



FI000097152B



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 10 1996

97152

SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12Q 1/527, C 07D 311/16, 311/18, C 07C 271/30
C 08B 11/08, 11/24 // C 12Q 1/04

(21) Patentihakemus - Patentansökning	913460
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	18.07.91
(24) Alkupäivä - Löpdag	18.07.91
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	20.01.92
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.07.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
19.07.90 US 554506 P	

(71) Hakija - Sökande

I. Becton, Dickinson and Company, One Becton Drive, Franklin Lakes, NJ 07417-1880, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

I. Mize, Patrick D., 2113 Summit Street, Durham, NC 27707, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Fluorogeenisia tryptofanaasisubstraatteja
Fluorogeniska tryptofanassubstrat

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4603108 (C 12Q 1/04)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tryptofanaasia varten tarkoitettu fluoro-
geeninen substraatti, jota voidaan käyttää
jonkin tuntemattoman mikro-organismien iden-
tifiointiin, on jokin fluorogeeninen väri-
aine, joka on sitoutunut johonkin aminoryh-
mään karbamaatti- tai tiokarbamaattiryhmän
välityksellä. Suositeltavimmissa substraat-
teissa väriaine on fluoreseiini tai 7-amino-
4-metyylikumariini ja siihen sitoutunut ami-
nohappo on kysteiini, treoniini tai seriini.

Det för tryptofanas avsedda fluorogeniska
substratet, som kan användas för identifie-
ring av en okänd mikroorganism, är ett fluo-
rescerande färgämne, som är bundet vid en
aminosyra via en karbamat- eller en tiokar-
bamatgrupp. I de mest rekommenderade subs-
traten är färgämnet fluorescein eller 7-ami-
no-4-metylkumarin och den därvid bunden ami-
nosyran är cystein, treonin eller serin.

Fluorogeenisia tryptofanaasisubstraatteja
Fluorogeeniska tryptofanassubstrat

- 5 Tämä keksintö koskee mikro-organismien tunnistusta ja tarkemmin sanottuna se koskee entsyymisubstraattia, jota voidaan käyttää jonkin organismin identifioimiseen sen entsyymisisältöä analysoimalla.
- 10 Monet tautitilat johtuvat bakteerien pääsemisestä kehon kudoksiin tai nesteisiin, kuten vereen, virtsaan, aivoselkädinnesteeseen tai nivelnesteeseen. Tällaisten infektioiden menestyksenkäs hoito vaatii varhaista diagnoosia ja asianmukaista hoitoa ei voida aloittaa ennen kuin patogeeni
- 15 on saatu tarkasti tunnistetuksi. Tämä saattaa olla vaikeaa infektion varhaisvaiheissa, koska patogeenin konsentraatio on vähäinen.

Useat menettelytavat, joita yleensä käytetään sairaaloiden

20 mikrobiologian laboratorioissa bakteerien tunnistamiseksi, ovat niiden kasvattamiseen perustuvia menetelmiä, jotka yleensä vaativat tunnistamiseen 18-24 tuntia tai pitempäänkin organismin eristämistä. Joissakin tilanteissa näin pitkä tunnistusaika saattaa vaarantaa potilaan hengen.

25 Patogeenin tunnistamista määrittämällä, mitä entsyymejä se sisältää, on tutkittu. Tämä menetelmä perustuu fluorogeenisten tai kromogeenisten substraattien hydrolysoimiseen organismin ekspressoimilla entsyymeillä ja se suoritetaan

30 yleensä ymppeämällä organismi alustapaneeliin ja vertaamalla saatua fluorogeenista tai kromogeenista profiilia profiileihin, jotka on saatu esiin samalla paneelilla tunnetuista organismeista. Tätä menettelytapaa edustaa patenttijulkaisun US-4603108 sisältö.

35 Godsey ym. julkaisussa *Journal of Clinical Microbiology*, 13, 483 (1981) kuvaavat menetelmää ja laitetta *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvien kantojen ekspressoimien entsyymien

profiloimiseksi käyttämällä fluorogeenisiä substraatteja, jotka on saatu β -metyyliumbelliferonista, β -naftyyliamiinista ja 7-amino-4-metyylikumariinista (AMC).

- 5 Tryptofanaasi on entsyymi, jota esiintyy tietyissä bakteereissa ja joka katalysoi tryptofaanin konversion indoliksi, palorypälehapoksi ja ammoniakiksi. Erästä substraattia, S-(2-nitrofenyyli)kysteiiniä, jonka tämä entsyymi pilkkoo kromofori-2-nitrotiofenoliksi, kuvaavat Suelter ym. julkaisussa
10 *Methods in Enzymology*, 82, 561 (1979).

Tryptofanaasia varten tarvittaisiin fluorogeeninen substraatti, joka voitaisiin sisällyttää entsyymien profilointi-paneeleihin, joita käytetään bakteerien tunnistamiseen. Täl-
15 lainen substraatti parantaisi kovasti tällä menettelytavalla tapahtuvaa bakteerien tunnistuksen tarkkuutta erityisesti kun kysymyksessä ovat Enterobacteriaceae-lajit. Tämä keksintö tähtää juuri tämän tarpeen tyydyttämiseen.

- 20 Tryptofanaasia varten tarkoitettu fluorogeeninen substraatti sisältää fluoresoivan väriosan ja jonkin aminohappo-osan, jolloin värissä oleva nukleofiilinen ryhmä sitoutuu aminohapon nukleofiiliseen ryhmään, joka on muu kuin α -aminoryhmä, karbonyyli- tai tiokarbonyyliryhmän välityksellä. Suositel-
25 tavissa substraateissa aminohappo on treoniini, kysteiini tai kaikkein suositeltavimmin seriini ja fluoresoiva väriosa on fluoreseiini, rodamiini, β -naftyyliamiini tai suositeltavimmin jokin kumariinijohdos. Kaikkein suositeltavin väri on AMC.

30

Keksinnön mukaan suositeltavin substraatti ei ole itsessään fluoresoiva, mutta tryptofanaasi pilkkoo sen aminohapoksi ja AMC:ksi. Sitä voidaan käyttää määrittämään, sisältääkö jokin tuntematon mikro-organismi tryptofanaasia, ja se voidaan
35 sisällyttää laitteeseen, jossa tuntematon mikro-organismi tunnistetaan sen entsyymisisällön perusteella.

Jonkin tuntemattoman mikro-organismin tunnistus määrittämäl-
lä sen entsyymisisällön profiili ja vertaamalla sitä tunnet-
tujen organismien profiileihin, on yleensä tarkka useimpien
organismien kohdalla. Tekniikka on kuitenkin vähemmän tarkka
5 Enterobacteriaceae-heimon bakteerien kohdalla yleisesti käy-
tössä olevilla substraateilla. Koska jotkut Enterobacte-
riaceae-lajit ekspressoivat tryptofanaasin ja jotkut taas
eivät, keksinnön mukaisen substraatin sisällyttäminen profi-
lointilaitteeseen parantaa mikro-organismin tämän ryhmän
10 tunnistamisen tarkkuutta.

Vaikka tämä keksintö voidaan toteuttaa monilla eri tavoilla,
tässä kuvataan yksityiskohtaisesti keksinnön suositeltavim-
pia toteutusmuotoja, jolloin on selvää, että tämä selitys on
15 katsottava esimerkiksi keksinnön periaatteista eikä sen tar-
koituksena ole rajoittaa keksintöä tässä kuvattuihin toteu-
tusmuotoihin. Keksinnön suoja-alan määrittävät liitteinä
olevat patenttivaatimukset ja niitä vastaavat.

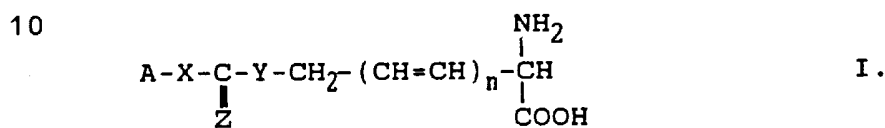
20 Tryptofanaasi katalysoi tryptofaanin konversion indoliksi,
palorypälehapoksi ja ammoniakiksi ja mikro-organismeja, jot-
ka sisältävät tätä entsyymiä, nimitetään usein indoliposi-
tiivisiksi. Esimerkkejä indoliposiitivisista mikro-organis-
meista ovat *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Proteus*
25 *vulgaris*, *Morganella morganii* ja *Klebsiella oxytoca*. Edusta-
via indolinegatiivisia organismeja ovat *Klebsiella pneumo-*
niae, *Citrobacter freundii* ja *Proteus mirabilis*.

Sen määrittämistä, onko jokin tuntematon mikro-organismi
30 indoliposiitivinen tai indolinegatiivinen, voidaan käyttää
tuntemattoman tunnistamisessa. Erityisesti Enterobacteria-
ceae-lajien oikea tunnistaminen helpottuu määrittämällä or-
ganismin indoliluokitus.

35 Tämän keksinnön mukaista substraattia voidaan käyttää mää-
rittämään mikro-organismin indoliluokitus jostakin kliini-
sestä näytteestä, kuten virtsasta, ulosteesta, haavasta,
nielusta, genitaalinäytteistä tai tavallisesti steriileistä

kehon nesteistä, kuten verestä, aivoselkäydinnesteestä tai nivelnesteestä. Tässä keksinnössä termin mikro-organismit katsotaan tarkoittavan mitä tahansa pientä organismia, joka tuottaa entsyymejä, kuten homeita, hiivoja ja suositeltavim-
5 min bakteereita.

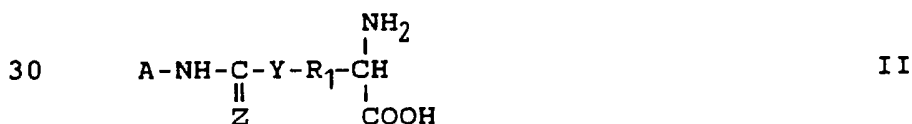
Tämän keksinnön mukaisella fluorogeenisellä tryptofanaasi-substraatilla voi olla kaavan I rakenne:



Rakenteessa I A voi olla jokin fluoresoiva väriaineosa, X, Y ja Z voivat toisistaan riippumatta olla O, S tai NH ja n voi olla 0-3. Esimerkkejä sopivista fluoresoivista väriaineosista ovat:

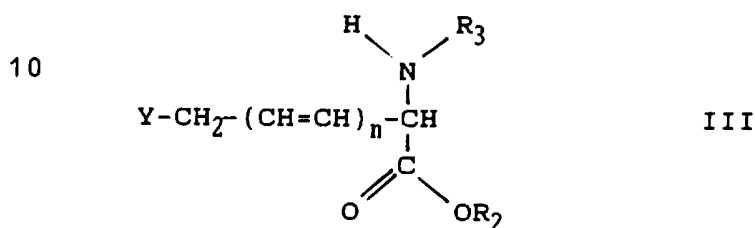
- (1) AMC, jossa X on NH;
20 (2) 7-hydroksi-4-metyylikumariini, jossa X on O;
(3) fluoreseiini, jossa X on O;
(4) rodamiini, jossa X on NH;
(5) B-naftyyliamiini, jossa X on NH.

25 Suositeltavia keksinnön mukaisia substraatteja ovat fluoreseiinin seriini-, kysteiini- ja treoniinijohdokset ja AMC, seuraavan rakenteen II mukaisesti:



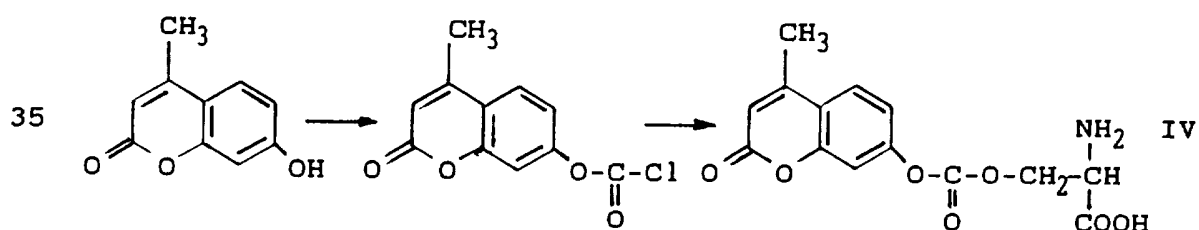
jossa A voi olla fluoreseiini tai AMC, R₁ voi olla CH₂ tai CH₂CH=CH ja Y ja Z voivat olla O tai S. Kaikkein suositeltavimmassa substraatissa A on 4-metyylikumariini, Y ja Z ovat
35 O ja R₁ on CH₂.

Keksinnön mukaiset substraatit voidaan syntetisoida kaupallisesti saatavissa olevista fluoresoivista väriaineista tunnetuilla synteetitavoilla. Erään suositeltavan menettelytavan mukaan jokin väriaine, joka on substituoitu jollakin aminoryhmällä, voidaan muuttaa vastaavaksi isosyano- tai isotiosyanojohdokseksi ja antaa sen reagoida jonkin sopivasti suojatun aminohapon kanssa, jolla on rakenne III:



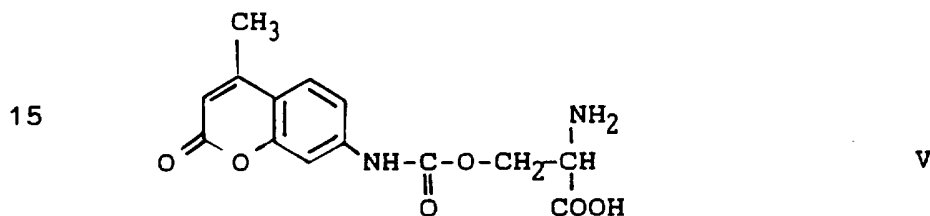
15 jossa Y voi olla OH, SH tai NH₂, n voi olla 0-3 ja R₂ ja R₃ ovat konventionaalisia aminohappoja suojaavia ryhmiä, kuten karbobentsyylioksi-, bentsyyli-, litium- ja trimetyylisilyyllietoksikarbonyyliryhmiä (Teoc). Suositeltavimpia suojaryhmiä ovat litium R₂:na ja Teoc R₃:na (kuten esimerkissä 1 kuvataan). On selvää, että tämä synteetimenettely johtaa suojaryhmien poistamisen jälkeen rakenteeseen I, jossa X on NH ja Z on O, isosyanoryhmällä substituoitusta väriaineesta lähdettäessä ja rakenteeseen I, jossa X on NH ja Z on S, isotiosyanoryhmällä substituoitusta väriaineesta lähdettäessä. Näin esimerkiksi substraatti, jossa A on rodamiini, X on NH, Z on S, Y on O ja R₁ on metyleeni, saadaan antamalla rodamiini-isotiosyanaatin ja kaksoissuojatun seriinin reagoida keskenään.

30 Eräs sopiva menettelytapa substraatin IV, jossa X on O, syntetisoimiseksi on esitetty seuraavassa yhtälössä:

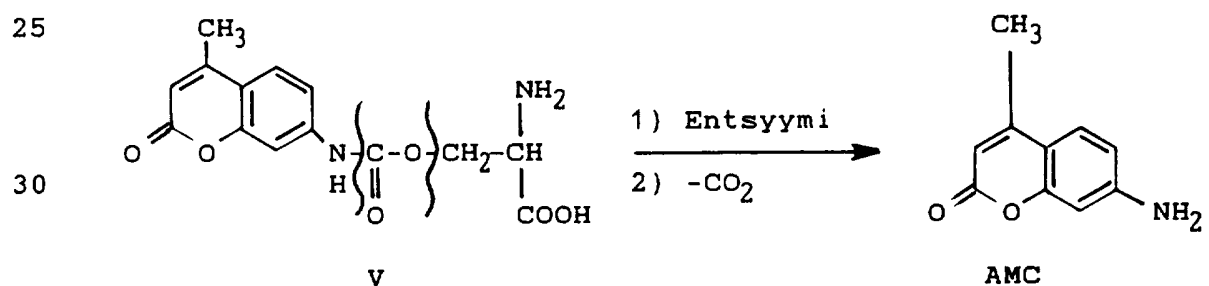


Tämä yhtälö esittää fluorofori-7-hydroksi-4-metyylikumariinin konversiota klooriformyylijohdokseksi ja tämän välituotteen reaktiota kaksoissuojatun seriinin kanssa, jolloin suojaryhmien poistamisen jälkeen saadaan tryptofanaasisubstraatti IV.

Muut menettelytavat keksinnön mukaisten tryptofanaasisubstraattien syntetisoimiseksi ovat itsestään selviä alaan perehtyneille ja eräs yksityiskohtainen kokeellinen menettelytapa suositeltavimman substraatin syntetisoimiseksi annetaan esimerkissä 1.



Kun keksinnön mukaista substraattia inkuboidaan jonkin tryptofanaasia ekspressoivan organismin kanssa, entsyymi pilkkoo fluorogeenisen substraatin, joka ei itsessään ole fluorogeeninen, alla esitetyn mukaisesti, jolloin saadaan palorypälehappoa, AMC:a, CO₂:a ja ammoniakkia.



35 Fluoresenssin detektio identifioi organismin indolipositiviseksi. Fluoresenssin puuttuminen osoittaa, että organismi on indolinegatiivinen.

40 Keksinnön mukainen substraatti voidaan sisällyttää jonkin tuntemattoman organismin tunnistamiseen käytettävään laitteeseen. Erästä suositeltavaa laitetta, jossa keksinnön mu-

kaista substraattia voidaan käyttää, kuvataan hakijan patenttihakemuksessa US-209677, jonka sisältö liitetään tähän viitejulkaisuna.

5 Kun keksinnön mukaista substraattia käytetään patenttihakemuksen US-209677 mukaisessa laitteessa, se voidaan yhdistää patenttihakemuksen US-209677 mukaiseen alustaan. Substraatti voidaan saattaa kosketukseen nestenäytteen kanssa, jonka epäillään sisältävän tuntematonta organismia, mieluiten sen
10 jälkeen kun organismi on käsitelty solukalvon läpäisevällä reagenssilla, kuten jollakin pinta-aktiivisella aineella, jotta solunsisäiset entsyymit pääsevät helpommin nestenäytteeseen. Jos tuntematon organismi on indolipositiivinen, nestenäytteessä läsnä oleva tryptofanaasi reagoi substraatin
15 kanssa vapauttaen fluorogeenin. Fluoresenssin puuttuminen alustasta, joka sisältää keksinnön mukaisen substraatin, identifioi tuntemattoman organismin indolinegatiiviseksi. Määrittämällä nopeus, jolla fluoresenssi kehittyy, saadaan tietoa substraatin hydrolysoitumisnopeudesta ja siten tryptofanaasin konsentraatiosta organismissa. Tällä tavoin määritetyn tuntemattoman organismin indolireaktio voidaan sisällyttää osaksi tuntemattoman organismin entsyymiprofiilia, joka saadaan esiin käyttämällä useita muita entsyymisubstraatteja, jotka on asetettu laitteessa oleville muille
25 alustoille. Profiilia voidaan sitten verrata tunnettujen mikro-organismien profiileihin, jotka on saatu esiin olennaisesti samanlaisissa koeolosuhteissa, ja tuntematon organismi voidaan tunnistaa tunnetun mikro-organismin profiililla, joka on lähinnä tuntemattoman organismin profiilia.
30

Keksinnön mukaista tryptofanaasisubstraattia voidaan käyttää myös patenttihakemuksen US-209677 mukaisen laitteen yhteydessä tuntemattoman organismin identifioimiseen määrittämällä sen herkkyysprofiili sarjalle antibiootteja. Kukin patenttihakemuksen US-209677 mukaisista alustoista voi sisältää keksinnön mukaisen substraatin ja eri antibiootin. Alustoihin ympätään tuntematon organismi nestemäisessä kasvatus-

väliaineessa ja inkuboidaan. Jos antibiootti tehoaa tuntemattomaan organismiin, sen kasvu estyy, entsyymiä ei muodostu, substraatti ei hydrolysoitu ja fluoresenssia ei tule esiin. Jos antibiootti on tehoton, tuntematon organismi kasvaa ja ekspressoituu entsyymien, joka hydrolysoi substraatin ja aikaansaa fluoresenssin. Kuten edellä kuvattiin, tieto, joka saadaan käyttämällä keksinnön mukaista tryptofanaasisubstraattia, voidaan yhdistää tietoon, joka saadaan käyttämällä muita entsyymejä varten tarkoitettuja substraatteja tuntemattoman organismin reaktiivisuusprofiilin eri antibiootteja kohtaan saamiseksi esiin. Tuntemattoman organismin herkkyysprofiilia voidaan verrata tunnettujen organismien profiileihin tunnistamista varten.

Keksinnön mukaista substraattia voidaan käyttää myös patenttihakemuksen US-209677 mukaisen laitteen yhteydessä eri antibioottien pienimmän bakteerien kasvun estävän konsentraation (MIC) määrittämiseksi tuntemattomalle organismille. Tätä sovellusta varten alustalevy sisältää sarjan antibioottien eri väkevyyksiä ja keksinnön mukaisen substraatin. Ympäristön ja inkuboinnin jälkeen kullakin alustalla olevan antibioottikonsentraation tehon osoittaa fluoresenssitaso. Alustoista, joissa on ympäristöalustasta saadun vertailuarvon yläpuolella oleva minimifluoresenssitaso, saadaan antibiootin MIC tuntemattomaa organismia vastaan.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön valaisemiseksi edelleen, mutta niiden ei tule katsoa rajoittavan keksinnön suojapiiriä.

Rutiinianalyysitekniikat

Analyttinen TCL suoritettiin 0,25 mm, 5 cm x 20 cm alumiinipohjaisilla silikageelilevyillä (luettelonumero 5534), jotka saatiin EM Science'ltä (Cherry Hill, New Jersey).

Analyttinen käänteisfaasi-HPLC suoritettiin Waters 860 kaksipumppusysteemillä ja valodiodirividetektorilla (200-600 nm) käyttäen Waters Delta Pak C-18 100 A, 4,6 x 220 mm kolumnia (SN-338B31162); käytetyt olosuhteet olivat: aluksi

pidettiin 60 minuuttia 0,2 % trifluorietikkahapon vesiliuok-
sessa, mitä seurasi lineaarinen gradientti 0,2 %:iseen tri-
fluorietikkahappoon THF:ssa 1 tunnin ajan. Sulamispisteet
saatiin Thomas-Hoover-kapillaarisulamispisteen määrittämis-
5 teella (Philadelphia, Pennsylvania) eikä niitä korjattu.
Fluoresenssi-spektri rekisteröitiin Perkin-Elmer LS-5 fluo-
rometrillä. NMR-spektri rekisteröitiin IBM/Brucker WP-
200SY:llä (200 MHz) (Billerica, Massachusetts). Kemialliset
siirtymät ilmoitetaan käyttäen referenssinä tetrametyyli-
10 silaania. Korkean erotuskyvyn massaspektrografiati suoritti
D.S. Millington, Mass Spectrometry Facility, P.O. Box 3028,
Duke University Medical Center, Durham, North Carolina
27710.

15 Esimerkki 1

Seriini-AMC-karbamaatin (V) synteesi

A. 4-Metyyli-7-isosyanokumariinin synteesi

Pyöreäpohjaiseen 200 ml:n kolmikaulakolviin, joka oli varus-
tettu kuivajääjäähdyttimellä ja magneettisekoittimella, pan-
20 tiin 2,0 ml 20 % fosgeeni/tolueeniliuosta ja 80 ml kuivaa
dioksaania. Tähän seokseen lisättiin 2,0 g (0,0114 moolia)
kiinteää AMC:a ja seosta refluksoitiin yön yli. Seos muuttui
keltaisesta saostuneeksi valkoiseksi kiinteäksi aineeksi.
Siihen lisättiin vielä 7,0 ml 20 % fosgeeni/tolueeniliuosta
25 ja seosta refluksoitiin edelleen vielä 5 tuntia, jossa ajas-
sa liuos kirkastui. Kolviin lisättiin argonkaasun syöttöput-
ki ja argonia kuplitettiin liuoksen läpi fosgeeniylimäärän
ja HCl-jäämien poistamiseksi. Sama seos suodatettiin rea-
goimattoman AMC:n poistamiseksi ja seos väkevöitiin, jolloin
30 saatiin 2,0 g, saanto 87 %, valkoista kiinteää ainetta, joka
oli haluttu tuote. NMR (CDCl₃): ppm: 2,43 (s, 3H), 7,02 (s,
1H), 7,39 (dd, 3H). IR: voimakas absorbanssi 2250 cm⁻¹:n koh-
dalla; ei absorbanssia 3800-3500 cm⁻¹:n kohdalla.

35 B. N-(trimetyylisilyylietyylioksikarbonyyli-o-karbonyyliami-
no-7-(4-metyyliumarinyyli)-L-seriinin litiumsuolan synteesi
Pyöreäpohjaiseen 100 ml:n vetoiseen kolmikaulakolviin, joka
oli varustettu magneettisekoittimella, pantiin 1,16 g

(4,16 mmoolia) N-trimetyylisilyylietyylioksikarbonyyli-L-seriinin litiumsuolaa (Shute ym., Synthesis 1987, 346) ja 20 ml asetonitriiliä. Tähän seokseen lisättiin 0,84 g (4,18 mmoolia) 4-metyyli-7-isosyanokumariinia (kohdan A tuote) liuotettuna 15 ml:aan THF:a. Tätä seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 48 tuntia. Sitten seos suodatettiin, jolloin saatiin 1,32 g vihertävän valkoista kiinteää ainetta. Kiinteä aine lietettiin kyllästettyyn natriumvetysulfaattiliuokseen ja sitä sekoitettiin 1 tunnin ajan. Sitten 10 suspensio suodatettiin ja saatiin 0,84 g (1,83 mmoolia) 44 %:n saannolla. Nopea atomipommitus(FAB)-massaspektrometrian tulokseksi saatiin 479 = [MH+Na]⁺. NMR(DMSO-d₆): ppm: 0,0 (bs, 9H), 0,90 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 4,01 (m, 4H), 4,30 (m, 2H), 7,09 (m, 4H), 10,26 (s, 1H). HPLC-retentioaika 15 98 minuuttia.

C. Seriini-AMC-karbamaatin (V) synteesi

10 ml:n vetoiseen kolviin pantiin 2,0 ml trifluorietikka-happoanhydridiä (TFA) ja se jäähdytettiin 0°C:een argonkehässä. Jäähdytettyyn TFA:han lisättiin 0,24 g (0,525 mmoolia) 20 kohdassa B saatua tuotetta. Tätä liuosta sekoitettiin 4 tuntia 0°C:ssa, se väkevöitiin pyöröhaihduttimessa alipaineessa. Jäännös liuotettiin metanoliin, eetteriä lisättiin ja valkoinen kiinteä aine saostui. Tämä valkoinen kiinteä aine 25 suodatettiin ja saatiin 0,178 g (80,9 %). Sulamispiste = 185-186°C (hajoaminen). NMR (CDCl₃ + CF₃COOH): ppm: 2,54 (s, 3H), 4,85 (m, 3H), 6,44 (s, 1H), 7,66 (4H). HPLC-retentioaika 74 minuuttia. Korkean erotuskyvyn massaspektrografia [MH⁺]: C₁₄H₁₅N₂O₆. Laskettu 307,0848. Todettu 307,0937.

30

Esimerkki 2

Seriini-AMC-karbamaatin reaktio tryptofanaasin kanssa

100 nm:iin kaliumfosfaattipuskuria liuotettuna seriini-AMC-karbamaatin 1,19 x 10⁻⁶ M liuokseen, pH 8,2, lisättiin 100 µl

35 5,0 mg/ml tryptofanaasiliuosta. Fluoresenssin lisääntyminen mitattiin 440 nm:n kohdalla aktivoimisen tapahtuessa 365 nm:n kohdalla. Seriini-AMC-karbamaattiliuoksen lähtöfluoresenssi oli 26 suhteellista yksikköä. Entsyymin lisäyk-

sen jälkeen fluoresenssi voimistui 440 nm:n kohdalla nopeudella 97 yksikköä/ minuutti. Tämä tulos osoitti, että entsyymi katalysoi seriini-AMC-karbamaatin konversion 7-amino-4-metyyliikumariiniksi. Fluoresenssin lisääntyminen entsyymin puuttuessa oli merkityksetöntä.

Esimerkki 3

Mikro-organismien indolireaktion määrittäminen

20 Mikrolitran alikvootteja esimerkin 1 mukaisen substraatin
10 0,5 % liuoksesta liuotettuna dimetyylisulfoksidiin lisättiin
selluloosakiekoille (luettelonumero 740-E, Schleicher ja
Schuell, Inc. Keene, New Hampshire). DMSO poistettiin tyh-
jiökuivaamalla. Kuivatut kiekot asetettiin mustan polysty-
reeniä olevan mikrosyvennyksilevyn syvennyksiin. Neljään kie-
15 koista ympätettiin kuhunkin 25 mikrolitraa suspensiota, joka
sisälsi ml:aa kohti 3×10^8 kolonian muodostavia yksikköjä
tunnettuja indolipositiivisia mikro-organismeja *Escherichia*
coli ja *Citrobacter diversus* ja tunnettuja indolinegatiivi-
sia mikro-organismeja *Klebsiella pneumoniae* ja *Citrobacter*
20 *freundii*. Suspensiot tehtiin fosfaattipuskuriin, jonka pH
oli 8,4 ja joka sisälsi tolueenia konsentraationa 2 tippaa/5
ml puskuria bakteerien tekemiseksi läpäiseviksi. Neljään
kiekkoon ympätettiin pelkästään puskuria verrokeiksi. Kiekkoja
aktivoitiin 365 nm:n kohdalla ksenonlampulla ja fluoresenssi
25 mitattiin 1 minuutin välein 10 minuutin ajan 440 nm:n aal-
lonpituudella käyttäen Fluoroskan II-lukijaa (Flow Laborato-
ries, McLean, Virginia 22102). Neljästä putkesta kutakin
organismia saaduista tuloksista laskettiin keskiarvot ja ne
on esitetty alla olevassa taulukossa nanogrammina vapaata
30 AMC:a/minuutti.

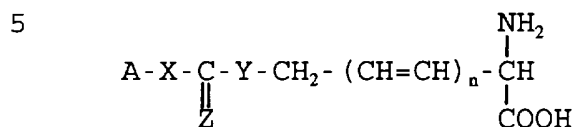
Taulukko

5	Organismi	Kanta	Fluoresenssin lisääntyminen (ng AMC/min)
	<i>E. coli</i>	1W9901N1	1,53
	<i>E. coli</i>	2W0803N1	1,85
10	<i>E. coli</i>	4H8162N1	1,6
	<i>E. coli</i>	7W0563N1	1,7
	<i>C. diversus</i>	404	5,35
	<i>C. diversus</i>	2075	4,4
	<i>K. pneumoniae</i>	6N3696N1	0,5
15	<i>C. freundii</i>	2027	0,8
	<i>C. freundii</i>	2058	0,45
	Verrokki		0,43

- Taulukosta näkyy, että indolinegatiivisilla organismeilla
- 20 *K. pneumoniae* ja *C. freundii* on suunnilleen sama fluoresenssin lisäys kuin verrokillä, kun taas indolipositiivisilla organismeilla *E. coli* ja *C. diversus* on paljon suurempi fluoresenssin lisäys, mikä johtuu vapaan AMC:n vapautumisesta.

Patenttivaatimukset

1. Fluorogeeninen tryptofanaasisubstraatti, **tunnettu** siitä, että sillä on rakenne



jossa A on jokin fluoresoiva väriaineosa, X, Y ja Z on
10 toisistaan riippumatta valittu ryhmästä, jonka muodostavat O, S ja NH ja n on kokonaisluku 0-3.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen substraatti, **tunnettu** siitä, että A on jokin fluoresoiva väriaineosa, Y on va-
15 littu ryhmästä, jonka muodostavat O ja S, X on valittu ryhmästä, jonka muodostavat O ja NH, ja n on kokonaisluku 0-1.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen substraatti, **tunnettu**
20 siitä, että A on 4-metyylikumariiniosa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen substraatti, **tunnettu** siitä, että A - X on 7-amino-4-metyylikumariiniosa.

25 5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen substraatti, **tunnettu** siitä, että A - X on 7-hydroksi-4-metyylikumariiniosa.

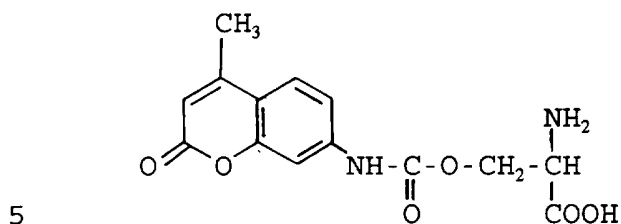
6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen substraatti, **tunnettu** siitä, että A on fluoreseiiniosa.

30

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen substraatti, **tunnettu** siitä, että A on rodamiiniosa.

8. Patenttivaatimuksen 2 mukainen substraatti, **tunnettu**
35 siitä, että A on β -naftyyliamiiniosa.

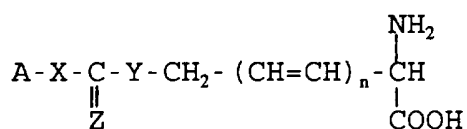
9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen substraatti, **tunnettu** siitä, että sillä on rakenne



Patentkrav

1. Fluorogeniskt tryptofanassubstrat, **kännetecknat** av att den representeras av strukturen

10



15 i vilken A är en fluorescerande färgämneskomponent, X, Y och Z är oberoende varandra valda ur en grupp som består av O, S och NH och n är heltalet 0-3.

2. Substrat enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att A är en fluorescerande färgämneskomponent, Y är vald ur en grupp som består av O och S, X är vald ur en grupp som består av O och NH och n är heltalet 0-1.

25 3. Substrat enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att A är en 4-metylkumarindel.

4. Substrat enligt patentkrav 3, **kännetecknat** av att A - X är en 7-amino-4-metylkumarindel.

30 5. Substrat enligt patentkrav 3, **kännetecknat** av att A - X är en 7-hydroxi-4-metylkumarindel.

6. Substrat enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att A är en fluoresceindel.

35

7. Substrat enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att A är en rodamindel.

8. Substrat enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att A är en β -naftylamindel.

9. Substrat enligt patentkrav 4, **kännetecknat** av att den 5 representeras av strukturen

