

SEZNAMTE SE, BENZONÁZA...

Jak efektivně snížit viskozitu roztoků způsobenou přítomností DNA a zlepšit manipulaci s nimi? Jak zvýšit výtěžek a čistotu rekombinantního proteinu při purifikačních operacích? Jak odstranit kontaminující nukleové kyseliny z finálního produktu určeného pro terapeutické účely a splnit tak požadavky lékopisu?

Kladli jste si někdy během Vašeho výzkumu nebo při optimalizaci technologického postupu Vaší výroby tyto otázky? Potom dovolte, abychom Vás seznámili s unikátním enzymem, jehož výrobem je firma Merck KGaA z německého Darmstadtu a jehož obchodní název je **Benzonase® Nuclease** nebo jen **Benzonase®**.

Benzonase® Nuclease je geneticky produkována endonukleáza, která byla původně izolována z bakterie *Serratia marcescens*. Kvartérní struktura tohoto enzymu je tvořena dvěma identickými podjednotkami o molekulové váze cca 30 kDa spojenými dvěma disulfidickými můstky. Hodnota izoelektrického bodu je $pI=6,85$ a enzym je funkční v rozmezí pH 6 až 10 a teplot 0 až 42 °C. Ke své funkci potřebuje hořčičnaté ionty v optimální koncentraci 1–2 mM.

Benzonase® Nuclease atakuje všechny formy DNA a RNA (šroubovice, dvojšroubovice, lineární, cirkulární) a způsobuje jejich degradaci. Produkty tohoto štěpení jsou oligonukleotidy o délce 2–5 bází s 5'-monofosfátovým koncem. Enzym vyniká velmi vysokou specifickou aktivitou ($> 1 \times 10^6$ U/mg proteinu) a zároveň nemá detekovatelnou proteolytickou aktivitu. To jej činí vhodným pro odstranění nukleových kyselin z vysoce viskózních vzorků nebo všude tam, kde nukleové kyseliny nejsou v konečném produktu žádoucí, a dále, díky nepřítomnosti proteolytické aktivity, ideálním pro produkci vysoce čistých biologicky aktivních proteinů.

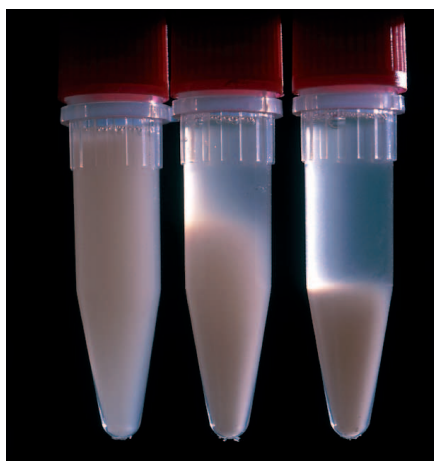
Typické oblasti použití **Benzonase® Nuclease** při výzkumu v laboratořích jsou:

- eliminace kontaminujících nukleových kyselin při produkci rekombinantních proteinů,
- snížení viskozity buněčných lyzátů (lepší manipulace, kratší centrifugační a purifikační kroky, vyšší výtěžky proteinů),
- příprava vzorků pro 2D gelovou elektroforézu a chromatografii proteinů (omezení tvorby komplexů s NK, lepší rozlišení),
- odstranění nukleových kyselin adhezních např. na inkluzních tělísčích nebo virech a jejich snazší purifikace.

Pro ilustraci uvádíme jako příklad snížení viskozity buněčného lyzátu při expresi rekombinantního proteinu. Buňky *E. coli* BL21(DE3) obsahující pET konstrukt byly suspendovány v extrakčním činidle Bug-Buster Reagent (5 ml/g). K jednotlivým

podílům suspenze bylo přidáno zvyšující se množství **Benzonase® Nuclease** (0, 2,5 a 25 U/ml), suspenze byla ponechána 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugována (350×g, 3 min). Na obr. 1 je vidět výrazné snížení viskozity roztoku a jasné oddělení pelety od supernatantu po přidavku benzonázy. Obdobných výsledků je dosažováno i při eukaryotické expresi a při expresi v hmyzích buňkách.

Obr. 1 – Snížení viskozity buněčného lyzátu při expresi rekombinantního proteinu po přidavku benzonázy



Benzonase® pro farmaceutickou a biotechnologickou výrobu

Shora uvedené vlastnosti **Benzonase®** se s výhodou využijí nejen ve výzkumných a vývojových laboratořích ale i ve výrobních procesech farmaceutické nebo biotechnologické výroby. Zejména ve farmaceutické výrobě se uplatní vysoká dosažitelná čistota finálního produktu a schopnost štěpit DNA a RNA na řetězce s délkou menší než 10 bp (párů bází), přičemž regulatorně je zpravidla požadována hodnota pod 100 bp. Dále pak je dostupný certifikát BSE/TSE, neboť **Benzonase®** je produkována, jak již bylo zmíněno, v geneticky modifikované bakterii *E. coli*, není tedy živočišného původu. **Benzonase®** (Obr. 2) je dodávána i se známkou **EMPROVE® bio**, to znamená, že k tomuto produktu je dostupná dokumentace vyžadovaná farmaceutickými regulačními orgány a autoritami pro suroviny používané v biofarmaceutické výrobě.

V souhrnu lze říci, že **Benzonase®** firmy Merck KGaA v průmyslovém měřítku přináší:

- vysokou čistotu finálního produktu,
- úsporu procesního času,
- vyšší produktivitu,
- širokou škálu aplikací (výroba rekombinantních proteinů, vakcín atp.),
- výhodu dostupné dokumentace pro biofarmaceutickou výrobu,

– balení podle požadavku klienta.

Obr. 2 – Enzym Benzonase® se známkou EMPROVE® bio



K detekci benzonázy je dostupný ELISA kit firmy Merck, tedy založený na imunologické detekci.

Tab. – Produkty Benzonase® pro aplikace ve výrobních procesech

Kat. č.	Název	Jednotky
101695	Benzonase® suitable for biopharmaceutical production EMPROVE® bio	100000 U
101697	Benzonase® suitable for biopharmaceutical production EMPROVE® bio	500000 U
101654	Benzonase® purity grade II (>90%) for biotechnology	100000 U
101656	Benzonase® purity grade II (>90%) for biotechnology	500000 U
101681	Benzonase® ELISA kit II for the immunological detection of Benzonase®	

Pro bližší informace kontaktujte společnost Merck spol. s r.o.: stanislav.kukla@merck.cz pro aplikace ve výzkumu a laboratořích, lubomir.svoboda@merck.cz pro aplikace ve výrobních procesech.

Mgr. Stanislav KUKLA,
Ing. Lubomír SVOBODA,
Merck spol. s r.o., Česká republika