



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

214 546
(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlásené 03 02 81
(21) PV 78⁹ - 81

(51) Int. Cl. ³ C 12 N 9/16

(40) Zverejnené 15 09 81
(45) Vydané 28 02 84

(75)

Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing.CSc., LEHNICE
KUNIAK ĽUDOVÍT ing.CSc.,
KUČÁR ŠTEFAN RNDr.CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob izolácie enzýmov cholinesterázového typu

Vynález sa týka spôsobu izolácie enzýmov cholinesterázového typu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že biologický roztok obsahuje enzým cholinesterázového typu s výhodou acetylcholinesterázu alebo pseudocholín esterázu po úprave na pH 7,5 až 9 a iónovej sily pod 0,01 M sa nechá v prvom stupni interagovať s výhodou na kolóne s gélom sieťovaného a metylovaného polyestylénimínu a po následnom premytí gélu rovnakým tlmivým roztokom sa v druhom stupni vytasní zakotvený enzým elúciou roztokom o pH 8 a iónovej sile vyššej ako 0,1 M alebo účinkom zriedeného roztoku cholínu, prípadne inej alkylamóniovej soli.

Vynález má použitie pri izolácii alebo purifikácii enzýmov cholinesterázového typu pre výskum alebo priemyselnú prax.

Vynález sa týka spôsobu izolácie enzýmov cholinesterázového typu, a to acetylcholinesterázy/acetylcholin hydroláza, EC 3. 1. 1. 7/ a pseudocholinesterázy /acetylcholin acylhydroláza, EC 3. 1. 1. 8/.

Pri izolácii a purifikácii enzýmov cholinesterázového typu sa obyčajne vychádza z homogénatu tkaniva / acetylcholinesteráza, pseudocholinesteráza/ alebo krvnej plazmy za použitia etanolovej frakcionácie / pseudocholinesteráza /, Surgenor D.M., Ellias D.: J.Amer. chem.soc.76 6049, 1954, prípadne ďalšej chromatografie na géli z fosforečnanu vápenatého, resp.ionomeniči / Malström B.G., Levin Ö., Boman H.G.:Acta Chem.Scand.,10, 1077, 1956/ , prípadne ďalšej géupvej filtrácie / Das P.K., Liddell J.:Biochem.J.,116,875, 1970/. Rýchlou metódou purifikácie acetylcholinesterázy z hovädzích erytrocytov afinitnou gélovou chromatografiou na Sepharoze s naviazaným d-tubukarínom a elúciou s chloridom sodným popisujú Jung J. a Belleau B.: Mol.Pharmacol.,8, 589, 1972. Trimetyl/m-aminofenyl/ amónium chlorid, hydrochlorid ako afinitný ligand viazaný na Bio-Gel A popisujú Berman J.D. a Young M.:Proc.Nat.Acad.Sci US 68, 395, 1971. Nevýhodou uvedených postupov je ich zdĺhavosť, prípadne nákladná príprava afinitných ligandov a v ďalšom nie jednoduché viazanie na nosič.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že biologický roztok obsahujúci enzým cholinesterázového typu s výhodou acetylcholinesterázu alebo pseudocholinesterázu po úprave pH na 7,5 až 9 a iónovej sily pod 0,01 M sa nechá v prvom stupni interagovať s výhodou na kolóne s gélom sieťovaného a metylovaného polyetylénimínu o napúšťavom objeme 6 až 12 ml/g a po následnom premytí gélu rovnakým tlmivým roztokom sa v druhom stupni vytesní zakotvený enzým elúciou tlmivým roztokom o pH 8 a iónovej sile vyššej ako 0,1 M, alebo tlmivým roztokom o pH alebo účinkom zriedeného roztoku cholínu, prípadne inej alkylamóniovej soli.

Postup možno aplikovať tak vsádzkovým spôsobom, alebo výhodnejšie je pracovať tak, že polyetylénimínový modifikovaný ligand je naplnený v kolóne, cez ktorú sa prelieva biologický roztok obsahujúci cholinesterázové enzýmy. Kapacita nosiča dosahuje niekoľko tisíc jednotiek enzýmu na gram suchého nosiča. Po zakotvení enzýmu sa gél na kolóne premýva 60 násobným objemom tlmivého roztoku o pH 8 aby sa vytesnili nežiaduce sprievodné látky. Po vymytí sprievodných látok sa viazaný čistý enzým uvoľní z nosiča na kolóne elúciou s tlmivým roztokom o pH 8 a iónovej sily vyššej ako 0,1 M alebo tlmivým roztokom o pH 6, alebo zriedeným roztokom cholínu, prípadne inej alkylamóniovej soli. Uvedeným postupom sa dosiahne takmer 50 násobná purifikácia enzýmu.

Metylovaný sieťovaný polyetylénimín predstavuje afinitný ligand obsahujúci opakujúce sa štruktúrne jednotky cholínu, čo je základom vysokej účinnosti izolácie a purifikácie cholinových enzýmov.

Výhodou nového postupu je, že práprava afinitného liganda je jednoduchá a nevyžaduje drahé chemikálie, umožňuje pracovať vsádzkovým alebo kolónovým spôsobom, afinitný ligand je stály a možno ho používať mnohonásobne, umožňuje dosahovať jednoduchým postupom mnohonásobnú purifikáciu izolovaných enzýmov.

P r í k l a d 1

K 10 g vodného roztoku polyetylénimínu obsahujúceho 5 g suchej hmotnosti polyetylénimínu sa pridal 1 ml 25 %-ného roztoku hydroxidu sodného a 0,5 g 2-chlórmetyloxiránu. Po dokonalom premiešaní reakčnej zmesi za vzniku emulzie dochádza k reakcii za súčasného zahrievania zmesi. Vonkajším chladením sa udržiavala teplota reakčnej zmesi pri teplote 40 až 50 °C. Po skončení sieťovania / 1 h/ sa zosieťovaný polyetylenimín mixoval vo vodnom roztoku v mixéri na potrebnú veľkosť častíc /0,1 až 0,3 mm/. Takto pripravený sieťovaný polyetylénimín mal napúšťací objem 6 ml/g, stupeň sieťovania 0,046 etylénimínových jednotiek pripadajúcich na jednu priečnu hydrazopropánovú väzbu a obsah amino skupín 1,65 mol/g, strednú dĺžku vonkajších reťazcov 17,4 Å, čo odpovedá 4 etylénimínovým jednotkám. Takto pripravený sieťovaný polyetylénimín sa suspendoval v 25 ml vody a miešal na elektromagnetickej miešačke s 5 g metyljodidu pri izbovej teplote po dobu 16 hodín. Nadbytočný metyljodid sa odparil na vákuovej odparke. Získaný sieťovaný

metylovaný polyetylénimín s obsahom amino skupín 0,01 mmol/g sa premyl 500 ml vody a použil po predchádzajúco, premytí 30 ml 0,1 % roztokom albumínu hovädzieho séra a 50 ml fosfátového pufru /5 mM, pH 8/. Na takto pripravený stípec /15 x 1,5 cm/ sa nanieslo 5 ml konskej plazmy, zriedenej 5 mM fosfátového pufru /5 ml, pH 8/ s aktivitou 200 jednotiek. Stípec sa na to premyl okolo 300 ml horouvedeného fosfátového pufru /do negatívnej reakcie na proteíny v eluáte/. Naviazaná butyrylcholínesteráza sa vytesnila 150 ml 5 mM fosfátového pufru / pH 7,5/ obsahujúceho 0,1 M chlorid sodný. Uvedená vytesnená frakcia obsahovala 12,5 mg bielkovín a 148 jednotiek butyrylcholínesterázovej aktivity, čo predstavuje 72 % celkovej aktivity a 48,5 násobné prečistenie.

P r í k l a d 2

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že sa pracovalo vsádkovým spôsobom, t.j. nie na kolóne a gél zosieťovaného metylovaného polyetylénimínu /5 g/ o napúšťacom objeme 12 ml/g sa adjustoval 30 ml 0,1 % roztoku albumínu v 50 mM borátovom pufri / pH 9 /. Takto adjustovaný gél sa zmiešal s 5 ml ľudskej plazmy, zriedenej do 10 ml horeuvedeným borátovým pufrom /celkový obsah bielkovín 442 mg a celková aktivita 165 jednotiek butyrylcholínesterázovej aktivity. Naviazaná butyrylcholínesterázová aktivita sa vytesnila 0,2 M roztokom cholínu v 5 mM borátovom pufri / pH 9, 150 ml/. Vytesnená frakcia obsahovala 16,8 mg bielkovín a 105 jednotiek aktivity, čo predstavuje 16,8 násobné prečistenie.

P r í k l a d 3

Ako zdroj acetylcholínesterázy sa použil extrakt z hovädzích erytrocytov, pripravený z Tritonu-X-100 postupom podľa Ciliv G. a Ozand P.T.: Biochem. Biophys. Acta, 248, 136, 1972 a po odcentrifugovaní / 10 000 g, 30 min./ sa uvedený extrakt / 5 ml / adjustoval na pH 8,5 mM fosfátovým pufrom / 5 ml / a naniesol na stípec / 20x1,5 cm/ sieťovaného metylovaného polyetylénimínu. Po premytí stípcu 300 ml fosfátového pufru / pH 8 / sa naviazaná acetylcholínesteráza uvoľnila 150 ml 50 mM fosfátového pufru / pH 6 /.

Výťažok 18,7 mg bielkovín a celková aktivita enzýmu 193 jednotiek.

P r í k l a d 4

Postup podľa príkladu 2, s tým rozdielom, že k vytesneniu naviazanej butyryl cholínesterázy sa použil / 0,1 M roztok trimetyl / p-aminofenyl / amónium chloridu v 5 mM fosfátovom pufri / pH 8, 150 ml /.

Vytesnená frakcia obsahovala 12 mg bielkovín a 110 jednotiek aktivity.

Vynález možno uplatniť všade, kde je potrebné izolovať alebo prečistiť enzýmy cholínesterázového typu a to či už v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie enzýmov cholínesterázového typu využitím princípu afinitnej chromatografie vyznačený tým, že biologický roztok obsahujúci enzým cholínesterázového typu s výhodou acetylcholínesterázu alebo pseudocholínesterázu po úprave pH na 7,5 až 9 a iónovej sily pod 0,01 M sa nechá v prvom stupni interagovať s výhodou na kolóne s gélom sieťovaného a metylovaného polyetylénimínu o napúšťacom objeme 6 až 12 ml/g a po následnom premytí gélu rovnakým tlmivým roztokom sa v druhom stupni vytesní zakotvený enzým elúciou s tlmivým roztokom o pH 8 o iónovej sile vyššej ako 0,1 M, alebo tlmivým roztokom o pH 6 alebo účinkom zriedeného roztoku cholínu, prípadne inej alkylamóniovej soli.