



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

218702
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 13 L 3/00

(22) Prihlášené 19 01 81
(21) (PV 357-81)

(40) Zverejnené 28 05 82

(45) Vydané 01 06 85

(75)

Autor vynálezu

GEMEINER PETER ing. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JIŘÍ ing. CSc.,
LEDNICA, KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob vysokokapacitnej imobilizácie proteínov

Vynález sa týka spôsobu vysokokapacitnej imobilizácie proteínov.

Podstata vynálezu, v ktorom sa v prvom stupni pektín alebo vodorozpustná soľ kyseliny pektovej zosieťuje v alkalickom prostredí 2-chlórmetyloxiránom spočíva v tom, že sa v druhom stupni aktivujú karboxylové skupiny karbodiimidmi, hydrazín hydrátom či hydrazín hydrátom a potom dusitanom sodným v prítomnosti kyseliny soľnej a v treťom stupni sa využitím známych metód prevedie naviazanie proteínu.

Vynález sa týka spôsobu vysokokapacitnej imobilizácie proteínov na modifikovanom pektíne.

Kovalentná imobilizácia proteínov na polysacharidy vyžaduje v prvom rade vhodnú aktiváciu polysacharidu. Jedným z často používaných spôsobov je zavedenie karboxylových skupín. Tak je tomu napr. v prípade komerčných karboxymetyl-derivátov celulózy (CM-celulózy Lovosa, Whatman), agarózy (CM-Sepharose^R), alebo sieťovaných dextrans (CM-Sephadex^R C). Takéto karboxylové deriváty možno po aktivácii karbodiimidom priamo použiť na imobilizáciu proteínov. Väčšinou je však vhodnejšie previesť ich na hydrazidy, resp. azidy či až izokyanáty.

Zavedenie karboxylových skupín ako jeden zo spôsobov aktivácie polysacharidov nie je ovšem potrebné, keď polysacharid už tieto skupiny obsahuje. Tak je tomu v prípade sieťovanej kyseliny pektovej, ktorá sa pripraví sieťovaním pektínu epichlórhydrínom v alkalickom prostredí (V. Tibenský, L. Kuniak, Čs. patent 140 713 [1971]). Takto sieťovaná kyselina pektová je makroporéznym, gélovitým materiálom s napučiacim objemom (n. o.) vo vode 4 až 14 ml/g. Stupeň napučievania možno nastaviť voľbou podmienok sieťovania. Sieťovaná kyselina pektová má vysoký stupeň substitúcie karboxylovými skupinami, DS ~ 1.

Už v takejto forme, s využitím karbodiimidov, možno použiť sieťovanú kyselinu pektovú ako nosič pre kovalentnú imobilizáciu proteínov. Ďalšie možnosti dáva prevedenie sieťovanej kyseliny pektovej na hydrazidy, resp. ďalej na azidy. Zatiaľ čo hydrazidové deriváty umožňujú výhodne viazať glykoproteíny cez ich cukorné zložky, azidy viažu proteíny cez ich polypeptidický reťazec.

Podstata spôsobu vysokokapacitnej imobilizácie proteínov, v ktorom sa v prvom stupni pektín alebo vodorozpustná soľ kyseliny pektovej zosieťuje v alkalickom prostredí 2-chlórmetyl-oxiránom, spočíva v tom, že sa v druhom stupni aktivujú karboxylové skupiny karbodiimidmi, hydrazín hydrátom či hydrazín hydrátom a potom dusitanom sodným v prítomnosti kyseliny soľnej a v treťom stupni sa využitím známych metód prevedie naviazanie proteínu.

Pre uvedené postupy imobilizácie proteínov je vhodná slabo zosieťovaná kyselina pektová (s epichlórhydrínom), s napučiacim objemom (n. o.) 14 ml H₂O/g resp. 3,7 ml metanolu/g. Takýto gél má totiž vysoký vylučovací limit pre proteíny (až do molekulovej hmotnosti 80 000). Tiež pri príprave jej derivátov, napr. hydrazidov, možno dosiahnuť až DS 0,42, pričom zvyšok karboxylových skupín je vo forme esteru.

Výhodou navrhovaného spôsobu vysokokapacitnej imobilizácie proteínov na vodонераzpustné deriváty kyseliny pektovej je, že

- základný materiál (pektín) je ľahko dostupný prírodný biopolymér
- pri sieťovaní sa pektín súčasne deesterifikuje
- sieťovaná kyselina pektová má DS Ni, čo

umožňuje tiež pripraviť jej ďalšie deriváty s vysokými DS

- v súvislosti s predchádzajúcim možno pripraviť preparáty s vysokým obsahom proteínov (do 100 mg proteínu/g nosiča)

- sieťovaná kyselina pektová, jej deriváty ako aj preparáty s imobilizovanými proteínmi sú gélovité materiály s dobrými hydrodynamickými vlastnosťami

- umožňuje vyrábať preparáty z lacných surovín pomerne jednoduchým technologickým postupom.

Príklady vyhotovenia

Príklad 1

Ku 20 g pektínu (citrusového) sa pridalo za stáleho miešania 13 ml 25%-ho NaOH a nechalo sa reagovať po dobu 1 h pri 20 °C. Pridalo sa 1,8 ml epichlórhydrínu a po 2 h miešania pri 20 °C sa postupne, v priebehu 1 h, zvýšila teplota na 40 °C. Pri tejto teplote sa nechá reagovať ešte 1 h. Zosietená sodná soľ kyseliny pektovej sa postupne premyla vodou, etanolom a vysušila pri teplote 60 °C. Sieťovaný pektan sodný sa pomaly premyl 0,25 N HCl, ďalej vodou do negatívnej reakcie na chloridy, etanolom a nakoniec sa vysušil na vzduchu. 200 mg sieťovanej kyseliny pektovej (n. o. 14 ml H₂O/g) sa resuspendovalo v 15 ml 1,5 % roztoku N-cyklohexyl-N'-(N-metyl-morfolino)/etyl/-karbodiimid-p-toluénsulfonátu v destilovanej vode okyslenej na pH 4,8 a suspenzia sa miešala po dobu 1 h pri izbovej teplote. Aktivovaný gél sa dôkladne premyl vodou a pridal sa k roztoku 10 mg acetylcholinesterázy (acetylcholin hydroláza, EC 3.1.1.7; 25,4 U-mg) v 8 ml destilovanej vody. Suspenzia sa miešala po dobu 2 h pri 0–2 °C. Po filtrácii a premytí nerozpustného podielu 100 ml 2 M NaCl vykazovala imobilizovaná acetylcholinesteráza špecifickú aktivitu 5,8 U/mg a preparát mal celkovú aktivitu 71,3 U/g. Pri skladovaní vo zvlhčenom stave pri 4 °C sa pozoroval v priebehu 6 mesiacov 15%-ný pokles katalytickej aktivity.

Príklad 2

Sieťovaná kyselina pektová (1 g) pripravená ako v príklade 1, sa suspendovala v 100 ml metanolu, pridalo sa 0,6 ml koncentrovanej HCl a refluxovalo 4 hod. Po premytí metanolom a vysušení sa produkt (0,95 g) resuspendoval v zmesi 16,6 ml metanolu a 16,6 ml 99 % hydrazín hydrátu. Suspenzia sa udržiavala 72 hod pri 38 °C za občasného premiešania a po zachytení na sklenej frite premyla 0,15 M NaCl do negatívnej reakcie na hydrazín, 250 ml vody, 250 ml etanolu a produkt sa vysušil. Hydrazid sieťovanej kyseliny pektovej (0,28 g) obsahoval 4,13 % dusíka. K roztoku 0,5 g laktozylovaného hovädzieho sérového albumínu v 100 ml 0,1 M acetátového pufru pH 5 sa pridalo 50 mg jodistanu sodného a nechalo stáť 1,5 hod v tme pri izbovej teplote. Po pridaní 0,15 ml etylenglykolu sa nechalo stáť ďalších 0,5 hod za

tých istých podmienok. Zmes sa dialyzovala 2 hod v tme proti 2×5 l 50 mM octanového pufru pH 5. 0,25 g hydrazidu sieťovanej kyseliny pektovej sa resuspendovalo v oddialyzovanej zmesi, pH sa upravilo na 6,5 a nechalo sa miešať 24 hod pri izbovej teplote. Preparát sa premyl 250 ml vody, 500 ml 0,1 M borátového pufru pH 8,5 obsahujúceho 1,075 M NaCl a Tween 20 (0,1 % v/v), odsal, resuspendoval v známom objeme a skladoval pri 4 °C. V prípade dlhšieho skladovania sa pridala kvapka chloroformu alebo azid sodný do koncentrácie 0,1 % (w/v). Preparát obsahoval 85,5 mg albumínu/g sieťovanej kyseliny pektovej.

Príklad 3

Sieťovaná kyselina pektová (n. o. 4 ml H₂O/g) sa pripravila ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa použili 4 ml epichlórhydrínu a reakčná doba pri izbovej teplote sa predĺžila o 2 h. Hydrazid sieťovanej kyseliny pektovej (0,59 g; 7,21 % dusíka) sa potom pripravil postupom uvedeným v príklade 2. 10 mg pseudocholínesterázy (10 jednotiek) (acylcholín acyl hydroláza, EC 3.1.1.8) sa rozpustilo v 2 ml 20 mM fosfátového pufru pH 8 a pridal sa 1 ml 4,35 mM roztoku jodistanu draselného v tom istom pufri. Reakčná zmes sa udržiavala po dobu 5 h pri 4 °C, potom sa enzým dvakrát prezrážal 10-násobným nadbytkom etanolu. Prezrážaný enzým sa rozpustil v 100 ml 20 mM fosfátového pufru pH 8 a k roztoku sa pridalo 0,5 g hydrazidu sieťovanej kyseliny pektovej. Suspenzia sa miešala po dobu 18 h pri 4 °C. Po premytí 100 ml 20 mM NaCl, 200 ml destilovanej vody a 100 ml 20 mM fosfátového pufru pH 8 vykazovala imobilizovaná pseudocholínesteráza špecifickú aktivitu 1,6 U/mg a preparát mal úhrnnú aktivitu 23 U/g.

Preparát sa skladoval tak, ako je uvedené v príklade 1.

Príklad 4

Postupovalo sa ako v príklade 3, s tým rozdielom, že sieťovaná kyselina pektová (n. o. 7,4 ml H₂O/g) sa pripravila podľa príkladu 1 s tým, že sa na sieťovanie použili 3 ml epichlórhydrínu. Preparát obsahoval 72,6 mg albumínu/g sieťovanej kyseliny pektovej.

Príklad 5

Hydrazid sieťovanej kyseliny pektovej (0,25 g) pripravený postupom uvedeným v príklade 2 sa resuspenduje v 10 ml 0,6 NHCl ochladenej na 0 °C. V priebehu 20 min sa za stáleho miešania pomaly pridá 1,25 ml 5 % vodného roztoku dusitanu sodného. Mieša sa ďalších 20 min, stále pri 0 °C. Azid sa premyje 100 ml ľadovej vody, 50 ml ľadového 1 M NaCl, znovu 100 ml ľadovej vody a odsaje. K čerstvo pripravenému azidu sieťovanej kyseliny pektovej sa pridá ochladený roztok 0,1 g hovädzieho sérového albumínu v 10 ml vody. Okamžite sa upraví pH na 8,7 nasýteným roztokom tetraboritanu sodného. Suspenzia sa mieša 20 min na ľadovom kúpeli za kontrolovania pH. Ak je to nutné, pH sa doupraví na 8,7. Potom sa suspenzia mieša ešte ďalších 40 min. Produkt sa premyje 100 ml vody, 200 ml 1 M NaCl, 100 ml 50 mM kyseliny octovej, 100 ml 1 M NaCl, 100 ml 0,5 M NaHCO₃, 100 ml 1 M NaCl, 200 ml vody a odsaje. Imobilizovaný enzým sa resuspendoval vo vode a skladoval ako je to uvedené v príklade 2. Preparát obsahoval 104,8 mg albumínu/g sieťovanej kyseliny pektovej.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob vysokokapacitnej imobilizácie proteínov, pri ktorom sa v prvom stupni pektín alebo vodorozpustná soľ kyseliny pektovej zosieťuje v alkalickom prostredí 2-chlórmetyloxiránom vyznačujúci sa tým, že sa v druhom stupni aktivujú

karboxylové skupiny s karbodiimidmi hydrazín hydrátom, či hydrazín hydrátom a dusitanom sodným v prítomnosti kyseliny soľnej a v treťom stupni sa s využitím známych metód prevedie naviazanie proteínu.