

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

100373

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 28.11.76 (P. 194041)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 26.09.77

Opis patentowy opublikowano: 31.07.1981

Int. Cl². C07G 7/026

Int. Cl³. C12N 9/76

Twórca wynalazku: Anna Wilimowska

Uprawniony z patentu : Uniwersytet Wrocławski im. Bolesława Bieruta,
Wrocław (Polska)

Sposób otrzymywania trypsyny z trzustki bydlęcej

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania czystych preparatów trypsyny z trzustki bydlęcej, z przeznaczeniem do badań podstawowych w biochemii oraz innych naukach biologicznych. Trypsyna jest enzymem proteolitycznym, wytwarzanym przez trzustkę.

Dotychczas znane i stosowane metody do preparacji trypsyny polegają na ekstrakcji białek trzustki do 0,25 N kwasu siarkowego, a następnie na wielokrotnym frakcjonowaniu tych białek za pomocą siarczanu amonu i siarczanu magnezu (Mc Donald M.R. and Kunitz M.J., J.Gen.Physiol 1946, 29, 155, Laskowski M. Methods in Enzymology) S.P.N.O. Kaplan, eds) 2 1955, 26, Academic press, New York). W wyniku zastosowania tych metod uzyskuje się trypsynę krystaliczną o aktywności 9000–13000 jedn/mg. Za jednostkę aktywności uważa się taką ilość enzymu, która powoduje przyrost ekstynkcji przy 235 nm o 0,001 na minutę w pH=7,6, temperaturze 25°C, używając estru etylowego benzoilo-argininy jako substratu.

Nie opisano dotychczas metody otrzymywania trypsyny z trzustki bydlęcej za pomocą kwasu trójchlorooctowego.

Istota wynalazku polega na zastosowaniu kwasu trójchlorooctowego zarówno do ekstrakcji, jak i oczyszczania enzymu, skutkiem czego otrzymuje się czystą trypsynę o aktywności około 16000 jedn/mg bez frakcjonowania białek za pomocą soli lub metod chromatograficznych.

Sposobem według wynalazku białka trzustki bydlęcej ekstrahuje się do kwasu trójchlorooctowego, korzystnie 5%, wypadający z ekstraktu osad rozpuszcza się w kwasie solnym, korzystnie 0,05 N i pozostawia do aktywacji w środowisku zasadowym, w obecności wapnia, a następnie dializuje do kwasu solnego, korzystnie 0,001 N i liofilizuje.

Sposób według wynalazku pozwala w sposób tani, prosty i niepracochłonny otrzymać wysoko oczyszczony preparat trypsyny, który jest wolny od soli.

Otrzymywanie trypsyny sposobem według wynalazku zostanie bliżej objaśnione na przykładzie wykonania.

Przykład. 1 kg świeżej trzustki bydlęcej, pobranej nie później niż 2–3 godziny po zabiciu zwierzęcia, pozostawia się w temperaturze około –15°C najlepiej na okres 24 godzin. Następnie tkankę rozmraża się

częściowo, w temperaturze pokojowej i rozdrabnia w elektrycznym młynku do mięsa. Rozdrobnioną tkankę zadaje się dwoma litrami 5% kwasu tróchlorooctowego, oziębionego do temperatury 0–5°C i ekstrahuje w tej temperaturze przy stałym mechanicznym mieszaniu przez okres 1 godziny. Wyciąg oddziela się przez wirowanie w temperaturze 0–5°C, sący przez bibułę filtracyjną i pozostawia w temperaturze 0–5°C na okres 24 godzin. Wypadający w tym czasie osad oddziela się przez wirowanie, zawiesza w około 100 ml 0,05 N HCl i rozpuszcza przez dializę do stu objętości tego kwasu w temperaturze 0–5°C. Otrzymany roztwór białka doprowadza się przy pomocy 0,1 N NaOH najpierw do pH=5–6, wypadający osad oddziela się przez wirowanie i odrzuca, a płyn doprowadza do pH=8 i dodaje się chlorek wapnia do końcowego stężenia 0,1 N. Roztwór pozostawia się na okres 24 godzin w temperaturze 0–5°C. W tym czasie nieaktywny proenzym przechodzi w enzym. Roztwór enzymu dializuje się do rozcieńczonego kwasu solnego 0,001 N i liofilizuje. Z 1 kg trzustki uzyskuje się 1–1,4 g liofilizowanej trypsyny. Preparat należy przechowywać w temperaturze 0–5°C.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania trypsyny z trzustki bydlęcej, z n a m i e n n y t y m, że białka trzustki bydlęcej ekstrahuje się do kwasu tróchlorooctowego, korzystnie 5%, a następnie wypadający z ekstraktu osad białkowy oddziela się przez wirowanie i rozpuszcza przez dializę do rozcieńczonego kwasu solnego, korzystnie 0,05 N, po czym pH roztworu doprowadza się do zasadowego, najkorzystniej do pH=8, dodaje chlorek wapnia, najkorzystniej do stężenia 0,1 N, a po 24 godzinach aktywną trypsynę dializuje się do kwasu solnego, korzystnie 0,001 N i liofilizuje.