



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

/22/ Prihlášené 17 04 80
/21/ /PV 2686-80/

(40) Zverejnené 31 07 81

(45) Vydané 15 05 83

(51) Int. Cl.³
C 07 H 11/04

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Spôsob prípravy ($U-^{14}C$) glukózo-6-fosfátu

Vynález rieši spôsob prípravy $U-^{14}C$ / glukózo-6-fosfátu účinkom enzýmu fosfoglukomutázy / α -D-glukózo-1,6-difosfát: α -D-glukózo-1-fosfát fosfotransferáza, EC 2.7.5.1/ na α -D-glukopyranozylfosfát $U-^{14}C$ / o vysokej mólovej aktivite, pripravený účinkom enzýmu fosforylázy na vodorozpustný polysacharid typu alfa [1 \rightarrow 4/6/] glukánu podľa /A.O. č. 194 587/ izolovaný z rádioaktívneho biochemického materiálu, s výhodou zo zelených a modrozelených rias, v procese komplexného spracovania rádioaktívnej biomasy /Čs. pat. 121 808/, pričom produkt enzymovej reakcie sa separuje z reakčnej zmesi chromatograficky, o výťažku 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 výhodní 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/ 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 pufového roztoku fosfátu o pH 6 až 7 /A.O. č. 194 587/, pričom na získaný alfa-D-glukopyranozylfosfát $U-^{14}C$ / sa pôsobí pufovaným roztokom fosfoglukomutázy v prítomnosti cysteínu, síranu horečnatého a glukózo-1,6-difosfátu /pH 7,5 až 8,0/ a získaný glukózo-6-fosfát $U-^{14}C$ / sa oddelí jednoducho chromatografiou na papieri. Uvedeným postupom možno získať glukózo-6-fosfát $U-^{14}C$ / o vysokej mólovej aktivite a výťažku až 95 %, vzhľadom na alfa-D-glukopyranozylfosfát $U-^{14}C$ /.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy $/U-^{14}C/$ glukózo-6-fosfátu je, že:

- celý postup prípravy je veľmi jednoduchý v technickom prevedení
- poskytuje ďalšiu možnosť využitia vodorozpustného glukánu $/U-^{14}C/$, 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 $/U-^{14}C/$ zo zelených rias o celkovej aktivite 47 kBq sa pridal 1 ml 0,2 M fosfátového pufru o pH 6,0 a 1 ml fosforylázy zo zemiakov /A.O. 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 μ l fosfoglukomutázy /z kvasiniek, 0,34 U/ a reakčná zmes sa inkubovala ďalšie 2 hodiny pri 35 °C. Po ukončení reakcie sa reakčná zmes naniesla na papier Whatman 1 a separácia glukózo-6-fosfátu sa previedla v systéme kyselina izomaslová-čpavok-voda /66:1:33/ po dobu 100 hodín. Výťažok glukózo-6-fosfátu $/U-^{14}C/$ 7,2 kBq, to je 95 % na množstvo vytvoreného alfa-D-glukopyranozylfosfátu /7,44 kBq/.

P r í k l a d 2

Tak ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že po ukončení reakcie sa zvyškový alfa-D-glukopyranozylfosfát $/U-^{14}C/$ rozloží prídavkom HCl na výslednú koncentráciu 0,1 N k reakčnej zmesi, tá sa povarí po dobu 3 minút a kyselina chlór vodíková sa odparí na vákuovej odparke. Chromatografická separácia sa prevedie tak, ako je uvedené v príklade 1.

Glukózo-6-fosfát je dôležitá biochemikália, ktorá v značenom stave ako $/U-^{14}C/$ rádiochemikália sa môže použiť k štúdiu enzýmových procesov prebiehajúcich in vitro, ako aj k histochemickým štúdiám a sledovaniu priebehu glykolýzy v bunkách. Možno ho považovať aj za dôležitú východziu látku k chemickým syntézam v oblasti chémie cukrov.

T a b u l k a 1

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

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

P R E D M E T V Y N A L E Z U

Spôsob prípravy $/U-^{14}C/$ glukózo-6-fosfátu z rádioaktívneho biologického materiálu, s výhodou vetveného vodorozpustného alfa- $[1 \rightarrow 4/6/]$ glukánu zo zelených alebo modrozelených rias, vyznačujúci sa tým, že na roztok získaného alfa-D-glukopyranozylfosfátu $/U-^{14}C/$ sa pôsobí pufrovaným roztokom fosfoglukomutázy pri pH 7,5 až 8,0 v prítomnosti cysteínu, glukózo-1,6-difosfátu a horečnatých solí a vzniknutý produkt sa izoluje chromatograficky na papieri.