



УДК 577.152.34' 135 : 543.544

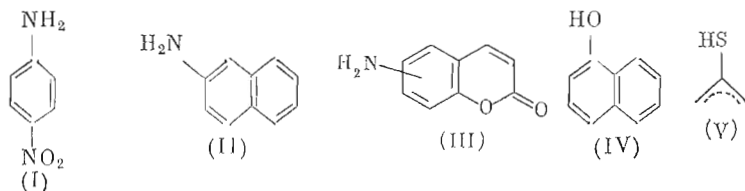
СПОСОБ СКРИНИНГА ИСКУССТВЕННЫХ СУБСТРАТОВ  
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Недоспасов А. А., Потаман В. П., Родина Е. В.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР,  
Москва

Предлагается способ скрининга субстратов для определения активности протеиназ. Смесь исследуемых субстратов, сконструированных так, что детектируемые группы их различны, подвергается действию фермента, продукты протеолиза (по одному из каждого субстрата) определяются количественно с помощью ВЭЖХ. При равенстве начальных концентраций субстратов параметр  $k_{cat}/K_m$  будет больше у того, выход продукта протеолиза которого выше. Способ иллюстрирован скринингом пептидных субстратов для определения трипсина. В качестве детектируемых групп серии субстратов использованы аминафталинсульфамиды, имеющие различия в сульфамидной части молекулы.

В последние годы широкое распространение в биохимических исследованиях и медицинской диагностике получили методы анализа с использованием синтетических ферментных субстратов. Наибольшее применение они нашли при анализе пептидаз и протеиназ. Коммерчески доступны хромогенные субстраты, представляющие собой пептиды с присоединенным по концевой COOH-группе красителем. При расщеплении связи пептид — краситель происходит изменение спектра поглощения или флуоресценции. Чаще такие искусственные субстраты являются пептидильными производными ароматических аминов. В качестве амина особенно широко используется 4-нитроанилин (I) благодаря доступности, неплохой растворимости и высокому молярному коэффициенту поглощения [1]. Из «флуорогенных» субстратов часто применяются пептидил-2-нафтиламины [2, 3].



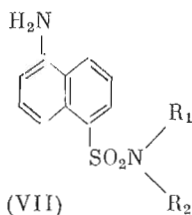
Низкий порог детекции при использовании флуоресцентных методов анализа компенсирует в среднем несколько худшие кинетические характеристики таких субстратов. Существенным недостатком их является канцерогенность 2-нафтиламина (II). В СССР производство 2-нафтиламина и его ацильных производных запрещено в законодательном порядке [4]. Широко применяются также аналогичные производные аминокумаринов (III) [5, 6]. Описанные в научной и патентной литературе в качестве хромогенных субстратов пептидные эфиры нафтолов (IV) [7] и тиолов (V) [8] используются реже — будучи более лабильными, они оказываются существенно менее технологичными, а при стандартных условиях синтеза, хранения, транспортировки и использования аналитические растворы таких субстратов обычно содержат значительные количества продукта реакции (фенола или тиофенола) еще до добавления фермента в реакционную смесь в ходе анализа, что, естественно, снижает достоверность и воспроизводимость результатов.

Сокращения: DMF — диметилформамид, DCC — дциклогексилкарбодимид, ОВТ — N-гидроксибензотриазол. Все аминокислоты L-ряда.

Характеристикой чувствительности анализа фермента с использованием хромогенного субстрата может служить произведение чувствительности метода детекции образуемого им красителя на каталитическую константу реакции протеолиза. Ясно, что, чем больше красителя производится каждой молекулой фермента в единицу времени и чем легче детектировать краситель, тем меньше количества фермента можно обнаружить. Ясно также, что всякие побочные реакции (такие, как спонтанный, без участия фермента, гидролиз субстрата или, например, протеолиз по внутренним амидным связям) нежелательны. Для предотвращения побочного протеолиза часто при конструировании субстратов используют неприродные аминокислоты, в особенности *D*-изомеры [9, 10]. Субстрат должен быть специфичным, т. е. расщепляться только «своей» протеиназой. Следовательно, предпочтительны субстраты с низкими значениями  $K_m$ , с тем чтобы использование в анализе концентраций субстрата порядка 3–5  $K_m$  не вызвало насыщения активных центров конкурирующих протеиназ. Естественны требования достаточной растворимости субстратов в реакционных буферных смесях — на практике часто для растворения субстрата приходится использовать органические растворители (этанол, DMF, диметилсульфоксид), что не всегда безразлично для фермента [11].

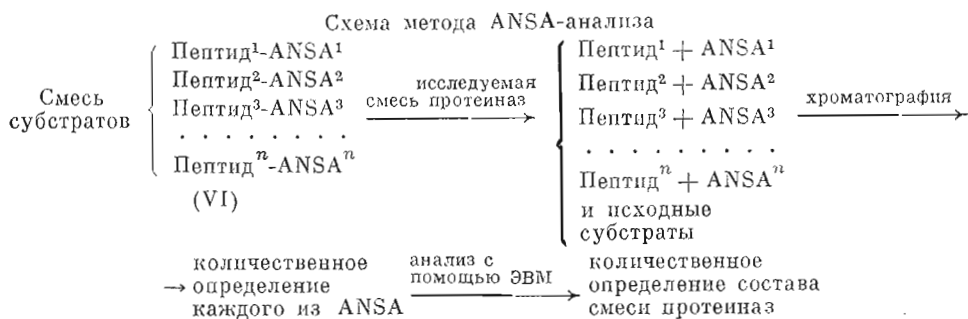
Поскольку чувствительность метода детекции зависит от используемого способа обнаружения и качества прибора, не являясь по сути характеристикой качества собственно субстрата, за последнюю принимают обычно отношение  $k_{cat}/K_m$ . Априори невозможно надежно предсказать кинетические характеристики превращения хромогенного субстрата в условиях ферментативной реакции. Это приводит к необходимости синтезировать, выделять в индивидуальном состоянии и испытывать множество соединений, лишь единицы из которых оказываются эффективными субстратами. Поэтому упрощение скрининга субстратов по параметру  $k_{cat}/K_m$  является актуальной проблемой, от решения которой зависит скорость разработки чувствительных методов анализа ферментов.

В предложенном недавно [12] методе анализа смесей протеиназ с использованием смеси нескольких субстратов в ходе одного эксперимента можно определить каждую протеиназу смеси отдельно, причем одновременно возрастает точность определения. Для реализации этого подхода предложены пептидные производные аминафталинсульфамидов (VI). Как и обычные хромогенные субстраты, под действием протеиназ они отщепляют детектируемые группы — замещенные аминафталинсульфамиды (ANSA, VII), которые могут быть количественно определены различными методами.



Поскольку у разных субстратов, присутствующих в смеси при анализе протеиназ, детектируемые ANSA-группы различаются заместителями в сульфамидной части, с помощью хроматографии их можно определять порознь. Существенные различия в спектрах поглощения и флуоресценции, химических и электрохимических свойствах позволяют определять ANSA детекторами различных типов даже при большом избытке непрореагировавших субстратов. С использованием ANSA-субстратов может быть решена и задача упрощения скрининга (схема).

Действительно, для ANSA-субстрата типа (VI) вклад в кинетические характеристики протеолиза вносят как сульфамидная, так и пептидная части. При действии индивидуальной протеиназы на смесь таких субстратов, различающихся ANSA-группами (пептидные части могут совпадать или быть различны — несущественно), образуется смесь ANSA, каждый компонент которой определяется хроматографически. При детекции по



поглощению в УФ для серии субстратов с однотипными детектируемыми группами чувствительности определения всех ANSA-групп практически равны, если различия строения отдельных ANSA не затрагивают хромофорной группы. (При использовании детекторов по флуоресценции такого равенства может не быть.) Скорость распада ( $v$ ) каждого из субстратов в смеси (аналогично реакции с конкурентным ингибитором — по отношению к каждому из субстратов все остальные действуют как ингибиторы, связывая часть фермента в непродуктивный — «со своей точки зрения» — комплекс) можно записать в виде

$$v^i = \frac{k_2^i [E]_0 [S^i]}{K_m^i \left( 1 + \sum_{\substack{n=1 \\ n \neq i}}^n \frac{[S^n]}{K_m^n} \right) + [S^i]}, \quad (1)$$

где  $v^i$  — скорость распада,  $[S^i]$  — концентрация,  $k_2^i$  и  $K_m^i$  — соответствующие кинетические константы  $i$ -го субстрата,  $[E]_0$  — концентрация фермента. Аналогичное выражение характеризует и  $j$ -й субстрат. Тогда справедливо соотношение

$$\frac{v^i}{v^j} = \frac{[S^i] k_2^i K_m^j}{[S^j] k_2^j K_m^i}. \quad (2)$$

При малых степенях превращения  $[P^i]$  пропорционально  $v^i$  ( $P^i$  — ANSA-продукт  $i$ -го субстрата). Если  $[S^i] = [S^j]$ , то

$$\frac{[P^i]}{[P^j]} = \frac{k_2^i / K_m^i}{k_2^j / K_m^j}, \quad (3)$$

т. е.  $[P]$  максимальна у лучшего (обладающего меньшим значением  $K_m/k_2$ ) субстрата. Хотя  $[P^i]$  пропорциональна  $v^i$  лишь при малых степенях превращения реакции протеолиза, когда изменения состава реакционной смеси малы, выбор лучшего субстрата предлагаемым методом может быть сделан и по измерениям смесей с глубокими степенями протеолиза.

На рис. 1 представлен ход изменения во времени спектра поглощения смеси ANSA-субстратов типа Tos-Gly-Pro-Arg-ANSA (VIIa—д), различающихся строением ANSA-групп (табл. 1), в ходе ферментативного гидролиза трипсином. Для индивидуальных субстратов картина принципиально не меняется, так как хромофорные группы практически идентичны. (Субстрат (VIIд) является производным аминафталисульфокислоты, спектр поглощения которой несколько отличен от спектров производных ANSA с насыщенными заместителями. Для рассматриваемого метода скрининга эти отличия несущественны (см. ниже).)

ANSA-продукты протеолиза (характеристики представлены в табл. 2) могут быть определены отдельно с помощью ТСХ или ВЭЖХ. По серии хроматограмм реакционной смеси, содержащей эквимольные количества субстратов (VIIa—д) в последовательные моменты времени (рис. 2) видно, что ВЭЖХ с детекцией в максимуме поглощения продуктов ( $\lambda = 340$  нм) позволяет определять их в большом избытке непрореагировав-

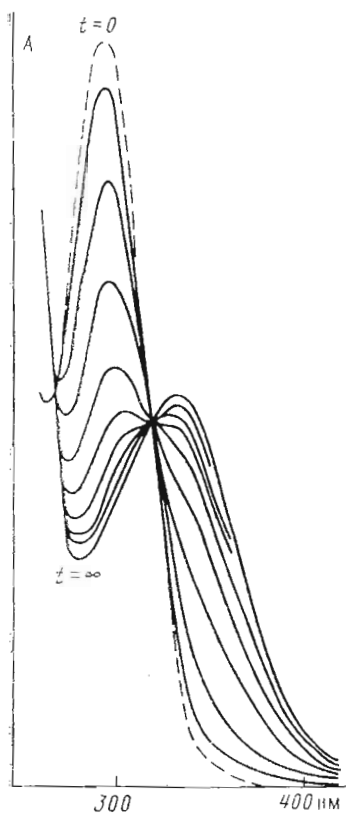


Рис. 1

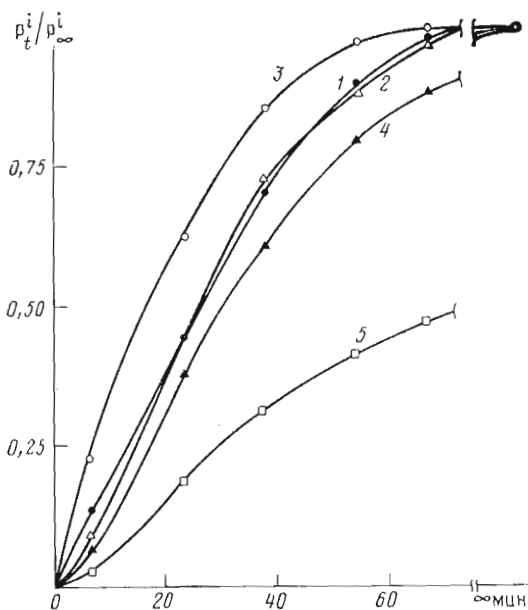


Рис. 3

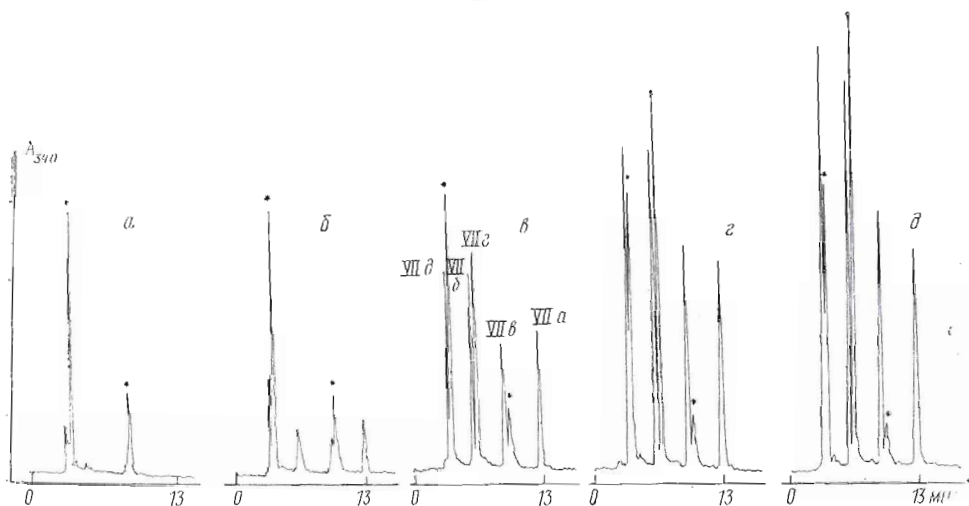


Рис. 2

Рис. 1. Изменение характера оптического поглощения смеси субстратов (VIIa-д) в процессе протеолиза

Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограммы продуктов протеолиза эквимольной смеси субстратов (VIIa-д) в последовательные моменты времени: 0 (а), 6,5 (б), 23 (в), 38 (г) и 53,5 мин (д). (Звездочками отмечены пики веществ, детектируемые в исходной смеси)

Рис. 3. Кинетика накопления ANSA-продуктов VIIa (1), VIIб (2), VIIв (3), VIIг (4) и VIIд (5) в ходе протеолиза смеси субстратов (VIIa-д)

## Характеристика субстратов Tos-Gly-Pro-Arg-ANSA (VIII)

Субстрат	Формула	$\lambda_{\max}$ , нм	$R_f$ в системе	
			А	Б
VIIIa		297	0,42	0,72
VIIIб		297	0,36	0,70
VIIIв		298	0,45	0,71
VIIIг		295	0,33	0,72
VIIIд	SO <sub>3</sub> H	288	0,39	0,54

Таблица 2

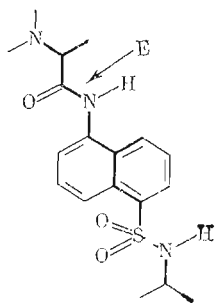
## Характеристики детектируемых групп (VII)

Соединение	$R_f$ в системе		Время удерживания*, мин
	А	Б	
VIIa	0,87	0,75	13,0
VIIб	0,76	0,57	6,0
VIIв	0,90	0,79	9,1
VIIг	0,36	0,04	6,4
VIIд	0,42	0,00	3,5

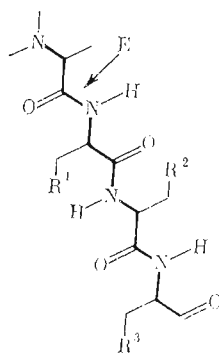
\* ВЭЖХ на Servachrom RP-18.

ших субстратов. Хотя со временем увеличиваются концентрации всех ANSA-продуктов, скорости их накопления различны. На основании представленных хроматограмм построены кинетические кривые протеолиза нескольких субстратов при их одновременном присутствии в реакционной смеси (рис. 3). Количества образовавшихся ANSA( $P_t^i$ ) отнесены к их количествам ( $P_\infty^i$ ) по завершении протеолиза всех субстратов. Тем самым устранено влияние различий в молярных коэффициентах поглощения отдельных детектируемых групп. Ясно, что метод не накладывает ограничений на класс последних — достаточно лишь возможности индивидуального определения каждой из них в смеси. Видно, что субстрат (VIIIв) (кривая 3) первоначально гидролизует быстрее других и, следовательно, является лучшим в соответствии с принятым критерием. По мере протекания реакции концентрация его быстро уменьшается, соответственно скорость его гидролиза падает. Фермент, активный центр которого был занят субстратом (VIIIв), освобождается, что увеличивает скорость гидролиза остальных субстратов (это и приводят к S-образному виду кинетических кривых). Хотя скорость протеолиза субстрата (VIIIв), максимальная при малых степенях превращения ( $t \sim 0$ ), оказывается в конце концов ниже скорости протеолиза других субстратов из-за значительно более высоких концентраций последних к этому времени (ср. наклоны касательных к кривым 1, 2 и 3 при  $t=40$  мин), измерения с целью скрининга лучшего субстрата можно проводить и при  $t \gg 0$ , так как значения  $P_t^i/P_\infty^i$  будут оставаться максимальными у искомого субстрата. (В случае, если в системе присутствует только один фермент и при введении ряда дополнительных ограничений, можно показать, что отдельные кинетические кривые (рис. 3)

не могут пересечься при  $0 < t < \infty$ . Действительно, в точке пересечения двух кривых скорости протеолиза двух соответствующих субстратов не равны, а степени превращения равны, как и при  $t=0$ , что противоречит уравнению (2). Для смеси нескольких ферментов это утверждение заведомо неверно. Многократное пересечение кривых 1 и 2 на рис. 3 статистически недостоверно, но не может быть полностью исключено: коммерческий препарат трипсин, использовавшийся в работе без дополнительной очистки, мог содержать примеси продуктов автолиза, сохранивших каталитическую активность.) Интересно, что из пяти представленных в табл. 1 субстратов два, содержащие полярные группы (VIIIг, д), расщепляются трипсином существенно хуже других, а из трех оставшихся лучший имеет NH-протон в сульфамидной части молекулы. Возможно, образуемая им водородная связь участвует в связывании субстрата с активным центром фермента, моделируя NH-протон R<sup>3'</sup>-остатка пептида:



Фрагмент ANSA-субстрата



Фрагмент пептидного субстрата

Известно, что ошибка при относительных измерениях ниже, чем при выполненных в тех же условиях абсолютных прямых измерениях. Обычные методы нахождения  $k_{cat}$  и  $K_m$  являются косвенными, основанными на обработке серии кинетических экспериментов, часто с графической экстраполяцией. В предлагаемом способе скрининга проводится относительное измерение ( $P^i \leq P^j$ ), отсутствие необходимости разделять  $k_{cat}$  и  $K_m$  каждого из субстратов позволяет избежать ошибок как самих кинетических измерений и подготовки образцов, так и связанных с обработкой результатов (в том числе с экстраполяцией).

Ясно, что для решения собственно задачи скрининга анализировать большую серию хроматограмм не требуется (в принципе достаточно одной хроматограммы). При использовании ВЭЖХ площадь пика продукта лучшего субстрата больше площадей других пиков, что позволяет легко осуществить выбор. При применении ТСХ аликвоту реакционной смеси после остановки реакции хроматографируют на пластинке типа Силуфол. При визуальном анализе детекция ANSA по флуоресценции более чувствительна; однако, если спектры поглощения ANSA с различными насыщенными заместителями в сульфамидной части практически совпадают, гашение флуоресценции сорбированных на пластинке ANSA существенно зависит от природы заместителей. При определении ANSA в виде азокрасителей [13] эта зависимость устраняется. При использовании смеси свидетелей в параллельной дорожке надежность визуальной детекции по флуоресценции в УФ возрастает.

Преимущество предлагаемого способа состоит не только в том, что возрастает точность и экономится время на кинетических измерениях. При решении задачи подбора оптимальной ANSA-группы к определенному пептиду можно существенно сократить и объем синтетической работы. В самом деле, если для стандартных методов скрининга необходимо синтезировать (и очищать до гомогенного состояния) каждый из субстратов порознь, в предлагаемом методе можно осуществить скрининг, проводя синтез сразу со смесью ANSA, а после проведения скрининга нарабаты-

вать (для практической работы) только лучший субстрат. Таким образом, предлагаемый подход значительно ускоряет решение задачи поиска оптимальных субстратов и на стадии синтеза, и на стадии анализа.

### Экспериментальная часть

Аминонафталинсульфамиды получены из 5-аминонафталин-1-сульфокислоты (Союзреактив) ацилированием аминогруппы карбобензоксихлоридом, превращением в сульфохлорид, реакцией его с избытком аминов с образованием N-защитенных сульфамидов и их декарбобензоксигированием (подробную методику см. [14]). В настоящее время более 20 различных ANSA в коммерческих масштабах производится Институтом биохимии АН ЛитССР (Вильнюс).

Трипсин — коммерческий препарат (Srofa, ЧССР) — использовался без дополнительной очистки.

Для ТСХ на пластинках силуфола (Kavalier, ЧССР) использовали системы: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 2 (А), изопропанол — 8% водный аммиак, 7 : 3 (Б), этилацетат — гексан — ацетон, 5 : 5 : 1 (В).

*5-N<sup>α</sup>-Бензилоксикарбонил-аргиниламинонафталин-1-пентаметилсульфамид*. Раствор 3,5 г (10 ммоль) гидрохлорида N<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-аргинина в 20 мл DMF прилили при перемешивании при -4° С к 1,33 г ОБТ в 10 мл DMF, добавили 2,1 г DCC и перемешивали 40 мин при 0° С. К полученному раствору добавили 3,7 г (10 ммоль) бромгидрата 5-аминонафталин-1-пентаметилсульфамида и 2,8 мл триэтиламина. Смесь перемешивали 48 ч, отфильтровали, к фильтрату добавили 60 мл этилацетата и 120 мл гексана, декантировали, осадок промыли смесью этилацетат — гексан, растворили в смеси бутанол — вода, верхний слой отделили, водный экстрагировали бутанолом, объединенные бутанольные вытяжки промыли 5% водным NaHCO<sub>3</sub>, 5% водным KHSO<sub>4</sub>, водой и упарили досуха. Полученный препарат (R<sub>f</sub> 0,75 (А)) без кристаллизации вводили в следующую стадию синтеза.

*5-Аргиниламинонафталин-1-пентаметилсульфамид*. 4 г N-защитенного производного, полученного как описано выше, перемешивали 2,5 ч при 20° С с 40 мл 2 н. НВг в СН<sub>3</sub>СООН, вылили при перемешивании в 600 мл эфира, осадок отфильтровали, растворили в 200 мл воды, экстрагировали этилацетатом, водный слой упарили досуха, остаток растворили в системе А и хроматографировали на колонке (5×15 см) с силикагелем в той же системе. Зону с голубой флуоресценцией собрали, упарили досуха, растворили в 200 мл воды, перемешивали при 50° С с 0,5 г активированного угля, отфильтровали, к фильтрату добавили 1 г NaBr, упарили до 20 мл, довели рН до 7,8 с помощью Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и оставили при 4° С. Осадок отделили, высушили в вакууме. Выход 2,1 г (40%). R<sub>f</sub> 0,28 (А). На ТСХ проявляется нишгидрином, обладает синей (λ<sub>max</sub>=440 нм) флуоресценцией при облучении УФ.

*5-Тозилглицил-пролил-аргиниламинонафталин-1-пентаметилсульфамид (VIIIa)*. К раствору 330 мг тозилглицилпролина [15] в 5 мл DMF добавили 140 мг ОБТ, при -4° С добавили 250 мг DCC, перемешивали 30 мин, добавили 530 мг гидробромида 5-аргиниламинонафталин-1-пентаметилсульфамида и 140 мкл триэтиламина, перемешивали 24 ч при 4° С и 24 ч при 20° С, отфильтровали, упарили в вакууме досуха, очистили хроматографией на силикагеле, как описано для аргинильного производного, зону с голубой флуоресценцией собрали, упарили досуха. Получили 730 мг (85%) хроматографически чистого продукта.

Аналогичным образом получены и субстраты (VIIIб) — (VIIIд).

*Анализ субстратов и продуктов ферментативного гидролиза методом ВЭЖХ*. К 1 мл 1 мМ раствора субстрата в 0,1 М трис-НСI-буфере, рН 8,2, добавили раствор 1 мкг трипсина в 50 мкл того же буфера, перемешивали и инкубировали при 37° С. Аликвоты по 50 мкл отбирали в фиксируемые моменты времени, останавливали реакцию добавлением 10 мкл СН<sub>3</sub>СООН, разделяли в режиме обращенно-фазовой хроматографии на колонке Zorbax-C8 (4,6×250 мм) с градиентной элюцией (А: 50 мМ фосфат аммония,



pH 3, В: 60%  $\text{CH}_3\text{CN}$ +40% раствора А, линейный градиент 50–80% В за 18 мин) при скорости потока 1,5 мл/мин и температуре 35° С. Идентификацию пиков проводили сравнением с известными образцами ANSA и Tos-Gly-Pro-Arg (последний получен ферментативным гидролизом соединения (VIIIд) [16] по аналогичной процедуре). Скорости ферментативных реакций определяли по накоплению продукта (УФ-детектор, 225 нм).

*Скрининг субстратов с использованием тонкослойной хроматографии.* К 0,4 мл термостатированного при 25° С раствора, содержащего по 0,4 ОЕ<sub>300</sub> каждого субстрата в 0,05 М трис-НСl-буфере, pH 8,2, добавили 10 мкл 0,002% раствора трипсина и регистрировали изменение светопоглощения с помощью спектрофотометра. До добавления фермента и в фиксируемые моменты времени после начала ферментативной реакции из реакционной смеси отбирали аликвоты по 50 мкл, смешивали с равными объемами 2 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , пробы лиофилизировали, наносили на пластинку с тонким слоем силикагеля (в параллельных дорожках наносили в качестве стандарта эквивалентные растворы ANSA). Хроматографировали в системе А (или В). Хроматограммы анализировали визуально (желтый (ЖС 12) светофильтр) при облучении УФ-светом.

*Скрининг субстратов с использованием ВЭЖХ.* Подготовку субстратов, проведение ферментативной реакции и обработку проб осуществляли как описано для ТСХ. Лиофилизованную пробу растворяли в смеси 0,05 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  — метанол, 1 : 1, и хроматографировали при 40° С при скорости потока 1 мл/мин на колонке Servachrom RP-18 с детекцией по поглощению при 340 нм (максимум поглощения ANSA, поглощение субстратов незначительно) или 254 нм. Для идентификации пиков и их количественной оценки в тех же условиях использовали хроматографию известных образцов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hemker H. C. Handbook of synthetic substrates for the coagulation and fibrinolytic System. 1-st ed. Martinus Nijhoff Publ. Hague, 1983.
2. Green M. N., Kwan Chung Tsou, Bressler R., Seligman A. M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1955. V. 57. № 2. P. 458–474.
3. Раганова Т. В., Колесанова Е. Ф., Дывак И. А., Шрам С. И., Гинюдман Л. М., Антонов В. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 349–356.
4. Вредные вещества в промышленности. Т. 2/Ред. Лазарев Н. В., Левина Э. Н. М.: Химия, 1976. С. 292.
5. Sakakibara Sh. Dipeptide derivatives of 7(N-alpha-substituted or non-substituted X-arginyl)amino-4-methyl-coumarin. Eur. Pat. 0000063 publ. 10.06.81.
6. Kunugi S., Fukuda M., Hayashi R. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 153. № 1. P. 37–40.
7. Niinobe M., Hitomi Y., Fujii S. // J. Biochem. 1980. V. 87. P. 779–783.
8. Green G. D. J., Shaw E. // Analyt. Biochem. 1979. V. 93. № 2. P. 223–226.
9. Wohl R. C., Summaria L., Robbins K. C. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 5. P. 2005–2013.
10. Svendsen L. G. Tripeptide derivatives and their application in assaying enzymes. U. S. Pat. 4440678 publ. 03.04.84.
11. Люблинская Л. А., Хайду И., Баландина Г. Н., Филиппова И. Ю., Маркарян А. Н., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Степанов В. М. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 748–753.
12. Недоспасов А. А., Незавибагько В. Н., Погаман В. Н., Родина Е. В. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1989. № 1.
13. Недоспасов А. А., Незавибагько В. Н., Яхимович А. Д., Большакова Т. Д., Кузнецов В. А., Смоляницкий А. Я. Способ определения ферментов, обладающих амидазной активностью. А. с. 1353809 СССР // Б. И. 1987. № 43.
14. Недоспасов А. А. 5-(N-Карбобензоксид)-аминонафталин-1-сульфохлорид в качестве полупродукта в синтезе замещенных 5-аминонафталин-1-сульфамидов, используемых в качестве детектируемых групп ферментных субстратов. А. с. 1413103 СССР // Б. И. 1988. № 28.
15. Veecham A. F. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 12. P. 3262–3263.
16. Недоспасов А. А., Незавибагько В. Н., Кузнецов Н. В. Способ определения активности протиназа: А. с. 1278361 СССР // Б. И. 1986. № 47.

Поступила в редакцию  
15.VI.1988

После доработки  
7.IX.1988



## SCREENING OF ARTIFICIAL SUBSTRATES FOR PROTEINASES

NEDOSPASOV A. A., POTAMAN V. N., RODINA E. V.

*Institute of Molecular Genetics,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A method of screening of proteolytic enzyme's substrates is proposed. An equimolar mixture of substrates consisting of peptide and easily detectable chromophore moieties (all chromophores in the mixture must be different) is subjected to enzymatic treatment. The cleaved chromophore groups, which are products of the substrate proteolysis, are quantitatively determined by chromatography. The  $k_{cat}/k_m$  ratio is greater for substrates with higher initial rate accumulation of proteolysis products. The method is illustrated by screening of peptide derivatives of aminonaphthalene sulphonamides for trypsin assay. Proteolysis products are determined by HPLC with absorption detection or by TLC with fluorescence detection.