



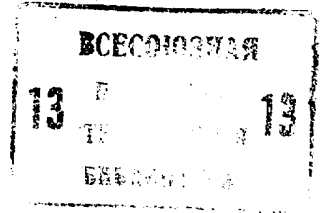
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1377292** **A1**

(5D) 4 С 12 N 9/00, 9/50

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



(21) 4105833/31-13

(22) 20.06.86

(46) 29.02.88. Бюл. № 8

(71) Институт биохимии им. А. Н. Баха

(72) Е. В. Иевлева, А. В. Зимачева

и В. В. Мосолов

(53) 663.15(088.8)

(56) Slijterman I. A. A., Wijdenes G.

An agarosa mercurial column for the separation of mercaptoparain and nonmercaptoparain. - Biochim. Biophys. Acta, 1970, 200, 593-595.

Мосолов В. В., Костанова Е. А.,
Валуева Ж. А. Взаимодействие цистеиновых протеиназ с соевым ингибитором трипсина (ингибитор Кунитца). - Прикладная биохимия и микробиология, 1985, XXI, вып. 2, с. 167-172.

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ПРОТЕИНАЗ ЦИСТЕИНОВОГО ТИПА

(57) Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способам очистки протеолитических ферментов цистеинового типа из растений. С целью упрощения процесса в способе очистки протеиназ цистеинового типа аффинной хроматографией предложено в ка-

честве сорбента использовать сефарозу, модифицированную иминодиуксусной кислотой, содержащую координационно связанные ионы ртути, а элюцию вести буферным раствором, содержащим 0,4-0,6 М NaCl, при pH 6,5-7,5. Принципиальным отличием предлагаемого сорбента является то, что сорбирование происходит за счет ионов ртути, координационно связанных с поверхностью сорбента, а не ковалентно связанных с ним, что позволяет осуществлять элюцию сорбированного белка в более мягких условиях солевым раствором фосфатного буфера, а не дорогостоящими и вредными реактивами, такими как α -цистеин и β -меркаптоэтанол. Кроме того, способ очистки ферментов на предлагаемом сорбенте дает возможность значительно упростить стадию сорбции протеиназ, т.к. отсутствует необходимость обрабатывать ферменты активирующими добавками и освобождаться от них перед очисткой, а также увеличить производительность за счет высокой емкости сорбента.

(19) **SU** (11) **1377292** **A1**

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способам очистки протеолитических ферментов цистеинового типа из растений.

Цель изобретения - упрощение процесса.

Изобретение заключается в том, что в способе очистки протеиназ цистеинового типа аффинной хроматографией предложено в качестве сорбента использовать сефарозу, модифицированную иминодиуксусной кислотой, содержащую координационно связанные ионы ртути, а элюцию вести фосфатным буфером, содержащим 0,4-0,6 М NaCl при pH 6,5-7,5.

Принципиальным отличием предлагаемого сорбента является то, что сорбирование происходит за счет ионов ртути, координационно связанных с поверхностью сорбента, а не ковалентно связанных с ним. Это позволяет осуществлять элюцию сорбированного белка в более мягких условиях.

Способ осуществляют следующим образом.

Очистке подвергают препараты ферментов, полученные из латекса дымного дерева *Carica papaya* или растений рода *Ficus*. Сорбент получают ковалентным присоединением к эпоксипроизводному сефарозы иминодиуксусной кислоты при 65°C в течение 24 ч. Насыщение поверхности полученного сорбента осуществляют пропусканием через колонку с сорбентом 1%-ного раствора HgCl₂. Несорбированные ионы ртути отмывают водой. На колонку наносят раствор белка в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,5-7,5. Элюцию ведут тем же буфером, содержащим 0,4-0,6 М NaCl. При значениях pH меньших, чем 6,5, не происходит полная сорбция белка, а при значениях выше 7,5 наблюдается неспецифическая сорбция белков. Использование меньших, чем 0,4 М концентраций NaCl приводит к неполной элюции ферментов, а при концентрациях больших 0,6 М элюируются неспецифически сорбированные белки. Достигаемая степень очистки равна 2.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. 140 мг латекса из дымного дерева *Carica papaya* (отечественный препарат производства Гагрского опорного пункта Главного Ботанического сада АН СССР) с активностью

19 ед/мг белка растворяли в 40 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,5 и пропускали через колонку с 6 мл сефарозы, модифицированной иминодиуксусной кислотой, содержащей координационно связанные ионы ртути. После отмывания колонки тем же буфером от несорбированного белка проводили элюцию 0,1 М фосфатным буфером, pH 6,5, содержащим 0,4 М NaCl. Полученный раствор содержал 36 мг белка с протеолитической активностью 38 ед/мг белка.

Пример 2. 140 мг латекса растворяли в 40 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,5 и пропускали через колонку с 6 мл сорбента. После отмывания колонки тем же буфером от несорбированного белка проводили элюцию 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 0,6 М NaCl. Полученный раствор содержал 120 мг белка с протеолитической активностью 30 ед/мг белка.

Пример 3. Через колонку с 6 мл сорбента пропускали раствор 140 мг латекса в 40 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0. После отмывания колонки от несорбированного белка осуществляли элюцию сорбированного белка с помощью 0,5 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0. Получили 107 мг белкового материала с протеолитической активностью 38 ед/мг.

Пример 4. 50 мг фицина (препарат латекса растений рода *Ficus*, Calbiochem) растворяли в 30 мл 0,1 М фосфатного буфера и пропускали через колонку с сорбентом. После промывания колонки белковый материал элюировали 0,5 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0. Получили 7 мг фицина, активность которого соответствует 40 ед/мг, что в 2 раза превышает активность исходного препарата.

Как видно из представленных примеров, оптимальными условиями для элюции цистеиновых протеиназ с поверхности сорбента являются 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0, содержащий 0,5 М NaCl. В результате полученные препараты ферментов латекса и фицин имеют активность 38 и 40 ед/мг соответственно. Таким образом, применение более простого сорбента, содержащего на своей поверхности координационно связанные ионы ртути, позволяет применять для элюции сорби-

рованных протеиназ простой способ, заключающийся в промывании сорбента фосфатным буфером, содержащим NaCl.

Способ очистки ферментов на предлагаемом сорбенте дает возможность значительно упростить стадию сорбции протеиназ, так как отсутствует необходимость обрабатывать ферменты активирующими добавками и освобождаться от них перед очисткой, позволяет осуществлять элюцию более простым способом, т.е. солевым раствором фосфатного буфера, который исключает применение более дорогостоящих (α -цистеин и β -меркаптоэтанол) и вредных (β -меркаптоэтанол) реактивов более дешевым и безвредным (хлористый натрий), а также увеличить

производительность за счет высокой емкости сорбента.

5 Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ очистки протеиназ цистеинового типа, предусматривающий аффинную хроматографию на сорбенте на основе сефарозы, содержащем ионы Hg^{2+} , с последующей элюцией, отличающийся тем, что, с целью упрощения процесса, в качестве сорбента используют сефарозу, модифицированную иминодиуксусной кислотой, содержащую координационно связанные ионы Hg^{2+} , элюцию ведут фосфатным буфером, содержащим 0,4-0,6 М NaCl, а pH буферного раствора устанавливают 6,5-7,5.

Редактор Н. Киштулинец Составитель В. Соина
Техред М. Дидык Корректор М. Максимишинец

Заказ 816/18 Тираж 520 Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4