ارزیابی زیرلایه های ) بستر) طبیعی در مقابل سنتزی برای اندازه گیری فعالیتهای آنتی تریپتیک نمونه های سویا

**چکیده**

روش هضم ماده پنیری kunitz برای اندازه گیری فعالیت بازدارنده تریپسین عصاره های سویا برای بدست آوردن نتایج دقیق تر و بهره وری بیشتر مورد اصلاح قرار گرفته شد. این اصلاح شامل استفاده از 2% ماده پنیری (بجای 1%) و تبدیل ریاضی مقادیر خوانده شده جذب (A) در 280 mu به A3/2 می باشد. استفاده از زیرلایه سنتزی بنزویلdl آرگینینp نیترونیلید (BaPa) نشان دهنده روش خوب و قابل اعتمادی برای سنجش فعالیت بازدارنده تریپسین می باشد. تاثیر آخر را می توان بمیزان زیادی با برون یابی فعالیت ترپسین جبران کرد که بصورت تریپسین بازداری شده در هر ml عصاره به غلظت صفر بازدارنده بیان می شود. با اینکه , مجموعه ای از نمونه های سویا را می توان در درجه نسبی مشابهی از فعالیت بازدارنده با استفاده از ماده پنیر یا bapa رتبه بندی نمود , مقدار تریپسین بازداری شده بطور پایداری در زمان استفاده از bapa بعنوان زیرلایه بالاتر بوده است.

ماده پنیر بمیزان گسترده ای بعنوان زیرلایه برای اندازه گیری فعالیت بازدارنده تریپسین طبیعی استفاده می شود مانند سویا و سبزی. معمولترین روش بکارگیری ماده پنیر , اصولا روش kunits بوده که از تعیین طیف سنجی محصولات تفکیک شده با غلظت مشخص تریپسین در حضور و عدم حضور بازدارنده مشخص می شود. با اینحال , همانطور که توسط چندین محقق هم اشاره شده و بر اساس آزمایشات ما , این حقیقت نرخ هیدرولیز ماده پنیر بوسیله kunits قابلیت اعتماد این روش را کاهش داده و دارای مشکلات بهره وری می باشد , امری درست می باشد.

از سوی دیگر هیدرولیز تریپتیک زیرلایه سنتزی مانند بنزویل dl آرگینین p نیترونیلید (bapa) که اولین بار توسط Erlanger و همکاران معرفی شد از واکنش درجه صفر استفاده کرده و در محدوده وسیع بدست می آید و دارای رابطه ای خطی بین مقدار pنیتروآنیلین آزاد شده و غلظت آنزیم فعالیت می باشد. با اینکه bapa برای سنجش فعالیت آنتی تریپتیکی کسرهای سویایی مورد استفاده قرار می گیرد , ارزیابی مهم این تکنیک در آزمایش ما نشان داده که برخی مراقبتها را باید در تفسیر نتایج بدست آمده از این روش مد نظر قرار داد , بطور خاص اگر بخواهیم مقایسه های معنی داری بین یک نمونه سویا با نمونه دیگر انجام دهیم.

هذف مقاله جاری , توصیف مفصل اصلاح خاص روشیست که از ماده پنیر یا bapa استفاده کرده و بنظر می رسد برای حفظ قابلیت اعتماد و بهره وری داده ها در فعالیت بازدارنده تریپسین نمونه های سویا لازم است.

**آزمایش**

**فعالیت بازدارنده تریپسین با استفاده از زیرلایه ماده پنیر**

مواد. بافر فسفات  و 1.8g  در 900ml آب حل شده است. Ph 7.6 و حجم نهایی به 1 لیتر رسید.

محلول ماده پنیر (1 یا 2%) در 80ml بافر فسفات تعلیق شده و بطور کامل با گرم کردن بر حمام بخار بمدت 15 دقیقه حل شد. محلول ختک شده و با بافر به 100ml رسید و در زمانی که از آن استفاده نشده در یخچال نگهداری شد.

محلول تریپسین موجود: 4 تا 5 mg تریپسن با وزن دقیق در 100ml hcl .001M حل شد. این محلول را می توان در یخچال بمدت 2 تا 3 هفته نگهداری بدون افت قابل توجه فعالیت نگهداری کرد.

آماده سازی نمونه های سویا. نمونه های سویای رسیده که در آسیاب wiley خرد شده اند از صفحه 100 حلقه ای عبور داده شته و با 10vol اتر نفتی در دمای اتاق استخراج گردید . یک گرم آرد گندم در 19ml آب بحالت تعلیق درآمده و ph تعلیق تنظیم شده به 7و6 تنظیم شد. پس از تکانهای مکانیکی بمدت 1 ساعت تعلیق سانترفیوژ شده و 1ml محلول شناور بمیزان 50ml با بافر فسفات رقیق سازی شد. محتوای پروتئین عصاره رقیق شده با روش lowry و همکاران تعیین شد.

پروسه. منحجنی استاندارد تریپسین : .2 تا 1.0ml محلول تریپسین موجود در مجموعه های سه تایی لوله های آزمایش قرار داده شده (یک مجموعه برای هر تریپسین ) و حجم نهایی هر لوله به 2ml با بافر فسفات تنظیم شد. لوله ها در حمام آب در دمای 37C قرار داده شد. به یکی از لوله های سه تایی 6 ml اسید تریکلرواستات 5% اضافه گردید ؛ این لوله بعنوان لوله خالی در نظر گرفته شد ؛ 2ml محلول ماده پنیر , که قبلا به دمای 37C رسیده بود بمدت 20 دقیقه نگهداری شده و سپس واکنش با افزودن 6nl اسید تری کلرواستات 5% به لوله های آزمایش متوقف شد. پس از 1 ساعت نگهداری در دمای اتاق , تعلیق تصفیه شده و جذب صافی در 280mu در مقایسه با لوله خالی اندازه گیری شد.

فعالیت بازدانرده تریپسین : .2 تا 1ml عادی کننده عصاره سویا در مجموعه سه تایی لوله های آزمایش قرار داده شد (یک مجموعه برای هر عصاره) و حجم به 1.0 ml با بافر فسفات رسید؛ 1ml محلول تریپسین موجود به هر لوله اضافه گردید و لوله ها در حمام آب در دمای 37C قرار داده شدند . مراحل باقیمانده پروسه مشابه با پاراگراف قبلی می باشند.

بیان فعالیت. یک واحد تریپسین (TU) بطور دلخواه بعنوان افزایش .01 واحد جذب در 280um بمدت 20 دقیقه برای هر 10ml ترکیب واکنش تحت شرایط مجموعه چهارم تعریف شد. فعالیت بازدارنده تریپسین بعنوان تعداد واحدهای تریپسین بازداری شده (TUI) تعریف شد.

**فعالیت بازدارنده تریپسین با استفاده از زیرلایه bapa**

مواد. بافر تریس حاوی .02M cacl2:6.05g , آمینواتان تریس (هیدروکسیمتیل) و در 900ml آ ب حل شدند. Ph به 8.2 و حجم به 1 لیتر در آب تنظیم شد.

محلول bapa : 30mg bapa.hcl در 1ml دی متیل سولفوکسید حل شده و با بافر تریس از قبل گرم شده به دمای 37C رقیق شد. برای حل کل bapa در دی متیل سولفوکسید باید مراقب بود زیرا آثار کریستالهای حل نشده ممکن است بعدا در محلول ته نشین شوند. محلول bapaی تازه بصورت روزانه آماده شده و در دمای 37C نگهداری می شوود.

محلول تریپسین : روش ماده پینری را بینیند.

آماده سازی نمونه سویا. مشابه با روش ماده پنیر توصیف شده بوده با این تفاوت که آب برای رقیق سازی 1:50 عصاره سویای اصلی مورد استفاده قرار گرفت.

پروسه . منحنی استاندارد تریپسین: .2 تا 1.0ml محلول تریپسین خالص در مجموعه های سه تایی لوله آزمایش قرار گرفت و حجم با آب به 2ml رسید. لوله های آزمایش در حمام آب در دمای 37C قرار داده شد ؛ 1ml اسید استات 30% به یکی از لوله های آزمایش اضافه شده تا بعنوان لوله خالی در نظر گرفته شود. سپس به هر لوله 7ml محلول bapa اضافه شده که قبلا در دمای 37C گرم شد , و دقیقا 10min بعد واکنش بوسیله افزودن 1ml اسید استات 30% به هر لوله آزمایش متوقف گردید. پس از ترکیب کامل , جذب هر محلول در 410mu در برابر لوله خالی اندازه گیری شد.

فعالیت بازدارنده تریپسین : .2 تا 1.0ml عصاره سویا در مجموعه سه تایی لوله های آزمایش قرار گرفته شده و حجم نهایی به 1.0 ml آب رسید. 1ml محلول تریپسین موجود به هر لوله اضافه شد که سپس همانند روش پاراگراف قبلی اندازه گیری شد.

بیان فعالیت . یک واحد تریپسین (TU) بطور دلخواه بعنوان افزایش .01 واحد جذب در 410um در هر 10ml ترکیب واکنش تحت شرایط جاری انتخاب شد. فعالیت بازدارنده تریپسین بعنوان تعداد واحدهای تریپسین بازداری شده تعریف شد (TUI) .

**نتایج و بحث**

منحنی تریپسین استاندارد بدست آمده با استفاده از 1% محلول ماده پنیر (غلظت نهایی ماده پنیر در تریک حضم شده .5%) توسط kunits توصیف شده و در شکل 1a نشان داده شده است. در تلاش برای تبدیل این پاسخ دارای خطوط منحنی به نوع خطی , مقادیر خوانده شده جذب (a) به a3/2 بعنوان مقدار اصلی پیشنهادی miller و Johnson تغییر داده شد. با اینحال , قسمت بالای منحنی شکل 1a نشان می دهد که این انحراف از خطی بودن در سطوح بالاتر شرایط آنزیمی هم وجود دارد. از آنجایی که این اثر به غلظت زیرلایه محدودشده نسبت داده شده است , غلظت ماده پنیر به میزان 2% افزایش یافته است(غلظت نهایی در ترکیب هضم شده 1%) و نتیجه نهایی در شکل !b نشان داده شده است. تحت این شرایط رابطه خطی را می توان بین a3/2 و محدوده غلظت آنزیم بکار رفته در تحقیق , بدست آورد . حال این منحنی بدست آوردن مقادیر پایدار برای فعالیت خاص آماده سازی تریپسین در مقایسه با پروسه kunitz اصلی را ممکن می سازد (جدول 1) . پس با پروسه kunits , افزایش 5 برابری غلظت آنزیمی تقریبا باعث کاهش 50% در محاسبه فعالیت ویژه تریپسین می شود در حالی که مقادیر فعالیت ویژه بدست آمده با پروسه اصلاح شده در همان محدوده فعالیت آنزیمی نسبتا پایدار باقی می ماند.



شکل 1: منحنی تریپسین استاندارد. A) 1% ماده پنیر بعنوان زیرلایه b) 2% ماده پنیر بعنوان زیر لایه . منحنی a با ترسیم نقاط خوانده شده جذب (a) مستقیما از غلظت جذب بدست آمده است. منحنی a3/2 با تبدیل ریاضی مقادیر خوانده شده جذب بدست آمده است.

جدول 1 : فعالیت ویژه تریپسین با ماده پینر بعنوان زیرلایه



جدول 2 : تعیین فعالیت بازداری تریپسین عصاره سویا با ماده پنیر بعنوان زیرلایه



رابطه خطی بین نرخ هیدرولیز bapa و غلظت تریپسین گزارش شده توسط Erlanger و همکاران در تحقیق جاری تایید شده است (شکل 2) . بخاطر این رابطه خطی , فعالیت ویژه تریپسین ممکن است در هر سطح از تریپسین محاسبه شود حداقل در محدوده هاییی که این خطی بودن بطور تجربی برقرار باشد.

داده های و محاسبات مربوط به اندازه گیری فعالیت بازدارنده تریپسین نمونه سویای خام با استفاده از ماده پنیر (پروسه اصلاخ شده ) یا bapa در جدول 2 و 3 نشان داده شده است. می بینیم که در مورد ماده پینر , مقادیر فعالیت بازدارنده ترییپسین بر حسب tui در ml عصاره بیان شده و با سطح عصاره تست شده کاملا پایدار و مستقل می باشد. از سوی دیگر , اگر bapa زیرلایه باشد , فعالیت بازدارنده تریپسین بطور پیشرونده کم می شود یعنی همگام با افزایش سطح عصاره بازداری بعنوان تابعی از سطح عصاری سویا که در شکل 3 نشان داده شده است. مسلم است که وقتی ماده پنیر زیرلایه باشد , فعالیت بازدارنده تریپسین با نسبت مستقیم به سطح بازدارنده تا نقطه بازدارندگی 80% پیش می رود. وقتی bapa زیرلایه باشد , انحراف از خطی بودن در سطوح پائینتر بازداری شروع می شود حدودا در 55% . از اینرو اگر ماده پنیر بعنوان زیرلایه استفاده شود , فعالیت بازداری تریپسین که بر حسب هر واحد ml بیان می شود باید تا سطح تقریبی بازدارندگی 80% پایدار بماند در حالی که برای bapa فعالیت بازدارندگی نریپسین بطور پیشرونده با تجاوز بازداری از مقدار تقریبی 55% کاهش می یابد.

مقایسه فعالیت بازدارنده رسوب کریستالی بازدارنده تریپسین سویا kunitz با ماده پینر و bapa دارای اهمیت می باشد. همانند شکل 4 , بر خلاف عصاره خام , منحنی های مرتبط با بازداری درصد سطح بازدارنده برای دو زیر لایه یکسان است.



شکل 2: (چپ) منحنی اتریپسین استاندارد با استفاده از زیرلایه bapa

شکل 3: (راست) بازداری فعالیت تریپسین بعنوان تابعی از سطح عصاره سویای خالص با استفاده از ماده پنیر یا bapa . خطوط نقطه چین از نسبت خطی هر منحنی برون یابی شده اند.



شکل 4: بازداری فعالیت تریپسین بعنوان تابعی از سطح بازدارنده تریپسین سویا kunitz با استفاده از ماده پنیر یاbapa . خطوط نقطه چین از نسبت خطی منحنی برون یابی شده اند.

این حقیقت که فعالیت بازدارنده تریپسین در سطوح بالای غلظت بازدارنده از خطی بودن سرپیچی می کند به جدایی جزئی ترکیب تریپسین-بازدارنده نسبت داده شده است. از منحنی های شکل 3 برای عصاره خام بنظر می رسد که میزان این جدایی در مورد bapa بیش از ماده پنیر می باشد. دلیل این تفاوت آشکار جدایی روشن نیست زیرا ثابت جدایی (ki) ترکیب آنزیم-پیچیده باید مستقل از ماهیت زیرلایه باشد ک.ه در حقیقت با بازدارنده خالص شکل 4 نشان داده شده است. توصیف اثر بی قاعدگی زیرلایه بر ki عصاره خام احتمالا ناشی از این واقعیت است که عصاره خام حاوی چندین بازدارنده می باشد , هر یک ممکن است دارای یک مقد ار ki ویژه می باشند. مثلا , ki بازدارنده kunitz 2\*10-10M می باشد و ki بازدارنده aa brik 5.6\*10-8M گزارش شده است. نزدیکی تریپسین برای دو بازدارنده بیش از نزدیکی موجود برای زیرلایه های طبیعی ماننده ماده پینر می باشد بطوریکه بازداری الزاما غیر مقایسه ای است. در از سوی دیگر , زیرلایه های سنتزی دارای نزدیکی بیشتر برای تریپسین در مقایسه با پروتئین می باشند طوریکه مورد اول ممکن است با بازدارنده هریک از آنزیمهای آزاد در نمونه داده شده رقابت کند. پس با نزدیک شدن بیشتر مقدار km به ki بازدارنده aa می توان انتظار مشاهده نوع رقابتی بازدارندگی با این بازدارنده ها را داشت که ممکن است لزوما به بازدارنده kunitz نزدیک نباشند(frattali اخیرا گزارش کرده که تریپسین با بازدارنده aa بروشی غیر stoichiometric با تریپسین ترکیب می شودو منحنی مشابهی با شکل 4 بدست می دهد) . بنابراین می بینیم که حضور بازدارنده های دیگر غیر از kunitz در عصاره خام بطور مسلم بر نوع تصویر انرژی جنبشی چنین سیستم پیچیده ای اثرگذار است.

وقتی فعالیت بازدارنده تریپسین که توسط روش bapa تعیین شده بعنوان تابعی از سطح محلول بازدارنده تعیین می شود , همبستگی خطی منفی مانند شکل 5 دیده می شود. با تعمیم این منحنی به سطح صفر محلول بازدارنده , باید مقداری بدست آید که بمیزان بیشتری به فعالیت بازدارندگی عصاره سویا نزدیک می شود.



شکل 5: فعالیت بازدارنده تریپسین که بوسیله روش bapa در رابطه با سطح عصاره سویای خام تعیین شده است. منحنی از داده های ثبت شده در جدول iii رسم شده است. منحنی تعمیم یافته که با خطوط شکسته نمایش داده شده 0ml را در 54tui/ml تفسیر می کند.

اندازه گیری های بازدارنده تریپسین بر اساس عصاره هایی از انواع مختلف سویا انجان شده هم با پروسه های ماده اصلاح شده ماده پنیر و هم با روش bapa . در مورد دوم , تعمیم نموداری به بازدارنده صفر برای بدست آوردن فعالیت بازدارنده تریپسین بکار گرفته شده است. با اینکه بیان فعالیت بازدارنده تریپسین بر اساس واحدهای بازداری شده تریپسین دارای این مزیت است که فعالیت مستقل از درجه خلوص تریپسین می باشد می تواند برای اهداف مقایسه برای بیان فعالیت تریپسین بر اساس مقدار مطلق تریپسین بازداری شده نیز مفید باشد. این امر را می توان با اشاره به منحنی استاندارد جذب بر حسب غلظت تریپسین انجام داد. متاسفانه , اغلب آماده سازی های تجاری تریپسین کریستال خالص نیستند طوریکه لازم است از روشهای خالص سازی استفاده کنیم. در این تحقیق خلوص آنزیم بوسیله عیارگیری مکان فعال با استفاده انجام شده و مقدار آن 56% بوده است. بر این اساس , 1y تریپسین خالص باید دارای فعالیت 1.79tu در روش ماده پنیر و 1.90tu در روش bpa باشد. فعالیتهای بازدارنده های تریپسین نه نمونه سویا که برحسب y تریپسین خالص بازداری شده در هر mg پروتئین در عصاره خام گزارش شده است , در جدول iv گزارش شده است. فعالیت بازدارنده kunitz خالص شده برای مقایسه لحاظ شده است.

جدول iv مقایسه فعالیت بازدارنده تریپسین نمونه های سویا با استفاده از ماده پنیر و روشهای bapa



جدول iv نشان می دهد که چندین نوع از سویاهایی که تست شده اند را می توان بترتیب مشابهی بصورت مقدار صعودی فعالیت بازداری بدون توجه به روش ارزیابی مرتب سازی نمود. با اینحال شایان ذکر است که مقدار تریپسین بازداری شده با bapa بعنوان زیرلایه بطور پایداری بیش از (در حدود 25 تا 305) مقدار بدست آمده از زیر لایه ماده پنیر می باشد. تفاوتها بمیزان کمتری با بازدارنده kunitz خالص شده نیز دیده می شوند. با اینکه برای bapa , 1.02mg تریپسین با 1mg بازدارنده خالص می شود برای ماده پنیر این مقدار .89 می باشد. Laskowski در گزارش خود از بازدارنده های تریپسین اشاره کرده که محققین دیگری هم بدین نتیجه رسیده که بازداری تریپسین سویا همیشه بیش از زیرلایه های ترکیبی بوده است غیر از زیرلایه های پروتئین طبیعی. در تحقیق جدیدتری , fritz و همکاران یاداور شده اند که بازدارنده های پروتئینیاز بافتهای پستانداران , پدیده مشابهی را نشان داده که تا حدودی به دخالت تشکیل آنزیم ترکیب بازدارنده در نتیجه بازداری استقرایی ناشی از مولکولهای بزرگتر زیرلایه , نسبت داده شده است. اگر این اثر برای بازدارنده های سویایی هم درست باشدروش bapa باید میانه های دقیق تری از ارزیابی میزان بازداری واقعی سویا را ارائه دهد. این امر و سادگی پروسه , باعث شده تا روش bapa را برای روتین تعیین فعالیت بازدارنده تریپسین نمونه های سویا بپذیریم.