

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 269 204

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 1123-88.L
(22) Přihlášeno 23 02 88

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 06 11 90

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/534

(75)

Autor vynálezu

ŠAFAŘÍK IVO ing., CSc., ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54)

Způsob přípravy nerozpustných značených
substrátů pro stanovení proteolytické
aktivity

(57) Příprava nerozpustných značených
substrátů pro stanovení proteolytické
aktivity podle řešení se provádí zapo-
lymerováním značených bílkovin do
struktury polyakrylamidu.

Vynález se týká způsobu přípravy nerozpustných značených substrátů pro stanovení proteolytické aktivity.

Pro stanovení aktivity proteolytických enzymů je možno použít celou řadu substrátů. Mezi nimi významné místo zaujímají nerozpustné bílkovinné značené substráty. Mezi ně patří například kožní prášek s navázanou Remazolovou brilantní modří, elastin s navázanou kongo červení, fibrin obarvený indigokarmínem, želatina zesítěná glutaraldehydem v přítomnosti nigrosinu, želatina značená fluoresceinem a navázaná na Sepharosu 4B, kolagen značený ^{14}C nebo síťované bílkoviny s kovalentně navázaným reaktivním barvivem.

Dosud používané způsoby přípravy nerozpustných značených bílkovinných substrátů pro stanovení proteolytické aktivity spočívají v tom, že se na přirozenou nerozpustnou bílkovinu (například kolagen, keratin, elastin, fibrin) kovalentně nebo adsorbcí naváže vhodná značka, nebo se běžné rozpustné bílkoviny v roztoku zesítí bifunkčním činidlem, přičemž se vytvoří nerozpustné síťované bílkoviny, na které se v druhém stupni kovalentně nebo adsorbcí naváže vhodná značka. Další možností je, že se v roztoku bílkoviny suspenduje nebo rozpustí vhodná značka a potom se provede zesíťování bílkoviny vhodným bifunkčním činidlem; značka je zabudována do struktury nerozpustné bílkoviny. Je také možné značenou rozpustnou bílkovinu navázat na vhodnou matici. Deriváty kaseinu je možné tepelným zásahem převést na nerozpustnou formu.

Způsob přípravy nerozpustných značených substrátů pro stanovení proteolytické aktivity podle vynálezu spočívá v tom, že se značená bílkovina zabuduje do struktury polyakrylamidu. Vzniklý produkt se převede na jemné částice, která se důkladně promyje vodou a organickými rozpouštědly a potom se usuší. Působením proteolytických enzymů se ze zabudované bílkoviny odštěpují značené peptidy, jejichž množství je úměrné aktivitě proteinasy, a je možné je stanovit například spektrofotometricky, fluorimetricky nebo radiometricky, po odfiltrování nebo odstředění nerozloženého nerozpustného substrátu.

Vynález je dokumentován příklady.

Příklad 1

Na kasein se kovalentně naváže reaktivní barvivo dichlorotriazinového nebo monochlorotriazinového typu (například Ostazinová červen S-5B, Ostazinová modř S-2G nebo Ostazinová modř H-5R) podle standardního postupu. 5 g značeného kaseinu se rozpustí v 70 ml 10% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Po rozpuštění se přidá 28,8 g akrylamidu a 1,2 g N,N'-metylen-bis-akrylamidu. Po rozpuštění se objem roztoku upraví na 100 ml, roztok se odvzdušní a přidá se 1,5 ml 10% persíranu amonného a 150 μl N,N,N',N'-tetramethylenethyldiaminu (TEMED). Po promíchání se směs ponechá polymerovat. Po 24 hodinách se vzniklý gel rozkrájí na malé kousky a homogenizuje se v nožovém mixeru. Jemné částice gelu se zabudovanou značenou bílkovinou se na fritě promyje důkladně vodou a etanolem a usuší se při laboratorní teplotě.

Příklad 2

Do zkumavek se naváže po 70 mg substrátu, připraveného podle bodu 1. Přidají se 3 ml vhodného pufru a substrát se ponechá bobtnat při pracovní teplotě po dobu 20 min. Potom se do zkumavek přidá po 1 ml roztoku obsahujícího proteinasy a směs se protřepe. Po vhodné dlouhé inkubaci (například 30 min při 37 až 50 °C) se substrát odfiltruje nebo odstředí a filtrát nebo supernatant se proměří při vhodné vlnové délce (520 nm pro Ostazinovou červen S-5B, 590 nm pro Ostazinovou modř H-5R nebo 620 nm pro Ostazinovou modř S-2G). Trypsin bylo možno úspěšně stanovit v rozsahu koncentrací 0,1 až 10 $\mu\text{g/ml}$.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy nerozpustných značených substrátů pro stanovení proteolytické aktivity, vyznačující se tím, že se značená bílkovina zapolymeruje do struktury polyakrylamidu.