

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
( 19 )



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

## 258940

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 12 N 9/22

(22) Přihlášeno 12 01 87

(21) PV 211-87.W

(40) Zveřejněno 15 01 88

(45) Vydáno 14 04 89

(75)

Autor vynálezu

HEJDÁNKOVÁ JANA RNDr., RYPÁČKOVÁ BLANKA RNDr., PRAHA

(54) Způsob chromatografické purifikace restrikční endonukleasy Pst I

Řešení se týká nového způsobu chromatografické purifikace restrikční endonukleasy Pst I, který využívá sloupcové chromatografie na fosfocelulose s předřazením kolony s DEAE-celulosou a na hydroxylapatitu.

Vynález se týká způsobu purifikace restriční endonukleasy Pst I z bakteriálních buněk kmene Providencia stuartii 164.

Restriční endonukleasy jsou endodeoxyribonukleasy, které po rozpoznání specifické sekvence dvojitěvláknové DNA štěpí v každém vlákně jednu fosfodiesterovou vazbu. Rozlišují se tři třídy restričních endonukleas, z nichž pro genové inženýrství má největší význam třída druhá, do které patří také restriční endonukleasa Pst I. Endonukleasy této třídy štěpí dvojitěvláknovou DNA přímo v rozpoznávané sekvenci nebo v její těsné blízkosti.

Při purifikaci restričních endonukleas z buněčného extraktu se využívá zejména metod sloupcové chromatografie, přičemž je často nutné nejprve odstranit nukleové kyseliny, které mohou při chromatografických krocích interferovat. Nukleové kyseliny lze z buněčného extraktu odstranit gelovou filtrací, pasážováním buněčného extraktu přes DEAE-celulosu za podmínek, za nichž se restriční endonukleasa nezachytí, dále precipitací streptomycinsulfátem nebo precipitací polyethyleniminem. Bylo publikováno několik postupů pro purifikaci restriční endonukleasy Pst I.

Postupem využívajícím chromatografie na DEAE-celulose a fosfocelulose (Smith, D. I., Blattner, F. R. and Davies, J.: The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from Providencia stuartii. NUCL. ACID. RES. 3, 343, 1976) byl získán enzym s velmi nízkou stabilitou. Pro stanovení rozpoznávací sekvence restriční endonukleasy Pst I bylo k purifikaci tohoto enzymu užito gelové filtrace, chromatografie na fosfocelulose a chromatografie na DEAE-celulose (Brown, N. L. and Smith, M.: The mapping and sequence determination of the single site in  $\phi$ X174am3 replicative form DNA cleaved by restriction endonuclease Pst I. FEBS LETT. 65, 284, 1976).

Další postupy spočívaly v chromatografii na blue-Sepharose nebo pyran-Sepharose po odstranění nukleových kyselin (George, J. and Chirikjian J. G.: Biospecific fractionation matrices for sequence specific endonuclease. NUCL. ACID. RES. 5, 2 223, 1978), oba tyto postupy byly neúspěšné v odstranění kontaminujících nukleas. Obecný postup purifikace, doporučený i pro restriční endonukleasu Pst I, využívá chromatografie na fosfocelulose a hydroxylapatitu (Greene, P. J., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Betlach, M. C., Covarrubias, A. A., Backman, K., Russel, D. J., Tait, R. and Boyer, H.: A general method for purification of restriction enzymes. NUCL. ACID. RES., 5, 2 373, 1978).

Protože uvedenými purifikačními postupy nebyl získán dostatečně čistý enzym, byl vypracován nový postup, který zaručuje nejen dostatečnou čistotu purifikovaného enzymu, ale i vyšší výtěžnost. Navrhovaný postup sestává ze dvou chromatografických kroků - chromatografie na fosfocelulose a hydroxylapatitu, přičemž při prvním kroku je před kolonu s fosfocelulosou předřazena kolona s DEAE-celulosou, která zachytí nukleové kyseliny a část proteinů včetně značného množství nespecifických endonukleas, čímž se podstatně zefektivní oba následující chromatografické kroky. S výhodou lze kolony s DEAE-celulosou a fosfocelulosou spojit, takže se buněčný extrakt při prvním purifikačním kroku nanáší na fosfocelulosu přes DEAE-celulosu.

Iontová síla isolačního fosfátového pufru musí být upravena na 0,12 mol/l NaCl, protože za těchto podmínek se restriční endonukleasa Pst I váže na fosfocelulosu ale nikoli na DEAE-celulosu, kdežto nukleové kyseliny a velká část kontaminujících proteinů se na DEAE-celulosu zachytí. Spojením obou kolon se podstatně zkrátí doba, po kterou je enzym volně v roztoku, kde je jeho stabilita menší než při vazbě na nosič. Stabilitu restriční endonukleasy Pst I během purifikace lze také s výhodou zvýšit přítomností Tritonu X-100 (0,15%) v isolačním pufru.

Popis konkrétního provedení.

Bakteriální buňky se suspendují v pufru A (10 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,12 mol/l NaCl,

1 mmol/l EDTA, 7 mmol/l 2-ME, pH 7,0), přidá se 100 µg/ml lysozymu a 25 µg/ml PMSF a hodinu se míchá za chlazení ledem. Všechny další operace se provádějí při teplotě 0 až 6 °C. Buňky se rozbijí sonikací a po odstranění buněčných zbytků ultracentrifugací se supernatant krátce dialysuje proti pufru A obsahujícím 0,15 % Tritonu X-100, a nanese na spojené kolony s DEAE-celulosou a fosfocelulosou. Po promytí obou kolon pufrům A s 0,15% Tritonem X-100 se enzym z fosfocelulose eluuje gradientem NaCl (0,12 až 0,6 mol/l NaCl).

Aktivní frakce se spojí, krátce dialysují proti pufru B (10 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 mol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 7 mmol/l 2-ME, 0,15% Triton X-100, pH 7,0); místo dialysy lze také upravit koncentraci NaCl naředěním. Po dialyse se enzym nanese na kolonu s hydroxylapatitem, kolona se promyje pufrům B a enzym se eluuje gradientem 0,01 až 0,4 mol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Aktivní frakce se spojí, dialysou se převedou do skladovacího pufru (10 mmol/l Tris-HCl, 0,2 mol/l NaCl, 0,1 mmol/l EDTA, 7 mmol/l 2-ME, 0,15% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7,4 při 20 °C) a uloží při teplotě -20 °C.

#### Použité zkratky

DEAE - diethylaminoethyl-  
EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina  
2-ME - 2-merkapt ethanol  
PMSF - fenylmethylsulfonylfluorid  
Tris - tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

#### P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob chromatografické purifikace restrikční endonukleasy Pst I, vyznačující se tím, že se využije sloupcové chromatografie na fosfocelulose s předřazením kolony s DEAE-celulosou, přičemž iontová síla fosfátového isolačního pufru je upravena na 0,12 mol/l NaCl, a následně chromatografie na hydroxylapatitu.