



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224 226

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 02 06 82  
(21) PV 4080-82

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> G 01 N 31/06

(40) Zveřejněno 25 03 83  
(45) Vydáno 01 09 84

(75)

Autor vynálezu

RAUCH PAVEL ing. CSc., PRAHA  
MAREK MIROSLAV ing. CSc., DĚČÍN  
BEDNÁŘ BOHUMIL ing. CSc., PRAHA  
DEVÁTÝ JAN ing., Železnice

VODRÁŽKA ZDENĚK doc. ing. DrSc., PRAHA  
KRÁLÍČEK JAROSLAV prof. ing. DrSc.,  
PRAHA

(54)

Způsob separace volného a vázaného ligandu v saturační analýze

Vynález se týká způsobu separace volného a vázaného ligandu při saturační analýze.

Saturační analýza je analytický postup, který využívá principu specifické vazby různých látek, například hormonů, vitamínů, steroidů, enzymů, alkaloidů, pesticidů, mikroorganismů a antigenů na určitou, pro tyto látky specifickou bílkovinu. Stanovení je založeno na soutěžení ligandů, což je stanovovaná látka, přítomná ve vzorku a tatáž přidaná látka značená například radio-nuklidem nebo fluorescenčním činidlem, ve vazbě na ligát, což je specifická látka, například bílkovina. Podle uspořádání analytického postupu mohou být ligandem nebo ligatem bílkoviny, peptidy, hormony, vitaminy, steroidy, alkaloidy, pesticidy, toxiny, mikroorganismy, ale i nízkomolekulární látky, například hapteny.

Po separaci navázaného ligandu od nenavázaného se dá změřením radioaktivity, fluorescence či jiné veličiny přímo určit koncentrace stanovované látky ve vzorku. Metoda saturační analýzy je vysoce specifická a látky lze stanovit v koncentracích řádů nmolů až fmolů.

K separaci volného a vázaného ligandu je používána celá řada metod, např. adsorpce volného ligandu na vhodný adsorbent /aktivní uhlí, silikagel aj./, vysrážení ligátu s navázaným ligandem organickými rozpouštědly, anorganickými solemi apod. Jelikož je vazba ligát - ligand reversibilní povahy je u těchto metod nebezpečí porušení rovnováhy volný - vázaný ligand.

Značného zjednodušení separace volného a vázaného ligandu je možno dosáhnout tím, že se ligát imobilisuje na nosič. Nej-

jednodušší formou imobilisace je adsorpce na stěny reakční nádoby. Vazebná bílkovina se nejčastěji adsorbuje na polystyrenové zkumavky nebo na mikrotitrační destičky z téhož materiálu. Adsorpční síly, které drží vazebnou bílkovinu na povrchu nosiče, jsou však poměrně slabé a imobilisace je proto mnohdy nedostatečná. Rovněž nízký titr vazebné bílkoviny může ještě dále zhoršit výsledný efekt. Z uvedených důvodů se vazebná bílkovina někdy zesiluje na povrchu nosiče různými bifunkčními činidly anebo ještě častěji se imobilisuje kovalentní vazbou přímo na aktivovaný nosič.

K imobilisaci vazebných bílkovin kovalentní vazbou byla použita řada materiálů, jako např. celulóza aktivovaná bromkyanem, sklo aktivované  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilanem nebo hydroxysukcinimidem, polymerů obsahujících aktivní isothiokyanátové skupiny, částic vytvořených polymerací polystyrenového latexu s glycidylmethakrylátem a styrenem, částic vytvořených polymerací celulosy, akroleinů a oxidů železa apod.

Způsob separace volného a vázaného ligandu podle vynálezu spočívá v tom, že se vhodný nosný materiál, s výhodou skleněná tyčinka, hliníková fólie, polyethylenová fólie, polystyrenová zkumavka apod. potáhne tenkou vrstvou polymeru, nebo kopolymeru obsahující vhodné reaktivní skupiny, s výhodou oxiranové skupiny, aldehydové skupiny, aminové skupiny, karboxylové skupiny, hydroxylové skupiny, sulfhydrové skupiny nebo epithioskupiny. Nosič se zasune do roztoku se stanovovanou látkou a po vytvoření reakční rovnováhy se vysune z roztoku. Jako polymer se s výhodou používá poly/2,3-epoxypropylmethakrylát/ nebo poly/2,3-epoxypropylakrylát/, resp. jejich kopolymery například se styrenem nebo estery kyseliny methakrylové, resp. akrylové, kde alkoholová část esteru tvoří methylová skupina, ethylová skupina, propylová skupina, isopropylová skupina, butylová skupina, terc. butylová skupina a cyklohexylová skupina. Potažení nosného materiálu uvedenými polymery je dostatečně stálé, aby umožnilo buď přímou vazbu vazebné bílkoviny, případně aktivaci povrchu naneseného polymeru převedením epoxyskupin na aminové skupiny, sulfhydrové skupiny, karboxylové skupiny či jiné skupiny vhodné k imobilisaci ligatu na nosič. S výhodou je možno hydrolysovat epoxyskupiny

naneseného polymeru a získaný vicinální diol jodistanovou oxidací převést na aldehydové skupiny pro vlastní vazbu ligatu.

Oproti dosud používaným postupům imobilisace ligatu skýtá způsob podle vynálezu tyto výhody. Zjednodušuje separaci volný - vázaný ligand na prosté vyjmutí nosiče z inkubačního roztoku, čímž se navíc vylučuje porušení rovnováhy volný - vázaný ligand, ke kterému může dojít při použití jiných technik. Umožňuje pracovat i s vazebnou bílkovinou nízkého titru, kdy při imobilisaci kovalentní vazbou je dosaženo jejího efektivnějšího navázání a využití. Vedle experimentálního zjednodušení imobilisace kovalentní vazbou je při způsobu podle vynálezu odstraněna práce s výrazně toxickými látkami zvláště v případě přímé vazby ligatu na nanesený polymer.

Vynález je dokumentován příklady:

#### Příklad 1

Poly/2,3-epoxypropylmethakrylát/ připravený radikálově iniciovanou polymerací /iniciátor 2,2-azobisisobutyronitril/, 2,3-epoxypropylmethakrylátu v 1,4-dioxanu při teplotě 60°C, byl nanesen ve formě 5%ního roztoku na hliníkovou fólii 10x4 mm. Po usušení při teplotě 20°C za tlaku 101 kPa byl nanesený polymer aktivován hydrolysou pomocí 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po dobu 3 h při 60°C a poté perjodátovou oxidací 0,5 M NaIO<sub>4</sub> po dobu 1 h při 20°C. Po promytí hliníkových destiček s aktivovaným polymerem bylo přidáno antiserum proti papainu. Po 18 h při 4°C byly destičky promyty 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7,4 a použity ke stanovení papainu. Papain byl stanovitelný v rozmezí 20 až 2000 ng/100 ul.

#### Příklad 2

Na polyethylenovou fólii 10x4 mm byl nanesen kopolymer 2,3-epoxypropylmethakrylátu /EPM/ se styrenem s obsahem 50 % EPM, připravený radikálově iniciovanou kopolymerací EPM se styrenem /iniciátor 2,2-azobisisobutyronitril/, shodným postupem jako v příkladu 1 ve formě 10%ního roztoku v o-dichlorbenzenu. Nanesený kopolymer byl aktivován zahříváním s ethylendiaminem při 60°C po dobu 15 h a po promytí vodou reakcí s 5%ním roztokem

224 228

glutaraldehydu po dobu 2 h při 37°C. K foliím s aktivovaným kopolymerem bylo přidáno antiserum proti papainu. Po 15 h při 4°C byly folie dokonale promyty shodným pufrům a použity ke stanovení papainu. Papain byl stanovitelný v rozmezí 20 až 2000 ng/100 ul.

#### Příklad 3

Na skleněné tyčinky délky 10 mm a průměru 3 mm byl nanesen shodným způsobem jako v příkladu 1 poly/2,3-epoxypropylakrylát/ připravený radikálově iniciovanou polymerací 2,3-epoxypropylakrylátu. Po usušení polymeru při 60°C a tlaku 101 kPa byla zvýšena adheze k nosiči včetně prosíťování naneseného polymeru záhřevem na 180°C. K nosiči s naneseným polymerem bylo přidáno antiserum proti papainu. Po 1 h zahřívání na 37°C a následujícím promytí 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,4 byla takto imobilizovaná protilátka použita ke stanovení papainu. Papain byl stanovitelný v rozmezí 20 až 2000 ng/100 ul.

#### Příklad 4

Poly/2,3-epoxypropylakrylát-co-styren/ připravený radikálově iniciovanou kopolymerací při 60°C 2,3-epoxypropylakrylátu se styrenem s obsahem 50% styrenu /iniciátor 2,2'-azobisisobutyronitril/ byl nanesen ve formě 2%ního roztoku v octanu ethylnatém na vnitřní plochu polystyrenových zkumavek. Nanesená vrstva kopolymeru byla usušena při 20°C za postupně se snižujícího tlaku s konečnou hodnotou 0,1 kPa. Do zkumavek s nanesenou vrstvou kopolymeru bylo pipetováno 0,5 ml antisera proti papainu. Po 18 h při 4°C byla zkumavka promyta důkladně střídavě 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,4 a 1 M NaCl v tomtéž pufru. Papain byl stanovitelný v rozmezí 20 až 2000 ng/100 ul.

#### Příklad 5

Na polyethylenovou fólii 10x4 mm byl nanesen kopolymer 2,3-epoxypropylmethakrylátu /EPM/ s methylmethakrylátem s obsahem 70 % EPM, připravený radikálově iniciovanou kopolymerací EPM s methylmethakrylátem /iniciátor 2,2'-azobisisobutyronitril/, shodným postupem jako v příkladu 1 ve formě 10%ního roztoku methyl-ethylketonu. K fóliím s naneseným kopolymerem bylo přidáno antiserum proti thyroxinu. Po 18 h třepání při 4°C a promytí 0,1 M

fosfátovým pufrům pH 7,4 byl stanoven tyroxin v rozmezí 20 až 240 pmolů/ml.

#### Příklad 6

Na polystyrenové destičky o rozměrech 10x4x1 mm byl nanesen kopolymer 2,3-epoxypropylakrylátu /EPA/ s ethylakrylátem /EA/ s obsahem 80 % EPA, připravený radikálově iniciovanou kopolymerací EPA s EA /iniciátor 2,2'-azobisisobutyronitril/ shodným způsobem jako v příkladu 4. Po přidání vazebných bílkovin pro kyselinu listovou a vitamin B 12 v 0,1 M lysinovém pufru pH 10, 1 h stání při 37°C a následujícím promytí shodným pufrům byl stanoven obsah kyseliny listové v rozmezí 0,5 až 20 ng/ml a vitamin B 12 0,05 až 1,50 ng/ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

224 228

1. Způsob separace volného a vázaného ligandu v saturační analýse, při stanovení biologicky účinných látek soutěžením ligandů stanovované látky a téže značené látky, například radionuklidem nebo fluorescenčním činidlem, ve vazbě na ligát, například specifickou vazebnou bílkovinu, vyznačující se tím, že ligát se kovalentní vazbou imobilisuje na nosič potažený vrstvou polymeru nebo kopolymeru obsahujícího chemicky modifikovatelné reaktivní skupiny, s výhodou oxiranové skupiny, aldehydové skupiny, aminoskupiny, karboxylové skupiny, hydroxylové skupiny, sulfhydrylské skupiny a epithioskupiny, který se zasune do roztoku se stanovovanou látkou a po vytvoření reakční rovnováhy se vysune z roztoku.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako polymer je použito poly/2,3-epoxypropylakrylát/ s hodnotami molárních hmotností  $5 \cdot 10^4$  až  $1 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako polymer se použije kopolymer /2,3-epoxypropylakrylát/ se styrenem o obsahu styrenu 5 až 95 % mol. o molární hmotnosti  $5 \cdot 10^4$  až  $1 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako polymer se použije poly/2,3-epoxypropylmethakrylát/ s hodnotami molárních hmotností  $5 \cdot 10^4$  až  $1 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.
5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako nanášený polymer se použije kopolymer /2,3-epoxypropylmethakrylát/ se styrenem o obsahu styrenu 5 až 95 % mol. a molární hmotnosti  $5 \cdot 10^4$  až  $1 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.
6. Způsob podle bodů 1 až 5, vyznačující se tím, že se polymery termicky zesítují po nanesení na nosič například na skleněnou tyčinku, hliníkovou nebo polyethylenovou fólii nebo polystyrenovou zkumavku.

7. Způsob podle bodů 1 až 6, vyznačující se tím, že se imobilisace ligátu provede přímou reakcí s epoxydovými skupinami naneseného polymeru.
8. Způsob podle bodů 1 až 6, vyznačující se tím, že se imobilisace ligátu provede po předchozím převedení epoxyskupin naneseného polymeru na aminoskupiny, popřípadě aldehydové skupiny.