



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

242220
(11) (B1)

(22) Prihlášené 23 11 84
(21) [PV 8989-84]

(40) Zverejnené 31 08 85

(45) Vydané 15 09 87

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/53

(75)

Autor vynálezu

TALÁN PETER RNDr.; MUCHA JURAJ ing., KOŠICE

(54) **Spôsob naväzovania vysokomolekulových biologicky aktívnych látok na polytetrafluóretylénový povrch kovalentnou chemickou väzbou**

1

2

Popisuje sa spôsob naväzovania vysokomolekulových biologicky aktívnych látok, akými sú napríklad špecifické protilátky gama globulínovej povahy, na polytetrafluóretylénový povrch kovalentnou chemickou väzbou. Povrch bol aktivovaný v roztoku amoniaku kovovým sodíkom. Po prepláchnutí destilovanou vodou bol vnesený do roztoku 1-etyl-(3,3-dimetylamínopropyl)-karbodiimidu v destilovanej vode. Do roztoku potom bol vnesený roztok biologicky aktívnej vysokomolekulovej látky. Po prebehnutí reakcie bol povrch opláchnutý vodným roztokom chloridu sodného a vysušený.

Takto pripravená pevná fáza mala potom využitie pri rádioimunoanalýze, respektíve enzýmoimunoanalýze mnohých látok (tyroxín, digoxín, progesterón, alfatoxín B₁ a ďalších).

Vynález sa týka spôsobu naväzovania vysokomolekulových biologicky aktívnych látok (VBAL), akými sú napríklad špecifické protilátky gama globulínovej povahy na polytetrafluóretylénový (PTFE) povrch kovalentnou chemickou väzbou s ďalším použitím v rádioimunoanalýze (RIA) alebo enzýmoimunoanalýze (EIA).

Dôležitým krokom pri RIA alebo EIA je separácia voľnej a viazanej frakcie stanovovanej látky s jej protilátkou. K tomuto účelu sa využíva väčšinou precipitačných činidiel na bielkovinovú frakciu, akými sú síran amónny a polyetylén glykol. Ďalej sa využíva imunoprecipitácie s druhou protilátkou. Iným separačným postupom je možnosť využitia sorpcie nízkomolekulových látok na aktívnom uhlí potiahnutom dextranom. Tieto postupy sú nevýhodné v tom, že po pridaní separačného činidla je potrebné viazanú a voľnú frakciu oddeliť centrifugáciou, čo značne komplikuje postup a predlžuje jednotlivé stanovenia. Preto sa k separácii stále vo väčšej miere používa tzv. pevnej fázy, t.j. protilátka je pred samotnou imunochemickou reakciou zakotvená na pevnej fáze, väčšinou fyzikálnou adsorpciou. Protilátka môže byť naviazaná napríklad na skúmavke alebo guľke z polypropylénu, polystyrénu a pod. Vlastná separácia je po prebehnutí imunochemickej reakcie veľmi jednoduchá — naviazaná stanovovaná látka na protilátku zostáva na pevnej fáze. Tento postup má výhodu oproti predchádzajúcim vo väčšej rýchlosti vlastnej analýzy, nevýhodou je, že väzba na povrch nie je príliš stabilná a naviazanú VBAL je potrebné chrániť skladovaním pri nízkej teplote (problémy pri transporte), alebo robiť naviazanie tesne pred imunochemickou reakciou. Ďalším možným typom separácie pomocou pevnej fázy je naviazanie VBAL v tlmivom roztoku na jemné suspenzie, napríklad hydroxilovaného dextranu. Táto pevná fáza sa do reakcie pridáva vo forme suspenzie a nevýhodou je zaradenie centrifugácie, respektíve voľnej sedimentácie pevnej fázy do postupu RIA a EIA. Okrem toho chemikálie na prípravu suspenzie sú väčšinou dovozové.

Uvedené nedostatky rieši postup podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že PTFE povrch sa aktivuje v roztoku amoniaku vo vode s koncentráciou 5 — 42 % obj. prídavkom kovového sodíka od 0,01 do 15,00 mol. dm^{-3} pri teplote -40°C až $+25^\circ\text{C}$ s následným premytím destilovanou vodou a vnesením takto aktivovaných povrchov do roztoku 1-etyl-(3,3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidu (EDC) s koncentráciou od 10^{-3} do 30 g. dm^{-3} v destilovanej vode s pH v rozsahu od 4,0 do 6,5, ku ktorému sa pridá VBAL s koncentráciou od 2 do 100 mg. dm^{-3} s následným ponechaním v kľude po dobu 2 až 24 hodín pri teplote v rozmedzí od 2°C do 50°C , vytiahnutím z roztoku, premytím vodným roztokom chloridu sodného s koncen-

tráciou od 0,5 do 15,0 % hmot. osušením pri teplote od 5°C do 45°C .

Použitím postupu podľa vynálezu sa dosahujú nasledovné účinky. Je vytvorená veľmi pevná väzba VBAL na PTFE povrch, tepelne málo labilná, takže sa výrazne predlžuje expirácia tejto pevnej fázy. Protilátka na pevnej fáze je vnášaná do reakčnej zmesi a po prebehnutí imunochemickej reakcie je možné voľnú a viazanú frakciu od seba oddeliť vybratím pevnej fázy z reakčnej zmesi, čo značne zjednodušuje celý postup. Urýchlenie celého postupu pri RIA má za následok, že pracovník, ktorý vlastnú analýzu robí, je kratšiu dobu vystavený rádioaktívnemu žiareniu. Ďalej sa šetria dovozové suroviny.

Príklad 1

Guľky z PTFE boli vnesené do kadičky, v ktorej bol roztok amoniaku vo vode s koncentráciou 11 % obj. Do kadičky sa potom po častiach pridával kovový sodík s výslednou koncentráciou 7,5 mol. dm^{-3} pri teplote -10°C . Po prebehnutí reakcie boli guľky z PTFE premyté destilovanou vodou a vnesené do roztoku EDC vo vode s koncentráciou 10 g. dm^{-3} (destilovaná voda mala $\text{pH} = 5,2$). Do roztoku sa vnesla protilátka proti tyroxínu s koncentráciou gama globulínu 50 mg. dm^{-3} a tam ponechaná v kľude 4 hodiny pri teplote 22°C . Po vytiahnutí boli guľky opláchnuté roztokom chloridu sodného vo vode s koncentráciou 10 % hmot. Guľky boli osušené pri teplote 22°C . Potom boli použité pri RIA a EIA tyroxínu.

Príklad 2

Postupovalo sa ako v príklade 1. Koncentrácia amoniaku bola 42 % obj. a prídavok sodíka 15 mol. dm^{-3} . Pevná fáza bola vnesená do roztoku EDC v destilovanej vode s $\text{pH} = 6,5$, s koncentráciou 30 g. dm^{-3} . Koncentrácia protilátky proti progesterónu bola 100 mg. dm^{-3} a k prepláchnutiu sa použil roztok chloridu sodného vo vode s koncentráciou 15 % hmot. Guľky boli osušené pri teplote 45°C .

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 2. Koncentrácia protilátky proti alfatoxínu B₁ bola 2 mg. dm^{-3} .

Príklad 4

Postupovalo sa ako v príklade 1. Na PTFE povrch bola naviazaná protilátka proti digoxínu s koncentráciou 10 mg. dm^{-3} .

Príklad 5

Postupovalo sa ako v príklade 2. Koncen-

trácia kovového sodíka bola však $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Príklad 6

Postupovalo sa ako v príklade 1. Koncen-

trácia EDC však bola $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vlastná konjugácia prebiehala pri 2°C 24 hodín.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob naväzovania vysokomolekulových biologicky aktívnych látok na polytetrafluóretylénový povrch kovalentnou chemickou väzbou pre následné použitie v rádioimunoanalýze alebo enzýmoimunoanalýze, vyznačený tým, že polytetrafluóretylénový povrch sa aktivuje v roztoku amoniaku vo vode s koncentráciou 5 až 42 % obj. prídavkom kovového sodíka od $0,01$ do $15,00 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pri teplote -40 až $+25^\circ\text{C}$ s následným premytím destilovanou vodou a vnesením takto aktivovaných povrchov do roztoku 1-etyl-

-(3,3-dimetylamínopropyl)karbodiimidu s koncentráciou od 10^{-3} do $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v destilovanej vode s pH v rozsahu od 4,0 do 6,5, ku ktorému sa pridá vysokomolekulová biologicky aktívna látka s koncentráciou od 2 do $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ s následným ponechaním v kľude po dobu 2 až 24 hodín pri teplote v rozmedzí od 2°C do 50°C , vytiahnutím z roztoku, premytím vodným roztokom chlóridu sodného s koncentráciou od 0,5 do 15,0 % hmot. a osušením pri teplote od 5°C do 45°C .