



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199 122

(II) (B1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 08 03 78

(21) PV 1455-78

(51) Int. Cl.³ C-07 G-7/028

(40) Zverejnené 17 09 79

(45) Vydané 30 09 82

(75)

Autor vynálezu ŠIMUTH JOZEF ing.CSc.

TURŇA JÁN

TIMKO JOZEF ing.CSc.

ZELINKA JÁN doc.ing.DrSc., BRATISLAVA

(54)

Spôsob izolácie bielkovín

1

Predmet PV sa dotýka izolácie bielkovín z biologického materiálu, ktoré majú afinitu k nukleovým kyselinám.

Pre exaktné štúdium enzýmov a bielkovín zúčastňujúcich sa metabolizmu nukleových kyselín v živých systémoch je potrebné získať ich v čistom stave. Doteraz sa používajú k izolácii bielkovín obecné deliace metódy, ktoré využívajú rozdiely v ich molekulových váhach a ionogénnych vlastnostiach. Tieto metódy sú značne zdĺhavé (trvajú niekoľko dní až týždňov), vyžadujú náročné prístrojové vybavenie a vysokú odbornú kvalifikáciu pracovníkov. Zdĺhavosť operácií má za následok zníženie výťažkov enzýmových aktivít čo často súvisí aj so stratou ich natívnej štruktúry.

Tieto nedostatky odstraňuje spôsob izolácie podľa tohto vynálezu, pri ktorom sa využíva schopnosť týchto bielkovín špecificky sa viazať na chromatografický iontomenič, ktorý tvorí dezoxyríbonukleová kyselina naviazaná na polyetylenimin-karboxymetyl-celulózu. Podmienkou použitia tohto iontomeniča pre afinitnú chromatografiu bielkovín je, aby z biologického materiálu boli odstránené nukleové kyseliny..

Príklad č. 1

Izolácia RNA-polymerázy zo *Streptomyces aureofaciens*.

10 g premytých buniek *S. aureofaciens* sa dezintegruje s 20 ml 0,05M Tris-hydroxymetyl-aminometan pH 7,9, 0,1mM chelaton III a centrifuguje sa pri 30 000g 2 hod pri 2 °C. Supernatant sa zmieša s 5g polyetenimin-karboxymetyl-celulózy a pridá sa také množstvo chloridu draselného, aby výsledná koncentrácia bola 0,3M. Mieša sa 1/2 hod. a centrifuguje sa pri 30 000g. K supernatantu sa pridá 20 ml tlmivého roztoku bez chloridu draselného a nanesie sa na kolonu 2x5 cm rýchlosťou 3 ml/hod. Z tejto kolony sa eluuje tlmivým roztokom, v ktorom sa zvyšuje ionová sila postupne 0,3M, 0,5M, 1M, 2M chlorid draselný. Aktívny enzým sa eluoval vo frakcii s 1M a 2M chloridom draselným. V oboch prípadoch stupeň purifikácie je rádovo $5 \cdot 10^2$ a funkcia enzýmu je plne závislá na DNA. Celý proces purifikácie trvá necelých 36 hodín.

Príklad 28. 2

Izolácia restriktívnej endodeoxyribonukleázy Sau I. zo *Streptomyces aureofaciens*.

K 10 g premytých buniek zo *S. aureofaciens* sa pridá 20 ml 0,01M Tris-hydroxymetyl-aminometan tlmivého roztoku. Po dezintegrácii sa zmes centrifuguje pri 105 000 g 2 hod. pri 2 °C. Celá zmes sa nanesie na chromatografickú kolonu 2x10 cm a eluuje sa postupne 0,01M fosforečnanovým tlmivým roztokom s obsahom 0,1mM chelatonu III, 1mM 2-merkaptotetanolu a 10% glycerínom. Frakcia obsahujúca restriktívnu endonukleázu bola z kolony eluovaná 0,1M chloridom draselným v uvedenom tlmivom roztoku. Táto frakcia bola nanesená na kolonku 1x8 cm s obsahom deoxyribonukleová kyselina polyetylenimin-karboxymetyl-celulózy a eluovala sa postupne 0,1, 0,3, 0,5M chloridom draselným. Aktívny enzým sa eluoval vo frakcii s 0,5M chloridom draselným. Enzým bol zbavený nešpecifických nukleáz.

Týmto spôsobom sa môžu izolovať rôzne bielkoviny z biologických materiálov, ktoré majú afinitu k nukleovým kyselinám. Tieto enzýmy majú široké použitie v molekulárno-biologických experimentoch a génovom inžinierstve.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie bielkovín vyznačujúci sa tým, že sa bielkoviny viažu na iontomeniči deoxyribonukleová kyselina-polyetylenimin-karboxymetyl-celulóza, z ktorého sa uvoľňujú ionovou silou od 0,1 do 1,5 M pri pH od 7,0 - 9,2.