

AGRITEC PLANT RESEARCH s.r.o.

Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk



**Optimalizovaná metodika
pro stanovení inhibitorů trypsinu u hrachu
(*Pisum sativum* L.)**

**Autoři:
Mgr. Jiří Horáček, PhD. & kol.**

2008

OPTIMALIZOVANÁ METODIKA PRO STANOVENÍ INHIBITORŮ TRYPSINU U HRACHU (*PISUM SATIVUM* L.)

Metodika vypracovaná jako výstup projektu MSM2678424601

Jiří Horáček a kol.

horacek@agritec.cz

Vydal: Agritec Plant Research s.r.o.

v nakladatelství Agritec, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk 2008

<http://www.agritec.cz>

ISBN: ISBN 978-80-903868-3-9

Oponenti: Prof. Ing. Václav Hosnedl, CSc.
Ing. Tomáš Mezlík

© AGRITEC PLANT RESEARCH, s.r.o., Šumperk 2008

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na osobu uvedenou výše.

Obsah

1	ÚVOD	4
1.1.	<i>CÍL METODIKY</i>	4
1.2.	<i>DEDIKACE</i>	4
2	PŘÍPRAVA	5
2.1.	<i>PŘÍSTROJE A POMŮCKY</i>	5
2.2.	<i>CHEMIKÁLIE A ROZTOKY</i>	5
3	PRACOVNÍ POSTUP	6
3.1.	<i>PRINCIP STANOVENÍ</i>	6
3.2.	<i>PŘÍPRAVA VZORKU</i>	6
3.3.	<i>ŘEDĚNÍ VZORKU</i>	6
3.4.	<i>ENZYMOVÁ REAKCE</i>	6
3.5.	<i>ČASOVÉ SCHÉMA</i>	6
3.6.	<i>SCHÉMA PIPETOVÁNÍ NA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKU</i>	7
3.7.	<i>VÝPOČET</i>	7
4	PROTOKOL O ZKOUŠCE	8
5	ZDŮVODNĚNÍ METODIKY	8
6	ZÁVĚR – POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	8
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	8

1 Úvod

1.1. Cíl metodiky

Inhibitory trypsinu (TI) jsou hlavním antinutričním faktorem semen hrachu. Stanovení TIA (z anglického „Trypsin inhibitor activity“) je využíváno při šlechtění nových odrůd hrachu s důrazem na nízký obsah TI. Z toho vyplývají i požadavky na analytickou metodu, která by měla být rychlá, levná a měla by umožňovat analýzu větších sérií vzorků. Cílem této metodiky je podrobné představení právě takové analytické metody.

1.2. Dedikace

Metodika byla vytvořena a optimalizována za finanční podpory projektu MSM2678424601.

2 Příprava

2.1. *Přístroje a pomůcky*

laboratorní mlýnek, rotační třepačka, analytické váhy, třepačka s termostatem pro mikrotitrační destičky, chlazená centrifuga s rotorem pro mikrozkušavky 1,5 ml, ELISA reader s filtrem 410 nm, osmikanálová pipeta, odměrné baňky, pipety, mikrozkušavky 1,5 ml

2.2. *Chemikálie a roztoky*

Všechny použité chemikálie jsou čistoty *p.a.* Pro přípravu roztoků se používá demineralizovaná nebo destilovaná voda.

1. extrakční pufr 1

Naváží se:	glycin	750 mg
	NaCl	585 mg
	močovina	600 mg
	EDTA	3,7 g
	0.1M NaOH	95,7 ml

Převeďte se kvantitativně do odměrné baňky 1000 ml, rozpustí se v 900 ml destilované vody, pH roztoku se upraví na 11,0 a doplní se vodou po rysku.

2. pufr 2 na přípravu umělého substrátu

Naváží se:	TRIS-báze	6,05 g
	CaCl ₂ .6H ₂ O	4,38 g

Převeďte se kvantitativně do odměrné baňky 1000 ml, rozpustí se v 900 ml destilované vody, pH roztoku se upraví na 8,2 a doplní se vodou po rysku.

3. umělý substrát BAPNA

Naváží se 40 mg BAPNA (N α -benzoyl-DL-arginin p-nitroanilid), rozpustí se v 1 ml DMSO (dimethyl sulfoxid) a tento roztok se doplní pufrem 2 do 100 ml (v odměrné baňce). Roztok se před analýzou připravuje vždy čerstvý. Před analýzou se roztok vytemperuje na 37 °C.

4. 1 mM HCl

43 μ l koncentrované HCl se doplní destilovanou vodou do 500 ml.

5. trypsin

4 mg trypsinu (lyofylizovaný prášek z hovězího pankreatu, 11800 jednotek/mg) se rozpustí ve 100 ml 1 mM HCl nebo se připraví zásobní roztok 400 mg/10 ml (rozpuštěním v 1 mM HCl) a poté se naředí 100 μ l zásobního roztoku do 100 ml (1mM HCl). Roztok se před analýzou připravuje vždy čerstvý. Před analýzou se roztok vytemperuje na 37 °C.

6. 30 % kyselina octová

150 ml koncentrované kyseliny octové se doplní vodou do 500 ml.

7. aceton

3 Pracovní postup

3.1. Princip stanovení

Stanovení se provádí dvoubodovou metodou (ředění vzorků 3x a 5x) vždy v tripletech, reakce probíhá v mikrotitračních destičkách přesně 10 minut při 37 °C v termostatovaném prostoru třepačky pro mikrotitrační destičky. Absorbance se měří při 410 nm pomocí ELISA readeru, vždy vzorek proti příslušnému blanku.

3.2. Příprava vzorku

1. Naváží se 1,5 g semen a pomele se na laboratorním mlýnku.
2. 1 g dobře homogenizovaného semenného šrotu se naváží do 100 ml Erlenmayerových baněk, přidá se 25 ml acetonu, přikryje hliníkovou fólií a ponechá 24 hod (odmaštění).
3. Aceton se poté opatrně dekantuje do láhve s organickým odpadem a vzorek se vysuší volně na vzduchu.
4. Ke vzorku se napipetuje 50 ml extrakčního pufru 1, extrakce probíhá 3 hod za stálého míchání na rotační třepačce.
5. 1 ml extraktu se napipetuje do 1,5 ml mikrozkmavek, pak se odstředí při 15000g, při 4 °C, po dobu 5 min. Vzorek je možno uchovat při -20 °C.

3.3. Ředění vzorku

Ředění se provádí vždy před analýzou.

Pro hrách se vzorek ředí 3x (200 µl vzorku + 400 µl pufru 1) a 5x (100 µl vzorku + 400 µl pufru 1).

3.4. Enzymová reakce

1. Substrát BAPNA a roztok trypsinu se vytemperují na 37 °C.
2. Na mikrotitrační destičku se podle schématu pipetování postupně pipetují pufr 1, vzorky a 30 % kyselina octová (do jamek se slepým vzorkem).
3. Do všech jamek se pipetuje umělý substrát BAPNA vytemperovaný na 37 °C. Mikrotitrační destička se vloží do termostatu, uzavřením termostatu se začíná měřit čas.
4. Mikrotitrační destička se inkubuje při 37 °C po dobu 10 min za stálého třepání.
5. Po uplynutí 10 min se do všech jamek přidává 40 µl roztoku trypsinu (vytemperovaného na 37 °C).
6. Po uplynutí dalších 10 minut se do jamek se vzorky a reakčními standardy pipetuje 30 % kys. octová (zastaví se enzymová reakce). Enzymová reakce v každé jamce musí trvat **přesně 600 s** !

3.5. Časové schéma

1. čas 0 min: - pipetuje se pufr 1, vzorky a kyselina octová dle schématu pipetování
- do všech jamek se pipetuje 100 µl substrátu BAPNA
2. čas 10 min: - do všech jamek se pipetuje 40 µl roztoku trypsinu
3. čas 20 min: - do jamek s reakčními standardy a se vzorky se pipetuje
20 µl roztoku kys. octové

4 Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce obsahuje tyto informace:

1. odkaz na tuto metodiku
2. všechny informace nutné pro úplnou identifikaci vzorku
3. výsledky vyjádřené v TIU

5 Zdůvodnění metodiky

V současnosti je známo více metodik pro analýzu inhibitorů trypsinu u hrachu. Předkládaná metoda byla vytvořena jako kombinace několika známých metodik. Využívá alkalické extrakce vzorku do glycinového pufru pH 11 (della Gatta *et al.* 1988), dále nahrazuje klasickou analýzu ve zkumavkách pomocí mikrotitračních destiček (Bacon *et al.* 1995, Page *et al.* 2000). Práce ve formátu mikrotitračních destiček přináší vedle významné úspory chemikálií zejména zvýšení rychlosti a reprodukovatelnosti analýzy (paralelně je pomocí vícekanálové pipety zpracováno osm vzorků v šesti opakováních). Metoda byla ověřena kruhovými testy ve spolupráci s ÚKZÚZ Brno a byla již využita při řešení výzkumných úkolů mimo společnost Agritec Plant Research (Dvořák *et al.* 2005).

6 Závěr – popis uplatnění metodiky

Metodika je určena pro zemědělské laboratoře, pro které se zabývají problematikou kvality hrachu. Metodika bude využívána při analýze kvality hrachu, konkrétně při stanovení antinutričních látek.

7 Seznam použité literatury

Bacon J.R., Wanigatunga S.C.D.R., An J., Fenwick G.R. (1995): A microassay for the analysis of trypsin inhibitor activity in peas, *Food chemistry*, **52**: 77-80

Gatta della C., Piergiovanni R., Perrino P. (1988): An Improved Method for the Determination of Trypsin Inhibitor Levels in Legumes, *Lebensm.Wiss. u. Technol.*, **21**: 315-318

Dvořák R., Pechová A., Pavlata L., Filípek J., Dostálová J., Réblová Z., Klejdus B., Kovařík K., Poul J. (2005): Reduction in the content of antinutritional substances in pea seeds (*Pisum sativum* L.) by different treatments, *Czech J. Anim. Sci.*, **50**: 519-527

Page D., Quillien L., Duc G. (2000): Trypsin inhibitory activity measurement: simplifications of the standard procedure used for pea seed, *Crop Sci.* **40**: 1482-1485