



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199 123

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(11) (B1)

(51) Int. Cl. C 07 H 21/00

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 08 03 78

(21) PV 1456-78

(40) Zverejnené 17 09 79

(45) Vydané 30 09 82

(75)

Autor vynálezu

ŠIMUTH JOZEF ing.CSc.

ZELINKA JÁN doc.ing.DrSc.

TURŇA JÁN, BRATISLAVA

(54)

Spôsob odstraňovania nukleových kyselín z roztoku bielkovín

1

Vynález sa týka spôsobu odstránenia nukleových kyselín kolonovou iontomeničovou chromatografiou od bielkovín za použitia anexového iontomeniča pripraveného naviazaním polyetylenimínu na karboxymetyl skupinu celulózy, dextranu, alebo polyakrylamidu, pričom sa využíva schopnosť tohto chromatografického média viazať sa s nukleovými kyselinami pevnejšie ako s bielkovinami.

Nukleové kyseliny predstavujú značnú časť vysokopolymérneho materiálu bunky. Vzhľadom k tomu, že sa zúčastňujú základných biologických procesov a majú výrazný negatívny náboj, viažu sa s ostatnými zložkami bunky, najmä však s bielkovinami.

Pre izoláciu nukleových kyselín od bielkovín bolo vypracovaných viacero metód (napr. extrakcia fenolom, inaktivácia bielkovín soľnou dodecylsulfátu atď.). Všetky tieto metódy spôsobujú denaturáciu bielkovín. Doteraz nemáme k dispozícii jednoduchý spôsob eliminácie nukleových kyselín z roztoku bielkovín. Najčastejšie sa nukleové kyseliny odstraňujú z roztoku bielkovín zrážaním streptomycín sulfátom. Tento spôsob je nevýhodný najmä v tých prípadoch, keď sa izolujú enzýmy pre proteosyntetický systém in vitro. Ďalší spôsob odstraňovania nukleových kyselín je zrážanie polyetylenglykolom. Nevýhoda tohto spôsobu je nereprodukovateľnosť výsledkov. Spôsob eliminácie nukleových

kyselín z roztoku bielkovín zrážaním roztoku polyetyleniminom má nevýhodu v tom, že pri solubilizácii bielkovín z precipitátu sa používajú veľké objemy tlmivých roztokov v dôsledku čoho v získanom roztoku je nízka koncentrácia bielkovín, čo sťažuje ďalší postup izolácie enzýmov.

Tieto nevýhody odstraňuje spôsob eliminácie nukleových kyselín kolonovou chromatografiou za použitia iontomeniča pripraveného reakciou karboxymetyl-celulózy a polyetyleniminom, pri ktorom sa využíva schopnosti tohto chromatografického média viazať sa s nukleovými kyselinami pevnejšie ako s bielkovinami. Viazané bielkoviny sa z iontomeniča uvoľňujú premývaním tlmivým roztokom od pH 7 do pH 9 o iónovej sile 0.25M a nukleové kyseliny tlmivým roztokom od pH 7 do pH 9 a iónovej sile vyššej ako 1M.

Príklad 1

Postupuje sa pri tom tak, že 5g karboxymetylcelulózy sa dekantuje destilovanou vodou a potom 200 ml 2M NaOH. Karboxymetylcelulóza sa premýva vodou až hodnota pH klesne na 8. Potom sa pridá 200 ml HCl a po 1 hodinovom stáaní sa premýva destilovanou vodou do pH 5.0. Takto aktivovaná celulóza sa premieša s 20 ml 5 % polyetyleniminu v tlmivom roztoku obsahujúcom 0.01M Tris-hydroxymetyl-aminometan pH 7,2 a 1mM 2-merkaptotetanol. Po 24 hodinovom intenzívnom miešaní sa suspenzia naniesie na kolonu 2x15 cm a premýva sa 1000 ml tlmivého roztoku, ktorý obsahuje 0,01M Tris-hydroxymetyl-aminoetan pH 8,0, 1mM chelatom III a 2M chlorid draselný. Potom sa premýva opäť 500 ml tlmivého roztoku hore uvedeného zloženia, ktorý obsahuje miesto 2M chloridu draselného 0.1M chlorid draselný. Na kolonu 1,5x5 cm sa rýchlosťou 1ml/min. nanieslo 100 mg hovädzieho serumalbumínu v 5 ml tlmivého roztoku uvedeného zloženia, ktorým kolona bola premytá objemom 50 ml. Uvoľňovanie albumína z iontomeniča sa sledovalo pomocou UV-analyzátora. Elučná rýchlosť bola 1ml/min. Za týchto podmienok sa z kolony neuvoľňovala žiadna bielkovina. Ďalej sa eluovalo tlmivým roztokom uvedeného zloženia, ktorý ešte obsahoval 0.3M chlorid draselný. Za týchto podmienok sa uvoľnila z chromatografického média prakticky všetka nanesená bielkovina. Ďalej sa kolóna premývala 50 ml 0,5M KCl. Nakoniec sa kolona premyla 50 ml 1M KCl v uvedenom tlmivom roztoku. 1 ml tohto pripraveného chromatografického média viaže z tlmivého roztoku obsahujúceho 0.01M Tris-hydroxymetyl-aminoetan pH 8, 1mM chelatom III a 0,1mM 2-merkaptotetanol, minimálne 100 mg hovädzieho serumalbumínu. Na túto kolonu sa za podmienok ako pri nanášaní bielkovín nanieslo 15 mg kvasničnej ribonukleovej kyseliny. Výsledky sú uvedené v tab. 1. Takto premytá kolona je schopná opäť viazať RNK, čo svedčí o tom, že elúcia tohto chromatografického média vysokou ionovou silou /2M KCl/ pri pH 8.0 neuvoľňuje väzbu medzi karboxymetylovou skupinou a polyetyleniminom.

Tabulka č. 1

Väzba kvasničnej RNA na PEI-CM-celulózovej kolone. (Nanesené 15 mg RNA).

Koncentrácia chloridu draselného v tlmivom elučnom roztoku	Množstvo uvoľnenej RNA v mg	% uvoľnenej RNA vzhľadom na nanesené množstvo
0.1M	0	0
0.2M	0,005	0,03
0.5M	0,08	0,5
1M	14,9	99,47
2M	0	0

Príklad 2

Za použitia chromatografického média pripraveného podľa príkladu 1 sa odstraňujú nukleové kyseliny zo surového bunkového extraktu *S. aureofaciens* tak, že k 10 ml PEI-CM celulózy sa pridá 30 ml hrubého bunkového extraktu *S. aureofaciens* v tlmivom roztoku obsahujúcom 0,3M KCl, získaného mechanickou dezintegráciou 50 g vlhkých buniek. Tento surový extrakt má značný obsah nukleových kyselín, pomer absorbie 280/260 = 0,53. Po dvojhodinovom miešaní pri 4 °C surového extraktu s PEI-CM celulórou sa zmes centrifugovala a v supernatante značne poklesol obsah nukleových kyselín (pomer absorbie 280/260 - 1,15) viď tab. č. 2.

Tabulka č. 2

Odstránenie nukleových kyselín zo surového bunkového extraktu.

	Absorbancia /nm/		
	280	260	280/260
Pôvodná vzorka	0,63	1,17	0,53
Po spracovaní s PEI-CM-celulórou	0,575	0,45	1,16

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob odstraňovania nukleových kyselín z roztoku bielkovín vyznačujúci sa tým, že sa zmes bielkovín a nukleových kyselín získaná z biologických materiálov v tlmiacom roztoku o ionovej sile 0.25M a pH 7.0 - 9.0, naniesie na kolonu s iontomeničom pripraveným reakciou polyetylenimínu s karboxymetylou skupinou viazanou na inertný nosič, napríklad celulózu, polydextran, polyakrylamid a premyva sa tlmiacim roztokom o ionovej sile 0.25M pri pH 7.0 - 9.0.