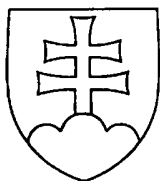


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

# 287932

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2012.01):

**B01J 19/00**  
**B03C 1/00**  
**C01B 33/00**  
**C03B 19/00**  
**C03B 8/00**  
**C03C 14/00**  
**C12N 15/00**  
**C12Q 1/00**  
**H01F 1/00**

- (21) Číslo prihlášky: **664-2002**  
(22) Dátum podania prihlášky: **17. 11. 2000**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **99122853.7, 00110165.8**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **17. 11. 1999, 12. 5. 2000**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP, EP**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 8. 2003**  
Vestník ÚPV SR č.: **8/2003**  
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **14. 4. 2012**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP00/11459**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/37291**  
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim, DE;**

(72) Pôvodca: **Weindel Kurt, Wielenbach-Hardt, DE;**  
**Riedling Michael, Penzberg, DE;**  
**Geiger Albert, Penzberg, DE;**

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob výroby zmesi magnetických sklenených častíc, magnetické sklenené častice, zmes a suspenzia magnetických častíc, skúmavka a viaczložková súprava obsahujúca uvedenú zmes, použitie uvedenej zmesi a spôsob izolácie biologického materiálu**

(57) Anotácia:  
Tento vynález sa vzťahuje na magnetické častice s nano-veľkosťou so skleneným povrchom, charakterizovaným tým, že magnetické sklenené častice obsahujú aspoň jeden magnetický objekt so stredným priemerom medzi 5 a 500 nm. Tento vynález sa tiež vzťahuje na metódy ich prípravy, na ich suspenzie a ich použitie na purifikáciu DNA alebo RNA, najmä v automatizovaných postupoch.

**SK 287932 B6**

## Oblasť techniky

Tento vynález sa vzťahuje na magnetické v podstate guľovité, častice so skleneným povrchom. Tento vynález sa tiež vzťahuje na metódy ich prípravy, na ich suspenziám a na ich použitie na purifikáciu biologického materiálu, najmä v automatizovaných procesoch.

Veľa biologických materiálov, najmä nukleových kyselín, poskytne pri izolácii z ich normálneho prostredia výnimočné problémy. Na jednej strane sú veľmi často prítomné vo veľmi malých koncentráciách a na druhej strane sú často v prítomnosti mnohých iných pevných a rozpustných substancií, ktoré sťažujú izoláciu alebo meranie, najmä pri biologických analýzach.

Biošpecifické väzobné analýzy umožňujú detekciu špecifických analytov, napr. nukleových kyselín alebo špecifických vlastností analytov a hrajú dôležitú rolu na poli diagnostik a bioanalytík. Príklady sú hybridizačné analýzy, immuno analýzy a analýzy typu receptor-ligand.

Hybridizačné analýzy využívajú na molekulárnu detekciu analytov nukleových kyselín, napr. RNA a DNA, špecifické párovanie báz. Oligonukleotidové sondy s dĺžkou 18 až 20 nukleotidov tak môžu umožniť špecifické rozpoznanie vybranej sekvencie v ľudskom genóme. Iná analýza, ktorá využíva selektívnej väzby dvoch oligonukleotidových primérov, je polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction, PCR) opísaná v US 4 683 195. Táto metóda využíva v niekoľkých cykloch selektívnu amplifikáciu špecifickej oblasti nukleovej kyseliny termostabilnou polymerázou, až do detegovateľného množstva, za prítomnosti deoxynukleotidových trifosfátov.

Nukleové kyseliny sú pomerne komplexné analyty, ktoré sa musia normálne extrahovať z komplexnej zmesi pred tým, ako sa môžu použiť v testoch založených na sondách:

Existuje niekoľko metód na extrakciu nukleových kyselín:

- od sekvencie závislej alebo biošpecifickej metódy, ako napr.:

- afinitná chromatografia,

- hybridizácia k imobilizovaným sondám na guľôčkach,

- od sekvencie nezávislej alebo fyzikálno-chemickej metódy, ako napr.:

- extrakcia vodná fáza - vodná fáza s napr. chloroformom,

- precipitácia napr. čistým etanolom,

- extrakcia s filtračným papierom,

- extrakcia s činidlami tvoriacimi micely, ako cetyl-trimetylamónium-bromid,

- naväzovanie k imobilizovaným interkalačným farbivám, napr. derivátom akridínu,

- adsorpcia ku kremičitému gélu alebo dvojmocným zeminám (diatomic earths),

- adsorpcia k magnetickým skleneným časticami (MGP) alebo organosilánovým časticami pri chaotropných podmienkach.

V posledných rokoch sa navrhlo veľa procedúr a materiálov na izoláciu nukleových kyselín z ich prirodzeného prostredia, ktoré využívali ich naväzovanie na sklenené povrchy. Napríklad v Proc. Natl. Acad. USA 76, 615 - 691 (1979) je navrhnutý postup na naväzovanie nukleových kyselín v agarózových géloch na mleté flintové sklo v prítomnosti jodidu sodného.

V Anal. Biochem. 121, 382 - 387 (1982) je opísaná purifikácia plazmidovej DNA z baktérií na sklenenom prachu v prítomnosti chloristanu sodného (sodium perchlorate).

V DE-A 37 34 442 je opísaná izolácia jednopramennej DNA fágu M13 na vláknitých filtroch precipitáciou fágových častíc s využitím kyseliny octovej a lýza fágových častíc chloristanom. Nukleové kyseliny sa naviažu na filtre zo sklenených vlákien, omyjú a potom vymyjú Tris/EDTA pufrom s obsahom metanolu.

Podobná procedúra na purifikáciu DNA z fágov lambda je opísaná v Anal. Biochem. 175, 196 - 201 (1988).

Procedúra, známa už skoršie, vyvolá selektívnu väzbu nukleových kyselín na sklenený povrch v roztokoch chaotropných solí a oddelí nukleové kyseliny od kontaminujúcich prímiesí, ako je agaróza, proteíny alebo bunkové zvyšky. K oddeleniu sklenených častíc od znečisťujúcich látok sa častice podľa doterajších postupov buď centrifugujú, alebo sa tekutina prefiltruje cez sklenený vláknitý filter. To je ale obmedzujúci krok, ktorý zabraňuje použitiu tohto postupu na spracovanie veľkého počtu vzoriek.

Ukázalo sa, že magnetické častice pokryté skleneným povrchom ponúkajú na izoláciu biologických materiálov značné výhody. Keď sa nevystavili magnetické častice pôsobeniu magnetického poľa, je jedinou silou použiteľnou na sedimentáciu gravitácia. Pretrepaním roztoku sa môžu resuspendovať. Sedimentačná procedúra, ktorá nevyužíva magnetické pole, je pomalšia, ako imobilizácia biologických materiálov na časticách. To platí najmä pre nukleové kyseliny. Magnetické častice sa môžu ľahko sústrediť na určitom mieste v roztoku pomocou magnetu. Roztok sa potom oddelí od častíc a teda tiež od prichytených biologických materiálov.

Použitie magnetických častíc na imobilizáciu nukleových kyselín po precipitácii, pridaním soli a etanolu, je opísané v Anal. Biochem. 201, 166 - 169 (1992) a v PCT GB 91/00212. V tomto postupe sa nukleové kyseliny aglutinujú spoločne s magnetickými časticami. Aglutinát sa oddelí od pôvodného roztoku aplikáciou

magnetického poľa a premývacím krokom. Po jednom premytí sa nukleové kyseliny rozpustia v Tris pufrí. Tento postup má ale nevýhodu v tom, že precipitácia nie je selektívna pre nukleové kyseliny. Dochádza tiež k aglutinácii radu pevných a rozpustených častíc. Výsledkom je, že sa táto procedúra nemôže použiť na odstránenie významného množstva inhibítorov špecifických enzymatických reakcií, ktoré sa môžu vyskytovať.

5 Na trhu je tiež magnetické porézne sklo, ktoré obsahuje v pórovitej, špeciálnej sklenej základnej hmote (matrix) magnetické častice a ktoré je pokryté vrstvou obsahujúcou streptavidín. Tento produkt sa môže použiť na izoláciu biologických materiálov, napr. proteínov alebo nukleových kyselín, ktoré sú modifikované v komplexnom prípravnom kroku tak, že sa viažu kovalentne na biotín. Zmagnetovateľné špecifické adsorbenty sa ukázali ako veľmi účinné a vhodné na automatickú prípravu vzorky. Na tieto účely sa môžu použiť ferimagnetické, feromagnetické a superparamagnetické pigmenty.

10 Čiastočky sú podľa odborníkov pevné materiály s malým priemerom. Takéto čiastočky sa často nazývajú pigmenty.

Tieto materiály, ktoré sú označené ako magnetické, sú priťahované k magnetu, tzn. napríklad feromagnetické alebo superparamagnetické materiály. Ako výhodný a preferovaný sa odborníkom javí supermagnetizmus (napr. US 5 928 958; US 5 925 573; EP 757 106). Sklené alebo organosilánové (organosilane) povrchy sú často na použitie v biošpecifických väzobných reakciách upravované, napr. US 5 928 958, US 5 898 071, US 5 925 573, EP 937 497, US 9 554 088 alebo US 4 910 148. Alebo sa môže sklený alebo organosilánový povrch upraviť rôznymi rozpúšťadlami alebo soľami na modifikáciu ich hydrofilnosti a/alebo ich elektropozitivity, napr. US 5 438 127.

20 Nederivatizované silanolové skupiny skla alebo silánového povrchu môžu byť, ale za vhodných reakčných podmienok opísaných v DE 195 20 964, DE 195 37 985, WO 96/41840, WO 96/41811, EP 757 106 alebo US 5 520 899 použité na adsorpciu pomocou čírych fyzikálno-chemických síl. Typicky sú magnetické jadrá alebo magnetické jadrové agregáty pokryté skleným povrchom, ktorý sa vytvorí kyselinou- alebo zásadou- katalyzovaným sol-gél procesom (by an acidor base- catalyzed sol-gel-process). Tieto častice sa nazývajú častice typu jadro-plášť (core-shell particles). Sklený obal má potom typickú hrúbku vrstvy (pozri napr. DE 195 20 964), kde veľkosť a tvar pigmentu (ktorý môže obsahovať okrem magnetických kovových oxidov tiež nemagnetické častice, ako napr. sľudu) určujú veľkosť a tvar produkovanej častice (pozri napr. DE 195 37 985 a zodpovedajúci WO 96/41811). Aby sa získala vysoká povrchová aktivita, používa sa sklený materiál s veľkou pórozitou (pozri napr. EP 757 106; WO 99/26605). Opísané sú ďalej zložené magnetické častice, napr. kremičitanom obalený oxid železitý obalený anorganickou kremennou hmotou z kremenných častíc (EP 757 106), alebo zmesi sklenených a kremenných gélov (mixtures of glass and silica gel) (WO 95/06652). Problém, ktorý by mal vyriešiť predkladaný vynález, sa môže vidieť ako poskytnutie magnetických sklenených častíc so zlepšenými vlastnosťami na prípravu vzorky a na biologické analýzy, najmä v automatizovaných procesoch.

35 Nedostatok magnetických sklenených častíc v súčasnom stave vývoja sa vyrieši výsledkami predkladaného vynálezu.

Cieľom vynálezu je poskytnúť zmes (composition) magnetických sklenených častíc. Magnetické sklené častice (magnetic glass particles - MGPs) sú podľa predkladaného vynálezu pevné disperzie malých magnetických jadier v skle. MGP sú relatívne malé a sú v podstate guľovité. Nemagnetický jemný obsah zmesi MGP je veľmi nízky, vďaka metóde ich prípravy. To má ten účinok, že suspenzia MGP sedimentuje pomaly a môže tak byť výhodne využitá na postupy v molekulárnej biológii, ktoré sa môžu automatizovať. V jednej forme vynálezu sú poskytnuté zmesi a suspenzia MGP podľa predkladaného vynálezu. V inej forme vynálezu je poskytnutá metóda pre zmes MGP. V ešte ďalšej forme vynálezu je poskytnutá metóda na purifikáciu DNA alebo RNA, kde sa používajú MGP podľa predkladaného vynálezu.

45 Predmetom vynálezu je spôsob výroby zmesi magnetických sklenených častíc, ktorého podstata spočíva v tom, že zahŕňa stupne

- a) suspendovanie magnetických objektov s priemerom medzi 5 až 500 nm v solu,
- b) sušenie suspenzie rozprašovaním vo dvojdýzovej rozprašovacej sušiarne a,
- c) slinovanie rozprašovaním vysušeného prášku.

50 Výhodne vstupná teplota dvojdýzovej rozprašovacej sušiarne je medzi 120 °C a 500 °C, výstupná teplota je zvolená podľa teploty varu solu a rozprašovací tlak je aspoň rovnajúci sa aspoň 0,3 Mpa.

Výhodne vstupná teplota dvojdýzovej rozprašovacej sušiarne leží medzi 170 °C a 230 °C, výhodnejšie medzi 190 °C a 210 °C.

Výhodne rozprašovací tlak leží medzi 0,4 a 0,6 Mpa.

55 Výhodne soľ ako rozpúšťadlo obsahuje etanol.

Výhodne výstupná teplota leží medzi 50 °C a 300 °C.

Výhodne výstupná teplota leží medzi 90 °C a 100 °C.

Výhodne slinovacia teplota leží medzi 400 °C a 1200 °C, výhodne medzi 720 °C a 770 °C.

Predmetom vynálezu sú rovnako magnetické sklenené častice získateľné uvedeným spôsobom.

Predmetom vynálezu je rovnako zmes magnetických sklenených častíc získateľná uvedeným spôsobom, ktorá obsahuje aspoň jeden magnetický objekt so stredným priemerom medzi 5 a 500 nm, a ktorej podstata spočíva v tom, že počas sedimentácie suspenzie zmesi v izopropanolu s obsahom 3 mg/ml (hmotn./obj.) je dlhší než 3 minúty.

- 5 Výhodne magnetický objekt má stredný priemer medzi 10 a 200 nm, výhodne medzi 15 a 50 nm.  
 Výhodne počas sedimentácie je dlhší než 6 minút.  
 Výhodne magnetický objekt má stredný priemer 23 nm.  
 Výhodne pomer priemeru magnetického telieska k priemeru skleneného plášťa je menší než 1 : 10.  
 Výhodne magnetické sklenené častice majú stredný priemer medzi 0,5  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ .
- 10 Výhodne magnetické sklenené častice sú mikroporézne.  
 Výhodne porézny povrch magnetických sklenených častíc tvorí menej než 10 % celkového povrchu.  
 Výhodne magnetický objekt je superparamagnetický.  
 Výhodne magnetický objekt je ferimagnetický alebo feromagnetický.  
 Výhodne magnetický objekt obsahuje železo alebo oxid železa.
- 15 Výhodne oxidom železa je  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  alebo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .  
 Výhodne magnetické sklenené častice majú povrchovú plochu väčšiu než 4  $\text{m}^2/\text{g}$ .  
 Výhodne sklenené častice majú povrchovú plochu medzi 5 a 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , výhodne v rozmedzí 10 až 50  $\text{m}^2/\text{g}$ , najvýhodnejšie v rozmedzí 15 až 30  $\text{m}^2/\text{g}$ .  
 Výhodne magnetické sklenené častice sú v podstate sférické.
- 20 Predmetom vynálezu je rovnako suspenzia, ktorej podstata spočíva v tom, že obsahuje uvedenú zmes magnetických častíc v kvapaline.  
 Výhodne kvapalina obsahuje alkohol.  
 Výhodne alkoholom je isopropanol alebo etanol.  
 Výhodne kvapalinou je pufrovaný vodný roztok.
- 25 Výhodne suspenzia dodatočne obsahuje DNA alebo RNA.  
 Výhodne suspenzia dodatočne obsahuje chaotropné činidlo.  
 Výhodne chaotropné činidlo je prítomné v koncentrácii medzi 2 a 8 mol/l, výhodnejšie medzi 4 a 6 mol/l.  
 Výhodne suspenzia obsahuje 5 až 60 mg/ml uvedenej kompozície.  
 Predmetom vynálezu je rovnako skúmavka obsahujúca uvedenú kompozíciu alebo uvedenú suspenziu.
- 30 Predmetom vynálezu je rovnako viaczložková súprava obsahujúca uvedenú skúmavku.  
 Výhodne súprava ďalej obsahuje premývací roztok alebo eluent.  
 Výhodne súprava obsahuje činidlá vhodné na čistenie nukleovej kyseliny.  
 Predmetom vynálezu je rovnako použitie uvedenej zmesi na prípravu suspenzie.  
 Výhodne sa suspenzia použije na čistenie nukleových kyselín.
- 35 Predmetom vynálezu je rovnako použitie uvedenej viaczložkovej súpravy na čistenie nukleových kyselín.  
 Predmetom vynálezu je rovnako spôsob izolácie biologického materiálu, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje
- a) privedenie vzorky, ktorá obsahuje biologický materiál v kvapaline, do kontaktu so zmesou podľa niektorého z nárokov 10 až 24, magnetickými sklenenými časticami podľa nároku 9 alebo suspenziami podľa niektorého z nárokov 25 až 32 za podmienok, pri ktorých sa biologický materiál viaže priamo na sklenený povrch,
- a
- b) oddelenie biologického materiálu od kvapaliny.  
 Výhodne biologickým materiálom je nukleová kyselina.
- 45 Výhodne sa oddelenie uskutoční pomocou magnetu.  
 Výhodne magnetické častice nie sú predmagnetizované, keď sú privedené do kontaktu so vzorkou.  
 Výhodne je spôsob automatizovaný.  
 Výhodne je spôsob prevádzkovaný vo formáte vysokého presadenia.  
 Výhodne sa pri spôsobe odobere zo zásobnej nádoby uvedená suspenzia a čiastkové objemy suspenzie sa
- 50 pridávajú do rôznych reakčných nádob.  
 Výhodne sa nukleová kyselina po čistení deteguje.  
 Výhodne sa nukleová kyselina deteguje po amplifikačnom stupni.  
 Výhodne sa nukleová kyselina deteguje spôsobom zahrňujúcim:
- a) uvedenie do kontaktu vzorky s oligonukleotidom obsahujúcim sekvenciu komplementárnu k oblasti cieľovej nukleotidovej kyseliny a so značeným oligonukleotidom obsahujúcim sekvenciu komplementárnu k druhej oblasti toho istého vlákna sekvencie cieľovej nukleovej kyseliny, ale nezahrňujúcim sekvenciu nukleovej kyseliny definovanú prvým oligonukleotidom, na vytvorenie za hybridizačných podmienok zmesi duplexov, pričom tieto duplexy obsahujú cieľovú nukleovú kyselinu spojenú s prvým oligonukleotidom a so značeným oligonukleotidom tak, že 3'- koniec prvého oligonukleotidu je priľahlý ku 5'-koncu značeného nukleotidu;
- 60

b) udržanie zmesi zo stupňa a) s templat-dependentnou polymerázou nukleových kyselín majúcou 5'- a 3'-nukleázovou aktivitu za podmienok dostatočných na umožnenie 5'- a 3'-nukleázovej aktivity rozštiepiť pripojený značený oligonukleotid a uvoľniť značené fragmenty; a  
c) detekciu a/alebo meranie signálu generovaného hydrolyzou značeného oligonukleotidu.

5 Spôsob podľa niektorého z nárokov 48 až 49, vyznačujúci sa tým, že detekcia sa uskutočňuje za prítomnosti blokujúceho oligonukleotidu.

Výhodne blokujúcim oligonukleotidom je aptamer.

Výhodne aptamer má sekvenciu SEQ ID NO:23.

10 Výhodne sa amplifikačná a detekčná reakcia uskutočňuje vo formáte homogénneho multiplexového stanovenia v roztoku na účely súčasnej detekcie viacpočetných cieľov.

Výhodne v priebehu aspoň 5 cyklov polymerázovej reťazovej reakcie je teplota nasadenia primérov menej ako 8 °C, výhodne menej ako 3 °C, nad disociačnou teplotou polymerázo-aptamérového komplexu.

MGP podľa predkladaného vynálezu sú sklenené kvapôčky, v ktorých sú rozptýlené veľmi malé, v ktorých sú rozptýlené veľmi malé, neagregujúce magnetické častice. Tieto častice, ktoré sa nazývajú ako magnetické, sú priťahované k magnetu, tzn. napríklad feromagnetické alebo superparamagnetické materiály. Preferované sú feromagnetické materiály, najmä ak neboli dosiaľ predmagnetizované. Predmagnetizovaním sa v tomto kontexte rozumie kontakt s magnetom, ktorý zvýši zvyškový magnetizmus (remanencia). Preferovanými magnetickými materiálmi sú železo alebo oxidy železa, ako napríklad magnetid ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) alebo  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , prednostne  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . V zásade sa môžu použiť železitan bárnatý, nikel, kobalt, zlatiny Al-Ni-Fe-Co, alebo iné feri alebo feromagnetiká (ferri or ferromagnetic). Magnetickými časticami môže byť napr. magnetický pigment. Veľkosť magnetických častíc je v nano rozsahu, tzn. podľa predkladaného vynálezu je priemer medzi 5 a 500 nm, lepšie medzi 10 a 200 nm a ešte lepšie medzi 15 a 50 nm. Vhodné magnetické pigmenty vyrába firma CERAC; majú stredný priemer 23 nm a skladajú sa z  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  (BET-povrch 50  $\text{m}^2/\text{g}$ , CERAC: P. O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201 - 1178 USA; Article-No. I-2012). Magnetické sklenené častice podľa predkladaného vynálezu sú ďalej charakterizované skutočnosťou, že MGP majú priemer častice medzi 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , prednostne potom medzi 1 a 2  $\mu\text{m}$ , čo sa určilo pomocou vysokorozlišovacieho rastrovacieho elektrónového mikroskopu, zatiaľ čo magnetické častice majú priemer medzi 5 až 500 nm, prednostne medzi 10 a 200 nm, alebo ešte lepšie medzi 15 a 50 nm, ako bolo uvedené. MGP predkladaného vynálezu sú teda ďalej charakterizované pomerom priemerov magnetického pigmentového jadra k magnetickej sklenej častici menším ako 1 k 10, ako sa určilo vysokorozlišovacou rastrovacou elektrónovou mikroskopiou. Vďaka týmto pomerom priemerov a tiež vďaka neprítomnosti akéhokoľvek inertného nosiča, ktorý by určoval tvar a veľkosť častíc, sú geometria MGP a počet začlenených magnetických častíc určených podmienkami výroby. MGP podľa predloženého vynálezu sú mikroporózne, ale majú vysoko štruktúrované a teda relatívne veľký povrch s viacej ako 6  $\text{m}^2/\text{g}$ . Magnetické sklenené častice podľa predkladaného vynálezu majú prednostne povrch v rozsahu 5 až 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , lepšie v rozsahu 5 až 90  $\text{m}^2/\text{g}$ , ešte lepšie v rozsahu 10 až 50  $\text{m}^2/\text{g}$  a najlepšie v rozsahu 15 až 30  $\text{m}^2/\text{g}$ . Tento povrch je zhruba dvojnásobný v zrovnaní s časticami opísanými v DE 195 37 985. To sa môže určiť metódou Braunauer-Emmett-Teller s využitím automatického komerčného prístroja (pozri príklad 4). Diskusia tejto metódy, neformálne nazývanej BET metóda, je v práci S. Brauner. The Adsorption of Gases and Vapors, Vol. 1, Princeton University Press, 1943. Napríklad vzorka EJ0096.5R-01, o ktorú je prednostne záujem (pozri príklad 1 a tabuľky 1 až 3 pre prehľad výrobných parametrov), má BET-povrch 26,8525  $\text{m}^2/\text{g}$ , oblasť mikropóru 2,3058  $\text{m}^2/\text{g}$  a priemerný priemer póru 24,9132 nm. To znamená, že povrch póru je menej ako 10 % celkového povrchu a že magnetická sklenená častica je mikroporózna.

Pórom sa myslí zárez (recess) vo vonkajšom povrchu častice. Povrch zasahuje tak ďaleko do častice, že zvislá línia vynesená v záreze na povrchu rozdelí časticu aspoň jeden raz v smere priľahlého prostredia častice. Navyše póry zasahujú do častice do hĺbky, ktorá je väčšia ako jeden polomer póru.

15 Pomalšia sedimentačná kinetika, väčší povrch a sférický tvar inhibujúci agregáciu sa prejaví v lepšom funkčnom správaní ako adsorbenta pri diagnóze nukleových kyselín (pozri príklad 3, 5 a 7), pri porovnaní s nemeckými návrhmi patentov DE 198 54 973.3, alebo DE 198 55 259.9. Toto kritérium sa môže kvantifikovať posunom cyklu, keď dôjde k prekročeniu nastaveného prahu (threshold cycle) v tzv. TaqMan® testoch, pomeru signál-pozadie, a štatisticky potvrdeným nižším detekčným limitom. Metódy na tento test sú uvedené v WO92/02638 a zodpovedajúcich US patentoch (US 5 210 015, US 5 804 375, US 5 487 972). Experimenty s rádioaktívnym sledovaním (pozri príklad 5.2) ukázali, že spôsob naväzovania pokiaľ ide o DNA a RNA bol ten istý, ako pri súčasnom referenčnom materiáli.

20 Produkčné parametre mali prekvapivo vplyv na výsledky experimentov s rádioaktívnym sledovaním. Ďalšou výhodou MGP typu predkladaného vynálezu je to, že neexistencia tenzie vo sklenej vrstve môže viesť kvôli vnútornej štruktúre k prasklinám počas procesu sušenia a zodpovedajúcim poškodením vo sklenenom obale (dôkladný (solid) rozptýl malých magnetických jadier v sklenej kvapke). To sa môže skúmať metódami tvorby obrazu (pozri príklad 3).

60 Inou formou predkladaného vynálezu je suspenzia magnetických častíc. Je to zrejme odborníkom, ktorí pripravujú suspenzie pridávaním tekutiny ku zmesi MGP a premiešaním suspenzie do homogenity. Tekutina

podľa predkladaného vynálezu môže zahrňovať akúkoľvek tekutinu, ktorá neovplyvní stabilitu magnetických častíc a môže sa použiť pre tvorbu homogénnej suspenzie.

Prednostne sa používajú tekutiny vhodné na procesy v molekulárnej biológii, najmä na procesy purifikácie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) alebo ribonukleovej kyseliny (RNA), ktoré využívajú za určitých podmienok naväzovania týchto látok na sklenené častice. Medzi preferované tekutiny patria alkoholy alebo akékoľvek ich zmesi s vodou alebo ketóny. Medzi alkoholy by podľa predkladaného vynálezu mali patriť predovšetkým primárne, sekundárne a terciárne alkoholy so všeobecným zložením R-OH, kde R znamená všeobecný vzorec  $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ , kde  $n \geq 0$ . Ale použité môžu byť aj iné alkoholy, ak sú vhodné na účely molekulárnej biológie, ako napríklad glycerol. Zvlášť vhodné sú izopropanol, etanol alebo ich zmesi s vodou, prednostne zmes 80 objemových častí izopropanolu a 20 objemových častí vody. V inej forme vynálezu tekutina obsahuje ketóny, ako napríklad acetón. V preferovanej forme vynálezu tieto suspenzie obsahujú medzi 5 a 60 mg/ml MGP. V inej forme vynálezu sú MGP suspendované vo vodných pufrovaných roztokoch, ktoré môžu prípadne obsahovať chaotropnú látku v koncentrácii medzi 2 a 8 mol/l, alebo lepšie medzi 4 a mol/l. Chaotropnými soľami môžu byť jodid sodný, chloristan sodný, guanidín tiokyanát, guanidín izotiokyanát, alebo guanidín hydrochlorid. Sú tiež možné iné zlúčeniny. Chaotropné činidlo podľa predkladaného vynálezu bude akákoľvek chemická látka, ktorá rozruší usporiadanú štruktúru kvapalnej vody a spôsobí naväzovanie DNA alebo RNA na MGP podľa predkladaného vynálezu, ak je táto látka v roztoku obsahujúcom DNA alebo RNA. Je to samozrejme pre kvalifikovaného pracovníka pripravujúceho vhodné pufrované vodné roztoky. Pufrovacie systémy, ktoré sa môžu použiť na účely molekulárnej biológie, je možné nájsť napríklad v Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour University Press, New York, NY, USA. Preferovanými pufrovacími látkami sú Tris-hydroxymetylamín fosfát (TRIS), N-(2-hydroxyetyl)piperazín-N'-(etánsulfónová kyselina) (HEPES), ich soli, alebo iné látky. Okrem toho môžu byť prítomné látky, ktoré upravujú iónovú silu roztoku, ako napríklad NaCl, KCl, alebo  $\text{CaCl}_2$ , alebo ktoré sú komplexotvornými látkami kovových katiónov, ako napríklad etylén-diamín-tetra-octová kyselina (EDTA), alebo jej soli. Môže byť tiež prítomný biologický materiál známy odborníkom. V inej forme predkladaného vynálezu môže suspenzia MGP ďalej obsahovať DNA alebo RNA, prípadne v zmesi s proteínmi, mastnými kyselinami, sacharidmi a inými materiálmi biologického pôvodu. V inej forme predkladaného vynálezu môže tekutina obsahovať zmes jednej alebo viacej zložiek vybraných zo skupiny alkoholov, ketónov, vodných pufrovaných roztokov, chaotropných látok, látok modifikujúcich iónovú silu roztoku, komplexotvorných látok, biologický materiál, DNA alebo RNA, všetky s vlastnosťami opísanými skôr.

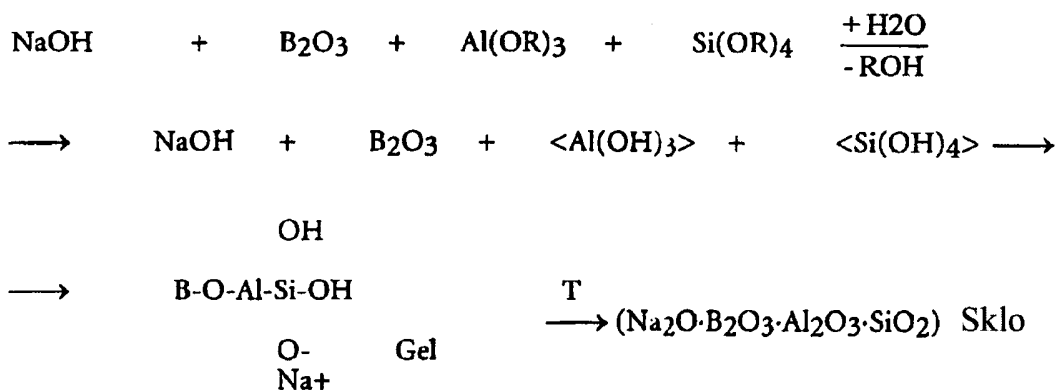
Pri inej forme vynálezu je poskytnutá skúmavka alebo reakčná nádoba obsahujúca suspenziu podľa predkladaného vynálezu. Skúmavka môže byť vyrobená z plastov, ale môže byť tiež časťou väčšej štruktúry, napríklad mikrotitračné doštičky v formáte s 96 alebo 384 jamkami. Ešte ďalšou poskytnutou formou vynálezu je skladovacia nádoba, ktorá obsahuje zmes magnetických častíc alebo ich suspenzie. Ďalšou poskytnutou formou vynálezu je súprava jednotlivých súčastí, ktorá obsahuje skladovaciu nádobu, ktorá obsahuje zmes magnetických sklenených častíc alebo ich suspenzie podľa predkladaného vynálezu. Súprava sa môže použiť na purifikáciu DNA alebo RNA. Takéto súpravy známe odborníkom ďalej obsahujú výrobky z plastu, ktoré sa môžu použiť počas purifikačného procesu, napríklad mikrotitračné doštičky vo formáte s 96 alebo 384 jamkami, alebo obyčajné reakčné skúmavky, vyrábané napríklad firmou Eppendorf, Hamburg, Nemecko. Súprava môže ďalej obsahovať premývací roztok, ktorý je vhodný na premývacie krok magnetických sklenených častíc, keď je na ne naviazaná DNA alebo RNA. Často je premývací roztok poskytovaný ako zásobný roztok, ktorý sa musí pred použitím zriediť. Súprava môže ďalej obsahovať vymývacie roztok, tzn. roztok alebo pufer (napr. TE, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), alebo čistú vodu na uvoľnenie DNA alebo RNA naviazanej k magnetickým skleneným časticiam. Ďalej potom môžu byť prítomné ďalšie reakčné činidlá, ktoré sa môžu použiť na proces purifikácie nukleových kyselín, tzn. DNA alebo RNA. V jednej forme vynálezu je súprava z častí podľa predkladaného vynálezu použitá na purifikáciu nukleových kyselín.

V jednej forme vynálezu sa môže použiť zmes MGP naprípravu suspenzie, ako to bolo už opísané.

V inej forme vynálezu sa môžu použiť suspenzie podľa predkladaného vynálezu na purifikáciu nukleových kyselín, tzn. RNA alebo DNA, z komplexných zmesí, ktoré obsahujú tiež ostatné biologické substancie. Môžu sa teda purifikovať tiež zmesi rôznych nukleových kyselín, dokonca aj zmesi obsahujúce nukleové kyseliny, ktoré nás zaujímajú, v malom množstve. Purifikačný efekt je výsledkom správania DNA alebo RNA, ktoré sa viažu za určitých podmienok na magnetické sklenené častice, napríklad za prítomnosti určitej koncentrácie chaotropnej látky. MGP s naviazanými DNA alebo RNA sú potom radšej aspoň jeden raz premyté, najlepšiu zmesou 70 objemových častí etanolu s 30 objemovými časťami vody („70 % etanol“). Potom sa podmienky zmenia, tzn. na vymytie DNA alebo RNA naviazaných na MGP častice sa zníži koncentrácia chaotropnej látky. To sa prednostne uskutoční peletovaním magnetických sklenených častíc, napríklad gravitáciou alebo použitím magnetu a resuspendovaním v roztoku bez obsahu a/alebo s nízkym obsahom chaotropnej látky. Alebo sa môže prípadne roztok zriediť roztokom bez obsahu a/alebo s nízkym obsahom chaotropnej látky. Purifikovaná DNA alebo RNA sa teraz môže použiť na ďalšie reakcie.

Jedným cieľom predkladaného vynálezu je poskytnutie výrobného postupu pre MGP podľa predkladaného vynálezu. Sklom sa podľa predkladaného vynálezu rozumie amorfný materiál, ktorý obsahuje kremík. Sklo môže obsahovať ďalšie látky, ako B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0 - 30 %), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0 - 20 %), CaO (0 - 20 %), BaO (0 - 10 %), K<sub>2</sub>O (0 - 20 %), Na<sub>2</sub>O (0 - 20 %), MgO (0 - 18 %), Pb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0 - 15 %). Sklo tiež môže obsahovať menšie percento (0 - 5 %) rad ďalších oxidov, ako Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, CoO atď.

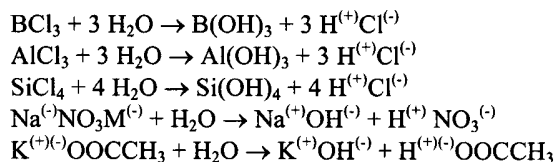
Podľa predkladaného vynálezu sú zvlášť preferované sklá, ktoré sú pripravené s použitím gél-sol procesu opísaného v WO 96/41811 a potom vysušené a zlisované. Základné princípy tohto procesu sú známe a boli opísané, napr. v C. J. Brinker, G. W. Scherer „Sol Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol Gel Processing“, Academic Press Inc. 1990, Sol-Gel Optics, Processing and Applications, Lisa C. Klein, Ed., Kluwer Academic Publishers 1994, p. 450 ff., a v DE-A-1941191, DE-A-3719339, DE-A-4117 041, DE-A-4217432 a WO 96/41811. V prvom rade sú v gél-sol procesu alkoholáty sieťujúcich zložiek, napr. SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, GeO<sub>2</sub> skombinované s oxidmi a soľami ostatných zložiek, napríklad v alkoholovom roztoku a potom hydrolyzované. Nasledujúca rovnica opisuje postup na prípravu sodného borohlinikového silikátového skla:



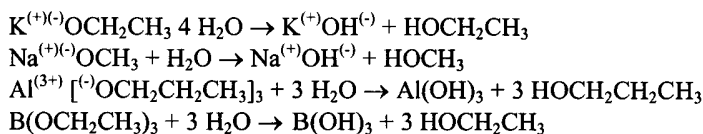
Na začiatok procesu hydrolyzy východiskových komponentov sa pridá voda. Reakcia prebieha relatívne rýchlo, pretože alkalické ióny majú katalytický vplyv na rýchlosť hydrolyzy esteru kyseliny kremičitej. Len čo dôjde k vytvoreniu gélu, môže sa vysušiť a zahustiť (alebo kondenzovať) termálnymi procesmi, čím sa vytvorí sklo.

V jednej forme vynálezu sa sklovitá základná hmota pripraví kyselinou alebo zásadou katalyzovanou sol-gél syntézou, ako je naznačené schematicky na obrázku 1 a obrázku 2 a detailne opísané v príklade 1. Využíva sa tu koloidný systém, kde sú najskôr dispergované pevné zložky v tekutej fáze (=sol) a po spracovaní sú vzájomne pospájané podobne ako včelí plást (=gél). Zloženie skla (kód EJ) vypočítané z množstva výťažkov bolo 70,67Mol %SiO<sub>2</sub>, 14,33Mol %B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,00 Mol %Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,00Mol % K<sub>2</sub>O, 2,00 Mol %CaO, 4,00Mol %ZnO. Zloženie skla (kód RN) bolo 74Mol %SiO<sub>2</sub>, 15Mol %B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,00 Mol %Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,00Mol % K<sub>2</sub>O, 2,00 Mol %CaO. Zloženie skla (kód EP) bolo 73,61Mol %SiO<sub>2</sub>, 14,93Mol %B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,21Mol %Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,17Mol % K<sub>2</sub>O, 2,08 Mol %CaO.

Reakcia môže byť opísaná nasledovne:  
buď katalyzovaná kyselinou, napríklad:

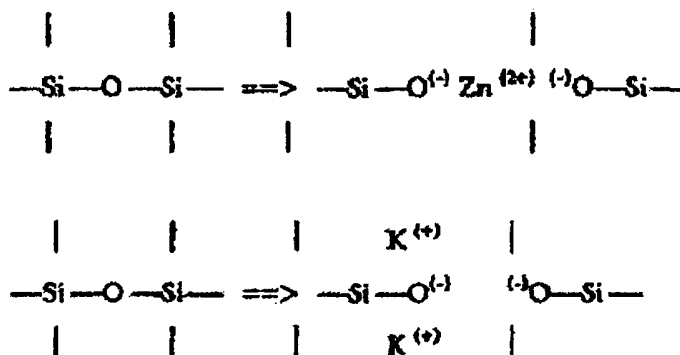


alebo katalyzovaná zásadou, napríklad:



Rôzne hydroxidy kondenzujú na zodpovedajúce oxidy, ktoré tvoria trojrozmernú sieť, amorfnú sklenenú hmotu SiO<sub>2</sub>/B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s kovovými iónmi na vmedzerených (interstitial) miestach. Okrem opísaných alka-

lických iónov a iónov alkalických zemných kovov, sa môžu zainkorporovať do hmoty, ako činidlá ovplyvňujúce zosieťovanie, ióny prechodových kovov, ako napríklad  $Zn^{2+}$  a  $Zr^{2+}$ .

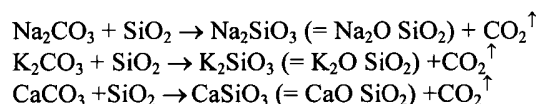


5

V inej forme vynálezu sa môže sklo pripraviť metódami známymi odborníkom - tavením surového  $SiO_2$  a uhličitanov alkalických kovov alebo alkalických zemných kovov  $Na_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$  alebo  $CaCO_3$ .

Reakcia môže byť opísaná nasledovne:

10



15

Vo väčšine prípadov, ale výsledkom nie je čistá silikátová matrix, ale matrix boritan-hliník-kremičitan, tzn. vzhľadom na jednotlivé časti tvoriace sieť je časť  $SiO_2$  nahradené  $B_2O$  a  $Al_2O_3$ .

Pomer sol : pigment má značný efekt na výnos magnetických častíc poskytovaných týmto vynálezom. Pre proces je dôležité, že sol môže byť stále kvalifikovaným pracovníkom pumpovaný a rozprašovaný.

20

Pre prípravu prášku sa kaša prednostne rozprašuje cez dvojkvapalinovú dýzu (two-fluid nozzle) opísanú na obrázku 1 a v príklade 1.3. Vhodné sušiacie rozprašovacie systémy vyrába Nubilosa Molekularzerstäubung, Ladisch GmbH & Co. KG, Konstanz, Nemecko, napríklad „Labor-Zerstäubungstroekner (yp LTK)“ alebo Büchi AG, Uster, Švajčiarsko, napríklad Mini Spray Dryer (Type B-191).

25

Pretože pomery priemeru magnetických jadier k sklenenému obalu sú menšie ako 1 : 10, prednostne medzi 1 : 10 a 1 : 1000, geometria a počet včlenených magnetických jadier alebo ich inertných nosičov neurčujú tvar a veľkosť častíc; určujú to podmienky výroby, najmä podmienky počas sušenia rozprašovaním. Inými slovami voľba tlaku, vstupná teplota, výstupná teplota a rýchlosť prietoku počas procedúry sušenia rozprašovaním predstavujú stupne voľnosti, ktoré určujú rozloženie častíc a tvar sklenených kvapiek, čím modifikujú MGP.

30

Keď sa zvýši rozprašovací tlak, rozloženie veľkosti sa posunie smerom k sub- $\mu$ -oblasti. Znížená teplota počas procesu sušenia rozprašovaním povedie k pomalšiemu vyparovaniu rozpúšťadla, čím sa tvar MGP priblíži bližšie k ideálnej guli, tzn. pomer polomerov v rovinách xy- a xz- sa priblíži zhruba 1. Pomer polomerov sa bude pohybovať medzi 0,8 a 1,2, lepšie medzi 0,9 a 1,1.

35

V preferovanej forme vynálezu sú dýzy zohrievané. Prívodná teplota je medzi 120 °C a 500 °C, lepšie medzi 170 °C a 230 °C, alebo 150 °C a 230 °C a najlepšie medzi 150 °C a 200 °C, alebo 190 °C a 210 °C, alebo pri teplote 200 °C alebo trochu nižšej. Výstupná teplota závisí od teploty varu solu a tým od rozpúšťadla a môže byť nad, rovnaká alebo slabo pod, tzn. menej ako 10 °C, teplotou varu rozpúšťadla. Keď sa ako rozpúšťadlo použije etanol, je medzi 50 °C a 300 °C, lepšie medzi 70 °C a 150 °C a najlepšie medzi 80 °C a 110 °C. Optimálna teplota je medzi 90 °C a 100 °C. Tlak dýzy je cez 3 bary, najlepšie ak je regulovateľný od 4 do 6 barov.

40

Kvalifikovaný pracovník pozná, že presné parametre budú závisieť od použitého systému na sušenie rozprašovaním. Môže ale upraviť poznatky predkladaného vynálezu pre akúkoľvek ďalšiu rozprašovaciu sušičku a príslušné parametre hľadať s prihliadnutím na poznatky tohto vynálezu. Vzt'ah, ako opísaný v práci Masters: Spray Drying Handbook, Fifth Edition, John Wiley & Sons, 1991, New York, mu môže ukázať cestu na určenie, ktoré parametre sa musia vybrať pre iné nastavenie. Prednostne bude asi pracovať s návodom svojho systému na sušenie rozprašovaním, alebo bude kontaktovať technickú podporu výrobcu systému na sušenie rozprašovaním.

45

Na optimalizáciu výťažku by zhustenie alebo teplota spekania (sinter temperature) mali byť čo možno najvyššie, tzn. mierne pod teplotou topenia. Ak je ale príliš vysoká, častice sa budú k sebe prichytávať a tvoriť aglomeráty, ktoré sa musia preosievaním odstrániť. Ak je príliš nízka, nebudú MGP optimálne zhustené.

Ďalšie spracovanie častíc pri príliš vysokej teplote povedie ku strate magnetických vlastností. Príveľmi vysoká teplota by sa teda nemala používať. Presná teplota závisí od zloženia skla, ale môže byť v rozsahu 400 °C až 1200 °C. V prípade sklenej zmesi EJ je teplota spekania medzi 720 °C a 770 °C, najlepšie okolo 750 °C. Je na zručnosti pracovníka, aby našiel teploty pre každú sklenú zmes pri prihlíadnutí na poznatky predkladaného vynálezu. Podľa predkladaného vynálezu sa môže MGP prášok sušený rozprašovaním ďalej spracovať tak, ako je uvedené v obrázku 2 a opísané v príklade 1.4. Prednostne sa prášok zohreje počas 1 hodiny na 200 °C, prípadne ochladí na izbovú teplotu a zohreje na čas 1 hodiny na 750 °C (zahusťovanie alebo teplota spekania) v dusikovej atmosfére, s rýchlosťou ohrievania 1K/minútu a na tejto teplote sa udržiava 1 hodinu. Potom sa pec ochladí na 150 °C a potom sa opäť zohreje na čas 1 hodiny na 200 °C vzdušnej teploty (in air). Po ochladení na izbovú teplotu sa prášok preniesie na sito (50 µm) a po 30 minút preosieva. Preosiata vzorka sa preniesie do fliaš a 4 hodiny sterilizuje pri 200 °C; potom sa ochladí na 80 °C. Potom sa sklenené nádoby vyberú z pece, pokryjú sterilnou fóliou a uzatvoria.

Magnetické častice poskytované vynálezom sú prekvapivo vhodné zvlášť na izoláciu biologických materiálov zo vzoriek. Okrem toho je materiál jadra prírodným zdrojom a teda nepredstavuje vážny ekologický problém. Navyše nie sú častice podľa vynálezu drahé a sú ľahko vyrábané.

Iným predmetom vynálezu je postup na izoláciu biologických materiálov, ktorý je taký, že sa vzorka obsahujúca biologický materiál v tekutine zmieša s magnetickými časticami vynálezu za podmienok, keď dôjde k naviazaniu biologického materiálu na povrch častíc a oddelenie biologického materiálu od tekutiny. Podľa vynálezu výraz „v tekutine“ znamená, že tekutina sa môže pridať ku vzorke pred tým, ako sa pridajú magnetické častice. Ale bude tiež zahrňovať situáciu, keď sama vzorka má nízku viskozitu a je sama osebe tekutinou, takže sa žiadna ďalšia tekutina alebo pufer nemusí na prípravu vzorky pridávať; príprava sa môže uskutočniť pridaním pevných činidiel pred pridaním magnetických častíc. Poradie pridávaných činidiel sa môže líšiť podľa požiadaviek procesu.

Biologickými materiálmi sa myslia materiály so špecifickým alebo molekulárnym základom. Zahrňujú zvlášť bunky, ako vírusy alebo baktérie, tiež izolované bunky z mnohobunkových organizmov, ako napríklad ľudské a zvieracie bunky, ako leukocyty, ďalej imunologicky aktívne nízko a vysoko molekulárne chemické zlúčeniny, ako haptény, antigény, protilátky a nukleové kyseliny. Nukleové kyseliny ako DNA alebo RNA sú zvlášť uprednostňované. V jednej forme vynálezu sa purifikujú zmesi špecifických nukleových kyselín, kde môže byť cieľová nukleová kyselina (nukleové kyseliny) menšinou súčasťou, pokiaľ ide o koncentráciu (alebo môže byť prítomná v malom množstve). Podľa predkladaného vynálezu cieľová nukleová kyselina bude záujmová nukleová kyselina, tzn. nukleová kyselina, ktorá bude skúmaná, pretože jej prítomnosť naznačuje určitý stav alebo ochorenie človeka alebo zvieratá. Napríklad prítomnosť vírusovej sekvencie (napr. vírusu hepatitídy B, vírusu hepatitídy C alebo vírusu ľudskej imunodeficiencie) ukazuje, že príslušný jedinec je infikovaný špecifickým vírusom. Potom by táto vírusová sekvencia bola cieľovou sekvenciou. Iné cieľové sekvencie sú sekvencie, ktoré naznačujú predispozície jedinca k určitému ochoreniu, ako napríklad dedičnému ochoreniu, ako je kosáčikovitá málokrvnosť alebo určité typy rakoviny. Tieto príklady by mali ilustrovať vynález, ale nemali by ho vymedzovať.

Vzorky podľa vynálezu zahrňujú klinické vzorky, ako krv, sérum, orálne výplachy, moč, mozgovú tekutinu (cerebral fluid), sputum, stolicu, bioptické vzorky a vzorky krvnej drene. Vzorky tiež môžu byť ich rôzne typy používané pri analýze prostredia, analýze potravín alebo molekulárne biologickom výskume, napríklad z bakteriálnych kultúr, lyzátov fágov a produkty amplifikačných procedúr, ako je treba PCR.

Opísané procedúry sa môžu použiť na izoláciu prírodných alebo modifikovaných biologických materiálov. Prírodným biologickým materiálom sa rozumie materiál, ktorého štruktúra nebola nezvratne zmenená pri zrovnaní s prirodzene sa vyskytujúcimi biologickými materiálmi. To ale neznamená, že iné zložky vzorky nemôžu byť modifikované. Modifikované biologické materiály zahrňujú materiály, ktoré sa nevyskytujú v prírode, napríklad nukleové kyseliny, ktoré sú modifikované pripojením skupín, ktoré sú reaktívne a ktoré umožňujú detekciu alebo imobilizáciu. Príkladom sú biotinylované nukleové kyseliny.

V určitých prípadoch môže byť vzorka použitá v izolačnej procedúre podľa predkladaného vynálezu bez predbežnej úpravy. Vo veľa prípadoch by ale mala byť vzorka vhodnou metódou lyzovaná, čím sa uvoľní biologický materiál obsiahnutý vo vzorke.

Procedúry na lýzu vzoriek sú odborníkom známe a môžu byť chemickej, enzymatickej alebo fyzikálnej povahy. Tiež sa dá použiť kombinácia týchto procedúr. Lýza sa môže uskutočniť napríklad ultrazvukom, vysokým tlakom, strižnými silami, s využitím alkálií, detergentov alebo chaotropných solných roztokov, alebo pomocou proteínáz či lipáz. Čo sa týka lyzačného postupu na získanie nukleových kyselín, špeciálnou referenciou je Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition*, Cold Spring Harbour University Press, Cold Spring Harbour, NY a Ausubel et al.: *Current Protocols in Molecular Biology 1987*, J. Wiley and Sons, NY.

Okrem biologického materiálu, ktorý má byť izolovaný, môže vzorka v tekutine tiež obsahovať ďalšie zložky, ako zvyšky buniek, proteíny, soli a ďalšie látky, ktoré sa nemajú izolovať. Táto vzorka, ktorá prednostne obsahuje biologický materiál v prírodnej forme, sa zmieša s časticami za podmienok, keď sa cieľový

biologický materiál naviaže na povrch častice. Tieto podmienky závisia od typu dotýčného biologického materiálu, ale v zásade sú známe. Tiež závisia od metódy, ktorou sa biologický materiál viaže na povrch. Ak sa na naväzovanie využívajú napríklad imunologické reakcie, musia sa vybrať podmienky, ktoré sú vhodné na tvorbu imunokomplexu. Ak sa používajú modifikované nukleové kyseliny, k naviazaniu môže dôjsť cez skupiny nukleových kyselín, ktoré predstavujú modifikáciu, napríklad biotín naviazuci sa na streptavidínom potiahnuté povrchy. Najmä pri nukleových kyselinách sa ale uprednostňuje priame naväzovanie nukleových kyselín na sklo, pretože (okrem iných dôvodov) sa nukleové kyseliny nemusia modifikovať a dokonca sa môžu viazať aj prírodné nukleové kyseliny. Postup na naväzovanie prírodných nukleových kyselín na sklenené častice môže byť analogický postupu opísanému skoršie. Prednostne sa uskutočňuje v prítomnosti chaotropných solí v koncentrácii medzi 2 a 8 mol/l, alebo lepšie medzi 4 a 6 mol/l. Chaotropnými soľami môžu byť jodid sodný, chloristan sodný, guanidín tiokyanát, guanidín izotiokyanát alebo guanidín hydrochlorit. Možné sú aj iné zlúčeniny.

Zmiešaním vzorky s časticami sa dostane vzorka s časticami do vzájomného kontaktu - inkubácia prebieha po dobu dostatočnú na to, aby mohlo dôjsť k naviazaniu. Odborníci sú spravidla zoznámení s dobou nevyhnutnou na inkubačný krok odvodením z postupov, kde sa používajú nemagnetické častice. Tento krok sa môže optimalizovať určením množstva naviazaného biologického materiálu na povrch v rôznych časových intervaloch. Vhodné inkubačné časy pre nukleové kyseliny môžu byť medzi 10 sekundami a 30 minútami.

V závislosti od veľkosti a typu magnetických častíc sú častice buď oddelené od tekutiny počas vlastnej inkubačnej periódy, alebo suspenzia zostane nedotknutá po dlhšie časové obdobie. Ak sú častice veľmi malé a nezmagnetizované, zostane suspenzia neporušená po dlhšie časové obdobie. Ak majú častice väčší rozmer, častica sa pomaly počas inkubačnej doby oddeľujú od tekutiny.

Imobilizácia sa prednostne neuskutočňuje precipitáciou, znížením rozpustnosti materiálov, ktoré majú byť imobilizované. Imobilizácia je skôr založená na biošpecifických interakciách (zачytenie molekúl) alebo adsorpcii. To z veľkej časti zabraňuje tomu, aby dochádzalo k zahrnutiu kontaminujúcich látok.

Po inkubácii sa biologický materiál oddelí od tekutiny. Použitím magnetického poľa sa všeobecne dosiahne oddelenie materiálu naviazaného na magnetické častice. Napríklad magnetické častice sa môžu priťahovať ku stene nádoby, v ktorej dochádzalo k inkubácii. Tekutina obsahujúca obsah vzorky, ktorý sa nenaviazal na magnetické častice, sa potom môže odstrániť. Proces použitý na odstránenie závisí od typu nádoby, v ktorej sa uskutočňovala inkubácia. Medzi vhodné kroky patrí odstránenie tekutiny pipetovaním alebo odsávaním.

Ak je to žiaduce, magnetické častice sa môžu ďalej jeden raz alebo viackrát prečistiť použitím premývacieho roztoku. Použije sa premývacie roztok, ktorý nespôsobí uvoľnenie biologického materiálu z povrchu častíc, ale obmyje čo možno najlepšie nežiaduce kontaminanty. Premývacie kroky sa najlepšie uskutočnia inkubáciou premývacieho roztoku s časticami. Častice sú najlepšie počas tohto kroku resuspendované, napríklad pretrepaním alebo aplikáciou magnetického poľa, ktoré nie je identické s tým, ktoré sa použilo prvý raz. Kontaminovaný premývacie roztok sa prednostne oddelí rovnako ako vzorka v kroku na naväzovanie biologického materiálu opísanom skôr.

Po poslednom premývanom kroku sa môžu magnetické častice rýchlo vysušiť pomocou vákua alebo sa môže nechať roztok vypariť. Tiež sa môže použiť krok s predbežnou úpravou acetónom. Ak sa to vyžaduje, biologický materiál purifikovaný týmto spôsobom sa môže od magnetických častíc oddeliť. Tento krok tiež závisí od spôsobu, ktorým sa biologický materiál naviazal na magnetické častice. Ak sú biologickým materiálom prírodné nukleové kyseliny a magnetické častice sú sklom potiahnuté častice, nukleové kyseliny sa môžu uvoľniť od častíc podľa vynálezu s použitím elučného pufru s nízkou koncentráciou soli. Pufre týchto vlastností sú známe z DE 3724442 a Analytical Biochemistry 175, 196 - 201 (1998). Vymývacími pufriami s nízkym obsahom soli sú najmä pufre s obsahom nižším ako 0,2 mol/l. V inej špeciálnej forme je vymývacím pufrom demineralizovaná voda.

V ešte ďalšej forme sa uskutočňuje opísaná purifikčná a izolačná procedúra potom, čo sú bunky (napríklad vírusové častice alebo prokaryontné či eukaryontné bunky) oddelené imunomagneticky z telových tekutín alebo pletiva. V tomto kroku je vzorka inkubovaná, napríklad pri pretrepávaní s magnetickými časticami, ku ktorým je pripojená protilátka proti antigénu. Tieto častice môžu byť častice podľa vynálezu, alebo komerčne dostupné častice (napríklad MACS Microbeads od Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemecko). Potom, čo sa aplikuje magnetické pole, sa uskutoční jeden alebo viacej premývacích krokov s využitím soľných roztokov. Získajú sa častice, ku ktorým sú prichytené žiaduce bunky. Prichytené bunky sú potom resuspendované v soľnom pufri. V preferovanom prípade je tento soľný pufer chaotropný soľný roztok, takže nukleové kyseliny v bunke sú z buniek uvoľnené.

Zvlášť výhodné purifikačné procedúry na izoláciu nukleových kyselín zo vzoriek obsahujúcich bunky sa dosiahne kombináciou izolácie buniek opísanou skôr, s izoláciou nukleových kyselín opísanou tiež skôr, na magnetických časticách podľa vynálezu. Výhoda tejto formy je v potenciálnej jednoduchosti (metóda využívajúca jednu skúmavku), vysokej citlivosti (zvlášť dôležitá v lekárskej mikrobiológii a onkológii) a v jednoduchosti, s ktorou môže byť automatizovaná.

Biologické materiály, izolované s využitím postupu podľa vynálezu, sa teraz môžu použiť podľa potreby ďalej. Môžu sa napríklad použiť ako substráty na rôzne enzymatické reakcie. Ak ide o nukleové kyseliny, môžu sa použiť na sekvenovanie, rádioaktívne alebo nerádioaktívne označenie, amplifikáciu jednej alebo viacej sekvencií ktoré obsahujú, transkripciu, hybridizáciu s označenými nukleovými kyselinami, transláciu alebo ligáciu. Výhoda postupu podľa vynálezu je v tom, že sa veľmi ľahko oddelí biologický materiál od te-  
 5 kutiny. Skôr sa na oddelenie sklenených častíc od kontaminantov používal centrifugačný krok, alebo sa (keď bol biologický materiál prichytený na sklenená vlákna) tekutina odstránila cez filtre. To je obmedzujúci krok, ktorý predstavuje spracovanie veľkého množstva vzoriek ťažko. Biologické materiály sa môžu od kontami-  
 10 nantov oddeliť účinnejšie s využitím častíc podľa vynálezu. Najmä inhibítory určitých enzymatických reakcií sa môžu do značnej miery odstrániť podľa vynálezu.

V preferovanom prípade sa častice podľa vynálezu pridávajú k lyzovanej zmesi. Po vhodnom časovom úseku nutnom na adsorpciu (ktorý sa môže optimalizovať mechanickým pretrepaním) sa častice separujú od okolitej tekutiny, obsahujúce bunkové komponenty, ktoré sa nemajú detekovať. To sa uskutoční prednostne aplikáciou magnetického poľa umiestnením magnetu ku stene nádoby.

Na odstránenie všetkých kontaminantov, ktoré môžu stále byť prítomné, sa uskutoční prednostne premý-  
 15 vací krok s roztokom, ktorý neuvolní nukleové kyseliny, ktoré majú byť určené, od skleneného povrchu. Na uvoľnenie nukleových kyselín zo skleneného povrchu sa pridá elučný pufer s reakčnými podmienkami, ktoré to umožnia. Týmito podmienkami sú najmä podmienky s nízkym obsahom solí. V závislosti od zamýšľaného  
 20 ďalšieho použitia nukleových kyselín sa môže tento roztok teraz oddeliť od častíc a ďalej spracovať. Tento separačný krok sa uskutoční prednostne aplikáciou magnetického poľa, takže sa častice oddelia od eluátu.

Preferovanou formou predkladaného vynálezu je použitie MGP predkladaného vynálezu v automatizova-  
 25 telných metódach, ako napríklad opísaných v WO 99/16781. Automatizovateľná metóda znamená, že kroky metódy sú vhodné na uskutočnenie aparátom alebo prístrojom schopným pracovať s malou, alebo bez von-  
 30 kajšej kontroly či ovplyvňovania ľudskou osobou. Iba prípravné kroky metódy sa môžu uskutočniť ručne, napríklad skladovacie nádoby musia byť naplnené a umiestniť na miesto, človek musí uskutočniť výber vzor-  
 35 iek a ako vedia odborníci, aj ďalšie kroky, napríklad práca s ovládacím počítačom. Aparát alebo prístroj mô-  
 že napríklad automaticky pridať tekutiny, miešať vzorky alebo uskutočniť inkubačné kroky pri určitej teplo-  
 te. Typicky je takýto prístroj alebo aparát robot ovládaný počítačom, ktorý vykonáva program, kde sú špeci-  
 fikované jednotlivé kroky a príkazy. Preferovanými automatickými metódami sú tie, ktoré sa uskutočňujú vo  
 40 formáte umožňujúcom vysokú priechodnosť, čo znamená, že metódy a používané prístroje alebo aparáty sú  
 optimalizované pre vysokú priechodnosť vzoriek v krátkom čase.

V inej forme sú MGP podľa predkladaného vynálezu použité v poloautomatickom postupe, čo znamená, že sa niektoré reakčné kroky môžu robiť manuálne. V preferovanej forme vynálezu sa vezme zo skladovacej  
 35 nádoby suspenzie obsahujúce MGP podľa predkladaného vynálezu a pridá sa v určitom množstve k rôznym  
 reakčným nádobám. Reakčnými nádobami môžu byť reakčné skúmavky vyrobené z plastiku alebo mikrotit-  
 račné doštičky s 69 alebo 384 (alebo aj viacej) jamkami, kde môže prebehnúť reakcia. Tieto nádoby môžu ale  
 byť aj z iných materiálov, napríklad zo železa.

Preferovanou formou vynálezu sú purifikačné metódy nasledované detekčným krokom alebo purifikačné  
 40 metódy nasledované amplifikačným a detekčným krokom. Cieľová nukleová kyselina alebo nukleové kyseli-  
 ny, ktoré nás zaujímajú, môžu byť obsiahnuté v prostredí niecieľových nukleových kyselín a môžu byť do-  
 konca minoritnou súčasťou tejto spomínanej zmesi špecifických nukleových kyselín. Vhodné DNA detekčné  
 metódy sú známe odborníkom v tejto oblasti a sú opísané v štandardných učebniciach, ako Sambrook et al.:  
 45 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Addition, Cold Spring Harbour University Press, Cold Spring  
 Harbour, NY a Ausubel et al.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. Pred  
 detekciou DNA sa môže uskutočniť ďalší purifikačný krok, napríklad precipitačný krok. Detekčné metódy  
 môžu zahŕňať okrem iného naväzovanie alebo interkaláciu špecifických farieb, ako je etidiumbromid, kto-  
 rý sa vmedzerí do dvojpramennej DNA a tak zmení svoju fluorescenciu. Purifikovaná DNA sa môže tiež  
 50 rozdeliť pomocou elektroforetických metód, niekedy na rozštiepenie reštrikčnými enzýmami, a potom vizua-  
 lizovať. Jestvujú tiež stanovenia založené na sondách, ktoré využívajú hybridizáciu oligonukleotidov k špeci-  
 55 fickým sekvenciám a s následnou detekciou hybridu. Je tiež možné, po určitých krokoch známych odborní-  
 kom, DNA sekvenovať. Novšie metódy využívajú rôznorodosti DNA sekvencií v spojení s kremíkovým či-  
 pom, ku ktorému sú prichytené špecifické sondy - pri naviazaní komplementárnej sekvencie poskytujú sig-  
 nál.

Preferovanými metódami podľa predkladaného vynálezu sú amplifikačné metódy, ako ligázová reťazová  
 55 reakcia a polymerázová reťazová reakcie, ktoré špecificky amplifikujú cieľovú sekvenciu na detegovateľné  
 množstvo. Zvlášť preferovanými detekčnými metódami sú TaqMan metódy, uvedené v WO 92/02638 a zod-  
 povedajúcich US patentoch US 5 210 015, US 5 804 375, US 5 487 972. Táto metóda využíva exonukleázovú  
 60 aktivitu polymerázy na tvorbu signálu. Podrobnejšie nukleová kyselina je detegovaná postupom zahrnujú-  
 cim kontakt vzorky s oligonukleotidom, obsahujúcim sekvenciu komplementárnej k oblasti cieľovej nukleo-  
 vej kyseliny a s označeným oligonukleotidom, ktorý obsahuje sekvenciu komplementárnu k inej oblasti toho

samého reťazca cieľovej nukleovej kyseliny, ale nie tej sekvencii nukleovej kyseliny, ktorá bola definovaná prvým nukleotidom; tým vznikne pri hybridizačných podmienkach zmes duplexov zahrnujúcou cieľovú nukleovú kyselinu s prichyteným prvým oligonukleotidom a s označeným oligonukleotidom tak, že 3'-koniec prvého nukleotidu je priľahlý 5'-koncu označeného nukleotidu. Potom sa na túto zmes pôsobí s od templátu závislú od polymerázy nukleových kyselín s 5'-3'nukleázovou aktivitou, za podmienok dostatočných na túto 5'-3'nukleázovou aktivitu polymerázy rozštiepiť pripojený označený nukleotid a uvoľniť označený fragment; signál produkovaný hydrolyzou označeného oligonukleotidu je detegovaný a/alebo meraný. TaqMan technológia eliminuje potrebu reakčných komplexov naviazaných na pevnú fázu nutných na detekciu.

Vo všeobecnejšom zmysle je uvedená procedúra na purifikáciu biologického materiálu nasledovaná detekčným krokom, kde je amplifikačná a/alebo detekčná reakcia homogénnym multiplexovým testom v roztoku na súčasnú detekciu viacej cieľov (pozri príklad 7.2).

V inej forme vynálezu je opísaný purifikačný postup kombinovaný s amplifikačným postupom s využitím jednej z ďalej opísaných metód, prednostne využitím blokujúcich nukleotidov. Problém často spojený s amplifikáciou, najmä malých množstiev nukleových kyselín, je aktivita termostabilnej polymerázy pri nižšej teplote (izbová teplota až do 40 °C). Pri tejto teplote sa primérové oligonukleotidy často viažu nespecificky jeden ku druhému alebo k nespecifickej nukleovej kyseline a môžu byť polymerázou predĺžované. To má za následok pokles reakčných komponentov a tiež vyššiu hladinu pozadia a nasledovne zníženie citlivosti. Tiež to môže viesť k falošne pozitívnym výsledkom. Aby sa obmedzila nespecifická aktivita polymerázy, bolo opísané niekoľko postupov, ako „hot-start“-PCR (Chou et al., 1992, Nucl. Acid Res. 20, 1717 - 1723), použitie kovalentne modifikovanej polymerázy (napr. AmliTaq Gold, Perkin Elmer) alebo protilátky (Scalice et al., J. Immunol. Methods, 172, 147 - 163, 1994) a oligonukleotidov (Dang a JMB 264, 268 - 278, 1996; US 5 763 173; US 5 693 502). Podľa predkladaného vynálezu blokujúce oligonukleotidy budú oligonukleotidy, ktoré sú schopné blokovať aktívne centrum polymerázy až do uvedenej teploty. Tieto oligonukleotidy môžu byť napríklad aptamér (aptamér), ako je to opísané v príklade 7.2.2.1.3

V inej forme vynálezu sa môžu použiť v amplifikačnej reakcii a nadväzujúcich detekčných metódach aptaméry (pozri napr. príklad 7.2.2.1.3) a/alebo samotné modifikované priméry (pozri napríklad príklad 7.2.2.1.3). To je výhodné a môže sa to považovať za vynález sám osebe, ktorý poskytuje lepšie výsledky. V preferovanej forme vynálezu je 3'-koncová nukleotidová báza, najlepšie adenín, modifikovaná p-(t-butyl)-benzyl zvyškom. Ďalšie modifikácie vrátane tých na 3'-1 pozícii sú opísané v EP 866 071 A2 a sú tak tu zahrnuté odkazom.

V ešte inej forme vynálezu na purifikáciu biologického materiálu nasledovaného detekčným krokom je uvedený (postup), kde je aspoň po 5 cyklov polymerázovej reťazovej reakcie teplota nasadenia primérov (annealing temperature) nižšia o 8 °C, alebo lepšie nižšia ako 3 °C, ako disociačná teplota komplexu polymé-  
ráza-aptamér.

Nasledujúce príklady slúžia na ilustráciu foriem vynálezu.

Opis obrázkov:

Obrázok: Schéma postupu na výrobu sol syntézou a sušením rozprašovaním.

Obrázok 2: Schéma postupu pri príprave surových MGP.

Obrázok 3: Schematické zobrazenie rozprašovacej sušičky - výrobok Nubilosa. Detaily sú opísané v texte pod príkladom 1.3.

Obrázok 4: Vysokorozlišujúci obrázok MGP s Merck pigmentom BM z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 5: Vysokorozlišujúci obrázok MGP s CERAC pigmentom z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 6: Vysokorozlišujúci obrázok MGP s Merck pigmentom MMB z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 7: Vysokorozlišujúci obrázok MGP sa Strem pigmentom z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 8: Vysokorozlišujúci obrázok MGP s BASF pigmentom FA z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 9: Vysokorozlišujúci obrázok MGP s BASF pigmentom CE-HQ z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 10: Vysokorozlišujúci obrázok MGP s BASF pigmentom CE-SU z rastrovacieho elektrónového mikroskopu.

Obrázok 11: Vplyv magnetického jadrového pigmentu alebo rozprašovacej sušičky na izoláciu RNA (rozprašovacia sušička: Büchi (B) alebo Nubilosa (N)).

Obrázok 12: Vplyv parametra „rozprašovací tlak“ na izoláciu DNA alebo RNA.

Obrázok 13: Vplyv rôznych parametrov pri produkcii MGP na izoláciu RNA (rozprašovací tlak, (L = vzduch, N = dusík), teplota prívodu (E) alebo teplota vývodu (A))

Obrázok 14 a, b: Sedimentačné správanie rôznych MGP v rôznych suspenzných médiách.

Obrázok 15: HREM-obraz vzorky EJ0096.5R-01; MGP s CERAC pigmentom.

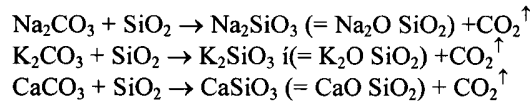
Obrázok 16: HREM-obraz vzorky EJ0100.5R-01, rozprášená pri nízkom tlaku a vysokej teplote, skladajúcej sa hlavne z deformovaných p-častíc.

5

Príklad 1: Výroba magnetických sklenených častíc

Klasicky, surové materiály ako  $\text{SiO}_2$  a alkalické uhličitaný alebo uhličitaný alkalických zemín ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  alebo  $\text{CaCO}_3$ ) sa spoločne roztopia.

10 Typ reakcie:

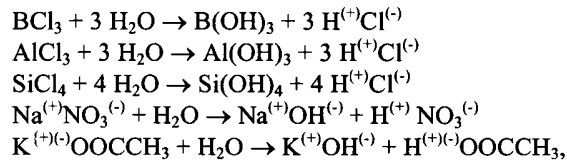


15

Vo väčšine prípadov sa ale používa kompozitná matica silikátov, boritanu a hlinitanu, tzn. v súvisiacich matrix je  $\text{SiO}_2$  čiastočne nahradený  $\text{B}_2\text{O}_3$  a  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Alebo sa sklo môže syntetizovať sol-gél reakciou.

Typ reakcie:

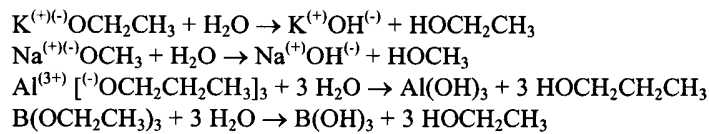
20 buď kyselinou katalyzovaná sol-gél reakcie, napríklad:



25

alebo zásadou katalyzovaná, ako v našom prípade, napríklad:

30

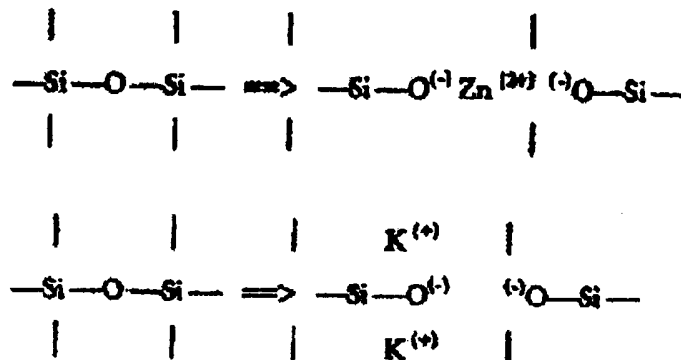


35

Výhoda: alkoholy sa počas sušenia rozprašovaním ľahko vyparia; v ideálnom prípade nedochádza k rekrystalizácii solí na povrchu.

Alkoholáty sú teda zmenené na hydroxidy, ktoré po eliminácii vody poskytujú zodpovedajúce oxidy. Tie nasledovne vytvoria 3-rozmernú amorfnú sklenenú hmotu skladajúcu sa z  $\text{SiO}_2/\text{B}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ , do ktorej sú začlenené určité oxidy kovov, ako oddeľovače väzby matrix (matrix bond separators), napr.

40



Pre experimenty tu opísané boli sklenené zložky pripravené sol-gél syntézou katalyzovanou zásadou. Zloženie skla vo všetkých experimentoch (pokiaľ nie je uvedené inak) bolo nasledujúce:

45 70,67 Mol %  $\text{SiO}_2$ , 14,33 Mol %  $\text{B}_2\text{O}_3$ , 5,00 Mol %  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 4,00 Mol %  $\text{K}_2\text{O}$ , 2,00 Mol %  $\text{CaO}$ , 4,00 Mol %  $\text{ZnO}$ 

(vypočítané z hmotnosti jednotlivých zložiek vnesených do reakcie)

## 1.1 Opis skúmaných magnetických pigmentov

Skúmali sa rôzne typy magnetických pigmentov a výsledky sú zhrnuté v tabuľke 1.

## 1.2 Výroba poťahovacieho solu (EJ-zmes)

5 Výťažky (educts) sa pridávajú v nasledujúcom poradí a množstvách do vyhrievateľnej premiešovateľnej nádoby:

	Tetraetoxysilán (Tetraethoxysilane - TEOS)	10700	ml
	Trietylborát (Triethylborate - TEB)	3305	ml
	K-metanolát		
10	(K-metanolate) 25 % (váha/objem) v metanole etanol	1601	ml
		11292	ml
	Izopropanolát hliníka (aluminiumisopropanolate)	1385	g
	Vápnik	54,4	g
	Octan zinku (Zincacetate)	498	g

15

Potom sa nádoba uzatvorí. Sol sa zohreje na 70 °C a premiešava cez noc (15 h). Teplota sa reguluje pomocou termosenzorov, ktoré sú ponorené do tekutiny.

Potom sa sol zohrieva na 90 °C a pridá sa zmes alkohol/voda (etanol: 3781 ml, H<sub>2</sub>O: 1512 ml) rýchlosťou 5000 ml/h. Po úplnom pridaní tejto zmesi sa nádoba ochladí na 20 °C.

20

Otvorí sa veko a za intenzívneho premiešavania sa pridá 10 249 g magnetického pigmentu (CERAC). Pripravený sol sa hadicou premiestni do rozprašovacej sušičky.

## 1.3 Sušenie rozprašovaním

25 Teplota prívodu rozprašovacej sušičky je nastavená na 200 °C. Tlak dýzy je nastavený na 6 barov a dýza sa 3 minúty ochladzuje etanolom. Potom sa pripojí na vývod sklenenej nádoby hadice a pigment obsahujúci sol sa pumpuje ultrazvukovým zariadením (200W) rýchlosťou 110 ml/min. do dvojkvapalinovej dýzy (priemer otvoru: 2 mm; dodávateľ: Nubilos, Type IB1WS1) rozprašovacie sušičky. Sušiacie rozprašovacie zariadenie je znázornené schematicky na obrázku 3. Častice vytvorené počas prvých dvoch minút sa vyhodia. Po úplnom rozprašení solu sa kontajner pod odlučovačom (cyclone) (AVO, pozri obrázok 3) s časticami odobere a častice sa v ďalších krokoch upravujú.

30

Aby sa predišlo sedimentácii suspendovaných častíc, pigment obsahujúci sol sa mieša v miešacej nádobe. Sol sa premiestni z nádoby do dýzy pomocou pumpy (SP). Ako sušiaci plyn sa využíva dusík ohrievaný elektrickým zohrievacím zariadením (EWT). Obalený pigment sa premiestni zo sušiacej komory (T) do odlučovača (ZY). Suchý prášok sa potom vyberie z kontajneru (AVO) pod odlučovačom. Veľmi jemné častice sa odstránia dusíkovým filtrom (SF). Aby sa zabránilo nasiatiu vzduchu do sušičky používa sa rozprašovacia sušička s pretlakom. Vzduch je fúkaný pomocou dúchadla (AV).

35

## 1.4 Ďalšie spracovanie rozprašovaním vysušeného prášku

40 Prášok sa preniesie do keramickej misky a zohreje v peci na 200 °C rýchlosti 1K/min. Potom sa teplota 200 °C udržiava počas jednej hodiny a potom sa pec ochladí na izbovú teplotu. Miska sa preniesie do atmosférickej pece s objemom 27 l, ktorá sa premyva 60 l dusíka za hodinu. Pec sa zohreje na 750 °C rýchlosťou 1K/min. a táto teplota sa udržiava 1 hodinu. Potom sa pec ochladí na 150 °C a premyje 60 l vzduchu za hodinu. Pec sa zohreje na 200 °C rýchlosťou 2K/min.; táto teplota sa udržiava 1 hodinu a potom sa ochladí na teplotu. Potom sa prášok preniesie na sito (50 µm) a 30 minút preosieva. Preosiata vzorka sa naplní do sklenených nádob, ktoré sa nezatvorené sterilizujú v peci zohriate rýchlosťou 1 K/min. na 200 °C; táto teplota sa udržiava 4 hodiny a potom sa zníži na 80 °C. Potom sa sklenené nádoby vyberú z pece, pokryjú sterilnou fóliou a uzatvoria viečkom. Prehľad dôležitých parametrov procesu je v tabuľke 2 a tabuľke 3, pripravenej individuálnej vzorky s niektorými údajmi sú poskytnuté v tabuľke 3. Každá vzorka má špecifický kód. Prvé dve písmena opisujú použitú chémiu skla (pozri nižšie) a ďalšie štyri čísla kódujú výrobný proces (pozri tabuľka 2). Ďalšie číslo opisuje použitý pigment (tabuľka 1). Písmeno R znamená, že sa neodstránil jemný obsah, zatiaľ čo písmeno E znamená, že sa jemný obsah etanolom odstránil. Posledné dve číslice opisujú číslo šarže. Zloženie skla (kód EJ) vypočítané z množstva zložiek vnesených do reakcie bolo 70,67 Mol % SiO<sub>2</sub>, 14,33 Mol % B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,00 Mol % Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,00 Mol % K<sub>2</sub>O, 2,00 Mol % CaO, 4,00 Mol % ZnO. Zloženie skla (kód RN) bolo 74 Mol % SiO<sub>2</sub>, 15 Mol % B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,00 Mol % Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,00 Mol % K<sub>2</sub>O, 2,00 Mol % CaO. Zloženie skla (kód EP) bolo 73,61 Mol % SiO<sub>2</sub>, 14,93 Mol % B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,21 Mol % Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,17 Mol % K<sub>2</sub>O, 2,08 Mol % CaO.

55

## 2 Príklad 2: Vysokorozlišovacia rastrovacia elektrónová mikroskopia

60 Aby sa získala informácia o povrchu, veľkosti a tvare MGP, uskutočnili sme vysokorozlišovaciu rastrovaciu elektrónovú mikroskopiю (výrobok firmy JEOL - JSM). Vzorky sa elektricky vodivým obojstranným

spojivom (electrically conducting double-sided adhesive) rozptýlili na nosič vzoriek a poprášili zlatom počas 36 sekúnd prúdom 30 mA. Na zobrazenie povrchu sa použili emitované sekundárne elektróny (topografia topography) a tiež spätne rozptýlené elektróny (back scattered electrons) (pravidelný číslovaný kontrast - order number contrast). Použité primárne elektrónové napätie bolo 10 kV (sekundárne elektróny) alebo

5 25 kV (spätne rozptýlené elektróny).

Obrázok 4 ukazuje MGP so sľudou, pokryté oxidom železitým ako magnetickým pigmentom (BM). Možno zreteľne vidieť trhlinu v sklenenom plášti, ktorá pochádza zo sušenia častíc rozprašovaním, keď sa začína zrážať vrstva na nezraziteľnom substráte (zmršťovacia trhlinka vzniká vysychaním). Okrem toho možno vidieť väčší počet guľovitých častíc, ktoré neobsahujú jednu z väčších magnetických častíc (10 až

10 60 µm). Tieto guľe bez magnetického jadra (jemný nemagnetický obsah) sa nemôžu odstrániť v magnetickom poli, môžu sa preniesť do PCR reakcie a interferujú s touto reakciou.

Častice s CERAC pigmentom (pozri obrázok 5) nemajú trhliny, pretože magnetický pigment (priemerná veľkosť častice 23 nm) nevytvára vo vrstve tenzné sily, takže nedochádza k tvorbe trhlín pri procese sušenia rozprašovaním. Okrem toho sú malé CERAC častice tiež začlenené v jemnom obsahu, takže tu nie sú nemagnetické častice. Častice sú tiež podstatne menšie ako častice so sľudou, ktoré je možné pozorovať na týchto obrázkoch s rovnakým zväčšením. Na obrázkoch 6 až 10 sú tiež ukázané MGP s ostatnými magnetickými pigmentmi pri rovnakom zväčšení.

### 3 Príklad 3: Fyzikálny výskum MGP

20 Na zhodnotenie MGP pred skutočnými funkčnými testmi sa uskutočnilo okrem HREM skúmania ďalšie fyzikálne meranie MGP. Bolo zaujímavé poučiť sa o rozpustnosti železa vo vode, magnetickej sile, jemnom obsahu a hustote. Ďalej sú tieto experimenty opísané a uvedené výsledky.

#### 3.1 Meranie extinkcie

25 Aby sa testom zistilo, ak sa odstránili jemné častice, navázilo sa 1000 mg teplotne opracovaného a preosiateho prášku do 50 ml centrifugačnej kyvety (Sarstedt), pridalo sa 40 ml vody a trepaním sa obsah premiešal. Potom sa kyveta ponorí do výšky naplnenia (with the total filling height) do ultrazvukového kúpeľa (Sonorex (RK 102H; 120/240W) a potom sa umiestni do magnetického separátora (Roche Diagnostics GmbH RD Art Nr. 1858 025). Po 3,5 minútach magnetickej separácie sa sklenenou pastérkou odoberie z nádoby tekutina až k 15 ml značky na strane protiľahlej magnetu a tou sa naplní 5 mm kremenná kyveta (typ 110-QS, Hellma). Extinkcia supernatantu sa meria UV-VIS-NIR spektrofotometrom (Hitachi U-3000) oproti zodpovedajúcej kyvete naplnenej deionizovanou vodou. Aby sa zistil rozsah vlnových dĺžok absorpčných pásiem prípadných nečistôt, meralo sa v rozsahu 200 až 1100 nm v 1 nm krokoch. Extinkcia pri vlnovej dĺžke 280 nm a 400 nm sa zobrali ako referenčné.

35

#### 3.2 Meranie hustoty

Na meranie hustoty sa použil plynový pyknometer (AccuPyc 1330, Fa. Micromeritics). Ako plyn sa použilo hélium 6.0. Prístroj sa kalibroval poskytnutým štandardom (kovové guľôčky so známym objemom). Ďalej sa vzorka sušila aspoň 1 hodinu pri 150 °C a potom naplnila do meracieho kontajneru a zvážila. Po zmeraní sa kontajner umiestni do plynového pyknometra a použije sa 10 premývacích cyklov a 5 meracích cyklov na určenie priemernej hodnoty a štandardnej odchýlky.

40

#### 3.3 Určenie rozpustnosti železa

Rozpustnosť železa obalených (coated) a tepelne opracovaných vzoriek sa určí indukčne viazanou plazmou (Inductive Coupled Plasma), atómovou emisnou spektroskopiou (JY 24, spoločnosť ISA). Preto sa premiestnil 1 g vzorky do 50 ml polypropylénovej skúmavky naplnenej destilovanou vodou a udržoval 20 hodín pri teplote 60 °C. Potom sa vzorky filtrujú 0,2 µm injekčným filtrom a filtrát sa meria. Uskutočnia sa štyri jednoduché určenia pri vlnovej dĺžke 259,940 nm a potom sa z nich vypočíta priemerná hodnota.

45

#### 3.4 Meranie magnetickej sily

Na meranie magnetickej sily sa zvážila MGP úplne naplnená vážiaca skúmavka PP (Pp-weighing tube) (Company Licefa, Art. Nr. V2-3). Pomocou šablóny sa tento obal vzorky umiestni do stredu LDPE skúmavky (Company Kartell, TS 735), zaťažený mosadzou tak, že sa viečko skúmavky dalo stále zatvoriť. Nádoba sa pomocou inej šablóny umiestni do stredu váhy (presnosť váženia 0,1 g). Po ustanovení rovnováhy váh sa nad stupnicu umiestni plastický vršok, ktorý obsahuje magnet v tvare valca (priemer: 30 mm; výška: 113,5 mm; samárium-kobalt 2/17).

50

Tak sú MGP na váhe priťahované proti gravitácii a znižujú teda svoju váhu. Po ustanovení rovnováhy (1,5 minúty) sa určí úbytok váhy vzorky a hodnota sa štandardizuje na 250 mg MGP.

### 3.5 Výsledky

Výsledky fyzikálnej charakterizácie MGP s EJ zložením a rôznymi pigmentmi sú zhrnuté v tabuľke 3. Stojí za povšimnutie, že hodnoty extinkcie sú veľmi nízke, keď sa použije CERAC pigment. To sa môže vysvetliť nedostatkom nemagnetického jemného obsahu, pretože malé CERAC pigmenty (23 nm) sa môžu začleniť do každej magnetickej sklenenej častice. Hustota CERAC-MGP nie je príliš veľká. To má pozitívny vplyv na rýchlosť sedimentovania. Magnetická sila je podrobená veľkým výkyvom, ale je pozitívne ovplyvnená použitím CERAC pigmentov. CERAC-MGP majú pomerne vysoký únik železa do vody. Ale ani desaťnásobne vyššie hodnoty nevykazujú žiadny vplyv na proces PCR.

Stručne povedané sa môže definovať, že medzi rôznymi pigmentmi nie sú žiadne významné rozdiely vo fyzikálnych vlastnostiach, ale CERAC-MGP má veľmi nízky jemný obsah.

#### 4. Príklad 4: Vplyv magnetického jadrového pigmentu a rozprašovacie sušičky na BET povrch

Povrch sa určil s využitím prístroja od Micromeritics (Type ASAP 2400). Meranie sa uskutočňovalo pri teplote tekutého dusíka. Ako merací plyn sa použil dusík 5.0 (Nitrogén 5.0) a ako inertný plyn sa použilo hélium 4.6. Typicky sa na jedno meranie použil 5 g vzorky.

Povrch MGP hrá zrejmu rolu pri izolácii DNA a RNA. Čím je povrch väčší, tým viac DNA sa môže naviazať na to isté množstvo MGP. Je tiež možné použiť menšie množstvo MGP a dosiahnuť toho samého výsledku. To má za následok to, že je medzizrnový (intergrain) objem menší a že sa teda dostane menšie množstvo kontaminujúceho alkoholu do PCR reakcie. Údaje o zmeraných BET-povrchoch pri niektorých vzorkách sú zhrnuté v tabuľke 4. Keď sa porovnajú povrchy vzoriek pripravených na veľkých rozprašovacích sušičkách, malo by sa upozorniť na to, že vzorky s malými pigmentmi (BASF FA, STREM a CERAC) majú relatívne veľké povrchy, zatiaľ čo veľké pigmenty Merck majú malé povrchy. To môže byť spôsobené skutočnosťou, že veľké magnetické častice vytvárajú veľké MGP, zatiaľ čo malé magnetické častice sú zainkorporované do guľovitých kvapôčok počas procesu sušenia rozprašovaním a majú teda za podobných podmienok procesu sušenia rozprašovaním podobné povrchy. BASF CE-SU častice majú častice s veľkosťou od malých (ako BASF FA, STREM a CERAC) až po veľké Merck častice. V zrovnaní s Merck časticami nemajú štruktúrovaný povrch, takže tieto častice majú veľmi hladký sklenený povrch. To má za následok menší povrch. Pri menšej rozprašovacej sušičke sa použil vyšší tlak a dýza tejto rozprašovacej sušičky je výrazne menšia ako pri väčšej rozprašovacej sušičke. To vedie k menším časticám a výrazne sa zväčší povrch. To je v súlade s výsledkami príkladu 5.2.1.

Akýkoľvek vplyv magnetického pigmentu alebo rozprašovacieho tlaku na výsledky ďalších fyzikálnych skúmaní je nedefinovateľný okrem spomínaného vplyvu na tvorbu trhlín a jemný obsah. Ale iba meranie povrchu vykazuje priame spojenie s výsledkami funkčných skúmaní. Ďalšie výsledky fyzikálneho skúmania nevykazujú tento priamy vzťah.

#### Príklad 5: Väzobné štúdie pomocou stopovania rádioaktivity

Jestvuje niekoľko metód na hodnotenie MGP, čo sa týka ich vhodnosti na extrakciu nukleových kyselín. Stanovenie extinkcie pri 260 nm pred purifikáciou a po purifikácii nie je veľmi citlivé a nepodobá sa situácii, pri ktorej je extrahované malé množstvo cieľovej nukleovej kyseliny z klinického materiálu. Výsledky funkčných vyhodnocovacích metód, ktoré sa spoliehajú na metódy amplifikácie nukleových kyselín, ako sú napr. PCR, RT-PCR, NASBA či akékoľvek podobné metódy, nie sú väčšinou dostatočne presvedčivé. Okrem toho tieto metódy, ktoré sú vhodné na stanovenie malého počtu kópií cieľového genómu, sú náchylné na látky, ktoré sa môžu nachádzať vo vzorkách či na látky používané počas prípravy vzoriek. Väzobné štúdie pomocou rádioaktivity sú vhodnou analytickou metódou, ktorá dovoľuje analyzovať proces prípravy vzoriek krok po kroku. Dáta týkajúce sa účinnosti nie sú absolútne dáta, ale sú vždy relatívne na účinnosť referenčných častíc.

#### 5.1 Experimentálny protokol

Najskôr je syntetizovaná enzymaticky, pomocou PCR, rádioaktívne označená DNA alebo RNA alebo *in vitro* transkripciou, v prítomnosti <sup>32</sup>P označeného deoxynukleozidu alebo nukleozidtrifosfátu. Potom je označená DNA alebo RNA oddelená od voľných nukleozidtrifosfátov. Stanoví sa obsah nukleových kyselín a je pripravené definované nariadenie. Malé množstvo označenej DNA alebo RNA sa pridá do každej vzorky pred pokusom. Počas prípravy vzoriek sa za prítomnosti chaotropných látok všetka nukleová kyselina naviaže na MGP. MGP sú oddelené (peletované) vystavením magnetickému poľu a zleje sa supernatant. Pelet sa premyje a naviazané nukleové kyseliny sa eluujú pri zvýšenej teplote opačnými reakčnými podmienkami, napr. prídavkom elučného pufru s nízkym obsahom solí. Po naviazaní a prípadnom premývanom kroku sa alikvotná časť supernatantu nanesie na filter. Tiež eluát a vo vode dispergované MGP sa taktiež nanesú na filter. Filtre sa potom usušia a nakoniec sa meria ich rádioaktivita. Pre každú vzorku sa spočíta distribúcia rádioaktivity.

## 5.1.1 Príprava rádioaktívne označenej DNA

## 5.1.1.1 A. 1.1. Reagencie

- Expand High Fidelity PCR Systém (Roche Molecular Biochemicals, kat. č. 732641)
- zmes dNTP (Roche Molecular Biochemicals, kat. č. 1277049)
- 5 - deoxycytidín 5'-alfa-P32 Trifosfát dCTP 3000 Ci/mmol (Amersham kat. č. PB 102 05)
- lambda-DNA (Roche kat. č. 1029053), koncentrácia ng/ml - rádioznačkovací primér 1 (SEQ ID NO 1) koncentrácia
- 5,3 OD<sub>260</sub>/ml
- rádioznačkovací primér 2 (SEQ ID NO 2) koncentrácia
- 10 5,2 OD<sub>260</sub>/ml
- QIA Quick PCR Purification Kit (Qiagen kat. č. 28104)

## 5.1.1.2 Reakcia

- 29,5 µl dvojnásobne destilovanej vody
- 15 - 5 µl Expand High Fidelity pufer
- 2,5 µl zmesi dNTP (1 : 10) riedenej dvojnásobne destilovanou vodou
- 1 µl rádioznačkovací primér 1 (SEQ ID NO1)
- 1 µl rádioznačkovací primér 2 (SEQ ID NO2)
- 0,3 µl <sup>32</sup>P-dCTP
- 20 - 10 µl lambda-DNA
- 0,75 µl enzýmovej zmesi Expand High Fidelity

## 5.1.1.3 Amplifikácia

- 2 min. 94 °C
- 25 - 10 cyklov (10 sek. 94 °C/30 sek. 60 °C/60 sek. 72 °C)
- 20 cyklov (10 sek. 94 °C/30 sek. 60 °C/60 sek. 72 °C +10 sek. 72 °C predĺženie na cyklus)
- 7 min. 72 °C
- 4 °C

## 30 5.1.1.4 Purifikácia

- podľa protokolu QIA Quick PCR Purification Protocol (Qiagen)

## 5.1.1.5 Riedenie

- Riedenie DNA 1 : 10 v dvojnásobne destilovanej vode a meranie rádioaktivity
- 35

## 5.1.2 A.2. Príprava rádioaktívne označenej RNA

## 5.1.2.1 - Reagencie

- SP6/T7 Transcription Kit (Roche Molecular Biochemicals kat. č. 999644)
- Uridín 5'-alfa-P32 Trifosfát UTP 3000 Ci/mmol (Amersham kat. č. PB 10203)
- 40 - Plazmid pBKBH10S, linearizovaný EcoRI v koncentrácii 100 µl/ml
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals kat. č. 1828665)

## 5.1.2.2 - Reakcia

- 2 µl 10x pufru
- 45 - 3 µl zmesi NTP (AGC)
- 1 µl UTP (1 : 50 s dvojnásobne destilovanou vodou)
- 5 µl <sup>32</sup>P-UTP
- 7 µl linearizovaného plazmidu
- 1 µl RNase Inhibitor (Roche Molecular Biochemicals kat. č. 802808)
- 50 - 1 µl T7 RNA-Polymerázy

## 5.1.2.3 Transkripcia a rozštiepenie pomocou DNAzy

- 20 min. inkubácia pri 37 °C
- pridanie 2 µl DNAzy, RNase free
- 55 - 10 min. inkubácia pri 37 °C
- pridanie 178 µl dvojnásobne destilovanej vody

## 5.1.2.4 - Purifikácia

- podľa High Pure RNA Isolation Protocol (Roche Molecular Biochemicals)
- 60

## 5.1.2.5 Riedenie

Riedenie RNA v pomere 1 : 30 dvojnásobne destilovanou vodou a meranie rádioaktivity.

## 5.1.3 Príprava rádioaktívnej vzorky

## 5 5.1.3.1 Reagencie

- negatívna plazma
- Proteínáza K, koncentrácia 20 mg/ml (napr. Roche, č. 1942387) - Poly-A-RNA (napr. Roche, č. 1942387), koncentrácia 1 mg/ml, riedené 1 : 1000 (objem na objem) lyzačným pufrom
- 10 - lyzačný pufer (50 mM Tris pH 7,0, 15 % (obj./obj.) Polydocanol, SM guanidín izotiokyanát, 1 mM DTT)
- MGP (s EJ zložením skla a rôznymi pigmentmi jadra (BM, MMB, CERAC, STREM, BASF-FA, BASF-CE)) suspendované v izopropanole 60 mg/ml alebo 6 mg/ml
- premývací pufer (20 mM Tris pH 7,5, 20 mM NaCl, 70 % (obj./obj.) etanol)
- elučný roztok: redistilovaná voda
- 15 - pomocný materiál: Filter Whatman GF/D

## 5.1.3.2 Reakcia (protokol pre 1,5 ml)

- 80 µl Proteinkinázy K
- pridať 410 µl negatívnej plazmy a zamiešať
- 20 - pridať 500 µl lyzačného pufru a zamiešať
- pridať 10 µl rádioaktívne označenej DNA alebo RNA, zamiešať
- 10 min. inkubácie pri izbovej teplote za miešania
- pridať 500 µl suspenzie MGP (koncentrácia 6 mg/ml) a zamiešať
- 20 min. inkubácia pri izbovej teplote za miešania
- 25 - dvojminútové oddelenie v magnetickom separátore (Magnetic separator, Dynal)
- odstránenie supernatantu a nanosenie 300 µl na filter
- pridať 750 µl premývacieho pufru, zamiešať, 2 min. separovať
- odstrániť supernatant, prípadne naniesť 375 µl supernatantu na filter
- opakovanie premývacieho postupu dvakrát
- 30 - pridať 100 µl elučného roztoku, inkubácia 5 min. pri 80 °C za stáleho miešania
- separácia 2 min. v magnetickom držiaku, nanosenie supernatantu na filter
- pridanie 100 µl elučného roztoku, resuspendovať a naniesť MGP na filter
- usušiť filtre 60 min. pri 75 °C v sušiarňi
- preniesť filtre do scintilačných fľaštičiek, pridať 5 ml scintilačného roztoku a zmerať rádioaktivitu
- 35

## 5.1.3.3 Experimentálny protokol (na 1 ml)

- 25 µl Proteinkinázy K
- pridať 415 µl negatívnej plazmy a zamiešať
- pridať 500 µl lyzačného pufru a zamiešať
- 40 - pridať 10 µl rádioaktívne označenej DNA alebo RNA, zamiešať
- 5 min. inkubácie pri izbovej teplote pri miešaní
- pridať 50 µl suspenzie MGP (koncentrácia 60 mg/ml) a zamiešať
- 20 min. inkubácie pri izbovej teplote za miešania
- dvojminútové oddelenie v magnetickom separátore (Magnetic separator, Dynal)
- 45 - odstránenie supernatantu a nanosenie 300 µl na filter
- pridať 700 µl premývacieho pufru, zamiešať, 2 min. separovať
- odstrániť supernatant, prípadne naniesť 350 µl supernatantu na filter
- dvojnásobné opakovanie premývacích krokov
- pridať 120 µl elučného roztoku, inkubácia 10 min. pri 80 °C za stáleho miešania
- 50 - separácia 2 min. v magnetickom držiaku, nanosenie supernatantu na filter
- pridanie 100 µl elučného roztoku, resuspendovať a naniesť MGP na filter
- sušiť filtre 60 min. pri 75 °C v sušiarňi
- preniesť filtre do scintilačných fľaštičiek, pridať 5 ml scintilačného kokteilu a zmerať rádioaktivitu

## 5.2 Výsledky experimentov pomocou rádioaktívneho stopovania

## 5.2.1 Vplyv magnetického jadrového pigmentu alebo rozprašovacej sušičky na izoláciu RNA

Charakterizovali sa rozdielne typy MGP, ktoré sa pripravili s použitím EJ sklenenej chémie a rozdielne jadrá s nano alebo mikro veľkosťou (MMB, CERAC, atd.) a s použitím rozdielnych rozprašovacích sušičiek (Büchi alebo Nubilosa) s ohľadom na ich správanie počas extrakcie nukleových kyselín z materiálu prostého virusov (negatívna plazma). Charakterizácia sa uskutočnila pomocou rádioaktívneho stopovania, metódou podľa príkladu 5.1.3.2. RNA parameter sa počas štúdií ukázal ako najcitlivejší materiál a vybral sa preto ako typická veličina. Obrázok 11 ukazuje, že BASF-CF nie je vhodný ako materiál na jadro, pretože v eluáte sa nachádza iba malá časť naviazanej RNA. Častice EJ/CERAC, rozprašované pomocou systému Büchi pri 6 baroch, vykazovali rovnakú účinnosť ako referenčné častice EJ/MMB, ktoré boli rozprašované pomocou Nubilosa systému.

## 5.2.2 Vplyv parametra tlaku pri rozprašovaní na izoláciu DNA alebo RNA

Rozdielne typy MGP pripravené pomocou systému Nubilosa s použitím rozdielnych rozprašovacích tlakov sú porovnané podľa 5.1.3.3. Referenčnými časticami sú EJ/MMB MGP. Skúmali sa väzobné vlastnosti DNA a RNA. Zatiaľ čo DNA parametre neukazujú závislosť od rozprašovacieho tlaku, RNA parametre vykazujú významné rozdiely v účinnosti. Účinnosť častíc EJ/CERAC, pripravovaných pri rozprašovaní tlakom 1,5 barov s použitím systému Nubilosa, je nižšia, ako účinnosť referenčných častíc. Nižšia účinnosť je pri rade vzoriek pripravovaných rozprašovaním tlakom, ktorý sa menil medzi 1,5 a 3,4 barov (30 %). Častice, ktoré sú rozprašované tlakom 4,3 barov dosiahli 90 % účinnosti častíc, ktoré sú rozprašované tlakom 1,5 barov (pozri obrázok 12). Experimenty dokázali priamo súvislosť medzi parametrami prípravy MGP a účinnosťou v teste. Malo by sa poznamenať, že zvyšujúci sa tlak rozprašovania vedie k nižšej účinnosti v teste, ale od určitého rozprašovacieho tlaku sú vlastnosti častíc zlepšené a vedú k lepšej účinnosti.

## 5.2.3 Vplyv rozdielnych parametrov prípravy MGP na izoláciu RNA a DNA

Tieto experimenty by mali viesť ku zisteniu, či rozdielne rozprašovacie tlaky vedú k MPG s ešte lepšou účinnosťou.

Preto sa MGP pripravujú systémom Nubilosa za tlaku 1,5 barov, 4,3 barov a 6 barov a s použitím dusíka ako rozprašovacieho plynu. Aby sa dosiahol šetrného sušiacieho procesu, boli vstupné aj výstupné teploty rozprašovacej sušičky dodatočne znížené. Vplyv týchto faktorov na izoláciu RNA sa skúmal podľa 5.1.3.3. a MGP častice EJ/MMB slúžili ako referenčné.

Výsledky (pozri obrázok 13) ukazujú prekvapivý vplyv dramatického zníženia účinnosti, ktoré je spôsobené znížením teploty rozprašovania a ktoré sa nemohlo predvídať. Zvýšením rozprašovacieho tlaku sa mohlo dosiahnuť účinnosti referenčnej kvality. Takto pripravené častice sú lepšie ako referenčný materiál, pretože sú súčasne stabilnejšie v suspenzii.

## Príklad 6: Sedimentačná analýza magnetických sklenených častíc

## 6.1 Experimentálny protokol

Na zhodnotenie sedimentačných vlastností magnetických sklenených častíc sa použil Spektrofotometer Uvikon, Model 930 firmy Kontron Instruments. Tento spektrofotometer je modifikovaný tak, aby dovolil variabilné nastavenie kyvety pozdĺž mierky. Na meranie sa kyveta nastaví do polohy, v ktorej merací lúč s vlnovou dĺžkou 650 nm pretína kyvetu vo 2/3 plniacej výšky (meracia pozícia 7,5). Používajú sa makrokyvety z polystyrénu s objemom 4 ml a šírkou 1 cm. Pred meraním sa urobí kalibrácia pomocou jednodúčového postupu proti čistému suspenznému médiu. Vzorky MGP sú dispergované homogénne v suspenznom médiu, bežne pri pomere hmotnosť/objem 3 mg/ml, a ihneď namerané. Sledujú sa zmeny extinkcie v čase, kontinuálne pri danej vlnovej dĺžke (650 nm).

Fyzikálna veličina používaná na porovnanie sedimentačnej rýchlosti rozdielnych vzoriek je „polčas života“ ( $t_{1/2}$ ) v určitom suspenznom médiu. Je to časový úsek, v ktorom extinkcia suspenzie v hornej tretine kyvety klesne na polovicu hodnoty, ktorá bola na počiatku merania. Znižovanie extinkcie je spôsobené sedimentáciou častíc a s tým spojené prečistenie hornej tretiny testovaného objemu.

Opísané zariadenie ďalej umožňuje inštaláciu magnetu pod kyvetou. Takto môže byť stanovená rýchlosť magnetickej separácie.

## 6.2 Výsledky sedimentačnej analýzy

## 6.2.1 Experiment 1

Niekoľko typov MGP s rozdielnymi jadrami v rozmedzí nano alebo mikrometrov a vyrobených pomocou EJ sklenenej chémie sa skúmali spektrofotometricky - zisťovalo sa ich sedimentačné a separačné správanie, tzn. s magnetom a bez magnetu pod kyvetou. V tomto prípade bol pomer hmoty ku objemu 6 mg/ml. Suspenzné médium bola zmes izopropanolu a lyzačného pufru v pomere 1 : 1. Výsledky sú zosumarizované.

Častice typu CERAC vykazujú jasné výhody v stabilite suspenzie, ale nemajú žiadne nevýhody pre magnetickú separáciu (pozri tiež obrázok 14).

### 6.2.2 Experiment 2

5 Sedimentačné správanie rozdielnych MGP typu CERAC vyrobených sklenenou chémiou EJ bolo skúmané v čistom izopropanole.

Dôležité výrobné parametre:

EJ0100.5R-01 - rozprašovací tlak 1,5 baru, teplota na vstupe 230 °C, systém Nubilosa

EJ0108.5R-01 - rozprašovací tlak 4,3 baru, teplota na vstupe 230 °C, systém Nubilosa

10 EJ0096.5R-01 - rozprašovací tlak 6,0 baru, teplota na vstupe 150 °C, systém Büchi

EJ0096.5R-01 sú ukázané na obrázku 15. Tieto guľôčky sú väčšinou guľovité s vysoko štruktúrovaným povrchom a veľkosťou prevažne 0,5 - 5 µm. Vzorka EJ0100.5R-01 rozprašovaná pri nízkom tlaku a vysokej teplote sa skladá hlavne z deformovaných častíc v µm mierke (pozri obrázok 16, ktorý ukazuje funkčný ekvivalent k EJ0100.5R). Záverom možno konštatovať, že častice ako EJ0096.5R-01 vykazujú významné spomalenie sedimentácie, čo je najvýhodnejšie na prenos kvapalných suspenzií MGP (pozri obrázok 14b). Výsledky sú zosumarizované.

### Príklad 7: Funkčný test pomocou PCR

20 7.1 Heterogénne funkčné testy: amplifikácia PCR pomocou prístroja GeneAmp 9600 od firmy Perkin Elmer a detekcia biošpecifickým väzobným testom s chemiluminiscenčne označenou detekčnou sondou na modifikovanom Elecsys1010®.

#### 7.1.1 Všeobecné úvahy

25 Vírusové častice vo vzorke (napr. plazme) sú lyzované v prítomnosti proteáz, vysokej koncentrácie chaotropných solí a tiež detergentov. Potom sa pridá adsorbent častíc (= MGP) pre fyzikálne-chemickú adsorpciu uvoľnených nukleových kyselín na sklenený povrch. Nasleduje magnetická separácia a premytie pridaných guľôčok, tzn. separácia uvoľnených a naviazaných komponent. Nakoniec sa uskutoční disociácia naviazaných nukleových kyselín z guľôčok (= elúcia) za opačných reakčných podmienok, ako je tomu pri adsorpcii, čo znamená nízkou koncentráciou solí v pufrí či dokonca destilovanou vodou. Alikvótna časť eluátu sa potom zmieša s alikvótnou časťou PCR mastermixu na naštartovanie amplifikácie nukleových kyselín izolovaných v eluáte. Táto reakcia je charakterizovaná rovnicou:

$$N_i = N_o \times (1 + E)^n, \text{ kde}$$

$N_o$  = počet molekúl na počiatku PCR

$N_i$  = počet molekúl na konci PCR

$E$  = účinnosť amplifikácie =  $0 \leq E \leq 1$

35  $N$  = počet reakčných cyklov = typicky  $20 \leq n \leq 35$

Po PCR s aspoň jedným biotinylovaným primérom sa alikvót amplifikátu s naviazaným biotínom zmieša s hybridizačným pufrom a detekčnou sondou. Po inkubácii sa pridajú guľôčky potiahnuté streptavidínom a nasleduje ďalšia inkubácia. Nakoniec sa guľôčky premyjú, pridá sa signálny pufer a meria sa intenzita signálu chemiluminiscencie, ktorá zodpovedá množstvu amplifikovanej naviazanej nukleovej kyseliny a teda množstvu vírusu vo vzorke plazmy.

Odborník môže tiež uskutočniť ručne 1 ml protokol.

#### 7.1.2 Experimentálny protokol

##### 7.1.2.1 Reagencie

##### 45 7.1.2.1.1 Príprava vzorky

- Proteínáza K v roztoku octanu vápenatého v glycerole (20 mg/ml)

- Poly-A-RNA, 1 mg/ml, používa sa riedenie 1 : 1000 v lyzačnom pufrí

- Lyzačný pufer obsahuje:

- Tris pufer, 50 mmol/l, pH 7,0 (1,0 a prípadne extrakčný protokol) alebo 4,0 (1,5 ml protokol)

50 - Polydokanol (Polydocanol), 15 % (v/v) (1,0 a prípadne extrakčný protokol) alebo Triton X-100 20 % (v/v) (1,5 ml protokol)

- guanidín izotiokyanát, 5 mol/l

- 1 mmol/l DTT

55 - magnetické sklenené častice (MGP), buď typ EJ/BM, EJ/MMB alebo EJ/CERAC suspendované v izopropanole (čistota 99,8 %) v koncentrácii 60 mg/ml

- premývací pufer zložený z

- Tris-pufer, 20 mmol/l, pH 7,5

- 60 % etanol vo vode (1,0 a prípadne extrakčný protokol) alebo 70 % (1,5 ml protokol)

- NaCl, 20 mmol/l

60 Eluent = redestilovaná voda

- Amplifikácia/Mastermix:  
 - PCR-pufer obsahujúci  
 pufrčné médium
- 5 RT-PCR (vírus ľudskej imunodeficiencie (HIV Human immunodeficiency virus), vírus hepatitídy C (HCV)):  
 250 mmol/l Bicin/KOH pH 8,2, 557 mmol/l octanu draselného, 40 % glycerol  
 HBV-PCR (vírus hepatitídy B (HBV)): 20 mmol/l Tris-HCl pH 8,3:  
 100 mmol/l KCl, 0,012 % Brij 35 (= 2x koncentrovaný)  
 katióny kovov MgCl<sub>2</sub> (HBV-PCR) 3 mmol/l alebo MnCl<sub>2</sub> (RT-PCR) 2,5 mmol/l (HCV) a 1,25 mmol/l
- 10 (HIV)  
 deoxynukleozid trifosfát (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, dUTP) pre analyt špecifické popredné priméry (forward)  
 pre analyt špecifické spätné priméry (reverse)  
 Uracil-N-glykosidáza (UNG)
- 15 DNA-polymeráza (Taq alebo Tth polymeráza pre HBV respektíve pre HIV/HCV)  
 demineralizovaná H<sub>2</sub>O (čistota pre molekulárnu biológiu) na úpravu objemu na 100 µl  
 Stop reagentie pre UNG po amplifikácii  
 N-lauroylsarkozín (napr. Roche kat. č. 133895), 1 % (váha/objem): 5 µl na 100 µl amplifikátu
- 20 7.1.2.1.2 Detekcia  
 hybridizačný pufer (napr. Roche kat. č. 1930273) chemiluminiscenčne označené detekčné sondy:  
 HCV (Roche BMO 28.140336), pracovný roztok = 8,0 nmol/l  
 HIV (Roche BMO 28.540948), pracovný roztok = 7,8 nmol/l  
 HBV (Roche BMO 28.540917), pracovný roztok = 9,2 nmol/l
- 25 ECL guľôčky pokryté SA (napr. Roche kat. č. 1865943-001)  
 denaturačný roztok (napr. Roche kat. č. 1930257)  
 ProCell (napr. Roche kat. č. 1717685)  
 CleanCell (napr. Roche kat. č. 1717642)
- 30 7.1.2.1.3 Priméry a sondy  
 Primér:  
 HIV- popredný: SEQ ID NO 3  
 HIV- spätný: SEQ ID NO 4  
 HCV- popredný: SEQ ID NO 5  
 HCV- spätný: SEQ ID NO 6  
 35 HBV- popredný: SEQ ID NO 7  
 HBV- spätný: SEQ ID NO 8  
 Detekčné sondy: HIV: SEQ ID NO 9  
 HCV: SEQ ID NO 10  
 40 HBV: SEQ ID NO 11
- 7.1.2.2 Reakčné podmienky a pracovný postup
- Príprava vzorky:
- 45 1 ml manuálny protokol; => použitý na pokus 1 pozri príklad 7.3.1  
 pridať 25 µl proteínázy K ku 425 µl vzorky s plazmou, premiešať  
 pridať 500 µl lyzačného pufru, inkubovať 5 min. pri izbovej teplote s mechanickým miešaním (1300 ot./min.  
 v trepačke Eppendorf)
- 50 pridať 50 µl MGP suspendovaných v izopropanole (koncentrácia 60 mg/ml), premiešať a inkubovať 20 min.  
 pri izbovej teplote na roleri  
 magnetická separácia s použitím magnetického separátora Dynal (2 min.);  
 odstrániť nenaviazanú frakciu odsátím, pridať 700 µl premývacieho pufru, premiešať, separovať a odsat';  
 zopakovať premývací postup ešte 4x  
 pridať 120 µl DEPC vody, premiešať a eluovať 10 min. pri 80 °C v termomixéri Eppendorf pri 1300 ot./min.,
- 55 vzorky sú odzátované  
 oddeliť guľôčky od vodného supernatantu (=eluát) pomocou magnetického separátora Dynal (2 min.) eluát  
 zamraziť až do doby použitia  
 Automatizovaný protokol použitý v nami vyvinutom extraktore; => použitý v experimentoch 2 a 3 (pozri  
 príklad 7.3.2 a príklad 7.3.3)

V podstate rovnaký postup a reagentie ako v predchádzajúcom prípade. Navyše je do každej vzorky pridaná RNA interná kontrola (IC, pozri nižšie). Extrakčný postup je termostatovaný na 40 °C a objemy sú upravené na 2 ml celkového lyzačného roztoku, to znamená:

50 µl IC

5 50 µl proteínázy K

850 µl vzorky

1000 µl lyzačného pufru

100 µl suspenzie MGP

2200 µl premývacieho pufru pre každý z piatich premývacích krokov

10 125 µl eluentu

1,5 ml manuálny protokol; => použitý pre Experiment 4 (pozri príklad 7.3.4)

pridať 80 µl proteínázy K ku 420 µl vzorky plazmy, premiešať

pridať 500 µl lyzačného pufru, inkubovať 10 min. pri izbovej teplote s mechanickým miešaním (1300 ot./min. v trepačke Eppendorf)

15 pridať 500 µl MGP suspendovaných v izopropanole (koncentrácia 6 mg/ml), premiešať a inkubovať 20 min. pri izbovej teplote na roleri

magnetická separácia s použitím magnetického separátora Dynal (2 min.)

odstrániť nenaviazanú frakciu odsatím,

pridať 700 µl premývacieho pufru, premiešať, separovať a odsat'

20 zopakovať premývací postup ešte 4x

pridať 100 ml DEPC vody, premiešať a eluovať 15 min. pri 80 °C v termomixéri Eppendorf pri 1300 ot./min.,

oddeliť guľôčky od vodného supernatantu (= eluát) pomocou magnetického separátora Dynal (2 min.)

zamraziť eluát až do doby použitia

25

#### Amplifikácia

Celkový objem reakcie je 100 µl (platí pre všetky vzorky)

HBV: objem eluátu pre PCR = 20 µl

	zásobný roztok	konečná koncentrácia v PCR/µl
30	voda (PCR čistota)	4 µl
	DNA-Mastermix	1x/50 µl
	MgCl <sub>2</sub>	3,0 mM/12 µl
	primér SEQ ID NO 7	0,2 µM/4 µl
35	primér SEQ ID NO 8	0,4 µM/8 µl
	UNG	2U/2 µl

HCV: objem eluátu pre PCR = 40 µl

	zásobný roztok	konečná koncentrácia v PCR/µl
40	voda (PCR čistota)	18 µl
	bicínový pufer	1x/20 µl
	MnOAc	2,5 mM/10 µl
	DNTP-Mix (dUTP/	0,6 mM
	DATP/dCTP/dGTP	0,2 mM/2 µl
45	primér SEQ ID NO 5	300 nM/3 µl
	primér SEQ ID NO 6	300 nM/3 µl
	UNG	2U/2 µl
	Tth-polymeráza	10U/2 µl

50 HIV: objem eluátu pre PCR = 40 µl

	zásobný roztok	konečná koncentrácia v PCR/µl
	voda (PCR čistota)	20 µl
	bicínový pufer	1x/20 µl
	MnOAc	1,25 mM/5 µl
55	DNTP-Mix (dUTP/	0,6 mM
	DATP/dCTP/dGTP	0,2 mM/2 µl
	primér SEQ ID NO 3	0,2 µM/4 µl
	primér SEQ ID NO 4	0,2 µM/4 µl
	UNG	2U/2 µl
60	Tth-polymeráza	10U/3 µl

Po PCR je UNG zablokovaná pridaním laurylsarkozínu do koncentrácie 1 %  
Termocyklové profily boli nasledujúce:

5	HBV:			
	UNG-krok	1x	10 min.	37 °C
	PCR	35x	30 sek.	92 °C
			30 sek.	55 °C
10			40 sek.	72 °C
	HCV:			
	UNG-krok	1x	10 min.	37 °C
	krok			
15	reverznej transkripcie	1 x	30 min.	60 °C
	denaturácia		1 min.	95 °C
	PCR	2x	10 sek.	95 °C
			20 sek.	60 °C
20		33x	15 sek.	90 °C
			20 sek.	60 °C
	d'alšia inkubácia		7 min.	72 °C
	HIV:			
25	UNG-krok	1 x	10 min.	37 °C
	krok			
	reverznej transkripcie	1 x	30 min.	60 °C
	PCR	4x	10 sek.	95 °C
30			10 sek.	55 °C
			10 sek.	72 °C
		31x	10 sek.	95 °C
			10 sek.	60 °C
			10 sek.	72 °C
35	detekcia s použitia, modifikovaného Elecsys 1010®			

	reagencie (HBV, HCV, HIV)	objem (HBV, HCV, HIV)	čas inkubácie
40	PCR produkt	10 µl	
	denaturačný roztok	35 µl	5 min.
	detekčná sonda	120 µl	30 min.
	SA-gul'ôčky	35 µl	10 min.

## 45 7.2 Homogénny funkčný test: technológia 5'-nukleázového testu na prístroji Cobas Taqman®

### 7.2.1 Všeobecné úvahy

Lýza vírusových častíc a tiež adsorpcia, purifikácia a elúcia nukleových kyselín extrahovaných zo vzorky sú uskutočnené spôsobom opísaným skôr (pozri príklad 7.1.2). Amplifikácia cieľových molekúl je opäť opísaná rovnicou

$$50 \quad N_i = N_0 \times (1+E)^n, \text{ kde}$$

$N_0$  = počet molekúl na počiatku PCR

$N_i$  = počet molekúl na konci PCR

$E$  = účinnosť amplifikácie =  $0 \leq E \leq 1$

$n$  = počet reakčných cyklov = v tomto prípade typicky  $40 \leq n \leq 60$

55

Pri 5'-nukleázovej technológii sú však amplifikačné a detekčné reakcie tesne prepojené a objavujú sa vo fáze roztoku, to znamená bez imobilizácie na pevnej fáze a bez tomu zodpovedajúcich premývacích krokov (= homogénna PCR). Do PCR mastermixe sa pridajú sondy s dvomi špeciálnymi chemickými modifikáciami. Jednou z týchto modifikácií je kovalentne naviazaná fluorescenčná reportérová skupina (R, napr. derivát 6-karboxy-fluoresceínu). Táto skupina je naviazaná na základný reťazec sondy. Druhá modifikácia je farbivo

60

(napr. derivát polymetín-cyanínu) schopné absorbovať fluorescenčné svetlo reportérové skupiny, „zhasnúť“ ju (quencher - zhášač). Zhášač je zvyčajne pripojený k základnému reťazcu sondy na 5'-konci, zatiaľ čo reportérová skupina sa nachádza vnútri oligo sekvencie, oddelená od zhášača množstvom nukleotidových stavebných blokov. Tieto sondy sa viažu na cieľové nukleové kyseliny (na sense alebo antisense vlákno) bližšie 3'-koncu priméru (prednému či spätnému). Ako sa primér naviaže na cieľ a DNA polymeráza sa naviaže na hybrid primér : cieľ a začne elongácia. Vďaka 5'-nukleázovej aktivite enzýmu je, spolu s kopírovaním a syntézou nového vlákna, vo chvíli, keď polymeráza dosiahne väzobného miesta sondy, hydrolyzovaná sonda. Tým sa reportérová skupina a zhášač vzdiali a fluorescenčný signál začne byť merateľný. Tento proces sa opakuje v každom cykle a stále viacej fluorescenčného reportéru sa akumuluje v roztoku dokiaľ sa nespotrebnujú reagencie na konci reakcie. Takto na grafu závislosti signálu od času vzniknú sigmoidné krivky. Čím vyšší je  $N_0$ , tým skôr sa signálna krivka objaví nad pozadím.

Bod na časovej osi, kde už možno spoľahlivo oddeliť fluorescenčný signál od pozadia sa nazýva prahový cyklus (threshold cycle = ct). ct je miera citlivosti stanovenia - čím nižšia je hodnota ct, tým citlivejšie je stanovenie. Hodnotu ct možno vypočítať pomocou rôznych matematických operácií, ako sú napríklad limitné prístupy (priemerná intenzita signálu pozadia násobená konštantným faktorom dá limitnú intenzitu signálu na odlišenie negatívneho od pozitívneho) alebo prístup, v ktorom sa lokalizuje maximum prvej derivácie krivky závislosti signálu od času (teda strmosť profilu) alebo sa spočíta lokalizácia maxima druhej derivácie na časovej osi a definuje ako ct.

Táto amplifikačná/detekčná technológia dovoľuje sledovať PCR v reálnom čase, pričom skúmanky sú uzatvorené, čo je v kontraste so štandardným postupom. PCR skúmanky sú od napipetovania eluátu a mastermixu uzatvorené, čím je účinne znížené riziko kontaminácie.

Okrem to je možné použiť súpravy sond a primérov pre rozdielne druhy vírusov (a teda rozdielne molekuly analytu a rozdielne cieľovej sekvencie) kombinovanej v jedinom mastermixe. Takto je možné uskutočniť niekoľko amplifikačných a detekčných reakcií naraz, v závislosti od prítomnosti vírusov kontrolovaného jedinca. To je základom tzv. viacnásobného stanovenia.

A čo viacej. Vďaka všeobecnej povahe prípravy vzoriek pomocou MGP, je všetka nukleová kyselina prítomná vo vzorkách extrahovaná na základe fyzikálne-chemickej adsorpcie na povrch častíc, bez ohľadu na sekvenčnú charakteristiku. To zahŕňa tiež ľudskú DNA (human hDNA), uvoľnenú z rozrušených krvných buniek, napr. leukocytov, ktorých titer sa môže vo veľkej miere líšiť v závislosti od fyziologického alebo patologického stavu jednotlivých darcov krvných vzoriek. Napr. v prípadoch autoimúnnych ochorení, ako sú SLE, môžu byť hladiny hDNA výrazne zvýšené. Takže hDNA a jedna či viacej patogénnych nukleových kyselín prítomných v danej vzorke tvoria zmes rozdielnych nukleových kyselín s rozdielnymi sekvenčnými vlastnosťami, ktoré sú extrahované spoločne. Tvoria sieť polynukleotidov, ktoré sú extrahované bez rozdielu a následne sú cieľové nukleové kyseliny za vhodných reakčných podmienok sekvenčne špecificky amplifikované a detegované pomocou interakcie so špecifickými primérami a sondami.

Daná patologická hladina 4000 ng/ml hDNA (v prípade SLE) a nízka hladinu vírusu - 50 kópií vírusovej genomikkej DNA na ml plazmy, čo je 10000 nukleotidov na genomovú RNA. 50 kópií resp. 50000 nukleotidov cieľovej RNA s hmotnosťou cca 325 daltonov ( $1 \text{ dalton} = 1,66 \times 10^{-24} \text{ g}$ ) na nukleotid dáva cca  $2,7 \times 10^{-7} \text{ ng}$  na ml plazmy, čo vedie k výsledku, že relatívne zastúpenie cieľovej nukleovej kyseliny k necieľovej je približne  $1 : 10^{+12}$ ! Na monitorovanie celého procesu môže byť do vzoriek pridávaný umelý konštrukt nukleovej kyseliny, najlepšie pokiaľ je zabalený (obalený) modifikovanou vírusovou časticou. Ten je potom extrahovaný a amplifikovaný dohromady s prírodným cieľom. Táto vnútorná kontrola (internal control = IC) predstavuje unikátnu väzobnú oblasť pre IC detekčnú sondu, ktorá sa líši od sond špecifických pre cieľ rozdielnymi reportérovými skupinami, s odlišnými emisnými charakteristikami. Takto môže byť IC signál odlišný od cieľového signálu a pretože je známe, že IC sú prítomné vo vzorke, môže tento signál slúžiť k monitorovaniu. Takže viacnásobné označenie zvyšuje užitočnosť multiplex technológie. Interná kontrola je opísaná v W098/00547.

## 7.2.2 Experimentálny protokol

### 7.2.2.1 Reagencie

#### 7.2.2.1.1 Príprava vzorky

Pozri (príklad 7.1.2 => automatizovaný protokol na vyvinutom extraktore)

#### 7.2.2.1.2 5'-nukleázový test, reakčné činidlá a reakčné podmienky

Reagent	koncentrácia zásobného roztoku	konečná koncentrácia v teste	prídavok ( $\mu\text{l}$ / reaction)
Mn(OAc) <sub>2</sub> pH 6,5	50 mM	3 mM	5,75
dNTPs			2,50
(dG, dA, dC)	100 mM	300 $\mu\text{M}$	

	(dT)		50 $\mu$ M	
	(dU)		500 $\mu$ M	
	DEPC-H <sub>2</sub> O		-	9,50
	Glycerol	80 %	5,64 % napospol	3,50
5			*2,8 % prid. tu	
	K Oac pH 7,5	2 M	100 mM	5,00
	Tricin pH 8,3	1 M	50 mM	5,00
	DMSO	80 %	5,0 %	6,25
	Primér SEQ ID NO 12	50 $\mu$ M	150 nM	0,30
10	Primér SEQ ID NO 13	50 $\mu$ M	150 nM	0,30
	Primér SEQ ID NO 14	50 $\mu$ M	400 nM	0,80
	Primér SEQ ID NO 15	50 $\mu$ M	150 nM	0,30
	Primér SEQ ID NO 16	50 $\mu$ M	400 nM	0,80
	Primér SEQ ID NO 17	50 $\mu$ M	150 nM	0,30
15	Primér SEQ ID NO 18	50 $\mu$ M	150 nM	0,30
	Sonda SEQ ID NO 19	50 $\mu$ M	100 nM	0,20
	Sonda SEQ ID NO 20	50 $\mu$ M	100 nM	0,20
	Sonda SEQ ID NO 21	50 $\mu$ M	100 nM	0,20
	Sonda SEQ ID NO 22	50 $\mu$ M	100 nM	0,20
20	UNG	2,4 U/ $\mu$ l	10 U	4,20
	ZO5	10 U/ $\mu$ l	40 U	4,00
	Aptamér SEQ ID NO 23	50,4 $\mu$ M	200 nM	0,40

\* Zvyšok glycerolu sa pridá s enzýmami ZO5 (mutovaná Tth-DNA polymeráza) a UNG (uracil-N-glykozidáza).

25 Bežný profil na multiplex termálnu cyklovaciu reakciu pre všetky testované parametre sú nasledujúce:

	UNG krok	45 °C	10 min.
	Denaturácie	94 °C	30 sek.
30	reverzná transkripcia	94 °C	30 sek.
	PCR	95 °C 20 sek./59 °C	50 sek. - 5x
		91 °C 15 sek./52 °C	50 sek. - 55x

#### 7.2.2.1.3 Sekvencia

35	Primér:	
	HIV popredný	SEQ ID NO 12
	HIV popredný	SEQ ID NO 13
	HIV spätný	SEQ ID NO 14
40	HCV popredný	SEQ ID NO 15
	HCV spätný	SEQ ID NO 16
	HBV popredný	SEQ ID NO 17
	HBV spätný	SEQ ID NO 18
45	Sondy:	
	HIV:	SEQ ID NO 19
	HIV:	SEQ ID NO 20
	HIV:	SEQ ID NO 21
50	HIV:	SEQ ID NO 22
	Aptamér:	
		SEQ ID NO 23

Teplota topenia komplexu DNA polymeráza-aptamér = 51,7 °C (= 50 % disociácia).

55 Terminológia chemickej derivatizácie:

Niektoré z nukleotidov sú derivatizované Cy5, čo je Pentamethine-di-indocarbocyanine pripojený k alkylfosfatidilovému spojovníku (linker) (Pharmacia Biotech Cy5-N-ethy-phosphoramidite) a ktorý pôsobí ako zhášač (quencher) (Q);  $\lambda_{EX} = 630$  nm,  $\lambda_{EM} = 665$  nm. Niektoré z oligonukleotidov sú derivatizované FAM, čo je 6-karboxyfluoresceín pripojený k 2-(amino-cyklohexyl-)propán-1,3-diol (ovému) spojovníku (Biogenex CX-FAM-phosphoramidite) a ktorý funguje ako reportér na ciele (R);  $\lambda_{EX} = 485$  nm,  $\lambda_{EM} = 515$  nm. Niektoré

60

z oligonukleotidov sú derivatizované hexachloro-6-carboxyfluoresceínom, ktorý je pripojený k 2-(amino-cyklohexyl)-propán-1,3-diol(ovému) spojovníku (Biogenex CX-HEX-phosphoramidite) a ktorý pôsobí ako reportér na internú kontrolu (R);  $\lambda_{EX} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{EM} = 585 \text{ nm}$ .

#### 5 7.2.2.1.4 Reakčné podmienky

Reakčné podmienky sú opísané vo výsledkoch experimentov (pozri príklad 7.3).

#### 7.2.2.1.5 Ďalšie potreby

- 10 - vírus-negatívna plazma (0-Matrix, jednoduchá plazma alebo zložená plazma (single plasma or Plasma-Pool)), napríklad citrát plazma alebo EDTA-plazma
- vírus pozitívna plazma, alebo vírus obsahujúci supernatanty kultúr, ktoré sa môžu použiť na úpravu určitých titrov vírusov zmiešaním s 0-matrix v zodpovedajúcich pomeroch;
- 15 - alebo: in-vitro transkripty so skúmanými cieľovými sekvenciami - ľudská placentárna DNA (a. genómová, Sigma kat. č. D4 642; b. fragmentovaná, Sigma kat. č. D3287) pridaná ku vzorke na napodobnenie patologických podmienok, ktoré vedú ku zvýšenému uvoľňovaniu intracelulárnych látok a tak ku zvýšeným hladinám DNA/RNA v krvi, napríklad autoimúnne ochorenie ako SLE hemolýza.

### 7.3 Výsledky funkčných testov

#### 7.3.1. Experiment 1

- 20 Rôzne MGP-vzorky typu EJ/CERAC sa skúmali metódou opísanou v 7.1. Premennou v teste bol rozprašovací tlak:

EJ0100.5R - 1,5 baru

EJ0106.5R - 2,5 baru

EJ0107.5R - 3,5 baru

- 25 EJ0108.SR - 4,3 baru

Môže sa ukázať, že so zvyšujúcim sa rozprašovacím tlakom, tzn. posunom smerom k menšiemu priemeru priemeru guľôčok, klesá nešpecifické nadväzovanie (USB, unspecific binding), zatiaľ čo tvorba vysoko špecifického signálu je nezmenená, čo má za následok zvýšený pomer signálu k pozadiu.

- 30 Upravením titra vírusu 0,5xGG je približne 100 sgu/ml (sgu = signal generating units, signál vytvárajúci jednotky) v prípade HBV a asi 150 sgu/ml v prípade HIV. Údaje sú zhrnuté v tabuľke 7.

#### 7.3.2 Experiment 2

- 35 Dva varianty ako EJ/MMB a EJ/CERAC sa funkčne porovnali s využitím metódy opísané v príklade 7.2 v spojení so spojenými (multipool, MP) a jednotlivými (PL) vzorkami plazmy. EJ0047.2R (MMB) a EJ0100.5R (CERAC) sa rozprašovali za štandardných podmienok, tzn. 1,5 baru, teplota na vstupe 230 °C a na výstupe 110 °C. EJ0102.2R (MMB) a EJ0108.5R (CERAC) sú vývojové varianty, čo sa týka rozprašovacích podmienok (teplota na vstupe znížená na 200 °C [MMB]) a rozprašovací tlak zvýšený na 4,3 baru [CERAC]. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 8 a ukazujú možnosti CERAC nano-jadrových častíc získať vyššiu citlivosť, ako je vysvetlené časnejším „threshold“ cyklom a/alebo väčšími rozdielmi signálu (saturačný signál mínus šum, S-N (signal minus noise)).
- 40

#### 7.3.3 Experiment 3

- 45 Niekoľko MGP prípravkov typu EJ/MMB a EJ/CERAC (pozri tabuľka 9) je funkčne porovnané s využitím metód opísaných v príklade 7.2. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 10 a ukazujú potenciál častíc typu EJ0096.5R-01 dosiahnuť vyššiu citlivosť, ako dokazuje časnejší „threshold“ cyklus alebo vyššiu úspešnosť hľadania (hit rate) nezávisle od konkrétneho testu.

#### 7.3.4 Experiment 4

- 50 Niekoľko MGP prípravkov typu EJ/MMB a ES/CERAC je funkčne porovnaných s využitím metód opísaných v príklade 7.1, kde sa uskutočňuje adsorpčná inkubácia s trepaním a/alebo bez trepania. Tým sa stane sedimentačná rýchlosť rozhodujúca, tzn. čím je vyššia sedimentačná rýchlosť, tým je vyšší počet častíc, ktoré sa (vo vytvárajúcom sa precipitáte) neúčastnia interakcie s analytom. Na rozdiel od stavu, keď je sedimentačná rýchlosť menšia ako časové rozpätie, v ktorom sa môžu molekuly analytu z tekutiny naviazať na povrch adsorbentu. Výsledky zhrnuté v tabuľke 11 (EJ0047.2R sa použil ako referencia) ukazujú, že bez mechanického trepania je strata výkonnosti najväčšia (>40 %) u MMB typu (líšia sa významne od charakteristík tohto vynálezu) a najmenšia alebo prakticky vôbec žiadna u CERAC typu (najviac sa podobá v tejto sérii charakteristikám vynálezu).
- 55

Aby bolo možné starostlivo zhodnotiť funkčnosť rôznych typov MGP, vypočítal sa pre každý typ nasledujúcim spôsobom výkonnostný index:

- 60 - eluáty rôznych dávok každého typu MGP a každej hladiny titra sú spojené do 1 spojeného eluátu

- z každého spojeného eluátu sa uskutočnili 3 amplifikácie každého testu (HIV, HCV, HBV)
- každý amplifikát sa meral zvlášť (in singlicate) na modifikovanom Elecsys 1010®
- signál sa pre všetky typy MGP, testy a hladiny titrov spriemerkovali
- pre každý typ MGP a test sa vypočítali faktory signál/šum (S/N), tzn. nízky titer (slabo pozitívny) cez O-
- 5 -maticu (negatívny) a zvýšený titer cez O-maticu
- S/N faktory sú normalizované k referenčnému typu MGP súčasne (at the time)
- výpočet súčtu normalizovaných S/N faktorov pre každý typ MGP získaný zo všetkých testov a hladín titrov; S/N faktory pre nízke rozsahy titrov sú vážené dvojnásobne relatívne k hodnotám pre vysoké hladiny titrov, aby sa zohľadnili aspekty citlivosti
- 10 - výsledná suma je pridelený index výkonnosti pre každý skúmaný typ MGP

### 7.3.5 Experiment 5

- Na extrakciu HCV in vitro transkriptov, ktoré sa nariadili na rôzne hladiny titrov riediacim roztokom obsahujúcim 10 mmol/l Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 20 ug/ml poly-A-RNA a 0,05 % NaN<sub>3</sub> a pridané do spojenej plazmy, sa použili rôzne typy MGP.

Ludské DNA pozadia (human background DNA - hBG-DNA) sa pridali do vzorky v koncentráciách 0 alebo 4000 ng/ml. Prekvapivo je možné obmedziť interferenciu hBG-DNA výberom guľôčok, ako ukazujú hodnoty uvedené v tabuľke 12.

### 7.3.6 Experiment 6

- Na spracovanie vzoriek HCV pozitívnej plazmy sa použili rôzne typy MGP. Do vzorky sa pridávala ľudská DNA pozadia (human background DNA - hBG-DNA) v koncentrácii 0 alebo 4 000 ng/ml. Opäť bolo možné pozorovať značný dopad veľkosti guľôčok a geometrie guľôčok. MGP EJ0096.5R, čo je najlepší predstaviteľ MGP predkladaného vynálezu, vykazuje jasné výhody čo sa týka minimálneho posunu ct hodnôt a znížením straty generovaného špecifického signálu (S-N), ako ukazujú dáta uvedené v tabuľke 13.

Tabuľka 1

Spoločnosť	Skratka	Opis	Kód (pozri príklad 1.4)
--	--	Bez pigmentu	0
Merck Darmstadt, Nemecko	BM	Merck Black Mica: Malé plátky sludy (podpora), priemer = 10 až 60 μm, hrúbka asi 1 - 2 μm, pripojené sú malé kvádre Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , a zrna TiO <sub>2</sub> ; typicky dochádza k agregácii niekoľkých jednotiek pigmentu	1
Merck Darmstadt, Nemecko	MMB	Merck Microna Matte Black Malé plátky sludy (podpora), priemer = 3 - 15 μm, hrúbka asi 1 - 2 μm, pripojené sú malé kvádre Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ; typicky dochádza k agregácii niekoľkých jednotiek pigmentu	2
BASF Ludwigshafen, Nemecko	BASF-FA	BASF oxid železitý FA28-41: Ihlice nanoveľkosti vyrobenej z gam p= Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , dĺžka asi 200 až 400 nm, vďaka tvaru a veľkému, vysoko štruktúrovanému povrchu veľmi vysoká náchylnosť k agregácii do častíc v u-rozsahu Cerac,	4
CERAC Milwaukee WI, USA	CERAC	γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , (kat. č. I-2012, distribuovaný Chemco Chemiprodukte GmbH v Nemecku) γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -mikroguľôčky v nano-oblasti (čistý oxid železitý), priemer = 23 nm, neagregujúci	5
Strem Chemicals, Newburyport MA, USA	STREM	STREM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> > 95 % (kat. č.: 93 - 2616) mikroguľôčky v nano-oblasti vyrobené z precipitovaného Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , priemer = 200 - 500 nm, silná tendencia k agregácii do častíc v u-rozsahu	7
BASF Ludwigshafen, Nemecko	BASF-CE	Guľôčky v μ-oblasti vyrobenej z kovového železa - BASF karbonylový železný prášok HQ: 10 % < 1,04 μm, 50 % < 1,91 μm, 90 % < 3,71 μm, - BASF karbonylový železný prášok SU: 10 % < 0,43 μm, 50 % < 0,93 μm, 90 % < 1,81 μm,	8 9

Tabuľka 2

Kód	MI TEOS	Voda (ml/100 ml) TEOS	Alkohol I	Alkohol (ml/100 ml) TEOS	Starnutie (h)		Rozprašovací tlak (bar)	Dýza	Teplou vstupu (°C)	Teplota vo vzduchu pred FA (°C)	Teplota N <sub>2</sub> po FA (°C)	Teplota O <sub>2</sub> po FA (°C)	Tepelné opracovanie vo fľaši pod vzduch (°C)
0005	1750	13,33	EtOH	50	1		1,5	A	230	250	675	300	300
0009	1750	13,33	EtOH	50	1		1,5	A	230	250	675	300	300
0045	1400	13,33	EtOH	50	0		1,5	A	230	200	675	300	200
00456	250	13,33	EtOH	50	0		5	Büchi	150	200	675	300	200
0047	1300	14,13	EtOH	137	0		1,5	A	230	250	750	200	200
0096	150	14,1	EtOH	141	0	230	6	Büchi	150	200	750	200	200
0097	150	14,1	EtOH	141	0	191	6	Büchi	150	200	750	200	200
0098	210	14,1	EtOH	141	0	230	6	Büchi	150	200	690	200	200
0099	210	14,1	EtOH	141	0	230	6	Büchi	150	200	710	200	200
0100	840	14,1	EtOH	141	0	230	1,5	A	230	200	750	200	200
0101	840	14,1	EtOH	141	0	191	1,5	A	230	200	750	200	200
0102	1300	14,1	EtOH	141	0	230	1,5	A	230	200	750	200	200
0106	840	14,1	EtOH	141	0	230	2,5	A	230	200	750	200	200
0107							3,5	A	230	200	750	200	200
0108							4,3	A	230	200	750	200	200
0109	8000	14,1	EtOH	141	0	230	1,5	A	210	200	750	200	200
0111	1300	14,1	EtOH	141	0	230	1,5	A	210	200	750	200	200
0119	1200	14,6	EtOH	130	0	230	1,5	A	210	200	750	200	200
0124							6	Büchi	150	200	750	200	200
0128	7830	14,1	EtOH	141	0	230	1,5	A	230	200	750	200	200
0129							1,5	A	200	200	750	200	200
0130							4,3	A	200	200	750	200	200
0131							6	A	200	200	750	200	200

Tabuľka 3

vzorka	Výstupná teplota (°C)	Hustota (g/cm <sup>3</sup> )	Extincia (280 nm)	Extincia (400 nm)	Rozpustnosť železa (mg/ml)	Magnetická sila (g/250 mg)
RN0005.2E-01	116	3,420	0,037	0,027	< detekčný limit	16,04
RN0009.1E-01	119	3,155	0,106	0,093	< detekčný limit	9,50
EJ0028.25-01	118	3,602	0,019	0,024	< detekčný limit	12,25
RN0045.4R-01	130	>3,647	0,032	0,034	< detekčný limit	9,23
RN0046.7R-01	98	3,866	0,013	0,013	< detekčný limit	13,12
RN0045.5R-01	120	3,802	0,019	0,017	0,047	9,52
EJ0047.2R-01	118	3,659	0,022	0,018	< detekčný limit	12,00
EJ0096.5R-01	96	4,203	0,001	0,000	< detekčný limit	13,53
EJ0096.7R-01	96	4,328	0,000	0,001	< detekčný limit	18,36
EJ0097.4R-01	96	3,859	0,001	0,000	< detekčný limit	15,17
EJ0098.8R-01	95	5,588	0,065	0,055	< detekčný limit	15,76
EJ0099.9R-01	95	5,538	0,103	0,101	0,016	14,13
EJ0100.7R-01	122	4,196	0,027	0,003	< detekčný limit	16,29
EJ0100.5R-01	126	4,069	0,012	0,012	< detekčný limit	12,42
EJ0101.4R-01	119	4,079	0,083	0,084	0,015	11,67
EJ0102.2R-01	128	3,668	0,009	0,009	< detekčný limit	13,36
EJ0047.2R-07	118	3,612	0,024	0,022	0,159	11,26
EJ0100.5R-02	127	4,107	0,029	0,023	0,054	14,51
EJ0100.5R-03	127	4,173	0,063	0,045	0,126	10,44
EJ0106.5R-01	127	4,191	0,004	0,004	0,025	10,09
EJ0107.5R-01	127	4,235	0,016	0,009	0,037	10,25

## SK 287932 B6

vzorka	Výstupná teplota (°C)	Hustota (g/cm <sup>3</sup> )	Extincia (280 nm)	Extincia (400 nm)	Rozpustnosť železa (mg/ml)	Magnetická sila (g/250 mg)
EJ0108.5R-01	127	4,233	0,026	0,026	0,039	11,56
EJ0109.2R-01	110	3,700	0,046	0,043	0,028	11,23
EJ0111.5R-01	117	3,612	0,071	0,036	0,166	16,48
EJ0111.5R-02	121	4,082	0,065	0,040	0,161	15,95
EJ0124.5R-01		3,992	0,001	0,001	0,051	17,57
EJ0128.5R-01	125	4,078	0,023	0,028		8,97
EJ0129.5R-01	92	4,013	0,044	0,043		9,64
EJ0130.5R-01	87	4,022	0,031	0,036		11,70
EJ0131.5R-01	89	3,908	0,033	0,037		11,73
EP0119.5R-01	127	4,110	0,003	0,003	0,079	17,15

Tabuľka 4

Šarža	BET povrch (m <sup>2</sup> /g)	Poznámka
EJ0096.5R-01	26,85	Cerac, malá rozprašovacia sušička, 6 bar
EJ0100.5R-01	8,95	Cerac, veľká rozprašovacia sušička, 1,5 bar
EJ0101.4R-01	8,47	BASF FA, veľká rozprašovacia sušička, 1,5 bar
RN0005.2E-01	3,54	MERC MMB, veľká rozprašovacia sušička, 1,5 bar
RN0009.1E-01	3,25	MERC MMB, veľká rozprašovacia sušička, 1,5 bar
EJ0099.9R	0,74	BASF CE-SU, veľká rozprašovacia sušička 6 bar
EJ0100.7R	8,53	STREM, veľká rozprašovacia sušička 1,5 bar

Tabuľka 5

typ MGP	veľkosť izolovaných jadriek	zloženie forma	t <sub>1/2</sub> sedimentácia [min.]	t <sub>1/2</sub> separácia [sec.]
MMB	3 - 15 µm	agregované	doštičky	3,9 14
CERAC	23 nm	individuálne	guľôčky	» 10 16
STREM	300 - 500 nm	agregované	guľôčky	4,8 10
BASF-FA	200 - 300 nm	agregované	ihličky	4,6 12

5

Tabuľka 6

MGP vzorka	t <sub>0,9</sub> (90 %-Wert) sedimentácia [min.]	t <sub>1/2</sub> (90 %-Wert) sedimentácia [min.]
EJ0100.5R-01	0,35	2,78
EJ0108.5R-01	0,62	7,58
EJ0096.5R-01	1,39	19,85

Tabuľka 7

MGP	USB [impulzy] - HIV	0-matrix HBV	SB [impulzy] - HIV	0,5x-matrix HBV
EJ0100.5R-01	4997	2277	20380	80292
EJ0100.5R-02	6100	3590	22036	53417
EJ0100.5R-03	4856	2270	19791	65109
EJ0106.5R-01	4427	2263	19030	75128
EJ0107.5R-01	3940	2261	19255	68285
EJ0108.5R-01	3429	2217	20048	80426

Tabuľka 8

vzorka	MGP šarža	HBV		HCV	
		Ct	S-N	ct	S-N
MP2	E10047.2	40,49	19,88	41,68	12,6
MP2	EJ100.5	40,96	21,80	43,08	12,74
MP2	EJ0102.2	41,93	21,39	44,74	10,10
MP2	BJ0108.5	40,09	22,01	47,36	10,61
Pl.1/2	EJ0047.2	41,03	18,14	-	-
Pl.1/2	EJ100.5	40,12	19,31	-	-
Pl.1/2	EJ0102.2	41,81	22,80	44,69	14,30
Pl.1/2	EJ0108.5	39,93	21,77	43,27	12,58
Pl.4/5	EJ0047.2	46,33	12,83	39,54	18,30
Pl.4/5	EJ100.5	40,82	15,12	38,24	21,48
Pl.4/5	EJ0102.2	42,49	19,65	39,24	19,05
Pl.4/5	EJ0108.5	47,33	9,51	39,47	17,81
Pl.6/8	EJ0047.2	41,08	20,83	49,44	9,46
Pl.6/8	EJ100.5	40,68	23,16	48,98	10,31
Pl.6/8	EJ0102.2	40,50	22,49	54,50	6,50
Pl.6/8	EJ0108.5	38,79	18,60	50,41	8,61
Pl.6/8	EJ0047.2	44,16	17,26	41,40	10,59
Pl.6/8	EJ100.5	42,97	18,59	41,01	11,33
Pl.6/8	EJ0102.2	44,49	12,41	42,18	11,32
Pl.6/8	EJ0108.5	41,24	18,73	41,46	10,80

Štatistika merania: Ktorý typ vyhovuje lepšie

„štandardné vzorky“ MMB: CERAC		„vývojové varianty“ MMB: CERAC		súhrn: najlepší typ na vzorka * stanovenie MMB: CERAC	
Ct	S-N	Ct	S-N	Ct	S-N
2 : 7	0 : 9	3 : 7	5 : 5	1 : 9	3 : 7

(1 zrovnanie nemohlo byť vyhodnotené)

Tabuľka 9

MGP	Opis
EJ0096.5R	6 barov rozprašovací tlak, 150 °C vstupná teplota, Büchi laboratórne vybavenie. Tento preparát sa blíži charakteristikám podľa výsledku veľmi dobre, pozri obrázok 15
EJ0111.5R	1,5 barov rozprašovací tlak, 230 °C vstupná teplota, Nubiosa laboratórne vybavenie
EP0119.5R	1,5 barov rozprašovací tlak, 230 °C vstupná teplota, Nubiosa laboratórne vybavenie, zmenené zloženie skla bez Zn-acetátu, K-metanolát je nahradený K-acetátom s rovnakou stechiometriou
EJ108,5R	4,3 barov rozprašovací tlak, 230 °C vstupná teplota, Nubiosa laboratórne vybavenie

5 Tabuľka 10

Parameter	ct-hodnoty (HBV)				
	ct- prepočet cez maximum prvej derivácie				
	Titer [sgu/ml]	MGP šarže EJ0111.5R-02 AVG	MGP šarže EP0119.5R AVG	MGP šarže EJ0096.5R AVG	MGP šarže EJ0108.5R AVG
HBV	NK	-	-	-	-
	100	46,1	44,1(6/6)	43,4	44,2
	40	47,6	46,5(7/8)	45,5(7/8)	46,7(6/7)
	20	50,6(6/8)	46,1(6/8)	46,8(7/8)	50,0(4/8)
	10	47,6(5/8)	50,1(5/8)	46,8(4/8)	47,7(3/7)
	5	51,2(3/8)	48,6(4/8)	47,8(5/8)	49,7(4/7)
	pomerná početnosť	75 %	74 %	77,5 %	67,5 %

ct-prepočet cez vzorec medznej hodnoty					
Parameter	Titer (sgu/ml)	MGP šarže EJ0111.5R-02 AVG	MGP šarže EP0119.5R AVG	MGP šarže EJ0096.5R AVG	MGP šarže EJ0108.5R AVG
HBV	NK	-	-	-	-
	100	44,2	41,7(6/6)	41,5	41,9
	40	45,5	44,1(7/8)	42,7(6/8)	45,0(6/7)
	20	47,7(6/8)	43,5(6/8)	44,3(7/8)	47,2(6/8)
	10	45,5(5/8)	47,7(3/8)	44,4(6/8)	45,6(3/8)
	5	49,3(3/8)	45,7(4/8)	45,4(4/8)	46,6(4/7)
	pomerná početnosť	75 %	74 %	77,5 %	71 %
ct-hodnoty (HCV)					
ct- prepočet cez maximum prvej derivácie					
Parameter	Titer [IU/ml]	MCP šarže EJ0111.5R-02 AVG	MGP šarže EP0119.5R AVG	MGP šarže EJ0096.5R AVG	MGP šarže EJ0108.5R AVG
HCV	NK	-	-	-	-
	400	42,7	42,5(7/8)	41,8	42,6(7/7)
	80	44,4(7/8)	44,1(6/6)	44,2(7/8)	44,2(7/7)
	60	45,1	44,7(7/7)	44,4(6/7)	45,1(6/6)
	40	46,2(7/8)	45,8(7/7)	43,9(5/7)	44,5(7/7)
	20	46,(5/8)	46,3(7/7)	45,9(6/8)	47,4(4/8)
	pomerná početnosť	90 %	97 %	84 %	85 %
ct-prepočet cez vzorec medznej hodnoty					
Parameter	Titer (IU/ml)	MGP šarže EJ0111.5R-02 AVG	MGP šarže EP0119.5R AVG	MGP šarže EJ0096.5R AVG	MGP šarže EJ0108.5R AVG
HCV	NK	-	-	-	-
	400	41,8	4106(7/8)	40,9	41,7(7/7)
	80	44,6(7/7)	44,0(6/6)	43,4(7/8)	44,5(7/7)
	60	44,7	45,5(7/7)	45,1(6/7)	44,3(5/6)
	40	47,9(7/8)	46,1(7/7)	44,7(4/7)	47,5(7/7)
	20	49,6(5/8)	47,2(7/7)	45,3(5/8)	47,4(4/8)
	pomerná početnosť	90 %	97 %	79 %	86 %
ct - hodnoty (HIV)					
ct- prepočet cez maximum prvej derivácie					
Parameter	Titer [sgu/ml]	MGP šarže EJ0111.5R AVG	MGP šarže EP0119.5R AVG	MGP šarže EJ0096.5R AVG	MGP šarže EJ0108.5R AVG
HIV	NK	-	-	-	-
	30	43,2(6/8)	46,9(3/8)	43,9(3/7)	41,9(1/7)
	60	42,7(4/7)	42,6(4/7)	42,8(7/7)	42,4.4(2/7)
	150	42,4(5/7)	42,0	41,7(6/6)	42,6(6/8)
	300	41,9(5/5)	41,0(5/5)	41,5(6/6)	41,3(6/6)
	600	41,6(7/7)	40,8(6/6)	40,8(5/5)	41,5
	pomerná početnosť	79 %	76 %	87 %	64,0 %
ct-prepočet cez vzorec medznej hodnoty					
Parameter	Titer [IU/ml]	MGP šarže EP011.5R AVG	MGP šarže EP0119.5R AVG	MGP šarže EJ0096.5R AVG	MGP šarže EJ0108.5R AVG
HIV	NK	-	-	-	-
	30	44,3(1/8)	47,3(2/8)	46,8(1/7)	-(0/7)
	60	50,3(3/7)	54,1(1/7)	51,4(4/7)	-(0/7)
	150	47,4(5/7)	43,7(5/8)	45,5(5/7)	52,2(2/8)
	300	42,2(5/5)	44,8(5/5)	41,6(4/6)	46,5(6/6)
	600	41,2(7/7)	41,3(5/6)	41,1(5/5)	42,5
	pomerná početnosť	62 %	53 %	59 %	44 %

Tabuľka 11

typ MGP	HIV 1		HCV		HBV		výkonnostný index	index pomer výkonnosti
	60 sgu/neg	600 sgu/neg		4800 sgu/neg	40 sgu/neg	400 sgu/neg	kumulovaný/vážený/normálny	s trepaním/bez trepania
EJ0047.2R (referencie)	100	100	100	100	100	100	900	-
EJ0096.5R	55	34	44	74	146	112	709	-
EJ0096.7R	47	47	18	8	116	107	523	-
EJ0097.4R	32	54	29	47	169	132	692	-
RN0045.5R	85	64	76	63	7	84	545	-
RN0046.7R	109	80	43	40	121	135	803	-
RN0045.4R	48	93	112	128	136	96	908	-
EJ0047.2R (referencie)	24	24	52	49	93	122	534	0,59
EJ0096.5R	28	23	47	88	102	154	619	0,87
EJ0096.7R	34	23	38	14	99	70	449	0,86
EJ0097.4R	33	36	20	18	101	94	456	0,66
RN0045.5R	53	74	60	25	107	72	610	1,12
RN0046.7R	141	90	16	8	32	40	518	0,64
RN0045.4R	55	113	25	146	78	101	675	0,74

Tabuľka 12

časť	HCV- titer (IVT-RNA)	$\Delta$ hDNA	$\Delta$ ct	$\Delta$ S-N
RN00091.E = veľké doštičky (3 - 60 $\mu$ m)	1000 cp/PCR	4000 ng/ml	+2	-6,1
EJ0100.SR = deformované guľôčky (ca. 1 - 12 $\mu$ rozsah)	↓	↓	-1	-3,2
EJ0108.5R = (ca. 1-4 $\mu$ rozsah) deformované* guľôčky	↓	↓	$\pm$ 0	-1,2

5 \* vysokotlaková varianta, pozri sekcia 7.2.4.2. a 7.3.1

poznámka:

$\Delta$  (+)  $\Delta$  ct = menej citlivý (tzn. tendencia k falošne negatívnym výsledkom); (-) $\Delta$  ct = citlivejší (tendencia k falošne pozitívnym výsledkom?)

10 (-) $\Delta$  S-N = tvorba menej špecifického signálu = negatívna interferencia

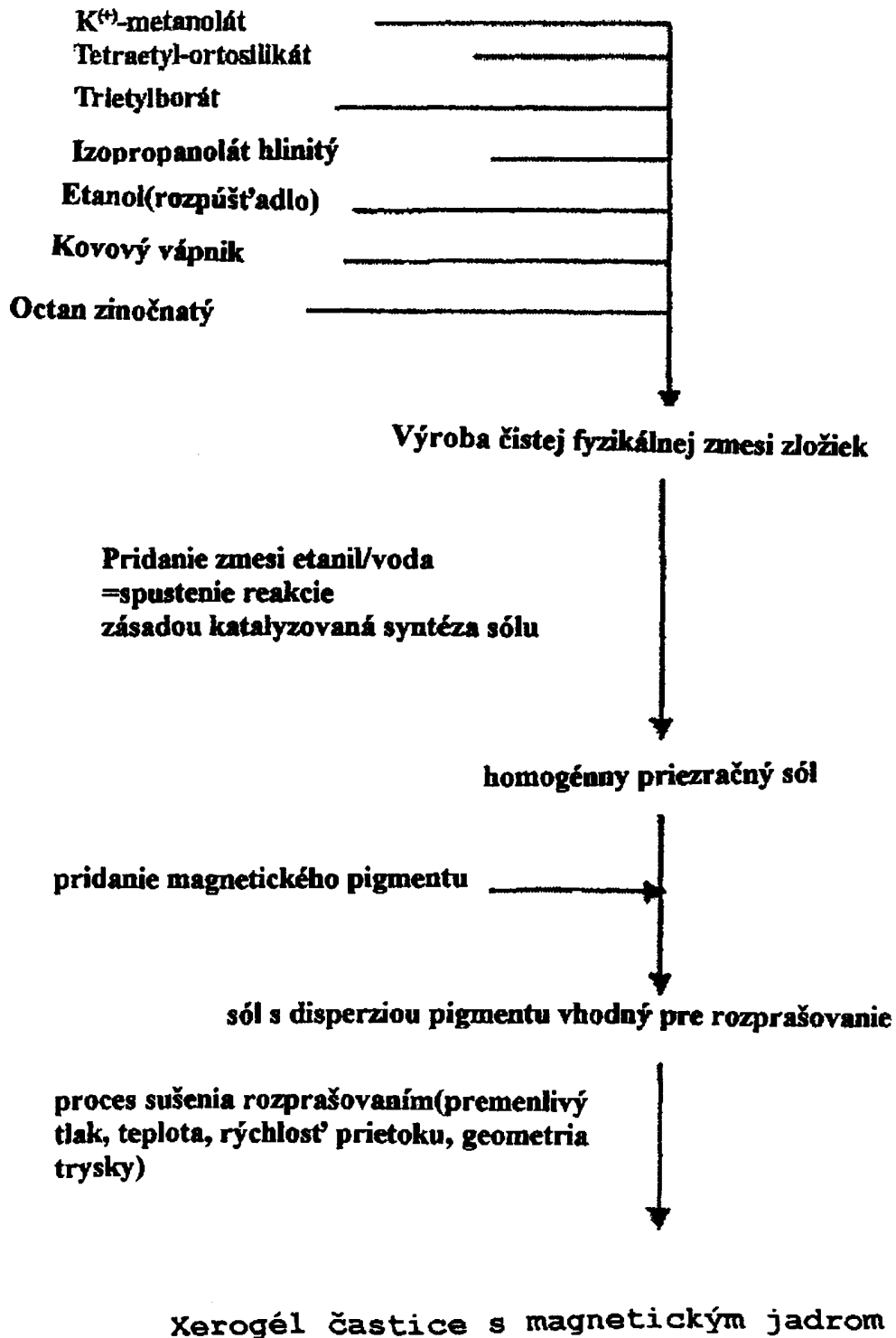
Tabuľka 13

(EJ/CERAC iba)	HCV- titer (extrahovaná génomová RNA)	$\Delta$ hDNA	$\Delta$ ct	$\Delta$ S-N
EJ0096.5R = zamýšľaný cieľ*	200 IU/ml vzorka	4000 ng/ml	-0,95	-8,5
EJ0127.5R = štandard	↓	↓	-3,08	-13,89
EJ0129.5R = p-variant	↓	↓	-2,30	-12,62
EJ0130.5R = p-variant	↓	↓	-2,62	-10,57
EJ0131.5R = p-variant	↓	↓	-2,46	-12,41

15 \* = 0,5 - 5  $\mu$ -rozsah: > 50 % sub-  $\mu$  -stupnice; veľká povrchová plocha (27 m<sup>2</sup>/g BET); dokonale guľovité guľôčky

p- variant = sušenie rozprašovaním pri vyššom tlaku (pozri sekcia 7.3.1).

Obrázok 1  
Schematické znázornenie prípravy syntézou solú a sušením rozprašovaním



Obrázok 2

Schematické znázornenie prípravy nehotových častíc

Predkondenzácia teplotným pôsobením (4h/200 °C) na vzduchu pre stabilizáciu povrchu



Konečná kondenzácia a spekanie v inertnej atmosfére ( $N_2$ )  
pôsobením vysokej teploty (1h, 750 °C) => jadra pigmentov obklopené slabo podchladenou taveninou



Rýchle ochladenie=> sklom obalené častice s magnetickým jadrom  
= MGP



Teplotní opracovanie na vzduchu (4h, 200 °C) = oxidácia skleneného obalu



Príprava neagregujúcej frakcie použitím sita



Plnenie MGP prášku do fliaš, potom teplotné opracovanie  
4h/200 °C

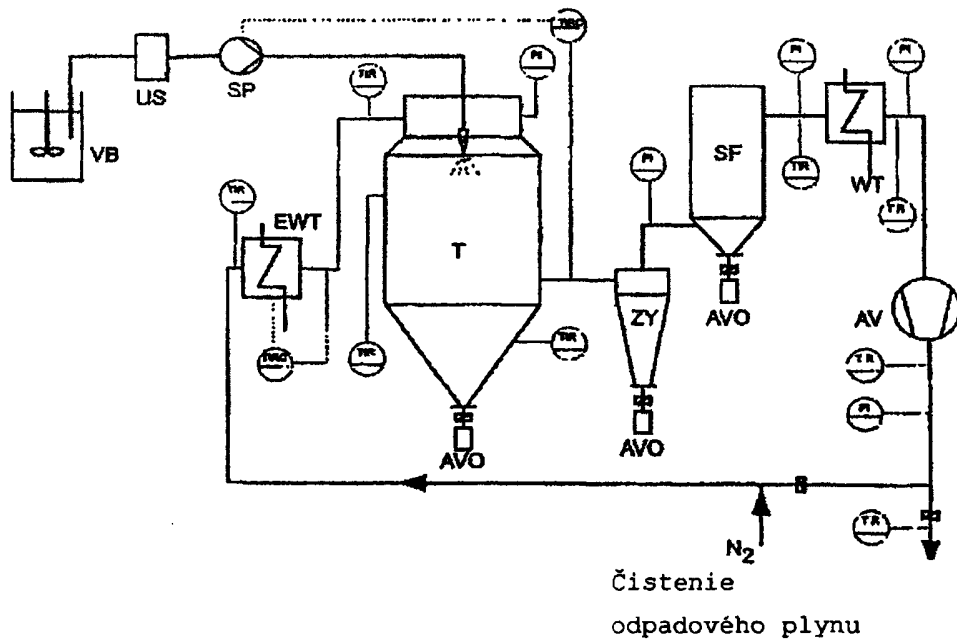


Ochladenie na asi 80 °C, uzatvorenie fľaše fóliu a zaskrutkovanie viečka



Skladovanie MGP častíc ==> suspenzia v R-OH (napr. izopropanole)

Obrázok 3

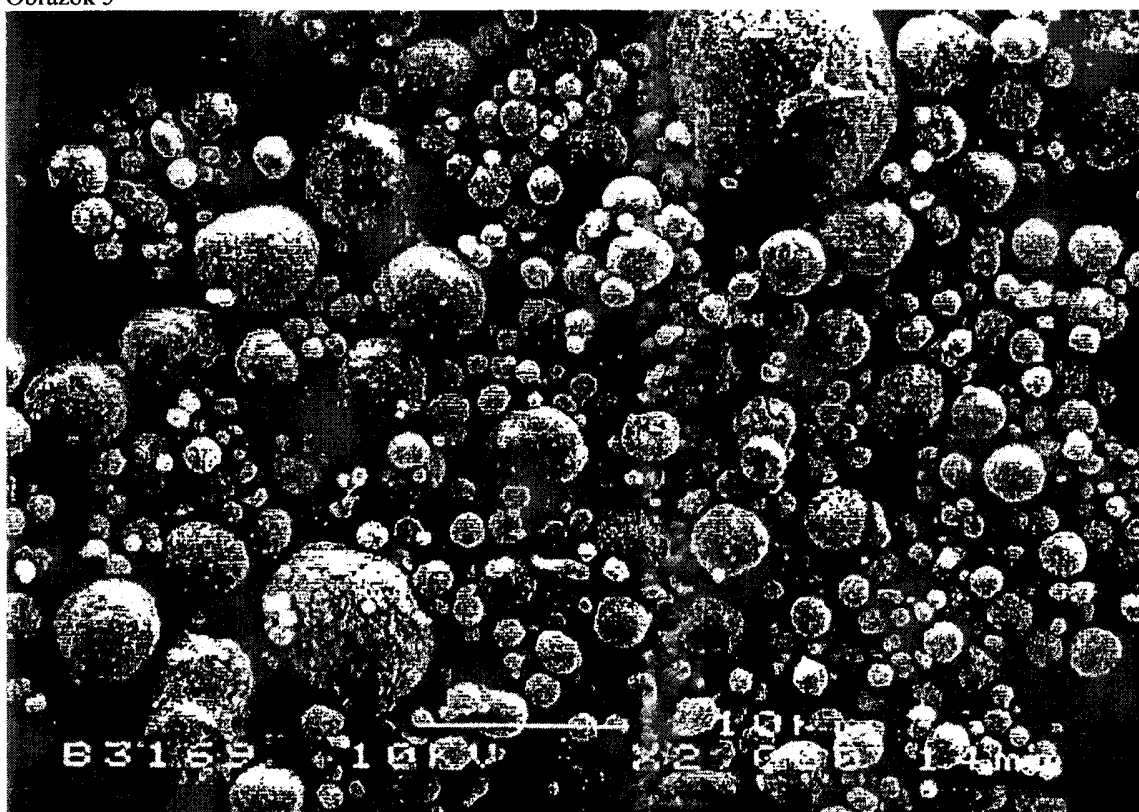


- 5 WB nádoba so solom  
 SP plniaca pumpa  
 EWT elektrický ohrievač  
 T sušiacia komora  
 ZY odlučovač  
 SF filter
- 10 WT kondenzátor  
 AV ventilátor  
 AVO nádoba  
 US ultrazvukové zariadenie
- 15 Technické údaje:  
 Priemer sušiackej komory 0,75 m  
 Výška sušiackej komory 2,5 m  
 Vyparovací schopnosť 1 - 2 l/h

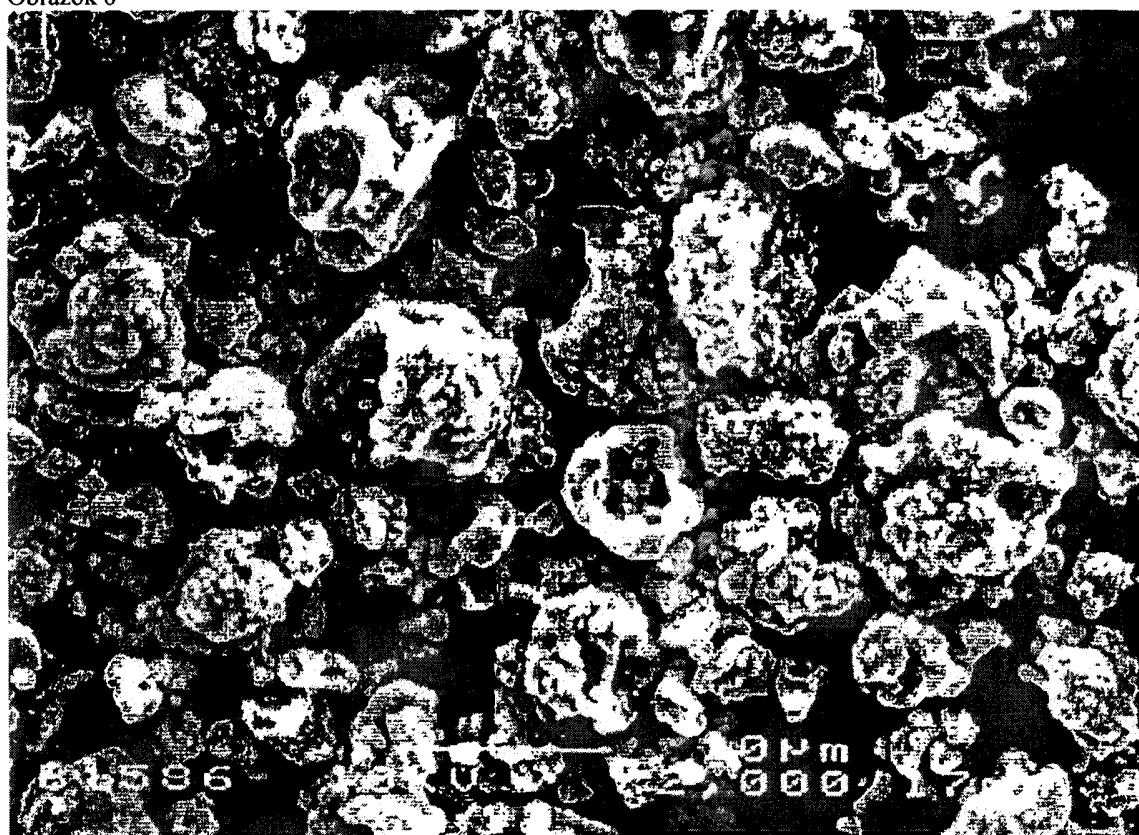
20 Obrázok 4



Obrázok 5



Obrázok 6



5

Obrázok 7



Obrázok 8

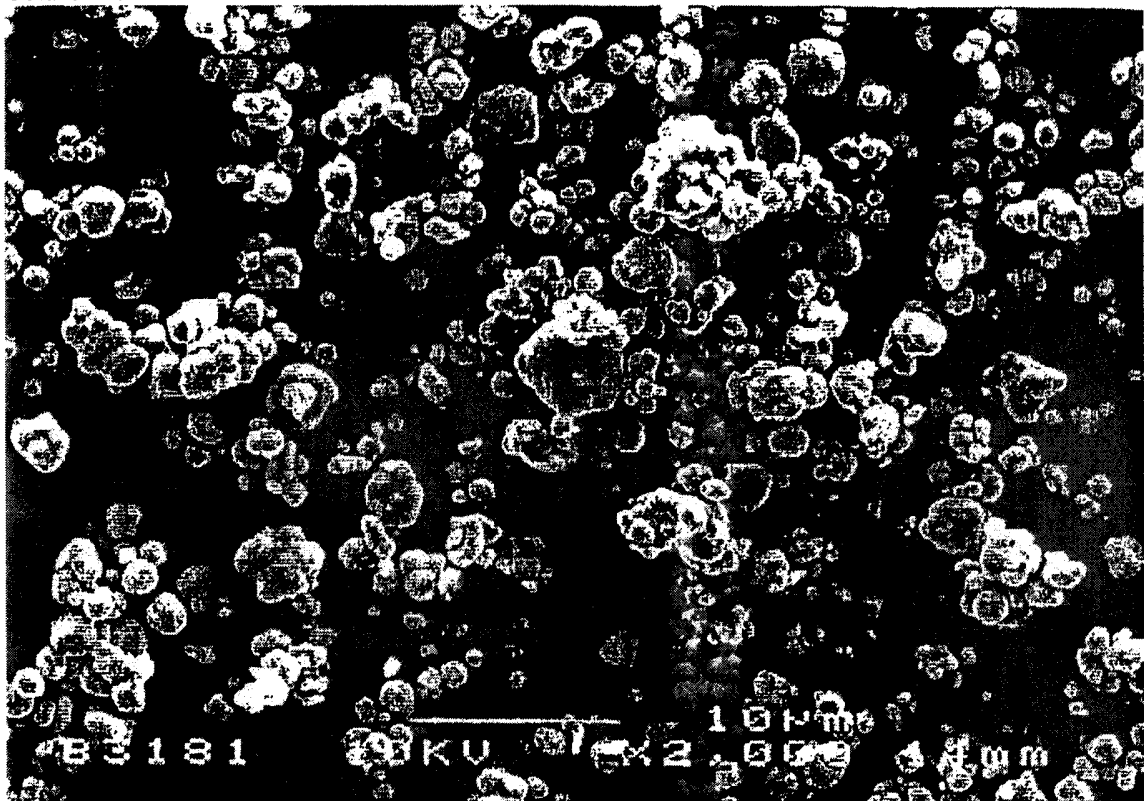


5

Obrázok 9

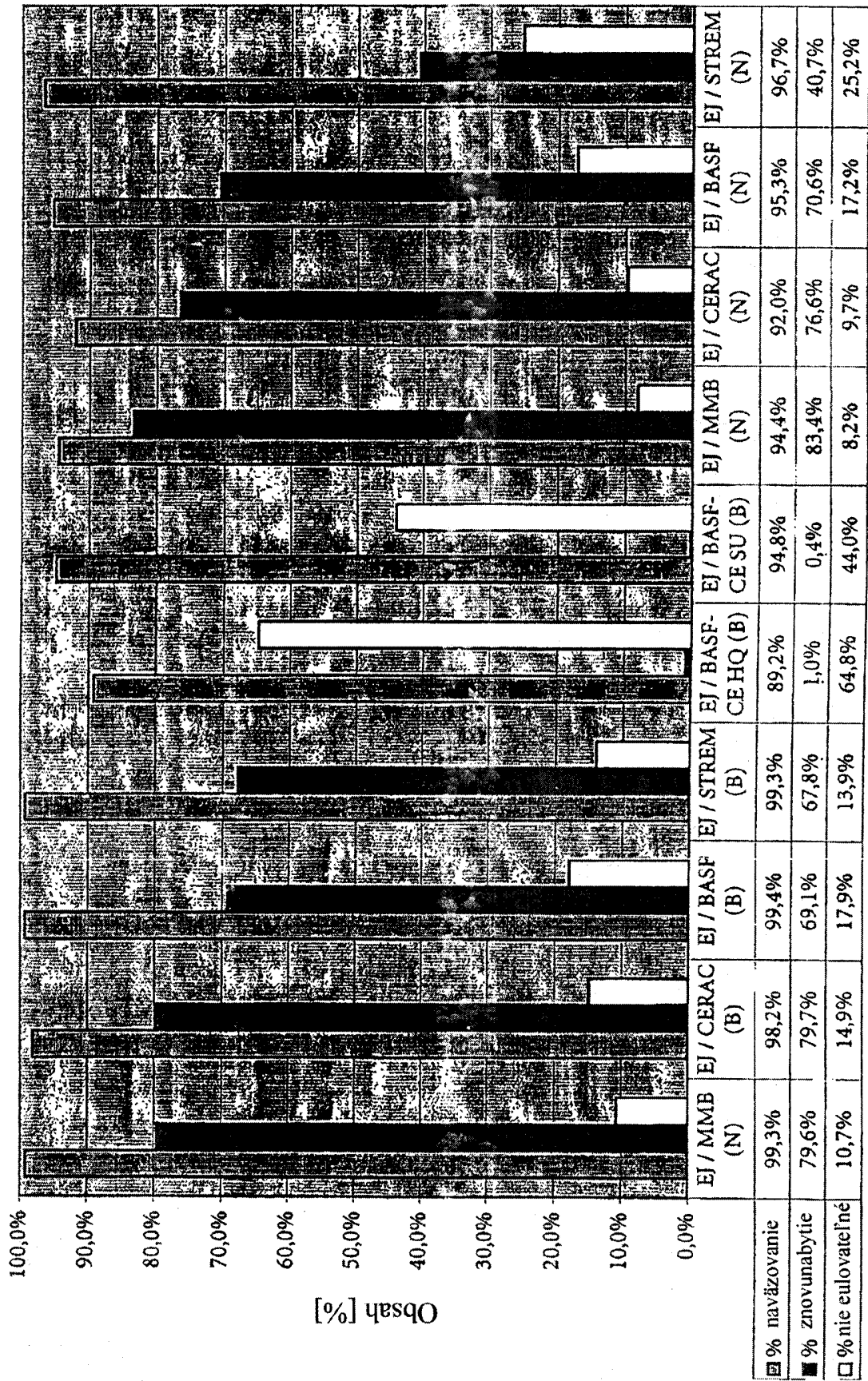


Obrázok 10

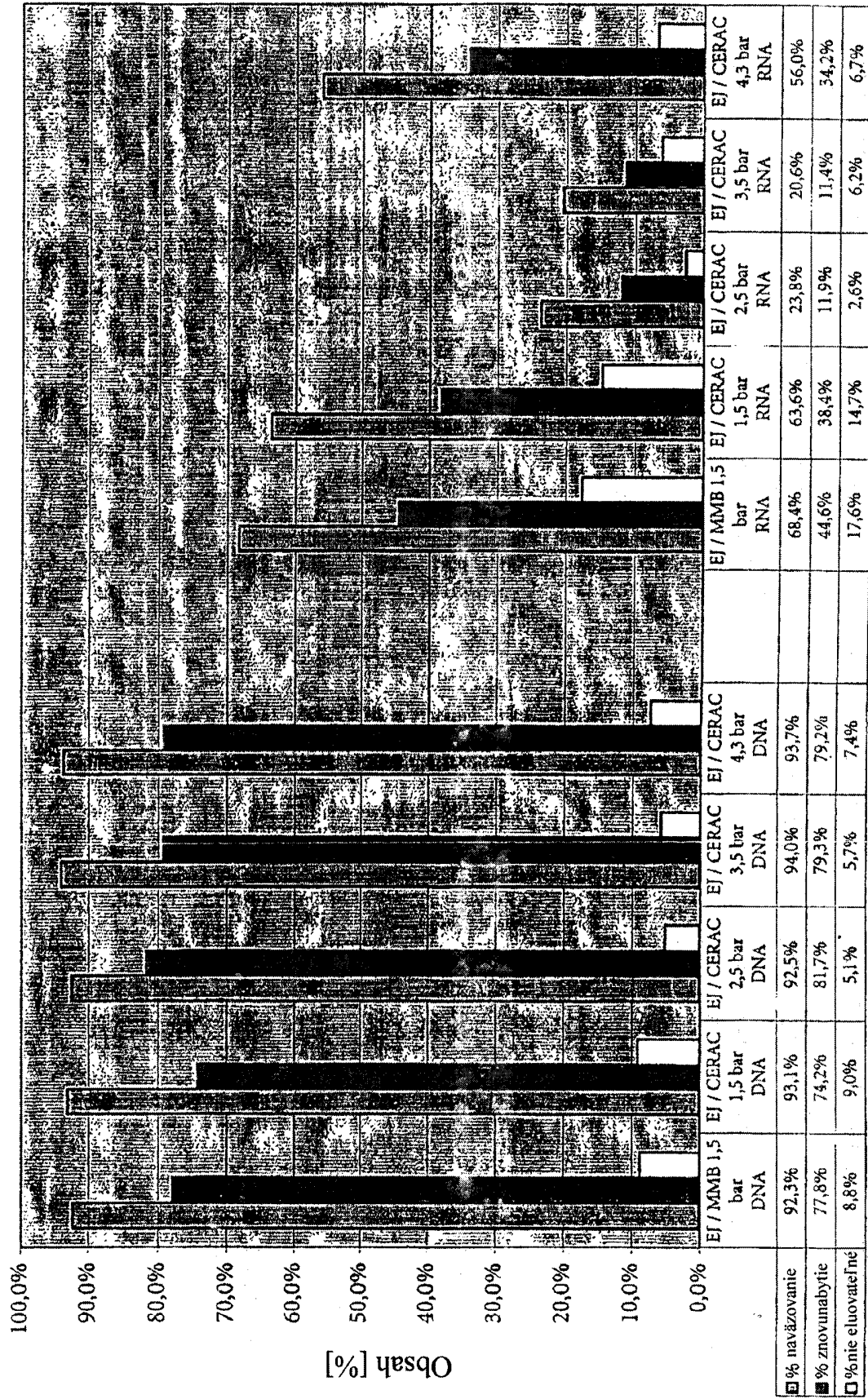


5

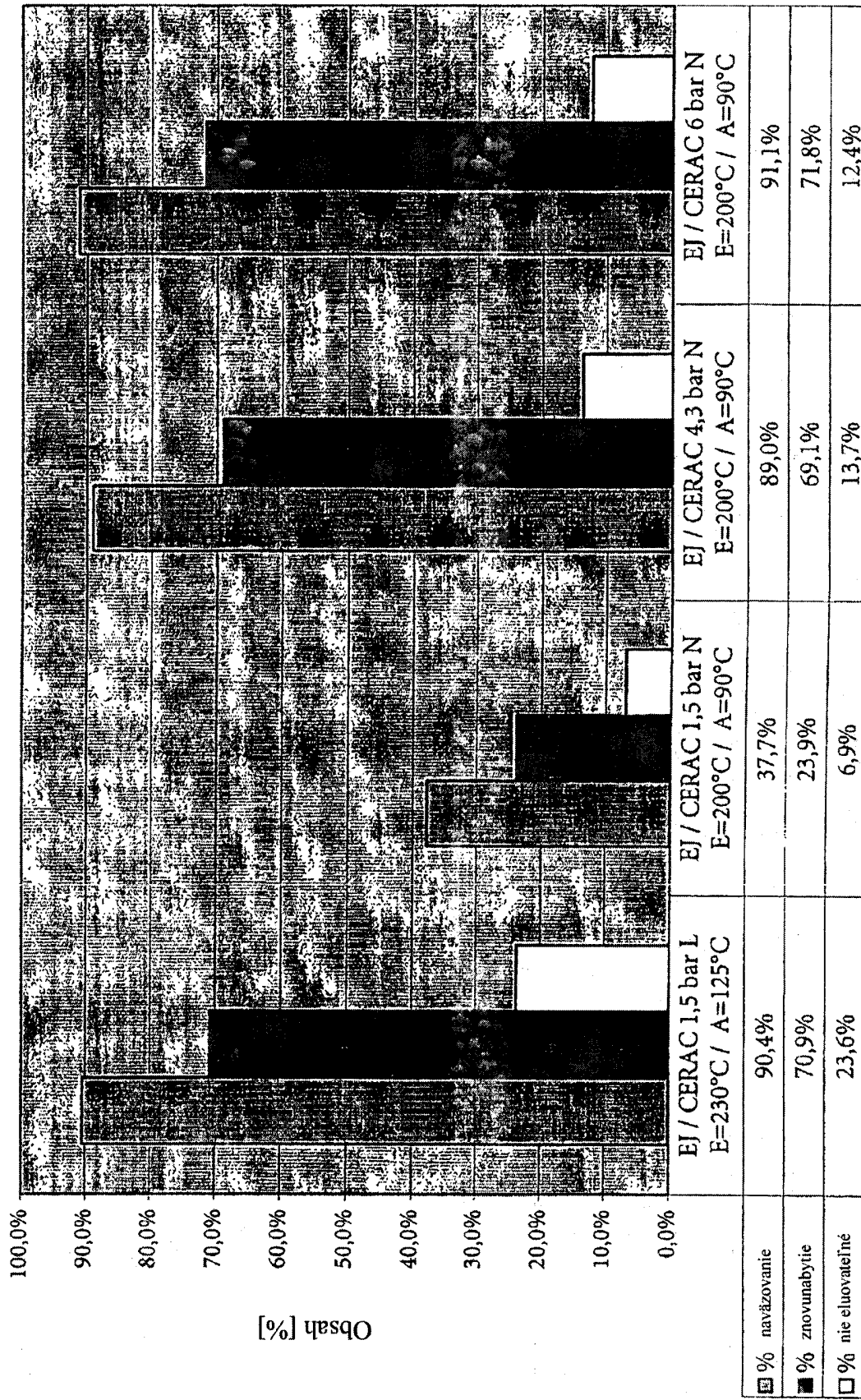
Obrázok 11



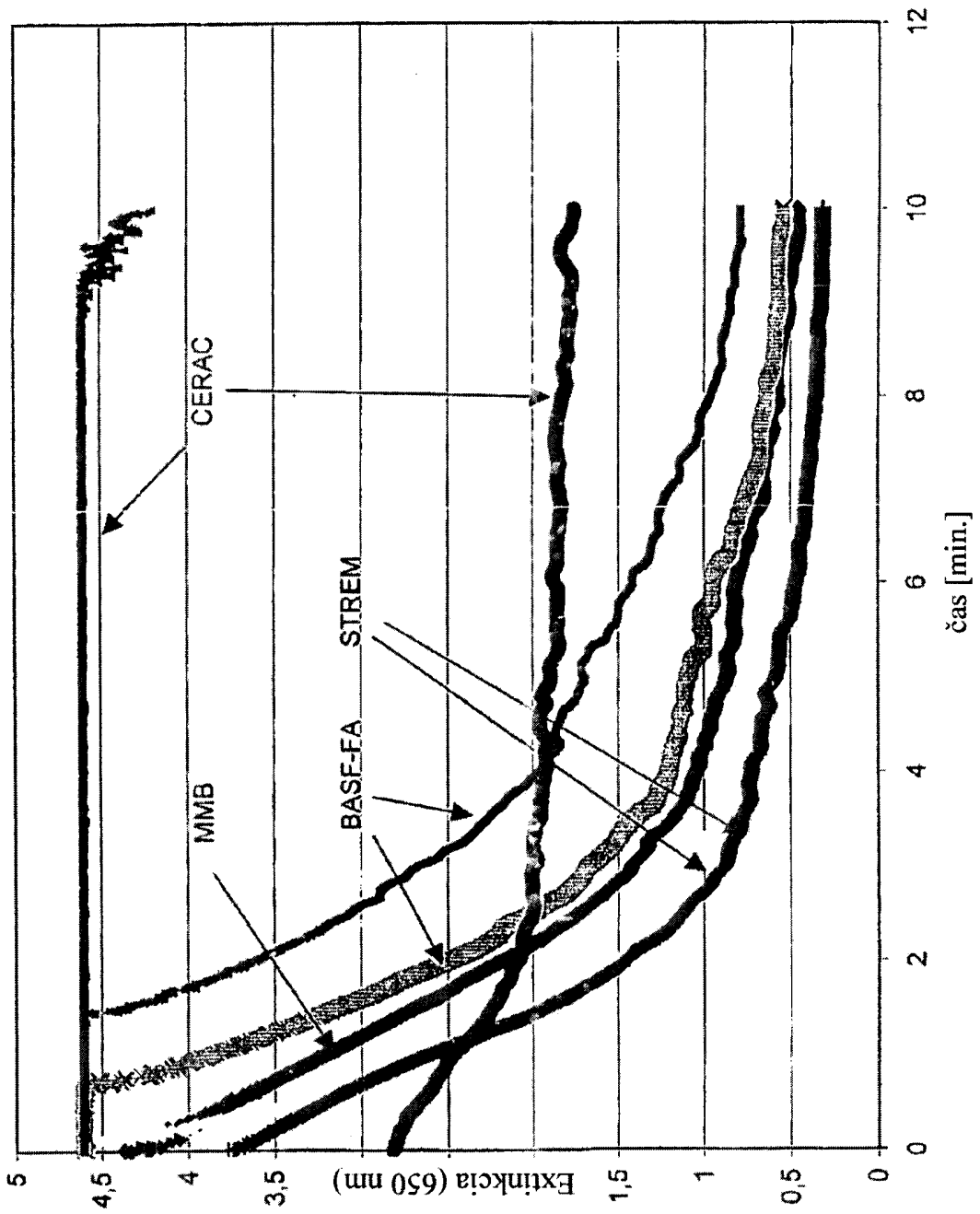
Obrázok 12



Obrázok 13

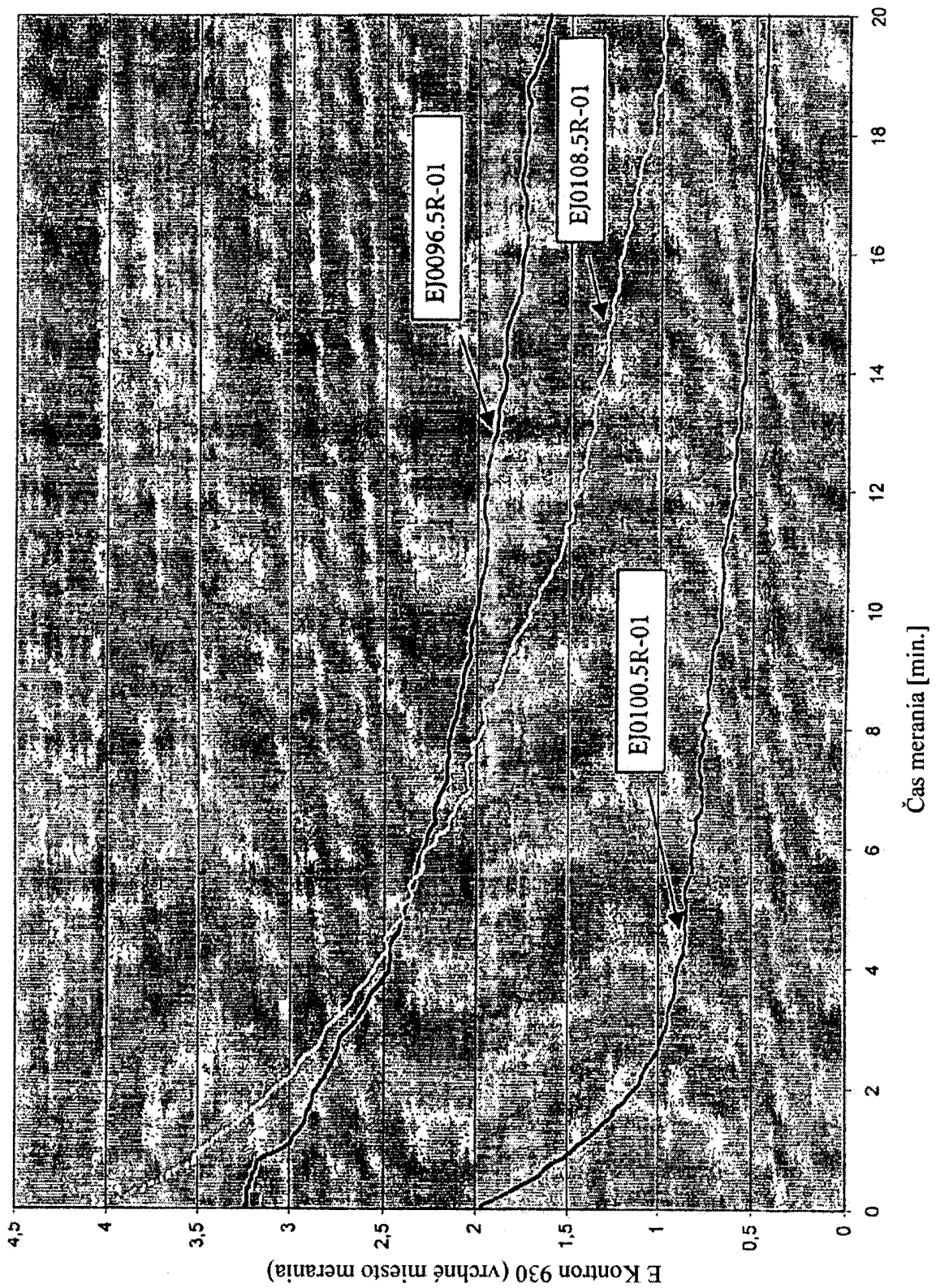


Obrázok 14a

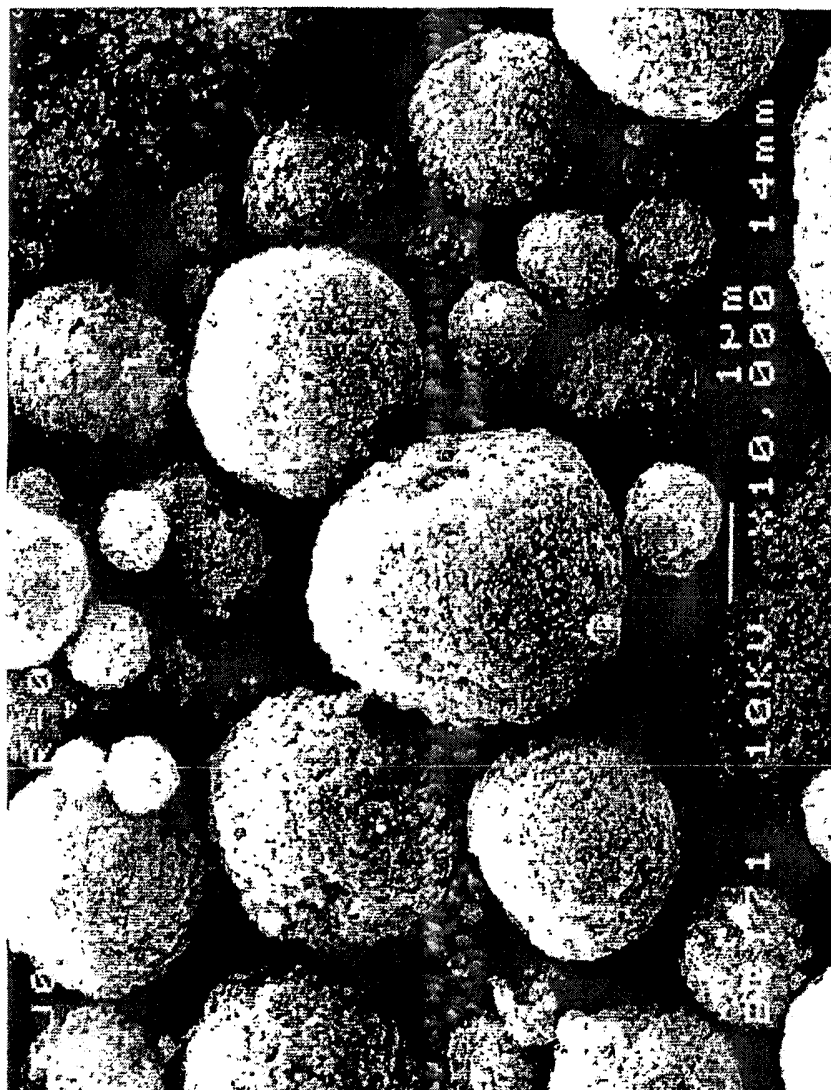


- ◆— EJ0047.2R-05
- EJ0096.5R-01
- EJ0096.7R-01
- ×— EJ0097.4R-01
- RN0045.4R-01
- RN0045.5R-01
- +— RN0046.7R-01

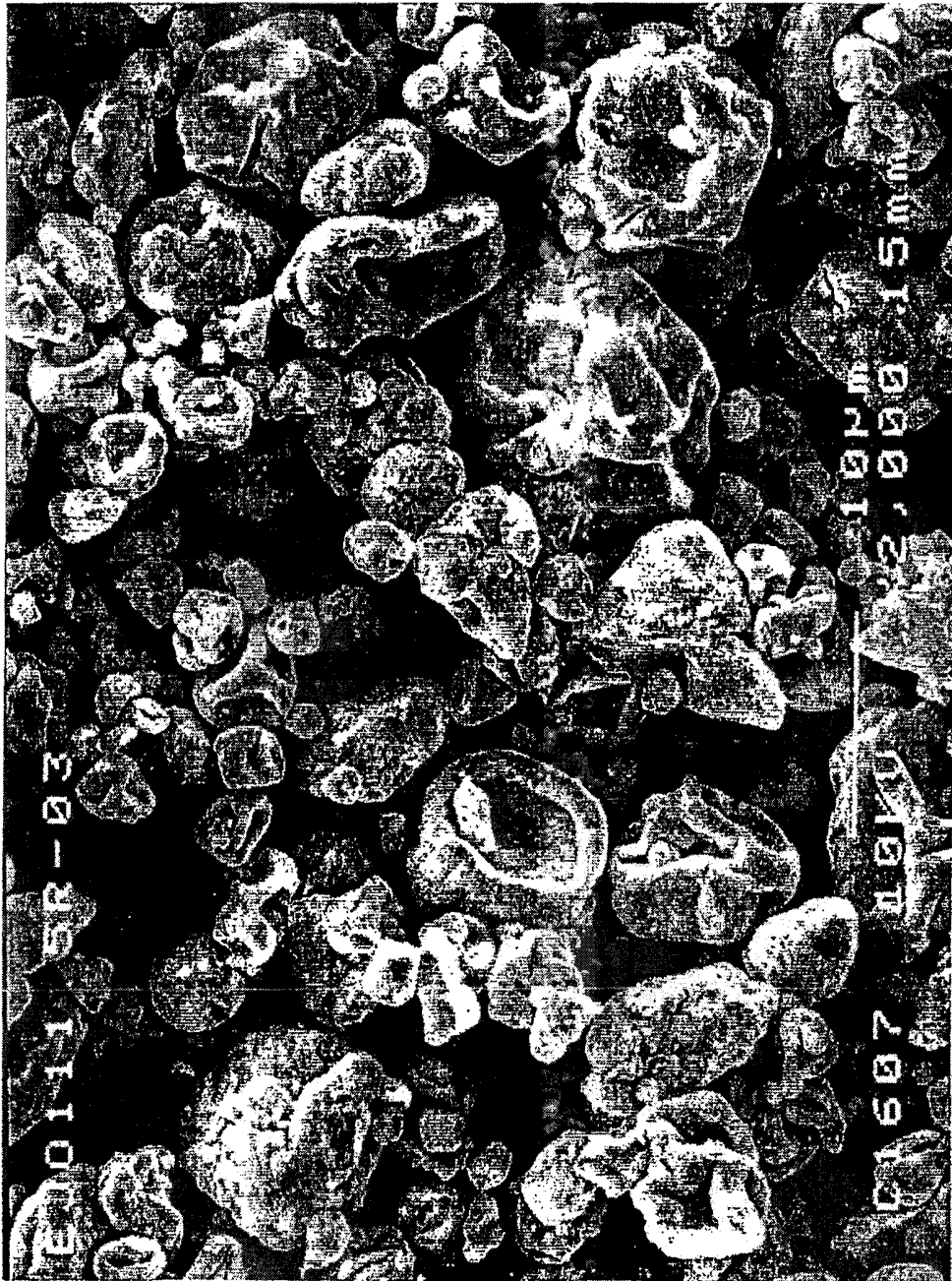
Obrázok 14b



Obrázok 15



Obrázok 16



## Prehľad sekvencií

&lt;110&gt; Roche Diagnostics GmbH

&lt;120&gt; Magnetické sklenené častice, metódy ich prípravy a použitie

5

&lt;130&gt; 52960AEP engl AB

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

10

&lt;150&gt; EP99122853.7

&lt;151&gt; 1999-11-17

&lt;160&gt; 23

15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 23

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umelá sekvencia

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér

25

&lt;400&gt; 1

tcagggcaaa actcagctca ccg

23

&lt;210&gt; 2

30

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umelá sekvencia

&lt;220&gt;

35

&lt;223&gt; Opis umelej sekvencie: syntetický oligonukleotid

&lt;400&gt; 2

gatgagttcg tgtcctgaca act

23

&lt;210&gt; 3

40

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umelá sekvencia

&lt;220&gt;

45

&lt;223&gt; Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HIV vopredný)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Modifikovaná báza

50

&lt;222&gt; (1)

&lt;223&gt; Derivatizácia biotínu

&lt;400&gt; 3

agttggagga catcaagcag ccatgcaaat

30

55

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umelá sekvencia

60

	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér(HIV spätný)	
	<220>	
5	<221> Modifikovaná báza	
	<222> (1)	
	<223> Derivatizácia biotínu	
	<400> 4	
10	tgctatgtca gtccccttg gttctct	27
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> DNA	
15	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HCV vopredný)	
	<400> 5	
20	gcagaaagcg tctagccatg gcgt	24
	<210> 6	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér(HCV spätný)	
30		
	<220>	
	<221> Modifikovaná báza	
	<222> (1)	
	<223> Derivatizácia biotínu	
35		
	<400> 6	
	ctcgcaagca ccctatcagg cagt	24
	<210> 7	
40	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
45	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HBV vopredný)	
	<400> 7	
	ggagtgtgga ttcgact	18
50	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
55	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HBV spätný)	
	<220>	
	<221> Modifikovaná báza	
60	<222> (1)	

	<223> Derivatizácia biotínu	
	<400> 8	
5	tgagatcttc tgcgacgc	18
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetická olinukleotidová sonda (HIV)	
	<220>	
15	<221> Modifikovaná báza	
	<222> (1)	
	<223> Ruthenium3+-(tris-bipyridyl)- derivatizácia	
	<400> 9	
20	atcaatgagg aagctgcaga	20
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetická olinukleotidová sonda (HCV)	
30	<220>	
	<221> Modifikovaná báza	
	<222> (1)	
	<223> Ruthenium3+-(tris-bipyridyl)- derivatizácia	
35	<400> 10	
	gtcgtgcagc ctccaggacc c	21
	<210> 11	
	<211> 18	
40	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetická olinukleotidová sonda (HCV)	
45	<220>	
	<221 > Modifikovaná báza	
	<222> (1)	
	<223> Ruthenium3+-(tris-bipyridyl)- derivatizácia	
50	<400> 11	
	agaccaccaa atgccct	18
	<210> 12	
55	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
60	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HIV)	

	<220> Modifikovaná báza	
	<221>	
	<222> (29)	
5	<223> derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom	
	<400> 12	
	agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa	29
10	<210> 13	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
15	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HIV)	
	<220>	
	<221> Modifikovaná báza	
20	<222> (29)	
	<223> derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom	
	<400> 13	
	agtgggggga caccagcag caatgcaaa	29
25	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Umelá sekvencia	
30	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HIV spätný)	
	<220>	
	<221> Modifikovaná báza	
35	<222> (30)	
	<223>' derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom	
	<400> 14	
40	ggtactagta gttcctgcta tgcacttcc	30
	<210> 15	
	<211> 26	
	<212> DNA	
45	<213> Umelá sekvencia	
	<220>	
	<223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HCV vopredný)	
50	<220>	
	<221> Modifikovaná báza	
	<222> (26)	
	<223> derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom	
55	<400> 15	
	gcagaaagcg tctagccatg gcgta	26
	<210> 16	
	<211> 28	
60	<212> DNA	

<213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HCV vopredný)

5 <220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 <222> (28)  
 <223> derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom

10 <400> 16  
 gcaagcaccc tatcagcgag taccacaa 28

<210> 17  
 15 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 20 <223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HBV vopredný)

<220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 <222> (20)  
 25 <223> i

<220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 <222> (28)  
 30 <223> derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom

<400> 17  
 agaagtcaga aggcaaaaa gagagtaa 28

35 <210> 18  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

40 <220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: syntetický olinukleotidový primér (HBV vopredný)

<220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 45 <222> (27)  
 <223> derivatizácia p-(t-butyl)benzyl- zvyškom

<400> 18  
 cacctctgcc taatcatctc ttgtca 27

50 <210> 19  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

55 <220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: syntetická olinukleotidová sonda (HIV)

<220>  
 60 <221> Modifikovaná báza

- <222> (1)  
<223> Derivatizácia Pentamethine-di-indocarbocyanine via a alkylphosphatidyl- spojovníkom (Pharmacia Biotech CyS-N-ethyl-phosphoramidite)
- 5 <220>  
<221> rôzne vlastnosti  
<222> (10)  
<223> N predstavuje 2-(amino-cyclohexyl-)propane-1,3-diol-spojovník derivatizovaný 6-carboxy-fluoresceinom (Hiogenex CX-FAM-phosphoramidite)
- 10 <220>  
<221> Modifikovaná báza  
<222> (31)  
<223> derivatizácia 3'-koncevou fosfátovou skupinou
- 15 <400> 19  
tctgcagctn tctcattga tggatcttt ta 32
- <210> 20  
20 <211> 32  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia
- <220>  
25 <223> Opis umelej sekvencie: syntetická olinukleotidová sonda (HCV)
- <220>  
<221> Modifikovaná báza  
<222> (1)  
30 <223> derivatizácia Pentamethine-eli-indocarbocyanine cez a alkylphosphatidyl-spojovník (Pharmacia Biotech CyS-N-ethyl-phosphoramidite)
- <220>  
<221> rôzne vlastnosti  
35 <222> (15)  
<223> N predstavuje; 2-(amino-cyclohexyl-)propane-1,3-diol-spojovník derivatizovaný 6-carboxy-fluoresceinom (Biogenex CX-FAM-phosphoramidite)
- <220>  
40 <221> Modifikovaná báza  
<222> (31)  
<223> derivatizácia 3'-koncevou fosfátovou skupinou
- <400> 20  
45 cgggtgtactc accgnttccg cagaccacta tg 32  
<210> 21  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia
- 50 <220>  
<223> Opis umelej sekvencie: syntetický oligonukleotid
- <220>  
55 <221> Modifikovaná báza  
<222> (1)  
<223> derivatizácia Pentamethine-di-indocarbocyanine via a alkylphosphatidyl- spojovníkom (Pharmacia Biotech CyS-N-ethyl-phosphoramidite)
- 60 <220>

- <221> rôzne vlastnosti  
 <222> (17)  
 <223> N predstavuje 2-(amino-cyclohexyl-)propane-1,3-diol-spojovník derivatizovaný 6-carboxy-fluoresce-  
 inem (Biogenex CX-FAM-phosphoramidite)
- 5
- <220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 <222> (32)  
 <223> derivatizácia 3'-terminal fosfátovou skupinou
- 10
- <400> 21  
 ccaagctgtg ccttgntgg cttggggca tgg 33
- <210> 22  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia
- 15
- <220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: syntetický oligonukleotid
- 20
- <220>  
 <221> modifikovaná báza  
 <222> (1)  
 <223> derivatizácia  
 Pentamethine-di-indocarbocyanine cez alkylphosphatidyl-spojovník (Pharmacia Biotech CyS-N-ethyl-pho-  
 sphoramidite)
- 25
- <220>  
 <221> rôzne vlastnosti  
 <222> (14)  
 <223> N predstavuje 2-(amino-cyclohexyl-)propane-1,3-diol-spojovník derivatizovaný hexachloro-6-car-  
 boxy-fluoresceinem (Hiogenex CX-HEX-phosphoramidite)
- 30
- <220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 <222> (30)  
 <223> derivatizácia 3'-koncevou fosfátovou skupinou
- 35
- <400> 22  
 tggactcagt cctntgtgca tctcaccttc t 31
- <210> 23  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia
- 45
- <220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: syntetický oligonukleotid (Aptamér)
- 50
- <220>  
 <221> Modifikovaná báza  
 <222> (46)  
 <223> derivatizácia 3'-koncevou fosfátovou skupinou
- 55
- <400> 23  
 cgatcatctc agaacattct tagcgtttg ttctgtgta tgatcg 46

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob výroby zmesi magnetických sklenených častíc, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahrnuje stupne:
  - a) suspendovanie magnetických objektov s priemerom medzi 5 a 500 nm v sole,
  - b) sušenie suspenzie rozprašovaním v dvojdyzovej rozprašovacej sušiarňi a
  - c) slinovanie rozprašovaním vysušeného prášku.
2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že vstupná teplota dvojdyzovej rozprašovacej sušiarňi leží medzi 120 °C a 500 °C, výstupná teplota je zvolená podľa teploty varu sola a rozprašovací tlak je aspoň rovnajúci sa 0,3 MPa.
3. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že vstupná teplota dvojdyzovej rozprašovacej sušiarňi leží medzi 170 °C a 230 °C, výhodne medzi 190 °C a 210 °C.
4. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rozprašovací tlak leží medzi 0,4 a 0,6 MPa.
5. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sol ako rozpúšťadlo obsahuje etanol.
6. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že výstupná teplota leží medzi 50 °C a 300 °C.
7. Spôsob podľa niektorého z nárokov 5 až 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že výstupná teplota leží medzi 90 °C a 100 °C.
8. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 7, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že slinovacia teplota leží medzi 400 °C a 1200 °C, výhodne medzi 720 °C a 770 °C.
9. Magnetické sklenené častice získateľné spôsobom nárokovanom v niektorom z nárokov 1 až 8.
10. Zmes magnetických sklenených častíc získateľná spôsobom nárokovaným v niektorom z nárokov 1 až 8, ktorá obsahuje aspoň jeden magnetický objekt so stredným priemerom medzi 5 a 500 nm, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že polčas sedimentácie suspenzie zmesi v izopropanole s obsahom 3 mg/ml (hmotnosť/objem) je dlhší než 3 minúty.
11. Zmes podľa nároku 10, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetický objekt má stredný priemer medzi 10 a 200 nm, výhodne medzi 15 a 50 nm.
12. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 11, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že polčas sedimentácie je dlhší než 6 minút.
13. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 12, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetický objekt má stredný priemer 23 nm.
14. Zmes podľa nároku 10 alebo 13, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že pomer priemeru magnetického telieska k priemeru skleneného plášťa je menší než 1 : 10.
15. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 15, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetické sklenené častice majú stredný priemer medzi 0,5 μm a 5 μm.
16. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 15, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetické sklenené častice sú mikroporézne.
17. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 16, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že porézny povrch magnetických sklenených častíc tvorí menej než 10 % celkového povrchu.
18. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 17, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetický objekt je supermagnetický.
19. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 16, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetický objekt je ferimagnetický alebo feromagnetický.
20. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 19, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetických objekt obsahuje železo alebo oxid železa.
21. Zmes podľa nároku 20, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že oxidom železa je Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> alebo γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.
22. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 21, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetické sklenené častice majú povrchovú plochu väčšiu než 4 m<sup>2</sup>/g.
23. Zmes podľa nároku 22, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetické sklenené častice majú povrchovú plochu medzi 5 a 100 m<sup>2</sup>/g, najvýhodnejšie v rozmedzí 15 až 30 m<sup>2</sup>/g.
24. Zmes podľa niektorého z nárokov 10 až 23, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že magnetické sklenené častice sú v podstate sférické.
25. Suspenzia, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje zmes magnetických častíc v kvapaline podľa niektorého z nárokov 10 až 24.
26. Suspenzia podľa nároku 25, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že kvapalina obsahuje alkohol.
27. Suspenzia podľa nároku 26, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že alkoholom je izopropanol alebo etanol.

28. Suspenzia podľa nároku 25, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že kvapalinou je pufrovaný vodný roztok.

29. Suspenzia podľa nároku 28, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že suspenzia dodatočne obsahuje DNA alebo RNA.

30. Suspenzia podľa niektorého z nárokov 25 až 29, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že suspenzia dodatočne obsahuje chaotropné činidlo.

31. Suspenzia podľa nároku 30, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že chaotropné činidlo je prítomné v koncentrácii medzi 2 a 8 mol/l, výhodne medzi 4 a 6 mol/l.

32. Suspenzia podľa niektorého z nárokov 25 až 31, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že suspenzia obsahuje 5 až 60 mg/ml kompozície podľa niektorého z nárokov 10 až 24.

33. Skúmavka obsahujúca kompozíciu podľa niektorého z nárokov 10 až 24 alebo suspenziu podľa niektorého z nárokov 25 až 32.

34. Viaczložková súprava, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje skúmavku podľa nároku 33.

35. Viaczložková súprava podľa nároku 34, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že ďalej obsahuje premývací roztok alebo eluent.

36. Viaczložková súprava podľa niektorého z nárokov 34 až 35, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje činidlá vhodné na čistenie nukleovej kyseliny.

37. Použitie zmesi podľa niektorého z nárokov 25 až 32 na prípravu suspenzie.

38. Použitie suspenzie podľa niektorého z nárokov 25 až 32 na čistenie nukleových kyselín.

39. Použitie viaczložkovej súpravy podľa niektorého z nárokov 34 až 35 na čistenie nukleových kyselín.

40. Spôsob izolácie biologického materiálu, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) privedenie vzorky, ktorá obsahuje biologický materiál v kvapaline, do styku zo zmesi podľa niektorého z nárokov 10 až 24, magnetickými sklenenými časticami podľa nároku 9 alebo suspenzií podľa niektorého z nárokov 25 až 32 za podmienok, pri ktorých sa biologický materiál viaže priamo na sklenený povrch, a

b) oddelenie biologického materiálu od kvapaliny.

41. Spôsob podľa nároku 40, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že biologickým materiálom je nukleová kyselina.

42. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 41, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa oddelenie uskutoční pomocou magnetu.

43. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 a 42, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že magnetické častice nie sú predmagnetizované, keď sú privedené do styku so vzorkou.

44. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 43, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že spôsob je automatizovaný.

45. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 44, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že spôsob je prevádzkovaný vo formáte vysokého nastojenia.

46. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 45, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa pri ňom odoberie zo zásobnej nádoby suspenzia podľa niektorého z nárokov 25 až 26 a čiastkové objemy suspenzie sa pridávajú do rôznych reakčných nádob.

47. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 46, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa nukleová kyselina po čistení deteguje.

48. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 47, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa nukleová kyselina deteguje po amplifikačnom stupni.

49. Spôsob podľa niektorého z nárokov 40 až 48, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa nukleová kyselina deteguje spôsobom zahrnujúcim:

a) uvedenie do styku vzorky s oligonukleotidom obsahujúcim sekvenciu komplementárnej k cieľovej nukleotidovej kyseliny a s označeným oligonukleotidom obsahujúcim sekvenciu komplementárnej k druhej oblasti toho istého vlákna sekvencie cieľovej nukleovej kyseliny, ale nezahrnujúcim sekvenciu nukleovej kyseliny definovanou prvým oligonukleotidom, na vytvorenie za hybridizačných podmienok zmesi duplexov, pričom tieto duplexy obsahujú cieľovú nukleovú kyselinu spojenú s prvým oligonukleotidom a s označeným oligonukleotidom tak, že 3'-koniec prvého oligonukleotidu je priľahlý k 5'-koncu označeného oligonukleotidu;

b) udržanie zmesi zo stupňa a) s templat-dependentnou polymerázou nukleových kyselín majúci 5'- a 3'-nukleázovú aktivitu za podmienok dostatočných na umožnenie 5'- a 3'-nukleázovej aktivite rozštiepiť pripojený označený oligonukleotid a uvoľniť značené fragmenty; a

c) detekciu a/alebo meranie signálu generovaného hydrolyzou označeného oligonukleotidu.

50. Spôsob podľa niektorého z nárokov 48 až 49, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že detekcia sa uskutočňuje v prítomnosti blokujúceho oligonukleotidu.

51. Spôsob podľa nároku 50, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že blokujúcim oligonukleotidom je aptamér.

52. Spôsob podľa nároku 51, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že aptamér má sekvenciu SEQ ID NO:23.

53. Spôsob podľa niektorého z nárokov 50 až 52, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že amplifikačná a detekčná reakcia sa uskutočňuje vo formáte homogénneho multiplexového stanovenia v roztoku na účely súčasnej detekcie viacpočetných cieľov.

54. Spôsob podľa niektorého z nárokov 51 až 53, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že v priebehu aspoň 5 cyklov polymerázovej reťazovej reakcie je teplota nasadenia primérov menej než 8 °C, výhodne menej než 3 °C, nad disociačnou teplotou polymerázo-aptamérového komplexu.

10

**Koniec dokumentu**