



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94101000.7

[51]Int.Cl⁶

C12P 19/32

[43]公开日 1995年8月9日

[22]申请日 94.2.7

[71]申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101北京市朝阳区大屯路15号生物物理研究所

[72]发明人 陆传宗

[74]专利代理机构 北京科龙专利事务所

代理人 韩小雷

C12N 1/16 C12N 9/16

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 一种制备腺嘌呤核苷二磷酸和胞嘧啶核苷二磷酸的方法

[57]摘要

本发明为一种生产腺嘌呤核苷二磷酸和胞嘧啶核苷二磷酸的方法。本方法主要包括啤酒酵母的预处理、酶液的制备、将核苷一磷酸转化为核苷三磷酸、将核苷三磷酸在不含磷酶液的作用下生成核苷二磷酸。本发明的合成方法成本低、产率高，最高可达90%，没有环境污染，能稳定产生目的产物，适合大规模生产。

权 利 要 求 书

1、一种制备腺嘌呤核苷二磷酸的方法，其特征是将啤酒酵母预处理后制成含磷和不含磷两种酶液，将腺嘌呤核苷一磷酸在含磷酶液的作用下转化为腺嘌呤核苷三磷酸并将纯化、浓缩、干燥，用不含磷酶液和腺嘌呤核苷三磷酸按重量浓度为70-90%酶液、10-30%核苷三磷酸配成水溶液，在此水溶液中按重量浓度分别加入0.2-0.7%的镁盐和5-20%的葡萄糖，在28-39℃、PH6-7.5的条件下反应1-3.5小时，得到的反应液经纯化、浓缩、干燥即为腺嘌呤核苷二磷酸。

2、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述啤酒酵母预处理是将啤酒中生产中经过培养七、八代的菌株或淘汰酵母用蒸馏水或去离子水洗2-3次，自然沉淀或离心至少10分钟，得到的酵母泥在0℃—10℃下保存。

3、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述含磷酶液是按重量浓度分别加入葡萄糖10%，磷酸3%，镁盐0.5%，酵母36%配成水溶液后，将PH调到7，在28℃下发酵6小时，用2000转/分的速度离心10分钟，得到的清液为含磷酶液。

4、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述不含磷酶液是按重量浓度分别加入葡萄糖10%，镁盐0.5%，酵母36%配成水溶液后，将PH调到7，在28℃下发酵6小时，用2000转/分的速度离心10分钟，得到的清液为不含磷酶液。

5、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述的将腺嘌呤核苷一磷酸转化为腺嘌呤核苷三磷酸是这样进行的：将腺嘌呤核苷一磷酸配成10%的水溶液，并按10%腺嘌呤核苷一磷酸水溶液：含磷酶液=1:10的此例，在PH为7、28℃下反应3.5小时。

6、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述的纯化过程是将反应液的PH调至中性在100℃下加热1分钟后，冷却，离心(3000-5000转/分)15分钟，或用一层滤纸铺硅藻土过滤，滤液用水稀释3倍，用氢氧化铵调PH到8-8.5，上到聚苯乙烯二乙烯苯季胺型阴柱上进行分离，用0.01N盐酸洗脱后，再用0.01N盐酸且含0.04N氯化

钠水溶液洗脱，再用0.2-0.7M氯化钠洗脱，得到有用的洗脱液(ATP或ADP)。

7、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述浓缩干燥过程是将有用的洗脱液用水稀释3倍，用氢氧化铵将PH调到8-8.5，充分上满聚苯乙烯二乙烯苯季胺型阴柱，用0.01N盐酸以及0.01N盐酸且含0.6-1M氯化钠溶液洗脱，洗脱液用6N氢氧化钠将其PH调到3.8，加三倍体积的95%的乙醇，冷置过夜，倾去上部乙醇，沉淀分别用75%乙醇，无水乙醇无水乙醚脱去水份，并用五氧化二磷真空干燥。

8、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述的镁盐是氯化镁或硫酸镁。

9、一种制备胞嘧啶核苷二磷酸的方法，其特征是将啤酒酵母预处理后制成含磷和不含磷两种酶液，将胞嘧啶核苷一磷酸在含磷酶液的作用下转化为胞嘧啶核苷三磷酸并将其纯化、浓缩干燥，用不含磷酶液和胞嘧啶核苷三磷酸按重量浓度为70-90%不含磷酶液、10-30%胞嘧啶核苷三磷酸配成水溶液，在此水溶液中按重量浓度分别加入0.2-0.7%的镁盐和5-20%的葡萄糖，在28-30℃、PH为6-7.5的条件下反应1-3.5小时，得到的反应液经纯化、浓缩、干燥即为胞嘧啶核苷二磷酸。

10、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述啤酒酵母预处理是将啤酒生产中经过培养七、八代的菌株或淘汰酵母用蒸馏水或去离子水洗2-3次，自然沉淀或离心至少10分钟，得到的酵母泥在0℃—10℃下保存。

11、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述含磷酶液是按重量浓度分别加入葡萄糖10%，磷酸3%，镁盐0.5%，酵母36%配成水溶液后，将PH调到7，在28℃下发酵6小时，用2000转/分的速度离心10分钟，得到的清液为含磷酶液。

12、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述不含磷酶液是按重量浓度分别加入葡萄糖10%，镁盐0.5%，酵母36%配成水溶液后，将PH调到7，在28℃下发酵6小时，用2000转/分的速度离心10分钟，得到的清液为不含磷酶液。

13、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述的将胞嘧啶

核苷一磷酸转化为胞嘧啶核苷三磷酸是这样进行的：将胞嘧啶核苷一磷酸配成10%的水溶液，并按10%胞嘧啶核苷一磷酸水溶液：含磷酶液 = 1:10的比例，在PH为7，28℃下反应3.5小时。

14、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述的纯化过程是将反应液的PH调至中性在100℃下加热1分钟后，冷却，离心(3000-5000转/分)15分钟，或用一层滤纸铺硅藻土过滤，滤液用水稀释3倍，用氢氧化铵调PH到8-8.5，上到聚苯乙烯-二乙烯苯季胺型阴柱上进行分离，用0.01N盐酸洗脱后，再用0.01N盐酸且含0.04N氯化钠水溶液洗脱，再用0.2-0.7M氯化钠洗脱，得到有用的洗脱液(CTP或CDP)。

15、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述浓缩干燥过程是将有用的洗脱液用水稀释3倍，用氢氧化铵将PH调到8-8.5，充分上满聚苯乙烯二乙烯苯季胺型阴柱，用0.01N盐酸以及0.01N盐酸且含0.6-1M氯化钠溶液洗脱，洗脱液用6N氢氧化钠将其PH调到3.8，加三倍体积的95%的乙醇，冷置过夜，倾去上部乙醇，沉淀分别用75%乙醇，无水乙醇，无水乙醚脱去水份，并用五氧化二磷真空干燥。

16、如权利要求9所述的方法，其特征在于所述的镁盐是氯化镁或硫酸镁。

说 明 书

一种制备腺嘌呤核苷二磷酸和胞嘧啶核苷二磷酸的方法

本发明为一种经两步制备腺嘌呤核苷二磷酸和胞嘧啶核苷二磷酸的方法。

腺嘌呤核苷二磷酸(简称ADP)和胞嘧啶核苷二磷酸(简称CDP)是制备聚肌胞药物的基本原料。临床证明,聚肌胞复合物是一种治疗免疫性疾病、疱疹病毒疾病的广谱抗毒药物,能诱导干扰素、肿瘤坏死因子、细胞激动素等。因此,能够大量制备腺嘌呤核苷二磷酸和胞嘧啶核苷二磷酸,对医药卫生行业具有非常重要的意义,目前的一步发酵法,产率低。化学合成,成本高,且有污染。

本发明的目的是提供一种用啤酒酵母经发酵,转化产生ADP和CDP的方法。

本发明的生产ADP的方法是将啤酒酵母预处理后制成含磷和不含磷两种酶液,将腺嘌呤核苷一磷酸(简称AMP)在含磷酶液的作用下转化为腺嘌呤核苷三磷酸(简称ATP)并将其纯化、浓缩干燥;将不含磷的酶液与ATP按如下重量浓度配成水溶液:

不含磷酶液	70-90%
ATP	10-30%

在水溶液中按浓度(重量)加入0.2-0.7%的镁盐和5-20%的葡萄糖,在28-39℃、PH为6-7.5的条件下反应1-3.5小时,所得溶液经纯化、浓缩干燥即为ADP。

本发明生产CDP的方法基本同上,只要将原料中腺嘌呤核苷一磷酸改为胞嘧啶核苷一磷酸(简称CMP)其它条件不变,最后产物即为CDP。

本发明生产ADP和CDP的方法中所述的啤酒酵母预处理可以是将啤酒厂生产的经过培养七、八代的菌株或淘汰酵母用蒸馏水或无离子水洗2-3次,自然沉淀或离心10分钟,得到的酵母泥在0℃—10℃下保存备用。

本发明生产ADP和CDP的方法中所述的含磷酶液可以这样制备:按重量浓度分别加入葡萄糖10%,磷酸3%,镁盐0.5%,酵母30%配成

水溶液，将PH调到7，在28℃下发酵6小时，用2000转/分的速度离心10分钟，得清液即为含磷酶液。

本发明生产ADP和CDP的方法中所述的不含磷酶液的制备基本同上，只要去掉磷酸即可。

本发明生产ADP和CDP的方法中所述的由AMP (或CMP) 转化为ATP (或CTP) 可以这样进行：

按10%AMP (或CMP) 水溶液：含磷酶液 = 1:10的比例，在PH为7、28℃下反应3.5小时，得到ATP (或CTP) 反应液。

本发明的生产ADP和CDP的方法中所述的纯化过程可以是上述反应液的PH调到中性，在100℃下加热1分钟后，冷却，离心(3000-5000转/分)15分钟，或用一层滤纸铺硅藻土过滤，得到的滤液用水稀释3倍，用氢氧化铵调PH到8-8.5，上到聚苯乙烯—二乙烯苯季胺型阴柱上进行分离，用0.01N盐酸洗脱后，再用0.01N盐酸且含0.04N氯化钠溶液洗下ADP (或CDP)，用0.2-0.7M氯化钠洗下ATP (或CTP)。

本发明的生产ADP或CDP的方法中所述的浓缩干燥过程可以这样进行：将纯化后得到的ATP (CTP) 洗脱液用水稀释3倍，用氢氧化铵将PH调到8-8.5，充分上满柱后，用0.01N盐酸以及0.01N 盐酸且含0.6-1M氯化钠溶液洗下ATP (CTP)，用6N氢氧化钠将洗脱液PH调到3.8，加三倍体积的95%的乙醇，冷置过夜，倾去上部乙醇，沉淀分别用75%乙醇，用无水乙醇，无水乙醚 脱去水份，并用五氧化二磷真空干燥。

本发明的生产ADP或CDP的方法中所述的镁盐可以是氯化镁或硫酸镁。

本发明生产ADP或CDP的方法成本低，产率高，最高可达90% 没有环境污染，能稳定产生ADP或CDP，适合大规模生产。

下面结合实施例对本发明进行更详细的描述实施例
一种生产CDP的方法。

选用啤酒酵母用蒸馏水洗2-3次，得酵母泥在低温下保存备用。

按重量浓度分别加入酵母36%，葡萄糖10%，磷酸3%，氯化镁0.5% 配成去离子水溶液，将PH调到7，在28℃下发酵6 小时，在转速为

2000转/分的离心机中离心10分钟，上清液即为含磷酶液，在5℃左右保存备用。

按重量浓度分别加入酵母36%，葡萄糖10%，氯化镁0.5%配成去离子水溶液，将PH调到7，在28℃下发酵6小时，在转速为2000转/分的离心机中离10分钟，上清液即为不含磷酶液，在5℃左右保存备用。

用去离子水将CMP配成10%的水溶液，按10%CMP水溶液：含磷酶液=1:10的比例，在PH为7，28℃下反应3.5小时，得到胞嘧啶核苷三磷酸(简称CTP)反应液。

将CTP反应液调PH至中性，在100℃下加热1分钟后，冷却、离心(3000-5000转/分)10分钟，将得到的清液用水稀释3倍，用氢氧化铵将PH调到8-8.5上到聚苯乙烯二乙烯苯季胺型阴柱上进行分离，用0.01N盐酸洗脱下CMP，用0.01N盐酸含0.04N氯化钠洗下CDP，用含0.5M氯化钠洗下CTP(实际上CMP90%以上转化成CTP)。

将前步的CTP洗脱液用去离子水稀释3倍，用氢氧化铵将PH调到8-8.5，充分上满浓缩阴柱，用0.01N盐酸含0.5M氯化钠溶液洗下CTP，用6N氢氧化钠调PH到3.8，并加入三倍体积的95%的乙醇后置冷库过夜，小心倾去上部酒精液，沉淀用75%乙醇，无水乙醇，无水乙醚脱去水份，再用五氧化二磷真空干燥，得到干燥的CTP。

按重量浓度加入不含磷酶液90%，CTP10%，氯化镁0.5%，葡萄糖10%配成去离子水溶液，在37℃，PH为7条件下反应1-3.5小时，得到的CDP反应液经聚苯乙烯-二乙烯苯季胺型阴柱纯化和浓缩，洗脱液用乙醇浓缩，洗涤及用乙醚干燥得到CDP。