



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218516
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/02

(22) Přihlášeno 04 09 81

(21) (PV 6543-81)

(40) Zveřejněno 25 06 82

(45) Vydáno 15 03 85

(75)

Autor vynálezu

KYSILKA ČENĚK RNDr. CSc., JEVANY

(54) Způsob přípravy isoenzymů peroxidázy E. C. 1.11.1.7. z křenu

1

2

Vynález se týká způsobu přípravy velmi čistých preparátů isoenzymů peroxidázy, který využívá běžného, levného a snadno dostupného laboratorního vybavení. Isoenzymy A₁—A₃ se na rozdíl od skupiny isoenzymů B—E nezachycují na CM-celulóze stabilizované 0,005 M octanovým puforem, pH 4,1 až 4,7. Isoenzymy B—E se uvolní z vazby na CM-celulózu 0,040 až 0,060 M octanovým puforem o tomtéž pH. Isoenzymy A₁—A₃ se dočišťují dále vsádkovou chromatografií na CM-celulóze při pH 8,1 až 8,7 gradientovou elucí roztokem NaCl. Isoenzymy B—E lze získat stejnou metodou na DE-celulóze při pH 8,1 až 8,7 v 0,005 M Tris-HCl pufru.

Vynález se týká způsobu přípravy velmi čistých preparátů peroxidázy z křenu (*Armoracia rusticana*). Týká se přípravy směsi isoenzymů E. C. 1.11.1.7., donor: H_2O_2 oxido-reduktázy. Isoenzymy peroxidázy mají široké využití v biochemické analytice pro svoji stálost, dobrou rozpustnost i aktivitu v nejširším rozmezí pH i pro snadnou analytickou sledovatelnost nejrozličnějších oxido-redukčních produktů reakcí katalyzovaných právě tímto enzymem. Isolace peroxidázy byla popsána četnými autory. Popsanýisolační postup vychází z práce: Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J. Y.: J. Biol. Chem. **241**, 2166 (1966). Veškeré literárně dostupné práce předchozích autorů i práce výše citovaná využívají k izolaci složitých, nákladných, drahých a často nedostupných technik, preparativní elektroforézy, kolonových chromatografií, vyžadujících jednak kolony samé, jednak sběrače frakcí, průtokové spektrofotometry a další zařízení těžko použitelná v průmyslové přípravě v preparativním měřítku.

Podstatou vynálezu je maximální zjednodušení dosud popsaných isolačních postupů takovým způsobem, že v preparativním měřítku není zapotřebí kolon, průtokových spektrofotometrů, čerpadel a sběračů frakcí. Většina z uvedených zařízení je v ČSSR těžko dostupná, pořizuje se se značnými finančními nebo i devizovými náklady nebo je zcela nedostupná. Navíc většina z uvedených zařízení je dimenzována pouze pro laboratorní přípravu malých kvant bílkovinného materiálu. Pořízení velkoobjemových kolon i velkokapacitních sběračů frakcí je u nás tedy značný problém. Navržený postup využívá běžného, levného, snadno dostupného laboratorního vybavení, jako jsou konve, odsávacíky, frity.

Isoenzymy peroxidázy značené A₁—A₃ se oddělí od skupiny isoenzymů B—E vsádkovou chromatografií na CM-celulóze při pH 4,1 — 4,7 v 0,005 M octanovém pufru a isoenzymy B—E se uvolní z celulózy následnou elucí octanovým pufrům o tomtéž pH a koncentraci 0,040 — 0,060 M, načež se případně chromatograficky dočistí. Isoenzymy A₁—A₃ se dočišťují vsádkovou chromatografií opakovaně na CM-celulóze při pH 8,1 — 8,7 gradientovou elucí roztokem NaCl. Isoenzymy B—E se dočišťují vsádkovou chromatografií na DE-celulóze při pH 8,1 až 8,7 elucí 0,005 M Tris-HCl pufrům.

Příklad

Křen (25 kg) se rozmixuje s 50 l 0,1 M středního fosforečnanu draselného. Drť se vyždímá na běžné prádlové odstředivé ždímačce v sílonovém pytli a extrakce drti se opakuje s 37,5 l téhož roztoku. Extrakty se spojí. Spojené extrakty se nasatí 35 % síranu amonného a supernatant získaný po odsátí sraženiny se nasatí síranem amonným do finální koncentrace 90 %. Konečným

produktem tohoto vysolení je sediment. Získá se hrubým odsátím čirého supernatantu a následnou centrifugací na průtokové odstředivce. Získaná sraženina se rozpustí v minimálním objemu destilované vody a dialyzuje přes noc proti 10násobku chlazené destilované vody. Během dialýzy se vytvoří sediment, který se odstraní druhý den centrifugací při 3000 ot/min po dobu 20 min při +4 °C. Čirý supernatant je opět dialyzován přes noc proti 10násobku chlazené destilované vody. Tato dialýza se opakuje celkem třikrát. Dialyzát se volně zfiltruje přes papír a rozdělí na dva shodné alikvóty. První alikvót se zpracuje níže popsaným způsobem, druhý lze buď uložit při —50 °C, či usušit mrazovou sublimací a zpracovat posléze.

Celulóza CM-50 (Whatman) se nacykluje podle návodu výrobce a stabilizuje 0,005 M octanem sodným, pH 4,4. Jeden alikvót dialyzátu se míchá po dobu 15 min se 4 l dobře usazené, stabilizované suspenze celulózy. Suspenze se odsaje na fritě o hustotě S3. Získaný supernatant obsahuje isoenzymy peroxidázy A₁—A₃. Celulóza váže ostatní isoenzymy. Celulóza se potom promývá na fritě celkem asi 70 l 0,005 M octanu sodného, pH 4,4 do konstantního poklesu absorbance při 280 nm. Koláč celulózy se rozmíchá ve skleněné konvi ve dvou litrech 0,050 M octanu sodného, pH 4,4 a ponechá 5 min eluovat. Následuje odsátí. Ve filtrátu se sleduje poměr absorbancí při 403 nm a 280 nm, tzv. RZ. Celý postup se opakuje buď do poklesu měřitelnosti absorbance, či do poklesu RZ pod 0,35; frakce s RZ minimálně 0,35 se spojí. Tyto frakce obsahují isoenzymy B—E. Isoenzymy A₁—A₃ lze získat analogickým postupem při vystabilizování celulózy DE-50 0,005 M Tris-HCl pufrům o pH 8,4 a následným uvolněním isoenzymů 0,1 M chlořidem sodným, připraveným v tomtéž pufru, čili gradientovou elucí NaCl. Výchozím materiálem pro dočišťování isoenzymů A₁—A₃ je dialýzou odsolená frakce A₁—A₃ získaná z předchozí chromatografie (výše popsané), upravená na 0,005 M vůči Trisu a upravená pomocí HCl na pH 8,4. Isoenzymy A₁—A₃ lze dočistit rechromatografií za těchto podmínek.

Spojené frakce obsahující isoenzymy B—E se usuší mrazovou sublimací, rozpustí v minimálním objemu destilované vody a dialyzují po třikrát proti 20násobku chlazené destilované vody. Dialyzát se upraví na 0,005 M vůči Trisu (Tris = tris-hydroxy-aminomethan) a upraví kys. chlorovodíkovou na pH 8,4. Takto upravený dialyzát se vyčistí vsádkovou chromatografií na celulóze DE-50 (Whatman). Celulóza DE-50 se nacykluje podle návodu výrobce a stabilizuje 0,005 M Tris-HCl, pH 8,4. Suspenze vystabilizované celulózy se míchá s upraveným dialyzátem po dobu 5 min. Potom se odsaje na fritě S3 a získaný filtrát se opět proměňuje při 403 a 280 nm (RZ). Tento postup se opakuje

buď do poklesu absorbancí frakcí, či do poklesu RZ pod 2,6. Frakce o RZ vyšším než 2,6 se spojí, dialyzují a mrazově sublimují. Získaný produkt je směsí isoenzymů peroxidázy B—E, vhodnou jako vysoce čistý

preparát peroxidázy k jakýmkoliv dalším biochemickým experimentům, např. k navázání na protilátky při metodách ELISA či k enzymologickým experimentům.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy isoenzymů peroxidázy E. C. 1.11.1.7. z křenu, vyznačený tím, že isoenzymy A₁—A₃ se oddělí od skupiny isoenzymů B—E vsádkovou chromatografií na CM-celulóze při pH 4,1 — 4,7 v 0,005 M octanovém pufru a isoenzymy B—E se uvolní z celulózy následnou elucí octanovým puforem o totéž pH a koncentraci 0,040 až 0,060 M, načež se případně chromatograficky dočistí.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že isoenzymy A₁—A₃ se dočistí vsádkovou chromatografií opakovaně na DE-celulóze při pH 8,1 — 8,7 gradientovou elucí roztokem NaCl.

3. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že isoenzymy B—E se dočistí vsádkovou chromatografií na DE-celulóze při pH 8,1 až 8,7 elucí 0,005 M Tris-HCl puforem.