

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

259875

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 30/48

(22) Přihlášeno 01 03 85

(21) [PV 1471-85]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 02 03 84

(34 07 814.2)

Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 15 04 88

(45) Vydáno 15 05 89

(72)

Autor vynálezu

MÜLLER WERNER prof. dr., MNICHOV,
SÄNGER HEINZ LUDWIG prof. dr., MARTINSRIED (NSR)

(73)

Majitel patentu

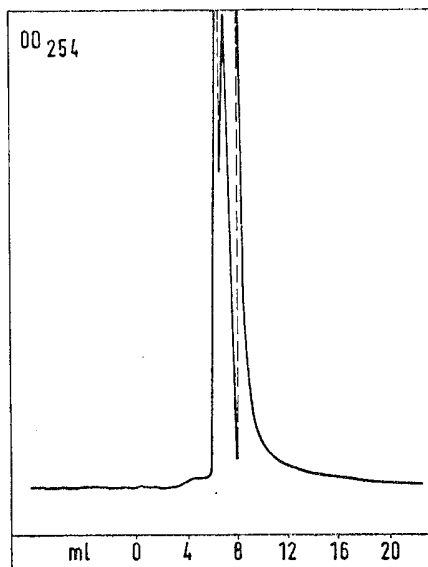
MERCK PATENTGESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG,
DARMSTADT (NSR)

(54) Nosič fází pro rozdělovací chromatografii a způsob jeho výroby

1

Nosič fází sestává ze základního nosiče o velikosti částic v rozmezí 7 až 2 000 μm , který má na svém povrchu hydroxylové skupiny a je potažen polymerovou vrstvou, vázanou chemickou vazbou s afinitou pro jednu z fází fázového systému pro rozdělovací chromatografii. Při výrobě nosiče se k základnímu nosiči ve vodné suspenzi přidá polymerovatelný monomer a potom se provede roubovaná polymerace. Nosič fází je vhodný k dělení biologických makromolekul a lze ho výhodně použít k dělení nízkomolekulárních a vysokomolekulárních ribonukleových kyselin, kyselin nukleových s dvojítm řetězcem, subcelulárních jednotek a celých buněk.

2



OBR. 3

Vynález se týká nosiče fází pro rozdělovací chromatografii makromolekul ve dvoufázovém vodném systému polyethylenglykol-dextran a způsobu jeho výroby.

Je známo, že biologické makromolekuly, subcelulární jednotky, bakterie a eukaryotické buňky lze oddělovat protiproudovým dělením ve vodném systému polyethylenglykol-dextran (P. A. Albertson „Partition of Cell Particles and Macromolecules“, 1971, druhé vydání, Almquist a Wiksell, Stockholm). Způsoby tohoto protiproudového dělení jsou ale nyní mimořádně nákladné jak aparaturně, tak i časově, zejména když při malých rozdělovacích koeficientech je zapotřebí velkého množství stupňů protiproudového dělení k tomu, aby se dosáhlo požadovaného rozdělení. Byly proto již prováděny pokusy nahradit tento proces protiproudového dělení způsobem rozdělovací chromatografie, protože takto je možné podstatně jednodušeji dosáhnout množství dělicích stupňů. Tyto pokusy však zatím ztroskotávaly, protože nebyly vhodné nosiče pro stacionární fázi.

Zatím mohly být chromatograficky děleny jenom dvouřetězcové nukleové kyseliny ve vodném systému polyethylenglykol-dextran za použití celulózy jako nosiče pro dextranem bohatou stacionární fázi (W. Müller, H. J. Schuetz, C. Guerrier-Takada, P. E. Cole a R. Potts, *Nucleic Acids Research*, vol. 7, č. 8, 1979, 2483 až 2499, a W. Müller a G. Kütemeier, *Eur. J. Biochem.* 128, 1982, 231 až 238). Při těchto výzkumech chromatografie kapalina/kapalina fragmentů DNK byla použita pro dextranem bohatou fázi vodného systému polyethylenglykol-dextran řada materiálů, z nichž se ukázala vhodnou zejména celulóza, protože vykazuje postačující afinitu pro fázi bohatou dextranem. V důsledku svých vyhraněných adsorpčních vlastností jsou tyto nosiče fází pro bílkovinné součásti buněk nepoužitelné; rovněž u ribonukleových kyselin jsou adsorpci podmíněné rušivé vlivy již zřetelné. Kationtové nebo aniontové gely na bázi polysacharidů vážou dextranem bohatou fázi sice podobně dobře jako celulóza, lze jich však použít jenom pro isokratické dělicí procesy, protože fáze je odpuzována, jakmile se mění elektrický potenciál v průběhu gradientové eluce různými solemi v mobilní, polyethylenem bohaté fázi.

Mezi neutrální gely, které by přicházely v úvahu jako potenciální nosiče fází pro takovou rozdělovací chromatografii, patří porézní směsné polymery na vinylové bázi (fraktogely), jakož i polyakrylamidové gely (biogely). Prvé z nich vážou pro obecné použití příliš malé množství fází dextranu, zatímco v druhém případě vázaná fáze je stěží dostupná makromolekulám. Toto je zřetelně zdůrazněno i ve výše uvedené literatuře *Eur. J. Biochem.* 128 [1982], str. 233. Tato nepřístupnost vázané fáze platí i pro kombinační gely polyakrylamid-agaróza.

Úkol tohoto vynálezu spočívá tudíž ve vytvoření nosiče fází pro rozdělovací chromatografii makromolekul, který umožňuje jednoduchým způsobem vynikající dělení, lze ho snadno vyrábět, je vhodný pro dělení jak nízkomolekulárních, tak vysokomolekulárních kyselin ribonukleových i pro subcelulární jednotky a celé buňky, což je důležité zejména při studiu virů a viroidů.

Nyní se ukázalo, že úkol lze řešit pomocí nosiče fází, který se skládá z částic základního nosiče, jejichž povrch je převrstven pevně přilnavým materiálem s afinitou pro jednu z fází fázového systému pro rozdělovací chromatografii.

Předmětem vynálezu je tudíž nosič fází pro rozdělovací chromatografii makromolekul, vyznačující se tím, že sestává ze základního nosiče o velikosti částic v rozmezí 7 až 2000 μm , který má na svém povrchu hydroxylové skupiny a je potažen polymernou vrstvou, vázanou chemickou vazbou, s afinitou pro jednu z fází fázového systému pro rozdělovací chromatografii.

U makromolekul se jedná zejména o jednořetězcové nukleové kyseliny a zvláště bílkoviny, jakož i subcelulární jednotky a celé buňky.

U nosiče fází podle vynálezu jsou částice základního nosiče převrstveny pevně přilnavým materiálem s afinitou k jedné z fází, jmenovitě k dextranové fázi dvoufázového systému polyethylenglykol-dextran, což má za následek, že u těchto kombinačních částic se dextranová fáze nuceně váže na povrchu, a tak se stává dostupnou i pro extrémně velké molekuly až celé buňky. Na druhé straně zajišťují částice základního nosiče potřebnou mechanickou stabilitu nosiče fází.

Podle výhodného provedení vynálezu sestávají částice základního nosiče z anorganického anebo organického materiálu, například z oxidu hlinitého, křemičitanu, křemeliny, silikagelu, celulózy, derivátů celulózy, zesíťovaného dextranu, zesíťované agarózy nebo z polymeru nebo kopolymeru na bázi kyseliny akrylové, akrylamidu, esterů kyseliny akrylové, kyseliny methakrylové, methakrylamidu, esterů kyseliny methakrylové, a/nebo vinylových sloučenin nebo směsí těchto monomerů. Obzvláště výhodné je, jestliže částice základního nosiče sestávají z některého z těchto popsaných materiálů v hydroxylované formě, protože takto je bez dalšího možné spojit povrchovou vrstvu pevně s částicemi základního nosiče, jmenovitě dosáhnout chemické vazby mezi materiálem povrchové vrstvy a materiálem částic základního nosiče.

Obzvláště výhodné je používat částic základního nosiče ze silikagelu substituovaného diolem, hydrofilizovaného polymethakrylátu, křemičitanu se škrobovitou vrstvou, nebo porézního polymeru na bázi vinyly.

Obzvláště výhodné mají částice základní-

ho nosiče u nosiče fází podle vynálezu průměrné velikosti částic 7 až 100 μm a zejména 10 až 50 μm .

Podle další výhodné formy provedení podle vynálezu jsou částice základního nosiče převrstveny polymerním materiálem, který je se zvláštní výhodou vázán chemicky na materiál částic základního nosiče. Přitom se ukázalo jako obzvláště výhodné převrstvit částice základního nosiče syntetickým polymerem nebo kopolymerem, který se vytváří naroubováním monomerních složek na částice základního nosiče. K tomuto účelu se pro požadovaný dělicí efekt ukázal být nejvhodnější naroubovaný polyakrylamid a obzvláště lineární nebo slabě zesítěný polyakrylamid.

Dalším předmětem vynálezu je způsob výroby tohoto nosiče fází, který se vyznačuje tím, že se k základnímu nosiči o velikosti částic v rozmezí 7 až 2000 μm majícímu na povrchu hydroxylové skupiny ve vodné suspenzi přidá polymerovatelný monomer a potom se provede roubovaná polymerace.

Podle jednoho z výhodných provedení vynálezu se suspendují částice základního nosiče z hydroxylovaného materiálu výše uvedeného druhu v roztoku obsahujícího případně monomery, načež se provádí v průběhu redoxpolymerace za vyloučení kyslíku naroubování polymerního materiálu. Při tomto provedení lze s výhodou použít jako polymeračního katalyzátoru iontů čtyřmocného ceru, protože tento materiál vyvolává tvorbu volných radikálů ovlivňujících příznivě polymeraci výlučně na povrchu částic základního nosiče, takže polymerace probíhá ve formě roubované polymerace. Pokud se týká podrobností tohoto o sobě známého způsobu, lze odkázat na práci autorů G. Mino a S. Kaizerman, *Journal of Polymer Science*, sv. XXXI, č. 122 (1958), str. 242 až 243.

Při tomto způsobu provedení se používá akrylamidu, výhodného k vytváření polyakrylamidové povrchové vrstvy, ve formě vodného roztoku.

Ukázalo se, že při výše diskutované redoxpolymeraci v přítomnosti iontů čtyřmocného ceru poskytuje roubovaná polymerace akrylamidu během 30 až 240 minut dostatečně hustou polyakrylamidovou vrstvu na částicích základního nosiče, která postačuje pro tvorbu dostačujícího množství dextranové fáze pro rozdělovací chromatografii ve vodném systému polyethylenglykol-dextran.

Následující nosiče byly s úspěchem opatřeny polyakrylamidovou vrstvou:

„Superose^(R)“: Zesítěná agaróza, velikost částic 25 až 40 μm ,

„Lichrosorb^(R)“: — Diol: diolsubstituovaný silikagel, velikost částic 10 μm ,

„Separon Hema 1000^(R)“: hydrofilizovaný polymethakrylát, velikost 16 až 21 μm ,

„TSK-SIL 3000^(R)“: křemičitanové nosiče se škrobovitou vrstvou, velikost částic 16 až 21 μm ,

„TSK-HW-40(S)^(R), -55(S)-65(S) a -75(S)“: porézní směsné polymery na vinylové bázi, 1m Äq OH/g, na trhu dostupné jako „Fractogely“, velikost částic 25 až 40 μm .

Ukázalo se, že nosiče fází podle vynálezu jsou vhodné k dělení nízkomolekulárních a vysokomolekulárních ribonukleových kyselin, kyselin nukleových s dvojitým řetězcem, subcelulárních jednotek a celých buněk, takže jich lze použít k izolaci viroidních RNK z rostlinných surových extraktů a ke chromatografickému dělení subcelulárních jednotek a celých buněk, mimo jiné i k lékařskodiagnostickým účelům.

Výše definovaného nosiče fází lze použít pro oddělování (pomocí rozdělovací chromatografie) makromolekul, biopolymerů, subcelulárních jednotek i celých buněk ve vodných dvoufázových i vícefázových systémech na bázi polymerů, které jsou popsány například u P. A. Albertsona („*Partition of Cell Particles and Macromolecules*“, druhé vydání; Almquist a Wiksell, Stockholm, str. 18 až 30), zejména ve dvoufázovém vodném polyethylenglykol-dextran.

Následující příklady slouží k dalšímu osvětlení vynálezu.

Příklad 1

Znázorňuje výrobu nosiče fází podle vynálezu.

Do trojhrdlé baňky opatřené plynovou zaváděcí trubicí, kapací nálevkou a připojením na vakuum, se vnáší roztok 50 g akrylamidu v 500 ml destilované vody a v tomto roztoku se suspenduje 20 g částic základního nosiče z dílem substituovaného silikagelu (Lichrosorb^(R)) o velikosti částic 10 μm v tomto roztoku. Potom se promývá po dobu 5 minut předčištěným dusíkem, evakuuje se a baňka se znovu naplní dusíkem. Tato opatření zahrnující evakuaci a plnění dusíkem se opakují dvakrát, načež se přidá za míchání 15 ml 0,2 M roztoku dusičnanu ceričitoamonného v 1 N kyselině dusičné za míchání. Za mírného míchání se zavádí suspenzí dusík po dobu 60 minut, přičemž intenzity žlutého zbarvení iontů čtyřmocného ceru zřetelně ubývá. Potom se k suspenzi za přístupu vzduchu přidá 20 g částic základního nosiče a po promíchání se provede tlaková filtrace přes filtr modrá páska (Schleicher a Schüll č. 5 893). Po promytí se 400 ml destilované vody se promývá asi se 400 ml 0,2 N roztoku octanu sodného v

kakodylátovém pufru (10 mM kakodylátu sodného na 1 mM kyseliny ethylendiaminotetraoctové, hodnota pH = 6).

Stejným způsobem se převrstvují částice základního nosiče z výše specifikovaných materiálů polyakrylamidovou vrstvou, přičemž není nezbytné provádět výše uvedené ředění nosiče, převrstveného polyakrylamidem, materiálem nepřevrstveným. V případě částic základního nosiče z Lichrosorb^(R) je toto ředění potřebné, aby se převrstvený materiál učinil filtrovatelným a tím se usnadnilo převrstvení dextranovou fází.

Příklad 2

K ozřejmnění dělicích vlastností nosiče fází podle vynálezu byly provedeny srovnávací pokusy, při kterých byly vzájemně srovnány nosiče fází podle vynálezu s těmi nosiči, které sestávají jenom z částic základního nosiče odpovídajícího nosiče fází podle vynálezu.

Nejprve byly nosiče fází převrstveny následujícím způsobem dextranovou fází systému polyethylenglykol-dextran.

Promytý materiál byl propláchnut na tlakovém filtru při teplotě 37 °C 2,5 objemy dextranové fáze systému polyethylenglykol-dextran (připravené rozpuštěním 66,3 g dextranu T 500 a 5,4 g polyethylenglykolu 8000 v 428,3 ml 0,2 M roztoku octanu sodného v kakodylátovém pufru připraveném podle příkladu 1), načež byl přebytek fáze vymyt horní fází, bohatou na polyethylenglykol, téhož systému (připravenou rozpuštěním 3 g dextranu T 500, 71,7 g polyethylenglykolu 8000 v 925,3 ml 0,2 M octanu sodného v kakodylátovém pufru). Po suspendování materiálu ve 3 objemech horní fáze byl takto získaný nosič fází naplaven do vhodné chromatografické trubice opatřené termostatickým vyhřívacím pláštěm, udržujícím teplotu na 37 °C.

Potom byly zkoumány dělicí vlastnosti nepřevrstvených částic základního nosiče dextranové fáze na jedné straně, případně nosiče fází podle vynálezu na druhé straně, a to za použití zkušebního materiálu na podkladě směsi přenosových RNK (tRNK) a 5sRNK. Oba komponenty RNK náležejí k rozpustným ribonukleovým kyselinám a mají následující vlastnosti:

t ribonukleová kyselina:

Molekulární hmotnost $\approx 30\,000$, sestává ze 40 až 60 stejně velkých druhů, které se liší aminokyselinovou akcepturovou aktivitou.

5s ribonukleová kyselina:

Molekulární hmotnost $\approx 43\,000$, u většiny organismů jednotná RNK, která má úlohu při přenášení sekvencí báze RNK do aminokyselinových sekvencí.

Dělení se provádí v systému polyethylenglykol-dextran D z 6,2 % hmot. dextranu, 4,40 % hmot. polyethylenglykolu a 89,4 % hmot. vody, který ve spodní fázi sestává ze 13,25 % hmot. dextranu, 1,07 % hmot. polyethylenglykolu a 85,68 % hmot. vody, a v horní fázi z 0,30 % hmot. dextranu, 7,17 procenta hmot. polyethylenglykolu a 92,53 procenta hmot. vody (tento a podobné polyethylenglykol-dextranové systémy jsou známy z výše uvedené literární citace P. A. Albertsona; viz zejména fázový diagram na straně 264). U tohoto dvofázového systému polyethylenglykoldextran lze ovlivňovat rozdělovací koeficient zejména skladbou iontů, tj. přidáním různých solí, přičemž ionty lithia rozdělovací koeficient K stupňují, zatímco ostatní alkalické kationty mají opačný účinek.

Při dělení prováděném zde ve fázové dvojici se tudíž používá následujících elektrolytů:

- 10 mM pufr s kakodylátem sodným o hodnotě pH 6,0,
- 3 mM azid sodný,
- 1 mM sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové,
- 0,2 M octan sodný.

Dělení se provádí při teplotě 37 °C na chromatografickém sloupci s termostatem.

Množství vzorků jsou udána v jednotkách OH₂₅₄, tj. jako optická hustota při vlnové délce 254 nM, přičemž 25 OH₂₅₄ odpovídá 1 mg RNK.

Výsledky dosažené při těchto děleních jsou uvedeny na připojených výkresech, jejichž obr. znázorňují v jednotlivostech následující údaje:

Obr. 1

Srovnávací pokus: Chromatografie vzorku 10 OH₂₅₄ na sloupci, který je plněn částicemi základního nosiče z „Lichrosorb^(R)“-diolu, nepřevrstveného polyakrylamidem. Objem sloupce: 55 ml. Průtok: 18 ml/hod.

Obr. 2

Pokus podle vynálezu: Dělení vzorku 50 OH₂₅₄, obsahujícího barviva, na sloupci naplněném částicemi z „Lichrosorb^(R)“-diolu převrstvenými polyakrylamidem. Objem sloupce: 8,4 ml. Průtok: 15 ml/hod.

Obr. 3

Srovnávací pokus: Chromatografie vzorku 19 OH₂₅₄ na sloupci naplněném částicemi základního nosiče ze „Superose^(R)“. Objem sloupce: 10 ml, průtok 9 ml/hod.

Obr. 4

Pokus podle vynálezu: Dělení vzorku 50 OH₂₅₄ na sloupci naplněném částicemi ze „Superose (R)“ převrstvenými polyakrylamidem.

Objem sloupce: 60 ml, průtok 20 ml/hod.

Obr. 5

Srovnávací pokus: Chromatografie vzorku 35 OH₂₅₄ na sloupci naplněném částicemi základního nosiče z „TSK-HW-40(S)“.

Objem sloupce 65 ml, průtok: 15 ml/hod.

Obr. 6

Pokus podle vynálezu: Dělení vzorku 50 OH₂₅₄ na sloupci naplněném polyakrylamidem převrstvenými částicemi základního nosiče z „TSK-HW-40(S)“.

Objem sloupce: 65 ml, průtok: 15 ml/hod.

Na obrázcích 1 až 6 je na ose y uvedeno množství vzorku v jednotce OH₂₅₄ a na ose x objem vzorku v ml.

Z výše uvedených obrázků je zřejmé, že s pomocí nosičů fází podle vynálezu ve srovnání se sloupci, které obsahují nepřevrstvené částice základního nosiče, je možné dosahovat překvapivě čistého oddělení složek zpracovávané rozdělované směsi. Z toho je ovšem zřejmé, že nosiče fází podle vynálezu jsou neočekávaně vhodné k dělení biologických makromolekul, což nemohlo být nikterak předvídáno, a lze jich používat s velkou výhodou k dělení a k lékařskodiagnostickým postupům.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Nosič fází pro rozdělovací chromatografii makromolekul, vyznačující se tím, že sestává ze základního nosiče o velikosti částic v rozmezí 7 až 2000 μm , který má na svém povrchu hydroxylové skupiny a je potažen polymerovou vrstvou vázanou chemickou vazbou s afinitou pro jednu z fází fázového systému pro rozdělovací chromatografii.

2. Nosič fází podle bodu 1, vyznačující se tím, že základní nosič sestává z oxidu hlinitého, křemičitanu, křemeliny, silikagelu, celulózy, derivátu celulózy, zesítěného dextranu, zesítěné agarózy nebo z polymeru nebo kopolymeru na bázi kyseliny akrylové, akrylamidu, esterů kyseliny akrylové, kyseliny methakrylové, methakrylamidu, esterů kyseliny methakrylové a/nebo vinylových sloučenin nebo ze směsí těchto monomerů.

3. Nosič fází podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že základní nosič sestává ze silikagelu substituovaného diolem, hydrofilizovaného polymethakrylátu, křemičitanu se škrobovitou vrstvou nebo porézního polymeru na bázi vinylu.

4. Nosič fází podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že částice základního nosiče mají velikost 7 až 100 μm .

5. Nosič fází podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že základní nosič je potažen vrstvou naroubovaného lineárního nebo zesítěného polyakrylamidu.

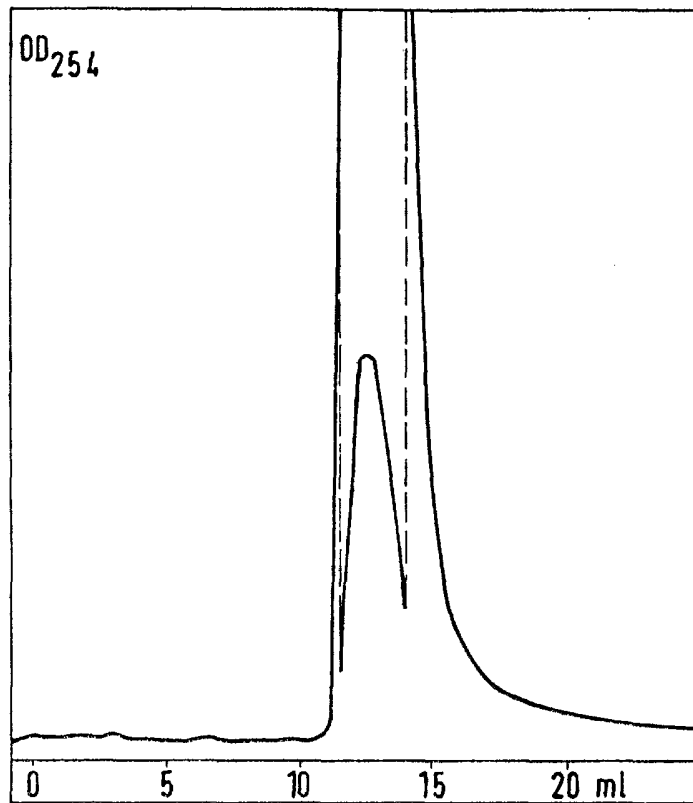
6. Způsob výroby nosiče fází podle bodu 1, vyznačující se tím, že se k základnímu nosiči o velikosti částic v rozmezí 7 až 2000 μm majícímu na povrchu hydroxylové skupiny ve vodné suspenzi přidá polymerovatelný monomer a potom se provede roubovaná polymerace.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se roubovaná polymerace provádí jako redox-polymerace indukovaná čtyřmocným cerem za nepřístupu vzduchu.

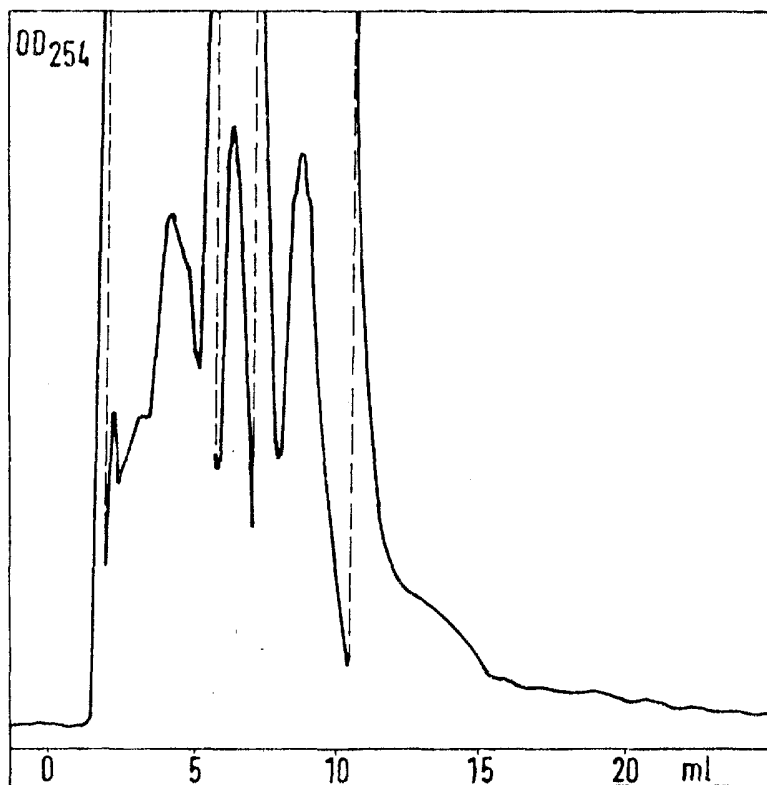
8. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se jako monomer použije akrylamid ve vodném roztoku.

9. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se použije základní nosič sestávající z oxidu hlinitého, křemičitanu, křemeliny, silikagelu, celulózy, celulóзовého derivátu, zesítěného dextranu, zesítěné agarózy nebo polymeru nebo kopolymeru na bázi kyseliny akrylové, akrylamidu, esterů kyseliny akrylové, kyseliny methakrylové, methakrylamidu, esterů kyseliny methakrylové a/nebo vinylových sloučenin nebo ze směsí těchto monomerů.

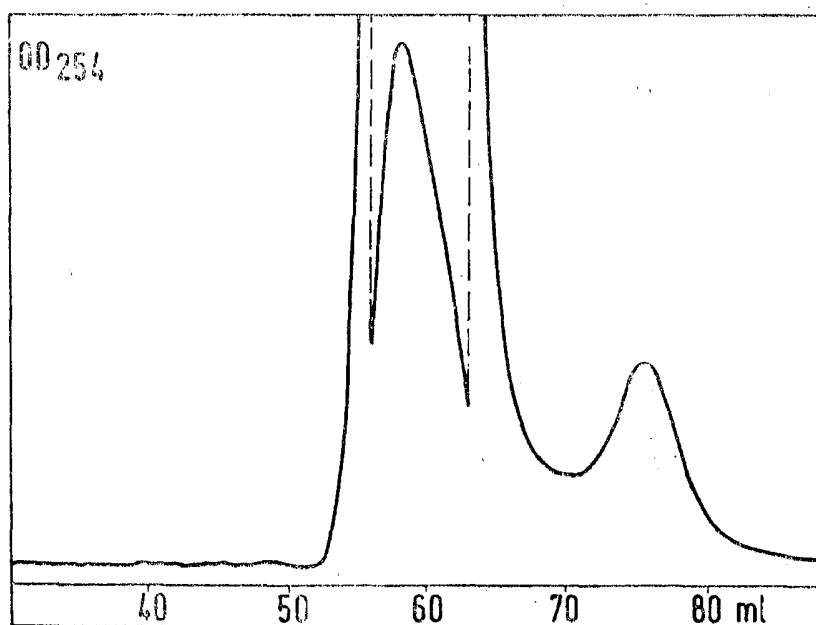
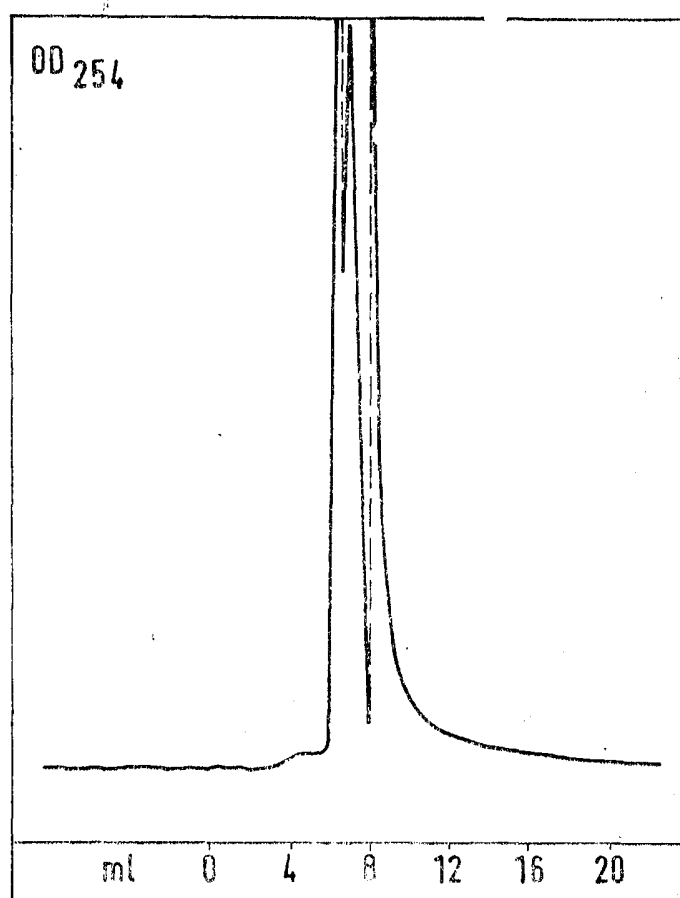
259875



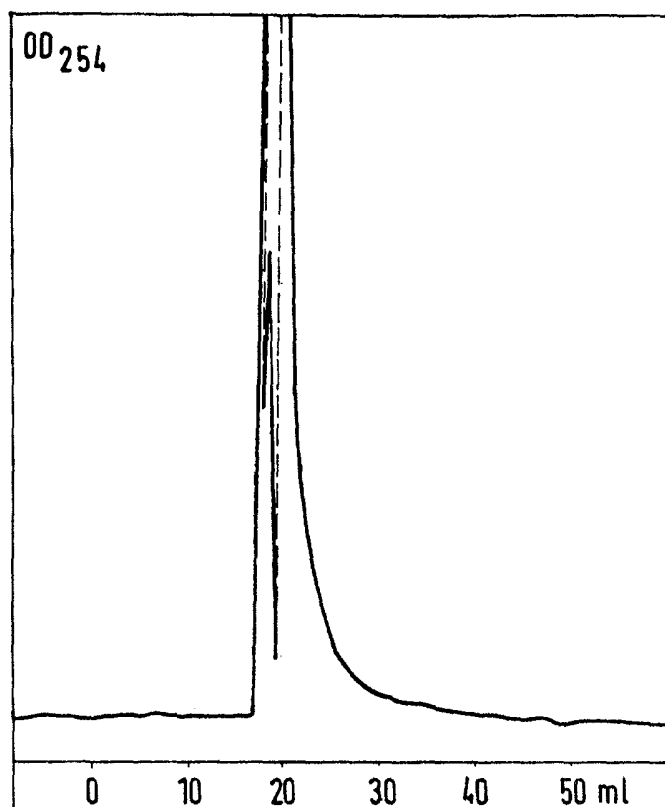
OBR.1



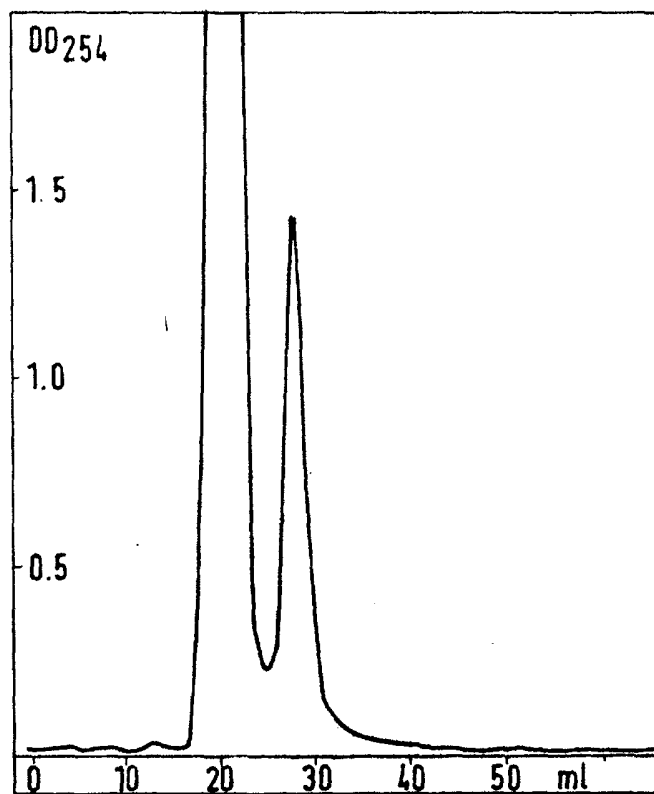
OBR.2



259875



OBR. 5



OBR. 6