



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

240462
(11) (B1)

(22) Prihlásené 14 05 84
(21) (PV 3539-84)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/42

(40) Zverejnené 16 07 85

(45) Vydané 15 08 87

(75)
Autor vynálezu

BIELY PETER RNDr. CSc.; MISLOVIČOVÁ DANICA ing. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz

1

2

Riešenie sa týka spôsobu stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz. Podstata spôsobu stanovenia spočíva v tom, že hydroxyetylcelulóza obsahujúca 2,5 až 20 % hmot. kovalentne viazaného červeného farbiva, trojsodnej soli 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu sa rozpustí vo vode alebo v pufrí o pH 4 až 6 a v koncentrácii 0,1 až 0,5 % hmot. sa použije ako substrát do inkubačných zmesí s endo-1,4- β -glukanázami, v ktorých sa enzýmová reakcia uskutočňovaná pri teplote 20 až 50 °C zastavuje pridaním dvoch až štyroch objemov zmesi etylalkohol — acetón 1 : 1 až 4 : 1 obj. obsahujúcej 0 až 0,1 mol.l⁻¹ octan sodný, čím sa vyzráža vysokomolekulárny podiel substrátu, ktorý sa takto oddelí od rozpustných farebných fragmentov uvoľnených účinkom enzýmu, ktoré sa stanovujú spektrofotometricky pri 550 nm. Vynález má použitie v biochémii, molekulárnej biológii a moderných biotechnológiach pri charakterizácii, identifikácii a stanovení aktivít endo-1,4- β -glukanáz.

Vynález sa týka spôsobu stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz (EC 3.2.1.4).

Bežné spôsoby stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz ako základných zložiek celololytických enzýmových systémov sú založené na kvantitatívnom stanovení redukujúcich sacharidov uvoľnených z nerozpustnej celulózy alebo z jej rozpustných derivátov. Tieto metódy nie sú však selektívne, pretože na tvorbe redukujúcich sacharidov sa podieľajú aj iné zložky celololytických enzýmových systémov ako sú napr. exo- β -glukanázy alebo β -glukózidázy (celobiázy). Nedajú sa použiť na sledovanie aktivity endo-1,4- β -glukanáz v roztokoch obsahujúcich vyššie hladiny redukujúcich látok, hlavne cukrov a tak isto neumožňujú stanovenie aktivity uvedených glukanáz viazaných na živé bunky, prípadne v prítomnosti buniek, ak tieto využívajú uvoľnené nízkomolekulové fragmenty substrátu ako zdroj uhlíka.

Viskózimetrickú metódu stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz využitím rozpustných derivátov celulózy možno označiť za veľmi citlivú a špecifickú metódu stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz, ktorá však vzhľadom na časovú náročnosť nie je vhodná na analýzu väčšieho počtu vzoriek. Iným princípom stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz je meranie množstva farbiva uvoľneného do roztoku vo forme rozpustných fragmentov z celulózy s kovalentne viazaným farbivom. S výnimkou jedného prípadu [B. V. McCleary: Carbohydr. Res. 86, 97 (1980)] všetky doteraz navrhnuté chromogénne substráty na stanovenie aktivity endo-1,4- β -glukanáz sú vo vode nerozpustné. Jedná sa o modré deriváty mikrokryštalickej celulózy [M. Linko, M. Leisola: Anal. Biochem. 70, 592 (1976)], celulózy s čiastočne zníženým stupňom kryštalinity [Calbiochem AG 1980, katalógové č. 219 481] alebo nerozpustnej sieťovanej hydroxyetylcelulózy (čs. AO 192 202).

Použitie nerozpustných substrátov je spojené s ťažkosťami ich presného dávkovania a potrebou miešania inkubačných zmesí, na čo upozorňujú výsledky fínskych autorov [M. Leisola, M. Linko: Biochemical Laboratory Report 13, Technical Research Centre of Finland, Helsinky (1976)]. Nerozpustné chromogénne substráty nie sú vhodné na stanovenie enzýmov viazaných na povrch buniek alebo na rôzne bunkové membrány. Vytváranie enzým-substrátového komplexu v celom objeme zmesí umožňujú substráty vo vode rozpustné. Takýto chromogénny substrát na stanovenie aktivity endo-1,4- β -glukanáz bol pripravený na báze karboxymetylcelulózy, ktorá sa však pred vlastným viazaním farbiva musela ešte parciálne hydrolyzovať celulázami (Austrálsky patent 48 831/79).

Stanovenie aktivity na rozpustný chromogénny substrát spočíva v meraní rýchlosti uvoľňovania farbených fragmentov roz-

pustných po pridaní organického rozpúšťadla, ktoré kvantitatívne zráža východzí polymérny substrát a jeho vysokomolekulárne podiely po čiastočnej enzýmovej degradácii. Keďže stanovenie je založené na depolymerizácii substrátu vedúcom k tvorbe farebných fragmentov rozpustných v prítomnosti organických rozpúšťadiel, presnosť stanovenia významne ovplyvňuje iónová sila prostredia [B. V. McCleary: Carbohydr. Res. 86, 97 (1976)]. Podobné substrátové vlastnosti má i chromogénny substrát na stanovenie aktivity endo-1,4- β -glukanáz pripravený autormi tohto vynálezu — trojsodná soľ 4-[N-etyl-N-fenylamino]-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl-hydroxyetylcelulózy.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že hydroxyetylcelulóza obsahujúca 2,5 až 20 % hmot. kovalentne viazaného červeného farbiva trojsodnej soli 2-chlór-4-[N-etyl-N-fenylamino]-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu sa rozpustí v pufrí o pH 4,0 až 6,0 v koncentrácii 0,1 až 1,5 % hmot. za intenzívneho miešania pri teplote 20 až 30 °C a získaný roztok sa použije ako substrát do zmesí s roztokom alebo suspenziou na partikuly viazaných endo-1,4- β -glukanáz, v ktorých sa enzýmová reakcia prebiehajúca pri teplote 20 až 50 °C po dobu 5 až 180 min. zastavuje pridaním dvoch až štyroch objemov zmesí etylalkohol acetón 1 : 1 až 4 : 1 obj. obsahujúcej 0 až 0,1 mol. l⁻¹ octan sodný, čím sa vyzráža podiel nehydrolyzovaného substrátu, ktorý sa po centrifugácii oddelí od rozpustných farebných fragmentov uvoľnených účinkom enzýmu a ktorých množstvo je úmerné koncentrácii enzýmu v zmesi, ako i trvaní inkubácie, a ktoré sa stanoví spektrofotometricky pri 550 nm.

Výhodou navrhovaného spôsobu stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz je, že využíva chromogénny substrát rozpustný vo vode a v pufrí, resp. v koncentrovanejších pufrí z malej časti homogénne dispergovaný, čo zaručuje rovnomerné rozloženie substrátu v enzýmových inkubačných zmesiach a odstraňuje požiadavky na miešanie, a že enzýmová reakcia sa zastavuje jednoducho pridaním organického rozpúšťadla, čo vedie k vyzrážaniu substrátu s výnimkou nízkomolekulárnych farebných fragmentov uvoľnených účinkom enzýmu z pôvodne zrážateľného substrátu. Ďalšou výhodou je, že spôsob stanovenia aktivity je špecifický pre endo-1,4- β -glukanázy, že je výnimočne citlivý, že nie je ovplyvnený prítomnosťou exo- β -glukanáz a β -glukózidáz, že umožňuje stanoviť aktivitu endo-1,4- β -glukanáz aj v prítomnosti redukujúcich látok, napr. sacharidov, ak tieto nemajú inhibičný účinok na enzýmy, že je vhodný pre analýzu enzýmu v prítomnosti živých bu-

niek, ako i enzýmu viazaného na bunkové štruktúry, a že je výnimočne vhodný na analýzu veľkého počtu vzoriek získaných po frakcionácii bielkovín chromatografiou, chromatofokusáciou, elektroforézou a elektrofokusáciou.

Príklad 1

80 mg hydroxyetylcelulózy obsahujúcej 10 % hmot. trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-2,6-bissulfonaf-1-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl (Ostazin bril. červen H—3B) sa rozpustí za stáleho miešania v 10 mililitroch citrát-fosfátového pufru zloženia: 1 diel 0,1 mol. l⁻¹ kyseliny citrónovej a 1 diel 0,2 mol. l⁻¹ hydrogénfosforečnanu disodného a 2 diely vody, o pM 4,8. 0,5 ml alikvóty tohto roztoku vyhriateho na 30 °C sa miešajú s 5 až 50 μ l neriedeného, desaťkrát a päťdesiatkrát riedeného roztoku celulózy, resp. endo-1,4- β -glukanáz a zmesi sa inkubujú pri teplote 30 °C po dobu 10 min. Reakcia sa zastaví pridaním troch objemov zmesi 96 % etylalkohol — acetón 2 : 1 obj. (1,5 ml), čím sa vyzráža vysokomolekulárny podiel substrátu, kým nízkomolekulárne fragmenty uvoľnené účinkom enzýmu ostávajú po pridaní organického zrážadla v roztoku. Po 10 min. stání pri teplote 22 °C sa zmesi opäť premiešajú a centrifugujú 1 min. pri 2 000 g.

Absorbancia čírych supernatantov sa meria pri 550 nm oproti vzorke neobsahujúcej roztok enzýmu. Farebná intenzita supernatantov je v určitom rozmedzí úmerná množstvu enzýmu v inkubačnej zmesi ako aj trvaniu inkubácie. Citlivosť stanovenia je daná teplotou zrážania nehydrolyzovaného substrátu ako aj iónovou silou roztoku. Za jednotku aktivity endo-1,4- β -glukanázy sa považuje množstvo farebných fragmentov rozpustených v zmesi citrát-fosfátový pufer — etylalkohol — acetón 1 : 2 : 1 obj., v ktorých sa nachádza 1 % hmot. z celkového množstva farbiva viazaného v substráte prítomnom v inkubačnej zmesi. Prevod hodnot absorbancie pri 550 nm na kataly alebo medzinárodné jednotky aktivity je možný po stanovení množstva redukujúcich sacharidov uvonených za rovnakých podmienok z ekvivalentného množstva nefarebnej hydroxyetylcelulózy.

Príklad 2

Hydroxyetylcelulóza obsahujúca 15 % hmot. kovalentne viazanej trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl sa za miešania pri teplote 25 °C rozpustí v 0,1 mol. l⁻¹ acetátovom pufrí o pH 5,0 a zloženia 7dielov 0,1 mol. l⁻¹ octanu sodného a 3 diely 0,1 mol. l⁻¹ kyseliny octovej, aby koncentrácia substrátu bola 16 mg/ml. Za tých-

to podmienok ostáva nepatrná časť substrátu nerozpustená, avšak homogénne dispergovaná vo forme jemnej zrazeniny. 0,25 ml tohto roztoku substrátu vyhriateho na teplotu 30 °C sa mieša s 0,25 ml vhodne riedeného roztoku enzýmu a inkubuje sa pri teplote 30 °C. Enzymová reakcia sa zastavuje a vyhodnocuje ako v príklade 1, berie sa však do úvahy vyšší obsah farbiva viazaného na hydroxyetylcelulózu.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije hydroxyetylcelulóza obsahujúca 2,5 % hmot. kovalentne viazaného farbiva, že enzymová reakcia sa uskutočňuje pri teplote 50 °C a zastavuje sa pridaním štyroch objemov zmesi etylalkohol acetón 4 : 1 obj.

Príklad 4

Pri zvýšených požiadavkách na presnosť stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz podľa príkladu 1 až 3 sa meria pre každú vzorku analyzovanú časová závislosť uvoľňovania farebných fragmentov substrátu. Z grafických závislostí absorbancie pri 550 nm trvania enzymovej reakcie sa určia smernice závislosti pre počiatočný čas reakcie, ktoré sú priamoúmerné koncentrácii enzýmu v inkubačnej zmesi, teda i jeho aktivity.

Príklad 5

Spôsob stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz na farebnú hydroxyetylcelulózu podľa príkladov 1 až 4 poskytuje reprodukovateľné výsledky, ak sa vo všetkých prípadoch zachovávali parametre, ktoré ovplyvňujú rozpustnosť farebných fragmentov uvoľnených účinkom enzýmu v zmesi po pridaní organického zrážadla, a to teplota zrážania a centrifugácie a iónová sila zrážacej zmesi. Vplyv menších zmien koncentrácií solí sa dá eliminovať pridaním interného elektrolytu, napr. 0,2 mol. l⁻¹ chloridu sodného do roztoku substrátu. Zvýšenie iónovej sily znižuje rozpustnosť farebných fragmentov hydroxyetylcelulózy v prítomnosti organického zrážadla, čo má za následok celkové zníženie citlivosti stanovenia.

Príklad 6

Vplyv meniacej sa koncentrácie solí v roztoku enzýmu na reprodukovateľnosť stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz, ako je uvedené v príklade 5, sa odstráni pridaním interného elektrolytu do zrážacej zmesi. Enzymové reakcie uskutočňované podľa príkladu 1 až 4 sa zastavujú pridaním troch objemov zmesi etylalkohol — acetón 2 : 1 obj., obsahujúcej 0,1 mol. l⁻¹ octan sodný.

Vynález má použitie v biochémií, molekularnej biológii a moderných biotechnológiach pri charakterizácii, identifikácii a stanovení aktivít endo-1,4- β -glukanáz.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanáz vyznačený tým, že hydroxyetylcelulóza obsahujúca 2,5 až 20 % hmot. kovalentne viazaného červeného farbiva, trojsodnej soli 2-chlór-4(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu sa rozpustí v koncentrácii 0,1 až 1,5 perc. hmot. pri teplote 20 až 30 °C vo vode alebo v pufri o pH 4 až 6 a inkubuje sa v objeme 0,5 až 2,0 ml s roztokom endo-1,4- β -glukanáz pri teplote 20 až 50 °C po

dobu 5 až 180 min, kedy sa enzýmová reakcia zastaví pridaním dvoch až štyroch objemov zmesi etylalkohol — acetón 1 : 1 až 4 : 1 obj. obsahujúcej 0 až 0,1 mol.l⁻¹ octan sodný, čím sa vyzráža vysokomolekulárny podiel substrátu, ktorý sa centrifugáciou oddelí od rozpustných farebných fragmentov uvoľnených účinkom enzýmu, ktorých množstvo je úmerné koncentrácii enzýmu v reakčnej zmesi a trvaniu inkubácie, a ktoré sa stanovia spektrofotometricky pri 550 nm.