

3. Oznaczanie aktywności proteinazowej trypsyny

Niemal wszystkie reakcje zachodzące w organizmach żywych przebiegają przy udziale bardzo silnych i wyjątkowo specyficznych biokatalizatorów zwanych enzymami. Międzynarodowa Unia Biochemii zaproponowała w 1964 roku podział enzymów na 6 klas w zależności od katalizowanej reakcji. Do jednej z najliczniej reprezentowanej klasy enzymów zaliczają się hydrolazy (EC 3), katalizujące reakcje hydrolizy wiązań chemicznych występujących w związkach naturalnych. Przedmiotem niniejszego ćwiczenia będzie oznaczenie aktywności enzymatycznej bydlęcej β -trypsyny.

Główną podklasę hydrolaz stanowią enzymy uczestniczące w hydrolizie wiązań peptydowych. Są one określane ogólnym terminem peptydaz lub proteaz (EC 3.4). Ze względu na rodzaj substratu i położenie wiązania peptydowego ulegającego hydrolizie, proteazy można podzielić na dwie kategorie:

- a) egzopeptydazy, które katalizują reakcje hydrolizy wiązań peptydowych w małych peptydach i wymagają obecności wolnej *N*- lub *C*-końcowej grupy funkcyjnej,
- b) endopeptydazy (zwane też proteinazami), które wykazują aktywność enzymatyczną w stosunku do protein.

W zależności od mechanizmu działania proteinazy podzielono na cztery podgrupy: serynowe, cysteinowe, aspartylowe i metaloproteinazy.

Trypsyna należy do podgrupy proteinaz serynowych, w której bardzo ważną rolę odgrywa grupa hydroksylowa reszty Ser¹⁹⁵. Enzym ten hydrolizuje wiązania peptydowe jakie tworzą grupy karboksylowe reszt Arg i Lys. Enzym ten pełni szereg bardzo ważnych funkcji fizjologicznych. Jej niedobór a także nadmierne stężenie prowadzi do bardzo groźnych stanów patologicznych. Z tego też powodu w organizmach żywych funkcjonują bardzo sprawne mechanizmy kontrolujące poziom tego enzymu. Związkami, które zapobiegają niekontrolowanej proteolizie są powszechnie występujące w organizmach roślinnych i zwierzęcych inhibitory proteinaz serynowych (w tym i trypsyny). Inhibitory te są proteinami od 3 do ok. 700 kD. Zadaniem niniejszego doświadczenia będzie badanie zależności aktywności trypsyny od pH oraz oznaczenie kinetyki hamowania trypsyny przez inhibitor trypsyny wyodrębniony z nasion soi. Stosowana w doświadczeniu metoda oznaczania aktywności trypsyny polega na spektrofotometrycznym oznaczaniu *p*-nitroaniliny uwalnianej w czasie reakcji trypsyny z jej substratem, *p*-nitroanilidem benzoilo-D,L-argininy. Mierzona przy długości fali 410 nm absorpcja tego związku jest wprost proporcjonalna do aktywności trypsyny.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Spektrofotometr UV-Vis
2. Kuwety plastikowe
3. Roztwór trypsyny: 0,8 mg enzymu w 1 mL 1 mM roztworu HCl
4. Roztwór inhibitora: 0,25 mg w 1 mL wody
5. Roztwór substratu (*p*-nitroanilidu benzoilo-D,L-argininy) 5 mg w 1 mL DMSO
6. Bufory: 0,1 M bufor octanowy pH 4,0; 5,0; 0,1 M bufor fosforanowy pH 5,0; 6,0; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0; 8,0; 8,5; 9,0; 10,0
7. 30% kwas octowy
8. Probówki zwykłe szklane
9. Stoper
10. Pipety miarowe automatyczne 20-200 μ L

Wykonanie doświadczenia:

1. Badanie przybliżonej kinetyki hamowania aktywności trypsyny

Do 10 probówek zawierających po 2,5 mL buforu o pH 8,5 dodać: do pierwszej probówki (wzorzec) 50 μ L wody, do pozostałych po 50 μ L roztworu trypsyny. Następnie do probówek od 2 do 10 dodać możliwie w jak najkrótszym czasie następujące objętości roztworu inhibitora: 0 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 100 μ L (objętości dodawanego inhibitora przekonsultować z prowadzącym zajęcia). Po 15 minutach inkubacji do wszystkich probówek dodać po 50 μ L roztworu substratu, *p*-nitroanilidu benzoilo-D,L-argininy. Po kolejnych 15 minutach przerwać reakcje poprzez dodanie do wszystkich probówek możliwie jak najszybciej po 100 μ L 30% roztworu kwasu octowego. Za pomocą spektrofotometru UV-Vis zmierzyć absorbancję roztworów z poszczególnych probówek przy długości fali 410 nm, stosując jako odnośnik roztwór z probówki 1. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od objętości dodanego roztworu inhibitora.

UWAGA: Określić przybliżoną masę cząsteczkową inhibitora wychodząc z założenia, że reakcja przebiega według stechiometrii 1:1 i nieodwracalnie ($E + I \approx EI$) oraz połowa spadku aktywności trypsyny ($E_{410}(50\%)$) odpowiada połowie zablokowania trypsyny. Masa cząsteczkowa trypsyny wynosi 24000 D.

2. Oznaczanie zależności aktywności trypsyny od pH

Do 8 probówek dodać po 3 mL buforu o różnym pH oraz po 50 μ L roztworu trypsyny. Następnie, jak najszybciej dodać po 50 μ L roztworu substratu, *p*-nitroanilidu benzoilo-D,L-argininy. Po 10 min przerwać reakcję poprzez dodanie po 100 μ L 30% roztworu kwasu octowego.

Zmierzyć, jak poprzednio, absorbancję przy długości fali 410 nm (wykorzystać odnośnik z pierwszego doświadczenia).

Wykreślić krzywą zależności aktywności trypsyny od pH. Przedyskutować otrzymane wyniki.

Zakres materiału:

Klasyfikacja enzymów, zasada działania enzymów, mechanizmy inhibicji, sposoby regulacji aktywności enzymów, proteiny serynowe (trypsyna, elastaza, chymotrypsyna).