



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

196 962

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 23 01 78

(21) PV 435-78

(51) Int. Cl.³ C 07 H 11/04

(40) Zverejnené 31 07 79

(45) Vydané 01 3 82

(75)

Autor vynálezu BIELY PETER RNDr. CSc., FARKAŠ VLADIMÍR ing. CSc., BRATISLAVA a
KÖLBEL JÁN ing., PRAHA

(54) Spôsob prípravy ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfátu vysokej mólovej rádioaktivity a rádiochemickej čistoty

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy α -D-glukózo-1-fosfátu značeného rádioaktívnym uhlíkom ^{14}C vysokej mólovej rádioaktivity enzymatickou cestou a jeho izolácie z reakčnej zmesi. Vynález rieši nový postup prípravy uvedenej látky vysokej rádiochemickej čistoty a špecifickej rádioaktivity.

^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát sa využíva v biochémií ako enzýmový substrát v rade reakcií, ktoré sa podieľajú na výstavbe a degradácii štrukturálnych a zásobných polysacharidov živých buniek rôzneho pôvodu. Štúdium mechanizmu takýchto reakcií, ako i vlastností odpovedajúcich enzýmov vyžaduje dostupnosť glukózo-1-fosfátu značeného rádioaktívnymi izotopmi. Okrem toho ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát sa dá využiť ako medziprodukt enzymovej alebo chemickej syntézy rôznych nukleozid difosfát glukóz značených v glukózovej časti molekuly (N. K. Kochetkov a V. N. Shibaev, Adv. Carb. Chem. 28, 307 (1973)).

^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát sa bežne pripravuje dvoma spôsobmi. Prvý spôsob, chemická syntéza, je založený na kondenzácii peracetylovaných alebo halogénperacetylovaných derivátov ^{14}C -D-glukózy s kyselinou fosforečnou, jej soľami a derivátmi v bezvodom prostredí (T. Posternak, Methods in Enzymology, Vol. 3, str. 129; L. L. McDonald, J. Org. Chem. 27, 1107, 1962; Y. Y. Kusov a N. V. Shibaev, Usp. Biol. Khim. 12, 182, 1971). Uvedené chemické postupy sú pomerne pracné a v niektorých prípadoch vedú i k tvorbe malých množstiev β -anoméru glukózo-1-fosfátu, ktorý je nutné od požadovaného produktu separovať. Druhou metódou na prípravu ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfátu je enzymatická fosforolýza ^{14}C -značeného škrobu kata-

198 982

lyzovaná rastlinnými fosforylázami (R. M. McCready a W. Z. Zassid, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, str. 137, Academic Press, New York, 1957). Táto metóda vyžaduje dostupnosť škrobu značeného uhlíkom ^{14}C vysokej mólovej rádioaktivity.

Teraz bol vypracovaný nový netradičný spôsob enzymatickej prípravy ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfátu vysokej mólovej rádioaktivity, ktorý vychádza z ^{14}C -D-glukózy. Podstata vynálezu spočíva v tom, že ^{14}C -D-glukóza sa účinkom kvasničných enzýmov konvertuje na UDP- ^{14}C -D-glukózu, ktorá sa priamo v pôvodnej reakčnej zmesi po odstránení rušivých látok alkalickou fosfatázou kvantitatívne rozloží účinkom hadej fosfodiesterázy na uridín monofosfát a ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát, ktorý sa z reakčnej zmesi izoluje preparatívnou papierovou chromatografiou. Fosfodiesteráza štiepi UDP- ^{14}C -D-glukózu výlučne za vzniku α -anoméru ^{14}C -D-glukózo-1-fosfátu, čo sa potvrdilo enzymatickými testami. Produkt sa účinkom fosfoglukomutázy konvertuje na ^{14}C -glukózo-6-fosfát, ktorý sa identifikoval enzymaticky pomocou glukózo-6-fosfát dehydrogenázy.

Výhodou tohto postupu prípravy ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfátu je, že:

- vychádza z ^{14}C -D-glukózy domáceho pôvodu,
- poskytuje jednoznačne α -anomér ^{14}C -D-glukózo-1-fosfátu,
- produkt sa izoluje z reakčnej zmesi jednoduchým spôsobom, papierovou chromatografiou,
- všetky reakcie vedúce k produktu, počnúc od ^{14}C -D-glukózy až po jeho chromatografickú separáciu a čistenie, sa uskutočňujú v jedinej reakčnej nádobe,
- s výnimkou niekoľkých komerčne dostupných enzýmov sa v postupe využívajú domáce suroviny,
- produkt má rovnakú mólovú rádioaktivitu ako východzia ^{14}C -D-glukóza.

Príklad prevedenia

Reakčná zmes obsahujúca v 2,4 ml (celkový objem) 0,4 ml 0,1 M Tris-HCl pufru (pH 7,8), 1 mg ^{14}C -D-glukózy špecifickej rádioaktivity 555 Bg/mmol a vyššej, 12 mg trojsodnej soli uridín 5'-trifosfátu, 20 mg fosfoglycerátu sodného, 10 mg hexahydrátu chloridu horečnatého, 0,05 mg glukózo-1,6-difosfátu, 0,2 mg hexokinázy, 0,2 mg anorganickej pyrofosfatázy a 15 mg bielkovín enzýmového preparátu pripraveného z pekárenských kvasiniek podľa A. Wright a P. W. Robbins (*Biochem, Biophys. Acta* 104, 594, 1965) sa inkubuje pri 30 °C, kým sa nedosiahne maximálna konverzia ^{14}C -D-glukózy na UDP- ^{14}C -D-glukózu. Inkubačná zmes sa potom zahreje na 100 °C na 2 až 3 min. a po ochladení pH zmesi upraví sa nasýteným roztokom Na_2CO_3 na hodnotu zhodnú s farebným prechodom fenolftaleínu. Pridá sa 50 μl preparátu alkalické fosfatázy a po 3 až 6 hodinovej inkubácii sa zmes opäť zahreje na 100 °C na 2 až 3 min. Do vychladenej zmesi, ktorej pH je zhodné s farebným prechodom fenolftaleínu sa pridá 50 μl roztoku fosfodiesterázy z *Crotalus terr*, *terr* a zmes sa nechá inkubovať pri laboratórnej teplote 2 až 3 hodiny. Po tomto čase, keď sa dosiahne úplný rozklad uridín difosfo- ^{14}C -D-glukózy na uridín 5'-monofosfát a ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát, sa inkubačná zmes zahustí na 0,5 až 1 ml a chromatografuje sa na vodou premytých papieroch Whatman 3 MM v systéme etanol - 1 M octan amónny (pH 7,3) 5 : 2 po dobu 60 až 80 hodín. Chromatogram sa po lokalizácii uridín monofosfátu a ^{14}C -D-glukózo-1-fosfátu dôkladne odsolí premy-

tím v absolútnom etanole a acetóne. ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát sa eluuje z vysušeného chromatogramu vodou a prečistí sa rechromatografiou za tých istých podmienok. Výťažky na východziu ^{14}C -D-glukózu sa pohybujú v rozmedzí 40 až 60 %.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfátu vysokej mólovej rádioaktivity a rádiochemickej čistoty enzymatickou syntézou, vyznačujúci sa tým, že ^{14}C -D-glukóza sa enzymaticky prevedie na uridín difoso- ^{14}C -D-glukózu, ktorá sa priamo v pôvodnej reakčnej zmesi po rozklade ostatných fosforylovaných derivátov alkalickou fosfatázou štiepi účinkom hadej fosfodiesterázy na uridín 5'-monofosfát a ^{14}C - α -D-glukózo-1-fosfát, ktorý sa zo zmesi izoluje papierovou chromatografiou.