	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50300.1 – Stanovení aktivity trypsin inhibitoru	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ AKTIVITY TRYPSIN INHIBITORU

### 1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení aktivity trypsin inhibitoru v semenech hrachu a sóji.

### 2 Princip

Provede se extrakce trypsin inhibitorů ze vzorku a k extraktu se přidá trypsin. Zbytková aktivita trypsinu se měří po přidání syntetického substrátu BAPNA ( $N_{\alpha}$ -Benzoyl-DL-arginin p-nitroanilid hydrochlorid), který je trypsinem hydrolyzován za vzniku p-nitroanilinu. Množství uvolněného p-nitroanilinu se měří spektrofotometricky při 410 nm.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 TRIS báze, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, (např. SIGMA 7-9<sup>®</sup>).
- 3 Chlorid vápenatý hexahydrát.
- 4 Kyselina chlorovodíková, 35 % (m/m),  $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$ .
- 5 TRIS pufr,  $c = 0,05 \text{ mol/l}$ ,  $\text{pH} = 8,2$ .

Příprava: 12,1 g TRIS báze (2) a 8,76 g chloridu vápenatého (3) se naváží do kádinky a rozpustí v 1800 ml vody (1). Pomocí kyseliny chlorovodíkové (4) se pH pufru upraví na hodnotu 8,2 a roztok se kvantitativně převede do 2000ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku. Roztok se skladuje v lednici po dobu maximálně jednoho týdne.

- 6  $N_{\alpha}$ -Benzoyl-DL-arginin 4-nitroanilid hydrochlorid (BAPNA).
- 7 Dimethylsulfoxid.
- 8 BAPNA roztok.

Příprava: Do kádinky se naváží se 40 mg BAPNA (6), přidá se 1 ml dimethyl sulfoxidu (7) a rozpustí se v ultrazvukové lázni. Poté se naředí TRIS puftrem (5), kvantitativně se převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku TRIS puftrem (5). Roztok se připravuje denně čerstvý a během použití se udržuje při teplotě 37 °C.

- 9 Trypsin, z hovězího pankreasu, aktivita:  $\geq 10,000 \text{ BAEE jednotek/mg proteinu}$ .

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50300.1 – Stanovení aktivity trypsin inhibitoru	Vydání	1
		Revize	1

10 Kyselina chlorovodíková,  $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$ .

Příprava: 353 ml kyseliny chlorovodíkové (4) se přidává za stálého míchání do asi 600 ml vody (1). Po vytemperování se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.

11 Kyselina chlorovodíková,  $c(\text{HCl}) = 0,001 \text{ mol/l}$ .

Příprava: 0,5 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (10) se doplní v 2000ml odměrné baňce po značku vodou (1).

12 Trypsin, roztok.

Příprava: Naváží se 10 mg trypsinu (9) a kvantitativně se převede do 500ml odměrné baňky pomocí asi 25 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (11). Rozpustí se a doplní po značku zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (11). Roztok se skladuje při teplotě přibližně  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu maximálně jednoho týdne.

13 Kyselina octová ledová, 99,8 % (m/m),  $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g/ml}$ .

14 Kyselina octová,  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) \approx 30 \text{ } \%$  (V/V).

Příprava: 300 ml kyseliny octové (13) se přidává za stálého míchání do 700 ml vody (1).

15 Hydroxid sodný, roztok  $c(\text{NaOH}) = 0,01 \text{ mol/l}$ .

Příprava: 0,8 g hydroxidu sodného se rozpustí asi ve 100 ml vody (1), poté se roztok kvantitativně převede do 2000ml odměrné baňky a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou (1) po značku.

16 Kyselina chlorovodíková,  $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ .

Příprava: Do 100ml odměrné baňky s asi 60 ml vody (1) se přidá 8,8 ml kyseliny chlorovodíkové (4). Po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou (1) po značku.

#### 4 Přístroje a pomůcky

1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

2 Elektromagnetická míchačka.

3 pH metr.

4 Vodní lázeň s regulací teploty.


5 Digitální stopky.

6 Spektrofotometr (UV-VIS).

7 Minitřepačka typu Vortex.

8 Zkumavky, asi 20 ml a 10 ml, stojan na zkumavky.

9 Filtrační papír nezpevněný, rychlá filtrace, např. FILPAP KA 2.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50300.1 – Stanovení aktivity trypsin inhibitoru	Vydání	1
		Revize	1

## 5 Postup

### 5.1 Příprava zkušebního vzorku

Vzorek se pomele na vhodném laboratorním mlýnku. V průběhu mletí se dbá na to, aby teplota vzorku nepřekročila 40 °C. Pokud by hrozilo nebezpečí zahřátí vzorku, je možné vzorek pomlet s malým množstvím suchého ledu. Vzorky s obsahem tuku vyšším než 2 % (sója) se odtuční extrakcí s petroletherem nebo hexanem. Podrobný postup mletí je popsán v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kapitola 5.6, postup 60120.1 Úprava vzorků luskovin.

### 5.2 Extrakce trypsin inhibitoru

Do 100ml kádinky se naváží ( $1 \pm 0,001$ ) g zkušebního vzorku. Přidá se magnetické míchadlo, 50 ml roztoku hydroxidu sodného (15) a pomalu se míchá 3 h při laboratorní teplotě. Po ukončení míchání se upraví pH suspenze pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové (16) na hodnotu v rozmezí 8,4 – 10.

### 5.3 Stanovení aktivity trypsin inhibitoru

Pro další stanovení se připravená suspenze vzorku naředí vodou (1) tak, aby absorbance testovacího roztoku, obsahujícího 1 ml zkušebního vzorku (suspenze) a 1 ml vody, byla mezi 40 % až 60 % hodnoty absorbance nulového vzorku. Vhodné ředění suspenze se stanoví experimentálně, tzn. část připravené suspenze se naředí, připraví se testovací roztok obsahující 1 ml takto naředěné suspenze a 1 ml vody. Dále se připraví nulový vzorek, který obsahuje pouze 2 ml vody a provede se celé stanovení tak, jak je dále popsáno. V závislosti na změřené absorbanci se pak suspenze vhodně naředí a provede se vlastní stanovení.


Do 20ml zkumavek se vždy ve dvou paralelních stanoveních dává (0; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8) ml zředěné suspenze. Poté se do každé zkumavky přidá voda (1) tak, aby celkový objem ve zkumavce byl 2 ml.

Do první zkumavky se přidají 2 ml trypsinu (12), obsah zkumavky se zamíchá na minitřepačce, zkumavka se vloží do vodní lázně o teplotě 37 °C a zapnou se stopky. Postupně se přidávají 2 ml trypsinu (12) do všech zkumavek. Do vodní lázně se vkládají v intervalech 15 s.

Po 10 min (měřeno od vložení první zkumavky do vodní lázně) se první zkumavka vyjme, přidá se do ní 5 ml roztoku BAPNA (8) zahřátého na teplotu 37 °C, zamíchá se na minitřepačce a vloží zpět do lázně. Vždy po 15 s se takto přidá 5 ml roztoku BAPNA (8) postupně do všech zkumavek. Každá ze zkumavek se nechá v lázni po dobu 10 min.

Po uplynutí 10 min se první zkumavka opět vyjme, přidá se 1 ml kyseliny octové (14), čímž se zastaví reakce. Obsah zkumavky se promíchá a zkumavka se umístí do stojanu mimo vodní lázeň. Stejným způsobem se přidá 1 ml kyseliny octové (14) v intervalech 15 s postupně do všech zkumavek.

Dále se připraví slepé pokusy ve dvou paralelních stanoveních. Pro slepý pokus  $S_0$  se do zkumavky napipetují 2 ml vody a pro slepý pokus  $S_2$  2 ml zředěné suspenze vzorku. Do obou zkumavek se přidá 5 ml roztoku BAPNA (8). Obsah zkumavek se zamíchá na minitřepačce a zkumavky se vloží na 10 min do vodní lázně o teplotě 37 °C. Po uplynutí

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50300.1 – Stanovení aktivity trypsin inhibitoru	Vydání	1
		Revize	1

stanovené doby se zkumavky vyjmou z lázně. Do každé se přidá 1 ml kyseliny octové (14), obsah zkumavky se zamíchá, pak se přidají 2 ml trypsinu (12) a opět se zamíchá.

Obsah všech zkumavek včetně slepých pokusů se přefiltruje přes suchý papírový filtr do 10ml zkumavek a změří se absorbance takto připravených roztoků při vlnové délce 410 nm.

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Aktivita trypsin inhibitoru ve vzorku se vyjadřuje v trypsin inhibitorových jednotkách, vztažených na mg vzorku (TIU/mg). Jedna trypsin inhibitorová jednotka (TIU) je definována jako pokles absorbance o 0,01 absorbanční jednotky, měřeno při 410 nm v 10 ml reakční směsi za výše uvedených podmínek.

TIU/mg se vypočítá pro každé jednotlivé ředění (tzn. při použití 0,6 ml, 1,0 ml, 1,4 ml a 1,8 ml naředěné suspenze vzorku). Vzhledem k tomu, že se provádí paralelní stanovení, získá se 8 hodnot z nichž se vypočítá průměrná hodnota TIU/mg. Výsledek se zaokrouhlí na jedno desetinné místo.

Výpočet trypsin inhibitorové jednotky v ml naředěné suspenze vzorku (TIU/ml) se provede dle vztahu

$$TIU / ml = \frac{100 \times [(A_0 - S_0) - (A_{VZ} - S_2)]}{Y}$$

kde  $A_0$  je absorbance nulového vzorku, obsahujícího 0 ml naředěné suspenze vzorku a 2 ml vody,

$A_{VZ}$  absorbance roztoku vzorku,

$S_0$  absorbance slepého pokusu, obsahujícího 0 ml naředěné suspenze vzorku a 2 ml vody,

$S_2$  absorbance slepého pokusu, obsahujícího 2 ml naředěné suspenze vzorku,


$Y$  objem naředěné suspenze vzorku použitý v příslušném pokusu v ml.

Aktivita se poté vyjádří v trypsin inhibitorových jednotkách vztažených na mg vzorku

$$TIU / mg = \frac{TIU / ml \times R \times V}{1000}$$

kde  $V$  je původní objem extraktu (suspenze), tzn. 50 ml,

1000 konverzní faktor pro přepočítání z g na mg,

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50300.1 – Stanovení aktivity trypsin inhibitoru	Vydání	1
		Revize	1

R ředicí faktor, zohledňující ředění suspenze vzorku před vlastním stanovením,

$$R = V_A / V_m$$

$V_A$  celkový objem po naředění v ml,

$V_m$  objem extraktu (suspenze) pipetovaný pro naředění v ml.

## 7 Literatura

- 1 AOCS Official Method Ba 12-75, Trypsin Inhibitor Activity, 1993.