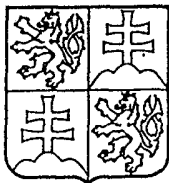


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 671

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/573

(21) PV 1608-87.C

(22) Přihlášeno 11 03 87

(40) Zveřejněno 13 12 89

(45) Vydáno 04 06 91

(75) Autor vynálezu ŠAFAŘÍK IVO ing. CSc., ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54) Způsob výroby prostředku pro stanovení
proteolytické aktivity

(57) Prostředek pro stanovení proteolytické aktivity se vyrábí tak, že se k roztoku želatiny přidá roztok vhodného barviva nebo pigmentu (např. kongo červen, ve vodě rozpustný nigrosin, černá tuš) a bifunkčním činidlem (např. glutaraldehydem) se provede zesíťení želatiny za současného zabudování barviva nebo pigmentu.

Vynález se týká způsobu výroby prostředku pro stanovení proteolytické aktivity.

Proteolytické enzymy jsou široce využívány v mnoha odvětvích průmyslu, v zemědělství, v medicíně, v biochemických laboratořích i jinde. Pro stanovení jejich aktivity lze použít celou řadu substrátů. Významné místo mezi nimi zaujímají nepropustné bílkovinné chromolytické substráty.

Dosud používané způsoby přípravy nerozpustných chromolytických substrátů spočívají v tom, že se

- a) na přirozenou nerozpustnou bílkovinu (např. kolagen, keratin, elastin, fibrin) kovalentně nebo absorbcí naváže vhodné reaktivní barvivo
- b) běžné rozpustné bílkoviny v roztoku zesítí vhodným bifunkčním činidlem, přičemž se vytvoří nerozpustné síťované bílkoviny, na které se v druhém stupni kovalentně nebo absorbcí naváže vhodné reaktivní barvivo.

Způsob výroby prostředku pro stanovení proteolytické aktivity podle vynálezu spočívá v tom, že se k roztoku vhodné bílkoviny (např. želatina) přidá vhodné barvivo nebo pigment, načež se přidá vhodné bifunkční činidlo (s výhodou např. glutaraldehyd), aby došlo k zesíťování a vytvoření nerozpustné, barevné síťované bílkoviny. Tato nerozpustná barevná síťovaná bílkovina je vytvořena v jediném kroku. Vzniklý produkt se důkladně promyje vodou a ponechá se buď ve formě gelu, nebo se rozdrobí na malé kousky, usuší za mírně zvýšené teploty a potom se rozetře na jemný prášek. Působením proteolytických enzymů se ze substrátu uvolňuje barvivo, jehož množství je úměrné aktivitě proteiny a je možno ho stanovit např. spektrofotometricky, po odfiltrování nebo odstředění nerozloženého nerozpustného substrátu.

Vynález je dokumentován příklady.

Příklad 1

Želatina (10 g) byla na vodní lázni rozvařena ve 100 ml vody. Po rozvaření bylo k roztoku želatiny přidáno 0,25 g kongo červeně rozpuštěné v 10 ml vody. Ke vzniklému roztoku bylo potom za míchání přidáno 1 až 2 ml 50 % glutaraldehydu, zředěného 10 ml vody. Došlo k rychlému zesíťování želatiny a vytvořil se nerozpustný barevný gel. Vzniklý gel byl rozdroben na malé částice, promyt důkladně vodou, usušen při mírně zvýšené teplotě a rozetřen v třecí misce na jemné částice.

Příklad 2

Analogicky jako v příkladu 1 byl připraven nerozpustný barevný gel. Po rozdrobení a promytí vodou byly částice gelu homogenizovány v Elvehjem-Potterově homogenizátoru. Vytvořené jemné částice byly suspendovány v pufru a použity pro stanovení proteolytické aktivity.

Příklad 3

Analogicky jako v příkladu 1 byly připraveny substráty obsahující jako pigment nigrosin rozpustný ve vodě (0,25 g na 10 g želatiny) nebo černou tuš (3 ml na 10 g želatiny, přidána po ochlazení roztoku želatiny na 35°C).

Příklad 4

Analogicky jako v příkladu 1 byl připraven roztok želatiny obsahující kongo červeně. Roztok byl rozlít na Petriho misky, aby se vytvořila vrstva asi 4 mm vysoká. Po zatuhnutí byla vrstva želatiny přelita 10 až 25 ml 2,5 % roztoku glutaraldehydu a roztok byl ponechán působit 18 až 24 hodin. Potom byl roztok glutaraldehydu slit, zesíťovaná želatina byla důkladně promyta vodou a korkovrtem byly vykrojeny disky o vhodném průměru. Disky byly uchovávány ve vodě s přídavkem vhodného bakteriocidního prostředku.

Příklad 5

Analogicky jako v příkladu 4 byly připraveny disky, které byly za laboratorní teploty ponechány vyschnout. Byly uchovávány za laboratorní teploty.

Použití nerozpustných chromolytických substrátů je dokumentováno příklady 6 až 10.

Příklad 6

Do zkumavek bylo naváženo po 20 mg substrátu (připraven podle příkladu 1), přidáno po 2 ml vhodného pufru a ponecháno 20 min bobtnat. Potom bylo do zkumavek přidáno po 1 ml roztoku obsahujícího proteinasy. Po vhodné dlouhé inkubaci (např. 30 min při 37 až 50°C) byl substrát odfiltrován a filtrát byl spektrofotometricky poměřen při 497 nm. Do hodnoty absorbance 1 byla závislost mezi množstvím (aktivitou) proteinasy a absorbcí filtrátu lineární.

Příklad 7

Do zkumavek bylo pipetováno po 2 ml suspenze substrátu (připraven podle příkladu 2, suspenze obsahovala 10 mg substrátu na 1 ml) a potom bylo přidáno po 1 ml roztoku proteinas. Další postup byl analogický jako v příkladu 6.

Příklad 8

Analogicky jako v příkladu 6 bylo provedeno stanovení proteolytické aktivity pomocí substrátů, které jako pigment obsahovaly nigrosin nebo černou tuš (připravené podle příkladu 3).

Příklad 9

Do 2 ml pufru ve zkumavkách byly vloženy disky substrátu (připravené podle příkladu 4) a bylo přidáno po 1 ml roztoku proteinas. Po skončení inkubace byl zabarvený roztok odlit a proměřován.

Příklad 10

Analogicky jako v příkladu 9 bylo provedeno stanovení proteolytické aktivity pomocí vysušených disků substrátu (připravené podle příkladu 5) s tím rozdílem, že před přidáním roztoku proteinasy po dobu 20 minut bobtnaly v pufru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby prostředku pro stanovení proteolytické aktivity, vyznačující se tím, že se k roztoku želatiny přidá roztok barviva, např. kongo červeně nebo ve vodě rozpustného nigrosinu, nebo pigmentu, například černé tuše a bifunkčním činidlem, například glutaraldehydem, se provede zesíťení želatiny za současného zabudování barviva nebo pigmentu.