pH 7,0.

Была предпринята попытка синтезировать субстрат, который, отвечая всем необходимым требованиям для субстрата нейтральных протеиназ, не гидролизовался бы карбоксипептидазами. Для этого в молекулу соединения вместо остатка лизина или аргинина был введен γ -диметиламинопропиламин. Был синтезирован γ -диметиламинопропиламид Dnp-Gly-Gly-Val. Предполагалось, что остаток γ -диметиламинопропиламина придаст всей молекуле субстрата и одному из отщепляемых фрагментов — γ -диметиламинопропиламиниду валина достаточно хорошую растворимость в воде и в то же время предохранит от гидролиза карбоксипептидазой. Синтез соединения был проведен по схеме 1. Бензилоксикарбонилвалин сочетали методом смешанных ангидридов с γ -диметиламинопропиламином с выходом 70,5%. Действием бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте удаляли бензилоксикарбонильную группу (выход 95,5%) и далее конденсировали полученный бромидат γ -диметиламинопропиламина валина с Dnp-Gly-Gly-OH методом смешанных ангидридов. Выход на последней стадии синтеза составил 34,5%.

Полученное соединение полностью расщеплялось термолизинном за 12 ч при pH 7,3 и 37° С, однако скорость его расщепления была в 50–60 раз меньше, чем скорость расщепления Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH. Ферментный

препарат «оризин» вообще не гидролизировал это производное ни при pH 5,7, ни при pH 7,3. Возможно, металлопротеиназа из *Asp. oryzae* в большей мере, чем термолизин, чувствительна к присутствию положительного заряда на атоме азота, расположенном вблизи атакуемой пептидной связи. Поэтому это соединение пока не может быть рекомендовано в качестве субстрата для металлопротеиназ.

Таким образом, были синтезированы Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH, Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH и Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH, которые оказались достаточно хорошими субстратами металлопротеиназ и широко применяются в нашей лаборатории для определения активности этих ферментов. Предложенная методика удобна для серийного определения активности металлопротеиназ в ферментных препаратах.

Наиболее распространенными до настоящего времени субстратами металлопротеиназ были амиды фурилакрилоилдипептидов, удобные тем, что за ходом их гидролиза можно следить спектрофотометрически [14]. Однако практическое использование субстратов такого строения осложнено сравнительно небольшим изменением поглощения при гидролизе пептидной связи ($\Delta\epsilon_{215} = 766 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Чувствительность метода с использованием N^{α} -(2,4-динитрофенил)тетрапептидов в качестве субстратов почти в 20 раз выше.

Экспериментальная часть

В работе использованы кристаллический термолизин, трипси (Serva, ФРГ), чистая металлопротеиназа из *B. subtilis* [8], кислая карбоксипептидаза из *Asp. oryzae* [15] и металлопротеиназа из *Asp. oryzae* с оптимумом pH 5,6*. «Оризин» представляет собой комплексный ферментный препарат поверхностной культуры *Asp. oryzae** отечественного производства. Dnp-Gly-Gly-OH получен по методу [16], Dnp-Gly-Gly-Val-Arg-OH получен ранее [2].

Нисходящая хроматография на бумаге Filtrak № 14 проведена в системе *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 30:20:6:24 (А); ТСХ на силуфоре — в той же системе (В); в системе метилэтилкетон — пиридин — вода, 65:15:20 (В). Электрофорез осуществлен на хроматографической бумаге «Ленинградская» (средняя) марки Б в течение 30 мин при градиенте потенциала 27 В/см. Использован пиридин-ацетатный буфер, pH 5,6 (8 мл пиридина, 2 мл уксусной кислоты и 990 мл воды). Для проявления использовали 0,5% раствор индигрина в ацетоне. Аргининсодержащие пептиды проявляли по Сакагуши. Удельное оптическое вращение определяли на спектрополяриметре Roussel-Jouan (Франция). Температуры плавления определяли в закрытых капиллярах и не исправляли. Все новые соединения охарактеризованы элементным анализом на С, Н, N; полученные значения соответствовали вычисленным. Характеристики соединений представлены в табл. 2.

Z-Ile-Arg-OCH₃-HCl. К раствору 3,0 г (11,3 ммоль) бензилоксикарбонилизолейцина в 25 мл сухого диметилформамида при -15°C прибавляли 1,6 мл (11,3 ммоль) триэтиламина и через 10 мин 1,6 мл (11,3 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты. Через 30 мин смешивали с охлажденным до -15°C раствором хлоридата метилового эфира аргинина, полученным прибавлением 1,6 мл (11,3 ммоль) триэтиламина к 2,95 г (11,3 ммоль) дихлоридата метилового эфира аргинина в 25 мл сухого диметилформамида. Перемешивали 1 ч при 0°C и 1 ч при 20°C , оставляли на 14 ч при 0°C . Отфильтровывали осадок хлоридата триэтиламина, фильтрат упаривали в вакууме. Полученное масло растворяли в 150 мл 0,1 *n*. HCl и экстрагировали эфиром (6×30 мл) для удаления примесей непрореагировавшего бензилоксикарбонилизолейцина. Полноту очистки проверяли электрофоретически. Метиловый эфир бензилоксикарбонилизолейцил-аргинина экстрагировали *n*-бутиловым спиртом (6×30 мл). Бутиловый экстракт промывали водой (2×15 мл) и упаривали в вакууме с сухим бензолом, получали аморфное вещество.

H-Ile-Arg-OCH₃-2HBr. К 5,0 г (10,6 ммоль) хлоридата метилового эфира бензилоксикарбонилизолейцил-аргинина прибавляли 6 мл 40% HBr в ледяной уксусной кислоте, выдерживали 30 мин при 20°C и осаждали 50 мл сухого эфира. Выпавшее масло отделяли декантацией, растворяли в метаноле и упаривали в вакууме. Получали аморфное вещество.

Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OCH₃-HCl. К раствору 2,98 г (10 ммоль) Dnp-Gly-Gly-OH в 20 мл сухого диметилформамида при -15°C прибавляли 1,4 мл (10 ммоль) триэтиламина и через 10 мин 1,4 мл (10 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты. Через 30 мин смешивали с охлажденным до -15°C раствором бромидата метилового эфира изолейцил-аргинина, полученным прибавлением 1,4 мл (10 ммоль) триэтиламина к 4,63 г (10 ммоль) дибромидата метилового эфира изолейцил-аргинина в 20 мл сухого диметилформамида. Перемешивали 1 ч при 0°C и 1 ч при

* Выделение и характеристика металлопротеиназы из *Asp. oryzae* будут опубликованы отдельно.

Выходы и физико-химические характеристики синтезированных соединений

| Соединение | Выход, % | Т. пл., °С | $[\alpha]_D^{22}$, град (с 1, DMF) | R_f | | | Электрофоретическая подвижность к катоду, см |
|---|-------------|------------|---|-------|------|------|--|
| | | | | А | Б | В | |
| Z-Ile-Arg-OCH ₃ ·HCl * | 94 | Аморфное | -11,1 | 0,96 | - | 0,76 | 4,2 |
| H-Ile-Arg-OCH ₃ ·2HBr | 96 | » | +12,4 | 0,64 | - | 0,65 | 8,6 |
| Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OCH ₃ ·HCl * | 54 | 107-109 | -13,9 | 0,92 | - | 0,78 | 3,6 |
| Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH | 92 | 183-185 | -17,6 | 0,83 | - | 0,76 | 0,6 |
| Z-Phe-Arg-OCH ₃ ·HCl * | 94 | 73-75 | -21,9 | 0,92 | - | 0,74 | 5,6 |
| H-Phe-Arg-OCH ₃ ·2HBr | 98 | Аморфное | -8,2 | 0,62 | - | 0,62 | 6,5 |
| Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OCH ₃ ·HCl * | 65,5 | 95-97 | -29,7 | 0,89 | - | 0,78 | 3,0 |
| Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH | 94 | 136-138 | -39,6 | 0,83 | - | 0,80 | 0,9 |
| Boc-Val-Lys(Z)-OCH ₃ ** | 91,3 | Аморфное | - | - | 0,83 | - | 0 |
| Dnp-Gly-Gly-Val-Lys(Z)-OCH ₃ ** | 66 | - | - | - | 0,70 | - | 0 |
| Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH | 93 | 122-124 | -15,1 ** | - | 0,58 | - | 0,7 |
| Z-Val-NH-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂ * | 70,5 | Масло | +1,2 ** | - | - | - | 8,7 |
| H-Val-NH-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂ ·2HBr | 95,5 | Аморфное | +60,6 | 0,44 | - | 0,25 | 11,0 |
| Dnp-Gly-Gly-Val-NH(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂ * | 34,5 | 103-105 | -9,9 | 0,87 | - | 0,71 | 4,2 |

* Метод смешанных ангидридов.

** Карбодимидный метод с добавлением 2 экв. N-гидроксисукцинимид.

** Растворитель — ледяная уксусная кислота.

** с 1,6, DMF.

20° С, оставляли на 14 ч при 0° С. Отфильтровывали осадок соли триэтиламина, фильтрат упаривали в вакууме. Оставшееся коричневое масло растворяли в 2,8 л 0,1 н. HCl, отфильтровывали нерастворившийся осадок, фильтрат многократно экстрагировали эфиром (15×300 мл) для удаления непрореагировавшего Dnp-Gly-Gly-OH. Полноту очистки проверяли электрофоретически. Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OCH₃ экстрагировали из кислого водного раствора *n*-бутиловым спиртом (10×300 мл). Бутанольный экстракт промывали водой (3×150 мл), упаривали в вакууме. Вещество получали в виде желтого аморфного порошка.

Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH. К раствору 2 г (3,24 ммоль) Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OCH₃·HCl в 50 мл 96% этанола прибавляли раствор 10 мг трипсина в 50 мл 0,2 М триэтиламин-карбонатного буфера, pH 7,8, и выдерживали 6 ч при 37° С. Гидролизат упаривали в вакууме, остаток экстрагировали кипящим этанолом и упаривали в вакууме. Вещество затвердевает при растирании с сухим эфиром.

Определение активности металлопротеиназ. Экстракционный метод. Готовили 0,2 мМ раствор N^α-Dnp-тетрапептида в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,0, содержащем 0,01 М CaCl₂. Поскольку субстраты гнгерскопичны, их точную концентрацию проверяли по поглощению раствора при 360 нм, принимая молярный коэффициент поглощения Dnp-аминогруппы равным 15 000. Оптическое поглощение 0,2 мМ раствора субстрата равно 3.

К 1 мл раствора металлопротеиназы в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,0, содержащем 0,01 М CaCl₂, добавляли 4 мл раствора субстрата; смесь инкубировали 30 мин при 37° С, останавливали реакцию добавлением 0,2 мл 1 н. HCl до pH 1-2 и экстрагировали 5 мл этилацетата, содержащего 10% этилового спирта. Органический слой экстрагировали 4 мл 1% бикарбоната натрия и измеряли поглощение водной фазы при 360 нм. Концентрацию фермента подбирали так, чтобы поглощение измеряемого раствора не превышало 1. Контрольный опыт проводили в тех же условиях, добавляя фермент к подкисленному соляной кислотой раствору субстрата.

Сорбционный метод. К 200 мкл 1 мМ раствора субстрата в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,0, содержащем 10 мМ CaCl₂, прибавляли 200 мкл этого же буфера и 5-50 мкл раствора фермента, инкубировали 30 мин при 37° С, останавливали реакцию прибавлением 40 мкл 50% уксусной кислоты. Для отделения нерасщепленного субстрата от продуктов гидролиза реакционную смесь разделяли на микроколонке с SP-сефадексом С-25, промывали 400 мкл 1 М уксусной кислоты, элюировали 1 мл 1 М уксусной кислоты и измеряли поглощение при 360 нм. Микроколонки готовили заранее: в голубой наконечник от автоматической пилетки помещали кусочек стекловаты, затем вносили суспензию SP-сефадекса С-25 в 1 М уксусной кислоте (1:1) двумя порциями по 800 мкл, промывали 2 раза 1 М уксусной кислотой.

За единицу активности фермента принимали активность такого его количества, которое в данных условиях гидролизует 1 мкмоль субстрата в 1 мин. При расчете активности исходят из значения молярного коэффициента поглощения Dnp-группы при 360 нм: $15\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morihara K., Tsuzuki H. // Arch. Biochem. and Biophys. 1971. V. 146. № 1. P. 291–296.
2. Люблинская Л. А., Ластовецкая Л. В., Шехватова Г. В., Ваганова Т. И., Степанов В. М. // Химия природ. соединений. 1976. № 1. С. 75–80.
3. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Якушева Л. Д., Оксенойт Е. С., Степанов В. М. // IV Всесоюз. симп. по химии белков и пептидов. Тез. докл. Минск, 1977. С. 197.
4. Куликов С. В., Соколов Н. Ю., Родин С. В., Самарцев М. А. // Химия природ. соединений. 1983. № 4. С. 499–504.
5. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Пасхина Т. С., Степанов В. М. // Биохимия. 1973. Т. 38. № 4. С. 790–795.
6. Ваганова Т. И., Азаренкова Н. М., Люблинская Л. А., Степанов В. М. // Химия природ. соединений. 1972. № 1. С. 134–135.
7. Wünsch E., Heidrich H.-C. // Z. Physiol. Chem. 1963. V. 332. № 1–2. P. 300–304.
8. Ваганова Т. И., Ластовецкая Л. В., Стронгин А. Я., Люблинская Л. А., Степанов В. М. // Биохимия. 1976. Т. 41. № 12. С. 2229–2236.
9. Шагиян К. А., Изотова Л. С., Понантас Ю. В., Стронгин А. Я., Степанов В. М. // Биохимия. 1950. Т. 45. № 11. С. 2083–2095.
10. Мосолова О. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Цаплина И. А., Тарасова Н. П. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 10. С. 1709–1716.
11. Гульник С. В., Лавренова Г. И., Степанов В. М. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. С. 1387–1396.
12. Честухина Г. Г., Загитъко О. П., Ревина Л. П., Клепикова Ф. С., Степанов В. М. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 10. С. 1724–1732.
13. Остерман А. Л., Степанов В. М., Руденская Г. Н., Ходова О. М., Цаплина И. А., Яковлева М. Б., Логинова Л. Г. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 2. С. 292–300.
14. Feder J., Schuck M. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 14. P. 2784–2791.
15. Азаренкова Н. М., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. // Биохимия. 1976. Т. 41. № 1. С. 20–27.
16. Loudfoot J. H., Kruger J. E. // Can. J. Chem. 1963. V. 41. № 10. P. 2462–2463.

Поступила в редакцию

8.XII.1986

После доработки

14.II.1987

SYNTHESIS AND USE OF CHROMOPHORIC DINITROPHENYL SUBSTRATES FOR METALLOPROTEINASES

LYUBLINSKAYA L. A., VAGANOVA T. I., OSTERMAN A. L.,
CHIKINDAS S. E., STERANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

New chromogenic substrates suitable for metalloendopeptidases assay, 2,4-dinitrophenyl (Dnp) derivatives of tetrapeptides with a C-terminal basic residue, have been synthesized, viz. Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg-OH, Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg-OH and Dnp-Gly-Gly-Val-Lys-OH. After metalloendopeptidase cleavage of C-terminal dipeptides from these substrates at pH 7.0, free Dnp-Gly-Gly-OH can be quantitatively separated from the non-hydrolysed tetrapeptide derivative either by organic solvent extraction or by filtration through a cationite column and its quantity, proportional to the metalloendopeptidase content activity can be assayed by the absorbance measurement ($\epsilon_{360}=15\,000$). The procedure allows to assay 0.1–20 mcg of thermolysin and has been successfully used for determination of metalloendopeptidases from *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis*.