



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206 986

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 24 10 79
(21) PV 7173-79

(51) Int. Cl.³ B 01 D 15/04

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 11 83

(75)
Autor vynálezu SVOBODA VRATISLAV ing. CSc., KLEINMANN IMRICH ing. CSc. a KOLINA JOSEF ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob preparativního dělení difosfátů a trifosfátů ribonukleosidů a deoxyribonukleosidů

1

Vynález se týká preparativního dělení směsí difosfátů a trifosfátů ribonukleosidů a deoxyribonukleosidů připravovaných z biologického materiálu, značených radioizotopy ^{14}C , ^{32}P nebo ^3H s vysokou specifickou aktivitou.

Dosud se tyto látky zpravidla dělily metodou preparativní papírové chromatografie. I když lze vhodnou kombinací rozpouštědlových soustav rozdělit i složitou směs na jednotlivé složky, má tato metoda zjevné nedostatky. Především jsou to izolační ztráty a nižší stupeň chemické čistoty sloučenin, které se dělí touto metodou. Při dnešních požadavcích na vysoké molové aktivity značených sloučenin jsou ztráty převyšující $10\text{ }\mu\text{g}$ z ekonomického hlediska nezanedbatelné. Nižší stupeň chemické čistoty preparátů připravovaných papírovou preparativní chromatografií je zapříčiněn zejména výluhy z chromatografického papíru, což je opět rozhodující při dělení sloučenin s vysokou molovou aktivitou. Další nedostatek preparativní papírové chromatografie spadá do oblasti bezpečnosti práce s radioaktivními látkami. Manipulace s radioaktivními sloučeninami při nanášení na chromatografické papíry, vlastní chromatografie, autoradiografie a eluce podstatně zvyšují možnost kontaminace prostředí i osob. Nutno ještě konstatovat, že preparativní papírová chromatografie je časově náročnou metodou.

Pro ilustraci uvádíme dosud používaný způsob pro separaci při výrobě ribonukleo-

206 888

sid-5'-trifosfátů- ^{14}C (U).

Enzymatická směs se nanese na chromatografický papír Whatman 3 a sestupně se vyvíjí v soustavě kyselina izomásečná : voda : koncentrovaný amoniak (66 : 33 : 1,5) po dobu 20 hodin. Po skončeném dělení se papíry suší v proudu vzduchu. Identifikace se provede na základě souběžně prováděné chromatografie standardů. Radioaktivní trifosfát se na papíru promyje soustavou butanol nasycený vodou, čímž se odstraní zbytek kyseliny izomásečné. Eluce z papíru se pak provádí směsí 96 % etanol - 1,5 N amoniak (1 : 1). Protože se obvykle nedosáhne požadované čistoty, je třeba papírovou chromatografii i několikrát opakovat, čímž vzrostou dále ztráty preparátu. Sušení papírů s nenasyčenými radioaktivními preparáty má za následek vysoké riziko kontaminace pracovníků i ovzduší.

Podstata způsobu prepaprativního dělení difosfátů a trifosfátů ribonukleosidů a deoxyribonukleosidů značených radioizotopy se specifickou aktivitou vyšší než 3,7 GBq/mmol eluční vysokotlakou kapalinovou chromatografií podle vynálezu spočívá v tom, že se směs látek vznikajících při přípravě radioaktivních difosfátů a trifosfátů deoxyribonukleosidů a ribonukleosidů dělí na sloupci porézního hydrofilního iontoměniče na bázi ethylenglykolmetakrylátového kopolymeru s diethylaminoethylowymi výměnnými skupinami za použití eluentu tvořeného kyselinou mravenčí, mravenčanem amonným, ethylalkoholem a vodou, přičemž koncentrace kyseliny mravenčí v eluentu činí 0,01 M až 4,5 M, koncentrace mravenčanu amonného 0,01 M až 1,3 M, koncentrace ethanolu 1 až 80 % objemových, přičemž takto získané frakce eluentů, obsahující nukleotidy, případně nukleosidy nebo báze se dále zbavují netěkavých složek eluentu na sloupci porézního hydrofilního iontoměniče na bázi ethylenglykolmethakrylátového kopolymeru s fosfátovými, karboxylovými nebo sulfátovými skupinami za použití eluentu tvořeného ethanolom, kyselinou octovou, kyselinou mravenčí a vodou, přičemž koncentrace kyseliny v eluentu činí 0,05 až 5 M a koncentrace ethanolu 1 až 80 % objemových.

Výhody nového postupu spočívají v tom, že výtěžek radioaktivního produktu je přibližně o 20 až 30 % vyšší než při dělení dosud běžným způsobem papírové chromatografie, neboť ztráty způsobené na ionexech jsou ve srovnání s chromatografickým papírem zanedbatelné. Vzhledem k tomu, že účinnost dělení a tudíž i čistota preparátů je velmi vysoká, vznikají ještě další úspory tím, že získáváme čisté další radioaktivní látky a dále tím, že použitý donor lze znovu použít.

Dělení kapalinovou chromatografií v podstatě probíhá v kapalném prostředí v uzavřeném poloaufomatizovaném systému. Odpadá autoradiografie a sušení chromatografických papírů, při nichž snadno může dojít ke kontaminaci obsluhy radioaktivitou. Tím se podstatně zvyšuje také bezpečnost práce.

Pro objasnění je dále uveden příklad postupu izolace radioaktivního 5' guanosin-trifosfátu z reakční enzymatické směsi, která obsahuje donor 5' adenosintrifosfát

a v menším množství produkty rozkladu uvedených trifosfátů tj. difosfáty, monofosfáty, nukleosidy a báze. Kromě uvedených látek obsahuje výchozí směs ještě značené množství solí.

Asi 15 ml dělené směsi se vnese na kolonu 15 x 400 mm a a promývá nejprve 0,05 M mravenčanem amonným pH = 8,1 v 10 % obj. ethanolu. Po eluci nukleosidů a bází se promývá 0,1 M mravenčanem amonným pH = 7,2 a po eluci monofosfátů 0,5 M mravenčanem amonným pH = 6,3 v 30 % obj. ethanolu. Po eluci 5'adenosindifosfátu se přepne na eluent 1 M mravenčan amonný pH = 6,3 v 50 % ethanolu a tak se rozdělí zbylé komponenty výchozí směsi, tj. 5'guanosindifosfát, 5'adenosintrifosfát a 5'guanosintrifosfát. Jednotlivé frakce rozdělené z původní směsi látek se dále odsolí na koloně 38 x 500 mm plněné katexem na bázi ethylenglykolmethakrylátového kopolymeru se sulfátovými výměnnými skupinami, promývaném roztokem 1,5 M kyseliny mravenčí v 5 % ethanolu. Odsolené frakce se odpaří do sucha na vakuové odparce, a tím se získají čisté kyseliny monomérů nukleotidů, které se pak mohou neutralizovat a uchovávat v mrazicím boxu.

P ř e d m ě t v ý n ě l e z u

Způsob preparativního dělení difosfátů a trifosfátů ribonukleosidů a deoxyribonukleosidů značených radioizotopy se specifickou aktivitou vyšší než 3,7 GBq/mmol eluční vysokotlakou kapalinovou sloupcovou chromatografií, vyznačující se tím, že se směs látek vznikajících při přípravě radioaktivních difosfátů a trifosfátů deoxyribonukleosidů a ribonukleosidů dělí na sloupci porézního hydrofilního iontoměniče na bázi ethylenglykolmetakrylátového kopolymeru s diethylaminoethylovými výměnnými skupinami za použití eluentu tvořeného kyselinou mravenčí, mravenčanem amonným, ethylalkoholem a vodou, přičemž koncentrace kyseliny mravenčí v eluentu činí 0,01 M až 4,5 M, koncentrace mravenčanu amonného 0,01 M až 1,3 M, koncentrace ethanolu 1 až 80 % objemových, přičemž takto získané frakce eluentů, obsahující nukleotidy, případně nukleosidy nebo báze se dále zbavují netěkavých složek eluentu na sloupci porézního hydrofilního iontoměniče na bázi ethylenglykolmetakrylátového kopolymeru s fosfátovými, karboxylovými nebo sulfátovými skupinami za použití eluentu tvořeného ethanolem, kyselinou octovou, kyselinou mravenčí a vodou, přičemž koncentrace kyseliny v eluentu činí 0,05 až 5 M a koncentrace ethanolu 1 až 80 % objemových.