



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14562 (13) A

(51) C 07 D 311/72; C 12 P 13/00

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІН Е-ЗВ'ЯЗУЮЧИХ БІЛКІВ З ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

1

(21) 95041648

(22) 11.04.95

(24) 20.01.97

(46) 25.04.97, Бюл. № 2

(47) 20.01.97

(72) Донченко Георгій Вікторович, По-
стоєнко Володимир Олексійович, Палівда
Ольга Михайлівна, Бойко Лариса Ми-
хайлівна(73) Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН
України (UA)(57) Спосіб получения витамин Е-связываю-
щих белков из печени крыс, включающий
гомогенизацию ее в буферном растворе,

2

центрифугирование, фильтрацию и последу-
ющее выделение целевого продукта, о т л и-
ч а ю щ и й с я тем, что выделение целевого
продукта осуществляют хроматографией при
использовании в качестве аффинного сорбен-
та 2, 5, 7, 8-тетраметил-2(2-метил-3-карбокси-
пентан)-6-оксихроман-1,6-диаминогексан-
сефарозы 4В или 2,5,7,8- тетраметил-2-(2-ме-
тил-3-аминометилпентан)-6-оксихромангли-
цилглицинсефарозы 4В, при этом сорбцию и
промывку проводят 0,04-0,08 М трис-НСІ бу-
фером рН 7,4-8,0, содержащим 0,25 М сахаро-
зы, а элюцию белка осуществляют указанным
буфером, содержащим 0,8-1,2 М NaCl.

Изобретение относится к области пре-
паративной биохимии, а именно, к способам
выделения витамин Е-связывающих белков.

Известны способы получения витамин
Е-связывающих белков из цитозоля гомоге-
низированной печени крыс методом аффин-
ной хроматографии (авт. св. СССР № 1405278,
кл. С 07 D 311/72, заявл. в 1986 г.; авт. св.
СССР № 1398357, кл. С 07 D 311/72, заявл.
в 1986 г.).

За прототип нами принят способ полу-
чения витамин Е-связывающих белков, опи-
санный в G. L. Catignani "Hepatic
 α -Tocopherol-Binding Protein" Methods of
Enzymology, 1980, v.67, part F, p. 117-122.

По прототипу печень животных (крыс,
цыплят и др.) гомогенизируют в 10 мМ трис-
НСІ буфере с содержанием сахарозы 0,2 М

при рН 7,5, гомогенизированную печень
центрифугируют при 10000 g и t 4°C в тече-
ние 15 мин, затем при 105000 g и t 4°C в
течение 1 часа, полученный цитозоль печени
фильтруют. Аликвоту цитозоля печени инку-
бируют с α - α (5-метил-3Н) токоферолом (100
нМ) в течение 4 часов при 26°C в присутст-
вии 400-кратного избытка немеченого α -то-
коферола и без него, после чего
центрифугированием в 10 мМ трис-НСІ бу-
фере при рН 7,5 и содержании сахарозы
5-20% показывают наличие специфического
связывания α -токоферола белком.

Недостатком прототипа является то, что
проводится лишь грубая очистка белков.

Задачей изобретения является созда-
ние способа получения витамин Е-связыва-
ющих белков, позволяющего путем исполь-

(19) UA (11) 14562 (13) A

зования в качестве аффинного сорбента 2,5,7,8-тетраметил-2(2-метил-3-карбокспентан)-6-оксихроман-1,6-диаминогексансефарозы 4В или 2,5,7,8-тетраметил-2(2-метил-3-аминометилпентан)-6-оксихроман-глицилглицинсефарозы 4В, проведения сорбции и промывки трис-НСI буфером, содержащим сахарозу, и осуществление элюции белка указанным буфером, содержащим NaCl, обеспечить повышение качества очистки белков.

Для этого, в способе получения витамин Е-связывающих белков из печени крыс, включающем гомогенизацию ее в буферном растворе, центрифугирование, фильтрацию и последующее выделение целевого продукта, выделение последнего осуществляют хроматографией при использовании в качестве аффинного сорбента 2,5,7,8-тетраметил-2(2-метил-3-карбокспентан)-6-оксихроман-1,6-диаминогексансефарозы 4В или 2,5,7,8-тетраметил-2(2-метил-3-аминометилпентан)-6-оксихроман-глицилглицинсефарозы 4В, при этом сорбцию и промывку проводят 0,04-0,08 М трис-НСI буфером рН 7,4-8,0, содержащим 0,25 М сахарозы, а элюцию белка осуществляют указанным буфером, содержащим 0,8-1,2 М NaCl.

Новым является проведение аффинной хроматографии на специально синтезированном для выделения кислых витамин Е-связывающих белков сорбенте и выполнение условий и режимов сорбции, промывки и элюции.

Предложенный способ обеспечивает качественно более высокий уровень очистки указанных белков из печени крыс: степень очистки повышается в сравнении с прототипом в 9-14 тыс. раз.

Изобретение иллюстрируется примерами конкретного выполнения способа.

Пример 1. Получение 2,2,5,7,8-пентаметил-4-карбоксо-6-оксихроман-1,6-диаминогексансефарозы 4В (аффинный сорбент 1) состоит из трех стадий.

1. В трехгорлый реактор емкостью 500 мл, снабженный обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, вносят под слой диоксана 15,2 г триметилгидрохинона, 5 мл эфирата трехфтористого бора и 8,7 мл диметилвинилкарбинола. Смесь выдерживают в течение 65 ч без доступа света, периодически подогревая на воздушной бане при t 40°C. Диоксан отгоняют под вакуумом, остаток растворяют в эфире, промывают водой, насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, подвергают окислению треххлористым железом и проводят реакцию циклизации в пиридине при нагревании. Очистку осуществляют хроматографией на колонке с SL 100/160

Lachema chemarol (ЧСФР). (Элюция гексаном и эфиром в соотношении 95:5). Получают 16 г белого кристаллического порошка - вещество № 1 (2,2,5,7,8-пентаметил-6-оксихроман-3) - $T_{пл}$ 78-79°C, R_f 051 (Silufol UV-254, гексан: эфир, 70:30); ИК-спектр (см^{-1}): 1088 (пирановый цикл), 1628 (-CH-CH-пиранового цикла), 3528 (ОН-группа). Найдено, %: С - 77,04; Н - 8,26, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2$. Вычислено, %: С - 77,01; Н - 8,32.

2. В круглодонную колбу объемом 100 мл, снабженную механической мешалкой, вносят 0,025 моль (8,6 г) вещества № 1, растворенного в небольшом объеме эфира, 0,05 моль (2,3 г) муравьиной кислоты и 0,2 моль (19,6 г) серной кислоты. Перемешивают на ледяной бане в течение 2 ч. Продукт реакции экстрагируют эфиром, промывают водой до нейтральной реакции, эфир упаривают на ротационном испарителе. Получают вещество № 2 (2,2,5,7,8-пентаметил-4-карбоксо-6-оксихроман. Выход по карбоксильной группе, определенный потенциометрическим титрованием, составляет 40%.

3. К бромцианоактивированной сефарозе 4В через спейсер 1,6-диаминогексан присоединяют вещество № 2

Подсушенную отсасыванием сефарозу со спейсером суспендируют в спиртовом растворе лиганда (4,5 г лиганда в 20 мл спирта на 10 г сефарозы). К полученной суспензии по каплям добавляют 10 мл спиртового раствора (200 мг) дициклогексилкарбодимида. Смесь перемешивают 16 ч при 4°C. Прибавляют избыток уксусной кислоты для блокирования несвязавшихся реакционных групп спейсера, перемешивают 2 ч при 4°C. После этого сефарозу промывают последовательно спиртом, смесью спирт:вода (1:1), 0,1 М HCl, 0,1 М NaHCO_3 , водой. Получают сорбент 1.

Пример 2. Получение 2,2,5,7,8-пентаметил-4-аминометил-6-оксихроманглицилглицинсефарозы 4В (сорбент II) состоит из 3 стадий.

1. Сначала получают вещество № 1, как описано в примере 1, стадия 1.

2. В круглодонную колбу с механической мешалкой и обратным холодильником прибавляют 48,79 г KI, 41,09 г 95% ортофосфорной кислоты и 21 г вещества № 1. Смесь перемешивают, нагревают в течение 3 ч при 80°C, охлаждают. Продукт реакции экстрагируют эфиром, промывают, сушат сульфатом натрия и перегоняют в вакууме. В эту же колбу к йодированному веществу вносят 5 г сухого цианистого натрия. Смесь сначала нагревают на водяной бане, а затем охлаждают. Реакция протекает в течение 1 ч, затем вещество перегоняют. Получают вещество № 3.

В трехгорлый реактор, снабженный мешалкой, капельной воронкой, обратным холодильником с хлоркальцевой трубкой, вносят 3,71 г литий алюминий гидрида в 91 мл эфира, затем по каплям добавляют 13,02 г хлорида алюминия в 147 мл эфира, перемешивают и добавляют по каплям 21 г вещества № 3, растворенного в 196 мл эфира. Реакцию проводят в течение 1 ч, по окончании продукт отмывают водой, эфир упаривают. Выход вещества по аминогруппе, определенной потенциометрическим титрованием, составляет 33%.

Получают вещество № 4 (2,2,5,7,8-пентаметил-4-аминометил-6-оксихроман).

3. К бромцианактивированной сефарозе 4В через глицилглициновый спектр присоединяют лиганд-вещество 4. Условия этой операции такие же, как в примере 1, стадия 3. Непрореагировавшие активные группы на сефарозе инактивируют избытком этаноламина.

Пример 3. Получение витамин Е-связывающих белков на аффинном сорбенте 1.

Печень крыс гомогенизируют в 0,04 М трис-НСI буфере, рН 7,4 с 0,25 М сахарозой (50% гомогенат). Гомогенат центрифугируют при 10000 g в течение 15 мин, затем при 105000 g - 60 мин. Липидную пленку удаляют фильтрованием, а полученный цитозоль, содержащий 1000 мг белка, пропускают через колонку (размером 1,1x10 см) с аффинным сорбентом 1, который предварительно уравновешивают 0,04 М трис-НСI буфером, рН

7,4, со скоростью 10 мл/см²/ч. Балластные белки удаляют тем же буфером. Сорбированные белки элюируют ступенчатым солевым градиентом на указанном буфере: 0,4 М NaCl, 0,8 М NaCl, 50% этанолом. Получают три белковые фракции, витамин Е-связывающей активностью обладает первая. Выделяют 0,103 мг целевого белка. Степень очистки по сравнению с цитозолем увеличивается в 9741 раз, удельная активность 30175 $\frac{\text{имп/мин}}{\text{мг белка}}$.

Примеры 4, 5 осуществляют согласно схеме, описанной в примере 3, на аффинном сорбенте I. Изменение условий и режимов получения витамин Е-связывающего белка, а также результаты очистки показаны в табл. 1.

Примеры 6-8. Получение витамин Е-связывающих белков на аффинном сорбенте II.

Схема получения белков соответствует примеру 3. Получают 3 фракции, витамин Е-связывающей активностью обладает первая. Выделяют 0,071 мг белка. Изменение режимов и условий, а также результаты очистки представлены в табл. 2.

Полученные результаты по выделению кислых витамин Е-связывающих белков подтверждают преимущество разработанного способа на основе аффинных сорбентов I и II при соблюдении указанных условий сорбции, промывки и элюции в сравнении со способом-прототипом степень очистки возрастает в 9-14 тыс. раз.

Таблица 1

№ примера	Буфер для уравновешивания колонки, сорбции, промывки		Буфер для элюции, содержание NaCl	Степень очистки	Удельная радиоактивность
	М	рН	М	раз	$\frac{\text{имп/мин}}{\text{мг белка}}$
4	0,06	7,7	0,6	9611	30105
5	0,08	8,0	0,8	9582	30004

Таблиця 2

№ примера	Буфер для урівнювання колонки, сорбції, промивки		Буфер для елюції, со- держання NaCl	Степень очи- стки	Удельная ра- диоактив- ность
	М	pH	М	раз	имп/мин мг белка
6	0.04	7.4	0.4	14250	52575
7	0.06	7.7	0.6	14103	52483
8	0.08	8.0	0.8	14047	52397

Упорядник

, Техред М.Моргентал

Коректор М. Самборська

Замовлення 4137

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101