



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 206 378

(11)(B 1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

(61)

(3) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 21 11 79
(21) PV 8001-79

(51) Int. Cl.³ C 08 B 15/00
A 61 K 37/54

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 15 10 83

(75)

Autor vynálezu MISLOVIČOVÁ DANICA ing., GEMEINER PETER ing. CSc., KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc.,
BRATISLAVA a ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEDNICA

(54) Spôsob izolácie a purifikácie laktátdehydrogenázy

1

Vynález sa týka spôsobu izolácie a purifikácie laktátdehydrogenázy pomocou farebných Remazolových a triazínových derivátov perlovej celulózy.

Triazínové farbivá, a to hlavne Cibacron Blue F3G-A, kovalentne viazané na vodonerozpustné polysacharidy, našli v poslednej dobe široké možnosti uplatnenia ako generálne afinanty v afinitnej chromatografii enzýmov, a to najmä zo skupiny dehydrogenáz a kináz. [R. S. Beissner, F. B. Rudolph, J. Chromatogr. 161, 127 /1978/]. Najväčšie uplatnenie tu našli polysacharidy na báze sietovanej agarózy vo forme komerčných preparátov Blue Sepharose® CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala; 275,- Sw. Crs. per 25 g), Affi-Gel® Blue (Bio-Rad Laboratories, München; 220,- DM. per 100 ml) či Mätrex™ Gel Blue A a Mätrex™ Gel Red A (Amiccn B. V., Oosterhout). Aj iné polysacharidy, napr. sietované dextransy, vykazujú dobré vlastnosti pre tento druh použitia. Nie je tomu tak u celulózy, ktorá sa doteraz javila ako úplne nevhodná (H.-J. Böhme et al., J. Chromatogr. 69, 209 (1972); S. Angal, P. D. G. Dean, Biochem. J. 167, 301 (1977)). Negatívnou vlastnosťou tohoto polysacharidu derivatizovaného farbivom Cibacron Blue F3G-A boli veľmi nízke resorpcie chromatografovaných enzýmov.

Ako sme už predtým ukázali, triazínové a Remazolové deriváty perlovej celulózy si zachovávajú znamenité vlastnosti perlovej celulózy. Navyše pri správnej voľbe afinanta je možné prekonať všetky nevýhody doteraz brániace použitiu celulózy na tieto účely.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa na perlovú celulózu s obsahom 50 až 100 μmólov

kovalentne viazaného Remazolového alebo triazínového farbiva na 1 g suchej perlovej celulózy nechá v prvom stupni pôsobiť zriedený roztok hovädzieho sérového albumínu, prebytočný albumín sa odstráni premytím s 1 M NaCl a po equilibrovaní tlmivým roztokom o pH 6,5 až 8 sa v druhom stupni na takto upravenú perlovú celulózu nechá pôsobiť homogenizovaný biologický materiál obsahujúci laktátdehydrogenázu, pričom všetky sprievodné nežiaduce nízko- a vysokomolekulové látky sa odstránia následnou elúciou s rovnakým equilibračným roztokom a potom equilibračným roztokom obsahujúcim 0,5 až 1 M nikotínamid-adenín-dinukleotid vždy dovtedy, kým nie je reakcia eluátu na bielkoviny negatívna, načo v treťom stupni sa adsorbovaný, prečistený enzým laktátdehydrogenáza vytesní elúciou s equilibračným roztokom obsahujúcim 0,5 až 1,5 mM redukovaný nikotínamid-adenín-dinukleotid dovtedy, kým nie je skúška eluátu na katalytickú aktivitu laktátdehydrogenázy negatívna a nakoniec sa perlová celulóza pripraví na opakované použitie premytím s 1 M NaCl do negatívnej reakcie premývacieho roztoku na bielkoviny.

Perlová celulóza, ako aj jej Remazolové či triazínové deriváty obsahujúce s 1 M NaCl nevymyteľný albumín nejavia žiadne nešpecifické sorpcie voči laktátdehydrogenáze (LDH).

Pre afinitnú chromatografiu LDH z biologického materiálu nie je vhodný Cibacron Blue F3G-A. Hoci toto farbivo má skutočne vysokú afinitu ku LDH, jeho derivát perlovej celulózy stále prejavuje nízku účinnosť resorpcie.

Pre popísaný jednostupňový vysokoučinný izolačný postup je možné použiť hrubé homogenáty z rôznych biologických materiálov počnúc kvasničnými extraktami až po špecializované orgány cicavcov, napr. sval, pečeň, srdce a pod. Nevhodným je vyšší obsah sérových bielkovín.

Jednoduchším a lacnejším je postup, pri ktorom sa premýva derivatizovaná perlová celulóza so zachytenou LDH equilibračným tlmivým roztokom obsahujúcim 1 mM redukovaný nikotínamid-adenín-dinukleotid (NADH). Eluát obsahuje viac než 90 % dávkovanej LDH s minimálne 15-násobným stupňom purifikácie. Naproti tomu keď sa eluuje tlmivým roztokom obsahujúcim 1 mM NADH po predchádzajúcej elúcii s 1 mM nikotínamid-adenín-dinukleotidom (NAD), eluát obsahuje menšie množstvo enzýmu, avšak viac než 25-násobne purifikovaného.

Nakoniec tak, ako Cibacron Blue F3G-A deriváty sieťovaných agaróz a dextránov aj Remazolové a triazínové deriváty perlovej celulózy je možné pre popísaný postup izolácie a purifikácie LDH použiť viacnásobne.

Výhodou navrhovaného postupu je, že umožňuje izolovať a purifikovať

- LDH pomerne jednoduchým technologickým postupom,
- LDH na podstatne lacnejších materiáloch ako doteraz,
- LDH s vyššou resorpciou a pri vyšších väzbových kapacitách farebnej perlovej celulózy než bolo tomu doteraz u známych triazínových derivátov polysacharidov,
- súčasne viacero enzýmov.

Príklad 1

10 ml Remazol Brilliant Blue RN derivátu perlovej celulózy obsahujúceho 65 μ molov

farbiva na 1 g suchej celulózy sa premylo s 25 ml 0,1 % roztoku hovädzieho sérového albumínu, 100 ml 10 mM Tris-HCl pufru pH 7,5 s prídavkom 1 mM Chelatonu 3 a 2 mM 2-merkaptostanolu (roztok 1), ďalej 100 ml 1 M NaCl a nakoniec 200 ml roztoku 1. Na takto pripravený stípec sa nanieslo 25 ml homogenátu z krysých pečien obsahujúceho 310 mg bielkovín a 473 jednotiek LDH a premylo 130 ml roztoku 1. Naviazaná LDH sa vytesnila 110 ml roztoku 1 s prídavkom 1 mM NADH (roztok 2).

NADH-frakcia obsahovala 16-násobne prečistenú LDH v množstve 430 jednotiek, čo predstavuje 98 % na stípec nanesej LDH.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použil Ostazín červén S-5B derivát perlovej celulózy obsahujúci 80 μ mólov farbiva na 1 g suchej celulózy.

NADH-frakcia obsahovala 14,5-násobne prečistenú LDH v množstve 468 jednotiek, čo predstavuje 99 % na stípec nanesej LDH.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použil Prócion Blue MX-R derivát perlovej celulózy obsahujúci 67 μ mólov farbiva na 1 g suchej celulózy.

NADH-frakcia obsahovala 10,5-násobne prečistenú LDH v množstve 416 jednotiek, čo činilo 88 % na stípec nanesej LDH.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že po nanesení homogenátu (320 mg bielkovín, 452 jednotiek) sa stípec premýval 250 ml roztoku 1, 100 ml roztoku 1 s prídavkom 1 mM NAD a nakoniec 140 ml roztoku 2.

NADH-frakcia obsahovala 23,5-násobne prečistenú LDH v množstve 266 jednotiek (8 mg bielkovín), čo zodpovedalo 60 % na stípec nanesej LDH.

Príklad 5

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použilo 15 ml čiastočne prečisteného preparátu LDH z králičieho svalu obsahujúceho 11 mg bielkovín a 440 jednotiek LDH.

NADH-frakcia obsahovala 100 % na stípec nanesej LDH.

Vynález má uplatnenie všade, kde je potrebné izolovať alebo prečistiť laktátdehydrogenázu z rôzneho biologického materiálu od ďalších bielkovín, resp. enzýmov, a to v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie a purifikácie laktátdehydrogenázy vyznačujúci sa tým, že sa na perlovú celulózu s obsahom 50 až 100 μ mólov kovalentne viazaného Remazolového alebo triazínového farbiva na 1 g suchej perlovej celulózy nechá v prvom stupni pôsobiť zriedený roztok hovädzieho sérového albumínu, prebytočný albumín sa odstráni premytím s 1 M NaCl a po

equilibrování tlmivým roztokem o pH 6,5 až 8 sa v druhom stupni na takto upravenú perlovú celulózu nechá pôsobiť homogenizovaný biologický materiál obsahujúci laktátdehydrogenázu, pričom všetky sprievodné nežiadúce nízko- a vysokomolekulové látky sa odstránia následnou elúciou s rovnakým equilibračným roztokom a potom equilibračným roztokom obsahujúcim 0,5 až 1 mM nikotínamid-adenín-dinukleotid vždy dovtedy, kým nie je reakcia eluátu na bielkoviny negatívna, načo v treťom stupni sa adsorbovaný, prečistený enzým laktátdehydrogenáza vytesní elúciou s equilibračným roztokom obsahujúcim 0,5 až 1,5 mM redukovaný nikotínamid-adenín-dinukleotid dovtedy, kým nie je skúška eluátu na katalytickú aktivitu laktátdehydrogenázy negatívna a nakoniec sa perlová celulóza pripraví na opakované použitie premytím s 1 M NaCl do negatívnej reakcie premyvacieho roztoku na bielkoviny.