



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258359

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 30/48

(22) Přihlášeno 02 09 85

(21) PV 6243-85

(40) Zveřejněno 17 12 87

(45) Vydáno 14 04 89

(75)

Autor vynálezu

KONEČNÝ PŘEMYSL RNDr., BORÁK JINDŘICH ing., SMRŽ MILOSLAV RNDr.,
BRNO

(54) Způsob izolace a purifikace mitochondriální malátdehydrogenasy

Podstata řešení spočívá v tom, že izolace a purifikace mitochondriální malátdehydrogenasy se provádí sorpcí enzymu z roztoků pufrů o pH 6 až 8 a určité koncentraci na modifikovaný makroporézní gelový kopolymer 2-hydroxyethylmetakrylátu s etylendimetakrylátem, který obsahuje v postranních řetězcích 1,4-diamino-9,10-anthrachinon-3-sulfonovou kyselinu. Současně sorbované doprovodné látky se odstraní promýváním pufrů, kterými se desorbuje enzym po přidavku sodné nebo draselné soli kyseliny chlorovodíkové nebo sírové a popřípadě nikotinamidenin-dinukleotidu, nikotinamid-adenin-dinukleotidu redukovaného nebo téhož ve směsi se solemi kyseliny siřičité.

Vynález se týká izolace a purifikace mitochondriální malátdehydrogenasy (dále MDH) a živočišných srdcí technikou afinitní chromatografie na modifikovaných hydroxyethylmetakrylátových gelech s vázaným anthrachinonovým barvivem.

Malátdehydrogenasa je důležitý enzym, který se široce využívá v klinické diagnostice a potravinářské analytice (stanovení transaminas, kys. jablečné apod.). Enzym se izoluje z různých zdrojů, nejčastěji z živočišných srdcí. Extrakty a koncentráty připravené z těchto zdrojů obsahují celou řadu balastních látek, od nichž je třeba malátdehydrogenasu oddělit. Pro izolaci a purifikaci enzymu byla vypracována celá řada postupů. Mezi nejmodernější patří afinitní chromatografie na imobilizovaném anthrachinonovém barvivu (T. Atkinson a kol., Biochem. Soc. Trans., 9, 290 (1981), R. Bittner a kol., pat. NDR č. 152 359 (1 981)), resp. azobarvivu (K. Smith a kol. Biochem. Biophys. Acta, 708, 17, (1982)). Širšímu využití těchto postupů však brání nevýhodné mechanické vlastnosti agarosové matrice, na níž byla zmíněná barviva zakotvena.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se enzym sorbuje z roztoku pufru o pH 6 až 8 o koncentraci 0,002 až 0,1 mol/l na modifikovaný makroporézní gelový kopolymer 2-hydroxyethylmetakrylátu s etylendimetakrylátem, který obsahuje v postranních řetězcích 1,4-diamino-9,10-anthrachinon-3-sulfonovou kyselinu kovalentně navázanou prostřednictvím arylidensulfonyltoxyskupin, současně sorbované doprovodné látky se odstraní ze sorbentu promýváním pufru o pH 6 až 8 a koncentraci 0,002 až 0,2 mol/l a nakonec se zachycený enzym desorbuje výše definovanými promývacími pufrů, k nimž bylo přidáno 0,2 až 1 mol sodné nebo draselné soli kyseliny chlorovodíkové nebo sírové a případně 0,1 až 10 mmol/l nikotinamid-adenin-dinukleotidu, nikotinamid-adenin-dinukleotidu redukováného, nebo nikotinamid-adenin-dinukleotidu ve směsi s 3 až 5 násobným molárním přebytkem solí kyseliny siřičité.

Hydroxyethylmetakrylátové gely s 1,4-diamino-9,10-anthrachinon-3-sulfonovou kyselinou navázanou v postranních řetězcích prostřednictvím arylidensulfonyltoxy skupiny jsou popsány v AO 255 416. Tyto materiály si zachovávají všechny příznivé vlastnosti výchozích hydroxyethylmetakrylátových gelů, zejména jejich mechanickou pevnost a objemovou stálost a mohou proto být na rozdíl od derivátů na bázi agarosu používány i za vyšších průtoků a tlaků.

Jejich výhodou oproti materiálům s 1,4-diamino-9,10-anthrachinon-3-sulfonovou kyselinou navázanou jiným způsobem než prostřednictvím arylidensulfonyltoxyskupin je i jejich vysoká selektivita vůči mitochondriální malátdehydrogenáse. Nesorbuje se na nich např. laktátdehydrogenasa, takže modifikovaný gel může být využit k oddělení obou enzymů. Podobně je tomu i u cytoplasmatické malátdehydrogenasy, která se nesorbuje nebo ji lze vymýt zředěným pufrům bez jakéhokoliv přídavku.

Způsob izolace a purifikace mitochondriální malátdehydrogenasy podle vynálezu je ilustrován následujícími příklady provedení.

P ř í k l a d 1

10 g acetonového prášku z vepřových srdcí bylo extrahováno 100 ml fosforečnanového pufru, pH 7,4 o koncentraci 0,1 mol/l. Extrakt byl smísen se síranem amonným do 45% nasycení, vyloučená sraženina byla odstředěna a supernatant dosycen síranem amonným na 70% nasycení. Po odstředění byla sraženina rozpuštěna ve vodě a roztok dialyzován proti fosforečnanovému pufru, pH 7,1, o koncentraci 0,01 mol/l. Po dialýze bylo získáno 30 ml roztoku, který podle výsledku analýzy obsahoval 595 mg bílkoviny; aktivita MDH činila 45 000 U. K roztoku bylo přidáno 5 g modifikovaného gelu, který byl připraven z výchozího kopolymeru získaného z 61 % hmotnostních 2-hydroxyethylmetakrylátu a 39 % hmot. etylendimetakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti 10^6 daltonů a zrnění 63 až 100 μm a obsahoval 199 $\mu\text{mol/g}$ 1,4-diamino-9,10-anthrachinon-3-sulfonové kyseliny kovalentně vázané prostřednictvím arylidensulfonyltoxyskupin, předem ekvilibrovaného s fosforečnanovým pufrům, pH 7,1 a suspenze byla třepána 30 minut.

Po oddělení gelu zůstalo ve zbývajícím roztoku 6 100 U cytoplasmatické MDH, veškerá mitochondriální dehydrogenasa zůstala nasorbována na gel s navázaným barvivem. Po promytí pufrem o pH 7,1 a koncentraci 0,01 mol/l byla zachycená mitochondriální MDH eluována týmž pufrem, k němuž bylo přidáno 0,5 mol/l chloridu draselného. Aktivita eluátu činila 35 800 U (92 % vztaženo na nasorbovaný enzym).

P ř í k l a d 2

2 ml extraktu z vepřových srdcí, který byl připraven obdobným způsobem jako v příkladu 1 a obsahoval 40 mg bílkoviny a 3 000 U MDH byly aplikovány na kolonku 0,7 x 5,5 cm, která obsahovala podobný gel jako v příkladu 1, avšak o zrnění 40 až 63 μ m a obsahu vázaného barviva 67 μ mol/g, který byl předem ekvilibrován s fosforečnanovým pufrem, pH 7,1 a koncentraci 0,01 mol/l. Sorbent byl promyt týmž pufrem. Přitom se vymyla cytoplasmatická MDH (690 U, 23 % celkové aktivity). Pak byla eluována sorbovaná mitochondriální MDH pufrem, do něhož bylo přidáno 0,5 mol/l chloridu draselného. Byla získána frakce 12 ml, která obsahovala 0,3 mg bílkoviny/ml a 180 U mitochondriální MDH (ml) tj. celkem získaná aktivita 2 160 U, což je 93,5 % sorbované aktivity; spec. aktivita 600 U/mg bílkoviny, faktor vyčištění - 8x).

P ř í k l a d 3

Postupováno bylo obdobně jako v příkladu 2, jako náplň kolonky však byl použit stejný materiál jako v příkladu 1. Zachycený enzym byl eluován roztokem 1 mmol/l NAD ve fosforečnanovém pufru, pH 7,1 o koncentraci 0,1 mol/l. Výtěžek desorpce činil 89 % (vztaženo na zachycenou mitochondriální MDH, specifická aktivita preparátu 640 U/mg).

P ř í k l a d 4

Postupováno bylo stejně jako v příkladě 3, eluční roztok však obsahoval kromě 1 mmol/l NAD ještě 5 mmol/l siřičitanu sodného. Výtěžek i specifická aktivita byly podobné jako v příkladu 3, zachycený enzym se však vymyl v užším píku (objem frakce 9 ml).

P ř í k l a d 5

Postupováno bylo obdobně jako v příkladu 3, eluční roztok však obsahoval 1 mmol/l NADH. Výtěžek desorpce činil 95 % (vztaženo na zachycenou aktivitu), specifická aktivita mitochondriální MDH v eluátu činila 700 U/mg.

P ř í k l a d 6

Postupováno bylo obdobně jako v příkladu 3 s tím, rozdílem, že násada byla poloviční a použitý fosforečnanový pufr měl koncentraci 0,1 mol/l a pH 6,8. Desorpce byla provedena stejným pufrem, k němuž bylo přidáno 10 mmol/l NAD a 0,1 mol/l síranu sodného. Výtěžek činil 74 %, specifická aktivita 620 U/mg bílkoviny, objem frakce 8 ml.

P ř í k l a d 7

Postupováno obdobně jako v příkladu 3, s tím rozdílem, že místo fosforečnanového pufru o pH 7,1 byl použit Tris pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l (roztok 6,05 g tris/hydroxymetyl/aminometanu v 1 l vody, jehož pH bylo nastaveno přidávkem kyseliny chlorovodíkové na uvedenou hodnotu). Zachycený enzym byl desorbován Tris pufrem o výše uvedeném pH a koncentraci, do něhož bylo přidáno 0,2 mol/l chloridu draselného a 0,5 mmol/l NADH. Výtěžek desorpce činil 85 % (vztaženo na zachycenou mitochondriální MDH), specifická aktivita 670 U/mg, objem frakce 11 ml.

P R E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

Způsob izolace a purifikace mitochondriální malátdehydrogenasy z extraktů a koncentrátů připravených z živočišných srdcí vyznačený tím, že se enzym sorbuje z roztoků pufrů o pH 6 až 8 a koncentraci 0,002 až 0,1 mol/l na modifikovaný makroporézní gelový kopolymer 2-hydroxymethylmetakrylátu s etylendimetakrylátem, který obsahuje v postranních řetězcích 1,4-di-amino-9,10-anthrachinon-3-sulfonovou kyselinu kovalentně navázanou prostřednictvím aryliden-sulfonyletoxyskupin, současně sorbované doprovodné látky se odstraní ze sorbentu promýváním pufrů o pH 6 až 8 a koncentraci 0,002 až 0,2 mol/l a nakonec se zachycený enzym desorbuje výše definovanými promývacími pufrů, k nimž bylo přidáno 0,2 až 1 mol sodné nebo draselné soli kyseliny chlorovodíkové nebo sírové a případně 0,1 až 10 mmol/l nikotinamid-adenin-dinukleotidu, nikotinamid-adenin-dinukleotidu redukovaného, nebo nikotinamid-adenin-dinukleotidu ve směsi s 3 až 5 násobným molárním přebytkem solí kyseliny siřičité.