

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145601 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

- (21) Ansøgning nr. 170/71 (51) Int.Cl.³ C 12 N 9/00
(22) Indleveringsdag 15. jan. 1971 C 07 G 7/00
(24) Løbedag 15. jan. 1971
(41) Alm. tilgængelig 17. jul. 1971
(44) Fremlagt 20. dec. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 16. jan. 1970, 2001902, DE
- (71) Ansøger BOEHRINGER MANNHEIM GMBH., 6800 Mannheim-Waldhof, DE.
- (72) Opfinder Hans Ulrich Bergmeyer, DE: Gotthilf Næher, DE: Guenter Weimann, DE: Waldemar Thum, DE.
- (74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

-
- (54) Fremgangsmåde til rensning og fraktionering af vandopløste, fortrinsvis enzymatisk aktive proteiner.

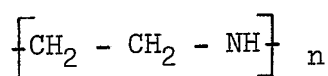
Opfindelsen angår en fremgangsmåde til rensning og fraktionering af vandopløste, fortrinsvis enzymatisk aktive proteiner.

Til berigelse, dvs. rensning og fraktionering, af proteiner, fortrinsvis af biologisk materiale, kendes allerede flere berigelsesmidler eller metoder. Som eksempler på egnede midler kan nævnes ammoniumsulfat, uorganisk gel, aktiv carbon, kromatografi på byttene og molekylsier og nogle andre. I betragtning af den usædvanlige mangfoldighed af naturligt forekommende proteiner og deres følgestoffer, gør manglen på variationsmuligheder ved isoleringen eller rensningen sig dog hyppigt meget uheldigt be-

mærket. Blandt det i sig selv allerede begrænsede antal metoder og midler til berigelse af proteiner, viser det sig for det meste, at kun ganske få er anvendelige i et specielt tilfælde, hvilket medfører, at de samme rensningstrin ofte må gentages, for at opnå en nogenlunde tilfredsstillende berigelse. For det meste er de opnåede berigelsesgrader desuden ringe, og den senere fjernelse af det til berigelsen anvendte middel, kræver særlige udgifter til inddampning af store væskevolumener og lignende.

Der er derfor behov for sådanne yderligere fremgangsmåder til berigelse af proteiner, som tillader en bedre variation og derfor også en mere virksom udformning af proteinberigelsen, og som ikke eller kun i ringe grad besidder de ulemper, som findes hos de hidtil kendte metoder og midler til berigelse af proteiner.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til rensning og fraktionering af vandopløste, fortrinsvis enzymatisk aktive proteiner, er ejendommelig ved, at proteinopløsningen tilsættes en vandopløselig polyethylenimin med den almene formel



hvor n har en værdi, som svarer til en gennemsnitlig molekylvægt mellem 600 og 100.000, i en til fraktionering og fraskilning af forureninger tilstrækkelig mængde.

Det var allerede kendt at anvende polyethylenimin som flokkuleringshjælpemiddel, f.eks. til klaring af spildevand, til forbedring af filtrerbarheden af bundfald og lignende. Yderligere er det allerede blevet foreslået at anvende polyethylenimin, som er gjort uopløselig som en slags ionbytter til kromatografi af nucleinsyre. Polyethylenimin bliver desuden anvendt som adhæsionsmiddel i forskellige industrigrene, f.eks. til fibre, farver, klæbestof, lakker og lignende. Ud fra kendskabet til disse anvendelsesområder kunne det ikke forventes, at vandopløseligt polyethylenimin skulle være særligt egnet til rensning og fraktionering af opløste proteiner.

Til fremgangsmåden ifølge opfindelsen egner sig som polyethylenimin de i handelen værende arter af svagt basisk over middelbasisk til stærkt basisk. Den opnåelige rensnings- og fraktioneringsvirkning afhænger til en vis grad af molekylvægten, således at der med bestem-

te molekylvægte, alt efter de specielle proteiner ofte kan opnås særligt gunstige berigelsesvirkninger. Det har vist sig, at i princippet er alle undersøgte vandopløselige polyethyleniminer anvendelige, dvs. sådanne med molekylvægte mellem 600 og 100.000 svarende til Brookfield-viskositeter på 500-2500 cps. ved 25°C.

Ved anvendelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fældning af proteiner tilsættes en ringe mængde polyethylenimin til proteinopløsningen, hvorpå proteinet fælder ud. Udfældningen finder sted ved ringe ionkoncentration og høj fortynding med hensyn til polyethylenimin.

Når polyethyleniminen ved den omhandlede fremgangsmåde ifølge opfindelsen tilsættes i form af en fortyndet vandig opløsning, er polyethylenimintilsætningen væsentlig simplere, end når tilsætningen sker i form af et fast stof eller en koncentreret opløsning. Ved at tilsætte en fortyndet opløsning undgås desuden, at der under tilsætningen optræder pletvise overkoncentrationer, som i det mindste forbigående også bevirker en udfældning af proteiner, som ikke selv skulle have været fældet.

Ved forhøjelse af ionkoncentrationen kan det fældede protein igen bringes i opløsning fra bundfaldet. Tilbage bliver herved sædvanligvis et på polyethylenimin rigere og på det ønskede f.eks. aktive protein fattigere bundfald. Fældning er afhængig af pH-værdiintervallet og sker i almindelighed mellem pH-værdien 5,0 og 9,0 fortrinsvis mellem 5,5 og 8,5. Over og under de angivne grænseværdier går det fældede protein normalt igen i opløsning.

Adskillelsen af protein og polyethylenimin holdt i bundfald kan ske ved hjælp af de sædvanlige metoder til proteinberigelse. F. eks. kan polyethylenimin skilles fra på kationbytter, eller omvendt proteinet skilles fra på anionbytter. Yderligere eksempler på mulige adskillelser er ammoniumsulfatfældning, fældning med organiske opløsningsmidler, molekylsiadskillelse, (specielt når det anvendte polyethylenimin har en meget stor eller meget ringe molekylvægt i sammenligning med fældet protein) og lignende.

Frengangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan bestå af en fældning af proteiner ved tilsætning af en ringe mængde polyethylenimin, hvorved visse forureninger bliver tilbage opløst. Det er også muligt ved tilsætning af polyethylenimin først at fælde forureningerne, medens det ønskede protein forbliver i den overliggende væske, og derpå udfælde dette efter isolering af den første fældning. Endelig kan der foretages en samlet udfældning, såvel af følgestoffer som af proteiner og efterfølgende selektiv genopløsning kun af ønsket protein, medens følgestofferne ligesom eventuelt inaktive proteiner forbliver i bundfaldet.

Fraktionering er adskillelsen af inaktive proteiner fra ønsket aktivt protein. Med inaktiv protein forstås herved også i og for sig aktive proteiner, som dog ikke udviser den i det specielle tilfælde søgte eller ønskede virkning. Fraktioneringen sker ved tilsætning af voksende mængder af polyethylenimin, hvorved de forskellige proteiner fælder ud efter hinanden med overraskende god adskillende virkning.

Med følgestoffer, d.v.s. sådanne stoffer, som ved rensningstrinnet ifølge den foreliggende opfindelse, bliver adskilt fra aktiv protein, skal forstås nucleinsyre, cellevægbestanddele, som polyuronsyre etc., og plasmabestanddele, undtagen proteinerne selv.

En særlig fordel ved frengangsmåden ifølge opfindelsen består i, at kun meget ringe mængder af polyethylenimin skal tilsættes for at opnå de ønskede adskillende virkninger. Ved lave saltkoncentrationer er det således hyppigt nok med mængder af størrelsesordenen 0,005 - 1 volumen% af en 10 %ig polyethyleniminopløsning i vand, for at opnå fuldstændig fældning eller fraktionering af bestemte proteiner. På den anden side kan der også til udfældning af følgestoffer ved relative høje saltaktiviteter i opløsningen, også tilsættes betydeligt større mængder af polyethyleniminopløsning, f.eks. 15 - 20 volumen% af en 10 %ig opløsning eller mere. Frengangsmåden ifølge opfindelsen er overordentlig skånsom og forløber derfor under den bedst tænkelige bevarelse af proteinernes aktivitet. Som de følgende eksempler viser, kan der ved negative berigelsestrin, altså ved udfældning af følgestoffer, opnås aktivitetsudbytter på indtil 100%, medens der ved positive berigelsestrin, altså under udfældning af

de ønskede proteiner, kan opnås aktivitetsudbytter på indtil 90%.

Følgende eksempler belyser opfindelsen nærmere.

Eksempel 1.

Adskillelse af albumin og ribonucleinsyre (RNS) ved hjælp af polyethylenimin (PEI), molvægt ca. 50.000.

500 mg serum-albumin (svarer til 400 mg protein efter Biuret-metoden) og 500 mg ribonucleinsyre opløses i 50 ml 0,05 M fosfatpuffer, pH-værdi = 7,0 og pH-værdien efterindstilles med 2 N NaOH på 7,0. Ved trinvis tilsætning af PEI (molvægt 50.000, 10 %ig opløsning, pH-værdi = 7,0) udfældes kun RNS, derimod intet albumin. Ved at forringe puffermolariteten ved fortynding med vand, udfældes derpå albuminet (tabel 1).

Tabel 1. RNS- og albumin-adskillelse ved hjælp af PEI.

Vol% PEI	Phosphat M	Σmg RNS i den overliggende væske	Σ mg protein i den overliggende væske
0	0,05	500	400
3	0,05	275	390
6	0,05	75	390
9	0,05	50	380
12	0,05	30	380
15	0,05	30	380
3	0,01 ⁺	5	40

⁺ Den overliggende væske fra fældningen med 15 volumenprocent PEI blev fortyndet tilsvarende med vand.

Eksempel 2

Isolering af glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH) af bagegær.

I 1 liter afsaltet vand, indeholdende 20 g Na₂HPO₄ · 12H₂O og 370 mg "Trilon" [®] (ethyldiamintetraeddikesyre) suspenderes 340 g tørret

bagegær, og der inkuberes i 4 timer ved 38°C. Derpå tilsættes 1 liter 4°C varmt vand, og der omrøres og centrifugeres. Den opnåede overliggende væske indeholder, foruden andre gærbestanddele, G-6-PDH og hexokinase. Der tilsættes langsomt 0,12 volumen polyethylenimin (PEI), molvægt ca. 50.000 (10%ig opløsning i H₂O), pH-værdi = 7,0. Der dannes et bundfald, som indeholder nucleinsyrer og proteaser. PEI-fældningen kan også gennemføres direkte i den inkuberede gærsoft uden forudgående centrifugering. PEI-bundfaldet er grovfnugget og lader sig udmærket centrifugere sammen med bristede gærceller. Den på denne måde forrensede enzymopløsning (overliggende væske) indstilles med fast ammoniumsulfat på 3,05 M, det dannede bundfald indeholder begge enzymer. Efter centrifugering bliver bundfaldet optaget med $2 \cdot 10^{-2}$ M MgCl₂-opløsning, indeholdende $1 \cdot 10^{-3}$ M "Trilon"[®] og $1 \cdot 10^{-3}$ M Na-azid, pH-værdi = 6,5 og dialyseret 12 timer mod ledningsvand.

Som yderligere rensningstrin behandles dialysatet (ca. 2,0 liter, 0,01 M ammoniumsulfatindhold) med 0,010-0,020 volumen af ovennævnte PEI-opløsning, så endnu ca. 5 % af G-6-PDH forbliver i den overliggende væske. Der arbejdes mellem pH-værdi 6,0 og 7,0, fortrinsvis pH-værdi 7,0. Den opnåede overliggende væske kastes bort.

PEI-enzym-bundfaldet suspenderes 1 gang med 0,01 M fosfatpuffer, pH-værdi 7,6 og centrifugeres. Vaskevandet indeholder ca. 2 % af enzymaktiviteten.

Til eluering anvendes en 0,03 M fosfatpuffer, pH-værdi 7,6, omrøres ved stuetemperatur i 15 minutter og centrifugeres. Den overliggende væske indeholder ca. 50-60 % af G-6-PDH-aktiviteten, beregnet på aktiviteten efter dialyse. G-6-PDH-beriges ved dette trin 7 gange (tabel 2).

Tabel 2. Positivt PEI-trin ved G-6-PDH-metode.

Trin	U/mg protein a)	%	U/mg protein b)	%
Efter dialyse	0,53	100	0,50	100
PEI-overliggende væske	-	16	-	1,47
vaskning 0,01 M, pH = 7,6	-	1,8	-	0,70
eluat 0,03 M, pH = 7,6	3,8	45	2,92	53

- a) = 0,85 % PEI-tilsætning af en 100 %ig opløsning, pH = 7,0
 b) = 1,23 % PEI-tilsætning af en 100 %ig opløsning

Eksempel 3.

Isolering af hexokinase (HK) af bagegær.

Der arbejdes som beskrevet i eksempel 2 under fremstilling af et dialysat.

Dialysatet, 0,01 M ammoniumsulfatindhold ca. 2,0 liter, behandles med 0,009 volumen polyethylenimin (PEI) molvægt ca. 50.000, pH-værdi = 7,0 (10 %ig opløsning i H₂O), således at endnu ca. 10 % af HK-aktiviteten forbliver i den overliggende væske. Til vaskning, suspenderes PEI-HK-bundfaldet en gang med 0,01 M fosfatpuffer, pH-værdi 7,6 og der centrifugeres. Vaskevandet kastes bort.

Enzybundfaldet optages med 0,025 M fosfatpuffer, pH-værdi = 7,6, der omrøres i 15 minutter ved stuetemperatur og centrifugeres derpå. Den overliggende væske indeholder ca. 40 % af HK-aktiviteten, beregnet på dialysatet. Rensningen ved dette trin er det firedobbelte (tabel 3).

Tabel 3. Positivt PEI-trin ved HK.

Trin	U/mg protein	%
efter dialyse	2,46	100
PEI-overliggende væske	0,39	10,8
vaskning 0,01 M, pH = 7,6	-	10,1
eluat 0,025 M, pH = 7,6	10,5	33,4

Eksempel 4.

Adskillelse af ribonucleinsyre (RNS) og proteaser (målt med casein som substrat) samt hexokinase og glucose-6-phosphatdehydrogenase gennem et negativt polyethylenimintrin.

100 ml afcentrifugeret gærsaft, ifølge eksempel 2, behandles trinvis med PEI (molvægt ca. 50.000, 10 %ig opløsning), pH-værdi = 7,0. Molariteten på fosfatpuffer og andre salte var ialt 0,08 M (målt ledningsevneværdi beregnet på fosfatpuffer). Tabel 4 viser den ved tiltagende PEI-indhold opnåede fraktionering.

Tabel 4. Fraktionering af RNS og proteaser samt HK og G-6-PDH (100 ml gærsaft).

Vol% PEI	Σ mg RNS	Σ mg proteaser	Σ U HK	Σ U G-6-PDH
0	185	0,350	$4,3 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^2$
4	45	0,147	$4,2 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^2$
8	6	0,035	$4,2 \cdot 10^3$	$7,6 \cdot 10^2$
12	15	0,020	$4,2 \cdot 10^3$	$7,6 \cdot 10^2$

RNS og proteaser bliver udfældet næsten fuldstændigt ved 8-12 volumenprocent PEI, medens HK og G-6-PDH forbliver praktisk taget uden tab i den overliggende væske.

Eksempel 5.

Glucose-oxydase af *Aspergillus niger*.

1 kg afpresset mycel af *A. niger* blev rørt med 2 liter helsaltet vand og ved 300-400 ato homogeniseret ved højtryksdispersionen.

Homogenisatet behandles med 0,2 vol% af en 10 %ig PEI-opløsning (molvægt 1800) ved pH-værdi 7,0-7,5 og affiltreret efter ca. 30 minutters omrøring. Det rene filtrat indeholdt glucose-oxidasen, følgestofferne befinder sig i bundfaldet, som skilles fra og kastes bort. Den saltfattige overliggende væske (ledningsevne ved 20°C ca. 2×10^3 μSiemens) behandles med 0,1 vol% af en 10 %ig PEI-opløsning (molvægt 30.000-60.000) ved pH-værdi 7,0-7,5. Efter ca. 30 minutters omrøring forbliver der i den rene centrifugerede overliggende væske, mindre end 8 % af glucose-oxydase-aktiviteten.

Bundfaldet bliver homogeniseret med 0,03 M kaliumphosphatpuffer pH-værdi 7,6, omrørt i 10 minutter og centrifugeret klar. Det inaktive bundfald kastes bort, den overliggende væske fryses og lyophiliseres. Tabel 5 viser den i de enkelte trin opnåede rensning samt udbyttet.

Tabel 5.

Oparbejdning	Volumen i ml	U	mg tør- vægt [†]	U/mg tørvægt	Udbytte %
1. Dekomponering og ekstraktion	2000	$1,78 \cdot 10^4$	2.900	5,35	100
2. Adskillelse af følgestoffer ved PEI (overliggende væske)	1950	$1,6 \cdot 10^4$	2.240	11,5	90
3. Fældning af glucoseoxydase med PEI (overliggende væske)	1870	$1,3 \cdot 10^3$	-	-	8,1
4. Ekstraktion af glucoseoxydase	140	$1,15 \cdot 10^4$	-	-	65
5. Glucoseoxydase efter lyophilisering	-	$1,22 \cdot 10^4$	250	48,5	68

[†] Tørvægtbestemmelsen skete efter opbrugende dialyse mod total saltet vand og efterfølgende lyophilisering.

Eksempel 6.

Glycerokinase af *Candida mycoderma*

Sammenligning mellem enzymisoleringer ifølge kendte metoder og under anvendelse af polyethylenimin.

A. Isolering ifølge den kendte teknik.

Ekstraktion af mycel:

60 g tørret mycel blev ekstraheret i 600 ml 0,05 M dikaliumhydrogenphosphat, 10^{-2} M glycerol og 10^{-3} M ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA) i 3 timer ved 37°C . Derpå blev der fortyndet med 600 ml 10^{-2} M glycerol og 10^{-3} M EDTA og centrifugeret fra mycel. Bundfaldet blev kastet bort.

Den opnåede ekstrakt blev i 60 minutter opvarmet til 60°C , afkølet til 10°C og centrifugeret fra denatureret protein.

Den overliggende væske fra opvarmningen blev mættet med ammoniumsulfat indtil 3,2 M og udfældet glycerokinase centrifugeret fra. Den inaktive overliggende væske blev kastet bort. I bundfaldet blev glycerokinase optaget med 0,05 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,6, 10^{-2} M glycerol og 10^{-3} M EDTA og ved 0°C dialyseret i ialt 14 timer mod den samme puffer.

B. Isolering af glycerokinase ifølge opfindelsen under anvendelse af polyethylenimin.

60 g tørret mycel blev ekstraheret som beskrevet under A., fortyndet og centrifugeret.

Den klare ekstrakt blev behandlet med 0,3 vol% af en 10 %ig PEI-opløsning (molvægt 30.000-60.000) ved pH-værdi 7,0-7,5. Efter ca. 30 minutters omrøring forblev glycerokinaseaktiviteten i den klart centrifugerede overliggende væske.

1 del overliggende væske blev nu fortyndet med 1 del kold 10^{-2} M glycerol og 10^{-3} M EDTA-opløsning. Derpå blev der tilsat 2,75 vol% af den ovennævnte 10 %ig PEI-opløsning ved en pH-værdi på 7,0-7,5. Den overliggende væske blev centrifugeret fra og kastet bort. Bundfaldet blev ekstraheret med 0,05 M kaliumphosphatpuffer, pH-værdi 7,0, og centrifugeret. Det afcentrifugerede bundfald blev kastet bort. I den overliggende væske blev glycerokinase udfældet med ammoniumsulfat til 3,2 M. Bundfaldet blev koncentreret optaget i 0,05 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 10^{-2} M glycerol og 10^{-3} EDTA og dialyseret i 14 timer ved 0°C mod den samme puffer.

Den følgende tabel 6 viser udbytterne opnået ved hjælp af den kendte metode og fremgangsmåden ifølge opfindelsen og viser klart det overlegne udbytte og den overlegne rensning, som opnås ved at arbejde i overensstemmelse med opfindelsen. Ifølge opfindelsen fås således ved 57 % udbytte en mere end 12 dobbelt berigelse, medens den kendte fremgangsmåde ved 22 % udbytte kun giver 4,5 gange berigelse.

Tabel 6.

1. Isolering af glycerokinase ifølge den kendte fremgangsmåde (tysk fremlæggeskrift nr. 1.238.422)

Oparbejdning	Volumen i ml	Sum enheder	Sum mg protein	Specifik aktivitet i enheder/mg pro- tein	Udbytte i %
1.1 Ekstraktion af mycel	1085	7,7 · 10 ³	3.720	1,98	100
1.2 Opvarmning af ekstrakt	1030	4,1 · 10 ³	246	16,6	53,3
1.3 Ammoniumsulfat- fældning og dialyse	50	2,1 · 10 ³	236	8,9	22,3
2. Isolering af glycerokinase under anvendelse af polyethylenimin.					
2.1 Ekstraktion af mycel	1035	7,7 · 10 ³	3.720	1,98	100
2.2 Adskillelse af følgestoffer ved hjælp af poly- ethylenimin	1000	8,0 · 10 ³	2.130	3,74	104
2.3 Fældning af glyce- rokinase med poly- ethylenimin. Op- løst bundfald	42	6,36 · 10 ³	328	19,4	81,5
2.4 Ammoniumsulfat- fældning og dialyse	28	4,39 · 10 ³	180	24,2	57,5

145601

Eksempel 7.

Diaphorase af svinehjerte.

Efter findeling af 1 kg frosset svinehjerte, udpresning af kødpasta, ekstraktion af den faste rest, varmebehandling af den således opnåede ekstrakt, ammoniumsulfatfraktionering til 3,2 M og dialyse fås en, beregnet på proteinet, vidtgående beriget diaphorase, som dog endnu indeholder betydelige mængder følgestoffer, som ikke kan påvises som protein. Til fjernelse af disse følgestoffer gennemføres polyethylenimintrinnet.

Dialysatet fortyndes med 0,01 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 i forholdet 1:1. Derpå tilsættes 0,5 vol% af en 10 %ig PEI-opløsning (molvægt 1800, pH-værdi indstillet på 7,0 med 2 N natriumhydroxid), hvorved følgestofferne fælder ud. Det inaktive bundfald centrifugeres fra og diaphorasen i den overliggende væske fryses og lyophiliseres.

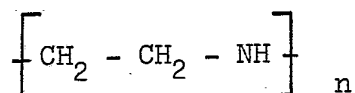
Tabel 7 viser de opnåede værdier vedrørende udbytte og berigelse.

Tabel 7.

Oparbejdning	Specifik aktivitet i enheder/ mg pro- tein	Aktivitet i enheder/mg lyophilisat	Udbytte %
1. Bundfald 3,2 M ammoniumsulfat	0,70	-	100
2. Dialyse	0,86	0,384	97
3. Overliggende væske efter PEI- fældning	0,9	0,657	91

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til rensning og fraktionering af vandopløste, fortrinsvis enzymatisk aktive proteiner, k e n d e t e g n e t ved, at proteinopløsningen tilsættes en vandopløselig polyethylenimin med den almene formel



hvori n har en værdi, som svarer til en gennemsnitlig molekylvægt mellem 600 og 100.000, i en til fraktionering og fraskilning af forureninger tilstrækkelig mængde.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at polyethyleniminen tilsættes i form af en fortyndet vandig opløsning.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at der arbejdes ved en pH-værdi mellem 5,0 og 9,0.

Fremdragne publikationer:

US patent nr. 3259569.