



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.321.088.1

© 1990 г.

А. Н. Маркарян, Я. В. Возный *

3-ЦИАНО-4-ТРИФТОРМЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРИЛ- β-D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИД — НОВЫЙ ХРОМОГЕННЫЙ И ФЛУОРОГЕННЫЙ СУБСТРАТ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *E. COLI*

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;

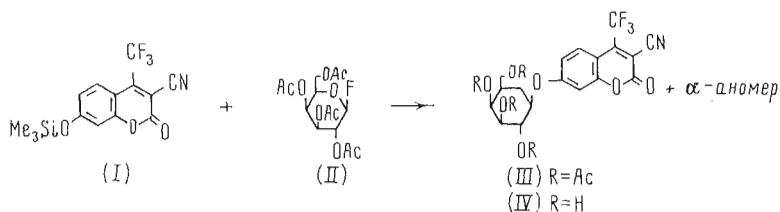
*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

β-Галактозидаза *E. coli* широко применяется в молекулярно-биологических исследованиях [1] и иммуноанализе [2] в качестве ферментной метки, поэтому проблемы ее детекции важны и актуальны. К числу наиболее чувствительных субстратов β-галактозидазы относятся производные на основе 7-гидроксикумарина (умбеллиферона), среди которых наиболее известен 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид (MUG) [2]. Согласно работам [3—5], введение в кумариновое ядро заместителя изменяет его свойства.

Недавно нами описан синтез и изучены свойства 4-трифторметилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид (FMU-галактозид) [6].

В настоящей работе представляло интерес выяснить характеристики нового субстрата β-галактозидазы, содержащего в кумариновом кольце наряду с трифторметильной также цианогруппу.

Синтез 3-циано-4-трифторметилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид (SMU-галактозид) проводили по методике, ранее описанной для аналога, не содержащего CN-группы [6]. Ключевая стадия синтеза — взаимодействие триметилсилилового эфира (I) с 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозилфторидом (II) при действии эфирата трехфтористого бора в бензоле.



В отличие от синтеза FMU-галактозида эта конденсация не отличается высокой стереоселективностью и наряду с β-гликозидом (III), выделенным с выходом 43%, получен α-аномер (17%). После снятия защитных ацетильных групп и очистки кристаллизацией соединение (IV) было испытано в качестве субстрата β-галактозидазы *E. coli*.

Изучение спектров показало, что в области максимального поглощения (λ 440 нм) и флуоресценции (λ 500 нм) 3-циано-4-трифторметилумбеллиферона (SMU) его β-галактозид практически не поглощает и не флуоресцирует. Значение $K_m = 5 \cdot 10^{-4}$ М для β-галактозидазы *E. coli* с использованием в качестве субстрата SMU-галактозида оказалось выше ($5 \cdot 10^{-4}$ М), чем $K_m = 1,1 \cdot 10^{-4}$ М для *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (Np-галактозид) [7]. Однако детекция β-галактозидазы *E. coli* в раст-

воре при pH 7,5 с помощью СМУ- и Np-галактозидов не обнаружила существенных различий в чувствительности. Относительно высокая K_m для СМУ-галактозида, по-видимому, частично компенсируется более высоким значением ϵ ($42\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) измеряемого продукта. Значение pK , равное шести для 7-ОН-группы СМУ, рассчитанное из кривой спектрофотометрического титрования согласно работе [8], позволяет проводить непрерывное измерение содержания ионизованного продукта ферментативной реакции в области pH-оптимума β -галактозидазы *E. coli* (pH 7,2—7,4) [7]. Это выгодно отличает предлагаемый субстрат от гликозидов о-нитрофенола (pK 7,2) и 4-метилумбеллиферона (pK 7,9 [9]). К преимуществам СМУ-галактозида относится также возможность повышать чувствительность определения фермента, используя флуоресцентные свойства того же раствора. Показан способ быстрого (5 мин) визуального определения β -галактозидазы *E. coli* на нитроцеллюлозе (0,1 фмоль фермента) с помощью СМУ-галактозида, что делает субстрат пригодным для применения в блоттинге. По-видимому, в отличие от Np-галактозида СМУ-галактозид обладает сродством к нитроцеллюлозе. Ранее аналогичные свойства были обнаружены у FMU-галактозида в работе [10].

Таким образом, введение в кумариновое ядро трифторметильной и цианогруппы позволило сместить спектральные характеристики измеряемого продукта в более длинноволновую область ($\lambda_{\text{возб}} 440\text{ нм}$, $\lambda_{\text{исп}} 500\text{ нм}$) по сравнению с 4-метилумбеллифероном и получить хромогенный и флуорогенный субстрат. Уменьшение pK 7-ОН-группы кумаринового ядра дает возможность проводить непрерывное измерение ферментативной реакции, что особенно важно при кинетических исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silhavy T. J., Berman M. L., Enquist L. W. Experiments with gene fusions. The Lactose operon. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984. P. 266—282.
2. Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ueno T. // J. Immunoassay. 1983. V. 4. № 3. P. 209—327.†
3. Sherman W. R., Robins E. // Anal. Chem. 1968. V. 40. № 4. P. 803—805.
4. Sherman W. R., Robins E. // Carbohydr. Res. 1968. V. 7. № 1. P. 184—192.
5. White I. N. // Anal. Biochem. 1988. V. 172. № 2. P. 304—310.
6. Yegorov A. M., Markaryan A. N., Vozniy Y. V., Cherednikova T. V., Demcheva H. V., Berezin I. V. // Anal. Letters. 1988. V. 21. № 2. P. 193—209.
7. Wallenfels K., Well R. // The Enzymes. V. 7. / Ed. Boyer P. D., 3rd ed. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972. P. 617—663.
8. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. // Биооргани. химия. 1979. Т. 5. № 2. С. 259—267.
9. Leaback D. H. An introduction to the fluorimetric estimation of enzyme activities. Koch-Light Laboratories Ltd. 2nd ed. P. 19—23.
10. Smith R. E. // J. Histochem. and Cytochem. 1986. V. 34. № 5. P. 585—591.

Поступило в редакцию
12.X.1989

A. N. MARKARYAN, Ya. V. VOZNYI *

3-CYANO-4-METHYLBELLIFERYL- β -D-GALACTOPYRANOSIDE, A NEW CHROMOGENIC AND FLUORIGENIC SUBSTRATE FOR THE β -GALACTOSIDASE FROM *E. COLI*

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;

* Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR,
Yerevan

A novel substrate, 3-cyano-4-trifluoromethylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside, for the continuous ($pK_a = 6,0$ for the measured product), photometric ($\epsilon = 42\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 440 nm, pH 7,5) and fluorimetric ($\lambda_{\text{ex}} = 440\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{ nm}$) assay of β -galactosidase was synthesized. The substrate's affinity to nitrocellulose membranes made possible its use for sensitive (up to 0,1 mole of the enzyme in 5—10 min) visual identification of the β -galactosidase activity on nitrocellulose sheets.