СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1138410 A

4(51) C 12 N 9/14

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ВСЕСОЮЗНАЯ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3491319/28-13
(22) 10.09.82
(46) 07.02.85. Бюл. № 5
(72) М.А.Володин
(71) Астраханский государственный медицинский институт им.А.В.Луначарского
(53) 577.15(088.8)
(56) 1. Lehman F.G., Lehman D. Reganisoenzym: Isolierung der alkalishen Prosphatase des menshlicher Placenta und Entwicklung einer emphfindlichen Methode für die Fumordiagnostick.-Wern. Deutsch. Ger. Almm.Med. '80 Kongr. Wiesbaden, 1974, p. 1658-1661.

2. Авторское свидетельство СССР № 1082811, кл. C 12 N 9/14, 1984.

(54)(57) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ПЛАЦЕНТАРНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ, предусматривающий экстрагирование ткани раствором хлористого натрия, прогревание экстракта, диализ и электрофорез в полиакриламидном геле, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что, с целью увеличения выхода целевого продукта и упрощения способа, перед диализом проводят повторное прогревание в присутствии 0,14-0,18%-ного сернокислого кадмия при 62-65°С в течение 1-5 мин.

(19) SU (11) 1138410 A

Изобретение относится к медицине, а именно в биохимии, и может быть использовано для выделения термостабильной плацентарной щелочной фосфатазы.

Известен способ выделения щелочной фосфатазы, включающий обработку гомогената ткани бутанолом, фракционирование ацетоном и сульфатом аммония, гельфильтрацию и ионообменную хроматографию [1].

Недостатками данного способа являются его сложность, длительность и низкий выход целевого продукта.

Наиболее близким к изобретению по технической сущности и достигаемому эффекту является способ выделения термостабильной плацентарной щелочной фосфатазы, предусматривающий экстрагирование ткани 3 М раствором хлористого натрия, прогревание экстракта в течение 10 мин при 65°С, фракционирование хлористым цетилпиридинием и сульфатом аммония, диализ и очистку целевого продукта электрофорезом в полиакриламидном геле [2].

Недостатками известного способа являются невысокий выход целевого продукта (72%), а также его сложность, заключающаяся в наличии двух стадий фракционирования.

Цель изобретения - увеличение выхода целевого продукта и упрощение способа.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу выделения термостабильной плацентарной щелочной фосфатазы, предусматривающему экстрагирование ткани раствором хлористого натрия, прогревание экстракта, диализ и электрофорез в полиакриламидном геле, перед диализом проводят повторное прогревание в присутствии 0,14-0,18%-ного сернокислого кадмия при 62-65°С в течение 1-5 мин.

Эффективность очистки при варьировании в предлагаемых интервалах концентраций сернокислого кадмия, температуры и времени практически не изменяется. За пределами этих интервалов или не достигается очистки фермента, например, прогревание при 45°С, или происходит его инактивация (табл. 1).

Прогревание без добавления сернокислого кадмия приводит к 4,3-кратному увеличению удельной активности целевого продукта.

Добавление сернокислого кадмия в концентрации 0,14-0,18% не приводит к значительному увеличению удельной активности: в этом случае выпадает в осадок около 30% балластных белков и удельная активность фермента возрастает в 13,5 раз.

Однако одновременное проведение двух обработок сернокислым кадмием и нагреванием, приводит к 15-кратной очистке с очень высоким выходом - более 90%.

Пример 1. 1 этап. Приготовление плацентарного тканевого экстракта: гомогенизация при 8000 об./мин в течение 5 мин отмытой от крови плаценты в 3 М растворе хлористого калия (вес-объемное соотношение 1:3-4); перемешивание на магнитной мешалке при 4°С в течение 12 ч; центрифугирование при 6000 об./мин в течение 30 мин. Дальнейшее исследование проводят с надосадочной жидкостью после диализа против дистиллированной воды (2 смены по 60 мин) и 0,1 моль раствора хлористого натрия (2 смены по 60 мин).

2 этап. Полученный плацентарный экстракт прогревают при 65°С в течение 10 мин и центрифугируют при 8000 об./мин в течение 20-30 мин.

3 этап. К надосадочной жидкости добавляют сульфат кадмия из расчета 0,14%-ной концентрации в итоговом растворе и проводится повторное прогревание при 65°С в течение 3 мин. Осадок отделяют путем центрифугирования при 8000 об./мин в течение 20-30 мин.

4 этап. Надосадочную жидкость диализуют в течение 10-12 ч против ацетатного буфера (pH 4,5).

5 этап. Доочищение препарата проводится методом препаративного диск-электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле с последующим извлечением из геля термостабильной щелочной фосфатазы электрофоретически. Гель, содержащий фермент, вырезают под визуальным контролем после окрашивания методом азосочетания (субстрат - нафтол - AS - BS - фосфат, краситель - прочный синий соль В). Количество очищенной термостабильной щелочной фосфатазы определяют методом Лоури. Результаты очистки термостабильной щелочной фосфатазы плаценты даны в табл. 2.

Пример 2. Выделение проводят аналогично примеру 1, но используют 0,18%-ный раствор сульфата кадмия. Выход на этой стадии составляет 93% против 93,1% по примеру 1.

Зависимость активности щелочной фосфатазы от условий выделения (температуры и концентрации сульфата кадмия) дана в табл. 1.

Прогревание при 62° в течение 1 или 5 мин приводят к тем же результатам (табл. 1).

При введении вместо сульфата кадмия 0,28%-ного сульфата натрия при последующем прогревании не наблюдается увеличение выпадания в осадок балластных белков по сравнению с контрольным опытом, в котором не добавляют никаких солей.

Таким образом, использование предлагаемого способа позволяет значительно увеличить выход целевого продукта с 72% до 92,9%, а также значительно упростить выделение фермента за счет замены стадий фракционирования хлористым цетилпиридинием и сульфатом аммония простейшей стадией термообработки.

Таблица 1

Условия выделения	Количество исследуемого материала, мл	Общая активность, ед	Вес белка, мг	Удельная активность, ед./мг	Выход, %
Прогревание при 45°С	1200	15870	6850	2,3	100,0
Прогревание при 65°С	1150	14900	1520	9,8	93,8
Добавление сульфата кадмия при прогревании					
45°С : 0,14%	1150	15700	6500	2,4	98,9
0,18%	1150	15650	6400	2,44	98,8
65°С : 0,14%	1070	14790	470	31,5	93,1
0,18	1050	14740	430	34,3	93,0
80°С : 0,14	985	-	95	-	0
0,18	980	-	90	-	0
65°С 0,26%	1050	220	350	0,6	1,4

Таблица 2

Этап	Условия очистки	Количество исследуемого материала	Общая активность, ед.	Количество белка мг	Удельная активность, ед./мг	Выход целевого продукта,%
1	Экстракт после обработки хлористым калием	1200	15880	6900	2,3	100,0
2	Первичное прогревание	1150	14900	1520	9,8	93,8
3	Добавление сульфата кадмия	1100	14800	1120	13,2	93,2
4	Вторичное прогревание	1070	14790	470	31,5	93,1
5	Диализ при pH 4,5	1070	14770	350	42,2	92,9
6	Итог (после электрофореза)	10,0	14770	41,2	358,4	92,9

Составитель В. Муронец
Редактор И. Дербак Техред Т. Дубинчак Корректор Л. Пилипенко

Заказ 760 Тираж 525 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4