

TRIPSZIN AMIDOLITIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A tripszin mint szerin proteáz nemcsak peptid kötéseket képes hidrolizálni, hanem észter és amid kötéseket is. A gyakorlaton az amidolitikus aktivitását vizsgáljuk szintetikus szubsztráton: N α -benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA). E szubsztrát hidrolizise során p-nitroanilin szabadul fel, amely a szubsztráttól eltérő abszorbancia maximummal rendelkezik (405 nm-nél). Így fotométerrel követve az abszorbancia változását 405 nm-nél meghatározhatjuk a p-nitroanilin keletkezésének sebességét, amely arányos lesz a tripszin aktivitással. A p-nitroanilin extinkciós együtthatójának ismeretében ($\epsilon = 8270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) kiszámolhatjuk a tripszin aktivitást (1 IU= az az enzim mennyiség, amely 1 μmol szubsztrát átalakulását katalizálja 1 perc alatt).

Szükséges anyagok és eszközök:

- ✦ 1 mM BAPNA 50 mM TRIS-HCl pH7,5 1% dimetilszulfid pufferben (a BAPNA-t először DMSO-ban oldjuk fel 100 mM-os koncentrációban, és a TRIS pufferben tovább hígítjuk a kívánt koncentrációra)
- ✦ tripszin 2 mM HCl-ban feloldva (1 hétig stabil 4°C-on)
- ✦ szűkített 1cm-es küvetták
- ✦ spektrofotométer
- ✦ stopperóra

Mérési módszer:

A fotométert 405 nm-nél 1 ml BAPNA oldattal szemben nullázzuk. A reakciót tripszinnel indítjuk (mikropipettával többszöri fel- és leszívással belekeverjük az enzimet a szubsztrátba) és egyúttal indítjuk a stoppert is. 15 másodpercenként regisztráljuk az abszorbanciát 3 percen keresztül. A mérést kétszer végezzük: 20 és 40 μl tripszinnel.

	1	2	3
BAPNA (ml)	1	0.98	0.96
tripszin (ml)	0	0.02	0.04

Az eredmények értékelése:

	abszorbancia értéke az alábbi időpontokban													
CSŐ	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	ΔA	EA
2														
3														

A ΔA a 12 érték alapján kiszámított percenkénti abszorbancia változás, EA - az alábbi képletben definiált.

A két mérés alapján számítsuk ki az eredeti tripszin oldat enzim tartalmát IU/ml egységben figyelembe véve a p-nitroanilin extinkciós együtthatóját és az alkalmazott enzimoldat térfogatát. Az enzimaktivitás számításához a következő képletet használjuk:

$$EA = \frac{\Delta A \cdot f \cdot V}{\varepsilon \cdot l \cdot v_0}$$

EAenzim aktivitás (IU/ml)

ΔA abszorbancia változás (1/min)

f 10^6 (a mol \rightarrow μ mol átszámításhoz)

Va reakció elegy térfogata (l-ben)

εp-nitroanilin extinkciós együtthatója ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

la kűvetta hossza (cm)

v_0az enzimoldat térfogata (ml)