



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

231763
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 33/00

(22) Prihlášené 11 01 82
(21) (PV 194-82)

(40) Zverejnené 14 05 84

(45) Vydané 15 12 86

(75)
Autor vynálezu CEBECAUER LADISLAV ing. CSc., PIEŠTANY

(54) Spôsob prípravy prostriedku pre viazanie protilátok

1

2

Vynález sa týka spôsobu prípravy prostriedku pre viazanie protilátok, určeného na diagnózu systémového lupus erythematosus. Rieši problém prípravy prostriedku, ktorý si zachováva antigénne determinanty potrebné na viazanie protilátkami, LE-faktormi, zo sér chorých. Podstata vynálezu spočíva v autolýze a vibračnom štiepení materiálu s hmotnostným zlomkom bunkových jadier vyšším ako 0,5. Prostriedok sa dá využiť v diagnostickom teste v lekárstve, ale môže sa použiť aj v biochémii a všade tam, kde je potrebný rozpustný deoxyribonukleoproteín.

Vynález sa týka spôsobu prípravy prostriedku pre viazanie protilátok, ktorý je určený najmä pre diagnózu systémového lupus erythematosus.

Doterajšie testy pre diagnózu systémového lupus erythematosus vychádzajú z objavu tzv. LE-bunkového fenoménu, resp. testu Hargraves M. M., Richmond H., Morton R., Proc. Mayo Clin. 23, 25 až 28, 1948; o tomto fenoméne sa dokázalo, že v ňom ako efektor účinkujú protilátky proti deoxyribonukleoproteínu, pôvodne označené ako LE-faktory. Je známy rad testov, ktoré tento fakt zúžitkovali a najviac sa rozšírili aglutinačné testy. Väčšinou však tieto testy nespĺňajú nároky praxe, najmä pokiaľ ide o citlivosť. Aglutinačné testy preferujú len určitú časť protilátok a bývajú pozitívne v 14 až 86 % sér, podľa koncentrácie protilátok, ktoré tieto obsahujú Chapman J. C., Amer. J. med. Technol. 42, 154 až 157, 1976. V testoch, ktoré sú obchodne dostupné sa používajú latexové častice, potiahnuté deoxyribonukleoproteínom: firemná literatúra Hyland, Lederle, Fisher.

Deoxyribonukleoproteín je zložka chromatinu a na jeho prípravu sa využíva jeho nerozpustnosť pri fyziologickej iónovej sile, t. j. pri koncentrácii NaCl 0,15 mol. dm^{-3} a relatívna rozpustnosť alebo dispergovateľnosť pri nízkej alebo vyššej iónovej sile. Nedostatok tohoto klasického postupu je tendencia deoxyribonukleoproteínu vytvárať ireverzibilne nerozpustný gél, a to už pri relatívne nízkej koncentrácii, nad 0,8 g. dm^{-3} deoxyribonukleoproteínu, ďalej pri prezrážaní alkoholom alebo soľami, a tiež keď sa predčistený materiál nechá dlho stáť a homogenizácia nie je dost intenzívna. To sa v súčasnosti obchádza na základe poznatku, že chromatin je zložený z menších podjednotiek — nukleozómov — a tieto je možné získať na rozdiel od predchádzajúcich mechanických postupov, pôsobením enzýmov, ako napr. mikrokovej nukleázy alebo extrakciou pri selektívnej koncentrácii niektorých solí Noll M., Thomas J. O., Kornberg R., Science 187,

1203, 1975; Fenske a spol., Acta med. biol. germ. 39, 343 až 354, 1980. Tieto postupy sú zložité, nákladné a výťažky bývajú malé, menšie ako 25 % východzieho materiálu. Takéto prípravky slúžia hlavne pre bádateľské ciele.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob prípravy prostriedku pre viazanie protilátok, tvoreného deoxyribonukleoproteínom, pri ktorého príprave sa vychádza z telacieho týmusu, jadier kuracích erytrocytov alebo z materiálu s hmotnostným zlomkom jadier nad 0,5, vyčisteného opakovanou extrakciou fyziologickým roztokom. Podstata vynálezu spočíva v zbotnaní zvyšku a autolýze vo vode alebo roztoku chloridu sodného v koncentrácii do 0,01 mol. dm^{-3} počas 8—48 hodín, pri teplote 0 až 10 °C a v 2 až 5-násobnom podrobení vibračnému účinku s frekvenciou 10 až 30 kHz pri výkone 50 až 1300 W pri teplote 0 až 10 °C. Získaný materiál sa vysuší mrazovou sublimáciou a získa sa stabilný preparát vo forme bielej, páperovitej látky, dobre rozpustnej v roztokoch solí i vo vode. Použiteľnosť takto pripraveného prostriedku na viazanie protilátok, LE-faktorov, je možná na základe poznatku, že aj napriek enzýmovej a vibračnej degradácii a zníženiu molekulovej hmotnosti si zachováva potrebné antigénne determinanty.

Výhodou tohoto spôsobu prípravy je hlavne to, že sa dá uskutočniť jednoducho a nenákladne. V laboratórnych podmienkach sa dá pripraviť také množstvo substancie, aké je potrebné na jej priemyselné využitie.

K dôkazu účinku slúži nasledujúca tabuľka, udávajúca výsledky testovania sér chorých s pozitívnym LE-bunkovým testom, ktorý sa v tomto prípade môže považovať za referenčný. Analýzy sa vykonali testovacími súpravami Hyland, Lederle a pomocou prostriedku podľa vynálezu, enzýmovou imunoanalýzou na detekciu protilátok proti deoxyribonukleoproteínu triedy IgG (IgG—anti—DNP).

Tabuľka

Test	Počet analyzovaných vzoriek	Pozitívnych vzoriek počet	%
Hyland			
Lederle	76	36	47,4
IgG—anti—DNP	94	76	80,9
podľa vynálezu	157	138	87,9

Tieto výsledky dokazujú, že prostriedok podľa vynálezu je najúčinnjší v porovnaní s referenčným testom, v zmysle zhody v pozitívite oboch testov.

Príprava deoxyribonukleoproteínu známymi postupmi vedie k malým výťažkom pro-

duktu, ktorý je limitovane rozpustný. Bežný postup spočíva v homogenizácii tkaniva, alebo izolovaných jadier v štandardnom soľnom roztoku 0,15 mol. dm^{-3} NaCl, čo sa opakuje dotiaľ, kým sa už neextrahuje signifikantné množstvo proteínu. Nerozpustný

zvyšok sa potom rýchlo homogenizuje v tisíc-násobnom prebytku slabého soľného roztoku, $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl a menej a centrifuguje pri vysokom zrýchlení $15\,000 \cdot g$ a viac. Typicky sa z 10 g tefacieho týmusu vyťaží $0,20$ až $0,50 \text{ g}$ deoxyribonukleoproteínu.

Postup podľa vynálezu je jednoduchý a pritom účinnejší. Poskytuje väčšie množstvo substancie, s výhodnejšími vlastnosťami. Postup prípravy vynálezu je ďalej objasnený na príkladoch, ktoré ale jeho rozsah ani neobmedzujú ani nevyčerpávajú.

Príklad 1

10 g tefacieho týmusu, ktorý bol predbežne dôkladne extrahovaný štandardným soľným roztokom, obsahujúcim $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, sa dispergoval pomocou kuchynského mixéru v 250 ml $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl a gél sa nechal stáť v chlade pri 5°C 10 až 18 hod., kým nenabotnal. Gél sa potom dispergoval pomocou injekčnej striekačky s trubičkou $\varnothing 2,0$ až $2,5 \text{ mm}$ a podrobil sonikovaniu pri výkone 100 W a frekvencii 20 kHz . Teplota nesmie vystúpiť na 10°C . Po scentrifugovaní pri $15\,000 \text{ g}$ počas 1 hod. a 5°C sa sediment podrobil rovnakému sonikovaniu opakovane, až sa v sedimente nenachádzala deoxyribonukleová kyselina. Extrakty sa zlyofilizovali a vyťažilo sa tak spolu $1,7 \text{ g}$ preparátu. Tento sa dobre rozpúšťa vo vode alebo v soľných roztokoch. Roztoky majú charakteristické spektrum v ultrafialovej oblasti, kde vykazujú $\lambda_{\text{max}} = 257 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{min}} = 237 \text{ nm}$. Pomer absorbancií pri 260 a 280 nm je $1,3$ až $1,5$ v štyroch frakciách a hmotnostný pomer proteín/DNA bol $1,0$ až $1,6$.

Na prípravu je výhodné použiť tkanivá bohaté na obsah deoxyribonukleoproteínu a vedľa týmusov sú osobitne výhodné aj jadrá z kuracích erytrocytov, ktoré sa dajú ľahko pripraviť v čistom stave.

Príklad 2

Asi 150 ml kuracej krvi sa premylo 4 razy fyziologickým roztokom a podrobilo lyže v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CaCl_2 . Jadrá sa zachytili scentrifugovaním lyzátu pri nízkych obrátkach a premyli sa štandardným soľným roztokom až do zjavného odstránenia he-

moglobínu. Jadrá sa narušili dvojnásobným zmrazením a rozmrazením a podrobili sa zbotnaniu v 100 ml vody počas 18 hod. Nato sa dispergovali a podrobili sonikovaniu pri 100 W a 20 kHz pri teplote do 10°C vždy 1 min, načo sa stočili pri $15\,000 \text{ g}$ 1 hod. a 5 stupňov Celsia a zvyšok sa opäť podrobil sonikovaniu. Po 5 sonikáciách sa prakticky všetok nukleoproteín jadier previedol do roztoku a po mrazovej sublimácii sa získalo $1,35 \text{ g}$ bielej páperovitej látky. Rozpúšťal sa dobre vo vode i v soľných roztokoch s charakteristickým spektrom v ultrafialovej oblasti. Pomer absorbancií pri 260 a 280 nm bol $1,05$ až $1,4$ a hmotnostný pomer proteín/DNA $1,0$ až $1,7$.

V priebehu niekoľkých dní sa dá pripraviť týmto postupom také množstvo substancie, ktoré vystačí pre priemyslové zhotovenie testovacích súprav na screening systémového lupus erythematosus. Prostriedok je dlhodobe skladovateľný v chladničke pri teplote pod 10°C . Preparáty skladované 2 roky sa dali použiť v teste. Pred prípravou testovacích skúmaviek alebo mikrodosiek sa prostriedok rozpustí vo vode a jeho koncentrácia sa nastaví výhodne tak, že v soľnom roztoku $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl a $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ trinátriumcitrát dáva absorbančiu pri 260 nm $0,5$. Skúmavky, mikrodosky, všeobecne pevná fáza, sú výhodne z polystyrénu a naplnia sa roztokom prostriedku tak, aby sa získala dostatočná aktívna plocha.

Pláštenie, aktivovanie pevnej fázy prebehne za 15 až 18 hod. pri 5°C , načo sa roztok odsaje a pevná fáza sa opakovane premyje vodou. Testovanie sér sa uskutoční naplnením vhodne riedeného séra, ktoré sa po inkubácii odstráni a pevná fáza sa opäť dôkladne prepláchnie. Viazané protilátky sa napokon odhalia inkubáciou, pomocou antiglobulínového konjugátu, označeného výhodne enzýmom, ktorého farebný produkt je úmerný koncentrácii viazaného konjugátu a tým aj protilátky. Rozsah reaktivity testovaného séra sa môže výhodne porovnať s reaktivitami pozitívneho a negatívneho referenčného séra. Využitie prostriedku v enzýmoimunologickom teste umožňuje špecifický a citlivý screening chorých so systémovým lupus erythematosus, s možnosťou kvantitatívneho určenia protilátok v rôznych imunoglobulínových triedach.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy prostriedku pre viazanie protilátok tvoreného deoxyribonukleoproteínom, pri ktorého príprave sa vychádza z tefacieho týmusu, jadier kuracích erytrocytov alebo z materiálu s hmotnostným zlomkom jadier na $0,5$, vyčisteného opakovanou extrakciou fyziologickým roztokom, vyznačujúci sa tým, že sa predčistený zvyšok po-

drobí zbotnaniu a autolýze vo vode alebo roztoku chloridu sodného v koncentrácii do $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ počas 8 až 48 hodín, pri teplote 0 až 10°C a vibračnom účinku s frekvenciou 10 až 30 kHz pri výkone 50 až 100 W pri teplote 0 až 10°C , ktorý sa opakuje 2 - až 5 krát.