

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

214 543
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 N 9/00

(22) Přihlášeno 20 01 81

(21) (PV 397—81)

(40) Zveřejněno 15 09 81

(45) Vydáno 29 06 84

(75)

Autor vynálezu

ZABRANSKÝ JOSEF prom. chem. CSc., MARHOULOVÁ JIŘINA, Praha

{54} Způsob přípravy rozpustného preparátu acetylcholinesterázy

Mozková tkáň se homogenizuje při teplotě -10 až -20°C v organickém rozpouštědle rozpouštějícím lipidy, poté se nerozpustný zbytek zůstávající po homogenizaci v roztoku oddělí, šetrně vysuší a ze získané sušiny se uvolní acetylcholinesteráza působením vodného roztoku $0,05$ až 10% neionogenního kondenzačního produktu lipidického alkoholu s etylénoxidem obecného vzorce $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{OH}$, kde n je v průměru 16 . Acetylcholinesteráza se izoluje z tohoto roztoku ve formě rozpustného preparátu lyofilizací.

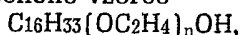
Vynález se týká způsobu přípravy rozpustného preparátu acetylcholinesterázy z mozkové tkáně savců.

Acetylcholinesteráza — EC 3. 1. 1. 7 — z elektrických orgánů elektrického úhoře a rejnoka, mozku a nervové tkáně savců a erytrocytů, o různé čistotě a rozpustnosti, se používá v analytice pro citlivé biochemické stanovení organofosforových a karbamátových insekticidů a dále k výzkumným účelům v neurochemii a biochemii. Použitím acetylcholinesterázy lze zvýšit citlivost stanovení reziduí organofosforových a karbamátových insekticidů v potravinách a potravinářských surovinách a přispět k výzkumu mechanismů působení těchto látek v biochemickém materiálu.

Nedostupnost zdrojů rozpustné acetylcholinesterázy nebo její pevná vazba na buněčnou strukturu nedovolují výrobu vhodného rozpustného přípravku tohoto enzymu ve větším měřítku. Dosud známé způsoby přípravy z mozkové tkáně savců spočívají na uvolnění acetylcholinesterázy z nerozpustného lipoproteinového komplexu, ve kterém je v mozkové tkáni vázána, a na jejím převedení do roztoku účinkem různých činidel, jako jsou některé povrchově aktivní látky, deionizované prostředí, hadí jedy nebo proteolytické a lipolytické enzymy. Při použití povrchově aktivních látek se postupuje tak, že se mozková tkáň homogenizuje přímo v prostředí příslušné komplex stěpící povrchově aktivní látky a po odstranění buněčných struktur se acetylcholinesteráza izoluje z roztoku srážením síranem amonným, dialýzou nebo se dále přečišťuje gelovou, iontoměnnou nebo afinitní chromatografií na sloupci.

Nevýhodou všech dosud známých postupů je, že jsou časově velmi náročné, málo efektivní z hlediska výtěžku a proto pro výrobu acetylcholinesterázy ve větším měřítku příliš nákladné a těžko realizovatelné.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob přípravy rozpustného preparátu acetylcholinesterázy podle vynálezu, který je založen na štěpení nerozpustného lipoproteinového komplexu acetylcholinesterázy povrchově aktivními látkami, jehož podstata spočívá v tom, že se mozková tkáň nejprve homogenizuje při teplotě -10 až -20°C v organickém rozpouštědle rozpouštějícím lipidy. Po homogenizaci se oddělí nerozpustný zbytek od roztoku a šetrně se vysuší. Tak se z mozkové tkáně odstraní volné lipidy a voda. V získané sušině je zachován nerozštěpený lipoproteinový komplex, z něhož se uvolní acetylcholinesteráza působením vodného roztoku obsahujícího v hmotnostní koncentraci $0,05$ až 10% neionogenního kondenzačního produktu lipidické alkoholy s etylenoxidem obecného vzorce



kde n je v průměru 16. Acetylcholinesterá-

za přechází do roztoku, z něhož se izoluje ve formě rozpustného preparátu lyofilizací. Výhodným organickým rozpouštědlem rozpouštějícím lipidy je aceton, butanol, etyléter nebo jejich vzájemné kombinace.

Výhodou způsobu podle vynálezu je jeho ekonomické a jednoduché provedení, vedoucí k uvolnění acetylcholinesterázy z buněčné struktury téměř se 100% výtěžkem. Získaný preparát je slabě nažloutlá, vločkovitá látka, dobře rozpustná ve vodě, o specifické aktivitě $0,16$ až $0,25 \text{ U. mg}^{-1}$. V uzavřených ampulích a za chladu ji lze skladovat neomezeně dlouho bez ztráty aktivity.

Příklad 1

Z mozkové tkáně, získané z čerstvých nebo v chladírně uskladněných hovězích hlav, se pečlivě vyřízne oblast nucleus caudatus, pokud možno s nejmenším množstvím okolní tkáně.

100 g čerstvé tkáně nucleus caudatus se ve skleněné nádobě, chlazené solankou, homogenizuje po dobu 3 minut v 500 ml acetonu při udržování teploty -15°C . Po deseti minutovém stání se sediment odsaje na Büchnerově nálevce a ještě vlhký koláč se znovu krátce zhomogenizuje ve 300 ml ochlazeného acetonu. Po přefiltrování se sediment 30 sekund homogenizuje ve 300 ml etyléteru při teplotě -15°C , homogenát se znovu přefiltruje, zbytek na filtru se dvakrát promyje 100 ml vychlazeného etyléteru a potom se vysuší ve vakuovém exikátoru nad hydroxidem sodným.

Takto získaná acetonová sušina se homogenizuje v 750 ml $0,5\%$ vodného roztoku neionogenní povrchově aktivní látky CIRRA-SOL ALN-WF po dobu 3 minut a homogenát se potom odstředí v chlazené centrifuze při -5°C a zrychlení $105\,000 \text{ g}$. Čirá kapalina nad sedimentem se přenesse do lyofilizačních lahví a po namrazení na stěnu se provede lyofilizace běžným způsobem. Dosušení lyofilizátu se provádí bez přehřívání.

Způsobem se získá ve vodě dobře rozpustný preparát acetylcholinesterázy o specifické aktivitě $0,20 \text{ U. mg}^{-1}$. Výtěžnost preparátu je 10% , vztaženo na hmotnost čerstvé mozkové tkáně.

Získaný technický preparát lze přímo použít jako zdroj acetylcholinesterázy pro biochemické stanovení organofosforových a karbamátových insekticidů nebo jako výchozí materiál pro získání přečištěné acetylcholinesterázy nebo pro jiné biochemické účely.

Příklad 2

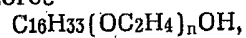
100 g čerstvé tkáně nucleus caudatus se ve skleněné nádobě, chlazené solankou, homogenizuje po dobu 3 minut v 500 ml butanolu o teplotě -20°C . Po desetiminutovém stání se nerozpustný zbytek odsaje a znovu krátce homogenizuje ve vychlazeném butanolu. Dále se pokračuje obdobně, jak uvedeno v příkladu 1.

214543

Předmět vynálezu

1. Způsob přípravy rozpustného preparátu acetylcholinesterázy z mozkové tkáně, založený na štěpení nerozpustného lipoproteinového komplexu acetylcholinesterázy povrchově aktivními látkami, vyznačující se tím, že se mozková tkáň homogenizuje při teplotě -10 až -20°C v organickém rozpouštědle rozpouštějícím lipidy, poté se nerozpustný zbytek, zůstávající po homogenizaci v roztoku oddělí, šetrně vysuší, načež se ze získané sušiny působením vodného roztoku obsahujícího v hmotnostní koncentraci $0,05$ až 10% neionogenního kondenzačního pro-

duktu lipidického alkoholu s etylénoxidem obecného vzorce



kde n je v průměru 16 , uvolní acetylcholinesteráza přecházející do tohoto roztoku, z něhož se izoluje ve formě rozpustného preparátu lyofilizací.

2. Způsob přípravy rozpustného preparátu podle bodu 1, vyznačující se tím, že organickým rozpouštědlem rozpouštějícím lipidy je aceton, butanol, etyléter nebo jejich libovolná kombinace.