



Patent dodatkowy  
do patentu

Zgłoszono: 21.VI.1965 (P 109 671)

Pierwszeństwo: 6.X.1964 Niemiecka  
Republika  
Demokratyczna

Opublikowano: 10.V.1967

Kl. 6 a, 22/07

MKP C 12 d

UKD

CZYTELNIJA

Urzędu Patentowego  
Polskiej Rzeczypospolitej

Współtwórcy wynalazku: prof. dr Erwin Negelein, dr Franz Noll, Walter Heumann, Gabriele Littmann

Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul (Niemiecka Republika Demokratyczna)

**Sposób wydzielania z mięśni szkieletu ssaków, zwłaszcza królików,  
wysoko aktywnej piruwatkinazy wolnej od miokinazy**

1

Wynalazek dotyczy sposobu wydzielania z mięśni szkieletu ssaków, zwłaszcza królików, wysoko aktywnej piruwatkinazy wolnej od miokinazy.

Sposoby wytwarzania piruwatkinazy (PK) były już często opisywane. Polegają one na tym, że dokładnie rozdrobnione mięśnie szkieletu ekstrahuje się wodą lub silnie rozcieńczonym roztworem buforowym, a następnie ekstrakt zawierający enzym oczyszcza się przez frakcjonowanie strącaniem acetonem, alkoholem, siarczanem amonowym albo przez kombinację tych sposobów strącania.

Przy stosowaniu frakcjonowanego strącania siarczanem amonowym wydajność piruwatkinazy jest mała, a poza tym jest ona zanieczyszczona miokinazą, tak że preparat PK nie może być stosowany do analiz enzymochemicznych. Inny sposób otrzymywania piruwatkinazy polega na frakcjonowanym strącaniu jej acetonem i następnej obróbce żelam fosforanu wapniowego. Przy tym uzyskuje się preparat piruwatkinazy wolny od miokinazy, lecz o niskiej aktywności właściwej, wynoszącej zaledwie około 3 000 jednostek (według Büchera). Również znane jest kombinowane strącanie enzymu PK siarczanem amonowym i alkoholem ale również ta metoda daje tylko słabo oczyszczony preparat PK.

Według dotychczasowych metod nie można więc otrzymać preparatu PK, o wymaganym stopniu czystości do celów analizy enzymatycznej, gdyż

2

piruwatkinaza wykazuje zbyt małą aktywność właściwą albo jest zanieczyszczona szkodliwą miokinazą.

5 Celem niniejszego wynalazku jest sposób wydzielania piruwatkinazy o takiej czystości, ażeby nadawała się do podstawowych badań enzymatycznych, a zwłaszcza do enzymatyczno-chemicznego oznaczania dwufosforanu adenozy (A.D.P.).  
10 Do tego celu preparat musi być bardzo czysty, a zwłaszcza wolny od miokinazy, ponieważ w obecności miokinazy oznaczenie ADP jest niemożliwe.

Stwierdzono, że z mięśni szkieletu ssaków, zwłaszcza z mięśni królików, można otrzymać piruwatkinazę, wolną od miokinazy, jeśli po ekstrakcji wodą rozdrobnionych mięśni otrzymany wyciąg podda się najpierw dwukrotnemu frakcjonowanemu strącaniu acetonem, otrzymany w ten sposób osad, zawierający enzym wysuszy w stanie zamrożenia, suchy proszek rozpuści w destylowanej wodzie, roztwór podda działaniu ciepła i dalszemu oczyszczaniu. Dalsze oczyszczanie prowadzi się przez adsorpcję na żelu fosforanu wapniowego i eluację piruwatkinazy za pomocą buforowego roztworu fosforanu, zawierającego siarczan amonowy. Z eluatu strąca się piruwatkinazę siarczanem amonowym i w końcu krystalizuje z roztworu zawierającego siarczan amonowy.  
25  
30 Otrzymany w ten sposób preparat ma wyższą

aktywność właściwą od dotychczasowych preparatów i jest wolny od miokinazy.

Sposobem według wynalazku postępuje się następująco:

Mięśnie szkieletu królika natychmiast po zabiciu spreparowane w chłodni, posiekane w oziębionej maszynie do siekania homogenizuje się z potrójną w stosunku do ich wagi ilością lodowatej wody destylowanej, następnie miesza jednorodną masę i jednocześnie chłodzi do temperatury 0°C w ciągu około 1 godziny. Otrzymany lekko mętny, różowo zabarwiony surowy wodny ekstrakt odwirowuje się, po czym strąca z niego najpierw proteinowe substancje balastowe, tworzące piruwatkinazę, a następnie piruwatkinazę. W tym celu do ekstraktu wprowadza się podczas mieszania i chłodzenia tyle oziębionego acetonu, ażeby nie spowodować wytrącenia się piruwatkinazy. Normalnie wystarczające jest dodanie 30—35% objętościowych acetonu. Wytrącający się przy tym osad odwirowuje się i odrzuca, natomiast z przesączu przez dalszy dodatek zimnego acetonu w ilości do około 40—50% objętościowych strąca się osad zawierający piruwatkinazę. Oddzielony osad rozpuszcza się w małej ilości zimnej wody destylowanej. Z zimnego roztworu po kilkugodzinnym odstaniu wydziela się osad nieaktywnej proteiny, który odrzuca się. Enzym (PK) pozostały w roztworze oczyszcza się dalej na drodze drugiego frakcjonowanego strącania acetonem, przy czym korzystne jest, ażeby stężenie enzymu w roztworze było wyższe aniżeli w przypadku pierwszego strącania. W tym celu stosuje się mniejszą objętość cieczy, korzystnie roztwór o objętości wynoszącej około 7—10% objętości surowego ekstraktu. Po dodaniu acetonu w ilości około 20—25% objętościowych wytrąca się nieaktywny osad białka, który odrzuca się. Po dalszym wprowadzeniu acetonu do zawartości 30—45% objętościowych wytrąca się enzym PK, który oddziela się i suszy w stanie zamrożenia. Różowo zabarwiony suchy produkt jest trwały przez kilka dni. Waga tego proszku wynosi około 1% wagowych w stosunku do wagi użytych mięśni. Suchy proszek rozpuszcza się następnie w zimnej wodzie destylowanej (około 1 g suchego proszku w 25 ml wody) i dodaje się tyle czteroocianu dwusodowego etylenodwuaminy (EDTA-NA<sub>2</sub>) ażeby jego stężenie w roztworze wynosiło 0,01 mola. Roztwór w trakcie umiarkowanego mieszania przez poruszanie naczyńia ruchem kołowym ogrzewa się szybko w ciągu 7 minut do 56—60°C i następnie studzi. Przy tym wytrąca się większa część zdenaturowanej proteiny towarzyszącej, przede wszystkim miokinazy, którą oddziela się. Ogrzewanie nie powoduje strat PK.

Następnie prowadzi się dalsze oczyszczanie roztworu, zawierającego piruwatkinazę przez adsorpcję na żelu fosforanu wapniowego. Szczególnie przydatny okazał się żel fosforanu wapniowego opisany w „Biochemical preparation” 6, 57 (1958) do otrzymywania „starego, żółtego fermentu” z drożdży browarnianych. 100 ml wstępnie oczyszczonego przez obróbkę cieplną roztworu, zawierającego enzym rozcieńcza się 350 ml roztwo-

ru buforowego o wartości pH=6,8 zawierającego w 1 l około 0,06 mola fosforanu. Roztwór ten zadaje się żelem fosforanu wapniowego (w ilości odpowiadającej około 4,5 g suchej substancji). Piruwatkinaza zostaje zaadsorbowana na żelu fosforanu wapniowego, podczas gdy miokinaza zostaje w roztworze. Preparat PK zawarty w oddzielnym żelu wymywa się na zimno w ciągu około pół godziny roztworem zawierającym w 1 litrze 0,2 mola buforu fosforanowego i 1,6 mola siarczanu amonowego. Z eluatu strąca się enzym roztworem siarczanu amonowego, o stężeniu około 2,8 molowym. Osad, który stanowi prawie czysty preparat enzymu, oddziela się i rozpuszcza w małej ilości wody. Piruwatkinazę krystalizuje się z 0,05 molowego buforowego roztworu octanu o wartości PH około 5,2, który korzystnie powinien zawierać 11 mg proteiny na 1 ml roztworu oraz stężenie 1,9 molowe siarczanu amonowego, przez powolne, stopniowe podwyższanie stężenia siarczanu amonowego na skutek dodawania stężonego roztworu siarczanu amonowego. Korzystna dla krystalizacji okazała się temperatura około 42°C, ponieważ preparat PK jest trudniej rozpuszczalny na gorąco niż na zimno. Preparat PK można ewentualnie przekrystalizować zachowując wyżej podane warunki.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się bardzo czystą piruwatkinazę, która wykazuje aktywność właściwą 9000 jednostek (według Büchera) na mg proteiny. Wydajność w odniesieniu do zawartości PK w ekstrakcie z mięśni wynosi około 20%.

#### Zastrzeżenie patentowe

Sposób wydzielania z mięśni szkieletu ssaków, zwłaszcza królików, wysoko aktywnej piruwatkinazy wolnej od miokinazy przez ekstrakcję rozdrobionych mięśni królika, za pomocą wody, frakcjonowane strącanie enzymu acetonem, dalsze oczyszczanie przez adsorpcję na żelu fosforanu wapniowego i eluację roztworem buforowym i wytrącanie produktu siarczanem amonowym, **znamienny tym**, że do ekstraktu wodnego wprowadza się 30—35% objętościowych acetonu, wytrącając przy tym substancje balastowe, po usunięciu których do ekstraktu wprowadza się dalej aceton w ilości 40—50% objętościowych, przy czym wytrąca się piruwatkinaza, którą rozpuszcza się w takiej ilości wody, ażeby otrzymać roztwór o 7—10% pierwotnej objętości, ponownie traktuje acetonem przez wprowadzenie najpierw 20—25% objętościowych acetonu, wytrącenie substancji balastowych i oddzielenie ich, a następnie dalsze wprowadzenie do roztworu acetonu w ilości 35—45% objętościowych, co powoduje wytrącanie się piruwatkinazy, po czym osad oddziela się, suszy w stanie zamrożenia, a następnie rozpuszcza w 0,01 molowym roztworze czteroocianu dwusodowego etylenodwuaminy i ogrzewa do temperatury 56—60°C w ciągu 7 minut, chłodzi, oddziela wytrącone substancje balastowe, a roztwór po rozcieńczeniu roztworem buforu zawierającym 0,006 mola/l fosforanu i o pH=6,8 oczyszcza dalej przez adsorpcję na żelu fosforanu wapniowego

5

i piruwatkinazę eluuje 0,2 molowym roztworem buforu fosforanowego o  $\text{pH}=6,8$  i o zawartości 1,6 mola/l siarczanu amonowego, po czym wytrąca ją z eluatu około 2,8 molowym roztworem siarczanu amonowego, rozpuszcza w małej ilości wody, roz-

6

cieńcza roztworem buforu octanowego o  $\text{pH}=5,2$  i o zawartości 1,9 mola/l siarczanu amonowego i wytrąca stopniowo przez dodawanie nasyconego roztworu siarczanu amonowego.