

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263665

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/68

(22) Přihlášeno 10 12 86

(21) PV 9109-86.R

(40) Zveřejněno 16 09 88

(45) vydáno 14 08 89

(75)

Autor vynálezu

ŠAFAŘÍK IVO ing. CSC., ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54) Prostředek pro stanovení proteolytické aktivity a způsob jeho výroby

Prostředek pro stanovení proteolytické aktivity je tepelně modifikovaný kasein a jeho deriváty. Příprava prostředku podle vynálezu se provádí záhřevem kaseinu a jeho derivátů, jako je azokasein a nitrokasein, na teplotu 150 až 250 °C po dobu 30 minut až 10 hodin.

Vynález se týká nových prostředků pro stanovení proteolytické aktivity a způsobu jejich výroby.

Aktivitu proteolytických enzymů je možno stanovit pomocí celé řady substrátů. Důležitou skupinu tvoří substráty založené na nerozpustných, v přírodě se vyskytujících bílkovinách. Patří mezi ně např. elastin, fibrin, kolagen nebo keratin.

Pro zvýšení citlivosti stanovení byly vyvinuty nerozpustné bílkovinné substráty s navázaným barvivem. Příkladem je např. kožní prášek s navázaným azobarvivem, fibrin obarvený indigokarmínem nebo kožní prášek s navázanou remazolovou brilantní modří.

Rovněž byly popsány metody přípravy nerozpustných chromolytických substrátů z rozpustných bílkovin jejich chemickou modifikací.

Způsob přípravy nerozpustných substrátů pro stanovení proteolytické aktivity podle vynálezu spočívá v tom, že se kasein nebo jeho deriváty /jako je např. azokasein nebo nitrokasein/ zahřívají v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 150 až 250 °C po dobu 30 min až 10 hodin. Získaný tepelně modifikovaný kasein a jeho deriváty jsou ve vodě a vodných roztocích prakticky nerozpustné. Působením proteolytických enzymů se z nich uvolňují peptidy, jejichž množství je úměrné aktivitě proteinasy a je možno je stanovit např. spektrofotometricky, po odfiltrování nebo odstředění nerozloženého nerozpustného substrátu.

Vynález je dokumentován příklady.

P ř í k l a d 1

Azokasein byl v tenké vrstvě zahříván v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200 °C po dobu 5 hodin. Po záhřevu byl tepelně modifikovaný azokasein opakovaně suspendován ve 2 až 4% roztoku hydroxidu sodného, dokud se uvolňovalo intenzivní hnědočervené až červené zabarvení. Poté byl odfiltrován a na filtru důkladně promyt vodou. Po usušení byl promytý substrát rozetřen v třecí misce. Byl získán jemný prášek, který byl dále používán pro vlastní stanovení aktivity proteinasy.

P ř í k l a d 2

Analogicky jako v příkladu 1 byly připraveny substráty na bázi tepelně modifikovaného kaseinu a tepelně modifikovaného nitrokaseinu.

P ř í k l a d 3

Analogicky jako v příkladu 1 byly připraveny různé šarže tepelně modifikovaného azokaseinu, lišící se použitou teplotou a dobou působení. Byly připraveny následující vzorky:

150 °C/10 h; 180 °C/6 h; 200 °C/5 h; 220 °C/2 h; 240 °C/1 h; 250 °C/30 min

Rovněž byl připraven tepelně modifikovaný kasein záhřevem na 200 °C po dobu 9 hodin.

Dále bylo postupováno jako v příkladu 1.

Použití připravených nerozpustných substrátů je dokumentováno následujícím příkladem.

Do zkumavek bylo naváženo po 20 mg substrátů, které byly připraveny podle příkladu 1, 2 a 3. Byly přidány 2 ml vhodného pufru a substrát poté bobtnal 20 minut. Poté bylo do zkumavek přidáno po 1 ml roztoku obsahujícího proteinasy. Po inkubaci o délce 30 min při teplotě 37 až 50 °C byl substrát odfiltrován a filtrát byl spektrofotometricky proměřen v 1 cm skleněné kyvetě při vlnové délce 400 nm proti slepému pokusu. Do hodnoty absorbance 1,0 byla závislost mezi množstvím proteinasy a absorbancí k filtrátu lineární.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Prostředek pro stanovení proteolytické aktivity vyznačený tím, že sestává z kaseinu nebo jeho derivátů, jako je azokasein nebo nitrokasein.

2. Způsob výroby podle bodu 1 vyznačující se tím, že se kasein nebo jeho deriváty, jako je azokasein nebo nitrokasein, podrobí záhřevu při teplotách 150 až 250 °C po dobu 30 minut až 10 hodin.