



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

233233

(11) (B1)

(22) Prihlášené 11 07 83
(21) (PV 5255-83)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/02

(40) Zverejnené 17 07 84

(45) Vydané 17 04 87

(75)
Autor vynálezu

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

(54) Spôsob prípravy (U-¹⁴C) manózo-6-fosfátu

Vynález sa týka oboru biochémie, chémie sacharidov, ako aj lekárskej a potravinárskej chémie.

Vynález rieši prípravu (U-¹⁴C) manózo-fosfátu pre štúdium metabolizmu sacharidov, ako aj pre teoretické štúdie v oblasti chémie a biochémie sacharidov.

Uvedeného účelu sa dosiahne tým, že na roztok (U-¹⁴C)glukózo-6-fosfátu, pripraveného z vodorespustného alfa (1→4,6) glukánu zo zelených alebo modrozelených rias, pripraveného podľa čs. AO 211 785 sa pôsobí pufrovaným roztokom fosfomanózo izomerázy pri pH 7,2 a vzniknutý produkt sa izoluje chromatografiou na papieri.

Vynález sa týka spôsobu prípravy ($U-^{14}C$) manózo-6-fosfátu následným účinkom enzýmu manóza fosfát izomerázy (D-manóza-6-fosfát ketol izomeráza, EC 5.3.1.8) na ($U-^{14}C$) fruktózo-6-fosfát, pripravený podľa čs. AO 211 785 o vysokej mólovej aktivite.

Príprava ($U-^{14}C$) manózo-6-fosfátu nie je v literatúre popisovaná. Vhodným zdrojom cukrov značených rádionuklidom ^{14}C je alfa ($1 \rightarrow 4,6$) glukán, izolovaný z rádioaktívneho biologického materiálu, s výhodou z rias, v procese komplexného spracovania rádioaktívnej biomasy (čs. pat. 121 808). Následným účinkom enzýmov fosforylázy (alfa-1,4-glukan : ortofosfát alfa-glukozyltransferáza, EC 2.4.1.1.), fosfoglukomutázy (alfa-D-glukózo-1,6-difosfát : alfa-D-glukózo-1-fosfát fosfotransferáza, EC 2.7.5.1.) glukózofosfát izomerázy (D-glukózo-6-fosfát ketol izomeráza, EC 5.3.1.9) na ($1 \rightarrow 4,6$) glukán značený rádionuklidom ^{14}C možno pripraviť po chromatografickej separácii ($U-^{14}C$) fruktózo-6-fosfát, ako východziu látku k príprave ďalších fosforylovaných derivátov cukrov.

($U-^{14}C$) D-manózo-6-fosfát možno pripraviť účinkom monokinázy (ATP : D-manózo 6-fosfotransferáza, EC 2.7.1.7) na ($U-^{14}C$) D-manózu a ATP. Aj keď výťažok v tejto reakcii je vysoký, nevýhodou je, že sa spracováva vzácny cukor ($U-^{14}C$) D-manóza a nie východzí zdroj pre prípravu cukrov, vodorozpustný glukán. Táto nevýhoda je riešená postupom podľa vynálezu, kedy východnou látkou 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 $1 \rightarrow 6$ 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-glukan ortofosfát glukozyltransferáza, EC 2.4.1.1) v prítomnosti pufovaného roztoku fosfátu o pH 6 až 7 (čs. AO 194 587), pričom na získaný alfa-D-glukopyranozylfosfát ($U-^{14}C$) sa pôsobí pufovaným roztokom fosfoglukomutázy v prítomnosti cysteinu, síranu horečnatého a glukózo-1,6-difosfátu (pH 7,5 až 8,0) a na získaný glukózo-6-fosfát ($U-^{14}C$) sa pôsobí pufovaným roztokom glukózo-6-fosfát izomerázy pri pH 9,0 a na vytvorený fruktózo-6-fosfát ($U-^{14}C$) (čs. AO 211 785) sa pôsobí enzýmom manozofosfát izomerázou v pufovanom prostredí o pH 7,2 a vytvorený manózo-6-fosfát ($U-^{14}C$) sa oddelí chromatografiou na papieri. Vzhľadom na D-alfa-glukopyranozylfosfát je výťažok manózo-6-fosfátu ($U-^{14}C$) až 38 %.

Výhodou navrhovaného postupu prípravy ($U-^{14}C$) značených fosforylovaných derivátov D-manózy je, že celý postup prípravy je veľmi jednoduchý a všetky enzýmy potrebné k prevedeniu príslušných realizácií sú komerčne dostupné, prípadne pripraviteľné v laboratórnych podmienkach.

P r í k l a d

K 0,1 ml 1 % roztoku vodorozpustného polysacharidu ($U-^{14}C$) zo zelených rias o celkovej aktivite 20 kBq sa pridal 1 ml 0,2 mol/l fosfátového pufru o pH 6,0 a 1 ml fosforylázy zo zemiakov (AO 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 mol/l fosfátového pufru (pH 8,0) a pridal sa cystein na výslednú koncentráciu 50 mmol/l, síran horečnatý 6 mmol/l a glukózo-1,6-difosfát na 0,1 mmol/l a 10 μ l fosfoglukomutázy (z pekárenských kvasiniek/5 nkat) a reakčná zmes sa inkubovala ďalšie 2 hodiny pri 35 °C.

Po ukončení reakcie s fosfoglukomutázou pH hodnota reakčnej zmesi sa nastavila na pH 9,0 pomocou 0,5 mol/l glycínhydroxid sodný tlmivého roztoku (pH 10) a pridala sa kvasničná glukózo-6-fosfát izomeráza (10 μ l; 25 nkat) a inkubácia prebiehala ďalšiu hodinu pri 35 °C (čs. AO 211 785). Po ukončení reakcie s glukózo-6-fosfát izomerázou sa reakčná zmes odparila do sucha na vákuovej odparke pri 70 °C a pridal sa zriedený roztok kyseliny chlorovodíkovej 0,1 mol/l (cca 3 ml) až pokiaľ výsledné pH roztoku bolo 7,2. Potom sa pridal enzým fosfomanóza izomeráza (10 μ l; 8 nkat) a reakcia prebiehala po dobu

ďalšej 1 hodiny pri 30 °C. Po spracovaní reakčnej zmesi sa separácia fosforylovaných derivátov previedla v systéme kyselina izomaslová - čpavok - voda (66:1:32) papierovou chromatografiou po dobu 100 hodín. Manózo-6-fosfát ($U-^{14}C$) sa získal o výťažku 7,6 kBq (38 %).

Fosforylované deriváty D-manózy sú dôležité biochemikálie, ktoré v značenom stave, ako ($U-^{14}C$) rádiochemikálie možno použiť k štúdiu enzýmových procesov prebiehajúcich in vitro, ako aj k histochemickým štúdiám a k enzýmovej diagnostike metabolických porúch. Možno ich považovať aj za dôležité východzie látky k chemickým syntézam v oblasti cukrov.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy ($U-^{14}C$) manózo-6-fosfátu z rádioaktívneho biologického materiálu, s vynovou vetveného vodorozpustného alfa (1→4,6) glukánu zo zelených alebo modrozelených rias, vyznačujúci sa tým, že na roztok získaného ($U-^{14}C$) glukózo-6-fosfátu, sa pôsobí pufrovaným roztokom fosfomanózo izomerázy pri pH 7,2 a vzniknutý produkt sa izoluje chromatografiou na papieri.