



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

237620

(11)

(B3)

(61) Autorské osvědčení je závislé na
AO č. 225 971

(22) Přihlášeno 07 06 83

(21) PV 4099-83

(40) Zveřejněno 16 01 85

(45) Vydáno 16 02 87

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 3/18

(75)

Autor vynálezu

POMMERENING KLAUS dr. dipl. chem., JOBSKY DIETER, BERLIN (NDR), BENEŠ
MILAN ing. CSc., ŠTAMBERG JIŘÍ ing. CSc., PRAHA (ČSSR)

(54) Použití modrého afinantního celulóзовého sorbentu

Vynález se týká způsobu použití modrého afinantního celulóзовého sorbentu k separaci a izolaci sérového albuminu ze séra.

Podstata vynálezu spočívá v použití modrého afinantního celulóзовého sorbentu připraveného podle čs. autorského osvědčení č. 225 971 pro separaci a izolaci sérového albuminu ze séra afinitní chromatografií.

Použití modrého celulóзовého nosiče na bázi makroporézní sférické celulózy nebo jejich hydroxyalkylderivatů s kovalentně vázanou reaktivní modří 2 (color index 61211) vede k téměř 90% separaci a 75 až 90% izolaci albuminu obsaženého v séru.

Vynález se týká použití modrého afinantního celulóзовého sorbentu k separaci a izolaci sérového albuminu ze séra.

Separace a izolace albuminu ze séra afinitní chromatografií pomocí modrého afinantního sorbentu se používá jak pro analytické tak pro preparativní účely v chemii, biochemii a medicíně.

Sérum obsahuje směs téměř 100 proteinů různé struktury a s různou funkcí, přičemž albumin je s podílem zhruba 50% hmotnostních dominantní složkou.

Pro izolaci albuminu bylo vyvinuto více postupů, které jsou založeny na selektivním srážení nebo chromatografických děleních, a často probíhají v mnoha reakčních krocích. Dnes není důležité jen získání albuminu v preparativním měřítku. Význam má právě tak jednoduché, specifické a téměř kvantitativní odstranění albuminu ze séra především pro medicínsko-dia-
gnostické účely nebo při získání speciálních sérových proteinů, například α -fetoproteinu.

Pro obě oblasti použití byly v posledních letech vyvinuty postupy na základě afinitní chromatografie, které využívají adsorpci albuminu modrým barvivem označovaným jako reaktivní modř 2 (color index 61 211) (obchodní názvy Cibacronová modř F3G-A; Ostazinová modř H-3G) navázaným na polysacharidovém nosiči.

Pokusy, nahradit tyto nosiče celulózou, která je ve srovnání s ostatními polysacharidovými nosiči ekonomicky výhodnější byly dosud neúspěšné. Ve srovnání agarózovými nosiči byla vazba albuminu na odpovídajícím celulóзовém sorbentu 10x menší (S. Angal, P.D.G. Dean: Biochem. J. 167, 301, (1977) nebo nebyla zjištěna vazba žádná (G. Birkenmeyer, Dizertace, Lipsko 1981).

Dosavadní nedostatky odstraňuje způsob separace a izolace sérového albuminu ze séra podle vynálezu, který spočívá v použití modrého celulóзовého sorbentu připraveného podle čs. autorského osvědčení č. 225 971 k separaci a izolaci sérového albuminu ze séra afinitní chromatografií.

Vazba albuminu na reaktivní barvivo navázané na nosiči při kontaktu se sérem je specifická, vazebná kapacita je vyšší než 10 mg albuminu na ml nosiče. Eluce pak probíhá o sobě známým způsobem.

Adsorpce ze séra nebo zředěného séra se provádí při pH 5 až 9, přednostně při pH 8, při teplotě od 1 do 40 °C kolonovým nebo vsádkovým způsobem. Sérové proteiny, které se nesorbují, se vymývají adsorpčním pufrům.

Desorpce albuminu se provádí působením pufrů, které obsahují 1 až 2 M chlorid sodný (NaCl) nebo 0,2 až 1 M tiokyanatan draselný (KSCN).

Výhodou způsobu podle vynálezu je, že nosič se může použít opakovaně bez pozorovatelného zhoršení vazební kapacity.

Použití nosiče na bázi makroporézní sférické celulózy nebo jejich hydroxyalkylderivátů s kovalentně vázanou reaktivní modří 2 (color index 612 11) vede k téměř 90% separaci a 75 až 90% izolaci albuminu obsaženého v séru.

Ve srovnání s ostatními polysacharidovými nosiči je modrý celulóзовý nosič na bázi makroporézní sférické celulózy efektivnější a ekonomicky výhodnější.

Vynikající mechanické a adsorpční vlastnosti nosiče dovolují jeho použití ve velkém měřítku.

Způsob je objasněn na několika případech, které však vynález nijak neomezuji.

Příklad 1

10 ml makroporézní sférické modré celulózy (2,9 až 7,3 μ mol reaktivní modři 2 - color index 61 211 (Cibacronová modř/g mokrého nosiče) se ekvilibruje v koloně o průměru 1,3 cm pufrém 0,05 M Tris (HCl) 0,5 M NaCl pH 8, při teplotě místnosti a pak se na kolonu nanese 2 ml lidského sérového albuminu (40 mg/ml pufru). Eluuje se 25 až 30 ml pufru. Zachytí se 88 až 94 % albuminu. Desorpce se provádí pufrém 0,05 M Tris (HCl) pH 8, který obsahuje 0,2 až 1 M KSCN (výťažek 75 až 90 %).

Příklad 2

10 ml makroporézní sférické modré celulózy (2,9 až 7,3 μ mol barviva/g mokrého nosiče) se ekvilibruje pufrém 0,05 M Tris (HCl) 0,5 M NaCl pH 8 a nanese 2 ml séra buď přímo nebo zředěného ekvilibračním pufrém (1 : 5 až 1 : 10). Adsorpce albuminu probíhá v kolonovém nebo vsádkovém uspořádání (1 až 5 hodin) při teplotě místnosti. Neadsorbované sérové proteiny (30 až 45 % celkového obsahu proteinů) se eluují ekvilibračním pufrém. Zachytí se 93 až 96 % albuminu. Eluce adsorbovaného albuminu probíhá jak je popsáno v příkladu 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Použití modrého afinantního celulóзовého sorbentu připraveného podle čs. autorského osvědčení č. 225 971 pro separaci a izolaci sérového albuminu ze séra afinitní chromatografií.