



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU 199 124

## K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> C 07 H 21/00

(61)

(23) Výstavná priorita  
(22) Prihlásené 08 03 78  
(21) PV 1457-78

(40) Zverejnené 17 09 79  
(45) Vydané 30 09 82

(75)

Autor vynálezu

ŠIMUTH JOZEF ing.CSc.

ZELINKA JÁN doc.ing.DrSc.

TURŇA JÁN, BRATISLAVA

(54) Iontomenič pre izoláciu nukleových kyselín a bielkovín a spôsob jeho prípravy

1

Vynález sa týka iontomeniča pre izoláciu nukleových kyselín a bielkovín. Pri jeho príprave sa využíva schopnosť karboxymetylovej skupiny viazanej na celulóзовý dextranový alebo polyakrylamidový nosič vytvárať s polyetylénimínom anexový iontomenič, na ktorý sa môže v ďalšom kroku naviazať nukleová kyselina, čím sa vytvorí chromatografické médium pre kolonovú afinitnú chromatografiu enzýmov metabolizmu nukleových kyselín.

Doteraz pre izoláciu enzýmov a nukleových kyselín sa používajú rôzne chromatografické média, vyvinuté v zahraničí. Využívajú rozdiely v ionogenných vlastnostiach bielkovín a nukleových kyselín. Ide o iontomeniče typu katexov karboxymetylcelulóza, karboxymetyl sephadex, fosfocelulóza a i., a anexov dietylaminocetylcelulóza, dietylaminocetylsephadex a i.

Tieto chromatografické média sa používajú ako náplň do kolón pre kolonovú chromatografiu enzýmov, nukleových kyselín, a ich zložiek.

Spoločnou nevýhodou týchto iontomeničov je ich malá selektivita, pretože nedokážu rozdeliť navzájom nukleové kyseliny a bielkoviny, hoci sa značne odlišujú v iónových vlastnostiach. V dôsledku tohoto sa pri purifikácii enzýmov a nukleových kyselín musia používať aj iné deliace metódy (gelová filtrácia, gradientová centrifugácia, preparatívna

elektroforéza a pod.). Ide o výrobky zahraničných firiem, ktorých dovoz k nám predstavuje nemalú položku v devízových prostriedkoch. Vzhľadom na súčasné vývojové triedy v molekularno-biologickom výskume, dá sa očakávať, že spotreba chromatografických médií bude ďalej vzrastať, najmä však takých, ktoré majú špecifické deliace schopnosti. Doterajšie spôsoby prípravy chromatografických médií obsahujúcich nukleové kyseliny sú buď značne náročné čo do prípravy základného nosiča (bromácia celulózy, väzba ligendov, atď.), alebo sú založené na čistej empirii - väzba nukleových kyselín ako vysokomolekulárnej látky s celulózou, alebo agarózou. Reprodukovateľnosť týchto metód je nízka, pretože vyžadujú okrem veľkej laboratórnej rutiny značné nároky na homogenitu použitého média, čo u celulózy a agarózy sa nie vždy dá dosiahnuť. Tieto nedostatky odstraňuje chromatografické médium, ktoré vznikne naviazaním nukleovej kyseliny na iontomenič typu polyetylénilín - karboxymetyl - celulóza. Nakoľko pri tejto reakcii dochádza k väzbe voľných kladných  $[-NH-]^+$  skupín polyetylénilínu so zápornými skupinami  $[-PO_4]^-$  nukleových kyselín ostávajú bázy nukleových kyselín dostupné pre špecifickú interakciu s enzýmami. Týmto jednoduchým spôsobom sa dá pripraviť chromatografické médium, ktoré je schopné viazať len tie látky zo živých systémov, ktoré majú afinitu k nukleovým kyselinám.

Spôsob prípravy iontomeniča zahrňuje tieto operácie:

### 1. aktivácia karboxymetyl celulózy

100 g práškovej karboxymetyl celulózy sa zmieša s 1,5 l 0,5 N NaOH. Po 30 minútovom státi pri izbovej teplote sa dekantuje destilovanou vodou do pH 8,0. Potom sa karboxymetylcelulóza premieša s 1,5 l 0,5 N HCl a po 30 minútach státi pri izbovej teplote sa dekantovalo vodou do pH 5,5.

### 2. Úprava polyetylénilínu.

Retok polyetylénilínu výrobok firmy BASF Ludwigshafen /NSR/ označený ako Polymín P (číslo 34 - 1460) sa pripravil následovne:

20 ml Polymínu P sa zmiešalo s 80 ml tlmivého roztoku obsahujúceho 0,02 M TRIS (hydroxymetyl aminometan) pH 7,4 a 0,1 M chelátón III. Nerozpustný podiel sa odstránil centrifugáciou pri 3 000 x g. Sediment sa zahodil a supernatant sa dialyzoval 20 hodín oproti 2 litrom tlmivého roztoku obsahujúceho 0,02 M TRIS (hydroxymetyl aminometan) pH 7,4 a 0,1 M chelátón III.

### 3. Príprava Polyetylenimínu - carboxymetylcelulózy (v ďalšom PEI - CM - celulózy).

Karboxymetylcelulóza a Polymín P upravené uvedeným spôsobom sa zmiešali v pomere 1 : 1 až 1 : 100 a za občasného miešania sa suspenzia zahrievala pri teplote od 25 až 45 °C dve hodiny a nakoniec sa zmiešala pri izolovanej teplote 15 hodín. Potom sa PEI - CM - celulóza naniesla na kolónu cmX cm a premývala sa pri izbovej teplote 1,5 l tlmivým roztokom, ktorý obsahoval: 0,01 M TRIS (hydroxymetyl aminometan) pH 8,0; 1 M 2 mercaptoetanol; 0,1 M chelátón III; 1 M chlorid draselný a glycerín v množstve, aby vznikol 5 % roztok glycerínu v tlmivom roztoku. Takto pripravené chromatografické médium má

kapacitu: maximálne 50 mg hovädzieho sérum albumínu na 1 ml vlhkého chromatografického média, pričom pri pH 8,0 sa hovädzie sérum albumín naviaže na karboxymetylcelulózu.

4. Príprava dezoxiribonukleová kyselina - polyetylenimín - karboxymetylcelulózy (ďalej DNA - PEI - CM - celulóza).

K suspenzii 5 g PEI - CM - celulózy v 20 ml tlmivého roztoku obsahujúceho 0,01 M TRIS (hydroxymetyl metan) pH 8,0 a 0,1 M chelatón III. sa pridala 250 mg dezoxiribonukleová kyselina izolovaná z calf thymusu v 10 ml tlmivého roztoku hore uvedeného zloženia. Dezoxiribonukleová kyselina sa pred zmiešaním s celulózou tepeľne denaturovala zahriatím na 100 °C počas 5 minút. Po desaťminútovom miešaní suspenzie PEI - CM - celulózy s DNA sa centrifugovalo pri 3 000 x g. K sedimentu sa po vysušení pri 50 °C počas 6 hodín a homogenizácii v trecej miske pridá 15 ml tlmivého roztoku vyššie uvedeného zloženia obsahujúci 2 M chlorid horečnatý. Po premiešaní sa suspenzia naniesie na kolonu 2 x 10 cm a premýva sa do nulovej absorbancie pri 260 nm. Potom sa kolona premýva 200 ml tlmivého roztoku uvedeného zloženia obsahujúci 0,1 M chlorid draselný a je pripravená pre izoláciu enzýmov metabolizmu nukleových kyselín.

Pripravené iontomeniče sa môžu použiť pre izoláciu bielkovín a nukleových kyselín afinitnou chromatografiou biologických materiálov.

## P R E D M E T      V Y N Á L E Z U

1. Iontomenič pre izoláciu nukleových kyselín a bielkovín vyznačujúci sa tým, že sa skladá z nukleovej kyseliny, polyetylenimínu a karboxy-metylovej skupiny viazanej na inertný nosič, napríklad celulózu, polydextran, polyakrylamid.
2. Spôsob prípravy iontomeniča podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa nukleová kyselina, alebo polynukleotid viaže na chromatografické médium pripravené reakciou polyetylenimínu s karboxymetylovou skupinou naviazanou na inertný nosič, napríklad celulózu, polydextran, polyakrylamid vo váhovom pomere 1 : 10 až 1 : 100 pri pH 7 až 9,0 a teplote 45 °C.