



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

211786

(11)

(B1)

/22/ Prihlášené 17 04 80
/21/ /PV 2687-80/

(51) Int. Cl.³
C 07 H 11/04

(40) Zverejnené 31 07 81

(45) Vydané 15 05 83

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JURAJ ing. CSc., KUČÁR ŠTEFAN RNDr. CSc., BRATISLAVA, KOLINA
JOZEK ing. CSc., PRAHA

(54) Spôsob prípravy ($U-^{14}C$) fruktózo-1,6-difosfátu

1

Vynález rieši spôsob prípravy $U-^{14}C$ fruktózo-1,6-difosfátu nasledným účinkom enzýmov fosfoglukomutázy /alfa-D-glukózo-1,6-difosfát: alfa-D-glukózo-1-fosfát fosfotransferáza, EC 2.7.5.1/ a glukózofosfát izomerázy /D-glukózo-6-fosfát ketol - izomeráza, EC 5.3.1.9/ a fosfofruktokinázy /ATP: D-fruktózo-6-fosfát 1-fosfotransferáza, EC 2.7.1.11/ na alfa-D-glukopyranosylfosfát $U-^{14}C$ o vysokej mólvej aktivite, pripravený účinkom enzýmu fosforylázy na vodorozpustný polysacharid typu alfa[1 $\rightarrow$ 4 /6/] glukánu /podľa A.O. č. 194 587/ izolovaný z rádioaktívneho biologického materiálu, s výhodou zo zelených a modrozelených rias, v procese komplexného spracovania rádioaktívnej biomasy /Čs. pat. 121 808/, pričom produkt enzýmovej reakcie sa separuje z reakčnej zmesi chromatograficky, o výťažku až 44 % pre fruktózo-1,6-difosfát až 23 % pre fruktózo-6-fosfát a až 23 % pre glukózo-6-fosfát.

Z biochemických metód prípravy glukózo-6-fosfátu $U-^{14}C$ je uvádzaný postup využívajúci D-glukózu $U-^{14}C$ a enzým hexokinázu /EC 2.7.1.1/, pričom reakcia prebieha za prítomnosti ATP. Aj keď výťažok v tejto reakcii je vysoký, nevýhodou je, že sa spracováva D-glukóza a nie vychodzí zdroj D-glukózy, vodorozpustný alfa[1 $\rightarrow$ 4/6/] glukán $U-^{14}C$.

Táto nevýhoda je riešená postupom podľa vynálezu, kedy východnou látkou prípravy je priamo vodorozpustný polysacharid, pripravený v rámci komplexného spracovania rádioaktívnej biomasy /Čs. pat. č. 121 808/.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že na vetvený polysacharid typu alfa[1 $\rightarrow$ 4/6/] glukánu s vetvením alfa[1 $\rightarrow$ 6/] väzbami, izolovaný z rádioaktívneho biologického materiálu, s výhodou so zelených, resp. modrozelených rias, v procese komplexného spracovania rádioaktívnej biomasy sa pôsobí enzýmom fosforylázou /alfa-1,4-glukán ortofosfát glukozyltransferáza, EC 2.4.1.1./ v prítomnosti pufrovaného roztoku fosfátu o pH 6 až 7 /A.O. č. 194 587/, pričom na získaní

211786

alfa-D-glukopyranozylfosfát /U-¹⁴C/ sa pôsobí pufovaným roztokom fosfoglukomutázy v prítomnosti cysteínu, síranu horečnatého a glukózo-1,6-difosfátu /pH 7,5 až 8,0/ a na získaný glukózo-6-fosfát /U-¹⁴C/ sa pôsobí pufovaným roztokom glukózo-6-fosfát izomerázy pri pH 9,0 a na vytváraný fruktozo-6-fosfát pufovaným roztokom fosfofruktokinázy /pH 8,0 až 8,5/, v prítomnosti adenosíntrifosfátu, cysteínu a horečnatých solí a vzniklý produkt sa oddelí chromatografiou na papieri. Uvedeným postupom možno získať fruktózo-1,6-difosfát o výťažku až 44 %.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy /U-¹⁴C/ značených fosforylovaných derivátov D-glukózy a D-fruktózy je, že:

celý postup prípravy je veľmi jednoduchý v technickom prevedení a umožňuje ukončenie reakčného procesu na úrovni jednotlivých medziproduktov glykolytickej dráhy až po fruktózo-1,6-difosfát

poskytuje ďalšiu možnosť využitia vodorozpustného glukánu /U-¹⁴C/, izolovaného z rádioaktívneho biologického materiálu

všetky enzýmy potrebné k prevedeniu naznačených postupov sú komerčne dostupné, prípadne pripraviteľné v laboratórnych podmienkach.

P r í k l a d 1

K 0,1 ml 1 % roztoku vodorozpustného polysacharidu /U-¹⁴C/ zo zelených rias o celkovej aktivite 17 kBq sa pridal 1 ml 0,2 M fosfátového pufru o pH 6,0 a 1 ml fosforylázy zo zemiakov /A.O. č. 194 588/ a reakčná zmes sa inkubovala pri 35 °C po dobu 4 hodín.

Po prebehnutí reakcie sa nastavilo pH reakčnej zmesi na hodnotu 7,5 pomocou 0,5 M fosfát. pufru /pH 8,0/ a pridal sa cysteín na výslednú konc. 50 mM, síran horečnatý na 6 mM konc. a glukózo-1,6-difosfát na 0,1 mM konc. a 10 µl fosfoglukomutázy /z kvasiniek, 0,34 U/ a reakčná zmes sa inkubovala ďalšie 2 hodiny pri 35 °C.

Po ukončení reakcie s fosfoglukomutázou pH hodnota reakčnej zmesi sa nastaví na 9,0 pomocou 0,5 M glycin-hydroxid sodný tlmivého roztoku /pH 10/ a pridá sa kvasničná glukózo-6-fosfát izomeráza /10 µl, 0,23 U/ a inkubácia prebieha po ďalšiu hodinu pri 35 °C. Reakčná zmes po prebehnutí reakcie s glukózo-6-fosfát izomerázou sa upraví pomocou Tris-HCl pufru na pH 8,0, pridá sa adenosíntrifosfát /Na soľ, 0,02 M/ a fosfofruktokináza /zo svalu zajaca/ /20 µl, 4,2 U/ a reakcia sa nechá bežať 3 hodiny pri 35 °C.

Po chromatografickej separácii fosforylovaných metabolitov, papierovou chromatografiou na papieri Whatman 1 v systéme kyselina izomaslová-čpavok-voda /66:1:3/ po dobu 100 hodín sa zóna odpovedajúca fruktózo-1,6-difosfátu vystrihla a eluovala 50% vodným roztokom etanolu. Výťažok fruktózo-1,6-difosfátu /U-¹⁴C/ bol 3,24 kBq /44 %/.

Fosforylované metabolity D-fruktózy sú dôležité biochemikálie, ktoré v značenom stave ako /U-¹⁴C/ rádiochemikálie možno použiť k štúdiu enzýmových procesov prebiehajúcich in vitro, ako aj k histochemickým štúdiám a sledovaniu priebehu glykolýzy v bunkách. Možno ich považovať aj za dôležité východzie látky k chemickým syntézam v oblasti chémie cukrov.

Tabuľka I

Hodnoty chromatografických pohyblivostí niektorých fosfátov D-glukózy a D-fruktózy, vzťahované na glukózo-6-fosfát v systéme kyselina izomaslová-čpavok-voda /66:1:33/.

Glukózo-6-fosfát	1,0
Fruktózo-6-fosfát	1,31
Fruktózo-1,6-difosfát	0,51
alfa-D-glukopyranozylfosfát	1,11

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy $/U-^{14}C/$ fruktózo-1,6-difosfátu z rádioaktívneho biologického materiálu, s výhodou vetveného vodorozpustného alfa/[1 $\rightarrow$ 4/6/] glukánu zo zelených alebo modrozelených rias, vyznačujúci sa tým, že sa na roztok alfa-D-glukopyranozylfosfátu $/U-^{14}C/$ pôsobí pufrovaným roztokom fosfoglukomutázy pri pH 7,5 až 8 v prítomnosti cisteínu, glukózo-1,6-difosfátu a horečnatých solí a na získaný $/U-^{14}C/$ glukózo-6-fosfát sa pôsobí pufrovaným roztokom glukózo-6-fosfát izomerázy pri pH 9 a na vytvorený fruktózo-6-fosfát $/U-^{14}C/$ pufrovaným roztokom fosfofruktokinázy pri pH 8 až 8,5 v prítomnosti adenosintrifosfátu, cisteínu a horečnatých solí a vzniknutý produkt sa izoluje chromatograficky na papieri.