



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

263173

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/00

(22) Prihlášené 18 07 86

(21) PV 5497-86.G

(40) Zverejnené 16 09 88

(45) Vydané 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

MIROSLAV VASIL MUDr., HUMENNÉ

(54) Určovanie homologických úsekov nukleových kyselín

Riešenie sa týka určovania prítomnosti homologických úsekov nukleových kyselín, najčastejšie génu na chromozóme. Určovanie prítomnosti homologických úsekov nukleových kyselín sa dosiahne tak, že na jednovláknovú nukleovú kyselinu sa pôsobí sondou a prítomnosť komplementárneho úseku sa potvrdí značenou monoklonálnou protilátkou proti dvojitáknovej nukleovej kyseline. Možnosť použitia je v medicíne, humánnej i veterinárnej, pri určovaní prítomnosti génu na chromozóme, v biotechnologických postupoch, pri mikrobiologickej diagnostike, pri hľadaní homologických úsekov nukleových kyselín v oblasti evolučných súvislostí organizmov.

Vynález sa týká spôsobu určovania prítomnosti homologických úsekov nukleových kyselín, najčastejšie génu na chromozóme.

Doposiaľ sa prítomnosť génu na chromozóme najčastejšie vyšetruje pomocou radioaktívne značených sond tak, že sa vyšetrovaná deoxyribonukleová kyselina rozstrihá na malé úseky pomocou restriktčných endonukleáz. Fragmenty sa rozdelia pomocou elektroforézy a prenesú na filtračný papier. Takto získaná vzorka sa premiestni do prostredia s radioaktívne značenými sondami. V hybridizačnom procese sa sondy naviažu na komplementárny úsek deoxyribonukleovej kyseliny a zaznamenajú na fotograficky citlivej vrstve radioaktívny úsek. Iný známy spôsob mapovania génov vychádza z chromozómov získaných po kultivácii základným postupom. Na ne sa pôsobí ribonukleázou a nasleduje proces hybridizácie so sondami, pôsobenie striebra a znovu zaznamenanie na fotocitlivú vrstvu. Zobrazia sa chromozómy i lókusy s prítomným génom. Nevýhodou je niekoľkodňové spracovanie, finančné náklady, pracovná náročnosť, manipulácia s radioaktívnymi látkami, ich krátky polčas rozpadu.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob určovania prítomnosti homologických úsekov nukleových kyselín, najčastejšie génu na chromozóme, ktorého podstata spočíva v tom, že sa k reakčnému systému obsahujúcemu na nosiči, napríklad nitrocelulóze, nylone fixovanú vyšetrovanú jednovláknovú nukleovú kyselinu a sondu samotnú, poprípade zabudovanú do dvojvláknovej vektorovej nukleovej kyseliny, pridá špecifická DNA-protilátka a urobí sa vyhodnotenie, napríklad pridaním substrátu za vytvorenia farebnej reakcie.

Výhody navrhovaného spôsobu vynálezu sú v tom, že umožňuje nahradiť prácu s radioaktívnymi látkami s enzymatickým značením, znižuje pracovnosť postupu, umožňuje vyšetrovanie génov u heterozygótov v medicíne, mikrobiologickú diagnostiku i pri biotechnologických postupoch. Znižuje finančné náklady.

Na pripojených výkresoch sú znázornené príklady postupu pri zisťovaní homologických úsekov nukleových kyselín. Na obr. 1 a 2 je znázornený príklad s využitím sondy vo forme jednovláknna. Na obr. 3 je znázornený spôsob s použitím komplexu jednovláknovej sondy nukleovej kyseliny a dvojvláknovej nukleovej kyseliny. Sonda sa buď pridá k fukovanej vyšetrovanej nukleovej kyseline obr. 1, 2, 3, alebo je fixovaná sonda a pridá sa dinaturovaná nukleová kyselina obr. 4.

P r í k l a d 1

Neznáma nukleová kyselina 1 sa vo forme jednovláknna fixuje na nosiči 2 a pridá sa sonda 3. V mieste komplementárneho úseku dojde k hybridizácii a vytvorí sa dvojvlákno 4. Na vzorku sa pôsobí špecifickou protilátkou proti dvojvláknovej nukleovej kyseline 5, protilátka môže byť značená napríklad radionuklidami obr. č. 1, alebo sa použije neznačená protilátka obr. č. 2. Naviazanie neznačenej protilátky 5 na dvojvlákno nukleovej kyseliny 4 sa potvrdí pridaním značenej protilátky 6 proti špecifickej protilátke 5.

P r í k l a d 2

Neznáma nukleová kyselina sa vo forme jednovláknna fixuje na nosiči 2, pridá sa sonda 3, v mieste komplementárneho úseku sa vytvorí dvojvlákno 4. Na vzorku sa pôsobí enzymaticky značenou špecifickou protilátkou proti dvojvláknovej nukleovej kyseline 5: Po naviazaní protilátky 5 na sondu 3 a dvojvlákno 4 sa pridá substrát 8. Výsledok reakcie 7 sa odčíta.

P r í k l a d 3

Sodna 3 sa fixuje na nosiči 2, pridá sa neznáma nukleová kyselina 1. V rozsahu homologického úseku nukleových kyselín sa vytvorí dvojvlákno 4, na vzorku sa pôsobí enzymaticky značenou protilátkou 5. Pridá sa substrát 8 a výsledok reakcie sa odčíta 7.

P r í k l a d postupu:

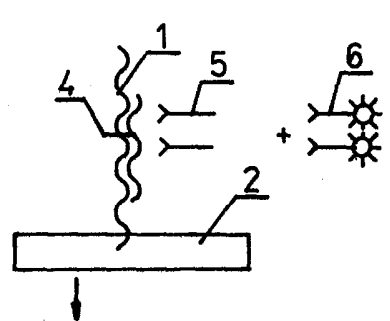
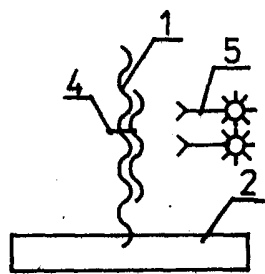
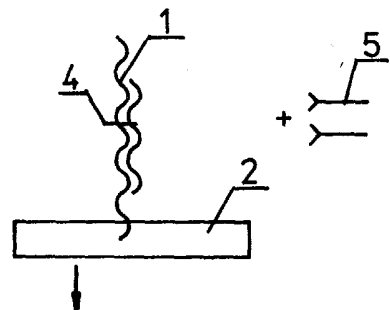
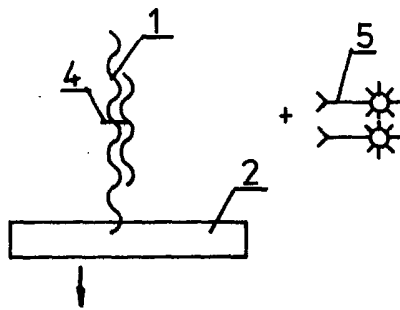
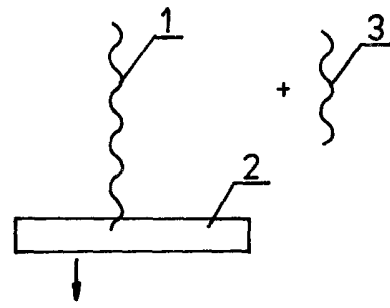
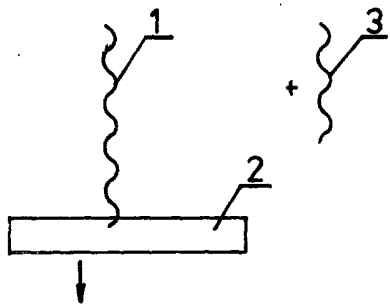
Denaturovaná jednovláknová deoxyribonukleová kyselina 1 sa preniesie na nitrocelulózový filter 2 v množstve 5 až 30 ul, ten sa ponechá vo vákuu pri teplote 80 stupňov Celzia na 2 hodiny. Potom nastúpi hybridizácia s predurčenou sondou 3 v množstve 1 až 1 000 ng/ml na 3 až 20 hodín v hybridizačnom pufre za prítomnosti 45 až 55 % formamidu a teploty 42 stupňov Celzia. Použitá sonda predstavuje jednovláknový úsek nukleovej kyseliny. Má schopnosť hybridizovať s neznámou kyselinou v mieste, ktoré má komplementárne usporiadanie báz /Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982/. Môže sa použiť sonda vo forme jednovláknna, alebo vo forme komplexu, kde jednovláknno tvorí špecifický úsek a ostatná časť môže byť tvorená dvojitým vláknom. Príkladom je jednovláknový úsek, ktorý je súčasťou vektora /Hu nad Messing, Gene, 17. 271 až 277, 1982/. Vektor je malá časť deoxyribonukleovej kyseliny, ktorá slúži ako nosič cudzorodej DNA, môžu to byť fágy, plazmidy a iné. Po hybridizácii dojde v mieste homologických úsekov k vytvoreniu dvojitým vláknom 4 nukleových kyselín. Vzorka sa prepláchne a nechá pôsobiť monoklonálna protilátka 5 proti dvojitým vláknom nukleovej kyseliny 4, jej schopnosť viazať sa len na dvojitým vláknom štruktúry vytvorí komplex. Naviazanie možno dokázať tak, že sa protilátka označí. Výhodne sa používa enzymatické 5, alebo radioizotopami 6. Pri značení protilátky enzýmom 5 sa naviazanie protilátky na sondu 3 dokáže pomocou substrátu 8. Substrát 8 je reaktant pri reakcii katalyzovanej enzýmom. Pre protilátku značenú alkalickou fosfatázou, môže pozostávať z 0,33 mg nitrotetrazolovej modre a 0,17 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphátu na mililiter rozpustený v 100 mM Tris HCl - 0,1 M NaCl - 5 mM MgCl₂ /Leary, J. J., D. J. Brigati, and D. C. Ward, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4 045 až 4 049, 1983/. Po jeho pridaní dojde k vytvoreniu farebnej reakcie 7. Výsledok sa môže odčítat.

Možnosť použitia je v medicíne humánnej i veterinárnej, pri určovaní prítomnosti génu na chromozóme, v biotechnologických postupoch, pri mikrobiologickej diagnostike, pri hľadaní homologických úsekov nukleových kyselín v oblasti evolučných súvislostí organizmov.

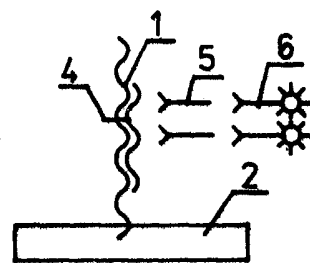
P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob určovania homologických úsekov nukleových kyselín, napríklad génu na chromozóme, pri ktorom sa najprv dvojitým vláknom nukleová kyselina denaturuje na jednovláknovú nukleovú kyselinu, na ktorú sa pôsobí sondou obsahujúcou aspoň 8 bází, vyznačený tým, že sa k reakčnému systému obsahujúcom na nosiči, napríklad nitrocelulóze, nylone fixovanú vyšetřovanú jednovláknovú nukleovú kyselinu a sondu samotnú, popri prípade zabudovanú do vektorovej nukleovej kyseliny pridá špecifickú DNA-protilátka a urobí sa vyhodnotenie, napríklad pridaním substrátu za vytvorenia farebnej reakcie.

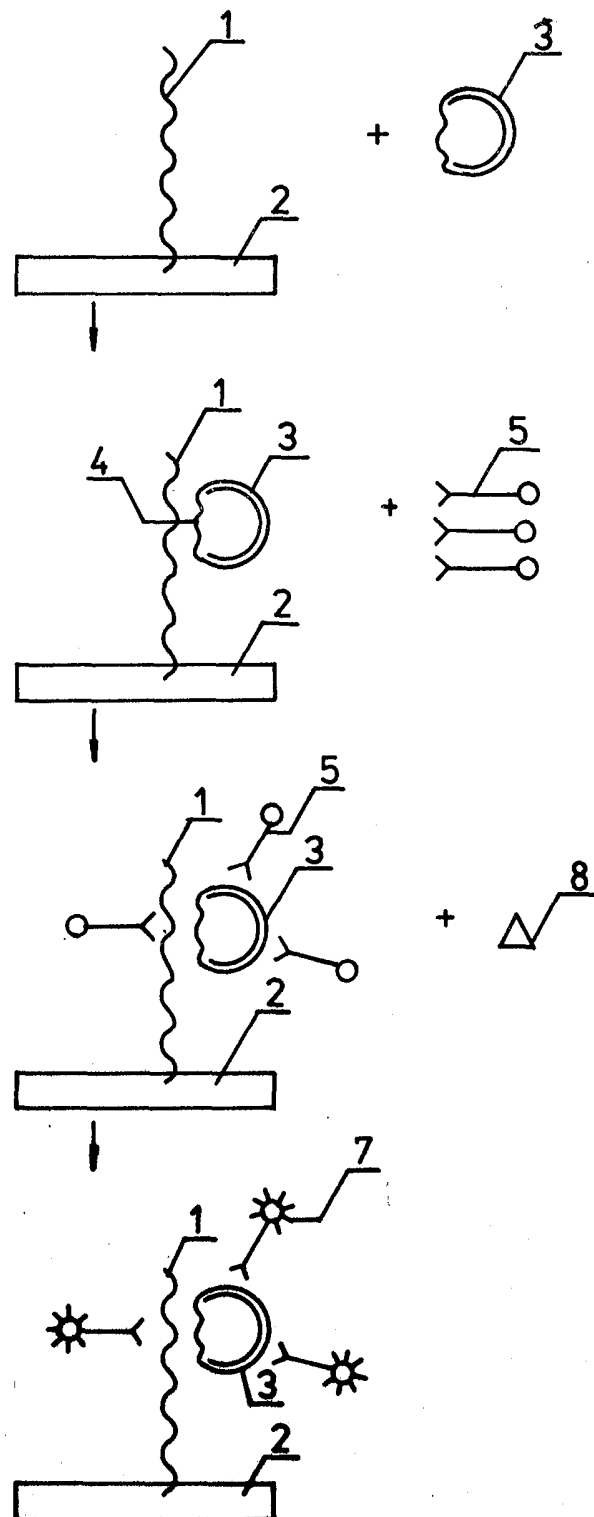
2. Spôsob podľa bodu 1 vyznačený tým, že sa do reakčného systému pridá značná protilátka špecifická proti DNA-protilátke a urobí sa vyhodnotenie.



Obr. 1

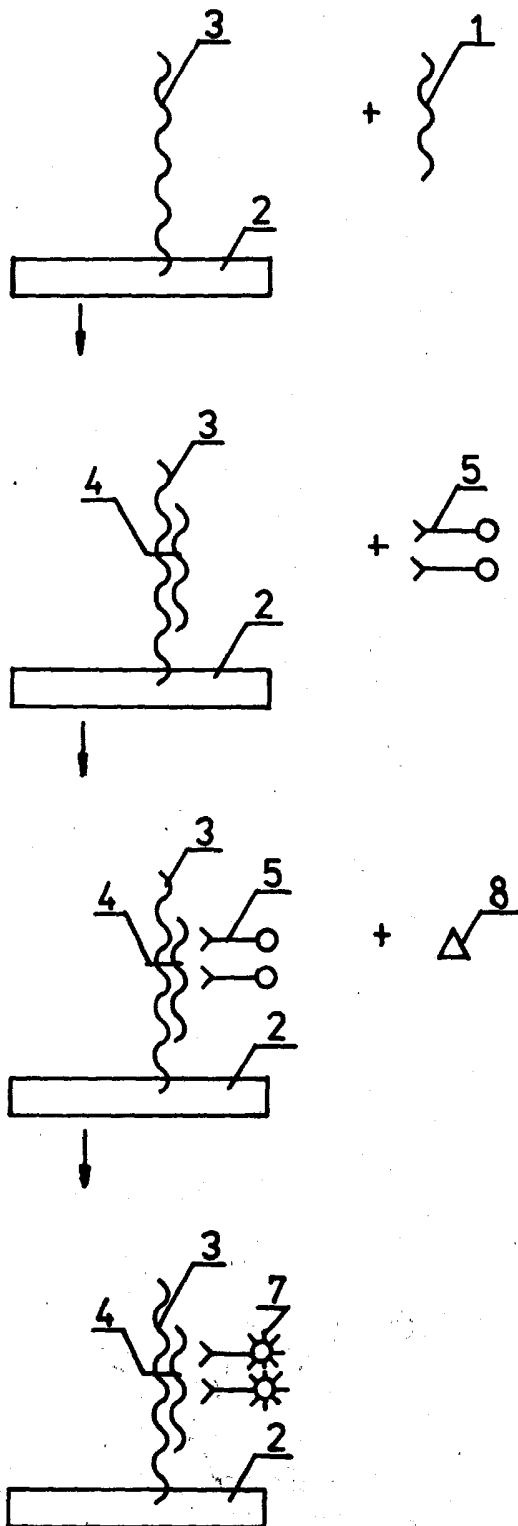


Obr. 2



Obr. 3

263173



Obr. 4