



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 161 185 A3

3(51) G 01 N 33/15

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

---

|      |                       |      |          |      |          |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | WP G 01 N / 226 983 2 | (22) | 14.01.81 | (45) | 02.05.85 |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|

---

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, 1080 Berlin, Unter den Linden 6, PSF 1297, DD

(72) Jantschak, Joachim, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Meisel, Helga, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

---

(54) Verfahren zur fluorografischen Radioaktivitätsbestimmung markierter Makromoleküle und Zellen

---

(57) Die fluorografische Radioaktivitätsbestimmung markierter Makromoleküle und Zellen ist in der medizinischen und veterinärmedizinischen Diagnostik sowie der molekularbiologischen und biochemischen Forschung anwendbar. Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch eine Vorrichtung und ein technisch einfach durchzuführendes fluorografisches Verfahren die Routinediagnostik ökonomischer zu gestalten. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zu entwickeln, die eine quantitative Bestimmung der Radioaktivität von in wäßrigen Suspensionen vorliegenden markierten Makromolekülen, Viren und Zellen mittels Fluorografie zulassen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem eine Vorrichtung, bestehend aus Grundplatte, Membranfilter mit Stützschiicht sowie einer Auftrageschablone mit 25 Bohrungen von einem Rahmen umgeben ist, wobei Auftrageschablone und Grundplatte mittels zweier Bolzen verbunden sind. Die gesamte Vorrichtung sitzt mit der Grundplatte auf einem evakuierbaren Behälter auf. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die markierten Makromoleküle als kreisförmige Flecken auf einem Filterabschnitt fixiert und als Filmschärzung nachgewiesen werden.

#### **Erfindungsanspruch:**

Verfahren zur fluorografischen Radioaktivitätsbestimmung markierter Makromoleküle und Zellen, gekennzeichnet dadurch, daß diese Materialien als kreisförmige Flecken auf einem Filterabschnitt fixiert und ihre Radioaktivität fluorografisch als Filmschwärzung nachgewiesen bzw. quantitativ bestimmt wird.

#### **Titel der Erfindung**

Verfahren zur fluorografischen Radioaktivitätsbestimmung markierter Makromoleküle und Zellen

#### **Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Aktivität von in wäßrigen Lösungen bzw. Suspensionen vorliegenden, mit schwachen  $\beta$ -Strahlern (z. B.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) radioaktiv markierten biologischen (Nukleinsäuren, Proteinen) und anderen Makromolekülen, Viren sowie verschiedensten Zellen und Mikroorganismen.

Das Verfahren ist in der medizinischen und veterinärmedizinischen Diagnostik sowie der molekularbiologischen und biochemischen Forschung einsetzbar.

Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich so z. B. beim Nachweis und der quantitativen Erfassung von Viren mit assoziierten Polymerasen, von Immunkomplexen, von biologischen bzw. enzymatischen Vorgängen, bei denen Makromoleküle synthetisiert, modifiziert oder abgebaut werden.

#### **Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

Zur Bestimmung der Radioaktivität von mit schwachen  $\beta$ -Strahlern markierten Makromolekülen oder Zellen werden diese als unlösliche Präzipitate durch Filtration auf Papier-, Glasfaser- oder Membranfilter fixiert und durch Waschen von nicht eingebauter und daher löslicher Radioaktivität befreit.

Für die Messung der Radioaktivität der Präzipitate sind Flüssigkeitsszintillationszähler mit speziellen Küvetten erforderlich. Diese Geräte sind sehr kompliziert und teuer. Deshalb ist die Anschaffung meist nur größeren Forschungseinrichtungen und Kliniken möglich. Außerdem ist die Meßkapazität begrenzt und die Geräte benötigen eine qualifizierte Wartung. Schließlich fallen radioaktive und brennbare Lösungsmittelabfälle an.

#### **Ziel der Erfindung**

Ziel der Erfindung ist die quantitative Bestimmung der Radioaktivität von in wäßrigen Lösungen oder Suspensionen vorliegenden, mit schwachen  $\beta$ -Strahlern ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  u. a.) markierten Makromolekülen, Viren und verschiedensten Zellen mit Hilfe eines generell anwendbaren und technisch einfach durchführbaren fluorografischen Verfahrens, welches in der Routinediagnostik einsetzbar ist. Damit wird die Auswertung vieler Tests und analytischer Methoden, die auf Radioaktivitätsmessungen basieren, wesentlich vereinfacht und kostengünstiger gestaltet.

#### **Darlegung des Wesens der Erfindung**

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zu entwickeln, das eine quantitative Bestimmung der Radioaktivität von in wäßrigen Lösungen oder Suspensionen vorliegenden, mit schwachen  $\beta$ -Strahlern markierten Makromolekülen, Viren und verschiedensten Zellen mittels Fluorografie zuläßt.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren können derartige Materialien, die als Flecken auf Membranfilterfolien oder Glasfaserfilter fixiert sind, fluorografisch als Filmschwärzung nachgewiesen werden.

Dazu werden die Proben direkt oder deren unlösliche Präzipitate mittels einer geeigneten Filtrationsvorrichtung in Form kleiner, kreisförmiger Flecken auf einem quadratischen Glasfaser- oder Membranfilter fixiert. Der Durchmesser dieser Flecken muß relativ gering sein (etwa 6 mm), um eine örtlich hohe Konzentration der Radioaktivität und damit eine möglichst starke Filmschwärzung und hohe Empfindlichkeit zu erzielen. Wegen des kleinen Fleckendurchmessers ist es weiterhin möglich, sehr viele Proben (25 oder mehr) auf einem Filterabschnitt gleichzeitig auszuwerten. Nach dem Fixieren der Proben wird der Filter mit einer geeigneten Szintillatorsubstanz imprägniert.

Der fluorografische Nachweis der Radioaktivität erfolgt in modifizierter Form zu der in der Literatur beschriebenen Auswertung von Acrylamid-Elektrophoresegelen und dünnenschichtchromatografischen Platten.

Durch visuellen Vergleich mit einer Standardreihe (Schwärzungsskala) ist eine halbquantitative Auswertung der Filmschwärzung möglich, die für die meisten Zwecke der Routinediagnostik ausreicht. Eine quantitative Bestimmung kann mit einem Densitometer durchgeführt werden. Das fluorografische Verfahren ist sehr empfindlich, relativ einfach und erfordert im Gegensatz zur Flüssigkeitsszintillationszählung weder kostspielige Geräte noch speziell ausgebildetes Personal und Serviceleistungen.

#### **Ausführungsbeispiel**

Das Verfahren wird nachfolgend am Beispiel der Bestimmung von Viren mit assoziierten Polymerasen (z. B. bovines Leukämievirus (BLV), Hepatitis B-Virus (HBV)) erläutert. Zur radioaktiven Markierung werden die Viren mit einer der üblichen Methoden angereichert (z. B. Ultrazentrifugation oder Polyethylen-Glykolfällung), die Polymerasereaktion unter Zusatz eines  $^3\text{H}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten Nukleosidtriphosphates in 100  $\mu\text{l}$  Testansätzen durchgeführt und die Reaktionsprodukte mit 100  $\mu\text{l}$  eiskalter 10%iger Trichloressigsäure ausgefällt.

Erfindungsgemäß werden dann 25 Testansätze zu je 200  $\mu\text{l}$  mittels einer geeigneten Filtrationsvorrichtung auf einem 60  $\times$  60 mm Cellulosenitrat-Membranfilter abgesaugt.

Der Filter wird zur Entfernung löslicher radioaktiver Produkte etwa 10mal mit kalter 5%iger Trichloressigsäure gewaschen, aus der Apparatur entnommen und kann nach Trocknen bei etwa 60°C fluorografisch ausgewertet werden. Der Membranfilter wird dazu mit der Lösung einer Szintillatorsubstanz (z. B. 2,5 Diphenyloxazol, PPO; 10 g in 20 ml Toluol) getränkt, getrocknet und zur besseren Handhabung auf Karton befestigt. 60 mm breite Röntgenfilmstreifen (HS 11; ORWO Wolfen) werden in Röntgenfilmkassetten mit den so behandelten Filtern, je nach der aufgetragenen Aktivität, zwischen 6 Stunden und 5 Tagen bei -78°C (Trockeneis) exponiert.

Eine Exposition bei -30°C (Tiefkühlschrank) ist auch möglich, erfordert aber längere Expositionszeiten.

Der Film wird mit Röntgenentwickler (TR 30 + TS 30; ORWO Wolfen) unter üblichen Bedingungen entwickelt. Bei einer Exposition von 120 Std. bei -78°C liegt die Nachweisgrenze bei etwa 1,7 Bq (100 dpm)  $^3\text{H}$  bzw. 0,17 Bq (10 dpm)  $^{14}\text{C}$ . Zur Anfertigung der Standardreihe (Schwärzungsskala) werden  $^3\text{H}$ -DNA-Verdünnungen in logarithmischen Stufen im Bereich von 1,7 bis 3400 Bq (100 bis  $10^5$  dpm) verwendet.