

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

264241

(11)

(13) B1

(21) PV 649-87.L
(22) Přihlášeno 02 02 87

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/573

(40) Zveřejněno 17 10 88
(45) Vydáno 15 08 89

(75)
Autor vynálezu

ŠAFARÍK IVO ing. CSc., ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54)

Prostředek pro stanovení proteolytické aktivity a způsob jeho výroby

(57) Příprava prostředku pro stanovení proteolytické aktivity se provádí tak, že se k rozto-
ku kaseinu přidá černá tuš, kasein se za součas-
né inkorporace tuše vysráží snížením pH rozto-
ku na hodnotu jeho isoelektrického bodu a zís-
kaná černá sraženina se po vysušení podrobí
záhřevu při teplotě 150 až 250 °C po dobu 30
minut až 10 hodin. Prostředek sestává z kaseinu
a černé tuše v poměru 10 : 1 až 1 : 1, kde množ-
ství kaseinu je uvedeno v gramech a množství
černé tuše v mililitrech.

CS 264241 B1

Vynález se týká prostředku pro stanovení proteolytické aktivity a způsobu jeho výroby.

Aktivitu proteolytických enzymů je možno stanovit pomocí celé řady substrátů (Fukal, L., Káš, J., Vodrážka, Z.: *Biochem. clin. bohemoslov.* 14, 109 (1985); Fukal, L., Káš, J.: *Chem. Listy* 78, 1176 (1984)). Významné místo mezi nimi zaujímají substráty, které jsou založeny na nerozpustných bílkovinách. Mezi ně patří např. kolagen (Gisslow, M. T., McBride, B. C.: *Anal. Biochem.* 68, 70 (1975), keratin (Nakanishi, T., Yamamoto, T.: *Agric. Biol. Chem.* 38, 2391 (1974), fibrin (Thorsen, S., Astrup, T.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130, 811 (1969)) nebo elastin (Bielefeld, D. R., Senior, R. M., Yu, S. Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1553 (1975)).

Pro zvýšení citlivosti stanovení byly vyvinuty nerozpustné bílkovinné substráty s navázaným barvivem. Příkladem je např. fibrin obarvený indigokarmínem (Nelson, W. L., Ciaccio, E. I., Hess, G. P.: *Anal. Biochem.* 2, 39 (1961)), nebo Azocoll (kožní prášek s navázaným azobarvivem; Moore, G. L.: *Anal. Biochem.* 32, 122 (1969)).

Současné chromogenní nerozpustné substráty pro stanovení proteolytické aktivity vyžadují speciální způsoby výroby, a jejich příprava v laboratoři může být obtížná.

Předmětem vynálezu je nový prostředek pro stanovení proteolytické aktivity a způsob jeho přípravy.

Způsob přípravy tohoto prostředku podle vynálezu spočívá v tom, že se k roztoku kaseinu přidá roztok černé tuše, kasein se za současné inkorporace tuše vysráží snížením pH na hodnotu jeho isoelektrického bodu, a získaná černá sraženina se po vysušení podrobí záhřevu při vyšší teplotě (s výhodou 150 až 250 °C) po dobu 30 min až 10 hodin. Získaný tepelně modifikovaný chromogenní kasein je ve vodě a vodných roztocích prakticky nerozpustný. Působením proteolytických enzymů se z něho uvolňuje barvivo, jehož množství je úměrné aktivitě proteiny a je možno ho stanovit spektrofotometricky, po odfiltrování nebo odstředění nerozloženého nerozpustného substrátu.

Předmětem vynálezu je také prostředek pro stanovení proteolytické aktivity, vyznačený tím, že sestává z kaseinu a černé tuše v poměru 10 : 1 až 1 : 1, kde množství kaseinu je uvedeno v gramech a množství černé tuše v mililitrech.

Vynález je dokumentován příklady:

Příklad 1

10 g kaseinu bylo rozpuštěno v 400 ml 0,2 %

roztoku hydroxidu sodného. K roztoku bylo přidáno 5 ml černé tuše pro technická pera („Centrograf“). Poté byla po kapkách za stálého míchání přidávána 50 % kyselina octová, dokud se komplex kasein—tuš kompletně nevysrážel. Získaná černá sraženina komplexu kasein—tuš byla odfiltrována na papírovém filtru, promyta vodou, vysušena v sušárně při cca 80 °C a poté zahřata v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200 °C po dobu 4 hodiny. Získaný tepelně modifikovaný chromogenní kasein byl rozemlet v tříštivém kávomlýnku a opakovaně suspendován ve 2 až 4 % roztoku hydroxidu sodného, dokud se uvolňoval pigment. Po odfiltrování byl substrát důkladně promyt vodou, vysušen v sušárně při 80 °C a opět rozemlet v tříštivém kávomlýnku na jemný prášek, který byl dále používán pro vlastní stanovení aktivity proteiny.

Příklad 2

Analogicky jako v příkladu 1 byly připraveny chromogenní substráty inkorporací 10 ml černé tuše/10 g kaseinu a 1 ml černé tuše/10 g kaseinu.

Příklad 3

Analogicky jako v příkladu 1 byly připraveny různé šarže tepelně modifikovaného chromogenního kaseinu, 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 a 250 °C/30 min.

Příklad 4

Do zkumavek bylo naváženo po 20 mg substrátu, přidáno po 2 ml vhodného pufru a necháno 20 min botnat. Poté bylo do zkumavek přidáno po 1 ml roztoku obsahujícího alkalické bakteriální proteiny. Po vhodné dlouhé inkubaci (např. 30 min při 50 °C) byl substrát odfiltrován a filtrát byl spektrofotometricky proměřen, např. při vlnové délce 400 nm. Alternativně byly zkumavky po skončení inkubace přeneseny do ledové lázně, obsah zkumavek byl rychle odstředěn a supernatant spektrofotometricky proměřen. Mezi hodnotami absorbance cca 0,2–1,0 byla závislost mezi množstvím (aktivitou) alkalické bakteriální proteiny a absorbcí filtrátu (supernatantu) lineární. Při vyšších hodnotách absorbance měla závislost konvexní charakter. Různé šarže substrátu, připravené podle příkladů 1, 2 a 3, vykazovaly podobné vlastnosti.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Prostředek pro stanovení proteolytické aktivity vyznačený tím, že sestává z kaseinu a černé tuše v poměru 10 : 1 až 1 : 1, kde množství kaseinu je uvedeno v gramech a množství v mililitrech.

2. Způsob výroby prostředku podle bodu 1 vyznačující se tím, že se k roztoku kaseinu

přidá černá tuš, kasein se za současné inkorporace černé tuše vysráží snížením pH roztoku na hodnotu jeho isoelektrického bodu, a získaná černá sraženina se po vysušení podrobí záhřevu při teplotách 150 až 250 °C po dobu 30 minut až 10 hodin.