



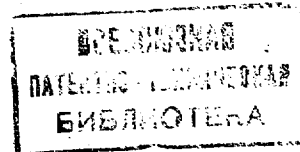
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1188948** **A1**

(51)5 A 61 K 37/48

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- 1
- (21) 3718820/28-14
(22) 02.04.84
(46) 30.11.90. Бюл. № 44
(71) Институт химической и биологической физики АН ЭССР и Опытный завод органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР
(72) А.А.Тара, Ю.Р.Сийгур и А.А.Аавик-саар
(53) 615.43:577.15.025.3 (088.8)
(56) Ансалон У.Р., Шамборант О.Г., Мирошников А.И. Биоорганическая химия 3 (II) 1553-1559, 1977.
(54) (57) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ИЗ ЯДА КОБРЫ, включающий растворе-

2

ние яда в буферном растворе с последующим центрифугированием, выделением целевого продукта путем аффинной хроматографии, элюции и лиофилизации, отличающийся тем, что, с целью упрощения процесса и повышения степени очистки целевого продукта, растворение проводят в 0,045-0,055 М буферном растворе уксусно-кислого аммония при pH 7,4-7,6, аффинную хроматографию осуществляют на пентил-агарозе в том же буферном растворе, а элюцию в 0,45-0,55 М растворе уксусно-кислого аммония и лиофилизируют полученный раствор дважды.

Изобретение относится к ферментной промышленности, в частности к получению чистой фосфолипазы A_2 из яда кобры.

Целью изобретения является упрощение процесса и повышение степени очистки целевого продукта.

Пример 1. К 1,0 г яда кобры добавляют 8,0 мл раствора 0,045 М уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,4, смесь медленно перемешивают 4 ч при 4°C . Растворенный яд центрифугируют при 5000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Осадок выбрасывают, насадочную жидкость используют для хроматографии. На уравновешенную с 0,045 М раствором уксусно-кислого

аммония (удельная электропроводность $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,4) колонку с пентил-агарозой (размеры колонки 2,1x16 см) наносят раствор яда. Колонку элюируют с 0,045 М раствором уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,4 со скоростью 30 мл/ч, отбирают фракции по 15 мл. Оптическую плотность элюата регистрируют непрерывно с помощью "Увикорд-11". Остальные компоненты яда кобры кроме фосфолипазы A_2 в данных условиях проходят колонку, а фосфолипаза A_2 , имеющая оптимум гидрофобности и активности при pH 7,5, связывается на пентил-агарозе и ее элюируют градиентом ионной силы концентрацией уксусно-

(19) **SU** (11) **1188948** **A1**

кислого аммония 0,45 М с удельной электропроводностью $32 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,4. Фракции, имеющие фосфолипазную активность, объединяют (выход 92 мл) и лиофилизируют дважды.

Характеристика препарата: выход 65,1%. Степень очистки 25 раз.

Пример 2. К 1,0 г яда кобры добавляют 8,0 мл раствора 0,050 М уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,5, смесь медленно перемешивают в течение 4 ч при 4°C . Растворенный яд центрифугируют при 5000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Осадок выбрасывают, надосадочную жидкость используют для хроматографии. На уравновешенную с 0,050 М раствором уксусно-кислого аммония (удельная электропроводность $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,5) колонку с пентил-агарозой (размеры колонки $2,1 \times 16 \text{ cm}$) наносят раствор яда.

Колонку промывают с 0,050 М раствором уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $4,5 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,5 со скоростью 30 мл/ч, отбирают фракции по 15 мл. Оптическую плотность элюата регистрируют непрерывно с помощью "Увикорда-11". Остальные компоненты яда кобры кроме фосфолипазы A_2 в данных условиях проходят колонку, а фосфолипаза A_2 , имеющая оптимум гидрофобности и активности при pH 7,5, связывается на пентил-агарозе и ее элюируют 0,50 М раствором уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $34 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,5. Фракции, имеющие фосфолипазную активность, объединяют (объем 90 мл) и лиофилизируют дважды.

Выход препарата 65,3% и степень очистки 25,2 раз.

Пример 3. К 1,0 г яда добавляют 8,0 мл раствора 0,055 М уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $4,6 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,6, смесь медленно перемешивают 4 ч при 4°C . Растворенный яд центрифугируют при 5000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Осадок выбрасывают, надосадочную жидкость используют для хроматографии. На уравновешенную с 0,055 М раствором уксусно-кислого аммония (удельная электропроводность $4,6 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,6) колонку с пентил-агарозой (размеры колонки $2,1 \times 16$) наносят раствор яда.

Колонку промывают с 0,055 М раствором уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $4,6 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,6 со скоростью 30 мл/ч, собирают фракции по 15 мл. Оптическую плотность элюата регистрируют непрерывно с помощью "Увикорда-11". Остальные компоненты яда кроме фосфолипазы A_2 в данных условиях проходят колонку, а фосфолипаза A_2 , имеющая оптимум гидрофобности и активности при pH 7,5 связывается на пентил-агарозу и ее элюируют 0,55 М раствором уксусно-кислого аммония с удельной электропроводностью $36 \cdot 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$, pH 7,6. Фракции, содержащие фосфолипазную активность, объединяют (объем 92 мл) и лиофилизируют дважды.

Выход препарата 65,0% и степень очистки 25 раз.

Технико-экономическая эффективность использования предлагаемого способа выражается в возможности количественного выделения фосфолипазы A_2 из яда кобры простым и дешевым способом, а остальной яд без фосфолипазы A_2 можно использовать для получения других биоактивных белков или после высушивания сохранить.

Редактор О. Филиппова Техред М. Дидык

Корректор Т. Малец

Заказ 4341

Тираж 542

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101