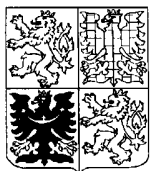


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19755960**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**  
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/07861**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/31219**

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 2261**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 12 N 1/06**

**C 12 M 1/33**

**C 12 M 3/08**

(71) Přihlašovatel:

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH  
& CO. KG, Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Müllner Stefan, Hochheim, DE;  
Neumann Thomas, Frankfurt am Main, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob rozkladu biologického materiálu**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu rozkladu biologického materiálu, při kterém se biologický materiál v pevném stavu rozkládá za přítomnosti pevné denaturující látky.

**CZ 2000 - 2261 A3**

16.05.00

PV 2000 - 261

44479

## Způsob rozkladu biologického materiálu

### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu rozkladu biologického materiálu, při kterém se biologický materiál v pevném stavu rozkládá za přítomnosti pevné denaturující látky.

### Dosavadní stav techniky

Pro získávání proteinů, nukleových kyselin, mastných kyselin a jiných látek obsažených v buňkách, se musí buňky rozložit. Nyní byly objeveny různé metody, popřípadě přístroje pro rozklad buněk, neboť se buňky různých organismů chovají různě a zčásti jsou pouze těžko rozložitelné. Také kvalita rozkladu je mezi jednotlivými organismy, popřípadě buňkami, velmi různá. Obzvláště problematické je při rozkladu buněk současné uvolňování odbourávajících enzymů, jako jsou nukleázy, proteázy, lipázy nebo glukosidázy. Aby se takovéto aktivity potlačily, přidávají se do vsázek obvykle speciální inhibitory.

Obvykle se buňky rozkládají v suspensi ultrazvukem, lisem French, vysokotlakým homogenisátorem nebo X-lisem. Pro získání proteinů se při tom všeobecně přidávají inhibitory proteáz, jako je například PMSF, EDTA nebo leupeptin. Nevýhodou těchto metod je však to, že aktivita proteáz nemůže být vždy dostatečně potlačena.

Pevný buněčný materiál může být také rozmělněn v mož-

díři za chlazení kapalným dusíkem nebo ve vibračním mlýnu (viz například Hess B. a Brand K. (1983) Cell and Tissue Disintegration. General Aspects. In Methods Enzym. Anal., Third Ed., Eds. Bermeyer, H.U. VCI, Weinheim, FRG, Vol. 2, 36 - 30). Nevýhodou této metody je však to, že výtěžky proteinů jsou ve srovnání s jinými metodami relativně nízké.

Pro získávání nukleových kyselin se všeobecně buňky rozkládají hydrolysou buněčných stěn pomocí lysozymu za přítomnosti SDS. Proteiny se všeobecně hydrolysuje proteinázou K. Nevýhodou této metody však je to, že z buněk, které jsou resistantní vůči lysozymu, je možno pouze těžko získat nukleové kyseliny.

Úkolem předloženého vynálezu tedy je nalezení způsobu, který by byl široce použitelný a který by umožnil získání látek, obsažených v buňkách, ve vysokých výtěžcích.

#### Podstata vynálezu

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že je možno biologický materiál v pevném stavu a za přítomnosti pevné denaturující látky lehce rozložit bez toho, že by se aktivovaly odbourávající enzymy.

Předmětem předloženého vynálezu tedy je způsob rozkladu biologického materiálu, při kterém se biologický materiál rozkládá v pevném stavu a za přítomnosti pevné denaturující látky.

Při výhodné formě provedení se jedná u pevné denatu-

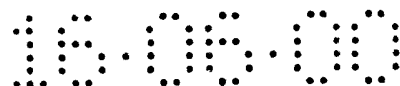
rující látky o krystalickou látku, obzvláště o krystalickou organickou látku. Jako příklady obzvláště výhodných látek je možno uvést močovinu, thiomčovinu, guanidiniumhydrochlorid, guanidiniumthiokyanát nebo síran amonný. Je také možné provádět rozklad za přítomnosti různých denaturujících látek.

Všeobecně se denaturující látka přidává v asi jednonásobném až asi dvacetinásobném (w/w) přebytku, výhodně v asi jednonásobném až asi desetinasobném (w/w) přebytku a především v jednonásobném přebytku. Dále je výhodné, když je biologický materiál hluboce zmražený a když výhodně během způsobu rozkladu podle předloženého vynálezu zůstává hluboce zmražený. K tomu je obzvláště vhodný například kapalný dusík.

Všeobecně se biologický materiál rozloží rozemletím, výhodně za přítomnosti mlecích koulí.

Jako biologický materiál je vhodný jakýkoliv biologický materiál, jako jsou například zvířecí, popřípadě lidské, nebo rostlinné buňky, buněčné struktury, tkáně nebo zvířecí, popřípadě lidský nebo rostlinný materiál. Vhodné jsou také mikroorganismy, jako jsou houby, bakterie, kvasinky, protozoa nebo řasy. Jako další vhodné příklady je možno uvést *E. coli*, streptomycey, *acremonium*, tetrahymena, euglena, kukuřici, pšenici, svalovou tkáň nebo actinoplanely.

Pro následující izolaci látek obsažených v buňkách, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny (DNA, RNA), mastné kyseliny, uhlohydráty a podobně, po rozkladu, se rozložený biologický materiál rozpustí ve vhodném pufru. K tomu se



mohou použít pufry, běžné pro odpovídající druhy buněk. konečná koncentrace močoviny je při tom všeobecně asi 1 až asi 10 M , výhodně asi 1 až asi 5 M a obzvláště asi 4 M. Před tím, než se požadované látky obsažené v buňkách izolují pomocí odborníkům známých způsobů, je výhodné zlomky buněk a jiné pevné součásti odstranit, například odstředěním.

V následujícím je způsob podle předloženého vynálezu příkladně popsán.

Obvykle se odpovídající organismus, popřípadě mikroorganismus, vyskytuje ve standardních mediích, pro odborníky známých. Potom se mohou buňky oddělit například pomocí odstředění. Obvykle se potom promyjí a mohou se pro skladování zmrazit. Rostliny se mohou udržovat na standardních půdách na světle nebo ve tmě. Rostlinný materiál se získává například odříznutím listů, stonků nebo kořenů, které se obvykle ihned šokově zmrazí, například v kapalném dusíku. Materiál se může nakonec mechanicky rozmělnit rozetřením v dusíkem vychlazeném moždíři.

Hluboce zmrazené pelety buněk, popřípadě rozmělněný materiál, se potom dají do například z teflonu sestávající třepačkové nádoby a chladí se například kapalným dusíkem. K peletám se přidá například močovina ve výše uvedeném poměru. Výhodně se potom přidá mlecí koule a vsázka se například třepe v laboratorním vibračním mlýnu, například Dismembratoru U firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD. Obvykle se pelety za přítomnosti močoviny rozemelou třepáním při například 2600 otáčkách za minutu pomalu na prášek. Výhodně se vsázka chladí kapalným dusíkem a postup se tak dlouho opakuje, dokud se nezíská jemný prášek. Po rozkladu se pro izolaci látek, obsažených v buňkách, získaný prášek

rozpustí ve vhodném pufru až do uvedené konečné koncentrace. Zlomky buněk a ostatní pevné součásti se výhodně odstraní odstředěním. Supernatant obsahuje požadované látky, obsažené v buňkách.

Podstatná výhoda způsobu podle předloženého vynálezu spočívá v tom, že látky obsažené v buňkách, jako jsou například proteiny, ale také olej z řas, je možno získat ve vysokých výtěžcích a jednoduchým postupem především z buněk, které jsou pouze těžko rozložitelné. Obzvláště je možno výhodným způsobem získat vysokomolekulární (> 20 kb) DNA například z Actinoplanes, které jsou normálně například pomocí lysozymu pouze těžko rozložitelné. DNA, získaná podle předloženého vynálezu je proto obzvláště dobře vhodná pro izolaci velkých fragmentů DNA. Všeobecně není také při způsobu podle předloženého vynálezu nutná optimalisace podmínek pěstování mikroorganismů.

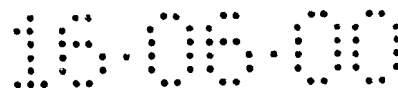
Následující příklady provedení slouží k bližšímu popisu předloženého vynálezu, aniž by byl tento na ně nějak omezen.

#### Příklady provedení vynálezu

##### P ř í k l a d 1

##### Rozklad E. coli

E. coli se pěstuje ve 100 ml LB media (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l kvasničný extrakt (Difco, Detroit, Michigan, USA) a 5 g/l chlorid sodný) v třepacích baňkách při teplotě 37 °C až do OD 600 nm = 15 . Buňky se získají



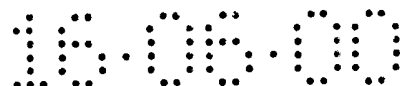
odstředěním při 4000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut při teplotě 4 °C . Peleta se dvakrát promyje v 1 M roztoku chloridu draselného. Potom se získaná peleta zmrazí v kapalném dusíku. 2 g zmrazené pelety se potom se 2 g močoviny převedou do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje. Výtěžek proteinu činí 4 mg/g prášku (v prášku obsaženo 50 % močoviny).

Aby se isoloval protein, rozpustí se 2 g prášku ve 2 ml 10 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA a 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5. Potom se DNA štěpí přidávkem 10 jednotek benzonázy, popřípadě 10 µl roztoku Dnázy/Rnázy (10 mg/ml DNázyI, 4 mg/ml RNázyA v 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) při teplotě místnosti po dobu 30 až 60 minut, načež se odstřeďuje při 14000 otáčkách za minutu. Proteiny se nacházejí v supernatantu a mohou se použít pro další experimenty.

## P ř í k l a d 2

### Rozklad *Streptomyces griseus*

*Streptomyces griseus* se pěstuje v 50 ml TSB (30 g/l Tryptic Soy Broth) v jednolitrové speciální baňce (firma Schott, Regensburg, BRD) po dobu 2 dnů při teplotě 29 °C a při 240 otáčkách za minutu. Mycel se oddělí odstředěním při 5000 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Potom se peleta promyje 1 M roztokem chloridu draselného. 2 g pelety se převedou se 2 g močoviny do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí



koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje. Výtěžek proteinu činí 5 mg/g prášku (v prášku obsaženo 50 % močoviny).

#### P ř í k l a d 3

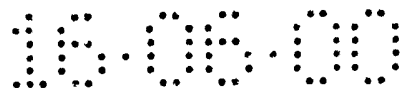
##### Rozklad *Acremonium chrysogenum*

*Acremonium chrysogenum* se pěstuje v minimálním mediu (30 g/l glukosy, 3 g/l dusičnanu sodného, 1 g/l hydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l síranu hořečnatého, 0,5 g/l chloridu draselného a 0,01 g/l síranu železnatého) při teplotě 25 °C a 220 otáčkách za minutu po dobu 3 dnů. Buňky se oddělí odstředěním při 5000 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Potom se peleta promyje 1 M roztokem chloridu draselného. 2 g pelety se převedou se 2 g močoviny do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje. Výtěžek proteinu činí 4,5 mg/g prášku (v prášku obsaženo 50 % močoviny).

#### P ř í k l a d 4

##### Rozklad *Tetrahymena thermophiles*

*Tetrahymena thermophiles* se pěstuje v PPYS mediu (10 g/l Protease-Pepton Nr. 3, 1 g/l kvasničný extrakt (Difco,



Detroid, Michigan, USA) a 1 ml/l stopových prvků (10 g/l citranu sodného, 23,4 g/lk chloridu železnatého)) při teplotě 25 °C při 80 otáčkách za minutu po dobu 2 dnů. Buňky se oddělí odstředěním při 2000 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C . Potom se peleta hluboce zmrazí v kapalném dusíku. 2 g pelety se převedou se 2 g močoviny do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje.

#### P ř í k l a d 5

Rozklad *Euglena gracilis*, *Tetraselmis specialis*, *T. chui* a *T. coneoluate*

*Euglena gracilis* se pěstuje v mediu 9 (1 g/l octanu sodného, 1 g/l masového extraktu, 2 g/l Bacto Tryptonu, 2 g/l kvasničného extraktu, 0,02 g/l dusičnanu draselného, 0,002 g/l fosforečnanu amonného, 0,001 g/l síranu hořečnatého a 0,04 g/l chloridu vápenatého) a 30 ml půdního extraktu (300 g/l zahradní půdy, která se vaří po dobu 10 minut, potom se po odsazení přefiltruje a hodnota pH se nastaví pomocí 10% roztoku uhličitanu sodného na 7,5).

*Tetraselmis specialis*, *T. chui* nebo *T. coneoluate* se pěstuje v mediu 460 s poloviční salinitou (0,3 g/l glukosy, 0,01 g/l kvasničného extraktu (Difco, Detroid, Michigan, USA), 11,74 g/l chloridu sodného, 5,315 g/l chloridu hořečnatého, 1,96 g síranu sodného, 0,555 g/l chloridu vápenatého, 0,33 g/l chloridu draselného, 0,095 g/l hydrogenuhličitanu sodného, 0,05 g/l bromidu draselného, 0,015 g/l

kyseliny borité, 0,02 g/l chloridu strontnatého, 0,005 g/l chloridu železitého, 0,025 g/l síranu amonného, 0,005 g/l hydrogenfosforečnanu draselného, 0,15 g/l natriumglycerolfosfátu, 3 g/l Tris-pufru a 1,5 g/l kyseliny glutaminové), jakož i 3 ml roztoku kovů (1 g EDTA, 0,05 g/l chloridu železitého, 0,15 g/l chloridu manganatého, 0,01 g/l chloridu zinečnatého, 0,005 g/l chloridu kobaltnatého a 1 g/l kyseliny borité, hodnota pH nastavena pomocí hydroxidu sodného na 6,5) a 1 ml roztoku vitaminů (0,003 g/l biotinu a 1 g/l thiaminu) ve 100 ml v baňce o objemu 500 ml po dobu 7 dnů při teplotě 25 °C a při 100 otáčkách za minutu. Buňky se oddělí odstředěním při 2000 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Potom se 0,5 g vlhké biomasy smísí s 0,5 g močoviny a převede se do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje.

Pro získání oleje se k prášku přidají 4 ml LM-směsi (toluen/ethylalkohol v poměru 1 : 1) a inkubuje se za míchání po dobu 90 minut při teplotě 40 °C . Potom se odstřeďuje při 5000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut a odebere se horní organická fáze. Potom se znovu ke zbytku přidají 4 ml LM-směsi, protřepe se a odstřeďuje se při 5000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut. Horní fáze se znovu odebere a smísí se s první organickou fází. Potom se spojené organické fáze zahustí v rotační odparce. V baňce se nyní nachází čisý olej z řas.

## P ř í k l a d 6

### Rozklad kukuřice

Semena kukuřice (*Zea mays* cv. Felix) se nasejí do vermiculit-půdy a pěstují se při teplotě 30 °C po dobu 6 dnů na světle nebo ve tmě (střídavě). Půda se udržuje stále vlhká. Nadzemní části rostlin se nůžkami oddělí a ihned se zchladí v kapalném dusíku. Potom se rostlinný materiál pomocí skalpelu rozdělí na malé kousky nebo se rozemele za chlazení dusíkem. Rostlinný materiál se může ale také použít nerozmělněný. Potom se 2 g rostlinného materiálu smísí se 2 g močoviny a převedou se do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje. Výtěžek proteinu činí 7,5 mg/g prášku (v prášku obsaženo 50 % močoviny).

## P ř í k l a d 7

### Rozklad pšenice

Semena pšenice (*Triticum aestivum*) se nasejí do vermiculit-půdy a pěstují se při teplotě 30 °C po dobu 6 dnů na světle nebo ve tmě (střídavě). Půda se udržuje stále vlhká. Nadzemní části rostlin se nůžkami oddělí a ihned se zchladí v kapalném dusíku. Potom se rostlinný materiál pomocí skalpelu rozdělí na malé kousky nebo se rozemele za chlazení dusíkem. Rostlinný materiál se může ale také použít nerozmělněný. Potom se 2 g rostlinného materiálu smísí se

2 g močoviny a převedou se do chlazené teflonové nádoby, ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 0,5 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje. Výtěžek proteinu činí 7,5 mg/g prášku (v prášku obsaženo 50 % močoviny).

#### P ř í k l a d 8

##### Rozklad svalové tkáně

Svaly krysy nebo myši se po jejich usmrcení ihned zmrazí v kapalném dusíku, načež se 2 g hluboce zmrazených svalů smísí s 18 g močoviny a převedou se do chlazené teflonové nádoby (objem 20 ml), ve které se nachází wolframová mlecí koule (průměr 1 cm) a mele se ve vibračním mlýnu (Dismembrator U, firmy Braun Melsungen, Melsungen, BRD) při 2600 otáčkách za minutu po dobu jedné minuty. Nádoba se chladí kapalným dusíkem a postup se několikrát (asi desetkrát) opakuje. Po rozkladu obsahuje prášek 10 % proteinu.

#### P ř í k l a d 9

##### Isolace DNA z *Actinoplanes utahensis*

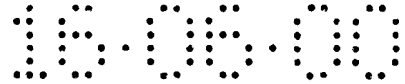
Pěstování kultury se provádí ne 300 ml Erlenmayerových baňkách s 50 ml R2YE media (Hopwood D. A. a kol (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual, John Innes Foundation, Norwich, UK) při teplotě 28 °C a při 180 otáčkách za minutu po dobu 5 dnů. Buněčná peleta (2 g) se oddělí odstředěním při teplotě 4 °C a dá se do 5 ml



rozkladové teflonové nádoby s wolfram-karbitovou kuličkou (průměr 0,5 cm) se 2 g močoviny, přičemž se chladí kapalným dusíkem. potom se buněčná peleta homogenisuje v dismembrátoru při 2600 otáčkách za minutu. Po každém cyklu se rozkladový přístroj ochladí v kapalném dusíku. Postup se třikrát opakuje. Studený homogenisát se potom resuspenduje ve 20 ml TSE-puftru (TSE: 25 mM Tris/HCl; 25 nM EDTA, 10,3 % sacharosa, pH 8,0) s 10 µg/ml RNAzy. Potom se roztok smísí se 2 % SDS, načež se přidá 7 ml neutrální směsi trichlor-methyn/fenol (1 : 1) a promísí se. Obě fáze se oddělí odstředěním (4000 otáček za minutu, 10 minut) a odebere se asi 15 ml vodné horní fáze opatrně pipetou. Tato se dá do nové zkumavky a jednou se vytřepe 3 ml trichlormethanu. Po novém odstředění (4000 otáček za minutu, 10 minut) a rozdělení fází se horní fáze smísí s 1/10 objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 0,8 objemu isopropylalkoholu a DNA se vysráží. DNA se potom z tohoto roztoku získá odstředěním při 15000 g (30 minut) nebo vylovením skleněnou tyčinkou. DNA se po promytí 70% ethylalkoholem suší a vyjme se do TE puftru.

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1.     Způsob rozkladu biologického materiálu,  
v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že se biologický mate-  
riál rozkládá v pevném stavu a za přítomnosti pevné denatu-  
rující látky.
  
2.     Způsob podle nároku 1 ,  
v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že denaturující látka  
je krystalická látka, výhodně krystalická organická látka.
  
3.     Způsob podle nároku 1 nebo 2 ,  
v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že pevná denaturující  
látka je zvolená ze skupiny zahrnující močovinu, thiomčo-  
vinu, guanidiniumchlorid, guanidiniumthiokyanát a/nebo síran  
amonný.
  
4.     Způsob podle některého z nároků 1 až 3 ,  
v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že se pevná denaturu-  
jící látka přidává do biologického materiálu v asi jednoná-  
sobném až asi desetinasobném (w/w) přebytku, výhodně v asi  
jednonásobném až asi dvacetinasobném (w/w) přebytku, ob-  
zvláště v asi jednonásobném až asi desetinasobném (w/w)  
přebytku a především v asi jednonásobném (w/w) přebytku.
  
5.     Způsob podle některého z nároků 1 až 4 ,  
v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že biologický materi-  
ál je hluboce zmražený.
  
6.     Způsob podle některého z nároků 1 až 5 ,  
v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že se biologický ma-



teriál rozkládá za hlubokých teplot, výhodně za chlazení kapalným dusíkem.

7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6 ,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se biologický  
materiál rozemele, výhodně za přítomnosti mlecí koule.

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 7 ,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že biologický mate-  
riál představuje zvířecí, popřípadě lidské nebo rostlinné  
buňky, buněčné shluky, tkáně nebo zvířecí, popřípadě lidské  
nebo rostlinné materiály.

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 7 ,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že biologický mate-  
riál je zvolený z mikroorganismů, výhodně hub, bakterií,  
kvasinek, protozoí nebo řas.

10. Způsob podle některého z nároků 1 až 9 ,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se rozložený bio-  
logický materiál potom vyjme do vhodného pufru.

11. Způsob podle nároku 10 ,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že konečná koncentrace  
močoviny v pufru je asi 1 až asi 10 M , výhodně asi 1 až  
asi 5 M a obzvláště asi 4 M .

12. Způsob podle nároku 10 nebo 11 ,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se do pufru vyjmutý  
biologický materiál odstředí.