

DETERMINAREA ACTIVITĂȚII PROTEOLITICE A TRIPSINEI CU AJUTORUL UNUI SUBSTRAT PROTEIC COLORAT

Eugenia Goina, M. Kerekes

Pentru determinarea activității unor enzime, în special a celor proteolitice, s-au întrebunțat de către diferiți autori substraturi colorate. Utilizarea acestora este în mod deosebit convenabilă pentru că produșii de hidroliză sînt colorați și concentrația lor poate fi ușor și direct determinată.

Se disting trei categorii de substraturi colorate.

1. Proteine de molecula cărora se leagă coloranți. Se cunosc astfel de substraturi în care proteina este insolubilă (ex.: fibrina, pulbere de piele) și a căror produși de hidroliză sînt solubili și colorați (1, 2, 3, 4, 5).

2. Proteine cuplate cu compuși diazotați necolorați, care în urma cuplării își modifică structura prin apariția unor grupări cromofore. În cele mai multe

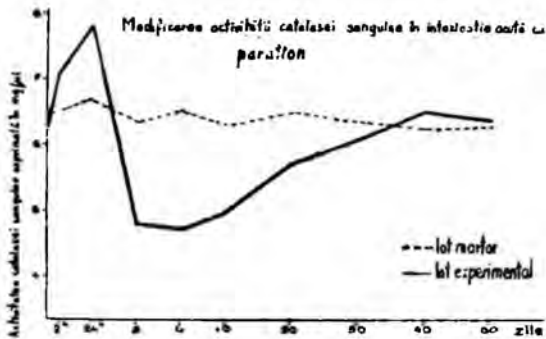


Fig. nr. 1.

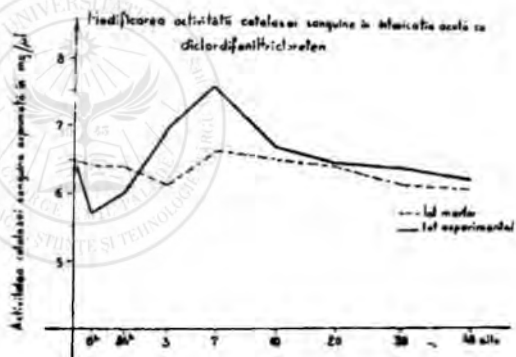


Fig. nr. 2.

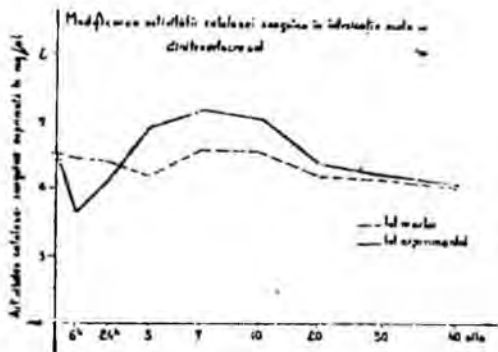


Fig. nr. 3.

cazuri descrise, substanța cuplată este acidul sulfanilic diazotat, iar proteina este albumina serică sau caseina (6, 7, 8, 9).

3. Proteine, ale căror moleculă modificată, de ex. prin nitrare, devine colorată. Este cazul nitrocaseinei (10, 11).

Întrucât întrebuițarea substraturilor din prima categorie este convenabilă din cauza utilizării simple și prezintă în plus o sensibilitate mare, am încercat să preparăm un substrat colorat care, spre deosebire de cele cunoscute, să fie solubil. După încercări orientative ne-am oprit asupra substratului solubil format din cazeină-eozină.

Material și metodă

Prepararea cazein-eozinei (CE)

5 g cazeină Hammarsten se introduc într-un flacon Erlenmeyer, se adaugă 8,95 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH = 7,8), 1 g eozină și aprox. 100 ml apă distilată. Se încălzește timp de 30 minute la fierbere lentă și agitând. Soluția obținută se răcește sub curent de apă, se precipită complexul CE cu câteva picături de acid acetic glacial, iar precipitatul se spală cu apă caldă (70°C) de 7—8 ori prin centrifugare. CE astfel obținută se introduce într-un balon Erlenmeyer, se adaugă 8,95 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ și aprox. 150 ml apă distilată și se încălzește pînă la dizolvare. Se determină apoi gravimetric concentrația substanței CE în această soluție, apoi se aduce la concentrație de 2%, adăugînd în prealabil și conservant Fenosept 2,5 ml pe 100 ml sol. CE.

Etalonarea substratului

Din soluția de bază de 2% s-au făcut o serie de diluții și s-a determinat extincția lor la fotometrul Pulfrich. Rezultatele sînt reprezentate grafic în fig. nr. 1, curba I.

Pentru a determina cantitatea de eozină legată de cazeină în complexul obținut, am pregătit o serie de diluții asemănătoare și din colorantul eozină în apă. Rezultatele sînt reprezentate grafic în fig. nr. 1, curba II.

Pe baza acestor date am constatat că aproape întreaga cantitate de eozină este legată de cazeină.

Determinarea activității enzimatice a tripsinei

S-a folosit complexul CE preparat pentru determinarea activității enzimatice a tripsinei. Pornind de la o soluție de tripsină NBC de concentrația 0,5 mg/ml în soluție $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH = 7,8), s-au pregătit următoarele serii de diluții:

— tripsină mg/ml: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, care au servit pentru determinarea activității enzimatice după următoarea metodă;

— la 1 ml soluție tripsină s-a adăugat 1 ml CE, s-a incubat la 40°C un anumit interval de timp, după care s-a precipitat substratul nehidrolizat cu 5 ml acid acetic 3%. După 10 minute s-a filtrat și s-a citit extincția filtratului la fotometrul Pulfrich, utilizînd filtrul S—50 și cuva de 1 cm. Din valorile obținute s-a scăzut extincția probei martor, pregătită în mod similar, dar fără incubare.

Rezultate și discuții

Cu metoda descrisă mai sus am efectuat 2 serii de determinări.

Seria I. Am variat concentrația enzimei, păstrînd constant timpul de incubare și concentrația substratului. În acest scop am folosit seria celor 5 soluții de tripsină de mai sus, iar timpul de incubare a fost de 30 minute.

Concentrația în amestecul de reacție a fost deci:

— tripsină: 50 — 100 — 150 — 200 — 250 $\mu\text{g/ml}$

— CE: 10 mg/ml.

Rezultatul determinărilor este reprezentat în graficul din fig. nr. 2, curba I.

Seria II. Respectînd raportul optim de 1:100 între enzimă și substrat, am variat durata incubației la 5, 10, 15, 20, 25, 30 min. Concentrația în amestecul de reacție a fost:

— tripsina: 0,1 mg/ml

— CE: 10 mg/ml.

Rezultatele determinărilor sînt trecute în graficul din fig. nr. 2, curba II.

După cum reiese din graficul fig. nr. 2, curba I, relația dintre cantitatea de tripsină și extincția produșilor de hidroliză este aproape liniară, iar timpul optim de incubație (fig. nr. 2, curba II) este de 15'—20'.

Concluzii

Față de substraturile aparținînd categoriei I, metoda prezintă avantajul că substratul preparat de noi este solubil, deci se evită cîntăririle repetate la balanța analitică.

Modul de preparare a CE este simplu, din substanțe ușor accesibile. Metoda prezintă de asemenea sensibilitate satisfăcătoare pentru determinările curente de laborator ale activității proteolitice a tripsinei.

Sosit la redacție: 24 noiembrie 1966.

Bibliografie

1. P. GRÜTZNER: Arch. ges. Physiol. (1874), 8, 452; 2. H. E. ROOF: Biochem. J. (1908), 3, 188; 3. A. PALLADIN: Arch. ges. Physiol. (1910), 134, 337; 4. J. A. SMORODINTEV: Biochem. J. (1924), 153, 14; 5. W. NELSON, E. CIACCIO, G. HESS: Analytical Biochem. (1961), 2/1, 39; 6. J. CHARNEY, T. TOMARELLI: J. Biol. Chem. (1947), 171, 501; 7. R. TOMARELLI, J. CHARNEY, M. HARDING: J. Lab. Clin. Med. (1949), 34, 428; 8. M. MAGER, D. FARMER: J. Lab. Clin. Med. (1953), 42/6, 915; 9. M. KEREKES, P. FURDA: Șt. cerc. Biochim. (1965), 8, 199; 10. E. PECHMANN: Biochem. J. (1950), 321, 248; 11. L. FERGUSON, S. LOVTRUP: C. R. Lab. Carls, Sér. Chim. (1955), 29, 113.