



URZĄD  
PATENTOWY  
PRL

Patent tymczasowy dodatkowy  
do patentu nr \_\_\_\_\_

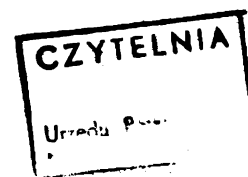
Int. Cl.<sup>3</sup> C12N 9/02

Zgłoszono: 83 03 29 (P. 241281)

Pierwszeństwo \_\_\_\_\_

Zgłoszenie ogłoszono: 84 07 16

Opis patentowy opublikowano: 1986 06 30



**Twórcy wynalazku:** Henryk Siemieniowski, Jadwiga Gołębiowska, Marian Wolny

**Uprawniony z patentu tymczasowego:** Akademia Medyczna,  
Wrocław (Polska)

### Sposób wytwarzania dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, której nazwa systematyczna brzmi: E.C.1.2.1.12, Oksydoreduktaza aldehyd 3-fosfoglicerynowy: NAD, fosforylująca. Preparat ten jest enzymem stosowanym do celów diagnostycznych w analityce klinicznej.

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego jest produkowana dla celów komercyjnych z mięśni królika i drożdży. Z publikacji: Gy. Jécsai: XIII. Isolation of D-glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Heart Muscle, Acta Physiol. Acad. Sci Hung. XVII, 161, 1960; znany jest sposób otrzymywania dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego z mięśnia sercowego wołu przez ekstrakcję wodą ochłodzonej miazgi i frakcjonowanie siarczanem amonu oraz poddawanie działaniu zmiennej temperatury podczas krystalizacji. Rozdrobnione mięśnie zalewa się dwukrotnie wodą i ekstrakty łączy, a następnie wysala siarczanem amonu do 0,7 nasycenia i sączy przez bibułę. Do supernatantu dodaje się 0,1 objętości nasyconego siarczanu amonu i pozostawia przez tydzień, zmieniając cyklicznie temperaturę otoczenia od 277 do 293 K, przy pH = 6,7. Uzyskuje się w ten sposób kryształy, które rozpuszcza się i wytrąca ponownie siarczanem amonu i znowu poddaje działaniu zmiennej temperatury, jak poprzednio. Nie podano aktywności specyficznej otrzymanego tym sposobem enzymu. Ze względu na długi czas preparacji można przyjąć, że wytworzony enzym ma niską aktywność specyficzną, zaś tak przeprowadzone frakcjonowanie wskazuje na znaczne zanieczyszczenia innymi enzymami.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, z mięśnia sercowego wołu, przez ekstrakcję oraz frakcjonowanie białek siarczanem amonu i rozdzielanie białek przy pomocy chromatografii kolumnowej z zastosowaniem buforu ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego.

Istota wynalazku polega na tym, że ekstrakcję przeprowadza się buforem złożonym z trójhydroksymetyloaminometanu, kwasu solnego i soli sodowej kwasu wersenowego przy pH = 7,5, po czym supernatant frakcjonuje się i otrzymaną frakcję w zakresie 0,62–0,8 nasycenia siarczanu amonu wprowadza się na kolumnę chromatograficzną wypełnioną fosfocelulozą i usuwa białka balastowe wyżej wymienionym buforem zawierającym chlorek sodowy najkorzystniej o stężeniu 60 mM, a następnie uwalnia się enzym właściwy wymienionym buforem ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego, do stężenia końcowego co najmniej 400 mM i stabilizuje się go przez dodanie dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego. Wyizolowany właściwy enzym oczyszcza się przez naniesienie na kolumnę chromatograficzną wypełnioną karboksymetylocelulozą, usuwa białka

balastowe buforem złożonym z betamerkaptoetanolu i soli sodowej kwasu wersenowego o  $\text{pH} = 7,0$ , natomiast właściwy enzym uwalnia się tym samym buforem ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego do stężenia końcowego co najmniej 300 mM, stabilizuje przez dodanie dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego i wysala siarczanem amonu.

Sposób według wynalazku charakteryzuje się tym, że otrzymaną drogą ekstrakcji i frakcjonowania białek zagęszczaną frakcją zawierającą dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego łączy się z fosfofelulozą w warunkach zapewniających wiązanie z nią właściwego enzymu, dzięki czemu możliwe staje się maksymalne usunięcie innych białek. Związany z fosfofelulozą właściwy enzym po uwolnieniu i wytrąceniu oczyszcza się przez chromatografię z zastosowaniem karboksymetylofelulozy w warunkach zapewniających wiązanie z nią właściwego enzymu i usuwa resztę białek balastowych, a potem uwalnia się właściwy enzym. Dzięki tak przeprowadzonym procesom: ekstrakcja-frakcjonowanie-rozdzielanie dwukrotne z zastosowaniem różnych buforów uzyskuje się dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego o aktywności apecyficznej nie mniejszej niż 130 jednostek na 1 mg białka, przy przyjęciu za jednostkę enzymatyczną wytwarzanie 1 mikromola produktu w ciągu 1 minuty w temperaturze 298 K wobec 1,3 difosfoglicerynianu jako substratu, według: Biochemica Information, Boehringer, Mannheim, str. 105 oraz oznaczenie białka spektrofotometrycznie przy 280 nm przyjmujące  $E 1\%/1 \text{ cm} = 10$ . Trwałość zawiesiny enzymu w roztworze siarczanu amonu wynosi 12 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 277 K.

Tak otrzymany enzym jest praktycznie wolny od aktywności nieswoistej; nie wykazuje aktywności izomerazy fosfotriozyowej, aktywności dehydrogenazy fosfoglicerolu, natomiast aktywność dehydrogenazy mleczanowej nie przekracza 0,01%, aktywność kinazy 3-fosfoglicerynianowej nie przekracza 0,02% i fosfogliceromutazy 0,05% w przeliczeniu na aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Ze względu na wysoką aktywność specyficzną i trwałość, otrzymany enzym może być uważany za odpowiednik enzymu mięśniowego produkowanego przez firmę Boehringer. Oczyszczanie na karboksymetylofelulozie gwarantuje uzyskanie enzymu o wysokiej aktywności, praktycznie wolnego od aktywności nieswoistych. Zastosowanie w celu stabilizacji enzymu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego zapewnia trwałość enzymu w okresie przynajmniej jednego roku.

Przykład. Do 500 g surowca w postaci oczyszczonych z tłuszczu i tkanki łącznej rozdrobionych i zamrożonych mięśni sercowych wołu dodaje się 1000 ml buforu złożonego z trojhydroksymetyloaminometanu o stężeniu 50 mM, kwasu solnego i soli sodowej kwasu wersenowego o stężeniu 1 mM i  $\text{pH} = 7,5$  i miesza mechanicznie przez 30 minut w temperaturze 277–279 K. Wszystkie dalsze operacje wykonuje się w tej temperaturze. Homogenat wiruje się, supernatant poddaje się frakcjonowaniu siarczanem amonu w zakresach 0–0,62–0,8 nasycenia, utrzymując  $\text{pH} = 7,5$ . Uzyskaną frakcję białkową zawartą pomiędzy 0,62–0,8 nasycenia siarczanem amonu w postaci osadu rozpuszcza się w 150 ml wyżej wymienionego buforu o  $\text{pH} = 7,5$ , odsala się na sicie molekularnym i wprowadza na kolumnę chromatograficzną wypełnioną fosfofelulozą wyrównowaną tym samym buforem. Kolumnę płucze się 5 objętościami tego buforu z chlorkiem sodowym o stężeniu 60 mM, aż do uzyskania absorbancji wypływu mierzonej przy 280 nm mniejszej niż 0,05, co jest miarą usunięcia białek balastowych.

Następnie nanosi się znów wymieniony bufor ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego do stężenia końcowego 400 mM chlorku sodowego, co powoduje uwolnienie właściwego enzymu. Aktywne frakcje mające powyżej 70 jednostek na 1 mg łączy się i dodaje 20-krotny nadmiar dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego w stosunku molowym i wysala siarczanem amonu do stężenia końcowego 0,75 nasycenia i  $\text{pH} = 7,5$ . W celu oczyszczenia enzymu zawiesinę wiruje się, osad rozpuszcza w buforze złożonym z betamerkaptoetanolu o stężeniu 5 mM i soli sodowej kwasu wersenowego o stężeniu 5 mM i  $\text{pH} = 7,0$ , dializuje do tego buforu i wprowadza na kolumnę chromatograficzną wypełnioną karboksymetylofelulozą uprzednio wyrównowaną tym samym buforem. Kolumnę płucze się 5 objętościami tego samego buforu, aż do uzyskania absorbancji wypływu mierzonej przy 280 nm mniejszej niż 0,05, co jest miarą usunięcia białek balastowych. Właściwy enzym uwalnia się przez na naniesienie wymienionego buforu ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego do stężenia końcowego 300 mM. Aktywne frakcje zawierające powyżej 100 jednostek na 1 mg łączy się, dodaje 20-krotny nadmiar dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego w stosunku molowym i wysala siarczanem amonu do stężenia końcowego 0,75 nasycenia i  $\text{pH} = 7,5$ . Otrzymuje się 0,075 g dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

### Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, z mięśnia sercowego wołu, przez ekstrakcję oraz frakcjonowanie białek siarczanem amonu i rozdzielanie białek przy pomocy chromatografii kolumnowej z zastosowaniem buforu o wzrastającym stężeniu chlorku sodowego, **znamienny tym**, że ekstrakcję przeprowadza się buforem złożonym z trójhydroksymetyloaminometanu, kwasu solnego i soli sodowej kwasu wersenowego przy  $\text{pH} = 7,5$ , po czym supernatant frakcjonuje się i otrzymaną frakcję w zakresie 0,62–0,8 nasycenia siarczanu amonu wprowadza na kolumnę chromatograficzną wypełnioną fosfocelulozą i usuwa białka balastowe wyżej wymienionym buforem zawierającym chlorek sodowy, najkorzystniej o stężeniu 60 mM, a następnie uwalnia się enzym właściwy wymienionym buforem ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego do stężenia końcowego co najmniej 400 mM i stabilizuje się go przez dodanie dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego, zaś tak wyizolowany właściwy enzym oczyszcza się przez naniesienie na kolumnę chromatograficzną wypełnioną karboksymetylocelulożą, usuwa białka balastowe buforem złożonym z betamerkaptoetanolu i soli sodowej kwasu wersenowego o  $\text{pH} = 7,0$ , natomiast właściwy enzym uwalnia się tym samym buforem ze wzrastającym stężeniem chlorku sodowego do stężenia końcowego co najmniej 300 mM, stabilizuje przez dodanie dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego i wysala siarczanem amonu.