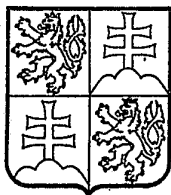


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 272 934

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 697-89.K
(22) Přihlášeno 01 02 89

(40) Zveřejněno 13 06 90
(45) Vydáno 16 12 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl⁵
C 12 N 9/48

(75) Autor vynálezu PRESS MILAN RNDr., PRAHA

(54) Způsob purifikace enzymů Hind II a Hind III pro genové manipulace

(57) Způsob purifikace restrikčních endonukleas Hind II a Hind III pomocí sloupcové kapalínové chromatografie tak, že se obě aktivity dělí na kolonách fosfocelulosity nebo Blue-celulosity nebo heparin-celulosity, s výhodou kombinacemi těchto kolon a popřípadě s kolonou DEAE-celulosity, čímž se docílí vyšší účinnosti dělení než na samotné koloně DEAE-celulosity.

Vynález se týká využití sorbentů Blue-celulosity, heparin-celulosity a fosfocelulosity, případně v kombinaci s DEAE-celulosou při purifikaci enzymů restrikčních endonukleáz Hind II a Hind III z kmene *Haemophilus influenzae* Rd.

Aktivity obou enzymů se nacházejí v kmeni společně. Pro jejich využití v molekulární biologii je důležité co nejlepší rozdělení obou aktivit. Obecný způsob purifikace enzymů využívá kroků jako desintegrace buněk, centrifugace a sloupcová kapalinová chromatografie. K dělení obou aktivit se používá v publikovaných pracích výhradně kolona DEAE celulosity (např. Old, Murray, Boises, J. Mol. Biol. 92, p. 33, 1975). Jiné purifikační kroky slouží k oddělení nespecifických nečistot, nikoliv k dělení obou aktivit. Na většinu sorbentů se totiž vážou oba enzymy přibližně stejně silně a neumožní efektivní rozdělení. Za vhodných podmínek se na koloně DEAE-celulosity zachytí jen enzym Hind II a enzym Hind III proteče. Hind III je zachycen další kolonou, např. fosfocelulosou, která ale neodstraní zbytky aktivity Hind II kontaminující Hind III. Enzymy jsou potom vymyty gradientem iontové síly a převedeny do vhodného skladovacího roztoku. Takto připravený enzym vyhovuje pro řadu prací, ale v některých případech, kdy je třeba použít nadbytek enzymu, jsou i malé kontaminace druhou aktivitou na závadu. Předmět vynálezu řeší tento problém tak, že používá pro dělení aktivit další nové kolony.

Nový postup využívá kromě DEAE-celulosity těchto sorbentů:

Fosfocelulosa: Obě aktivity se eluují blízko sebe, což lze využít pro předčištění, ale nelze využít pro zbavení se stop druhé aktivity.

Blue-celulosa: Zachytí většinu Hind III, nezachytí se Hind II.

Heparin-celulosa: Zachytí Hind II a malou část Hind III, většina Hind III se nezachytí. Při eluci se stopy Hind III uvolní dříve a nekontaminují Hind II.

Izolační roztoky jsou obvykle roztoky fosforečnanu draselného s koncentrací kolem 10 mM nebo Trisu s koncentrací kolem 20 mM. Dále obsahují obvykle 1 mM EDTA a 7 mM 2-merkaptosukcinat. Koncentrace NaCl je proměnlivá, při adsorpci enzymu na kolonu se pohybuje v rozmezí 0 až 0,1 M a na konci gradientu v rozmezí 0,5 až 1,0 M. pH roztoků se pohybuje v rozmezí 7 až 8. Tyto podmínky lze měnit v poměrně širokém rozmezí. Skladovací roztok obsahuje navíc 50 procent glycerolu. Objem gradientu bývá asi desetinásobek objemu kolony a průtok bývá asi půl objemu kolony za hodinu.

Příklad 1

Z 50 g buněčné pasty (*Haemophilus influenzae* Rd) bylo připraveno 200 ml buněčného extraktu. Z něho byly odstraněny nukleové kyseliny srážením 1,3procentním streptomycinsulfátem a oddělena frakce proteinů mezi 50 a 70 procenty nasycení síranem amonným. Tato síranová frakce byla dialyzována proti izolačnímu pufru a nanášena na kolonu fosfocelulosity (200 ml). Enzymové aktivity byly eluovány gradientem NaCl a spojily se frakce s převládající aktivitou Hind II a Hind III odděleně. Spojené frakce Hind III byly nanášeny na kolonu DEAE-celulosity (80ml). Tam se zachytil Hind II, ale Hind III se nezachytil. Proteklý roztok s Hind III byl nanášen na kolonu Blue-celulosity, kde se zachytil Hind III a poslední stopy Hind II se nezachytily. Enzym Hind III byl eluován gradientem NaCl a převeden do skladovacího roztoku. Spojené frakce Hind II byly nanášeny na tutéž kolonu DEAE-celulosity a zbytky Hind III se nezachytily. Hind II byl eluován gradientem NaCl a nanášen na kolonu heparin-celulosity (40 ml). Hind II zbavený stop Hind III byl eluován gradientem NaCl a převeden do skladovacího roztoku. Oba enzymy je možno dále čistit na dalších kolonách, např. na hydroxylapatitu.

Příklad 2

200 ml buněčného extraktu z 50 g bakterií bylo nanášeno na kolonu fosfocelulosity (200 ml) a enzymové aktivity byly eluovány gradientem NaCl. Spojily se frakce s převládající aktivitou Hind II a Hind III odděleně. Spojené frakce Hind III byly nanášeny na kolonu Blue-celu-

losy (60 ml), kde se zachytil Hind III, ale Hind II protekl. Tento roztok i spojené frakce s Hind II byly nanášeny na kolonu heparin-celulosa (60 ml). Oba enzymy na obou kolonách byly eluovány gradienty NaCl a převedeny do skladovacího roztoku.

Příklad 3

Síranová frakce, podle příkladu 1, byla nanášena na kolonu Blue-celulosa (100 ml) a za ní připojenou kolonu heparin-celulosa (100 ml). Hind III se zachytil na první koloně a Hind II na druhé. Oba enzymy na obou kolonách byly eluovány gradienty NaCl a převedeny do skladovacího roztoku.

Příklad 4

Buněčný extrakt byl nanášen na kolonu Blue-celulosa (100 ml). Hind II se nezachytil a byl v proteklém roztoku. Hind III byl eluován gradientem NaCl. Oba enzymy byly převedeny do skladovacího roztoku. Oba enzymy je možno přechistit na dalších kolonách.

Předchozí příklady provedení způsob podle vynálezu dokládají, ale neomezuji.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob purifikace restrikčních endonukleas Hind II a Hind III pomocí sloupcové kapalinové chromatografie, vyznačující se tím, že obě aktivity dělí na kolonách fosfocelulosa nebo Blue-celulosa nebo heparin-celulosa, s výhodou kombinací těchto kolon a popřípadě s kolonou DEAE-celulosa.