



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

241201
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 21. 11. 81
(21) (PV 6924-81)

(40) Zveřejněno 13. 08. 84

(45) Vydáno 15. 09. 87

(51) Int. Cl.⁴
C 07 H 5/04
C 12 N 15/00

(75)
Autor vynálezu

PONERT JIŘÍ prom. biol. ing. DrSc.; JARÝ JIŘÍ doc. ing. DrSc.; ČAPEK KAREL ing. CSc.; KEFURT KAREL ing. CSc., PRAHA (ČSSR);
FONŠTEJN LEONID MAXOVIČ DrSc., MOSKVA; ABILEV SERIKBAJ KARIMOVIČ CSc.; OBLAPENKO NATALJA GEORGIJEVNA prom. biolog;
SEDYŠEVA NINA JURJEVNA prom. biol.; BEREZOVSKAJA IRINA VLADIMIROVNA MUDr. CSc., STARAJA KUPAVNA; KINZIRSKIJ ALEXANDR SERGEJEVIČ MUDr. CSc., NOGINSK (SSSR)

(54) Mutagenní prostředek

1

2

Na základě zjištění o mutagenním účinku 6-azido-6-deoxy-D-glukosy, stanovení mechanismu mutagenního účinku (pomocí indikačních kmenů *Salmonella typhimurium*) jako mechanismu záměny párů nukleotidů v molekule DNK, o netoxičnosti 6-azido-6-deoxy-D-glukosy pro savce, o nepřítomnosti vlivu této sloučeniny na rychlost dělení bakteriálních buněk a na základě experimentálního zjištění schopnosti 6-azido-6-deoxy-D-glukosy vyvolávat jak zpětné, tak i přímé mutace je předmětem vynálezu použití 6-azido-6-deoxy-D-glukosy jako prostředku k vyvolání mutací, zejména mikroorganismů. Vynález je použitelný v kvasném, farmaceutickém a potravinářském průmyslu, jakož i při výrobě krmiv. Umožňuje získání nových produktivních kmenů mikroorganismů, producentů biologicky aktivních sloučenin, při zajištění nesnížené životaschopnosti jak mutantů, tak i výchozích kmenů mikroorganismů a současně při umožnění bezrizikové práce obsluhujícího personálu.

Vynález se týká použití 6-azido-6-deoxy-D-glukosy.

Způsob přípravy 6-azido-6-deoxy-D-glukosy je popsán v článku: Kefurt K., Čapek K., Kefurtová Z., Jarý J.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 44 (1979): 2532—2533. 6-azido-6-deoxy-D-glukosa má státní registraci SSSR no. 180 774, vydanou společně biochemické laboratoři Batumské botanické zahrady Akademie věd Gruzínské SSR a Vysoké škole chemicko-technologické v Praze.

Podstatou vynálezu je použití 6-azido-6-deoxy-D-glukosy jako prostředku k získání mutací, zejména mikroorganismů. Tím je pak možno získávat nové produkční kmeny mikroorganismů, nové producenty biologicky aktivních sloučenin. Toto použití je založeno na objevu mutagenního účinku 6-azido-6-deoxy-D-glukosy, na novém zjištění, že mutagenní účinek 6-azido-6-deoxy-D-glukosy spočívá ve vyvolání mutací typu záměny párů nukleotidů desoxyribonukleové kyseliny a na zjištění netoxičnosti 6-azido-6-deoxy-D-glukosy pro savce i bakterie.

Netoxičnost je velkou předností 6-azido-6-deoxy-D-glukosy při jejím použití jako prostředku k získávání mutací, protože jednak snižuje riziko pro personál mikrobiologických provozů a laboratoří a současně zajišťuje vysoký výtěžek životaschopných mutací.

Příklad 1

Zjištění mutagenního účinku 6-azido-6-deoxy-

Dávka (μg) 6-azido-6-deoxy- D-glukosy na 1 Petriho misku	Průměrný počet reverantů Salmonella		
	TA 1535	TA 1537	TA 1538
0 (voda)	9	5	4
1,0	12	5	5
10,0	43	5	4
100,0	147	4	4
1 000,0	421	4	5

Jako pozitivní kontroly byly použity:

1) nitrosometylmočovina, vyvolávající mutace pouze u kmene TA 1535,

2) 2,7-diamino-4,9-dioxy-5,10-dioxo-4,5,9,10-tetrahydro-4,9-diazopyren, vyvolávající mutace pouze u kmene TA 1538,

3) proflavin, vyvolávající mutace pouze u kmene TA 1537.

Protože kmen TA 1535 registruje účinek mutagenů, indikujících mutace typu záměny nukleotidů v molekule desoxyribonukleové kyseliny, kdežto kmeny TA 1537, TA 1538 revertují pod účinkem látek vyvolávajících mutace typu posunu „čtecího rámečku“ genetického kódu, lze usoudit, že 6-azido-6-deoxy-D-glukosa vyvolává mutace mechanismem záměny nukleotidů v molekule desoxyribonukleové kyseliny.

xy-D-glukosy, stanovení typu mutagenního účinku a získání mutací (revertantů).

Ke stanovení typu mutagenního účinku byly použity indikační kmeny Salmonella typhimurium, auxotropní na histidin. Počet mutací byl stanoven na základě zjištění reverzí od auxotrofnosti (na histidin) k prototrofnosti (na histidin). Autorem námi použitých indikačních kmenů bakterií je B. M. Ames (Ames B. M., Lee F. D., Durston W. E.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1973, 70, 782).

Bakterie byly napěstovány v maso-peptonovém bujónu do hustoty $2 \cdot 10^3$ buněk na 1 mililitr a centrifugovány (5 000 obrátek za minutu) po dobu 15 minut a resuspendovány ve slané prostředí (Fonštejn L. M., Kalinina Ch. M., Poluchina G. N., Abilev S. K., Šapiro A. A.: Test-systéma ocenky mutagennoj aktivnosti zagrjaznitělej sredy na Salmone-lla. Metodičeskoje ukazanije, Moskva, 1977). Po centrifugování činila hustota buněk 10^9 buněk na 1 ml.

0,2 ml takovéto suspenze při 45 °C se vnáší do roztaveného měkkého agaru (3 ml), obsahujícího 20 μg L-histidinu a 10 μg biotinu. V tentýž agar se vnáší 0,1 ml vodného roztoku 6-azido-6-deoxy-D-glukosy v potřebné koncentraci a potom se navrství na Petriho misky s minimálním agarem. Za 36 hodin se počítá počet vyrostlých kolonií revertantů.

Příklad 2

Získání přímých mutací a zjištění netoxičnosti 6-azido-6-deoxy-D-glukosy vůči nemutovaným bakteriím.

Buňky kmene K-12 Escherichia coli jsou citlivé vůči exogennímu valinu (40 μg L-valinu na 1 ml), antibiotikům, 5-metyl-troptofánu, chlorátu. Proto tento kmen byl použit ke studiu schopnosti 6-azido-6-deoxy-D-glukosy vyvolávat přímé mutace, a to mutace odolnosti proti exogennímu valinu.

Autorem námi použitého kmene Escherichia coli K 12 KS 150 je Ústav epidemiologie a mikrobiologie Akademie lékařských věd SSSR.

Čerstvá noční kultura bakterií byla dvacetkrát zředěna v maso-peptonovém bujónu a pěstována do dosažení hustoty 10^8 buněk v 1 ml. Potom odstředěna (5 000 obrátek/min.

po dobu 15 min.), potom promyta ve slané prostředí. Po opakovaném odstředění bakterie resuspendovány v témže prostředí, hustota $5 \cdot 10^8$ buněk na 1 ml. K 1,8 ml této kultury přidáno 0,2 ml vodného roztoku 6-azido-6-deoxy-D-glukosy v potřebné koncentraci a inkubováno po dobu 1 hod. při 37 °C, za protřepávání. Po inkubaci byla směs dvakrát odstředěna v popsaném režimu s cílem odmyt bakterie od preparátu. Bakterie byly resuspendovány ve výchozím objemu v čerstvém maso-peptonovém bujónu a inkubovány během 1,5 hod. při 37 °C, za protřepávání. Po inkubaci bakterie byly odmyty od bujónu dvojnásobnou centrifugací v popsaném režimu a resuspendovány ve 2 ml slané prostředí. K výpočtu počtu mutací odolnosti proti

ti valinu bylo 0,25 ml suspence bakterií vneseno do polotekutého (0,6%) agarů a vyseto na povrch selektivního agarů obsahujícího valin (40 $\mu\text{g/ml}$) a obohaceného tryptofánem (20 $\mu\text{g/ml}$). Pro stanovení stupně přežití bakterií a jejich vitality (schopnosti množit se) po působení 6-azido-6-deoxy-D-glukosy byly bakterie po odpovídajícím zředění vysety na Petriho misky s plnocennou živnou půdou, inkubace při 37 °C. Odpočet kolonií se prováděl na plnocenné živné půdě po 24 hodinách, kdežto na selektivní živné půdě po 48 hodinách.

Frekvenci mutantů odolných proti valinu byl pak určen jako poměr bakterií odolných proti valinu v 1 ml k počtu živých bakterií v totéž objemu.

Dávka (μg) 6-azido-6-deoxy-D-glukosy na 1 ml živné půdy	Přežití buněk ($\times 10^8$) na 1 ml živné půdy		Frekvence mutací ($\times 10^{-8}$)	
	Pokus č. 1	Pokus č. 2	Pokus č. 1	Pokus č. 2
0 (kontrola-voda)	8,7	7,4	4,2	2,3
50	8,6	6,6	9,9	6,0
100	9,5	7,7	14,4	9,3
250	8,3	7,1	18,7	19,8
500	9,0	7,4	22,6	28,6
750	8,6	7,2	31,9	35,5
1 000	8,6	7,0	35,8	38,2

Frekvence přímých mutací tedy vzrůstá s koncentrací 6-azido-6-deoxy-D-glukosy. Jak je zřejmé z údajů o přežití bakterií, 6-azido-6-deoxy-D-glukosa není pro bakterie toxická a současně není ani stimulatorem jejich růstu a množení. 6-azido-6-deoxy-D-glukosa tedy vyvolává mutace, aniž by přitom měnila rychlost dělení bakteriálních buněk.

Příklad 3

Zjištění netoxičnosti 6-azido-6-deoxy-D-glukosy pro savce

Zatímco azid natria použitý při výrobě 6-azido-6-deoxy-D-glukosy při vnitřitrobním

zavedení má $\text{LD}_{50} = 33(24-25)$ mg/kg, sama 6-azido-6-deoxy-D-glukosa ani v dávkě 600 miligramů/kg nepůsobí toxicky.

Stanovení akutní toxicity obou srovnávaných sloučenin se provádělo na neliniových pohlavně zralých samcích bílých myši, v průběhu 2 týdnů. Statistické hodnocení experimentálních výsledků bylo provedeno metodou probitové analýzy, podle Litchfield J. T., Wilcoxon F. J., Pharmacol. Exper. Ther., 1949, 96, 99.

Azid natria tedy patří do skupiny mírně toxických sloučenin. Naproti tomu 6-azido-6-deoxy-D-glukosa ani v dávkě $20 \times$ vyšší, než je smrtelná dávka azidu natria, nepůsobí toxicky.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Použití 6-azido-6-deoxy-D-glukosy jako prostředku k vyvolání mutací, výhodně jako netoxického mutagenu.