

Результаты анализа контрольного образца (АМ) на титан хорошо совпадают с расчетными (ошибка  $\sim 3\%$ ). Интересно отметить, что кроме титана все образцы содержат определяемые количества алюминия, кальция, кремния и магния, содержание которых мы не рассчитывали. Во всех образцах обнаружен в микроколичестве марганец, а в креслане и полипропилене еще хром и олово.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kline, Gordon M., Analytical chemistry of polymers PI 345, Interscience, New York, 1959.
2. McGavack J., Rubber Age (N. I.), 60, 565 (1947).

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
5/X 1973

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. 23. KOIDE  
KEEMIA \* GEOLOOGIA. 1974, NR. 1

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 23  
ХИМИЯ \* ГЕОЛОГИЯ. 1974, № 1

УДК 557.156.3

H. HEINLO, V. PIHEL GAS, O. KIRRET

### TRÜPSIINI JA SOJAOAST ISOLEERITUD TRÜPSIINI INHIBIITORI ERINEVATE KAALULISTE VAHEKORDADEGA KOMPLEKSIIDE SEDIMENTATSIOONIST

Х. ХЭЙНЛО, В. ПИХЕЛГАС, О. КИРРЕТ. СЕДИМЕНТАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ТРИПСИНА И ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА ИЗ БОБОВ СОИ С РАЗНЫМИ СООТНОШЕНИЯМИ КОМПОНЕНТОВ

H. HEINLO, V. PIHEL GAS, O. KIRRET. SEDIMENTATION OF TRYPSIN AND SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR COMPLEXES WITH DIFFERENT WEIGHT RATIOS OF COMPONENTS

Viimastel aastatel on intensiivistunud ainevahetuses tähtsat osa omavate proteiinide interaktsiooni uurimine. Sobiva uurimisobjektina on mitmete teadlaste tähelepanu pälvinud trüpsiini (T) ja sojaoast isoleeritud trüpsiini inhibiitori (STI) kompleks (T-STI kompleks) [1-9]. T ja STI kui kahe bioloogiliselt aktiivse proteiini interaktsiooni *in vitro* võib esimeses lähenduses vaadelda kui loomises organismis proteolüütilise fermenti ja toiduga organismi viidud naturaalse inhibiitori vahel kulgeva protsessi lihtsustatud mudelit.

Huvipakkuvaks on siinkohal küsimus inhibiitori mõjust fermenti funktsionaalsusele viimase maksimaalse aktiivsuse korral. Meie varasemas töös [10] käsitleti T-STI komplekside autolüüsi, selgitamaks, millist toimet avaldab STI trüpsiini autolüüsi kulule ja kuidas muutub T kaseinolüütiline aktiivsus sõltuvalt T ja STI kaalulistest vahekordadest (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4). Selgus, et T-STI komplekside autolüüsil on komponendite vahekorra 1:1 puhul T kaseinolüütiline aktiivsus püsivam kui teiste vahekordade puhul.

Käesolevas uurimuses käsitletakse T-STI komplekside stabiilsust T ja STI erinevate kaaluliste vahekordade puhul T maksimaalse ja minimaalse aktiivsuse korral. Selle probleemi selgitamiseks kasutati proovide analüütilist ultratsentrifuugimist ja paberelektroforeesi.



## Metoodika

Reagentidena kasutati Spofa kristalset T-d ja Reanali STI-d. T ja STI proovid kaaluti vahekordades 8:1, 4:1, 1:1 ja 1:4, et leida T-STI komplekside sedimentatsioonikoefitsiendid nii ühe komponendi tunduva ühele kui ka komponentide võrdsete koguste korral. T-STI komplekside sedimentatsiooni analüüsi ultratsentrifuugil Spinco E. Tsentrifugimine toimus toatemperatuuril kiirusega 60 000 pöörat minutis ja kestis 60 minutit. Komponentid lahustati 0,1 M boraatpuhvril, mille pH=8,6, järgmistes kontsentratsioonides:

	T, mg/ml	STI, mg/ml
8:1 —	8,9	1,1
4:1 —	8,0	2,0
1:1 —	5,0	5,0
1:4 —	2,0	8,0
STI —	5,0 mg/ml	—

Ultratsentrifuugi küvetitesse asetati kõikidel kordadel ~0,8 ml uuritavat lahust. Sedimentatsioonikoefitsiendid arvutati valemi

$$S = \frac{2,303 (\lg x_2 - \lg x_1)}{\omega^2 (t_2 - t_1)} \text{ järgi}$$

kus  $\omega = 2\pi n$  ja  $n = 1000$  pöörat/sek.

Elektroforeesiks ettenähtud T ja STI proovid kaaluti samades vahekordades ning lahustati 0,1 M formiaatpuhvril, mille pH=3,2. Kasutati Carl Zeiss Jena horisontaalset seadet ja vatmanpaberit nr. 1 (4×30 cm). Elektroforees kestis 19 tundi, pinget oli 180 V. Paberile kantud proovide ruumala oli kõikidel kordadel 0,25—0,3 ml ja proteiinisaldus proovis ~2 mg. Elektroforegrammid värviti broomfenoolsinises lahuses.

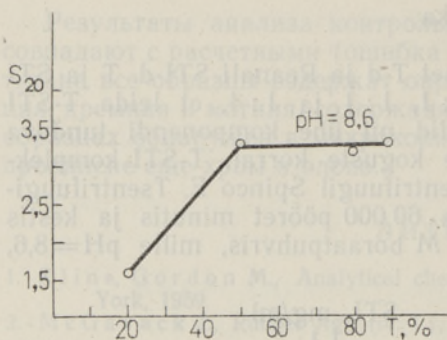
## Uurimistulemused ja arutelu

Andmed T-STI komplekside sedimentatsiooni kohta on esitatud tabelis ja joonisel. Neist selgub, et kui komponentide vahekord oli 8:1, 4:1 ja 1:1, siis moodustus T-STI kompleks. Nende proovide ultratsentrifuugimisel täheldati sümmeetrilist tippu, mille sedimentatsioonikoefitsient oli suurem kui kummalgi komponendil eraldi. Selgus, et kompleksi moodustumine või mittemoodustumine T ja STI segudes sõltub oluliselt T hulgast. Kompleks moodustub ainult siis, kui T on komponentide vahekorras ühele või STI-ga võrdses kaalulises koguses. STI tunduva ühele puhul (1:4) näitas sedimentatsiooni analüüs ainult monomeeri esinemist

T ja STI komplekside sedimentatsioonikoefitsiendid sõltuvalt komponentide vahekorrast segus

Komponentide vahekord	Proteiini kontsentratsioon, g/100 ml	T-sisaldus segus, %	$S_t$	$S_{20}$	Monomeer või dimeer
8:1	1	89	3,9	3,6	dimeer
4:1	1	80	2,94	3,4	dimeer
1:1	1	50	2,9	3,6	dimeer
1:4	1	20	1,24	1,52	monomeer
STI	0,5	—	1,37	1,59	monomeer





T-STI kompleksi sedimentatsioonikoefitsiendi sõltuvus T-sisaldusest segus.

saadud sedimentatsioonikoefitsient ühtus T-ga seostamata STI vastava koefitsiendiga.

Joonisel ja tabelis esitatud andmetest selgub, et T-STI kompleksi sedimentatsioonikoefitsient saavutas oma maksimaalväärtuse siis, kui T osahulk segus oli 50% või rohkem. T suuremate kontsentratsioonide puhul ei muutunud kompleksi sedimentatsioonikoefitsient oluliselt. Ülaltoodust järeldub, et pH=8,6 puhul moodustub püsiva koostisega T-STI kompleks bimolekulaarse assotsiatsioonina.

Saadud tulemused on heas kooskõlas E. Sheppardi ja A. D. McLaren'i andmetega [11] T-STI kompleksi sedimentatsiooni kohta. Meie poolt määratud STI sedimentatsioonikoefitsiendi absoluutväärtus erineb teatud määral neist, mis on avaldatud kirjanduses [11-14]. Selle erinevuse üheks põhjuseks võib olla V. Frattali [6], samuti D. B. S. Millari jt. [15] poolt täheldatud fakt, et sojaoast isoleeritud STI sedimenteerub ultratsentrifugimisel madalmolekulaarse vormina ( $M=8000$ ).

T-STI komplekside paberelektroforeesi tulemustest ilmses, et pH happelises piirkonnas on kompleksid vähestabiilsed ja dissotsieeruvad kergesti algkomponentideks. Selgelt eraldatavad komponendid saadi T tunduva ülehulga (8:1 ja 4:1) korral. T ja STI võrdsete koguste ning STI ülehulga puhul kulges proovi liikumine elektriväljas ainult ühe laialivalgunud fraktsioonina. T-STI komplekside dissotsiatsiooni pH happelises piirkonnas täheldati ka nende geelfiltratsioonil Sephadex' G-100 kolonnis, kus elueerimiseks kasutati formiaatpuhvrit (pH=3,2). Saadud tulemused kinnitavad väidet, et T-STI kompleks ei moodustu või dissotsieerub komponendid, kui pH on alla 3,2 [11].

Esitatud katseadmetest nähtub, et T-STI komplekside stabiilsuse ja püsiva koostise tagab leeliseliste pH-de kasutamine. See võimaldab ka usaldusväärsemalt ennustada inhibiitoriga seostunud T ensümaatilise aktiivsuse muutusi sõltuvalt T ja STI kaalulistest vahekordadest.

#### KIRJANDUS

1. Kunitz M., J. Gen. Physiol, **30**, 311 (1947).
2. Finkenstadt W. R., Laskowski M., Jr., J. Biol. Chem., **240**, PC 962 (1965).
3. Finkenstadt W. R., Laskowski M., Jr., J. Biol. Chem., **242**, 771 (1967).
4. Ozawa K., Laskowski M., Jr., J. Biol. Chem., **241**, 3955 (1966).
5. Haynes R., Feeney R. H., Biochemistry, **7**, 2879 (1968).
6. Frattali V., J. Biol. Chem., **244**, 274 (1969).
7. Frattali V., Steiner R. F., Biochem. Biophys. Res. Commun. **34**, 480 (1969).
8. Sealock R. W., Laskowski M., Jr., Biochemistry, **8**, 3733 (1969).
9. Niekamp C. W., Hixson H. F., Jr., Laskowski M., Jr., Biochemistry, **8**, 16 (1969).
10. Heinlo H., ENSV TA Toim., Keemia-Geoloogia, **21**, 176 (1972).
11. Sheppard E., McLaren A. D., J. Am. Chem. Soc., **75**, 2587 (1953).
12. Bier M., Terminiello L., Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., **41**, 239 (1952).
13. Rackis J. J., Anderson R. L., Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**, 230 (1964).
14. Yamamoto M., Ikenaka T., J. Biochem., **62**, 141 (1967).
15. Millar D. B. S., Willick G. E., Steiner R. F., Frattali V., J. Biol. Chem., **244**, 281 (1969).