



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

218709

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 07 C 103/52

(22) Prihlášené 14 05 81

(21) (PV 3546-81)

(40) Zverejnené 29 01 82

(45) Vydané 01 06 85

(75)

Autor vynálezu

KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JURAJ ing. CSc.,
LEHNICE

(54) Spôsob prípravy nerozpustného chromolytického proteínu

Vynález sa týka spôsobu prípravy nerozpustného chromolytického proteínu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa proteín rozpustí pri teplote 15 až 25 °C na 10 až 20 hmot. % roztok, načo sa v druhom stupni pridá sieťovací reagent s výhodou epichlórhýdrín a dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[-3/sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6 antrachinonsulfónovej a po rozpustení farbiva sa reakčný roztok alkalizuje hydroxidom sodným, dobre sa zamieša a nechá reagovať po dobu 15 až 24 hodín pri teplote 15 až 25 °C, načo sa zosietený chromogénny gél mixuje v zriedenom metanole, neutralizuje, odfiltruje, premýva metanolom, vysuší a suchý proteín sa pomelie za sucha na guľovom mlyne na častice 40 až 250 μ.

Vynález má použitie v klinickej biochémií pri stanovení proteolytických enzýmov v biologických tekutinách, v priemyselnej aplikácii pri medziope-
račnej kontrole kultivačných médií pri priemyslo-
vej výrobe enzýmov.

Vynález sa týka spôsobu prípravy nerozpustného chromolytického proteínu vhodného na stanovenie proteázovej enzýmovej aktivity spektrofotometrickou metódou.

Najčastejšie používané známe metódy na stanovenie proteolytickej aktivity sú veľmi zdĺhavé a málo presné.

V zásade sú založené na tom, že sa meria množstvo uvoľneného proteínu v priebehu proteolytickej hydrolýzy, ktoré sa stanovuje ako rozpustná frakcia v kyseline trichloroctovej M. Kunitz: J. Gen. Physiol. **30**, 291 (1947), prípadne pomocou pozitívnej reakcie s fenolovým reagens podľa Folína [M. L. Anson: J. Gen. Physiol. **22**, 79 (1938)].

Metóda založená na využití chromolytického substrátu na báze kazeínu nie je bežne dostupná pre pomerne zložitú prípravu azokazeínu [S. Berman a spol.: Proc. Expzl. Biol. Med. **107**, 798–83 (1961)].

Veľmi citlivý chromolytický substrát možno pripraviť podľa Aut. osv. č. 194 592 založený na sieťovaní a farbení rôznych typov proteínu. Vyžaduje však lyofilizáciu vyfarbeného a premytého proteínu, čo je pomerne náročná technologická operácia.

Uvádzané nedostatky rieši nová prihláška vynálezu, ktorá umožňuje pripraviť chromolytický nerozpustný sieťovaný proteínový substrát bez konečnej lyofilizácie modifikovaného proteínu s vysokou citlivosťou pre rôzne typy proteázových enzýmov vhodný pre spektrofotometrické stanovenie proteolytických enzýmových aktivít.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa proteín s výhodou hovädzí sérum albumín, ovalbumín, kazeín alebo ich zmes rozpúšťa vo vode pri teplote 15 až 25 °C na 10 až 20 % hmot. roztok, načo sa v druhom stupni pridá sieťovací reagent s výhodou epichlorhydrín v množstve 0,5 až 5 % hmot. na hmotnosť suchého proteínu a 5 až 20 % hmot. farbiva s výhodou dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3/sulfoethylsulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfonová na hmotnosť suchého proteínu a po rozpustení farbiva sa reakčný roztok alkalizuje s takým množstvom 25 % hmot. roztokom hydroxidu sodného aby jeho výsledná koncentrácia v reakčnom roztoku bola 0,7 až 1,2 % hmot., dobre sa zamieša anechá sa staticky reagovať po dobu 15 až 24 hodín pri teplote 15 až 25 °C, načo sa zosietený chromogénny proteínový gél mixuje v zriedenom alkohole s výhodou metanole v rýchloobrátkovom mixéri, neutralizuje s kyselinou octovou, odfiltruje a na filtri sa premyva zriedeným metanolom do bezfarebnej reakcie filtrátu, nakoniec sa premyva bezvodým metanolom, vysuší pri teplote 60 °C a suchý proteín sa pomelie za sucha na gulovom mlyne na častice 40 až 250 µ.

Aby sa získal proteínový gél s homogénnou distribúciou pričných väzieb medzi makromolekulami proteínu ako i homogénnou distribúciou viazaného farbiva v zosietenom proteínovom géle

je nevyhnutné rešpektovať niektoré zvláštnosti heterogénnych reakcií v konkrétnom reakčnom systéme.

Predovšetkým je dôležité, aby proteín bol dobre rozpustný vo vode. Keď je proteín rozpustený tak sa pridá sieťovací reagent a až po dokonalom premiešaní sa pridá pevné farbivo, ktoré sa v roztoku proteínu rozpúšťa pomaly. Na dobré rozpustenie farbiva sú potrebné 1 až 2 hodiny za intenzívneho miešania reakčného roztoku.

Na dostatočné zosietenie bielkoviny je potrebné okolo 1 % sieťovacieho reagentu. Ak sa použije väčšie množstvo sieťovacieho reagentu, tak hotový produkt má nižší napúšací objem a teda i nižšiu citlivosť k proteolytickej hydrolýze.

Rovnako dôležitou operáciou prípravy chromolytického proteínového gélu je spoľahlivé vymytie nezreagovaného farbiva.

Je výhodné voľné farbivo odstraňovať postupnou dekantáciou väčších častíc gélu, potom gél mixovať v rýchloobrátkovom mixéri na požadovanú veľkosť častíc a zvyšok farbiva vymyť na filtri najprv vodou, potom zmesou vody a alkoholu resp. acetónu v pomere 1 : 1 až nakoniec bezvodým alkoholom alebo acetónom. Vysušený chromogénny vo vode nerozpustný proteín sa pomelie na častice 50 až 100 µ a je vhodný pre analytické účely stanovenia rôznych proteolytických enzýmov.

Výhodou nového spôsobu prípravy chromolytického nerozpustného proteínového gélu je, že:

- je energeticky nenáročný, pretože všetky modifikačné reakcie pri jeho príprave prebiehajú pri laboratórnej teplote,

- umožňuje prípravu chromolytického proteínového gélu so širokým rozsahom fyzikálnych vlastností gélu pre špecifické potreby jeho používania,

- hotový produkt nie je potrebné skladovať pri zníženej teplote a je dostatočne stabilný pri skladovaní pri teplote do 30 °C,

- nevyžaduje žiadne nákladné technologické operácie a môže sa preto vyrábať v bežných laboratórnych zariadeniach.

Ďalšie prednosti nového postupu sú evidentné z nasledovných príkladov, ktoré však nie sú vyčerpávajúce, ale len ilustratívne.

Príklad 1

1 kg hovädzieho sérového lyofilizovaného albumínu sa rozpustí v 6,25 litra destilovanej vody. Po dokonalom rozpustení proteínu sa pridá 10 ml epichlorhydrínu a mieša sa 30 minút. Potom sa naraz pridá 120 g farbiva Remazol brilliant blue R (soľ kyseliny 8-amino-5-[3-/sulfoethylsulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfonová), a mieša sa pri teplote miestnosti po dobu 2 hodín. Potom sa pridá za intenzívneho miešania naraz 250 ml hydroxidu sodného o konc. 25 % hmot. a miešanie pokračuje až kým reakčný roztok nezhušťne, čo trvá okolo 2 až 5 minút. Po zhutnutí reakčného roztoku sa zastaví miešanie a reakčná zmes sa nechá reagovať cez noc (16 až 20 hodín) pri laboratórnej teplote,

kedy sa reakcie ukončí. Zosietený a vyfarbený pevný proteín sa mixuje v alkohole (najvýhodnejšie v metanole) zriedenom vodou v pomere 2 : 1. K rozmixovanému proteínu v alkohole sa pridá 100 ml konc. kyseliny octovej zriedenej dvojnásobným množstvom metanolu aby sa zneutralizoval voľný hydroxid sodný. Reakčná suspenzia sa odfiltruje a na filtri sa premýva zriedeným metanolom s vodou (1 : 1) až filtračný roztok je bezfarebný. Potom sa premýva stále koncentrovanejším metanolom až nakoniec bezvodým, dobre sa odsaje a zosietený vyfarbený proteín sa vysuší v sušiarňi pri teplote do 60 °C. Vysušený proteín sa pomelie v guľovom mlyne a presituje cez sito 0,250 mesh a nakoniec cez sito 0,04 mesh aby sa odstránili najjemnejšie podiely.

Výťažok o váhe 1030 g má veľkosť častíc medzi 40 až 250 μ a obsah viazaného farbiva 9,2 % a je vysokocitlivým substrátom pre všetky typy proteázových enzýmov.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako proteín sa použije ovalbumín a 200 g farbiva Remazol brillant blue R a 20 ml epichlorhydrínu ako sieťovacieho reagentu.

Získaný proteín 1040 g má obsah viazaného farbiva 16 % hmot. a je veľmi citlivým substrátom na neutrálne a alkalické proteázy, menej citlivý na kyslé proteázy.

Príklad 3

218709

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako proteín sa použije kazeínový hydrolyzát 1200 g, ktorý sa však zle rozpúšťa a na jeho rýchlejšie rozpustenie sa najprv 1 hodinu mieša vo vode potom sa pridá hydroxid sodný podľa príkladu 1 a mieša sa 1 hodinu. Potom sa pridá 150 g farbiva Remazol brillant blue R a mieša sa 2 hodiny a nakoniec sa pridá 15 ml epichlorhydrínu, mieša sa 30 minút a nechá sa reagovať cez noc ako v príklade 1. Výťažok proteínu 1050 g má obsah viazaného farbiva 12 % hmot. a je rovnomerne citlivý ku všetkým typom proteázových enzýmov.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako proteín použijeme zmes sérového hovädzieho albumínu, ovalbumínu v pomere 1 : 1 a ďalší postup je rovnaký ako v príklade 1.

Výsledný zmesný chromogénny proteín má vyrovnanú citlivosť pre všetky typy proteázových enzýmov.

Vynález má uplatnenie predovšetkým v klinickej biochémií pri stanovení proteolytických enzýmov v biologických tekutinách ale i v priemyselnej aplikácii pri medzioperačnej kontrole kultivačných médií pri priemyslovej výrobe enzýmov.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob výroby nerozpustného chromolytického proteínu vyznačujúci sa tým, že v prvom stupni sa proteín s výhodou hovädzí sérum albumín, ovalbumín, kazeín alebo ich zmes rozpustí vo vode pri teplote 15 až 25 °C na roztok hmotnostnej koncentrácie 10–20 %, načo sa v druhom stupni pridá sieťovací reagent s výhodou epichlorhydrín v množstve 0,5 až 5,0 % hmotnostných na hmotnosť suchého proteínu a 5 až 20 % hmotnostných farbiva s výhodou dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[-3/sulfoethylsulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfónovej na hmotnosť suchého proteínu a po rozpustení farbiva sa reakčný roztok alkalizuje

s takým množstvom roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 25 % hmotnostných, aby jeho výsledná koncentrácia v reakčnom roztoku bola 0,7 až 1,2 % hmotnostných, dobre sa zamieša a nechá sa staticky reagovať po dobu 15 až 24 hodín pri teplote 15 až 25 °C, načo sa zosietený chromogénny gél mixuje v zriedenom metanole, neutralizuje sa s kyselinou octovou, odfiltruje a na filtri sa premýva zriedeným metanolom do bezfarebnej reakcie filtrátu, nakoniec sa premýva koncentrovaným metanolom, vysuší pri teplote do 60 °C a suchý proteín sa pomelie za sucha na guľovom mlyne na častice 40 až 250 μ .