

H. HEINLO, T. KLEEMEIER, O. KIRRET

TRÜPSIINI, SOJAOAST ISOLEERITUD TRÜPSIINI INHIBIITORI JA KASEIINI MÜÜGIL OLEVATE PREPARAATIDE KALTSIUMISISALDUS

X. ХЕЙНЛО, Т. КЛЕЕМЕЙЕР, О. КИРРЕТ. СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИЯ В КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ ТРИПСИНА, ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА ИЗ БОБОВ СОИ И КАЗЕИНА

H. HEINLO, T. KLEEMEIER, O. KIRRET. CALCIUM CONTENT IN COMMERCIAL REAGENTS OF TRYPSIN, SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR AND CASEIN

Et Ca stabiliseerib ja mõningatel juhtudel koguni suurendab trüpsiini (T) ensümaatilist aktiivsust, on juba ammu teada [1-7]. J. Northropi ja M. Kunitzi [8] andmetel pidurdab Ca juba küllalt väikestes kontsentratsioonides (0,02 m) inertse valguse teket. F. F. Nord ja M. Bier [9] on seisukohal, et Ca^{2+} takistab kahe T molekuli assotsieerumist, millega pidurdub $T_{ensüüm}-T_{substraat}$ komplekside moodustumine, s.o. T autolüüs. L. Gorini [1] andmetel moodustub Ca toimel aktiivne trüpsiini-kaltsiumi kompleks, mis autolüüsi suhtes on püsivam kui T ilma Ca-ta. M. Delaage ja M. Lazdunski [5] on arvamisel, et ensümaatilisel aktiivse T molekulis eksisteerib spetsiifiline Ca^{2+} -d siduv tsenter. L. Pudles ja D. Bachellerie [6] andmetel võimaldab Ca lisamine märgatavalt suurendada T reaktiveerumist trüpsiini-trüpsiini inhibiitori komplekside dissotsiatsioonil.

Selgitasime oma varasemas töös [10], mis käsitleb trüpsiini-sojaoast isoleeritud trüpsiini inhibiitori komplekside (T-STI kompleks) autolüüsi, et komponentide kaalulise vahekorra 1:1 juures ilmutab T kaseinolüütiline aktiivsus tendentsi suuremale püsivusele, ühel juhul koguni suurenemisele.

Käesolevas töös uuriti T-STI komplekside ja T kaseinolüütilise aktiivsuse määramisel kasutatud preparaate Ca-sisaldust spektrograafiliselt. Püüti selgitada, millisel määral mõjutab müügil olevates preparaatides lisandina leiduv Ca T ensümaatilist aktiivsust.

Metoodika

Preparaatide spektrograafiliseks uurimiseks kasutati E. Johannese [11] sigarimeetodit, mis sobib mikroelementide määramiseks suurema orgaanilise aine sisaldusega proovides. Ca-sisaldus määrati kvantitatiivselt sünteetiliste etaloonidega võrdlemise teel. Teiste elementide suhtelist sisaldust hinnati visuaalselt spektraaljoonte mustumise järgi. Kaseiini ja sojaoast isoleeritud trüpsiini inhibiitorit (STI) spektrografeeriti eelnevalt töötlemata, T proovid (1-3) tuhastati enne spektrografeerimist 700 °C juures, et neid rikastada Ca-ga.

Spektrite saamiseks kasutati spektrograafi KCA-1, kusjuures pilu oli 0,1 mm ja vahediafragma 5×6 mm. Proovid aurustati vahelduvvooluga 380 V ja 13 A abil. Spektrid registreeriti fotoplaadil УФС-3 20 GOST-i.

Sigarite HF aurudega töötlemise asemel kasutati fluorestseeriva spektrograafilise puhvrina polütetrafluoretüleen ja söepulbri segu vahekorras 1:1, millega analüüsitavad proovid lahjendati vahekorras 1:1. Sünteetilised etaloonid kontsentratsioonides 0,002—0,1 mg Ca valmistati puhverseguga täidetud sigarite immutamise teel etaloonlahustega (kaltsiumfosfaadi väävelhappelised lahused). Analüütilise joonena kasutati Ca joont 3179,3 Å, mille mustumist fooni suhtes mõõdeti mikrofotomeetriga МФ-1.

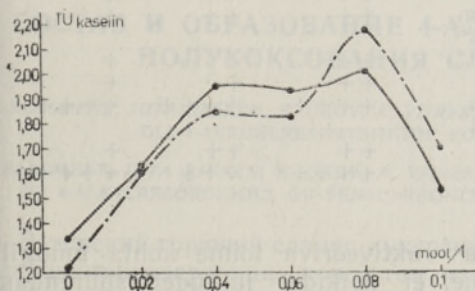
Ca-sisaldus määrati «Spofa» (Tšehhoslovakkia) kristallilise T, «Reanal» (Ungari) sojaoast isoleeritud trüpsiini inhibiitori (STI) ja sealsamas toodetud Hammarsteni kaseiini müügil olevates preparaatides. Spektrograafiliseks analüüsiks kasutati T uut ja vana partiid. Vanemast partiist (070666) võeti proovid kahest purgist (proov 1 ja 2), uuest partiist (010371) ainult ühest purgist (proov 3). STI (70051435) proovid võeti ühest ja samast purgist.

Et uurida Ca^{2+} toimet T ensümaatilisele aktiivsusele, kasutati preparaate 070666 ja 010371. T proovid (à 5,6 mg) lahustati 0,1 M TRIS-puhvris (pH=7,6) kuhu ettenähtud kontsentratsioonis oli lisatud veevaba CaCl_2 . Analüüsiks kasutati 0,1 ml eelnevalt TRIS-puhvris 1:10 lahjendatud lahust. Proovides määrati esmalt T preparaatide lähteaktiivsus ilma

Tabel 1

T, STI ja kaseiini Ca-sisaldus

Preparaat	Ca-sisaldus, %
T (070666), proov 1	0,029
T (070666), proov 2	0,029
T (010371), proov 3	0,037
STI	0,590
Kaseiin	0,077



Kaltsiumi mõju T proteolüütilisele aktiivsusele.

— — — — — T, partii 070666,
 — . — . — . — T, partii 010371.

CaCl_2 -ta, seejärel aga koos CaCl_2 -ga. Igas järgnevas proovis suurendati soola kontsentratsiooni 0,02 mooli võrra.

T proteolüütiline aktiivsus määrati Kunitzi kaseiini hüdrolüüsi meetodil [12]. Proovid inkubeeriti 20 minutiks temperatuuril 35,0°. Substraadina kasutatud Hammarsteni kaseiin lahustati 0,1 M TRIS-puhvris (pH=7,6).

Tulemused ja arutelu

Spektrograafilise analüüsi abil määratud preparaatide Ca-sisaldus on esitatud tabelis 1.

Tabelist selgub, et Ca-sisaldus on ühes ja samas T partiis ühesugune, eri partiides vähesel määral erinev. T-ga võrreldes on kaseiini Ca-sisaldus kaks korda suurem. Kõige rohkem on Ca STI-s: siin on ta sisaldus suurusjärgu võrra kõrgem kui teistes uuritud preparaatides.

Nende andmete alusel võib järeldada, et Ca küllaltki madal sisaldus T-s ja kaseiinis ei mõjuta kuigi oluliselt T proteolüütilist aktiivsust. Küll aga on alust arvata, et STI-s leiduv Ca kogus on küllaldane selleks, et säilitada või teatud tingimustes koguni tõsta T proteolüütilist aktiivsust. Ca mõju on tõenäoliselt maksimaalne, kui komponentide (T ja STI) vahekorrd on 1:1. See peegeldub T—STI komplekside aktiivsuste võrdlemisel

saadud andmetest [10]. Kui eeldada, et T—STI kompleks autolüüsi kestel või kaseinolüütilise aktiivsuse määramisel dissotsieerub, siis on võimalik, et Ca juuresolek soodustab T reaktiveerumist [6].

Uuritud preparaate spektraalanalüüs võimaldas neis ligikaudselt hinnata teiste elementide sisaldust (tab. 2). Torkab silma, et Ca ei ole ühegi analüüsitud preparaadi mineraalosa põhikomponent. Kaseiini mineraalosa põhikomponent on alumiinium, STI mineraalosa sisaldab alumiiniumi kõrval suuremas koguses vaske ja magneesiumi, T-preparaatide tuhk on rikas alumiiniumi ja magneesiumi poolest. Tuleb märkida, et tabelis 2 esinevatel elementidel puudub täielikult või esineb ainult vähesel määral Ca-le iseloomulik T-d stabiliseeriv ja aktiveeriv toime.

Tabel 2

Uuritud preparaate mineraalosa elementaarkoostise iseloomustus

Element	Kaseiin	STI	Tuhastatud T		
			Proov 1 (070666)	Proov 2 (070666)	Proov 3 (010371)
Na	—	+	++	++	+
Cu	+	~ 15 × rohkem kui kaseiinis	++	++	+
Ti	—	+	++	+	+
Fe	Jäljed	+	++	+	+
Al	++	~ 5 × rohkem kui kaseiinis	++++	++++	++++
Si	—	+	++	++	+
Mg	+	++	++++	+++	++++

Joonisel on esitatud andmed Ca^{2+} aktiveeriva toime kohta müügil olevatesse T-preparaatidesse. Näeme, et kõikidel juhtudel suurendas CaCl_2 lisamine T proteolüütilist aktiivsust, mis erinevates T partiides ilmnes erinevalt. Partiist 070666 võetud proovides tõusis aktiivsus esialgu intensiivsemalt. Kontsentratsiooni suurendamisel oli see suurem partiil 010371. Kui CaCl_2 kontsentratsioon oli 0,067—0,068 mooli/l, lõikusid T eri partiide aktiivsuskõverad. See näitab, et teatud kindla CaCl_2 kontsentratsiooni korral suurenes T eri partiidest võetud proovides proteolüütiline aktiivsus ühesugusel määral.

Ülaltoodust selgub, et juba küllalt väikesed erinevused Ca^{2+} kontsentratsioonis avaldavad märgatavat mõju T ensümaatiliste omadustele. Seega on alust väita, et ka müügil olevates preparaates (käsoleval juhul STI-s) sisalduv Ca mõjutab märgatavalt T proteolüütilist aktiivsust. See võib ühtlasi olla üheks põhjuseks, miks STI sobivas vahekorras juuresolek aitab autolüüsi kestel säilitada T ensümaatilist aktiivsust [10].

KIRJANDUS

1. Gorini L., Biochim. Biophys. Acta, 7, 318 (1951).
2. Bier M., Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., 33, 320 (1951).
3. Bier M., Terminiello L., Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., 41, 239 (1952).
4. Desnuelle P., In: Boyer P. D., Lardy H. and Myrbäck K. (editors), The Enzymes, N. Y., Acad. Press, 4, 1960, p. 119—132.
5. Delaage M., Lazdunski M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 390 (1967).
6. Pudles J., Bachellerie D., Arch. Biochem. Biophys., 128, 133 (1968).
7. Sipos T., Merkel J. R., Biochemistry, 9, 2766 (1970).