

STUDIUL IMUNOELECTROFORETIC AL UNOR ENZIME DE PROVENIENȚĂ TISULARĂ

Ecaterina Lukács

În ultimii ani metodele imunochimice și-au găsit o largă aplicare în cercetările enzimologice. Prin aplicarea imunoelectroforezei și colorații adecvate se pot localiza unele enzime în câmpul electroforetic precizându-se locul lor printre arcurile de precipitare. Până în prezent s-au studiat cu această metodă mai ales unele enzime serice, ca beta-naftilesteraza, indoxil-esteraza (Uriel, 1961), amilaza (Rahman, 1965), și alfa-naftilesteraza (Cortner, 1967).

În lucrarea de față am căutat să precizăm prin imunoelectroforeză localizarea unor enzime din extracte tisulare.

Material și metodă

Pentru obținerea antiserurilor anti-glandă salivară bovină și anti-ficat de cline am imunizat iepuri cu următoarele preparate antigenice:

1. Triturat de glandă salivară bovină obținută de la abator la 1—2 ore după tăiere.
2. Triturat de ficat de cline.

ECATERINA LUKÁCS: STUDIUL IMUNOELECTROFORETIC AL UNOR ENZIME
DE PROVENIENȚĂ TISULARĂ



Fig. nr. 1. Microimmunoelectroforeză.
În godeurile din mijloc extract de
glandă salivară bovină (antigen).
Sus: ser anti-glandă salivară bovi-
nă, jos: același antiser în diluție
 $\frac{1}{1}$. Colorație pentru proteine cu
fuxină acidă.

Fig. nr. 2.: Microimmunoelectroforeza
extractului de glandă salivară bo-
vină, colorare pentru punerea în
evidență a activității alfa-amilazei

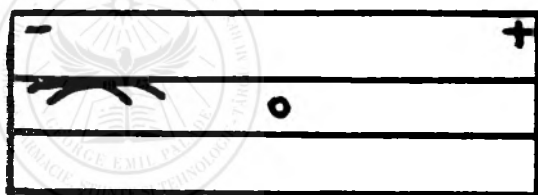


Fig. nr. 3.: Microimmunoelectroforeza
extractului de glandă salivară bo-
vină, colorare pentru beta-naftil-
esterază.



Fig. nr. 4.: Microimmunoelectroforeza
extractului de glandă salivară bo-
vină, colorare pentru indoxil-est-
rază

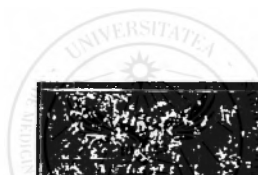


Fig. nr. 5.: Microimmunoelectroforeză.
Antigen: extract de ficat de cîine
în godeu, antiser: ser anti-ficat de
cîine. Colorare fuxină acidă pen-
tru proteine



Fig. nr. 6.: Microimmunoelectrofore-
za extractului de ficat, colorare
pentru punerea în evidență a ac-
tivității de beta-naftil-esterază.

Organele au fost omogenizate cu o cantitate egală de tampon fosfați M/15 avînd pH 7.2.

Emulsiile astfel obținute au fost amestecate cu volum egal de adjuvant Freund, preparat după formula utilizată de noi în alte experiențe (3).

Un număr de 12 iepuri cu greutate corporală între 2000—2500 g împărțiți în două loturi de câte 6 animale au fost imunizați cu câte 1 ml amestec antigenic, injectat în planta labelor de 6 ori la interval de 7 zile. Animalele au fost exsanguinate la 4—5 zile după ultima inoculare. Antiserurile le-am conservat cu mertiolat 0.01% la -10°C .

Prepararea antigenelor. Extractele au fost preparate la fel ca și pentru imunizarea animalelor. Trituratele au fost înghețate timp de 24 de ore apoi centrifugate la temperatura camerei timp de 60 min. cu 5000 t/min.

Supernatantul a fost folosit pentru imunoelectroforeză.

S-a aplicat metoda microimunoelectroforezei după *Backhaus* (1).

Punerea în evidență a alfa amilazei s-a făcut după metoda lui *Rahman*. Alfa amilazele degradează amidonul și astfel nu se colorează în albastru cu soluția Lugol. Preparatele microimunoelectroforetice sînt spălate și uscate, se așează timp de o oră într-o baie de amidon hidrolizat 0.25%, se spală cu apă și se tratează timp de 8—10 minute cu soluție Lugol.

Punerea în evidență a esterazelor după metoda lui *Uriel*: beta-naftil-esterazele degradează beta-naftil-acetatul și se eliberează beta-naftolul care intră în reacție cu sarea de diazoniu formînd azocolorantul.

Indoxil-esterazele: după hidrolizarea enzimatică a esterului grupările indoxilice se oxidează dînd albastru de indigo.

Rezultate

Antiserul anti-glandă salivară bovină, testată la imunoelectroforeză față de extractul de glandă salivară a dat mai multe arcuri de precipitare în zona alfa, beta și gama-globulinelor (fig. 1.). Prin colorarea preparatului de mai sus pentru punerea în evidență a activității alfa-amilazei se observă că enzima migrează și se precipită cu gama-globulinele (fig. 2.) Beta-naftil-esteraza și indoxil-esteraza de asemenea migrează cu gama-globulinele, dînd cîte un arc de precipitare în zona corespunzătoare (fig. 3 și 4).

Proteinele solubile ale extractului de ficat cu antiserul corespunzător formează mai multe arcuri de precipitare în zona alfa și beta-globulinelor (fig. 5). Prin colorarea beta-naftil-esterazei se obține o activitate enzimatică evidențiată prin două arcuri de precipitare, situate în zona alfa₂ și beta-globulinelor (fig. 6).

Discuții

Tehnica de caracterizare a enzimelor serice, după separarea lor imuno-electroforetică a permis individualizarea unui mare număr de enzime în serul sanguin, mai ales din grupa esterazelor. (*Uriel*, 1961). În cercetările noastre am reușit să caracterizăm din punct de vedere imunoelectroforetic unele enzime tisulare. În extractul de glandă salivară am pus în evidență activitatea amilazică în două linii de precipitare, corespunzătoare gama-globulinelor. Tot în această zonă am găsit o linie de precipitare cu activitate beta-naftil și indoxil- esterazică. Spre deosebire de glanda salivară, proteinele cu activitate beta-naftil esterazică din extractul de țesut hepatic migrează cu alfa₂ și beta-globulinele.

Confruntînd aceste rezultate cu datele lui *Uriel* (1961) referitoare la imuno-electroforeza esterazelor serice constatăm că beta-naftil-esteraza hepatică se comportă din punct de vedere electroforetic asemănător cu cea serică iar esteraza din glanda salivară se comportă diferit.

Concluzii

Examinând prin imunoelectroforeză unele enzime în extracte de organe s-au constatat următoarele:

În extractul de glandă salivară bovină activitatea amilazică beta-naftil și indoxil-esterazică este legată de gama-globulină. În extractul de ficat beta-naftil-esteraza migrează la electroforeză cu alfa₂- și beta-globulinele.

Sosit la redacție: 18 iunie 1968.

Bibliografie

1. BACKHAUS R.: Immunodiffusion und Immunelektrophoresis Veb Gustav Fischer Verlag, Jena und Akadémiai Kiadó, Budapest, 1967;
2. CORTNER J. A.: Biochem. Biophys. Acta (1967), 139, 107;
3. LUKÁCS E., LAPOHOS É., REICHEL C., SZABÓ ŞT.: St. Cerc. Fiziol. (1965), 10, 543;
4. RAHMAN A.: Nature (1965), 205, 973;
5. URIEL J.: Ann. Inst. Pasteur (1961), 101, 104.

