

Departamento de Química Microbiana
Instituto Pasteur
París

Estudio immunoquímico y electroforético de la degradación enzimática de la ovoalbúmina*

por

María Kaminski y Olga Gutiérrez**

En los estudios que hemos efectuado sobre las degradaciones que experimenta la ovalbúmina como consecuencia de la acción de diversas enzimas proteolíticas, entre las cuales utilizamos la pepsina, tripsina, quimotripsina y las proteasas de *B. subtilis*, haciendo variar las condiciones de la proteólisis, hemos podido observar que la ovalbúmina nativa es atacada por todas las enzimas empleadas. Estudiamos los productos de la degradación enzimática por los métodos de electroforesis en gelosa, inmunolectroforesis, según la técnica de Grabar y Williams, y por la precipitación específica con suero anti-ovalbumínico.

En todas nuestras experiencias hemos utilizado soluciones de ovalbúmina en concentraciones de 10 y 20 mgrs. por ml. a las que hemos adicionado la enzima correspondiente, ajustando luego el pH de las soluciones así obtenidas.

En el caso de la pepsina, trabajamos con concentraciones que varían de 0,001 a 1 mg. por 100 mg. de substracto, a distintas condiciones de pH: 3,5 4, 6 y 8, dejando actuar la enzima durante 4 horas a una temperatura de 37 °C.

* Comunicación 5-1 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo, 1959.

** Becaria de la Universidad Nacional de Buenos Aires, del Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública.

Delegada de la República Argentina ante las V Jornadas Bioquímicas Latinas.

Estas experiencias nos permitieron comprobar que si bien la pepsina ataca la ovalbúmina, no produce la escisión del motivo antigénico.

La tripsina y la quimotripsina atacan la ovalbúmina, pero con la condición de utilizar cantidades suficientemente elevadas de enzimas.

Nosotros empleamos soluciones cuyas concentraciones variaban de 8,33 a 50,00 mg. de tripsina por 100 mg. de substracto y entre 1,66 y 66,66 mg. por 100 mg. de substracto para la quimotripsina; utilizando para estas dos enzimas, un pH de 5 y 8, a una temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Tanto la tripsina como la quimotripsina producen la escisión del motivo antigénico en dos constituyentes diferentes, como puede observarse en los ejemplos que presentamos a continuación sobre el estudio electro e inmunolectroforético de la degradación por una de estas enzimas: la quimotripsina; en los que puede observarse los distintos estados de esta degradación y los porcentajes de los productos no precipitables por el ácido tricloroacético (fig. 1).

En una primera etapa puede verse la formación de una línea única anterior a la escisión del motivo antigénico, que corresponde a 20 % de productos no precipitables, produciéndose luego la escisión con la formación de dos líneas, que se presentan al principio poco definidas, haciéndose luego su separación bien neta con un 48 % de productos no precipitables por el ácido tricloroacético. En una última etapa se observa la subsistencia de una sola línea.

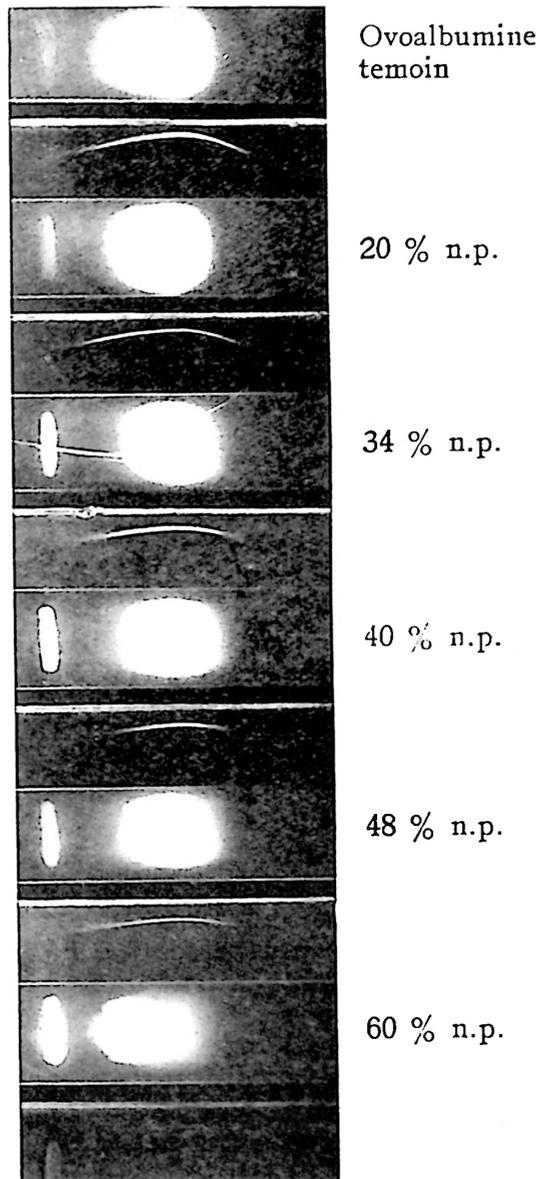
Hemos trabajado con soluciones de subtilisina de Odessen y con distintas soluciones de proteasas del *B. subtilis* obtenidas por las técnicas comunes de cultivos de cepas proteolíticas del Instituto Pasteur de París, que varían de 0,16 a 33,32 mg. por 100 mg. de substracto a pH 5 y 8 durante 24 y 48 horas a 37 °C de temperatura.

Comprobamos que también hay una acción de degradación enzimática del substracto y en algunos casos observamos además la escisión del motivo antigénico.

Podemos decir que los productos de degradación, que hemos obtenido por la acción enzimática en el transcurso de nuestras experiencias, conservan las propiedades inmunoquímicas y en ellos no hemos observado modificaciones electroforéticas netas.

El trabajo que nosotros presentamos a la consideración de este Congreso demuestra el interés de la utilización de estos métodos para el estudio de la degradación enzimática de las proteínas ya que permiten comprobar modificaciones que los métodos clásicos no siempre demuestran, en particular aque-

llos que se refieren a las modificaciones de las propiedades antigénicas.



Degradación de la ovoalbumina por la quimotripsina.

Resumen

Nous avons étudié par électrophorèse en gélose, immun-électrophorèse et précipitation spécifique avec le sérum anti-ovalbumine, les modifications subies par l'ovalbumine après dégradation avec divers enzymes protéolytiques : pepsine, trypsine, chymotrypsine et protéase du *B. subtilis* en faisant varier les conditions de la protéolyse et nous avons constaté que l'ovalbumine native est attaquée par tous les enzymes étudiés.

La pepsine ne produit pas la scission du motif antigénique.

L'ovalbumine est attaquée aussi par la trypsine et la chymotrypsine à condition d'utiliser des quantités d'enzymes assez élevées et produisent la scission du motif antigénique.

Nous avons travaillé avec divers solutions d'enzyme protéolytique du *B. subtilis* et dans quelques cas nous avons observé aussi la scission du motif antigénique.

Les divers produits de dégradations enzymatique que nous avons obtenu conservent leurs propriétés immunochimiques et nous n'avons pas observé modifications électrophorétiques nettes.

Le travail que nous présentons à ce Congrès montre l'intérêt d'utiliser ces méthodes pour l'étude de la dégradation enzymatique des protéines car elles permettent de constater modifications que les méthodes classiques ne démontrent pas toujours, en particulier des modifications des propriétés antigéniques.

Summary

Immunochemical and electrophoretic study of the enzymatic degradation of ovoalbumine.

We have studied the modifications experimented by the substrate, after degradation by various proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, chymotrypsin, *B. subtilis*' protease) on different proteolysis conditions.

The various products of degradation thus obtained have been studied by electrophoresis in gelose, immunoelectrophoresis and specific precipitation with antiovoalbumine serum. The natural ovoalbumine is hydrolyzed by all the enzymes studied, even trypsin and chymotrypsin, on condition high quantities of enzyme are used.

The trypsin and chymotrypsin produce the cleavage of the antigenic substance in two different components, while pepsin does not. None of the enzymes studied produce great intermediary fragments between the initial molecules and the final products.

This paper shows the interest of utilising these methods in the study of enzymatic degradation of proteins, as they allow the verifications, which the classic methods do not always show, principally the antigenic properties modifications.