

ZASTOSOWANIE MIKROMETODY „AUXOTAB” W BADANIACH JAKOŚCIOWEGO I PÓLIŁOŚCIOWEGO OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ W ORGANACH I TKANKACH

Jerzy Morstin

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu
Dyrektor: prof. dr hab. Maciej Żurkowski

WSTĘP

Metoda „Auxotab”, opracowana i opatentowana we Francji [2], służyła początkowo do oznaczania aktywności enzymatycznej mikroorganizmów. Adaptowana została następnie do badań aktywności enzymatycznej w tkankach i organach [5-7]. Pozwala ona w sposób szybki, przy wykonaniu tylko jednej manipulacji, oznaczyć w bardzo małych fragmentach organów czy tkanek (rzędu grama, a nawet miligrama) aktywność szeregu enzymów jednocześnie.

Metoda ta może służyć do oznaczania aktywności enzymatycznej w sposób ilościowy, ponieważ barwną reakcję można sklasyfikować według skali natężenia barwy (zerowa, słaba, średnia, silna). Z powodzeniem znajduje też ona wykorzystanie do oznaczeń: obecności substancji inhibujących czy aktywujących działanie enzymów, wpływu różnych czynników (np. żywienia) na aktywność enzymatyczną w różnych organach ustroju, wreszcie zmian aktywności enzymatycznej w różnych stadiach rozwoju organizmu.

OPIS METODY

Urządzenie stanowi płytka o wymiarach 55×160 mm, składająca się z paska specjalnej bibuły, zamkniętego między dwoma (tych samych rozmiarów) prostokątami z masy plastycznej. Spodnia warstwa z masy plastycznej jest biała i nieprzezroczysta, górna — przezroczysta. Dwie warstwy masy plastycznej wraz z bibułą są spojone na gorąco w ten sposób, że spawy tworzą 10 zbiorniczków o objętości 0,1 ml każdy. Za pomocą dokładnie wykalibrowanej mikropipety zbiorniczki nasącza się substratami w roztworze metanolu. Podobnie jak przy reakcjach histo-

chemicznych, substrat dla każdego enzymu jest tak dobrany, aby z enzymem dawał reakcję barwną spontanicznie, albo spowodowaną dodaniem „wywoływacza”. Napełnianie zbiorniczków jest możliwe dzięki istnieniu otworków w wierzchniej części płytki plastikowej. Ilość każdego substratu jest określona i stała (10-50 mikrolitrów, w zależności od substratu). Po wkropleniu substratów do zbiorniczków i wysuszeniu płytki mogą być przez dłuższy czas przechowywane w temp. $\pm 4^{\circ}\text{C}$ i w pojemniku z pochłaniaczem wilgoci (niektóre substraty zachowują w tych warunkach trwałość przez rok i dłużej).

PRZEPROWADZENIE TESTU

W tabeli przedstawiono charakterystykę substratów i enzymów, których aktywność można oznaczyć za pomocą omawianej metody. Przed wykonaniem oznaczenia badaną tkankę lub organ należy rozetrzeć w homogenizatorze Patera z dodatkiem 1,5-2 ml buforu. Jeśli mamy do czynienia z płynem ustrojowym (nasienie, osocze krwi), należy go tylko wymieszać z buforem. Większość homogenatów sporządza się w środowisku o pH 7,5, używając buforu Tris HCl 0,1 M. W pozostałych przypadkach oznaczenie aktywności enzymów dokonuje się w środowisku pH 5,4, używając buforu cytrynianowego (0,1 M).

Do wykonania całej serii oznaczeń aktywności enzymów, reagujących z substratami w środowisku pH 7,5, wystarczy 1,5-2 ml buforu. W serii oznaczeń w środowisku pH 5,4 należy sporządzić minimum 0,5 ml roztworu.

Zbiorniczki napełnia się homogenatem, używając pipety Pasteura. Podczas wkraplania płynu do górnego otworu zbiorniczka, należy lekko nachylić płytkę. Następnie, po ułożeniu płytki na płasko, zbiorniczki uzupełnia się dodatkową kroplą homogenatu tkanki czy organu. Nadmiar roztworu, wydobywającego się dolnym otworem zbiorniczka, należy osuszyć za pomocą skrawka bibuły filtracyjnej.

Nasączone płytki inkubuje się w temp. 37°C w wilgotnym środowisku. W tym celu płytki umiejscawia się w nawilgoconych, zamkniętych pojemnikach i wstawia do termostatu. Inkubowanie trwa od godziny (przy dużej koncentracji enzymów w badanej tkance czy organie) do 24 godz. (przy bardzo słabej koncentracji). Najczęściej wystarcza 4-6 godz. inkubacji.

ODCZYTYWANIE WYNIKÓW

a. Zabarwienie spontaniczne. W przypadku obecności galaktozydazy (tab. poz. 10) i glukozamidazy (tab. poz. 17), dzięki uwolnie-

niu się nitrofanilu, substraty przyjmują samoistnie kolor żółty (w przypadku glukozomidazy po zakończeniu inkubacji można dodać kroplę NaOH w celu wzmocnienia reakcji).

b. Barwne indykatory. Fosfotazy zasadowe (tab. poz. 1) i kwaśne (tab. poz. 16) w obecności substratu fenoloftaleiny są wywoływane przez 1 N lub 0,1 N wodorotlenek sodu. W przypadku reakcji pozytywnej — substrat barwi się na czerwono.

c. Wywołanie za pomocą błękitu dwuazowego B. Aktywność wszystkich pozostałych enzymów można stwierdzić poprzez działanie błękitem dwuazowym B w rozcieńczeniu 1 : 2000 (świeżo przygotowanym). Uwolniony z substratów naftyl (na skutek hydrolizy) łączy się z solami dwuazowymi i daje reakcję barwną. W przypadku reakcji pozytywnych substraty stają się niebieskie lub czerwone, w zależności od enzymu. Jako porównanie testu służy zbiorniczek nasączony samym buforem z dodatkiem kilku kropli błękitu dwuazowego B. Przybiera on barwę żółtą.

W przypadku oznaczania enzymu glukuronidazy (tab. poz. 18) i glukozydazy (tab. poz. 19) w celu lepszego uwidocznienia reakcji dobrze jest po zakończeniu błękitu dwuazowego B dodać kroplę NaOH. Wywoławczem napełnia się zbiorniczki w ten sposób, aby jego nadmiar wydostał się przez dolny otwór.

Po przeprowadzeniu testu istnieje możliwość przechowywania płytek. Barwne reakcje zostają utrwalone we włóknach bibuły i zachowują swą trwałość przez długi czas, o ile nie są narażone na działanie światła.

DOKŁADNOŚĆ METODY

Czułość metody jest bardzo duża. Aby wykonać kompletny test aktywności enzymów wyszczególnionych w tabeli, wystarczy kilka miligramów świeżej tkanki. Oto kilka przykładów ilustrujących tę czułość.

Enzym	Substrat	Minimalna ilość wykrywalnego enzymu	Czas inkubacji (godz)
Trypsyna	BAPA	1 (μ /ml)	4
„	BANA	10^{-3} „	24
Chymotrypsyna	BPNE	10^{-4} „	2

Jeśli oznacza się aktywność enzymów typu trypsyny (np. w świeżej trzustce), wystarczy 1-2 mg tkanki w mililitrze, czyli 0,1-0,2 mg na zbiorniczek. Czas inkubacji w tym przypadku wynosi 18 godzin.

Aktywność enzymatyczna oznaczana metodą Auxotab

Lp.	Enzym	Substrat	Objętość substratu (ml)	Substancja wywołująca błękit dwuazowy	NaOH	pH
1.	Fosfataza alkaliczna	dwufosforan fenoloftaleiny 0,5%	40		x	7,5
2.	Fosfataza nie specyficzna	fosforan AsMx naftyli 1%	30			
		fosforan β -naftyli 1%	50	x	x	7,5
3.	Esteraza octanowa	octan β naftyli 1%	30	x		7,5
4.	Esteraza maślanowa	maślan β naftyli 1%	20	x		7,5
5.	Esteraza i lipaza laurynianowa	laurynian β naftyli 1%	30	x		7,5
6.	Esteraza i lipaza palmitynowa	palmitynian β naftyli 1%	30	x		7,5
7.	Esteraza i lipaza stearynowa	stearynian β naftyli 1%	40	x		7,5
8.	Esteraza i lipaza nonanowa	nonanian β naftyli 1%	30	x		7,5
9.	Esteraza i lipaza myrystynianowa	myrystynian β naftyli 1%	30	x		7,5
10.	Galaktozydaza	ortonitrofenyl galaktopyranozyd 1%	20	spontanicznie, żółty		7,5
11.	Aminopeptydaza alanilowa	DL alanyl β naftyloamid 1%	30	x		7,5
12.	Aminopeptydaza leucylowa	L leucyl β naftyloamid 1%	30	x		7,5
13.	Aminopeptydaza walinowa	waliny β naftyloamid 1%	30	x		7,5
14.	Trypsyna	N-benzoil DL arcinino-naftyloamid (BANA) 1%	30	x		7,5
15.	Chymotrypsyna	N-benzoil DL fenyloalaniny naftyloamid 1%	30	x		7,5
16.	Fosfataza kwaśna	dwufosforan fenoloftaleiny 0,5%	40		x	5,4
17.	Glukozaminidaza	β D glukozaminid 1%	20	spontanicznie, żółty	x	5,4
		Naftyl ASBI N acetyl β D-glukozaminid 1%	20	x	x	5,4
18.	Glukoromidaza	Naftyl AS glukuronid 1%	40	x	x	5,4
19.	Glukozydaza	6 bromo 2-naftyl β glucopyranoid 1%	40	x	x	5,4

Czułość metody dla fosfatazy zasadowej jest znacznie większa. Używając jako substratu fosforanu p-nitrofenolu, można stwierdzić aktywność tego enzymu przy stężeniu 10^{-3} μ /ml, inkubując tylko 1 godzinę.

OPIS PRZEPROWADZONYCH PRÓB

Autor artykułu zapoznał się z metodą Auxotab w Laboratorium Biologii Zwierząt Narodowego Instytutu Nauk Stosowanych (Institut National des Sciences Appliquées) w Villeurbanne k. Lyonu, we Francji i za pomocą tej metody wykonał kilka prób oznaczania aktywności trypsyny w nasieniu buhaja i królika. Pełne, ejakulowane nasienie nie wykazywało aktywności tego enzymu. Po wkropleniu natomiast do zbiorniczka odwirowanych i przemytych plemników aktywność ta ujawniła się. Po ponownym połączeniu osocza nasienia z plemnikami aktywność enzymu znów zanika. Za pomocą tego bardzo prostego testu pokazano, że w osoczu nasienia znajduje się inhibitor, unieczyniający trypsynę znajdującą się w powierzchniowych warstwach główki plemnika.

Trypsynogen, odgrywający rolę w procesie zapłodnienia komórki jajowej, uaktywnia się najprawdopodobniej w środowisku wydzieliny dróg rodnych samicy. Sprawę tę mogą wyjaśnić dalsze badania aktywności tego enzymu w czasie kapacytacji plemników w drogach rodnych samicy.

Zwiedzając wytwórníę płytek Auxotab (czerwiec 1973) uzyskano informacje o możliwości zakupu tego materiału. Cena jednej płytki (z 10 zbiorniczkami) wynosi około 0,30 franka francuskiego, czyli ok. 1,50 zł. Przy dużych dostawach można uzyskać pewną bonifikatę¹. Adres wytwórcy:

Auxotab
La Balame — les Grottes
38390 Montalieu — Varcieu
Francja.

PIŚMIENNICTWO

1. Breton B., Bonnet G., Nardon P., Laviolette P.: C. r. Acad. Sci. (Paris) 265, 161-164, 1967.
2. Buisnière J., Fourcard A., Colobert L.: C. r. Acad. Sci. (Paris), 265, 979, 1967.
3. Buisnière J., Nardon P.: Annls Inst. Pasteur, 115, 218-231, 1968.
4. Mehezo A., Laxiolette P.: Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 12, 383-396, 1972.
5. Nardon P., Plantevin G.: C. r. Acad. Sci. (Paris), 271, 2137-2140, 1970.
6. Nardon P., Plantevin G.: C. r. Acad. Sci. (Paris.), 271, 2350-2355, 1970.
7. Plantevin G., Nardon P.: Ann. Zool. Ecol. Anim. 4, 229-248, 1972.

¹ W roku 1974 firma Auxotab sprzedała patent firmie „Colab Laboratories Inc.” (USA). Z wiadomości uzyskanych poprzez Centralę Importowo-Exportową Chemikalií CIECH firma Auxotab ma podjąć produkcję ulepszonych płytek, fabrycznie nasyconych syntetycznymi substratami.

Ежи Морстин

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОМЕТОДА „АУКСОТАБ” В ИССЛЕДОВАНИЯХ
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

Резюме

Метод Ауксотаб, разработанный и опатентованный во Франции, позволяет быстро и лишь при одном приеме определять активность ряда энзимов одновременно в очень малых фрагментах органов или тканей. Этот метод успешно применяется для выявления наличия веществ тормозящих или активирующих действие энзимов, влияния разных факторов на энзиматическую активность, а также изменений энзиматической активности в разных стадиях развития.

Ввиду возможности применения этого несложного метода выявления энзимов в тканях и органах животных, приводится его подробное описание и дается список литературы.

Jerzy Morstin

APPLICATION OF THE "AUXOTAB" MICROMETHOD IN INVESTIGATIONS
ON QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION
OF ENZYMATIC ACTIVITY IN PARTICULAR ORGANS AND TISSUES

Summary

The Auxotab method, developed and patented in France, enables to determine quickly and at a single manipulation only the activity of a number of enzymes simultaneously in very small fragments of particular organs or tissues. It can be applied successfully for detection of substances inhibiting or activating the effect of enzymes, influence of different factors on enzymatic activity as well as on changes of the latter at particular development stages.

With regard to the possibility of application of this simple method of detection of enzymes in animal tissues and organs, its description, together with the list of literature, is given in the article.

Dr inż. Jerzy Morstin
Polska Akademia Nauk
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu
05-551 Mroków