

Proteaseaktivitätsbestimmung in Gewebshomogenaten und Extrakten mit Trinitrobenzolsulfonsäure

Von G. VALET

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie (Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt) München

(Eingegangen am 8. Juli 1971)

Am Beispiel des Rattenleberhomogenats wird eine Methode zur Proteaseaktivitätsbestimmung von Gewebshomogenaten und Extrakten beschrieben, die auf der Reaktion der proteolytisch freigesetzten Aminogruppen der Spaltpeptide mit Trinitrobenzolsulfonsäure beruht. Die Quantifizierung der Aktivität in internationalen Enzymeinheiten U kann ohne Standard oder Eichkurve durchgeführt werden. Die Färbung ist bei Raumtemperatur für 12 Std innerhalb $\pm 5\%$ des Ausgangswertes stabil. Die Nachweisgrenze für Proteaseaktivität betrug bei Rattenleberhomogenat 0,56 mU. Sie kann mit gereinigten Enzympräparationen auf 0,19 mU erniedrigt werden. Als methodischer Fehler bei 10 Aktivitätsbestimmungen vom gleichen Rattenleberhomogenat bei pH 4 ergab sich ein Variationskoeffizient von 4,9%.

The determination of protease activity in tissue homogenates and extracts with trinitrobenzenesulphonic acid

A method for the determination of protease activity is described, in which the free amino groups of the released peptides are reacted with trinitrobenzenesulphonic acid. The method was tested on rat liver homogenates and extracts. The enzyme activity can be quantified in international enzyme units without standards or a calibration curve. The colour is stable within $\pm 5\%$ of the starting value at room temperature for 12 h. The detection limit for protease activity in rat liver homogenate was 0.56 mU. This can be lowered to 0.19 mU with purified enzyme preparations. 10 separate determinations of activity in the same rat liver homogenate at pH 4 gave a variation coefficient of 4.9%.

Von LIN, MEANS und FEENEY wurde eine Methode zur Messung der Proteaseaktivität gereinigter Enzyme angegeben, bei der die aus N,N-dimethyliertem Casein-, Hämoglobin- und Gelatinesubstrat freigesetzten α -Aminogruppen der Spaltpeptide mit Trinitrobenzolsulfonsäure gefärbt werden (1). Sie hat gegenüber den Ansätzen nach ANSON (2), nach KUNTZ (3) oder der Bestimmung des Ninhydrin-positiven Materials nach MOORE und STEIN (4) den Vorteil, daß die gespaltenen Peptidbindungen quantitativ erfaßt werden.

Es wurde versucht, das Verfahren auf die Messung lysosomaler katheptischer Aktivitäten von Rattenleber- und Rattenmilzhomogenaten und Extrakten anzuwenden. Wegen der geringen Proteaseaktivität in diesen Geweben wurden mg-Mengen der Enzympräparation zum Nachweis proteolytischer Aktivitäten benötigt. Infolge der Anfärbung freier Aminogruppen von Begleitproteinen der Enzympräparation ergaben sich trotz dimethylierten Hämoglobinsubstrats hohe photometrische Absorptionswerte in den Kontrollansätzen, die keine reproduzierbare Aktivitätsmessung ermöglichten. Am Beispiel von Rattenleberhomogenat wird nachfolgend eine modifizierte Methode beschrieben, bei der die proteolytisch freigesetzten Aminogruppen der Spaltpeptide im Trichloressigsäureüberstand eines Ansatzes nach ANSON (2) mit der von LIN, MEANS und FEENEY (1) verwendeten Trinitrobenzolsulfonsäure angefärbt werden.

Methodik

Chemikalien

Trinitrobenzolsulfonsäure von EGA-Chemie, 7924 Steinheim und Serva, Heidelberg nach Reinigung über Norit A/Celite 535

(Serva) (5), Rinderhämoglobin nach ANSON von Serva, die übrigen Chemikalien wurden in Analysenqualität verwendet.

Geräte

Zum Herstellen der Protease- und Trinitrophenylierungsansätze wurden Brand-Dispenser-Dosiergeräte (Brand, 6980 Wertheim) benützt. Die Inkubationen wurden in einem verschließbaren Wasserinkubator (Köttermann, 3165 Häningsen) durchgeführt. Der Trichloressigsäureüberstand wurde mit einer Eppendorf-Mikroliter-Pipette entnommen. Die photometrischen Messungen wurden in einem Beckmann-DB-Zweistrahlfotometer bei 340 nm in Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt.

Homogenat

Die Homogenate wurden aus Lebern in Äthernarkose entbluteter weiblicher spezifiziert pathogenfreier Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht zwischen 95—105 g hergestellt. Die Organe wurden sofort nach der Entnahme mit 4 Gewichtsteilen 0,25M Saccharose, 3 mm CaCl_2 bei 0° in einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator mit Teflonkolben 3 Min. bei 1500 U./Min. homogenisiert und die Homogenate bei 4° aufbewahrt. Der Homogenatstickstoff wurde mit der Mikro-KJELDAHL-Methode nach CONWAY (6) bestimmt.

Lösungen

Als Inkubationspuffer für den Proteaseansatz wurde der Universalpuffer nach TEORELL und STENHAGEN (7) in doppelter Konzentration verwendet. Zur Trinitrophenylierungsreaktion wurde ein 2M Boratpuffer aus 123,7 g H_3BO_3 und 450 ml 2N NaOH Lösung je Liter Puffer hergestellt und bei etwa 60° aufbewahrt. Hämoglobin 5 mg/ml und Trinitrobenzolsulfonsäure 1 mg/ml wurden zu jedem Versuch neu gelöst. Trichloressigsäure wurde als 1,2M Lösung verwendet.

Proteaseansatz

Folgende Ansätze wurden im Eisbad hergestellt (siehe Tabelle). Alle Ansätze wurden 30 Min. bei 37° im Wasserbad inkubiert mit Ausnahme des „Nicht inkubierten Enzymansatzes“, der bei 0° gehalten wurde. Anschließend wurde das Protein aller Proben

Ansatz	Volumen (ml)	Bestandteile	Konzentration der Bestandteile	Konzentration der Substanzen im Ansatz, wenn nicht anders angegeben in mM
Proteolytischer Ansatz	1	Universalpuffer pH 2 bis pH 9		NaOH 45,7
	1	Hämoglobinlösung	5 mg/ml	Citronensäure 4,5
	1	Leberhomogenat	0,5 mgN/ml	H ₃ PO ₄ 6,9
				H ₃ BO ₃ 7,3
				HCl bei pH 2 48,8 bei pH 9 15,7
			Hämoglobin 1,67 mg/ml	
			Leberhomogenat 0,167 mgN/ml	
Inkubierter Enzymansatz	1	Universalpuffer pH 2 bis pH 9		Puffersalze wie oben angegeben
	2	Leberhomogenat	0,5 mgN/ml	Hämoglobin — Leberhomogenat 0,333 mgN/ml
Nicht inkubierter Enzymansatz	1	Universalpuffer pH 2 und pH 9		Puffersalze wie oben angegeben
	2	Leberhomogenat	0,5 mgN/ml	Hämoglobin — Leberhomogenat 0,333 mgN/ml
Substratansatz	1	Universalpuffer pH 2 und pH 9		Puffersalze wie oben angegeben
	2	Hämoglobinlösung	5 mg/ml	Hämoglobin 3,33 mg/ml Leberhomogenat —
Trinitrobenzolsulfonsäureansatz	1	Universalpuffer pH 5		Puffersalze wie oben angegeben
	2	Wasser		Hämoglobin — Leberhomogenat —

im Eisbad mit 1 ml 1,2M Trichloressigsäure gefällt und nach 10 Min. Wartezeit 10 Min. lang bei 3200 g abzentrifugiert. Für die nachfolgende Trinitrophenylierungsreaktion wurde aus allen Ansätzen jeweils 1 ml Überstand entnommen und damit wie folgt verfahren:

Trinitrophenylierungsansatz

Volumen (ml)	Bestandteile	Konzentration der Lösungen
1	Trichloressigsäureüberstand	
1	NaOH	0,35N
1	Boratpuffer pH 9	2M
1	Trinitrobenzolsulfonsäurelösung	1 mg/ml
	Inkubation: 1 Std. bei 37° im abgedunkelten Wasserbad	
10	Wasser	
1	HCl	2N

Aus den trinitrophenylierten Ansätzen wurde die Proteaseaktivität folgendermaßen bestimmt:

Proteaseaktivitätsbestimmung

Die Proteaseaktivität der Enzympräparation mit dem zugesetzten Substrat Hämoglobin wurde als externe Aktivität bezeichnet und als Absorptionsdifferenz zwischen ‚Proteolytischem Ansatz‘ und einer Mischung gleicher Volumina ‚inkubierten Enzym‘ und ‚Substratansatzes‘ im Photometer bestimmt. Die Aktivität der Proteasen in der Enzympräparation gegen die Begleitproteine wurde als interne Aktivität bezeichnet und als Absorptionsdifferenz zwischen ‚inkubiertem‘ und ‚nicht inkubiertem Enzymansatz‘ gemessen. Die Konzentration der nicht fällbaren freien Aminogruppen in der Enzympräparation als Maß für die Konzentration freier Aminosäuren und Peptide im Lebergewebe wurde durch Messen des ‚nicht inkubierten Enzymansatzes‘ gegen den ‚Trinitrobenzolsulfonsäureansatz‘ bestimmt. Die externe und interne Proteaseaktivität der Enzympräparation wurde aus den gemessenen Absorptionsdifferenzen in Enzymeinheiten U/mg Stickstoff ausgerechnet, wobei 1 Einheit U derjenigen Enzymaktivität entspricht, die in einer Minute bei 37° 1 µMol Aminogruppen freisetzt. Folgende Formel wurde dazu verwendet:

$$\text{Proteaseaktivität} = \frac{\Delta E \cdot b \cdot 10^6}{d \cdot \epsilon \cdot t \cdot a} \quad (\text{U/mgN})$$

Die nicht fällbaren freien Aminogruppen in der Enzympräparation wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Freie Aminogruppen} = \frac{\Delta E \cdot b \cdot 10^6}{d \cdot \epsilon \cdot a} \quad (\mu\text{Mol/mg N})$$

ΔE = Extinktionsdifferenz zwischen Meß- und Vergleichsansatz, $\lambda = 340 \text{ nm}$.

ϵ = Molarer Absorptionskoeffizient der trinitrophenylierten freien Aminogruppen $\epsilon = 13500 \text{ (Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2)$ bei 340 nm.

d = Küvettschichtdicke (cm), $d = 1 \text{ cm}$.

t = Dauer der Proteaseinkubation (Min.), $t = 30 \text{ Min.}$

a = Menge der Enzympräparation im Trinitrophenylierungsansatz in Form des Trichloressigsäureüberstandes (mgN).

$a = 0,125 \text{ mgN}$ für die externe Aktivität.

$a = 0,250 \text{ mgN}$ für die interne Aktivität und die freien Aminogruppen.

b = Volumen des Trinitrophenylierungsansatzes (l), $b = 0,015 \text{ l}$.

Die Ninhydrinfärbung wurde nach MOORE und STEIN (4) und die Färbung mit dem Phenolreagenz nach LOWRY, ROSEBROUGH, FARR und RANDALL (8) durchgeführt. Zur Bestimmung der mittleren Länge der Spaltpeptide in Aminosäureresten pro Peptid wurden die Trichloressigsäureüberstände aller Ansätze nach HIRS, MOORE und STEIN (9) alkalisch hydrolysiert, und sodann trinitrophenyliert. Die photometrischen Absorptionsdifferenzen dieser Ansätze wurden wie unter ‚Proteaseaktivitätsbestimmung‘ beschrieben gemessen und als hydrolysierte externe und interne Aktivität bezeichnet. Die mittlere Länge der Spaltpeptide wurde aus dem Quotienten von hydrolysierte zu unhydrolysierte externer und interner Aktivität ausgerechnet.

Ergebnisse

Die Abbildung 1 zeigt die pH-abhängigen Proteaseaktivitätskurven von Rattenleberhomogenat mit Aktivitätsmaxima bei pH 3,3.

Zum Vergleich der verschiedenen Aktivitätsbestimmungsmethoden für Proteasen wurden von den Tri-

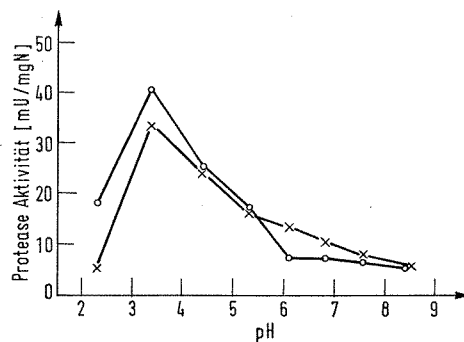


Abb. 1

Externe Proteaseaktivität von Rattenleberhomogenat gegen Rinderhämoglobin (o—o), sowie interne Proteaseaktivität (x—x) gegen Begleitproteine der Enzympräparation. Das pH wurde im Proteaseansatz gemessen und blieb während der Inkubationszeit unverändert. Die Aktivität ist in mU freigesetzte Aminogruppen pro mg Homogenatstickstoff angegeben.

chloressigsäureüberständen desselben Proteaseansatzes Aktivitätsbestimmungen nach ANSON (2) und nach KUNITZ (3), sowie Ninhydrin- (4) und Trinitrophenylierungsreaktionen durchgeführt. Die photometrischen Aktivitätswerte wurden auf 1 ml Trichloressigsäureüberstand bezogen und sind zusammen mit den mittleren Längen der Spaltpeptide in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1

Vergleich der nach verschiedenen Verfahren gemessenen Proteaseaktivität von Rattenleberhomogenat bei pH 3 pro ml Trichloressigsäureüberstand und der mittleren Längen der Spaltpeptide für externe und interne Aktivität

TBS = Trinitrobenzolsulfonsäure; MPL = Mittlere Länge der Spaltpeptide (Anzahl der Aminosäurereste)

Methode	Externe Aktivität ΔE	Interne Aktivität ΔE
ANSON	1,64	2,16
KUNITZ	0,10	0,04
Ninhydrin	1,06	5,77
TBS	1,65	4,20
MPL	4,0	1,6

Die Methode nach KUNITZ (3) ist wenig empfindlich. Die Ninhydrinfärbung ist für die von interner Aktivität gebildeten kurzkettigen Peptide empfindlicher (5), für die durch externe Aktivität entstehenden länger-kettigen Peptide unempfindlicher als die Trinitrophenylierungsreaktion. Der Ansatz nach ANSON (2) zeigt die umgekehrte Tendenz. Das entspricht insofern

der Erwartung, als äquimolare Peptidmengen zunehmender Kettenlänge durch Ninhydrinreagenz schwächer (9), durch LOWRY-Reagenz intensiver gefärbt werden (8). Die Trinitrobenzolsulfonsäurefärbung ergibt die einheitlichsten Aktivitätswerte, weil die molaren Absorptionskoeffizienten trinitrophenylierter α - und ϵ -Aminogruppen von Peptiden von deren Kettenlänge weitgehend unabhängig sind (10). Die Trinitrobenzolsulfonsäurefärbung ist bei Raumtemperatur mit einer Abweichung von maximal $\pm 5\%$ des Ausgangswertes für mindestens 12 Stdn. stabil, während für die LOWRY- und Ninhydrinfärbung nach 12 Stdn. nur noch 80% bzw. 60% der Ausgangswerte gemessen wurden.

Als methodischer Fehler für 10 Bestimmungen von Proteaseaktivität bei pH 4 und nicht fällbaren freien Aminogruppen vom gleichen Leberhomogenat wurden Variationskoeffizienten von 4,9% und 2,1% gefunden.

Die Nachweisgrenzen für Proteaseaktivität von Rattenleberhomogenat lag bei 0,56 mU, bei gereinigten Enzympräparationen können unter Weglassen der Wasserverdünnung der trinitrophenylierten Ansätze vor dem Ansäuern Proteaseaktivitäten bis 0,19 mU nachgewiesen werden.

Herrn Prof. Dr. G. RUHENSTROTH-BAUER bin ich für fortwährende Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Fr. SUSAN MITCHELL möchte ich für ausgezeichnete technische Assistenz danken.

Literatur

1. LIN, Y., G. E. MEANS und R. FEENEY, *J. biol. Chemistry* 244 789 (1969). — 2. ANSON, M. L., *J. Gen. Phys.* 22 79 (1939). — 3. KUNITZ, *J. Gen. Phys.* 30 291 (1946/47). — 4. MOORE, S. und W. H. STEIN, *J. biol. Chem.* 211 907 (1954). — 5. SATAKE, K., T. TAKE, A. MATSUO, K. TAZAKI und Y. HIRAGA, *J. Biochem.* (Tokyo) 60, 654 (1966). — 6. CONWAY, E. J. und E. O'MALLEY, *Biochem. J.* 36, 655 (1942). — 7. TEORELL, T. und E. STENHAGEN, *Biochem. Zschr.* 299, 419 (1938). — 8. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951). — 9. HIRS, C. H. W., S. MOORE, W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* 219, 623 (1956). — 10. SATAKE, K., T. OKUYAMA, M. OHASHI und T. SHINODA, *J. Biochem.* (Tokyo) 47, 654 (1960).

Dr. G. Valet
MPI f. Biochemie
8000 München 15
Goethestr. 31

