



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

258607
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 30/00

(22) Prihlášené 08 03 85
(21) (PV 1639-85)

(40) Zverejnené 17 12 87

(45) Vydané 15 03 89

(75)
Autor vynálezu

PODHRADSKÝ DUŠAN doc. ing. CSc., KOŠICE, SUCHÁR GEJZA ing. CSc.,
PREŠOV, KRISTIAN PAVOL prof. ing. DrSc., KOŠICE.
KRČMAR STANISLAV ing. CSc., BRATISLAVA, HUNČÍKOVÁ SOŇA ing.,
TRENČÍN

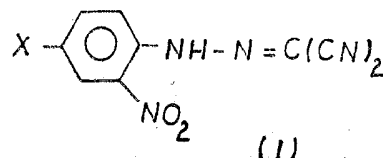
(54) Spôsob izolácie SH-amínokyselín, peptidov a proteínov

1

Riešenie sa týka spôsobu oddelenia sulfhydrilových od nesulfhydrilových zložiek zo zmesi proteínov kovalentnou chromatografiou.

Podstata riešenia spočíva v tom, že vzorka sa nanese na kolónu obsahujúcu ako sorbent 2-nitrofenylhydrazónpropándinitrilové deriváty polymérov obecného vzorca I, kde X znamená Y—O—CO alebo Y—NH—CO a Y je anhydroglukózový polymér, polyhydroxymetylmetakrylát, gél na báze agarózy alebo celulóza za prítomnosti tlmivého roztoku o pH až 5 a po pretečení celého objemu vzorky sa kolóna premyje tlmivým roztokom o pH 7 až 8.

2



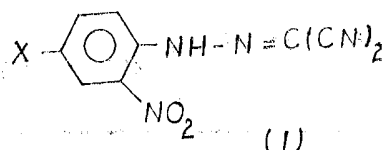
Vynález sa týka spôsobu izolácie SH-amínokyselín, peptidov a proteínov zo zmesi obsahujúcej sulfhydrylové a nesulfhydrylové zložky proteínov kovalentnou chromatografiou.

SH-skupiny majú v štruktúre živej hmoty esenciálny význam [P. J. Jocelyn: Biochemistry of SH-group, Academic Press, London — N. Y. 1972]. Sú súčasťou enzýmových a proteínových štruktúr, v peptidoch sa zúčastňujú oxidačno-redukčných, katalytických, detoxikačných procesov atď. Izolácia peptidov a proteínov je vo všeobecnosti dosť zložitý problém. Jednou z možností jeho riešenia je imobilizácia týchto látok na rôznych sorbentoch cez SH-skupiny zabudovaného cysteínu [K. Brocklehurst: Int. J. Biochem. 10, 259 [1979], D. Podhradský, P. Kristian: Chem. zvesti 35, 567 [1981]]. Tieto metódy izolácie však narážajú na problém desorpcie z nosiča, ktorá sa väčšinou uskutočňuje vytesňovaním iným tiolom, čím sa vlastne znehodnocuje izolovaný produkt. Iným problémom býva pomerne malá životnosť sorbenta, alebo neschopnosť jeho regenerácie. Napriek tomu je reverzibilná kovalentná chromatografia pre izoláciu SH látok veľmi perspektívna.

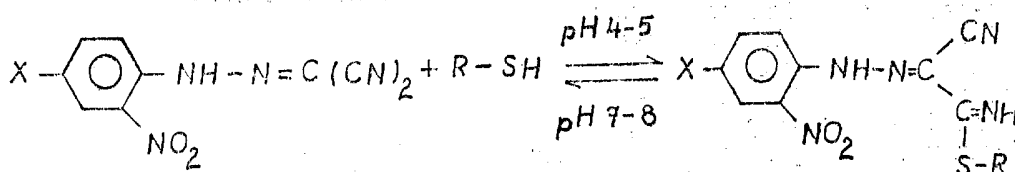
Otázka väčšieho využitia kovalentnej chromatografie sa týka hlavne výboru vhodného ligandu, ktorý by špecificky a reverzibilne reagoval s SH-skupinami amínokyselín, peptidov a proteínov. Bol popísaný ligand fenyldiazónopropándinitrilového typu, ktorý po naviazaní na celulózu umožňuje zachytávať nízkomolekulové tioly [V. Marko, P. Gemeiner, M. Antalík, E. Šturdík, L. Drobnica, P. Kristian: Reactive Polymers 1, 91 [1983]. Desorpcia z takéhoto nosiča

prebieha však len pri vysokých hodnotách pH (cca 12), kedy väčšina SH-skupín sa oxiduje na disulfid. Pri proteínoch vedie takáto imobilizácia k nevratným štrukturálnym zmenám a u enzýmov sa stráca aktivita.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob izolácie SH-amínokyselín, peptidov a proteínov podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že vzorka sa naniesie na kolónu obsahujúcu 2-nitrofenylhydrazónpropándinitrilové deriváty polymérov obecného vzorca I



kde X znamená Y—O—CO alebo Y—NH—CO a Y je anhydroglukózový polymér, polyhydroxymetylmetakrylát, gél na báze agarózy alebo celulóza za prítomnosti tlmivého roztoku o pH 4 až 5 a po pretečení celého objemu vzorky sa kolóna premyje tlmivým roztokom o pH 7 až 8. Polyméry 2-nitrofenylhydrazónopropándinitrilového typu majú výhodu v tom, že pK_a hodnota ich amínoskupín sa nachádza v rozmedzí 5,3—5,6, čo principiálne znamená, že sorbujúca látka sa viaže pri pH 4—5 a uvoľňuje pri pH 7—8. Viazanie a uvoľňovanie SH-látok na polymér sa môže znázorniť rovnicou



pričom X je hore uvedené.

Popísaná metóda izolácie SH-amínokyselín, peptidov a proteínov podľa vynálezu má oproti iným metódam výhody v tom, že: viazanie a uvoľňovanie látky sa uskutočňuje veľmi jednoducho — zmenou pH v režime 4—8, čím SH-skupiny imobilizovanej látky zostávajú zachované, pri vytesňovaní sa nepoužíva iná látka, ktorá by kontaminovala vzorku, ďalej odpadá regenerácia nosiča, stačí ekvilibrácia kolóny na pH viazania a nakoniec v dôsledku vysokej reaktivity ligandu je aj väzobná schopnosť nosiča veľmi vysoká.

Príklad 1

Izolácia SH-amínokyselín, peptidov a proteínov

Vzorka v ktorej sa nachádza glutatión, cysteín, alebo iný SH-proteín v koncentrácii najviac 2 mg/ml (napr. vodný extrakt z kvasiniek, deproteínovaný homogenát živočíšnych, alebo rastlinných tkanív a pod.) sa naniesie na 10 cm stĺpec nosiča s 2-nitrofenylhydrazónopropándinitrilovým ligandom, ktorý bol ekvilibrovaný na pH 4—5. Po premývaní pušom o rovnakom pH, kto-

ry obsahuje 0,01 % EDTA, sa z kolóny odstráni všetky zložky neobsahujúce SH-skupiny. Po zmene pH na 8 sa z kolóny vymyjú SH-amínokyseliny, peptidy alebo proteíny. Detekcia sa urobí Ellmanovým činidlom (G. L. Ellman; Arch. Biochem. Biophys. 74, 443 [1958]), alebo UV detekciou v prípade proteínov. Návratnosť sorpcie je 96—97 %.

Príklad 2

Separácia SH-proteínov

V pufrí o pH 4—5 sa rozpustia 2 mg proteínov, ktoré sú zmesou sulfhydrylových a nesulfhydrylových zložiek. Po nanosení vzorky na kolónu s 2-nitrofenylhydrazónpropándinitrilovým ligandom sa pri pH 4 až 5 oddelia proteíny, ktoré neobsahujú SH-skupiny zabudovaného cysteínu. Po gradien-

tovej zmene pufru na pH 8 sa vytesnia SH-proteíny. Detekcia z kolóny vychádzajúcich zložiek sa robí pomocou UV₂₅₄, alebo UV₂₀₈.

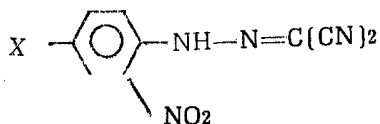
Príklad 3

Koncentrovanie enzýmu

2 mg enzýmu, ktorý obsahuje SH-skupiny (napr. ureáza, oxidoreduktázy a pod.) sa rozpustí v 5 dm³ pufru o pH 4—5 v ktorom sa nachádza 0,01 % EDTA. Uvedený roztok enzýmu sa prečerpáva cez kolónu pomocou peristaltického čerpadla, pri prietoku 2 ml/min. Po prečerpaní celého objemu sa na kolóne zachytený enzým uvoľní pufróm o pH 7—8. Pomocou zmeranej enzýmovej aktivity je možné zistiť 100-násobné za-koncentrovanie enzýmu.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob izolácie SH-kyselín, peptidov a proteínov zo zmesi obsahujúcej sulfhydrylové a nesulfhydrylové zložky proteínov kovalentnou chromatografiou pomocou nosiča s fenyhydrazónpropándinitrilovým ligandom vyznačujúci sa tým, že vzorka sa nanese na kolónu obsahujúcu ako sorbent 2-nitrofenylhydrazónpropándinitrilové deriváty polymérov obecného vzorca I



(I)

kde X znamená Y—O—CO alebo Y—NH—CO a Y je anhydroglukózový polymér, polyhydroxymetylmetakrylát, gél na báze agarózy alebo celulóza za prítomnosti tlmivého roztoku o pH 4 až 5 a po pretečení celého objemu vzorky sa kolóna premyje tlmivým roztokom o pH 7 až 8.