

## A TRIPSZIN AMIDOLITIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A tripszin, mint szerin proteáz nemcsak peptid kötéseket képes hidrolizálni, hanem észter, és amid kötéseket is. A gyakorlaton az amidolitikus aktivitást szintetikus szubsztrátot: N- $\alpha$ -benzoi-DL-arginin-p-nitroanilidet (BAPNA) alkalmazva vizsgáljuk. E szubsztrát hidrolízise során p-nitroanilin szabadul fel, amely a szubsztráttól eltérő fényabszorpciós maximummal rendelkezik (405 nm-nél). Így fotométerrel követve az optikai denzitás változását 405 nm-nél meghatározhatjuk a p-nitroanilin keletkezésének sebességét, amely arányos a tripszin aktivitással. A p-nitroanilin extinkciós együtthatójának ismeretében ( $\epsilon = 8270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) kiszámolható a tripszin aktivitása. (1 IU = 1  $\mu\text{mol}$  átalakított szubsztrát/perc).

### Szükséges anyagok és eszközök:

- 1 mM BAPNA - 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5 1% dimetilszulfoxid 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

### A kísérlet kivitelezése:

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 optikai denzitást 3 percen keresztül. A mérést kétszer végezzük el, először 20, majd 40  $\mu\text{l}$  tripszinnel.

küvettaszám	1	2	3
BAPNA (ml)	1	0,98	0,96
tripszin (ml)	0	0,02	0,04

**Eredmények értékelése:**

	extinkció értéke az alábbi időpontokban (mp)												
cső	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	$\Delta E$
2													
3													

$\Delta E$  = a 12 érték alapján kiszámított percenkénti extinkció változás átlaga.

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

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

A	enzim aktivitás (U/ml)
$\Delta E$	extinkció változás (1/min)
f	$10^6$ (a mól $\rightarrow$ $\mu$ mól átszámításhoz)
V	a reakcióelegy térfogata (l-ben)
$\varepsilon$	p-nitroanilin extinkciós együtthatója ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
l	a kűvetta hossza (cm)
$v_0$	az enzimoldat térfogata (ml)

Enzimaktivitás mérésére alkalmas fotométeren megfelelő faktort alkalmazva a készülékről is leolvashatjuk az enzimaktivitást.