

**Kationos vegyületeket és protondonort tartalmazó készítmények alkalmazása nukleinsavak stabilizálására és/vagy izolálására mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból, protozoonokból vagy algákból**

5

**Kivonat**

10 A találmány tárgyát kationos vegyületet és adalékanyagként protondonort tartalmazó készítmények alkalmazása képezi nukleinsavak stabilizálására és/vagy izolálására. Ezen felül, a találmány tárgyát képezi egy eljárás is a készítmény előállítására, valamint a készítményt tartalmazó diagnosztikus készítmény és reagenskészlet, továbbá a készítményt és biológiai mintát tartalmazó elegy.

15 A készítmény alkalmas nukleinsavak izolálására mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból, protozoonokból vagy algákból, és/vagy a nukleinsavak stabilizálására.

Jellemező alv. Ø  
Jolika Andri

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

**Kationos vegyületeket és protondonort tartalmazó készítmények alkalmazása nukleinsavak stabilizálására és/vagy izolálására mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból, protozoonokból vagy algákból**

5 A találmány tárgyát kationos vegyületet és adalékanyagként protondonort tartalmazó készítmények alkalmazása képezi nukleinsavak stabilizálására és/vagy izolálására. Ezen felül, a találmány tárgyát képezi egy eljárás is a készítmény előállítására, valamint a készítményt tartalmazó diagnosztikus készítmény és reagenskészlet, továbbá a készítményt és biológiai mintát tartalmazó elegy.

10 A készítmény alkalmas nukleinsavak izolálására mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból, protozoonokból vagy algákból, és/vagy a nukleinsavak stabilizálására.

Közelebbről, a találmány esszenciális összetevőként az



általános képletű kationos vegyületet - ahol:

15 Y jelentése nitrogén vagy foszfor;

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  és  $R_4$  egymástól függetlenül elágazás nélküli vagy elágazó  $C_1$ - $C_{20}$ -alkilcsoport és/vagy  $C_6$ - $C_{20}$ -aril-csoport vagy  $C_7$ - $C_{26}$ -aralkil-csoport; és

$X^-$  jelentése szervetlen vagy szerves, egy- vagy többbázisú sav anionja;

20 valamint adalékanyagként - mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból, protozoonokból vagy algákból származó RNS és/vagy DNS stabilizálására, vagy RNS és/vagy DNS azokból történő izolálására -, legalább egy protondonort tartalmazó készítmény alkalmazására vonatkozik.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a készítmény kationos vegyületként ammóniumsót tartalmaz, ahol  $R_1$  jelentése magasabb szénatomos, például 12, 14 vagy 16 szénatomos alkilcsoport; és  $R_2$ ,  $R_3$  és  $R_4$  jelentése minden esetben metilcsoport.

25 A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a készítmény általános képletében  $R_1$  jelentése aralkilcsoport, előnyösen benzilcsoport;  $R_2$  jelentése magasabb szénatomos, például 12, 14 vagy 16 szénatomos alkilcsoport; és  $R_3$  és  $R_4$  jelentése pedig metilcsoport.

30 A vegyület anionként tartalmazhat bromid, klorid, foszfát, szulfát, formiát, acetát, propionát, oxalát, malonát vagy szukcinát aniont.

A  $C_1$ - $C_{20}$ -alkil-csoport általánosságban 1-6 szénatomot tartalmazó elágazó vagy elágazás nélküli szénhidrogén csoportot jelent, amely adott esetben egy vagy több, azonos vagy egymástól különböző halogénatommal, előnyösen fluorral van szubsztituálva. A szénhidrogén csoport lehet például a felsoroltak valamelyike: metil, etil, propil, 1-metiletil(izo-propil), butil, 1-metilpropil, 2-metilpropil, 1,1-dimetiletil, n-pentil, 1-metilbutil, 2-metilbutil, 3-metilbutil, 1,1-dimetilpropil, 1,2-dimetilpropil, 2,2-dimetilpropil, 1-etilpropil, hexil, 1-metilpentil, 2-metilpentil, 3-metilpentil, 4-metilpentil, 1,1-dimetilbutil, 1,2-dimetilbutil, 1,3-dimetilbutil, 2,2-dimetilbutil, 2,3-dimetilbutil, 3,3-dimetilbutil, 1-etilbutil, 2-etilbutil, 1,1,2-trimetilpropil, 1,2,2-trimetilpropil, 1-etil-1-metilpropil vagy 1-etil-2-metil-propil.

Magasabb szénatomos alkilcsoporton elágazó vagy elágazás nélküli  $C_7$ - $C_{20}$ -alkil-csoportot értünk, amely adott esetben egy vagy több, azonos vagy egymástól különböző halogénatommal, előnyösen fluorral van szubsztituálva. Ilyen szénhidrogén csoport lehet például a felsoroltak valamelyike: elágazó vagy elágazás nélküli heptil, oktil, nonil, decil, undecil, dodecil, tetradecil, hexadecil, dodekadekil vagy eikozil.

$C_3$ - $C_6$ -alkenil-csoporton 3-6 szénatomos, egy vagy több kettőskötést tartalmazó elágazó vagy elágazás nélküli  $C_7$ - $C_{20}$ -alkil-csoportot értünk, amely adott esetben egy vagy több, azonos vagy egymástól különböző halogénatommal, előnyösen fluorral van szubsztituálva. Ilyen szénhidrogén csoport lehet például az alábbiak valamelyike:

2-propenil(allil), 2-butenil, 3-butenil, 1-metil-2-propenil, 2-metil-2-propenil, 2-pentenil, 3-pentenil, 4-pentenil, 1-metil-2-butenil, 2-metil-2-butenil, 3-metil-2-butenil, 1-metil-3-butenil, 2-metil-3-butenil, 3-metil-3-butenil, 1,1-dimetil-2-propenil, 1,2-dimetil-2-propenil, 1-etil-2-propenil, 2-hexenil, 3-hexenil, 4-hexenil, 5-hexenil, 1-metil-2-pentenil, 2-metil-2-pentenil, 3-metil-2-pentenil, 4-metil-2-pentenil, 1-metil-3-pentenil, 2-metil-3-pentenil, 3-metil-3-pentenil, 4-metil-3-pentenil, 1-metil-4-pentenil, 3-metil-4-pentenil, 4-metil-4-pentenil, 1,1-dimetil-2-butenil, 1,1-dimetil-2-butenil, 1,1-dimetil-3-butenil, 1,2-dimetil-2-butenil, 1,2-dimetil-3-butenil, 1,3-dimetil-3-butenil, 2,2-dimetil-3-butenil, 2,3-dimetil-2-butenil, 2,3-dimetil-2-butenil, 2,3-dimetil-3-butenil, 1-etil-2-butenil, 1-etil-3-butenil, 2-etil-2-butenil, 2-etil-3-butenil, 1,1,2-trimetil-2-propenil, 1-etil-1-metil-2-propenil, vagy 1-etil-2-metil-2-propenil.

Általánosságban,  $C_3$ - $C_6$ -alkinil-csoporton 3-6 szénatomos, egy vagy több hármaskötést tartalmazó elágazó vagy elágazás nélküli  $C_7$ - $C_{20}$ -alkinil csoportot értünk, amely adott esetben egy vagy több, azonos vagy egymástól különböző halogénatommal, előnyösen fluorral van szubsztituálva. Ilyen szénhidrogén csoport lehet például az alább felsoroltak valamelyike:

2-propinil(propargil), 2-butinil, 3-butinil, 1-metil-2-propinil, 2-metil-2-propinil, 2-pentinil, 3-pentinil, 4-pentinil, 1-metil-2-butinil, 2-metil-2-butinil, 3-metil-2-butinil, 1-metil-3-butinil, 2-metil-3-butinil, 3-metil-3-butinil, 1,1-dimetil-2-propinil, 1,2-dimetil-2-propinil, 1-etil-2-propinil, 2-hexinil, 3-hexinil, 4-hexinil, 5-hexinil, 1-metil-2-pentinil, 2-metil-2-pentinil, 3-metil-2-pentinil, 4-metil-2-pentinil, 1-metil-3-pentinil, 2-metil-3-pentinil, 3-metil-3-pentinil, 4-metil-3-pentinil, 1-metil-4-pentinil, 3-metil-4-pentinil, 4-metil-4-pentinil, 1,1-dimetil-2-butinil, 1,1-dimetil-3-butinil, 1,2-dimetil-2-butinil, 1,2-dimetil-3-butinil, 1,3-dimetil-2-butinil, 1,3-dimetil-3-butinil, 2,2-dimetil-3-butinil, 2,3-dimetil-2-butinil, 2,3-dimetil-3-butinil, 1-etil-2-butinil, 1-etil-3-butinil, 2-etil-1-butinil, 2-etil-2-butinil, 2-etil-3-butinil, 1,1,2-trimetil-2-propionil, 1-etil-1-metil-2-propionil vagy 1-etil-2-metil-2-propionil.

Hacsak kifejezetten másképp nem kötjük ki, arilcsoporton 4-22 szénatomos aromás, egy- vagy többmagvú csoportot értünk, amely adott esetben egy vagy több heteroatomot is tartalmazhat. Ilyen csoportok például a fenil, naftil, antracil, vagy pirol, furán tiofén, piridin, piridazin, pirimidin vagy pirazin csoportok, amelyek adott esetben - egymástól függetlenül - egy vagy több halogénatommal (F, Cl, Br, I), előnyösen fluorral, vagy alkilcsoporttal egyszeresen vagy többszörösen szubsztituáltak.

Aralkil- csoporton a fenti meghatározás szerinti egy- vagy többmagvú arilcsoportot értünk, amely a kationos részhez  $C_1-C_6$ -alkilén,  $C_3-C_6$ -alkenilén vagy  $C_3-C_6$ -alkinilén hídon keresztül kötődik, ahol a  $C_1-C_6$ -alkilén-,  $C_3-C_6$ -alkenilén- vagy  $C_3-C_6$ -alkinilén- csoport elnevezéseket a fentiekben meghatározott értelemben használjuk. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a vegyület benzilcsoportot tartalmaz.

Az  $X^-$ -ellenionként előnyösen alkalmazhatjuk bármely halogénsav anionját, vagy egy- vagy kétbázisú szerves savak anionjait, például azok acetátjait oxalátjait, malonátjait, szukcinátjait vagy citrátjait.

A találmány szerinti megoldással összhangban, a vegyület protondonorként - szervesen savakon és azok sóin felül, egymagukban vagy valamilyen kombinációban - tartalmazhat telített alifás monokarbonsavakat, telítetlen alkenil-karbonsavakat, telített és/vagy telítetlen alifás  $C_2-C_6$ -dikarbonsavakat, alifás keto-karbonsavakat vagy keto-dikarbonsavakat, vagy aminosavakat. Valamennyi említett szerves sav alkalmazható szubsztituálatlan formában vagy szubsztituált származékként, amelyek közül előnyösen - hacsak kifejezetten másképp nem kötjük ki - a telítetlen származékokat vagy hidroxilcsoportokkal egyszeresen vagy többszörösen szubsztituált származékokat alkalmazzuk.

Telített alifás monokarbonsavakon hangyasavon felül előnyösen  $C_1$ - $C_6$ -alkil-karbonsavakat értünk, amelyek közül előnyösen a következők valamelyikét alkalmazzuk: ecetsav, propionsav, n-vajsav, n-valeriánsav, izovaleriánsav, etil-metil-ecetsav (2-metil-vajsav), 2,2-dimetil-propionsav (pivalinsav), n-hexánsav, n-oktánsav, n-dekánsav, vagy n-dodekánsav (laurinsav). Az említetteken felül alkalmazhatjuk a fenti savak ketokarbonsav-származékait is.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható telítetlen alkenil-karbonsavak például a következők: akrilsav (propénsav), metakrilsav, krotonsav, izokrotonsav vagy vinil-ecetsav.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, telített  $C_2$ - $C_6$ -dikarbonsavakat, például oxálsavat, malonsavat, borostyánkősavat, glutársavat vagy adipinsavat, és különösen előnyösen oxálsavat és borostyánkősavat alkalmazunk.

A megoldani kívánt probléma megoldására különösen előnyösen alifás hidroxidi- és -trikarbonsavakat, különösen előnyösen borkősavat, D-(+)-, L-(-) vagy DL-malonsavat, (2R, 3R)-(+)-borkősavat, (2S, 3S)-(-)-borkősavat, mezo-borkősavat vagy citromsavat alkalmazunk.

A felvetett probléma megoldására telítetlen dikarbonsavakat, például malonsavat vagy fumársavat, vagy telítetlen trikarbonsavakat, például akonitsavat is alkalmazhatunk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, adalékanyagként alifás ketodikarbonsavakat, például mezoxálsavat vagy oxálecetsavat, különösen előnyösen oxálecetsavat alkalmazhatunk.

A találmány szerinti megoldással összhangban protondonorként aminosavakat, előnyösen  $\alpha$ -aminosavakat, különösen előnyösen aminoecetsavat (glicint),  $\alpha$ -amino-propionsavat (alanint),  $\alpha$ -amino-izo-valeriánsavat (valint),  $\alpha$ -amino-izo-kaprionsavat (leucint), vagy  $\alpha$ -amino- $\beta$ -metilvaleriánsavat (izoleucint) is alkalmazhatunk. A felsoroltak közül különösen előnyösen glicint alkalmazunk.

A fent említett protondonorok alkalmazhatók önmagukban, tiszta sztereoizomerekként, vagy elegyben.

Adalékanyagként alkalmazhatunk továbbá szervetlen savakat, vagy alkalmazhatjuk azok sóit is. Előnyösen, szervetlen savak, például foszforsav vagy kénsav alkálifémekkel alkotott vagy ammóniumsóit alkalmazzuk. Legelőnyösebben, foszforsavat vagy ammónium-szulfátot alkalmazunk.

## 1. táblázat

A találmány szerinti készítményben adalékanyagként alkalmazható savak

| Elnevezés      | Képlet                                                             |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| ecetsav        | $\text{CH}_3\text{-COOH}$                                          |
| oxálsav        | $\text{HOOC-COOH}$                                                 |
| malonsav       | $\text{HOOC-CH}_2\text{-COOH}$                                     |
| tartronsav     | $\text{HOOC-CH(OH)-COOH}$                                          |
| borostyánkősav | $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$                         |
| almasav        | $\text{HOOC-CHOH-CH}_2\text{-COOH}$                                |
| borkősav       | $\text{HOOC-CHOH-CHOH-COOH}$                                       |
| glutársav      | $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$             |
| adipinsav      | $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ |
| citromsav      | $\text{HOOC-CH}_2\text{-COHCOOH-CH}_2\text{-COOH}$                 |
| maleinsav      | $\text{HOOC-CH=CH-COOH}$                                           |
| oxálecetsav    | $\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-COOH}$                                  |
| glicin         | $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-COOH}$                              |

Az adalékanyag különböző koncentrációban lehet jelen a készítményben. Alkalmazhatjuk különböző adalékanyagok kombinációját is. Az adalékanyag természetétől függően, más-más koncentráció-tartományok lehetnek előnyösek. Alkalmazhatjuk különböző adalékanyagok kombinációját is.

A kationos komponens koncentrációja a készítmény vizes oldatában 0,01 vegyes-% és telítettség között van; előnyösen 0,1-10 vegyes-% és telítettség között van; még előnyösebben 0,5-8 vegyes-%, és legelőnyösebben 2-6 vegyes-% között van.

Ilyen készítmények leírását találjuk a 100 31 236 számon közzétett németországi szabadalmi bejelentésben, amely a jelen találmány elsőbbségének alapját képezi, valamint az ahhoz csatolt 1-17. igénypontokban.

Nyilvánvaló, hogy amikor kationos vegyületek és adalékanyag oldatát adjuk egy mintához, az optimális koncentrációkat a biológiai minta térfogata, és a stabilizáló oldat és biológiai minta térfogatának aránya alapján határozzuk meg.

A leírás szerinti értelemben a nukleinsav kifejezést – hacsak kifejezetten másképp nem kötjük ki – tágabb értelemben használjuk, vonatkoztatva ribonukleinsavakra (RNS), - hosszúságtól és konfigurációtól függetlenül – dezoxiribonukleinsavakra, például kettősszalú egyszálú,

cirkuláris vagy lineáris DNS-re, és valamennyi alcsoportra, például monomer nukleotidokra, oligomerekre, plazmidokra, és bakteriális DNS-re vagy RNS-re, feldolgozott vagy feldolgozatlan formában egyaránt.

5 A biológiai minta lehet szabad vagy kötött nukleinsavakat tartalmazó élelmiszer-minta vagy környezeti minta, vagy a fenti meghatározás szerinti nukleinsavakat tartalmazó mikroorganizmus, amely származhat valamilyen organizmusból (egysejtű vagy többsejtű organizmusból; rovarokból, stb.), növényekből, baktériumokból, vírusokból, élesztőkből vagy más gombákból vagy prokariótákból.

10 A találmány szerinti megoldással összhangban, a kiindulási anyagként alkalmazott, mikroorganizmusokat tartalmazó biológiai minta lehet továbbá plazma, testfolyadék, például vér, szérum, sejt, leukocitafrakció, gyulladásos pörk, köpet, vizelet, sperma, széklet, váladék, aspirátum, bármilyen szövetminta, például biopsziás minta, például szövetek vagy szervek része, vagy élelmiszer-minta, amely szabad vagy kötött nukleinsavakat, vagy nukleinsavakat tartalmazó sejteket tartalmaz.

15 Az említetteken felül, a találmány szerinti készítmény alkalmas a fenti biológiai mintákból származó és eukariota eredetű nukleinsavak stabilizálására.

A 100 31 236 számon közzétett németországi szabadalmi bejelentésben (az eredetileg benyújtott bejelentés 6. oldalának 2 bekezdésében) leírtak szerint nyert eukariota eredetű nukleinsavakat izolálhatunk vagy stabilizálhatunk például a kitanításban ismertetettek szerint. Ily módon, a jelen kitanítás szerint, eukariota eredetű, például vérből, köpetből vagy csontvelőből izolált nukleinsavakat sikeresen stabilizálhatunk a 100 31 236 számon közzétett németországi szabadalmi bejelentésben ismertetettek szerint (lásd az -15. példákat, valamint az 1-15. ábrákat), amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi.

25 Az adalékanyag a stabilizáló reagensben különböző koncentrációban lehet jelen; például, annak koncentrációja a stabilizáló oldat és vér 1:1, előnyösen 3:1 arányú elegyében (térfogatokra vonatkoztatva) 50 mmol/l és a telítettséget elérő koncentráció között van; előnyösen, 100 mmol/l – 1 mol/l között van, és legelőnyösebben 200-500 mmol/l között van. Az adalékanyag természetétől függően, más koncentrációtartományok alkalmazása bizonyulhat előnyösnek. Alkalmazhatunk továbbá különböző adalékanyagok kombinációját.

30 A kationos komponens koncentrációja a készítmény vizes oldatában 0,01 vegyes-% és telítettség között van; előnyösen 0,1 vegyes-% és telítettség között van; még előnyösebben 0,5-15 vegyes-%, és legelőnyösebben 2-10 vegyes-% között van.

Nyilvánvaló, hogy amikor kationos vegyületek és adalékanyag oldatát adjuk egy mintához, az optimális koncentrációkat a biológiai minta térfogata, és a stabilizáló oldat és biológiai minta térfogatának aránya alapján határozzuk meg.

Általánosságban, a kationos vegyület és adalékanyag elegyének pH-ja – a mintával történő elegyítést megelőzően – az adott mintától függően tág határok (pH= 2-12) közt változhat, és az előnyösen 2 és 10 (pH=2-10) között, előnyösebben 3 és 8 (pH=3-8) között van. Az előnyös pH-tartomány függ az alkalmazott biológiai mintától. Vér, plazma és szérum esetében a pH előnyösen 2 és 6 között van, előnyösebben 3 és 4 között van.

A kationos vegyület és adalékanyag elegyének pH-ja széles határok (pH=2-12) közt változhat az adott mintától, és a nukleinsavak stabilizálásától és/vagy izolálásától függően a mikroorganizmusokban/mikroorganizmusokból - például prokariotákban/prokariotákból, gombákban/gombákból, protozoonokban/protozoonokból vagy algákban/algákból -, és az előnyösen 2 és 8 között, előnyösebben 2 és 5 között van. Az előnyös pH-tartomány az alkalmazott biológiai mintától is függ.

Biológiai minták, például véren kívül más sejttartalmú testfolyadékok, plazma és szérum, vagy például baktériumok, aspirátumok, sejtek, szövetek vagy egyéb biológiai minták – például a fentiekben ismertetettek - esetében a kationos vegyületet és adalékanyagot tartalmazó stabilizáló oldat pH-értéke előnyösen 3 és 10 között van, és előnyösebben 4 és 8 között van. A megadott pH-értékek a biológiai mintával történő elegyítést megelőzően értendők.

Ahhoz, hogy nukleinsavakat biológiai mintákban stabilizáljunk, a mintát a kationos vegyületet (vegyületeket) és adalékanyagokat tartalmazó oldattal elegyítjük. A biológiai mintát az elegyhez adhatjuk térfogatra számított 0,1-10 000 arányban; előnyösen 1-1000 arányban, és legelőnyösebben 1-100 arányban. A minta természetétől függően azonban - például vékonytűbiopsziás minták vagy alacsony sejtszámú tenyészetek esetében -, bizonyos esetekben, lényegesen nagyobb térfogatokat is alkalmazhatunk.

Hasonlóképp, a fenti kationos vegyületek és adalékanyagok szilárd formában is hozzáadhatók a mintához ha maga a biológiai minta folyadékot tartalmaz a szilárd fázis feloldására (például sejttartalmú testfolyadékok, sejtek tápközegben, vizelet esetében); vagy ha folyadékot, például vizet adunk az elegyhez a szilárd komponens feloldására. A szilárd formák alkalmazásának előnye az, hogy a szilárd formák kémiaiailag rendszerint sokkal stabilabbak, és gyakran egyszerűbb azokat a mintához adni.

Ezen felül nagyon kompakt biológiai minták, például szövetek esetében, a mintát megdarálhatjuk vagy homogenizálhatjuk a stabilizáló oldatban vagy a stabilizáló oldattal történő ele-



gyítés előtt abból a célból, hogy a nukleinsavak vagy különálló sejtek vagy sejtaggregátumok kiszabadulását megkönnyítsük, oly módon, hogy a kompakt mintát például mechanikai, kémiai, fizikai vagy enzimatis hatással roncsoljuk. A mintát mechanikai úton roncsolhatjuk például elektromos késsel, szemcsés darálóval („*bead mill*” készülékkel), vagy fecskendőn történő átnyomással; vagy a mintát enzimatis úton kezelhetjük például hidrolázokkal, proteázokkal vagy lipázokkal.

A mintát előkezelhetjük továbbá tisztán fizikai úton, például ultrahanggal.

Más eljárás szerint, az előkezelést végezhetjük kémiai úton, egymagában vagy tisztán fizikai eljárással kombinálva. A lízist elősegíthetjük például alifás alkoholokkal, elsősorban izopropanollal; vagy aldehidekkel vagy dialdehidekkel, például glioxállal; vagy fenolokkal vagy fenolszármazékokkal, például 2-difenilollal; vagy ionos, zwitterionos vagy nem-ionos vegyületekkel, például merkaptó- vagy redukáló reagensekkel, például dithiothreitollal és  $\beta$ -merkaptóetanollal; vagy foszforsav-származékokkal, például tributilfoszfáttal; vagy kaotrop reagensekkel, például ureával, guanidin-tiocianáttal vagy guanidin-hidrokloriddal, vagy sókkal; egymagukban vagy valamilyen kombinációban.

Mechanikai, kémiai, fizikai vagy enzimatis hatást a technika állása szerint ismert egyéb módokon is gyakorolhatunk a mintákra, és azok szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

A minta – az adott kívánalmaktól függően – hosszabb ideig, például 1-4 napig, vagy hosszabb ideig is tárolható szobahőmérsékleten, vagy akár melegebb hőmérsékleten, például 40°C-on vagy magasabb hőmérsékleten; vagy alacsonyabb hőmérsékleten, például 4°C-on, vagy -20°C-on, vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten.

A fenti vegyületek oldatát tartalmazó biológiai minta tárolását követően, azt közvetlenül analizálhatjuk nukleinsavtartalomra, vagy a nukleinsavakat izolálhatjuk a mintából.

Az alábbiakban áttekintést adunk a találmány technológiai háttéréről.

Mikroorganizmusok RNS expressziós mintázatának molekuláris biológiai eljárásokkal, például kvantitatív RT-PCR-, NASBA-, bDNS-, "biochips"- és Northern-blot technológiával történő vizsgálata elterjedt az alap kutatásban a génexpresszió analizálására prokariotákban, valamint protozoonokban, gombákban és algákban, és egyre nagyobb jelentőséggel bír például az orvosi diagnosztikában, mikrobiális patogének azonosítására; a gyógyszeriparban, gyógyászati készítmények kifejlesztésére és elemzésére; a biotechnológiában, kutatási vagy terápiás célra alkalmazható rekombináns proteinek előállítására; az ekológiában és populáció-

biológiában; valamint az élelmiszeranalízisben, mikroorganizmusokkal történt kontamináció kimutatására.

Számolnunk kell azzal a problémával, hogy ahhoz, hogy a nukleinsavakat izolálhassuk az organizmusokból, azokat el kell távolítanunk természetes környezetükből, hogy vizsgálatra alkalmas sejteket nyerjünk, és ezeket el kell juttatnunk a nukleinsav izolálásának helyszínére. Ugyanakkor, jelentős a kockázata annak, hogy az RNS- és DNS-profil megváltozik. Ez helytelen diagnózis felállításához vagy téves analízishez vezethet; például a génexpresszió megállapításánál bakteriális tenyészetekben; vagy például az orvosi/klinikai diagnózisban, a nukleinsav-analíz alapját képező fertőzött beteganyagok (például gyulladásos helyekről származó minták) vizsgálata során; vagy baktériumokkal, gombákkal, protozoonokkal vagy algákkal kontaminálódott élelmiszerek vizsgálata során. Élelmiszermintákban, vagy betegekből származó klinikai mintákban a mikroorganizmusok akár el is pusztulhatnak, és a nukleinsavak, elsősorban az RNS teljesen lebomolhatnak. A legnagyobb fontosságot kell hát tulajdonítanunk annak, hogy a nukleinsavakat, elsősorban az RNS-t stabilizáljuk közvetlenül a mintavételt követően.

A baktériumok különleges sajátága, hogy génexpressziójuk különösen gyorsan képes alkalmazkodni a környezeti körülményekhez. A génexpressziós mintázatban ennek eredményeképp megfigyelhető rövidtávú változások azért jöhetnek létre, mert a baktériumok celluláris RNS-e rendkívül rövid féleletidejű, és a baktériumok néhány másodperc vagy perc alatt képesek új RNS-transzkriptumokat szintetizálni. Ez az adaptációs mechanizmus problémát jelent a prokariota RNS expressziós mintázatának analízisében, mivel az RNS expressziós mintázat akár a sejtek összegyűjtése és az RNS-izolálás folyamata során is változhat. A későbbi analízis során tehát nem az adott kísérletben alkalmazott tenyésztési körülményekre jellemző expressziós mintát mutatjuk ki, hanem a sejtek összegyűjtése, lizálása vagy a sejtlizátum feldolgozása során fennálló körülményeket tükröző RNS expressziós mintázatot értékeljük.

A kitanítás mRNS-en felül vonatkozik tehát más RNS-típusokra is, például rRNS-re, snRNS-re, tRNS-re alacsony molekulatömegű („*Low Molecular Weight*”; LWM) RNS-típusokra, de DNS-re például genomi eredetű DNS-re (gDNS-re) is.

Az RNS mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból vagy algákból történő izolálására szokásosan alkalmazott eljárások például szerves oldószerek, például fenol és kloroform (triklórmétán), kaotrop sók vagy a fentiek valamilyen kombinációjának alkalmazásán alapulnak. A nukleinsavak prokariotákból, gombákból vagy algákból történő izolálására alkalmas ismert eljárások mindegyikére jellemző, hogy a sejteket a további feldolgozást megelőzően először centrifugálással vagy szűréssel koncentrálnunk kell a tenyésztő tápközegből. Az

első lépésben, az esetek jelentős részében, a megváltozott környezeti körülmények (például hőmérsékletváltozás, a centrifugálás vagy szűrés által okozott mechanikai stresszhatás, a gáz-atmoszféra megváltozása, stb.) hatására bekövetkezik a sejtek génexpressziós mintázatának megváltozása úgy, hogy a sejtek génexpressziós mintázata már nem az adott tenyésztési kör-  
 5 rülmények mellett fennálló, hanem a nukleinsavak izolálásánál alkalmazott körülményekre jellemző mintázatot tükrözi. A későbbi analízis értékelhetősége tehát megkérdőjelezhető.

Az expressziós mintázat megváltozásáért főként az RNS RNáz-ok által vagy kémiai behatások, például proteinmentesítés során bekövetkező nem-specifikus lebomlása, valamint az RNS specifikus szekvenciákat lebontó RNáz-ok által történő lebontása felelős. Ezen felül, az új  
 10 RNS-ek szintézise előnytelen, és ezért nem kívánt következményekkel járhat.

Általában kísérletet teszünk arra, hogy a sejtek nagyon gyors összegyűjtésével és gyors roncsolásával a fenti hatásokat minimalizáljuk, de ezzel nem tudjuk teljesen megakadályozni a génexpressziós mintázat megváltozását. Ezen felül, nem lehet nagyobb számú mintát párhuzamosan feldolgozni. Az enzimatis sejtlyis alkalmazását gyakran elkerülték, mivel azt csak a  
 15 szerves oldószer vagy koncentrált kaotrop sóoldat hozzáadása előtt lehetett végrehajtani, és legalább három percet vett igénybe. Az enzimatis sejtlyis során tehát egyaránt lehetőség van enzimatis RNS-lebontásra és új RNS-szintézisre, ami megváltoztathatja a sejtek génexpressziós mintázatát. Ebből következik, hogy az enzimatis sejttroncsolás a későbbi génexpressziós analízisek szempontjából mindig előnytelen volt.

A nukleinsavak (RNS és DNS) prokariotákból, gombákból, algákból és protozoonokból történő izolálásával kapcsolatos további probléma a sejtlyissel kapcsolatos, mivel ehhez a sejtfalet fel kell tárnunk. Egy széles körben alkalmazott eljárás szerint a prokariota sejtfalet a lizozim nevű enzimmal emésztjük a mureint; de alkalmazhatunk más enzimeket is, például lizostaphint vagy proteinázokat. Az emésztés során, a feldolgozandó mintában uralkodó kör-  
 25 rülményeknek olyanoknak kell lenniük, hogy biztosítsák a megfelelő enzim enzimatis aktivitásának kifejtését. Ugyanakkor azonban, ezek a körülmények általában lehetővé teszik a bakteriális mRNS hasítását is RNáz-ok által, vagy a nukleinsavak kémiai úton történő hidrolízisét, azzal a következménnyel, hogy gyakran lebontott nukleinsavakat izolálunk a megfelelő készítményekből. Semmi sem garantálja továbbá, hogy a sejtek enzimatis roncsolása során nem  
 30 megy végbe nukleinsavszintézis, ami további változásokat okoz az RNS expressziós mintázatban.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során a következő célkitűzéseket tartottuk szem előtt:

Általánosságban, célul tűztük ki a technika állása szerint ismert, fent ismertetett hátrányok kiküszöbölését.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célunk az volt, hogy a génexpressziós mintázatban a feldolgozás által kiváltott, mikroorganizmusokból, például baktériumokból, gombákból (például élesztőkből), protozoonokból vagy algákból történő nukleinsavizolálás során végbemenő változásokat kiküszöböljük úgy, hogy a sejtek génexpressziós mintázata az adott tenyésztési körülményeket vagy az eredeti mintában - például a betegből vagy élelmiszerből származó mintában - uralkodó körülményeket tükrözze, és ne a sejtek összegyűjtése vagy a nukleinsavak izolálása során fennálló körülmények által kiváltott változásokat, ezáltal biztosítsuk a későbbi analízisek eredményeinek valódiságát.

Célul tűztük ki továbbá, hogy megteremtsük nagyszámú minta egyidejű, párhuzamos feldolgozásának lehetőségét RNS és DNS izolálására. A fentiekben felül, célkitűzésünk volt, hogy készítményt fejlesszünk ki stabilizáló oldatként történő alkalmazásra, amelynek összetevői nem károsak az egészségre, és amely ezáltal – szemben például a fenol alkalmazásával - az egészség veszélyeztetése nélkül alkalmazható például RNS és/vagy DNS stabilizálására biológiai mintákban, azoknak a mintavétel helyéről a laboratóriumba, a minták feldolgozásával foglalkozó szakemberekhez történő szállítása során.

A találmány szerinti megoldás különösen előnyösen alkalmazható prokarioták közül az eubaktériumok esetében, továbbá archaebaktériumok (például *Methanothermobacter marburgensis*) esetében. Az eubaktériumok közé Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokat, valamint fototrop baktériumokat vagy *Chlamydia*, *Mycoplasma* (például *Mycoplasma penetrans*), *Rickettsia*, *Spirillum* és *Spirocheta* (például *Borrelia burgdorferi*) baktériumokat sorolunk, amelyekre a kitanítás szintén vonatkoztatható. A Gram-pozitív eubaktériumok közül elsősorban említendőek a *Bacillus* (például *Bacillus subtilis*), *Staphylococcus* (például *Staphylococcus aureus* vagy *Staphylococcus epidermidis*), *Streptomyces* (például *Streptomyces coelicolor* vagy *Streptomyces lividans*, *Flavobacterium* (például *Flavobacterium johnsoniae*), *Mycobacterium* (például *Mycobacterium avium*) vagy *Streptococcus*.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kitanítás vonatkoztatható a következő Gram-pozitív eubaktériumokra.

Clostridiumok (például *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* és *Clostridium perfringens*),

Listeria;

Peptococcus;

Peptostreptococcus;

Enterococcus;

Corynebacterium (például *Corynebacterium diphtheriae* vagy *Corynebacterium glutamicum*);

5 Propionibacter; és

Lactobacillus.

A találmány szerinti megoldás különösen előnyösen alkalmazható a következő Gram-negatív Eubaktériumok esetében: *Escherichia* nemzetség (például *Escherichia coli*), *Pseudomonas* (például *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* vagy *Pseudomonas*  
10 *syringae*), *Klebsiella* (például *Klebsiella pneumoniae*), *Salmonella* (például *Salmonella typhimurium*), *Shinorhizobium* (például *Shinorhizobium meliloti*) vagy *Campylobacter* esetében.

A kitanítás vonatkozik továbbá a következő Gram-negatív baktériumokra:

Neisseria (például *Neisseria gonorrhoeae* vagy *Neisseria meningitidis*);

15 Vibrio (például *Vibrio cholerae*);

Shigella;

Serratia;

Enterobacter;

Acinetobacter;

20 Proteus;

Yersinia;

Brucella (például *Brucella abortus*);

Haemophilus (például *Haemophilus influenzae*);

Bacteroides;

25 Campylobacter;

Helicobacter (például *Helicobacter pylori*);

Bordetella;

Legionella; és

Pasteurella.

30 Az eukarioták közül, különös figyelmet érdemelnek a gombák, például a dermatophyton csoport tagjai, az élesztőgombák, penészgombák és dimorf gombák.

A találmány szerinti megoldás szempontjából az élesztőgombák közül különösen előnyösek a *Saccharomyces* nemzetség tagjai (például *Saccharomyces cerevisiae*), *candida* (például

*Candida albicans*), *Cryptococcus* (például *Cryptococcus neoformans*). A penészgombák közül, elsősorban említendő az *Aspergillus* nemzetség tagjai (például *Aspergillus fumigatus*) vagy a *Penicillium* vagy *Mucor* nemzetségek.

5 További eukariota sejtek az algák és protozoonok, például tripanosomák, toxoplasmák, amoebák, plasmodiumok és ostorosok – amelyekre a kitanítás szintén vonatkoztatható.

A találmány szerinti probléma megoldására a következő megoldást dolgoztuk ki.

10 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a baktérium-, gomba-, protozoon- vagy algatenyészetet vagy baktériumokat és/vagy gombákat és/vagy protozoonokat és/vagy algákat tartalmazó mintát az 1. általános képletű kationos vegyületet és legalább egy proton-  
donort tartalmazó készítménnyel – vagy annak vizes oldatával - érintkeztetjük.

15 Ezután, a sejtek későbbi összegyűjtéséhez és a minta további feldolgozásához a sejtfalat, például a bakteriális sejtfal murein alapstruktúráját enzimatis úton, lizozimmal emészthetjük anélkül, hogy a mintában található nukleinsavakat bármilyen enzimatis vagy kémiai degradációnak vetnénk alá, és lehetővé tennénk új nukleinsavak szintetizálódását, végső soron megakadályozva az RNS expressziós mintázatának megváltozását.

A sejtek enzimatis lizálását végezhetjük más eljárásokkal is, például lyostaphin vagy proteináz-K alkalmazásával, vagy detergens által közvetített sejtlizissel, vagy a fenti eljárások például mechanikai lizáló eljárásokkal történő kombinációjával.

20 Az enzimatis sejtlízis előnye - szemben a mechanikai behatásokon alapuló eljárásokkal, mint például a szemcsés daráló („*bead mill*”) alkalmazásával vagy folyékony nitrogénben történő szétőröszöléssel -, hogy viszonylag könnyű automatizálni. Ezen felül, a technika állása szerint az is ismeretes, hogy az enzimatis sejtlízis a mechanikai behatáson alapuló sejtlízis eljárásokhoz képest lehetővé teszi a minták nagyobb átmenő teljesítménnyel történő feldolgozását, és minimalizálja a kereszt-kontamináció veszélyét.

25 A baktériumok enzimatis sejtlízisén felül - miután a sejteket stabilizáltuk a találmány szerinti készítmények alkalmazásával -, élesztősejteket lizálhatunk például zimolázzal vagy litikázzal, vagy eukariota sejteket más módon lizálhatunk proteinázzal vagy más enzimekkel, vagy detergens alkalmazásával.

30 Bár az enzimatis sejtlízis az említett okokból kifolyólag elméletileg előnyösebb, ez az eljárás valójában nem alkalmazható a génexpressziós mintázat analizálására, mivel annak során, a preparálást a hagyományos módon végezve, várhatóan változás történik az RNS expressziós mintázatban. A találmány szerinti eljárás alkalmazása lehetőséget teremt a fenti probléma megoldására, azáltal, hogy még a sejtek összegyűjtését megelőzően, a sejtekben stabilizáljuk az

RNS-t. Ezt követően, enzimatis úton lizálhatjuk a sejteket, miközben az RNS enzimatis és kémiai lebomlása, valamint az új RNS szintézise gátolt.

Enzimatis sejtíz helyett a sejtízist végezhetjük mechanikai, hő- vagy kémiai behatással, valamint egy vagy több említett lizáló eljárás kombinációjával.

5 A stabilizálást és sejtízist követően, a minta további feldolgozása során a nukleinsavakat izolálhatjuk a technika állása szerint ismert módon, módosított szilikát alkalmazásával.

A találmány szerinti megoldás lehetőséget nyújt a minta további feldolgozására, például RNS izolálására szerves oldószer vagy kaotrop sók alkalmazásával, vagy a nukleinsavak kisézésével, vagy mágneses részecskék alkalmazásával, vagy hibrid befogásos („*hybrid capture*”) eljárással.

10 A technika állása szerint ismert RNS-extrakciós eljárásokkal, például a TRIzol- vagy RNeasy-eljárásokkal összehasonlítva, az 1. általános képletű kationos detergenst és adalékanyagként protondonort, előnyösen alifás karbonsavat vagy előnyösebben, dikarbonsavat, legelőnyösebben borkösavat tartalmazó találmány szerinti készítmény alkalmazásával 2-3-szor nagyobb hatásfok érhető el, mint a például a fent említett szokásos eljárásokkal.

Az RNS-izolálás magas hatásfoka különösen előnyös alacsony szinten expresszáldó RNS-transzkriptumok analízálása esetében, vagy csupán a bakteriális populáció egy alcsoportjában expresszáldó RNS-transzkriptumok analízisekor. Az említetteken felül eddig nem áll rendelkezésünkre elfogadható eljárás mRNS izolálására baktériumokból, bakteriális mRNS-ek analízisekor tehát a szakembernek más RNS-típusok (rRNS, tRNS, snRNP-k) jelenléte által okozott erős háttérrel kellett számolnia. Ilyen esetekben, az analitikai eljárások fokozott érzékenysége a fokozott hatásfok számlájára írható.

25 A találmány szerinti megoldás előnyei valamennyi alkalmazási területen nyilvánvalóak, ahol mikroorganizmusok (például prokarioták, protozoonok, gombák vagy algák) génexpressziós mintázatát kell értékelnünk. Ilyen alkalmazási területek például a prokariota génexpresszió szabályozása alapjainak megértéséhez hozzájáruló tudományos kutatások, valamint kiválasztott gének expressziója és baktériumok patogenitása közti összefüggéseket vizsgáló tanulmányok. Az utóbbi kérdés különös jelentőséggel bír bakteriális fertözések diagnózisában és kezelésében.

30 A találmány szerinti megoldás további alkalmazási területe a génexpresszió analízálása prokariotákban, protozoonokban és gombákban, a gyógyszerészeti kutatásban és fejlesztésben. Az RNS expressziós mintázat, például prokariota RNS expressziós mintázat stabilizálása jelentősen egyszerűsíti a transzkripció tükrök vagy teljes transzkripció mintázatok analízisét,

várhatóan olyan kísérletekben is, ahol a cél a génexpresszió időfüggésének kimutatása. Az ismertetteken felül, a találmány szerinti megoldás alkalmazásával egyszerűbbé válik meghatározott fajok, például talajmintában jelenlévő baktériumok vagy betegből származó kórokozók azonosítása és mennyiségi meghatározása komplex populációkban. Az alkalmazási lehetőségek köre más analitikai területekre, például élelmiszeranalízisre is kiterjed.

A nukleinsavak stabilizálása a találmány szerinti, kationos vegyületet (vegyületeket) és egy vagy több adalékanyagot tartalmazó készítmény alkalmazásával biztosítja, hogy a mintában található nukleinsavak hosszas tárolás, vagy szállítás során sem változnak. Ily módon a későbbi időpontban elvégzett tesztek pontossága jelentősen javul. Bizonyos esetekben, például ha a mintát nagyobb távolságra kell szállítani, vagy hosszabb ideig kell tárolni, a találmány szerinti eljárás alkalmazása először teszi lehetővé, hogy a teszteket ilyen későbbi időpontokban is elvégezzük.

A találmány szerinti megoldás előnyei egyaránt érvényesülnek a kutatás területén, például transzkriptumok szintjének analizálásában - amelyeket eltávolításukat követően azonnal fixálnunk kell -, és a klinikai analízis területén, például molekuláris diagnosztikában, például ahol a betegmintákat levételüket követően, a tárolás és szállítás során stabilizálnunk kell az analizálást.

Nukleinsavak izolálását és stabilizálását tumordiagnózisban, örökletes diabétesz diagnózisában, vírusfertőzések és más fertőző ágensek diagnózisában és utánkövetésében, valamint génexpressziós mintázatok analízisében is alkalmazzák.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán az RNS-kinyerés hatásfokát ábrázoltuk grafikusan a detergens pH-jának, valamint a tenyészet és detergensoldat térfogatra számított arányának függvényében.

A 2. ábrán látható grafikonon az RNS-kinyerés hatásfokát ábrázoltuk az eljárás különböző változataiban.

A 3. ábrán az RNS-kinyerés hatásfokát ábrázoltuk grafikusan a találmány szerinti készítmény vizes oldata térfogatának függvényében.

A 4. ábrán a kationos komponenst és különböző koncentrációban protondonort tartalmazó készítmény különböző térfogatú oldatának alkalmazásával *E. coli* baktériumokból izolált RNS alkalmazásával végzett denaturáló agarózgél-elektroforézis és ompA („outer membrane protein A”, „külső membrán protein A”) Northern-blot analízis eredményét mutatjuk be.



Az 5. ábrán *E. coli* baktériumokból rifampicin hozzáadását követően, a találmány szerinti készítmény feloldásával vagy anélkül izolált RNS alkalmazásával végzett ompA („külső membrán protein A”) Northern-blot analízis eredményét mutatjuk be.

5 A 6. ábrán *E. coli* baktériumokból rifampicin hozzáadását követően izolált RNS alkalmazásával végzett *bla* ( $\beta$ -laktamáz) Northern-blot analízis eredményét mutatjuk be a kationos komponenst és adalékanyagot tartalmazó készítmény feloldásával vagy azok vizes oldatának hozzáadásával, vagy anélkül.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk.

10

### 1. példa

#### RNS izolálása *E. coli* baktériumokból

Négy (4) % tetradecil-trimetil-ammónium-oxalátot és 200 mmol/l borkősavat tartalmazó vizes oldat pH-ját a következő értékekre állítottuk be nátrium-hidroxid oldattal:

15 2,2 (a NaOH hozzáadása nélkül); 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; és 5,0.

A kísérlethez különböző elegyeket állítottunk össze úgy, hogy 2, 3 vagy 4 térfogatnyi, különböző pH-értékű detergensoldatot pipettáztunk 400  $\mu$ l LB-tápközegben tenyésztett *E. coli* tenyészethez, és az RNS-t izoláltuk az alábbi eljárás szerint:

20 400  $\mu$ l *E. coli* tenyészetet adtunk az előkészített detergensoldathoz, majd vortexeltük;  
az elegyet 10 percig, 4°C-on, 5000xg-n centrifugáltuk;  
a felülúszót leöntöttük;  
az üledéket 1 ml H<sub>2</sub>O-ban szuszpendáltuk;  
az elegyet 10 percig, 4°C-on, 5000xg-n centrifugáltuk;  
a felülúszót leöntöttük;  
25 az üledéket 400  $\mu$ g/ml lizozimot tartalmazó 100  $\mu$ l TE-pufferben <sup>1)</sup> szuszpendáltuk;  
az elegyet 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk;  
az elegyhez 300  $\mu$ l RLT-puffert<sup>2)</sup> adtunk, és vortexeltük,  
ehhez 260  $\mu$ l H<sub>2</sub>O-t adtunk, és azt vortexeltük,  
a kapott elegyhez 40  $\mu$ l proteináz-K-enzimet (18 mg/ml) adtunk, és vortexeltük;  
30 az elegyet 10 percig, 55°C-on inkubáltuk; majd  
3 percig, 14 000 g-n centrifugáltuk.

<sup>1)</sup> A TE-puffer összetétele a következő: 10 mmol/l Tris-HCl és 1 mmol/l EDTA (pH=8).

<sup>2)</sup> RLT-puffer szokásos, a kereskedelemben hozzáférhető guanidinsót, például guanidin-izotiocianátot, és polibázisos szerves sav alkálifémsóját, valamint  $\beta$ -merkaptoetanolt tartalmazó, 7-es pH-értékű puffer (hozzáférhető: Messrs QIAGEN, Hilden).

Ezután, a felülúszót eltávolítottuk, ahhoz 350  $\mu$ l 100%-os etanolt adtunk, majd vortexeltük;

az oldatot "RNeasy Mini spin" oszlopra vittük fel;

a további feldolgozást a technika állása szerint ismert módon végeztük, például teljes RNS-t izolálhatunk baktériumokból az "RNeasy® Mini" eljárással, a gyártó utasításai szerint eljárva, az 5. lépéstől (hozzáférhető: Messrs QIAGEN, Hilden).

Az 1. ábrán RNS-kinyerés hatásfokát ábrázoltuk a detergensoldat pH-jának, valamint a tenyészet és detergensoldat térfogatra számított arányának függvényében.

Eredményeink szerint, a legmagasabb hatásfokot úgy érték el, ha a találmány szerinti készítmény vizes oldatának pH-ját 3,5 és 5,0 közé állítottuk be.

Az RNS intakt voltát agarózgél-elektroforézissel analizáltuk. Mindegyik esetben intakt riboszomális RNS-csíkokat figyeltünk meg.

## 2. példa

### RNS izolálása különböző eljárásokkal *E. coli* baktériumokból

Az ebben a példában bemutatott kísérlet kiindulási anyaga ismét LB-tápközegben tenyésztett *E. coli* tenyészet volt. A különböző eljárásokat  $1,5 \times 10^8$  és  $3 \times 10^8$  sejt alkalmazásával végeztük. Ehhez a kísérletsorozathoz a találmány szerinti készítmény alábbi összetételű vizes oldatát alkalmaztuk:

4 vegyes-% tetradecil-trimetil-ammonium-oxalát;

200 mmol/l borkősav;

(pH=4,0).

Az RNS-izolálási eljárás alább ismertetett részlépéseinek elvégzését követően különböző alternatív eljárásokat próbáltunk ki:

#### 1) Sejtek összegyűjtése

Az *E. coli* tenyészethez három térfogatnyi detergensoldatot adtunk vortexeltük, az elegyet 10 percig, 5000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk, és a felülúszót leöntöttük;

2) Az üledék mosása

Az üledéket 1 ml H<sub>2</sub>O-ban szuszpendáltuk, 10 percig, 5000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk, és a felülúszót leöntöttük;

3) Emésztés lizozimmal

5 Az üledéket 100 µl, 400 µg/ml lizozimet tartalmazó TE-pufferben szuszpendáltuk, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk;

4) A kötési körülmények beállítása

Az elegyhez 350 µl RLT-puffert adtunk, azt vortexeltük, majd ahhoz 250 µl 100%-os etanolt adtunk.

10 5) Proteináz-K-emésztés

Az elegyhez 300 µl RLT-puffert és 260 µl H<sub>2</sub>O-t adtunk, ehhez 40 µl proteináz-K-t (18 mg/ml) adtunk, azt vortexeltük, 10 percig, 55°C-on inkubáltuk, 3 percig, 14 000 g-n centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, majd az elegyhez 350 µl 100%-os etanolt adtunk, és vortexeltük.

15 6) Emésztés lizozimmal és proteináz-K-val hígított RLT-pufferben

A sejtekhez 300 µl RLT-puffert adtunk, azokat vortexeltük, 160 µl H<sub>2</sub>O-t adtunk hozzájuk, vortexeltük, az elegyhez 100 µl, 400 µg/ml lizozimet tartalmazó TE-puffer adtunk, azt 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, ehhez 40 µl proteináz-K-t (18 mg/ml) adtunk, azt vortexeltük, 10 percig, 55°C-on inkubáltuk, 3 percig, 14 000 g-n centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, majd az elegyhez 350 µl 100%-os etanolt adtunk, és vortexeltük.

7) Feldolgozás, adott esetben módosított szilikátoszloppal, például az „RNeasy Mini spin” oszloppal (hozzáférhető: Messrs QIAGEN, Hilden). Az oldatot felvisszük az oszlopra, a további feldolgozást az „RNeasy Mini” reagenskészlethez baktériumokból teljes RNS-izolálására ajánlott utasítások szerint végezzük, az 5. lépéstől folytatva.

25 Az eredeti eljárást a következő alternatív eljárásokkal hasonlítottuk össze:

1. változat: 1., 3., 4. és 7. lépés;

2. változat: 1., 2., 3., 4. és 7. lépés;

3. változat: 1., 2., 3., 5. és 7. lépés (az 1. példában ismertetett eredeti eljárás);

4. változat: 1., 6. és 7. lépés.

30 A 2. ábrán az RNS-kinyerés hatásfokát ábrázoltuk az eljárás különböző változataiban.

A fenti kísérletek eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy az 1. változat az RNS-kinyerés hatásfokának vonatkozásában összehasonlítható eredményt ad az eredeti eljárással

(lásd 3. változat). Ebben a változatban nincs mosási lépés, vagy emésztés proteináz-K-val. A feldolgozás tehát egészében jelentősen lerövidül, következésképp, ezt a változatot alkalmaztuk standard eljárásként a következő példákban.

5           3. példa

RNS izolálása *E. coli* baktériumokból a tenyészet és a találmány szerinti készítmény vi-  
zes oldatának különböző térfogatarányban történő alkalmazása mellett

A találmány szerinti készítmény alábbi összetételű vizes oldatát alkalmaztuk:

QCX 1 oldat: 4 vegyes-% tetradecil-trimetil-ammónium-oxalát;

10           200 mmol/l borkősav;

(pH=4,0);

QCX 2 oldat: 6 vegyes-% tetradecil-trimetil-ammónium-oxalát;

300 mmol/l borkősav;

(pH=4,0);

15           QCX 3 oldat: 8 vegyes-% tetradecil-trimetil-ammónium-oxalát;

400 mmol/l borkősav;

(pH=4,0);

QCX 4 oldat: 15 vegyes-% tetradecil-trimetil-ammónium-oxalát;

750 mmol/l borkősav;

20           (pH=4,0).

Négyszáz (400) µl térfogatú, LB-tápközegben (10 g Trypton; 5 g élesztőkivonat; 10 g NaCl; H<sub>2</sub>O 1000 ml-ig) tenyésztett *E. coli* tenyészetet elegyítettünk a megfelelő oldat 2, 3 vagy 4 térfogatnyi mennyiségével, és azt a 2. példában ismertetett standard eljárással dolgoztuk fel.

25           A 3. ábrán az RNS-kinyerés hatásfokát ábrázoltuk az 1. általános képletű kationos vegyületet és adalékanyagot tartalmazó készítmény vizes oldata térfogatarányának függvényében.

30           A kísérleti eredmények alapján látható, hogy az RNS-kinyerés hatásfoka a különböző detergensoldatok 2 vagy 3 térfogatnyi mennyiségének alkalmazásakor igen hasonló. Amikor a fenti oldatok 4 térfogatnyi mennyiségét alkalmaztuk, az RNS-kinyerés hatásfoka valamelyest romlott. A detergensoldat 2 vagy 3 térfogatnyi mennyiségét tartalmazó elegyekben az 1., 2. vagy 3. oldat alkalmazásával hasonló hatásfokot értünk el.

Az izolált RNS épségének ellenőrzésére az RNS-t denaturáló agarózgéleken szétválasztottuk, és Northern-blot analízist végeztünk (lásd 4. ábra).

Az RNS-csíkok vizuális vizsgálatával nagymértékben intakt riboszomális RNS-csíkokat figyeltünk meg az agarózgélén. Csak a 4. oldat alkalmazásakor kapott csíkok esetében láttuk az RNS részleges lebomlását. Ezt a megfigyelést Northern-blot analízissel is igazoltuk, amelyen *E. coli* ompA-t („külső membrán protein A”\*) kódoló mRNS elleni próbával végeztünk hibridizációt.

\*: Az ompA-mRNS viszonylag hosszú életű, 15 perc felezési idejű RNS-transzkriptum [Nature 312, 75 (1984)].

Ezúttal is, az izolált RNS bizonyos fokú lebomlását figyeltük meg a 4. oldat alkalmazásakor. Amikor a többi RNS-mintát hasonlítottuk össze, a legélesebb ompA-mRNS-csíkokat az 1. oldattal izolált RNS-mintákban láttuk. Összességében azonban, az 1-3. oldatokkal izolált RNS-minták csak igen csekély mértékben különböztek az izolált RNS minőségének tekintetében.

A 4. ábrán *E. coli* baktériumokból, különböző térfogatú és koncentrációjú oldatok alkalmazásával izolált RNS denaturáló agarózgél-elektroforézisének és ompA Northern-blot analízisének eredményét mutatjuk be.

#### 4. példa

##### *E. coli* RNS stabilizálása

A stabilizálás hatékonyságának ellenőrzésére olyan kísérleteket végeztünk, amelyekben az RNS-polimeráz-inhibitor hatású rifampicint adtuk az *E. coli* sejtek sejtenyésző tápközegéhez [FEBS Letters 440, 172 (1998)]. Ily módon, megakadályozva az új RNS-transzkriptumok képződését, megkönnyítettük az RNS-transzkriptumok lebomlásának értékelését. Az inhibitor hozzáadását követően meghatározott idővel, RNS-t izoláltunk a sejtekből. Kontrollként hasonló eljárásnak alávetett, de az oldat hozzáadása nélkül izolált RNS elegyeket alkalmaztunk („RNeasy” standard eljárás). Az mRNS intaktságának ellenőrzésére az RNS izolálását követően Northern-blot kísérleteket végeztünk.

Az 5. ábrán *E. coli* baktériumokból rifampicin hozzáadását követően, a találmány szerinti készítmény feloldásával vagy anélkül izolált RNS alkalmazásával végzett ompA („külső membrán protein A”) Northern-blot analízis eredményét mutatjuk be.

Az ompA-mRNS az alkalmazott tenyésztési körülmények mellett 15 perces féleletidejű *E. coli* transzkriptum [Nature 312, 75 (1984)]. A Northern-blot analízis szerint (5. ábra), a találmány szerinti oldattal kezelt mintákban egyforma intenzitású ompA-mRNS-szignál mutatható ki a vizsgálat teljes időtartalma alatt (15 percig). Ezzel szemben, a detergens hozzáadása

nélkül feldolgozott mintákban az ompA-mRNS-transzkriptum mennyiségének jelentős mértékű csökkenése figyelhető meg már 0-5. perc múlva.

A 6. ábrán *E. coli* baktériumokból rifampicin hozzáadását követően, a kationos komponenst és adalékanyagot tartalmazó készítmény vagy annak vizes oldata hozzáadásával, vagy anélkül izolált RNS alkalmazásával végzett *bla* ( $\beta$ -laktamáz) Northern-blot analízis eredményét mutatjuk be.

$\beta$ -laktamáz (*bla*) mRNS Northern-blot analízisének a hatás még nyilvánvalóbb. Ennek az mRNS-transzkriptumnak a féléletideje az alkalmazott tenyésztési körülmények mellett 2-5 perc [Nature 312, 75 (1984)]. Amint az a 6. ábra alapján nyilvánvaló, ez a transzkriptum az oldat hozzáadásával izolált RNS-mintákban hasonló szignálintenzitással mutatható ki a vizsgálat teljes időtartama alatt. Másrészt, a detergensoldat hozzáadása nélkül alkalmazott kontroll tenyészetekben a *bla*-mRNS-transzkriptum csaknem teljes eltűnését figyeltük meg még akkor is, ha az RNS-t azonnal (0. perc) feldolgoztuk. A két RNS-izolálási eljárással kapott *bla*-mRNS szignálintenzitásában megfigyelhető különbség azt jelenti, hogy az mRNS azonnal stabilizálódott a találmány szerinti készítmény vizes oldatának alkalmazását követően.

Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a találmány szerinti készítmény alkalmazása lehetővé teszi a bakteriális RNS expressziós mintázatok rögzítését folyékony tenyészetekben az izolálási eljárásból fakadó, az expressziós mintázatot torzító esetleges melléktermékek keletkezése nélkül.

### 5. példa

#### RNS stabilizálása tetradecil-trimetil-ammónium-bromidd alkalmazásával (TTAB) alkalmazásával

Az alább ismertetett kísérletekben az alábbi összetételű TTAB-oldatot alkalmaztunk:

4 vegyes-% TTAB;  
200 mmol/l borkősav;  
(pH=4,0).

A különböző baktériumfajok többek között sejtfaluk összetételében is különböznek. Különböző fajok alkalmazásánál a sejtlízis kritikus lépés az RNS izolálásában. Az enzimátikus sejtlízissel szemben, amely különösen Gram-negatív baktériumfajok esetében ad jó eredményt, a mechanikai behatással végzett sejtlízis potenciálisan valamennyi faj lizálására alkalmazható.

Az alábbi, 2. táblázatban a technika állása szerint ismert eljárásokkal (RNeasy lizozimmal által közvetített sejtlízissel) elérhető hatásfokokat hasonlítjuk össze a találmány szerinti készí-

mény, RNeasy és lizozimemésztés, valamint a találmány szerinti készítmény, RNeasy és szemcsés daráló („bead mill”) alkalmazásával elősegített enzimatikus emésztéssel elérhető eredményekkel. Szemcsés daráló („bead mill”, „MM 300”; Messrs QIAGEN) alkalmazásakor, tételenként 50 mg, savas közegben mosott üveggyöngyöt (150-600 µm átmérő) használtunk. A sejtlyízist a szemcsés daráló készülékben 5 percig végeztük, maximális rezgési intenzitással (30 Hz).

## 2. táblázat

Az RNS-kinyerés hatásfoka  $1 \times 10^8$  *B. subtilis* sejtéből különböző sejtlyízis eljárások és RNeasy®

10

### RNS-izoláló eljárás alkalmazásával

| Sejtlyízis                                                          | Emésztés<br>lizozimmal | TTAB-oldat +<br>emésztés lizozimmal | TTAB-oldat + „bead<br>mill” + emésztés<br>lizozimmal |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>B. subtilis</i> LB-<br>tápközegben                               | 7 µg                   | 15 µg                               | 19 µg                                                |
| <i>B. subtilis</i> ásványi<br>anyagokat tartalma-<br>zó tápközegben | 3 µg                   | 8 µg                                | 10 µg                                                |

Az összehasonlítás alapján nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti készítmény alkalmazásával végzett RNS-izolálás mechanikai lizáló eljárással kombinálva a kinyert RNS mennyiségének durván 25%-os növekedését eredményezi az oldat és enzimatikus sejtlyízis alkalmazásához képest (2. táblázat). A szokásos RNeasy-eljárással összehasonlítva, a mechanikai sejtlyízis és a detergensoldat alkalmazása átlagosan megháromszorozta az átlagos hatásfokot.

15

Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a detergensoldat alkalmazása mellett végzett enzimatikus sejtlyízis a Gram-pozitív *B. subtilis* sejtekben is hatékony, ami azt jelenti, hogy ebben az esetben a mechanikai sejtlyízis el is hagyható.

Amint azonban az alábbiakban ismertetett kísérlet eredményei mutatják, a mechanikai lizáló eljárás, például a szemcsés daráló alkalmazása - enzimatikus sejtlyízis nélkül – megnyitja a lehetőséget arra, hogy a hatásfokot durván 6-szorosára növeljük az enzimatikus vagy mechanikai sejtlyízis alkalmazásával elért eredményekhez képest.

20

Kiindulási anyagként *Bacillus subtilis* LB-tápközegben szaporított tenyészetét alkalmaztuk. Minden esetben  $1,8 \times 10^8$  sejtéből nyert RNS mennyiségét hasonlítottuk össze (3. táblá-

zat). A minták egy részénél a sejtlízist szemcsés daráló ("MM300 bead mill", gyártó: Messrs QIAGEN) alkalmazásával végeztük, tételenként 50 mg, savas közegben mosott üveggyöngy (150-600  $\mu\text{m}$  átmérő) használatával. A sejtlízist a szemcsés daráló készülékben 5 percig végeztük, maximális rezgési intenzitással (30 Hz). A minták további csoportjában, a sejteket nem vetettük alá sem mechanikai, sem enzimatisz lizálásnak [hivatkozás: J. Microbiol. Methods 44, 235 (2001)] (Promega; „SV Total RNA Isolation System”).

### 3. táblázat

Az RNS-kinyerés hatásfoka *Bacillus subtilis* baktériumokból az alkalmazott sejtlízis eljárás és

10

#### TTAB-oldat hozzáadásának függvényében

|                        | Enzimatisz vagy mechanikai sejtlízis nélkül | mechanikai sejtlízis |
|------------------------|---------------------------------------------|----------------------|
| TTAB-oldat alkalmazása | 3 $\mu\text{g}$                             | 18 $\mu\text{g}$     |



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Összetevőként az



5 általános képletű kationos vegyületet - ahol:

Y jelentése nitrogén vagy foszfor;

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  és  $R_4$  jelentése egymástól függetlenül elágazás nélküli vagy elágazó  $C_1$ - $C_{20}$ -alkil-csoport és/vagy  $C_7$ - $C_{20}$ -aril-csoport vagy  $C_6$ - $C_{26}$ -aralkil-csoport; és

$X^-$  jelentése szervetlen vagy szerves, egy- vagy többbázisú sav anionja; -

10 valamint legalább egy protondonort tartalmazó készítmény alkalmazása,

mikroorganizmusokból, például prokariotákból, gombákból, protozoonokból vagy algákból származó nukleinsavak stabilizálására és/vagy azok izolálására.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol Y jelentése nitrogén.

15 3. Az 1 vagy 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol  $R_1$  jelentése magasabb szénatomos, előnyösen 12, 14 vagy 16 szénatomos alkilcsoport; és  $R_2$ ,  $R_3$  és  $R_4$  jelentése minden esetben metilcsoport.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol  $X^-$  jelentése halogénsav anionja, vagy egy- vagy kétbázisú szerves sav anionja.

20 5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol  $X^-$ -anion jelentése bromid, klorid, foszfát, szulfát, formiát, acetát, propionát, oxalát, malonát, szukcinát vagy citrát.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a készítmény protondonorként telített alifás monokarbonsavat, telítetlen alkenil-karbonsavat, telített és/vagy telítetlen alifás  $C_2$ - $C_6$ -dikarbonsavat és/vagy trikarbonsavat, alifás keto-karbonsavat, aminosavat, vagy szervetlen savat, vagy azok sóit tartalmazza egymagában, vagy valamilyen kombinációban.

25 7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a készítmény alifás monokarbonsavként  $C_1$ - $C_6$ -alkil-karbonsavat, előnyösen ecetsavat, propionsavat, n-vajsavat, n-valeriánsavat, izovale-riánsavat, etil-metil-ecetsavat (2-metil-vajsavat 2,2-dimetil-propionsavat (pivalinsavat), n-hexánsavat, n-oktánsavat, n-dekánsavat, vagy n-dodekánsavat (laurinsavat) tartalmaz; vagy a fenti savak valamilyen kombinációját tartalmazza.

30 8. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a készítmény alifás alkenil-karbonsavként akrilsavat (propénsavat), metakrilsavat, krotonsavat, izokrotonsavat vagy vinil-ecetsavat tartalmaz; vagy azok valamilyen kombinációját tartalmazza.

9. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a készítmény telített alifás C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-dikarbonsavként oxálsavat, malonsavat, borostyánkősavat, glutársavat vagy adipinsavat tartalmaz; vagy az említett savak valamilyen kombinációját tartalmazza.

5 10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a készítmény protondonorként alifás dikarbonsavat, előnyösen oxálsavat vagy borostyánkősavat tartalmaz; vagy az említett savak valamilyen kombinációját tartalmazza.

10 11. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a készítmény protondonorként alifás hidroxidi- és/vagy -trikarbonsavat, előnyösen borkősavat, D-(+)-, L-(-) és/vagy DL-malonsavat, (2R, 3R)-(+)-borkősavat, (2S, 3S)-(-)-borkősavat, mezo-borkősavat, citromsavat; telítetlen dikarbonsavat, előnyösen malonsavat és/vagy fumársavat; telítetlen trikarbonsavat, előnyösen akonitsavat; alifás ketodikarbonsavat, előnyösen mezoxálsavat és/vagy oxálecetsavat; aminosavat, előnyösen amino-ecetsavat (glicint), α-amino-propionsavat (alanint), α-amino-izovaleriánsavat (valint), α-amino-izo-kaprionsavat (leucint) és/vagy α-amino-β-metil-valeriánsavat (izoleucint) vagy a felsorolt savak és/vagy aminosavak bármely kombinációját tartalmazza.

15 12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt vizes oldat formájában alkalmazzuk.

20 13. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a kationos komponens koncentrációja a készítmény vizes oldatában 0,01 vegyes-% és telítettség között van; előnyösen 0,1 vegyes-% és 10 vegyes-% között van; még előnyösebben 0,5 vegyes-% és 8 vegyes-% között van; és legelőnyösebben 2 vegyes-% és 6 vegyes-% között van.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak prokariotákból, például archaebaktériumokból (például *Methanothermobacter marburgensis*) vagy eubaktériumokból származnak.

25 15. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak Gram-pozitív baktériumokból származnak.

30 16. A 15. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak az alább felsorolt Gram-pozitív baktériumok valamelyikéből származnak: *Bacillus* (például *Bacillus subtilis*), *Staphylococcus* (például *Staphylococcus aureus* vagy *Staphylococcus epidermidis*), *Streptomyces* (például *Streptomyces coelicolor* vagy *Streptomyces lividans*), *Flavobacterium* (például *Flavobacterium johnsoniae*), *Mycobacterium* (például *Mycobacterium avium*), *Streptococcus*, *Clostridium* (például *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* vagy *Clostridium perfringens*), *Listeria*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*,

Corynebacterium (például *Corynebacterium diphtheriae* vagy *Corynebacterium glutamicum*), Propionibacter vagy Lactobacillus.

17. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak Gram-negatív baktériumokból származnak.

5 18. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak a következő Gram-negatív baktériumok valamelyikéből származnak: Escherichia (például *Escherichia coli*), Pseudomonas (például *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* vagy *Pseudomonas syringae*), Klebsiella (például *Klebsiella pneumoniae*), Salmonella (például *Salmonella typhimurium*), Shinorhizobium (például *Shinorhizobium meliloti*), Campylobacter, Neisseria (például  
10 *Neisseria gonorrhoeae* vagy *Neisseria meningitidis*), Vibrio (például *Vibrio cholerae*), Shigella, Serratia, Enterobacter, Acinetobacter, Proteus, Yersinia, Brucella (például *Brucella abortus*), Haemophilus (például *Haemophilus influenzae*), Bacteroides, Helicobacter (például *Helicobacter pylori*), Bordetella, Legionella vagy Pasteurella.

15 19. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak Chlamydiából, fototrop baktériumból, Mycoplasmából, például *Mycoplasma penetrans*ból, Rickettsiából, Spirocheták-ból vagy Spirillumokból származnak.

20. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak eukarióta mikroorganizmusokból származnak.

20 21. A 20. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak dermatophytonok csoportjába tartozó gombákból, élesztőgombákból, penészgombákból vagy dimorf gombákból származnak.

25 22. A 21. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak *Saccharomyces* élesztőgombákból - például *Saccharomyces cerevisiae* -, *Candida* - például *Candida albicans* -, vagy *Cryptococcus*, - például *Cryptococcus neoformans* - élesztőgombákból; az Aspergillus nemzetségbe tartozó penészgombákból, például *Aspergillus fumigatus* gombákból vagy penészgombákból, például a Penicillium vagy például a Mucor nemzetségbe tartozó gombákból származnak.

30 23. A 20. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a nukleinsavak algákból vagy protozoonokból, például tripanosomákból, toxoplasmákból, amoebákból, plasmodiumokból vagy ostorosokból származnak.

24. Az 1-23. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a baktériumokat, gombákat, protozoonokat vagy algákat enzimatis, mechanikai, termális vagy kémiai úton, vagy a felsorolt lizáló eljárások kombinációjának alkalmazásával lizáljuk.

25. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a készítmény pH-ja 2 és 12 között, előnyösen 2 és 8 között, előnyösebben 2 és 5 között van.

26. Eljárás az 1-13. igénypontok bármelyikében ismertetett készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az egyes komponenseket - adott esetben, vizes oldatban – kombináljuk, és elegyítjük egymással.

27. Diagnosztikus készítmény, amely az 1-13. igénypontok bármelyikében ismertetett készítményt tartalmaz.

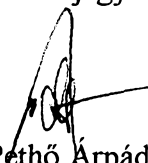
28. Reagenskészlet nukleinsavak stabilizálására, amely az 1-13. igénypontok bármelyikében ismertetett készítményt tartalmaz.

29. Elegy, amely a 14-23. igénypontok bármelyikében ismertetett biológiai mintát és az 1-17. igénypontok bármelyikében ismertetett készítményt tartalmaz, adott esetben, más kötőanyagokkal együtt.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



dr. Pethő Árpád

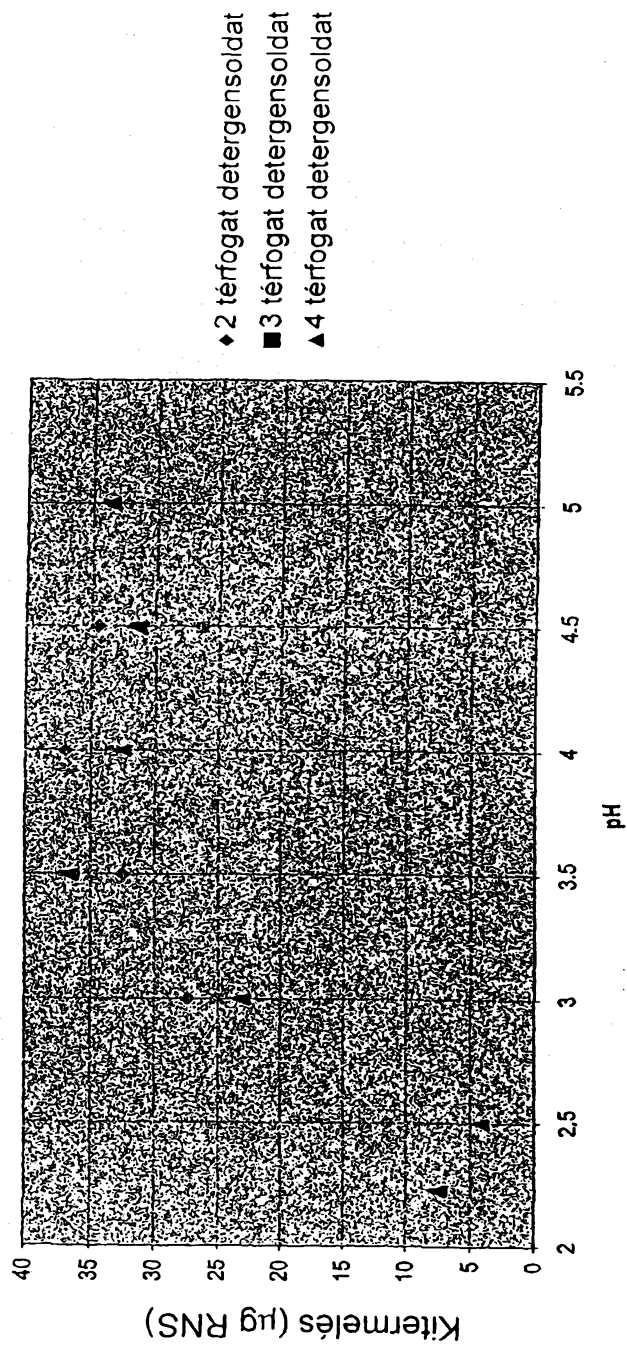
szabadalmi ügyvivő

27 oldal leírás  
6 oldal váz

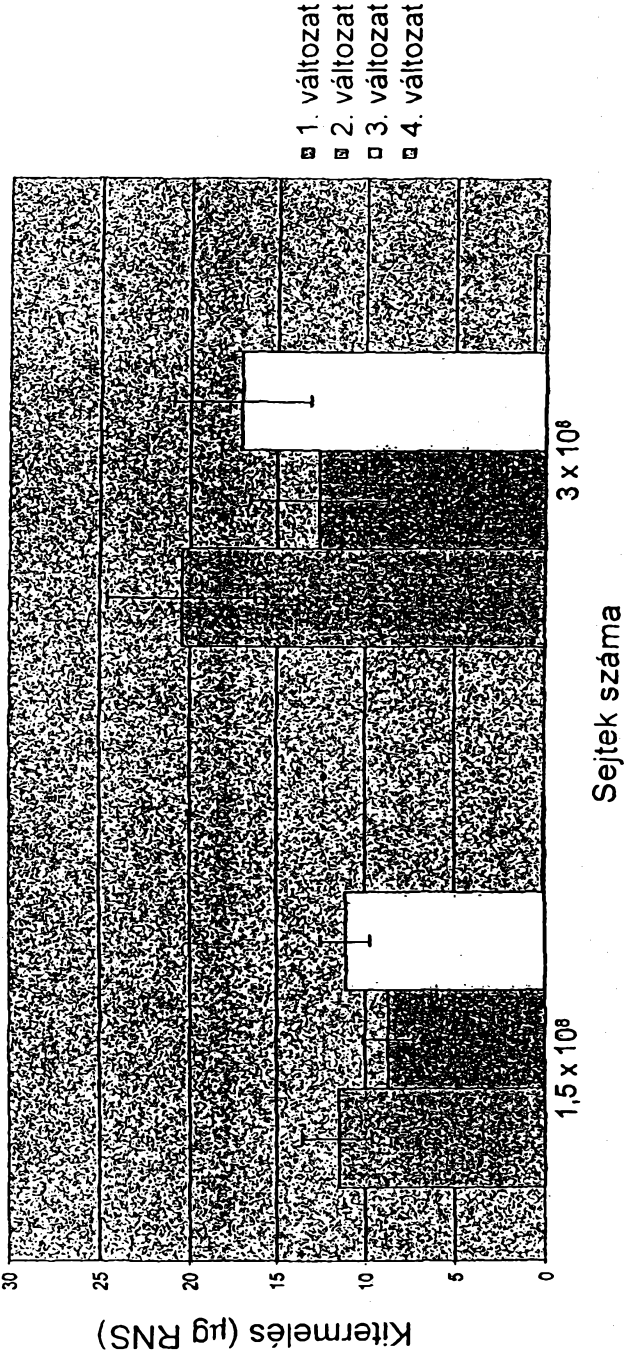
---

33 oldal

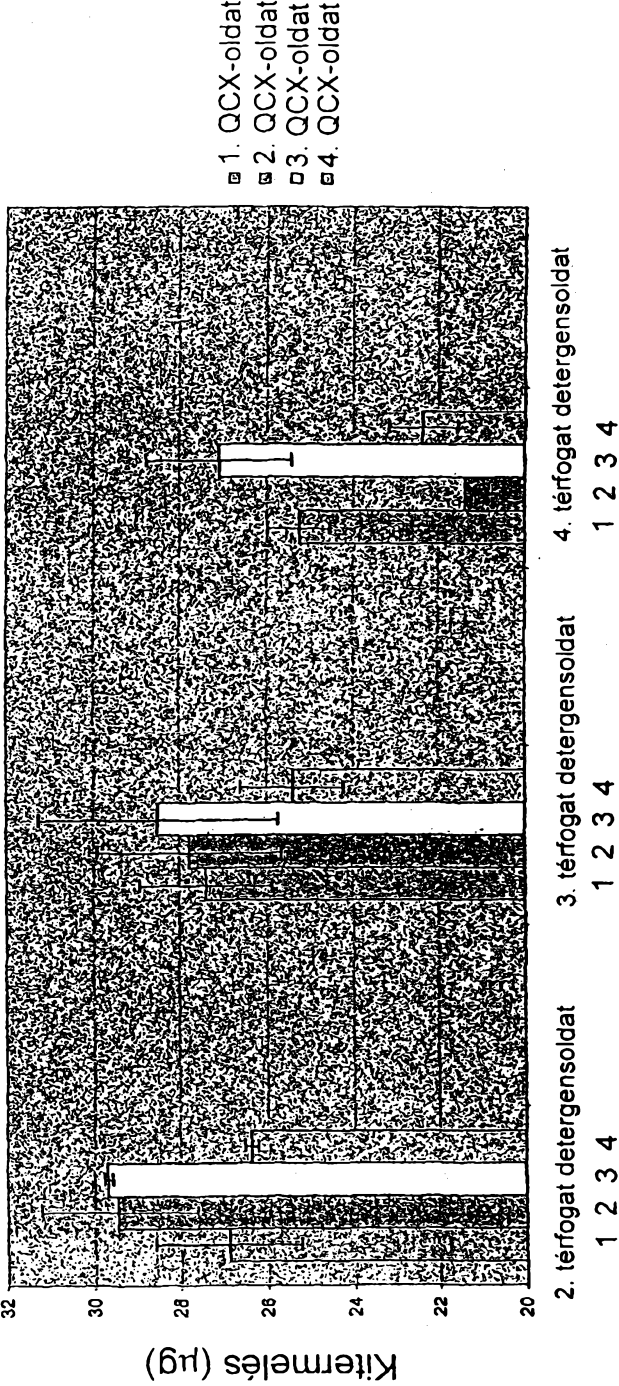
2. oldal fűzve



1. ábra

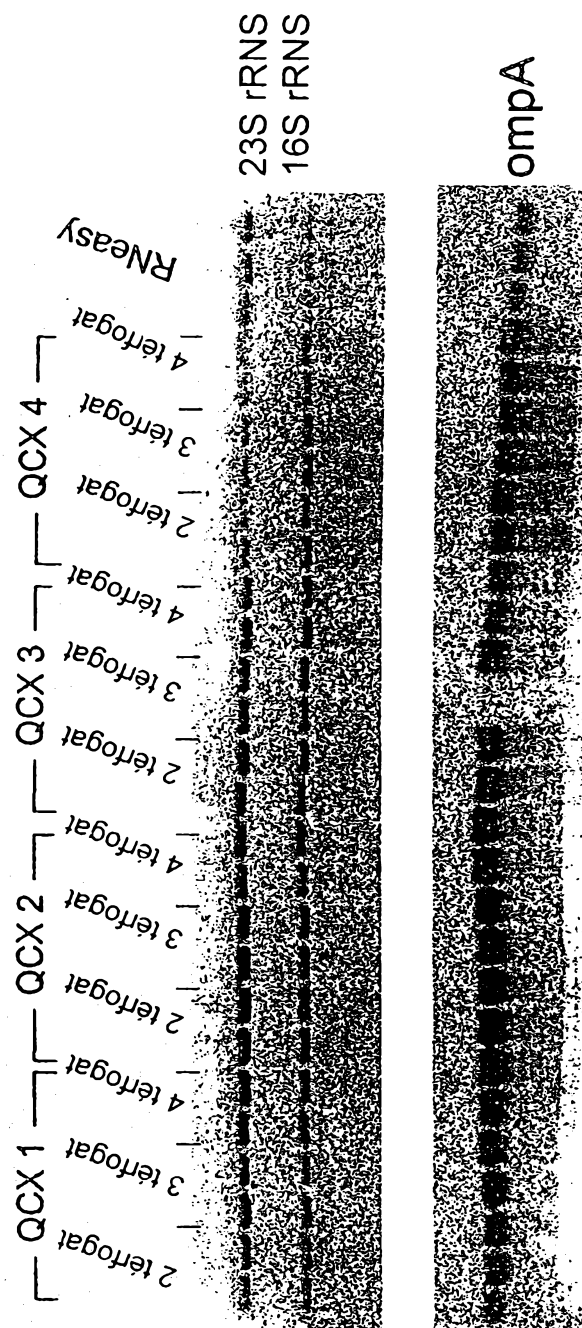


2. ábra



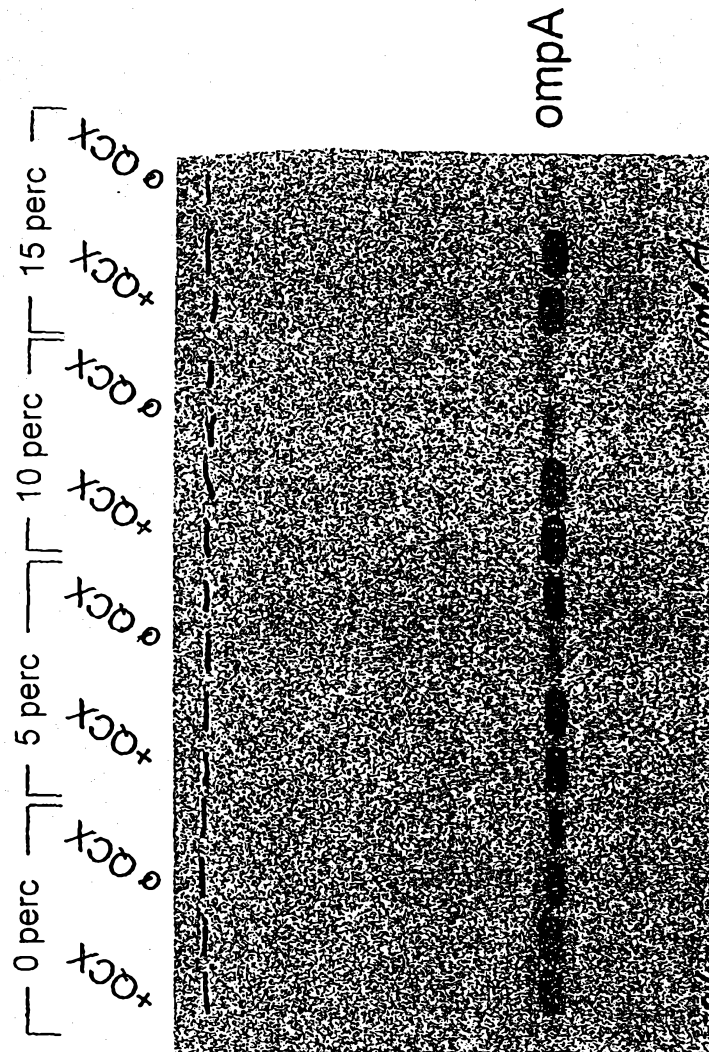
3. ábra

15887

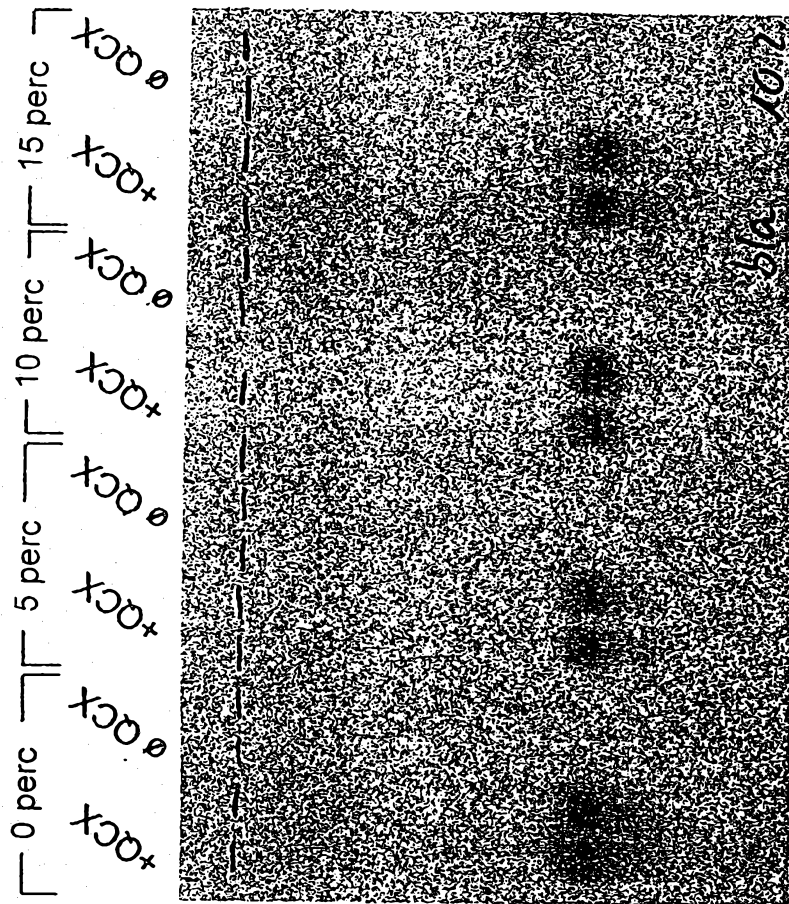


4. ábra





5. ábra



bla

6. ábra