



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

204179
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/26

(22) Prihlášené 13 01 78
(21) (PV 255-78)

(40) Zverejnené 31 07 80

(45) Vydané 15 12 83

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, KUČAR ŠTEFAN RNDr. CSc., KUNIAK
EUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA a KOLINA JOZEF ing. CSc., PRAHA

(54) Spôsob stanovenia aktivity amylolytických enzýmov

1

Vynález sa týka spôsobu stanovenia aktivity amylolytických enzýmov.

Spoľahlivé testy úrovne enzýmových aktivít v biologickom materiáli stali sa nepostradateľnými pre modernú diagnostickú prax. Tieto testy umožňujú jednoznačne potvrdiť alebo vylúčiť určitý druh onemocnenia. K pomerne najrozšírenejším a najčastejším onemocneniam, ktoré sa dajú diagnosticky určiť na základe zvýšenej hladiny α -amylázovej aktivity v moči a v krvnom sére patria mimo iných predovšetkým funkčné poruchy pankreasu. Nevýhodou väčšiny testovacích metód je, že nie sú dostatočne presné, vyžadujú objem analyzovanej vzorky až niekoľko 100 μ l prípadne výsledok dosiahnutý týmito metódami vyjadruje relatívnu hodnotu enzýmovej aktivity a k zisteniu absolútnej hodnoty aktivity treba ďalšie údaje resp. kalibračný graf alebo štandardizované krvné sérum. [Methoden der enzymatischen Analyse (III. vydanie), Vyd. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie Mannheim/Bergstr. 1974.]

Význam má aj štandardná metóda pre stanovenie aktivity amylolytických enzýmov v priemysle (napr. pri výrobe α -amylázy, glukoamylázy apod.).

Uvedené nedostatky rieši postup podľa vynálezu, ktorého výsledkom je úprava vo-

2

dorozpusťného polysacharidu typu $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukánu značeného nešpecificky rádionuklidom ^{14}C izolovaného z rádioaktívneho biologického materiálu, s výhodou zo zelených alebo modrozelených rias, v procese komplexného spracovania rádioaktívnej biomas. Čsl. patent 121 808, tak, že rádioaktívny $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukán o vhodnej špecifickej rádioaktivite sa použije ako substrát pri testovaní úrovne α -amylázovej (α -1,4-glukán 4-glukánhydrolázy EC 3.2.1.1.), α -glukozidázovej (α -D-glukozid glukohydroláza EC 3.2.1.20), β -amylázovej (α -1,4-glukán maltohydroláza EC 3.2.1.2) a glukoamylázovej (α -1,4-glukán glukohydroláza EC 3.2.1.3) aktivity v biologických materiáloch.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že pre stanovenie jedného z amylolytických enzýmov ako je α -amyláza, β -amyláza, α -glukozidáza alebo glukoamyláza, bez prítomnosti spriedacvných amylolytických aktivít sa použije rádioaktívny $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukán ($\text{U-}^{14}\text{C}$) o špecifickej rádioaktivite 1 až 10 kBq/mg, pričom aktivita enzýmu je úmerná prírastku rádioaktivity chromatograficky separovaných reakčných produktov, prípadne úbytku rádioaktivity východzieho $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukánu ($\text{U-}^{14}\text{C}$).

Výhodou navrhovaného spôsobu stanovenia aktivity amylolytických enzýmov je, že:

- umožňuje stanovenie absolútnej aktivity amylolytického enzýmu v prípade značného vodorozpustného substrátu,
- uvedená metóda je vysoko citlivá na prítomnosť amylolytického enzýmu,
- k stanoveniu aktivity amylolytického enzýmu postačuje podstatne menší objem analyzovanej biologickej tekutiny.

Príklad 1

K 10 μ l roztoku $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukánu ($U-^{14}C$), (3 mg) o špecifickej rádioaktivity 3,28 kBq/mg (0,01 kBq/Mekvivalent glukozylvej jednotky) v 20 mM fosfátovom pufrí o pH 7,0 s 10 mM chloridu sodného sa pridá 10 μ l krvného séra a nechá sa inkubovať po dobu 10 min. pri 37 °C. Po 10 minútach sa pridá ku vzorke 20 μ l acetónu, čím sa reakcia zastaví, vzorka sa nanesie na chromatografický papier Whatman 1 a chromatografická separácia prebieha v systéme etylacetát-pyridín-voda po dobu 24 hodín (meriame rádioaktivitu v zóne odpovedajúcej maltózo-vým štepným produktom) alebo v systéme 60% vodný roztok etanolu (po dobu 12 hodín) meriame zvyškovú rádioaktivitu na štarte chromatografického papiera.

Aktivita amylázy v séru je:

$$a = \frac{A_r}{A_s \cdot t} \cdot K$$

a = celková aktivita amylolytického enzýmu v analyzovanom objeme [ml]

A_r = aktivita odpovedajúca reakčným produktom [kBq]

A_s = špecifická aktivita východzieho substrátu

$$\frac{\text{kBq}}{\mu\text{ekv. glukozyl. jednotky}}$$

t = inkubačná doba [min]

K = enzým konštanta

K = 0,5 pre α -amylázu a β -amylázu

K = 1,0 pre glukooamylázu a glukozidázu.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že namiesto roztoku α -amylázy sa použije k analýze roztok β -amylázy a meria sa prírastok rádioaktivity v zóne odpovedajúcej pohyblivosťou maltóze.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že namiesto roztoku α -amylázy sa použije k analýze roztok glukooamylázy a meria sa prírastok rádioaktivity v zóne odpovedajúcej pohyblivosťou D-glukóze.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že k analýze sa použije roztok α -glukozidázy a meria sa prírastok v zóne odpovedajúcej pohyblivosťou D-glukóze.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob stanovenia aktivity amylolytických enzýmov, vyznačujúci sa tým, že pre stanovenie jedného z amylolytických enzýmov ako je α -amyláza, β -amyláza, α -glukozidáza alebo glukooamyláza, bez prítomnosti sprievodných amylolytických aktivít sa použije rádioaktívny $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukán ($U-^{14}C$)

o špecifickej rádioaktivity 1 až 10 kBq/mg, pričom aktivita enzýmu je úmerná prírastku rádioaktivity chromatograficky separovaných reakčných produktov, prípadne úbytku rádioaktivity východzieho $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukánu ($U-^{14}C$).