



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

241341
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/26

(22) Prihlášené 19 11 84
(21) (PV 8805-84)

(40) Zverejnené 16 07 85

(45) Vydané 15 09 87

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Spôsob detekcie α -amyláz v géloch

1

2

Vynález sa týka spôsobu detekcie α -amyláz v géloch. Podstata spôsobu detekcie spočíva v tom, že sa na agarový gél obsahujúci kovalentne vyfarbený hydroxyetylškrob s dvojsodnou soľou 1-amíno-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoetyl-sulfonylanilíno)]antrachinónu, s obsahom 5,8 až 13,2 % hmot. tohto farbiva, pôsobí agarovým gélom obsahujúcim a/alebo neobsahujúcim α -amylázy, načo sa gél obsahujúci kovalentne vyfarbený hydroxyetylškrob s dvojsodnou soľou 1-amíno-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoetyl-sulfonylanilíno)]antrachinónu oddelí a vymyje vodným roztokom obsahujúcim 1 objem 0,05 až 0,2 mol.l⁻¹ acetátového pufru o pH 4,5 až 6,0 a 2 až 5 objemov zmesi etanol-acetón 2:1 až 5:1 obj., čím sa z gélu v mieste pôsobenia α -amyláz vymyjú enzýmom uvoľnené farebné fragmenty a miesta, kde α -amylázy nepôsobia, zostanú nezmenené. Vynález má použitie v klinickej biochémii, diagnostike a vo fermentačnom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu detekcie α -amyláz v géloch.

α -amylázy sú súčasťou komplexu enzýmov živočíšnych a mikrobiálnych buniek katalyzujúceho konverziu škrobu a glykogénu na glukózu. Predstavujú významnú enzýmovú zložku biologických tekutín ľudského organizmu, ako je napr. krvná plazma, sliny a moč, kde sa vyskytujú vo viacerých formách lišiacich sa izoelektrickými bodmi.

Celková hladina α -amylázy v biologických tekutinách ako aj vzájomné zastúpenie jednotlivých foriem alebo ich počet sú závislé od zdravotného stavu človeka a sú indikáciou niektorých ochorení ako je napr. hyperamylazémia a pankreatitída [W. B. Salt, S. Schenker: *Medicína* (Paris) 55, 269 (1976)].

Analýza mnohotných foriem amyláz sa uskutočňuje aplikáciou účinných metód separácie bielkovín v géloch (elektroforézou, izoelektrickou fokusáciou, prípadne chromatografiou na tenkých vrstvách). Na separačný krok musí však naväzovať spoľahlivá a rýchla metóda detekcie, resp. lokalizácie enzýmovej aktivity.

Najnovšie spôsoby detekcie α -amyláz v géloch využívajú ako substrát nerozpustný škrob alebo amylopektín sieťovaný epichlórhydrínom s kovalentne naviazaným farbivom [J. Kamarýt, J. Zemek, L. Kuniak: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 451 (1982); L. Royse, D. M. Jensen: *Clin. Chem.* 30, 387 (1984)].

Princípom detekcie, ktorú pôvodne navrhol M. Ceska, je uvoľňovanie rozpustných farebných fragmentov polysacharidu do roztoku z nerozpustného substrátu v mieste kontaktu substrátu s enzýmom lokalizovaným v separačnom géli [M. Ceska: *Biochem. J.* 121, 575 (1971)].

Nerozpustný substrát sa aplikuje na separačný gél buď vo forme suspenzie v agarovom géli [M. Ceska: *Biochem. J.* 121, 575 (1971)], buď sa ním separačný gél posype a obraz α -amyláz sa získa po prevedení odtlačku pomocou filtračného papiera [J. Kamarýt, J. Zemek, L. Kuniak: *J. Clin. Chem. Biochem.* 20, 451 (1982)] alebo separačný gél sa priamo máča v suspenzii nerozpustného chromogénneho substrátu [L. Royse, D. M. Jensen: *Clin. Chem.* 30, 387 (1984)].

Pri posledne citovanej metóde dochádza k vyfarbovaniu miesta, kde sa nachádza enzým v separačnom géli, v dôsledku difúzie nízkomolekulárnych fragmentov polysacharidu do gélu v mieste štiepenia nerozpustného substrátu. Pomerne dobrá difúzia nízkomolekulárnych fragmentov však spôsobuje, že zóny na získaných zymogramoch sú dosť neostre a z tohoto dôvodu nie príliš vhodné na detekciu minoritných a elektroforeticky príbuzných foriem α -amyláz, ktoré sa javia dôležité práve z klinického hľadiska [J. J. Zakowski, D. E. Bruns: *Clin. Chem.* 29, 2095 (1982); P. Leclerc, J. C. Forest: *Clin. Chem.* 1020 (1983)].

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob detekcie α -amyláz v géloch podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa na agarový gél obsahujúci kovalentne vyfarbený hydroxyetylškrob s dvojsodnou soľou 1-amino-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoethylsulfonylanilino)]antrachinónu, s obsahom 5,8 až 13,2 % hmot. tohto farbiva, pôsobí agarovým gélom obsahujúcim a/alebo neobsahujúcim α -amylázy, načo sa vyfarbený gél oddelí a vymyje vodným roztokom obsahujúcim 1 objem 0,05 až 0,2 mol.l⁻¹ acetátového pufru o pH 4,5 až 6,0 a 2 až 5 objemov zmesi etanol—acetón 2:1 až 5:1 obj., čím sa z gélu v mieste pôsobenia α -amyláz vymyjú enzýmom uvoľnené farebné fragmenty a miesta, kde α -amylázy nepôsobia, zostanú nezmenené.

Výhodou tohto farebného substrátu je, že je rozpustný vo vode a v pufrach, ale dá sa z týchto roztokov kvantitatívne vyzrážať zmesou etanolu a acetónu. Enzýmom uvoľnené fragmenty sa za podobných podmienok nezrážajú, čo umožňuje selektívne vymývanie degradovaného polysacharidu z agarového gélu v mieste kontaktu s α -amylázou.

Výhodou spôsobu detekcie týmto substrátom je, že pri detekcii α -amyláz v géloch poskytuje ostrejšie zóny mnohotných foriem enzýmu ako doteraz popísané metódy, že je mimoriadne citlivý a umožňuje detekovať submikrogramové množstvá enzýmu a tiež umožňuje stanoviť správnu dĺžku expozície substrátu enzýmu tým, že transparentnosť gélov umožňuje vizuálne sledovanie zmien v agarovom géli so substrátom.

Príklad 1

Sodná soľ O-2-[3-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etyl]hydroxyetylškrobu (150 mg) s obsahom 13,2 % hmot. farbiva sodnej soli 2-[3-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etyl- sa rozpustí za miešania v 10 ml destilovanej vody, zmieša sa s 20 ml 80 °C teplého roztoku 60 mg agaru v 0,2 mol.l⁻¹ acetátového pufru pH 4,5 a okamžite sa naleje medzi dve priehľadné polyesterové fólie prilepené tenkou vrstvou silikónového oleja (DC-200) na sklenených doskách oddelených od seba rámom z polyvinylchloridu o hrúbke 0,8 mm.

Po stuhnutí sa farebný agarový gél použije na detekciu α -amyláz v separačných polyakrylamidových alebo agarózových géloch, prípadne na inom materiáli. Gél, na ktorom sa uskutoční separácia analyzovaných bielkovín obsahujúcich α -amylázy, sa okamžite po separácii prekryje tenkým agarovým gélom s farebným substrátom.

Na zamedzenie tvorenia bublín medzi oboma gélmí je vhodné agarový gél so substrátom predtým vyhriať na teplotu 40 °C nad horúcou platňou. Spojené gély sa inkubujú pri teplote 20 °C, kým sa v agarovej

vrstve so substrátom nezačnú objavovať miesta so zmeneným odtieňom modrej farby, čo je spôsobené degradáciou polymérneho substrátu v mieste jeho dotyku s enzýmom.

Po oddelení agarového gélu so substrátom od separačného gélu, na ktorom sa objavujú nevýrazné modré zóny v mieste výskytu α -amyláz, sa gél so substrátom ponorí do zmesi 0,05 mol.l⁻¹ acetátový pufr (pH 4,5) — etanol—acetón (1:3:1, obj.), v ktorej sa pôvodný enzým neatakovaný substrát nerozpúšťa a ani nezráža, ktorá však vymýva z gélu kratšie, enzýmom uvoľnené farebné fragmenty.

Po 5 hodinách držania agarovej repliky v odfarbovacom roztoku sa miesta odpovedajúce lokalite α -amyláz objavia ako bledo-modré až úplne bezfarebné zóny na tmavomodrom pozadí.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa použije sodná soľ O-[2-[3-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etyl]hydroxyetylškrobu s obsahom 5,8 % hmot. sodnej soli 2-[3-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etyl-, ktorej 300 mg sa rozpustí v 10 ml dest. vody a zmieša sa s 20 ml 80 °C teplého roztoku 600 mg agaru v 0,2 mol.l⁻¹ acetátového pufru pH 4,5.

Vynález má použitie v klinickej biochémií, diagnostike a vo fermentačnom priemysle na detekciu a lokalizáciu α -amyláz v géloch so separovanými bielkovinami po tenkovrstvovej chromatografii, elektroforéze alebo izoelektrickej fokusácii.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob detekcie α -amyláz v géloch s hydroxyetylškrobom s kovalentne naviazanou dvojsodnou soľou 1-amino-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoethylsulfonylanilino)]antrachinónu vyznačujúci sa tým, že sa na agarový gél obsahujúci hydroxyetylškrob kovalentne vyfarbený s dvojsodnou soľou 1-amino-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoethylsulfonylanilino)]antrachinónu, s obsahom 5,8 až 13,2 % hmot. tohto farbiva, pôsobí agarovým gélom obsahujúcim a/alebo neobsahujúcim α -amylá-

zy, načo sa gél obsahujúci kovalentne vyfarbený hydroxyetylškrob s dvojsodnou soľou 1-amino-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoethylsulfonylanilino)]antrachinónu oddelí a vymyje vodným roztokom obsahujúcim 1 objem 0,05 až 0,2 mol.l⁻¹ acetátového pufru o pH 4,5 až 6,0 a 2 až 5 objemov zmesi etanol—acetón 2:1 až 5:1 obj., čím sa z gélu v mieste pôsobenia α -amyláz vymyjú enzýmom uvoľnené farebné fragmenty a miesta, kde α -amylázy nepôsobia, zostanú nezmenené.