



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 00770
(22) A bejelentés napja: 1992. 09. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
9119735.0 1991. 09. 16. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 92/01698
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 93/06241

(40) A közzététel napja: 1995. 07. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 10. 30.

(11) Lajstromszám:

218 596 B

(51) Int. Cl.⁷

C 12 Q 1/68
G 01 N 33/543
G 01 N 21/77

(72) Feltaláló:

Squirrel, David James, Salisbury, Wiltshire (GB)

(73) Szabadalmaz:

The Secretary of State for Defence in Her
Britannic Majesty's Government of the United
Kingdom of Great Britain and Northern Ireland,
London (GB)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Génpróba bioszenzor eljárás és az eljárás megvalósítására szolgáló vizsgálati kitek

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás növényi vagy állati szövetek, mikroorganizmusok vagy sejtmentes szabad RNS vagy DNS kimutatására, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására, valamint az eljárás megvalósítására szolgáló vizsgálati kitek. Az eljárás elsősorban a

teljes belső reflexiós fluoreszcenciának a felhasználásán alapszik, amelynek révén egy evanescens hullámdetektor hullámvezetőjéhez rögzített RNS vagy DNS és az analit RNS-ének vagy DNS-ének hibridizálódása mérhető.

A találmány tárgya növényi vagy állati szövetek, mikroorganizmusok vagy sejtmentes RNS vagy DNS kimutatására, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására szolgáló eljárás, az ehhez az eljáráshoz szükséges vizsgálati kitek. Az eljárás különösen a teljes belső reflexiós fluoreszcenciát [Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)] hasznosítja az analít RNS vagy DNS hibridizációjának mérésére olyan RNS-sel vagy DNS-sel, amely kritikus frekvencia alatt alkalmazott (a továbbiakban evaneszcens) hullámdetektor hullámvezetővel kapcsolatos.

Biológiai anyagok kimutatására és azonosítására szolgáló immunológiai vizsgálatok más lehetőségét nyújtják a génpróbavizsgálatok, amelyek nukleinsavhibridizációt alkalmaznak. A génpróbának a célanyaggal kapcsolatos fajlagossága könnyebben ellenőrizhető, mint a proteinalapú kötődési jelenségek alkalmazása esetén lehetséges ellenőrzés, ha ezzel együtt polimeráz láncreakciót alkalmazunk a célanyag elősokszorozására, extrém érzékenységet érhetünk el. A napjainkban génpróbaként alkalmazott eljárások lassúak, néhány óra és néhány nap közötti időtartam szükséges az eredmény elérésére. A bioszenzorok egy másik lehetőséget nyújtanak, alkalmazásukkal gyors génpróbavizsgálatok végezhetők, de a génpróba bioszenzorvizsgálatokra ez ideig vonatkozó közlemény kizárólag a felületi plazmarezonanciát alkalmazó eljárások [Evans & Charles (1990); Abstracts of 1st World Congress on DNA probes and immunoassay; Pollard-Knight et al. *Ann. Biol. Clin.* 48, 642–646 (1990)].

A kritikus frekvencia alatt alkalmazott (evaneszcens) hullámbioszenzorok, amelyek a kimutatásnál a TIRF jelenségét használják ki [Sutherland & Dahne, *J. Immunol. Meth.*, 74, 253–265 (1987)] korábban fehérjékkel voltak használatosak biológiai felismerési elemként. Antitesteket használtak fluoreszcenssel jelzett antigén kötődés kimutatására [Eldefrawi és munkatársai, *Biosensors & Bioelectronics*, 6, 507–516 (1991)] acetyl-kolin-receptorok alkalmazásával, hogy acetyl-kolin és kolinészteráz inhibitorok kötődését tanulmányozzák. Más csoportok [Poglitsch & Thompson, *Biochemistry*, 29, 248–254 (1990)] antitestnek F_c epitópokhoz való kötődését mérték.

A találmány módszert nyújt génpróbavizsgálatok elvégzésére evaneszcens hullámdetektor bioszenzorok alkalmazásával, például TIRF hullámvezető, amely alkalmazható az említett eljárás kivitelezésére, ha egy evaneszcens hullámdetektor bioszenzor-berendezésbe építik be.

Az evaneszcens hullámdetektorok a TIRF jelenségét használják ki érzékeny módszer biztosítására a hullámvezető felületén lejátszódó reakciók kimutatására. A hullámvezető különféle formájú lehet, de jellemzően prizma, lemez vagy szál. A célmolekula mérésére szolgáló reakció nyomon követhető például a fluoreszcencia változásának mérésével egy fluoreszcens anyag kötődésekor vagy deszorpciójakor, vagy fluoreszcens anyagnak enzimes vagy kémiai úton való képződésének mérésével. Néhány szabadalmat közöltek már, amelyek evaneszcens hullámdetektorok immunológiai vizs-

gálatokban biológiai érzékelőelemként való alkalmazására vonatkoznak (például a 4 582 809 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), de az immunreagens belső korlátai miatt nem volt lehetséges a szenzor teljes lehetőségének a kihasználása.

A találmány módszert nyújt növényi vagy állati szövetek, mikroorganizmusok vagy sejtmentes RNS vagy DNS kimutatására, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására, amely módszer abban áll, hogy:

- 10 (i) gondoskodunk egy oligonukleotidról, amely a vizsgálandó anyag RNS-ére vagy DNS-ére jellemző oligonukleotidszekvencia egy részével vagy egészével komplementer, és ezt egy evaneszcens hullámdetektor-berendezés hullámvezetőjén rögzítjük;
- 15 (ii) az (i) lépésben nyert rögzített oligonukleotidot kitesszük a mintának vagy az abból származó DNS- vagy RNS-anyagnak olyan körülmények mellett, amelyek mellett a jellemző oligonukleotidszekvenciával bíró DNS vagy RNS hibridizál vele;
- 20 (iii) az (i) lépés szerinti rögzített oligonukleotidot vagy a mintából származó nukleinsavanyagot fluoreszcenciás úton kimutatható szerrel kapcsoljuk a (ii) lépésben végrehajtott DNS- vagy RNS-hibridizálás előtt, alatt vagy után úgy, hogy a fluoreszcenciásan kimutatható anyag a hibridizált termékkel kötődjön, de ne kötődjön a hibridizálatlan rögzített oligonukleotiddal;
- 25 (iv) mérjük a (iii) lépésben kötött fluoreszcenciásan kimutatható szert egy evaneszcens hullámdetektor-berendezéssel, és ennek mennyisége alapján mutatjuk ki a vizsgálandó anyag jelenlétét, azonosítjuk azt és/vagy mérjük mennyiségét.
- 30

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a fluoreszcenciásan kimutatható anyag egy fluoreszcenciásan kimutatható beépülő színezék, amely képes arra, hogy a hibridizációs termék duplexébe beépüljön. A módszernek ebben a formájában a színezék olyan színezék, amely nem kötődik a hibridizálatlan, rögzített oligonukleotidokhoz. A hibridizációs termék jelenlétének ez a meghatározási módszere tökéletesen alkalmazható önmagukban megfelelő hosszúságú rögzített szekvenciákkal, hogy az alkalmazott hibridizációs körülmények mellett sajátos hibridizációt érjünk el. Az így vizsgált minta DNS/RNS tartalma változatlan lehet, vagy lehet fajlagos szekvenciasokszorozással dúsított, például polimeráz láncreakciós sokszorozással (PCR) vagy ligáz láncreakcióval (LCR).

Egy második előnyös megvalósítási mód szerint a fluoreszcenciásan kimutatható anyag egy fluoreszcenciásan kimutatható oligonukleid, amely a hibridizált jellemző szekvenciával hibridizációra képes, vagy amely a fajlagos szekvenciasokszorozó primerként képes működni, például polimeráz láncreakció-primerként, és így fluoreszcenciásan kimutatható sokszorozási terméket ad, amely a hullámvezetőn rögzített oligonukleotidhoz hibridizálva kimutatható evaneszcencia alkalmazásával.

A találmány második megvalósítási módjának egy előnyös formája szerint, kimutatható oligonukleotid alkalmazásával, a találmány egy olyan módszert nyújt a növényi vagy állati szövetek, mikroorganizmusok vagy

sejtmentes RNS vagy DNS kimutatására, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására, amely abban áll, hogy

(i) gondoskodunk egy olyan oligonukleotidról, amely a kimutatandó anyag RNS-ének vagy DNS-ének jellemző oligonukleotidszekvenciájának egy részével komplementer, és amely egy evanescens hullámdetektor hullámvezető felszínén rögzített;

(ii) gondoskodunk egy fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidról, amely a jellemző szekvencia maradékának egészével vagy egy részével komplementer;

(iii) az (i) lépés szerinti rögzített oligonukleotidot egy olyan oldattal hozzuk össze, amely a vizsgálandó anyagot vagy az abból származó DNS-t vagy RNS-t tartalmazza, az érintkeztetést olyan körülmények között valósítjuk meg, amelyek mellett ezek az oligonukleotidszekvenciával hibridizálódni képesek;

(iv) a (iii) lépés szerinti anyag oldatát egy olyan oldattal helyettesítjük, amely a (ii) lépésből származó fluoreszcencián kimutatható komplementer oligonukleotidot tartalmazza, és

(v) a kötött, fluoreszcencián kimutatható oligonukleotid mennyiségét mérjük az evanescens hullámdetektor-berendezéssel, és ezt vonatkoztatjuk a mintában lévő célanyag jelenlétére, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint egy, a növényi vagy állati szövetek, mikroorganizmusok vagy sejtmentes RNS és DNS kimutatására, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására szolgáló módszer, amely abban áll, hogy

(i) gondoskodunk egy olyan oligonukleotidról, amely a kimutatandó anyag RNS-ének vagy DNS-ének jellemző oligonukleotidszekvenciájának egy részével komplementer, és amely egy evanescens hullámdetektor-berendezés hullámvezető felszínén rögzített;

(ii) gondoskodunk egy olyan fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidról, amely a jellemző szekvencia maradéka egészével vagy egy részével azonos;

(iii) a vizsgálandó anyagból származó mintán a (ii) lépés szerinti fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidnak a primerek egyikeként való alkalmazásával sokszorozási reakciót hajtunk végre, hogy ezzel a jelen lévő jellemző szekvenciákat megsokszorozzuk, és egyidejűleg beépítsük a fluoreszcencián kimutatható detektort;

(iv) az (i) lépés szerinti, a hullámvezetőn rögzített komplementer oligonukleotidot a (iii) lépés szerinti reakcióelegynek tesszük ki olyan körülmények mellett, amelyeknél a sokszorozási terméknek a rögzített oligonukleotiddal való hibridizációja bekövetkezik;

(v) a rögzített oligonukleotiddal hibridizált fluoreszcencián detektálható oligonukleotidot az evanescens hullámdetektor hullámvezetővel mérjük, és a kapott eredményt a mintában eredetileg jelen lévő, sokszorozott anyag mennyiségére vonatkoztatjuk.

A (iii) lépés fajlagos sokszorozási reakciója előnyösen és célszerűen egy polimeráz láncreakció, de más reakciók, például ligáz láncreakció is jól alkalmazható, ez szakember számára nyilvánvaló.

A hullámvezetőt – a találmány minden megvalósítási módja esetén – előnyösen szabályozható hőmérsékletű környezetben helyezük el, például egy szabályozott hőmérsékletű kamrában, hogy a komplementer szekvenciának a cél RNS-hez vagy DNS-hez való hibridizálásának szigorúsága szabályozható legyen, vagy hogy a polimeráz láncreakciós denaturálás, hibridizálás és kiterjesztés hőmérsékletciklusai fenntarthatók legyenek.

A fluoreszcencián kimutatható komplementer oligonukleotidok számos formában alkalmazhatók, például fluoreszcens jelzővel jelzett oligonukleotidként, amely egy olyan egységgel bír, amelyhez fluoreszcens minta kötődhet, vagy egy fluoreszcens minta létrehozására képes enzimmal vagy katalizátorral jelzett oligonukleotidként. Így a mérési lépést megelőzően további lépés lehet szükséges, mielőtt az alap fluoreszcenciás kimutatási lépést végeznénk, például kitehetjük azt az egységet, amelyhez egy fluoreszcenciás minta köthető, ilyen mintának vagy az enzim szubsztrátjának vagy katalitikus reakciónak.

Az (i) lépés szerinti komplementer szekvencia elegendően hosszú lehet ahhoz, hogy fajlagosan kötődjön a cél RNS-hez vagy DNS-hez, miközben elegendő cél RNS- vagy DNS-szekvenciát hagy kötetlenül ahhoz, hogy az a (iii) lépés szerinti kimutatható oligonukleotidhoz kötődjön. Jellemzően a rögzített szekvencia a célszekvencia hosszának mintegy felével bír, de a célszekvencia hosszának növekedésével kisebb arány is használható.

A kimutatható oligonukleotid alkalmazásával végzett előnyös megvalósítási mód szerint a kimutatható szekvencia a célszekvencia maradékának egészével vagy majdnem egészével komplementer, de a jellemző célszekvencia hosszának növekedésével ez is lehet egy csökkentett arányú rész.

Előnyösen a rögzített oligonukleotidszekvencia a célszekvencia egyik vége irányában lévő szekvenciával vagy egyik végének szekvenciájával komplementer, míg a fluoreszcencián kimutatható szekvencia egy, a másik vég irányában lévő szekvenciával komplementer. Így a hibridizálást megelőzően célszerűen használhatók restriktions endonukleázok a mintaanyag RNS-ének vagy DNS-ének hasítására abból a célból, hogy a jellemző célszekvencia ezen részeihez könnyebb legyen hozzáférni. Hasonló módon, a találmány egy második előnyös megvalósítási módja mellett a kimutatható szekvenciának csak ahhoz kell elegendően hosszúnak lennie, hogy a kívánt fajlagossággal bíró PCR-primerként alkalmazható legyen, de lehet ennél hosszabb is. Megjegyezzük, hogy mindkét PCR-primer lehet fluoreszcencián kimutatható, így növekszik a lehetséges fluoreszcencia, amely a hullámvezető felületét éri, és ezzel a megfelelő hatás hatékonysága. Minden esetben előnyös az 5–30 bázisnyi reagenshosszúság, még előnyösebb a 10–25, például 15–20 bázis hosszúság.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a komplementer szekvenciáknak nem kell minden bázispárral komplementernek lenni, amelyhez hibridizálódnak. Így szakember könnyen meghatározhatja a követelmények szigorúságát a rosszul illesztett oligomerek statisztikai elfogad-

hatósága tekintetében, például 90%-ban komplementer szekvenciákra, és képes megfelelő eredmények elérésére a hibridizációs hőmérséklet ennek megfelelő szabályozásával, ha rosszul illesztett szekvenciákat alkalmaz.

A precíz komplementer szekvenciák alkalmazásának szükségessége annak a szekvenciának az egyedi voltától függően változik, amelyet a felhasználó vizsgál. Így abban az esetben, ha egy szekvencia más lehetségesen jelen lévő szekvenciák bázisaival nagy százalékban azonos, tökéletesebb komplementer szekvencia szükséges, mint ha a vizsgálandó szekvencia viszonylag sajátos. Ha egy olyan szekvenciát vizsgálunk, amely nem teljesen tisztázott vagy változó, szakember képes meghatározni az (i) és (iii) lépésekhez szolgáló statisztikailag megfelelő oligomereket.

A találmány második szempontját tekintve egy vizsgálókitet nyújt a találmány szerinti eljárás alkalmazására, amely

(1) a kimutatandó anyag RNS-ének vagy DNS-ének jellemző oligonukleotidszekvenciája egészével vagy egy részével komplementer oligonukleotidot és

(2) egy fluoreszcencián kimutatható, a karakterisztikus szekvencia maradék részének egészével vagy egy részével komplementer vagy azonos oligonukleotidot tartalmaz.

Az (1) és (2) komponensek azokból választhatók, amelyeket az előzőekben ismertettünk, illetve az igénypontokban szerepelnek, ezeket a komponenseket a kitben adott esetben olyan reagensekkel egészítjük ki, amelyek az (1) oligomernek a hullámvezetőn való rögzítéséhez szükségesek; az ilyen reagensek példáulként hozzuk fel azokat, amelyekre az alábbiakban bemutatandó módszerekben hivatkozunk.

A találmány minden szempontját tekintve érvényesnek tartjuk, hogy megcélozhatunk egyidejűleg egynél több jellemző szekvenciát, oly módon, hogy a rögzített oligonukleotidnak és az ezzel kapcsolt fluoreszcencián kimutatható kötőanyagnak egynél több típusát alkalmazzuk az eljárásban, illetve a kivitelezésére alkalmazott berendezésben.

A találmány szerinti eljárás előnyei az analóg immunvizsgálati módszerekkel szemben a következők:

(a) a rögzített komponensnek a hullámvezető felületén való sűrűbb burkolata folytán nagyobb érzékenység és dinamikus tartomány érhető el, és a többszörösen fajlagos felületek létrehozása könnyebbé válik;

(b) az analit és a rögzített és származékká alakított oligonukleotidok közötti kötődés a hibridizálási körülmények és az oligonukleotidok hosszának változtatásával szabályozható, így az adott teszt fajlagossága és érzékenysége finoman beállítható az igényeknek megfelelően;

(c) az immunológiai vizsgálatoknak korlátot szab a reagensek hozzáférhetősége, stabilitása, az antigénváltozékonyság, az antigénhelyek maszkírozása és az antitest/antigén komplexek disszociációs állandói. A génpróbavizsgálatok mindezen szempontok tekintetében potenciálisan jobbak;

(d) a fluoreszcens immunológiai vizsgálatok hiányossága, hogy a környezeti szennyezők interferenciája és a nem fajlagos kötődés befolyásolják, míg a gén-

próbavizsgálatokhoz szükséges magasabb hőmérséklet (azaz a 37 °C hőmérséklet helyett 60 °C feletti hőmérséklet) csökkenti a szennyezőknek a detektor felületén való nemkívánt adszorpcióját;

(e) a nukleinsav komplexekkel az immunkomplexekhez viszonyítva nyerhető alacsonyabb disszociációs komplexeknek köszönhetően realizálható az evanescens hullámdetektor-technológia teljes érzékenysége.

A vizsgálandó mintákat használhatjuk a környezetben való előfordulásuk formájában (például a szabad RNS- vagy DNS-oligonukleotidokat) vagy előkezeltük például sejtlizálásos eljárásokkal, DNS/RNS betöményítéssel vagy sokszorozással (például Taq polimeráz alkalmazásával végzett polimeráz láncreakcióval), továbbá restrikciós enzimmel megvalósított lebontással (például jobban kezelhető méretű oligonukleotidok nyelésére).

A találmány szerinti eljárásban és kitekben rejlő lehetőségeket az alábbiakban példákkal világítjuk meg a korlátozás szándéka nélkül, a példákban az ábrákra hivatkozunk; a példákon túlmenő megvalósítási módok a példák tükrében szakember számára nyilvánvalóak.

Az alábbiakban az ábrákat ismertetjük.

Az 1. ábrán a példákban szereplő evanescens hullámdetektor lényeges elemei láthatók.

A 2. ábrán egy optikai szál hullámvezetőhöz kovalensen kapcsolt komplementer szekvenciának egy fluoreszcenccel jelzett 20-merrel való hibridizálásakor kapott feszültség/idő függvényt mutatjuk be.

A 3. ábrán komplementer és kontroll oligonukleotidok fajlagos hibridizálásakor kapott koncentráció/hatás görbékét mutatunk be, a koncentrációt nmol oligomer/liter értékben, a jelet mV/min értékben adjuk meg.

A 4. ábrán a mintaoldatnak a hullámvezetőt tartalmazó szabályozott hőmérsékletű kamrán való átáramlási sebességének hatását mutatjuk be a hibridizációs jelre; a jelet (mV/min) az áramlási sebesség (ml/min) függvényében ábrázoljuk.

Az 5. ábrán a hőmérsékletnek a hibridizáció sebességére gyakorolt hatását mutatjuk be; a jelet (mV/min) a hőmérséklet (°C) függvényében ábrázoljuk egy fluoreszcenccel jelzett 20-mer minta 50 mg/ml-es koncentrációja esetén.

A 6. ábrán oligonukleotid hibridizáció pH profilját mutatjuk be optikai szál hullámvezetőn; a jelet (mV/min) a pH függvényében ábrázoljuk.

A 7. ábrán egy kovalensen kötött, 204 bázisból álló oligonukleotid proximális (közelebbi) és disztális (távolabbi) végével komplementer oligomerek 8 nmol/l-es oldatából való kötődést mutatjuk be.

A 8. ábrán a találmány szerinti eljárás megvalósítási módjai közül kettőnek a molekuláris alapját mutatjuk be vázlatosan.

Az alábbiakban az eljárást ismertetjük.

Minthogy az oligonukleotidok hosszú láncú molekulák, amelyeknek hossza összevethető az evanescens zónák mélységével, vizsgálatokat folytattunk rövid, fluoreszcenciával jelzett oligonukleotidoknak egy 204 bázisból álló oligomer valamely végéhez való hibridizálásával, az egyik végén a hullámvezető felületéhez rögzített *Bacillus anthracis* védő antigén génből sokszorozással kapott fragmentumot hibridizáltunk a próba hosszának a kimutatásra gyakorolt hatása vizsgálatára.

Az alkalmazott anyagok az alábbiak: glutaraldehyd, 3-amino-propil-trietoxi-szilán (APTS), Tween-20, Ficoll, formamid, poli(vinil-pirrolidon), marhasérum-albumin V frakció (BSA), streptavidinnel jelzett torma-peroxidáz (HRP-SA), 2,2-azino-bisz(3-etil-benzotiazol-

lin-6-szulfonsav) (ABTS), nátrium-klorid és trinátrium-citrát, melyek beszerzési helye a Sigma Chemical Company, Poole, UK; nátrium-dihidrogén-ortofoszfát, nátrium-hidrogén-ortofoszfát, nátrium-dodecil-szulfonát (SDS), hidrogén-peroxid, hidrogén-klorid és aceton (AR minőségűek), beszerzési helyük a BDH, Poole UK; ammónium-hidroxid, beszerzési helye: Aldrich, Gillingham, Dorset, UK; és etanol, amelynek beszerzési helye Hayman Ltd., Witham, Essex, UK. Agarózgyöngyökön rögzített streptavidint a Pierce and Warriner, Chester, UK cégtől, C6-kapcsolt fluoreszcein, amino vagy biotin által módosított véggel bíró szintetikus DNS-oligonukleotidokat, amelyek felsorolását az 1. táblázatban adjuk a British Bio-Technology Ltd., Abingdon, UK cégtől szereztünk be.

1. táblázat
Alkalmazott oligonukleotidok (5'→3')

Azonosítási szám	Szekvencia
4946	CACGTTGTGGACTGTTTGGA-amino
4947	TCCAAACAGTCCACAACGTG-fluoreszcein
4949	CAACACACCTTAACAC-amino
4950	GTGTTAAGGTGTGTTG-fluoreszcein
5453	Amino-CTTTAATTGTCGCGAGTGTT
5805	Fluoreszcein-AACACTCGCGACAATTAAAG
6097	Biotin-AATTCAAGTACGGTCGCAAT
5452	Fluoreszcein-AATTCAAGTACGGTCGCAAT

A száloptikával bíró evanescens hullámdetektor-berendezés (19. számú prototípus) és az 1 mm×65 mm-es kvarc optikai szálak forrása az ORD, North Salem, New Hampshire, USA). A berendezést az 1. ábrára való hivatkozással ismertetjük. A fényt egy 6 W-os volfrám 1 fényforrással biztosítja, a fény három 2 kollimáló lencsén halad át, amelyeket egymástól egy 485 mm-es 3 kék szűrő és egy 0,8 mm átmérőjű nyílással bíró 4 takarólap választ el, a fény ezt követően egy 50:50 5 sugármegszakító eszközön verődik vissza, amely időszakonként egy 6 fókuszálólencsére és egy 7 oligonukleotidot hordozó hullámvezetőre irányítja a fényt. Bármely kötött, például hibridizált vagy beépült fluoreszcens anyagról származó fluoreszcens fényt, amely a bejövő fényre adott válasz, visszairányítunk a 7 hullámvezetőre a 6 lencséken át, és hagyjuk, hogy a sugármegszakító eszközön haladjon át egy 530 nm-es zöld 8 szűrő felé, ahonnan egy 9 fényelzáró eszközön, és egy 10 fókuszálólencsén halad át, majd egy mérőberendezéssel, például egy voltméterrel (amely az ábrán nem szerepel) kapcsolt 11 detektoreszköznek ütközik.

A voltméter kimenő feszültségét egy Pharmacia 482 típusú grafikus regisztrálókészülékhez kapcsoljuk. Az optikai szálakat egy duplikátoros áramlási cellában tartjuk, amely üveg kapilláris csőből készül rozsdamentes acél zárósapkákkal és szilikontömítéssel. A hőmérsékletet egy vízfürdő vizének az üvegduplikátoron (köpeny) való cirkuláltatásával szabályozzuk. A hőmérsékletet hőelem alkalmazásával ellenőrizzük. Az optikai szálakat megtisztítjuk, majd glutaraldehyddel kovalen-

sen kapcsoljuk, ezt Tijssen (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 15. kötet, 322–323. oldal, szerk.: Burdon és van Knippenburg; Elsevier, 1985) eljárása alapján végezzük.

35 A szálakat 2%-os acetonos APTS alkalmazásával szobahőmérsékleten szilánnal kezeljük, acetonnal mosuk, 50 °C hőmérsékleten szárítjuk, majd 1 óra időtartamra 1%-os glutaraldehyddel kezeljük, foszfáttal puffertolt sóoldattal mossuk, végül éjszakán át 4 °C hőmérsékleten egy amino-terminállal bíró oligonukleotid 10 µg/ml-es oldatában hagyjuk állni. A vizsgálat végrehajtására a rögzített oligonukleotiddal bíró optikai szálakat ionmentes vízzel öblítjük, szárazra itatjuk, és behelyezzük az átáramlásos cellába. Optimalizált esetben az alábbi, Anderson & Young (Nucleic acid hybridization – a practical approach, szerk.: Hames and Higgins; IRL Press, Oxford, 1985, 73–111. oldal) szakirodalmi helyről adaptált körülményeket alkalmazzuk. A vízköpeny hőmérsékletét 65 °C-ra állítjuk be.

50 Perisztaltikus szivattyúval előhibridizáló oldatot (250 ml 20×SSC, plusz 50 ml 100×Denhardt-féle oldat, 50 ml 0,1 mol/l-es foszfátpuffer és 1 ml Tween-20 600 ml steril, ionmentes vízhez adva, pH=6,8-ra beállítva) szivattyúzunk át a 25 µl-es átáramlásos cellában elhelyezett szálon 0,5 ml/perc sebességgel állandó alapvonal nyeréséig. Ezután a fentivel azonos áramlási sebességgel bevezetjük a végén fluoreszcenciával jelzett cél-oligonukleotidot előhibridizáló oldatban, és a grafikus regisztrálókészülék kijövő jelének növekedését követjük nyomon. Néhány perc múl-

va az előhibridizáló oldatot visszkapcsoljuk az áramlós cellába, és a hőmérsékletet 80 °C-ra emeljük. 10–15 perc alatt minden kötött oligonukleotid deszorbeálódik, és a hőmérséklet 65 °C-ra csökken, ekkor újabb folyamat indítható.

Kezdetben csak rövid 16–20-mer oligonukleotidokat kapcsolunk a szálakhoz. A hosszabb próbák alkalmazásának vizsgálatára egy aminoterminálissal bíró 204-mer szintetizáltunk PCR-eljárás alkalmazásával a célszekvencián egy primerrel, egy 20-mer alkalmazásával, és egy, a végén aminocsoporttal jelzett oligo.5453 alkalmazásával, másik primerként ugyancsak egy 20-mer alkalmazásával, egy, a végén biotinnal jelzett oligo.1222-vel. A be nem épült amino-jelzett primert agarózgyöngyökön rögzített sztreptavidin alkalmazásával eltávolítjuk, hogy a be nem épült aminovégződésel bíró primerek közül a kétszálú PCR-terméket elkülönítsük. Az aminocsoporttal jelzett 204 bázisból álló szálát szabaddá tesszük a komplementer száltól, és a gyöngyöket 95 °C hőmérsékleten 10 percig melegítjük, majd gyorsan lehűtjük jeges vízelegységben, és a gyöngyöket centrifugálással eltávolítjuk. A termelt 204-mer mennyisége elegendő egy 0,85 µg/ml-es oldat készítéséhez, amelyet a szálakhoz való kapcsolásra alkalmazunk.

Az oligomerek vizsgálatát a következő módon végezzük:

A kezdeti 20-meres vizsgálatoknál a cél- és kontrolloligonukleotidok magas szintjét alkalmaztuk. Az oligo.4946-t rögzítetten tartalmazó szálát magában foglaló áramlós cellán 1 ml/perc sebességgel, 60 °C hőmérsékleten vezettünk át 200 nmol/l-es (1 µg/ml) fluoreszcenccel jelzett oligonukleotid kontrollt (oligo.4950). A 80 mV-os alapvonal azonnali eltolódását észleltük, majd a kijövő jel állandó maradt mindaddig, míg az előhibridizáló oldatot be nem vezettük, ekkor a kijövő jel korábbi szintjére visszatért. Ezzel ellentétben, ha oligo.4947-t, amely a szálon lévő oligo.4946-tal komplementer, vezettünk be 160 nmol/l koncentrációban (ugyancsak 1 µg/ml), folyamatosan növekvő jelet nyertünk, amelynek kezdeti meredeksége mintegy 350 mV/min. Egy platót értünk el 14 perc elteltével, ekkor a kijövő jel az alapvonal szintje fölé 1140 mV. A kijövő jel ismét esett, amikor 90 °C hőmérsékleten előhibridizáló oldatot engedünk át az áramlós cellán. A kötődés fajlagosságának megerősítéseként a kontroll oligo.4950 kapcsolódott ahhoz az optikai szálhoz, melynek felületén komplementere, az oligo.4949 volt kovalensen rögzítve.

8 nmol/l-es fluoreszcenccel jelzett oligo.4947-nek a rögzített oligo.4946-hoz való hibridizálódásának időbeli lefolyását a 2. ábrán mutatjuk be, a 3. ábrán fluoreszcenccel jelzett oligo.4950-nek rögzített oligo.4949-hez való hibridizálódását mutatjuk be oligo.4947 kontrollként való alkalmazásával koncentráció/hatás görbe formájában. A görbék meredekségét a mintának az áramlós cellába való belépése után 1 perccel mérjük.

Optimalizált körülmények mellett kapott eredményeket mutatunk be a 4–6. ábrákon. Az áramlási sebesség hatását 50 ng/ml-es oligo.4947 oldattal vizsgáljuk. Eredményeinket a 4. ábrán mutatjuk be. A hibridizáló-

dás sebességének a hőmérséklettől és pH-tól való függését értékeltük, és az 5., illetve 6. ábrán mutatjuk be. A maximális kötődési sebességet 65 °C hőmérsékleten, pH=6,8 értéken észleltük.

A 7. ábrán egy egyik végén hullámvezető felületéhez kovalensen kapcsolt 204 bázisból álló oligonukleotid proximális vagy disztális végének valamelyikével komplementer, fluoreszcenccel jelzett oligonukleotidok 50 nmol/l-es oldatainak kötődési görbéit mutatjuk be. A két válasz között kevés különbség volt, mindkettő gyorsan emelkedett egy 48 mV-os (proximális) vagy 56 mV-os (disztális) platósintre, ez mintegy 3 perc alatt következett be, majd a kijövő jelben enyhe csökkenés következett be, amikor az előhibridizáló oldatot az áramlós cellába visszavezettük. A koncentráció/hatás görbék szerint hibridizálásra a kezdeti meredek szakaszokat alkalmazva a két oligonukleotid kevés különbséget mutatott (az eredményeket nem mutatjuk). Az oligo.4947 500 nmol/l koncentrációban kontrollként alkalmazva nem kötődött a 204-merhez.

Nanomoláris tartományban a kimutatásnál lineáris összefüggés jelentkezik a hatás meredeksége és a koncentráció között, hasonlóan azokhoz az eredményekhez, amelyeket bioszenzor alkalmazásával végzett immunológiai vizsgálatokkal nyerhetünk.

Azokhoz a vizsgálatokhoz, amelyeknél nagy érzékenység szükséges, az alábbi berendezéseket alkalmazzuk, illetve célszerűen az eljárást az alábbi módon javítjuk:

Jelzett oligomereket készítünk többszörös fluorofo-rokkal vagy fluoreszcens gyöngyökkel jelzett oligonukleotidok alkalmazásával, vagy fluoreszcens beépülő színezékeket alkalmazunk a hibridizálódás kimutatására.

A bioszenzorvizsgálatot DNS-sokszorozási eljárással, például PCR-eljárással kombináljuk, amelyek a mintán a hullámvezetőre való hibridizálást megelőzően hajthatók végre, előnyösen fluoroforral jelzett primerek alkalmazásával (mint az eljárás előzőekben ismertetett valamely előnyös megvalósítási módjánál), hogy a termék kimutatását javítsuk. Az is lehetséges lenne, hogy közvetlen ellenőrizzük a PCR-reakciókat bioszenzor alkalmazásával. A bioszenzoros vizsgálathoz szükséges mintegy 60 másodperc idő nagyságrenddel gyorsabb, mint a szokásos génpróbavizsgálatok időtartama, és még sokkal gyorsabb, mint a gyors tesztek, amelyek mintegy 1 óra időtartamot vesznek igénybe [Engleberg. ASM News 57, (4) 183–186 (1991)].

A detektorfelület könnyű visszaalakíthatósága (reciklizálhatósága) a kötött nukleinsavaknak melegítéssel való eltávolítása révén elejét veszi az ilyen rendszerű immunológiai vizsgálatoknál szokásos problémáknak, és az eredmény megadásának 60 másodperces időtartama révén az eljárást alkalmassá teszi katonai vagy más kritikus veszélyes környezeti körülmények gyors azonosítására. Néhány optikai szálról azt találtuk, hogy néhány napos időtartamon át használva sem jelentkezik romlás a hatásban.

Mind 5', mind 3' B.-jelzett oligonukleotidokat alkalmaztunk ezzel a faktorról, nem találtunk nyilvánvaló befolyást az eredményekre. Az oligonukleotidokat egy

204 bázisból álló oligonukleotidnak a proximális és disztális végéhez is kötöttünk. Ennek hossza 70 nm (3,4 nm-es értéket véve a kettős szálú, hélixként 10 bázist tartalmazó DNS ívének) és 200 nm (az -O-P-O-C-C-C- molekula váz menti ismétlődésének kötésközi távolságát véve) közötti lehet. Az evanescens zóna mélysége, amelyet abban a távolságban határozunk meg, amelyet a fénynek meg kell tennie ahhoz, hogy intenzitása eredeti értékének 1/e hányadára essen, mintegy 100 nm, ez összevethető a 204-mer

hosszával. Mivel a fluoreszcenciával jelzett oligonukleotidok disztális és proximális hibridizációjára hasonló jeleket nyertünk (a disztális oligonukleotidok esetén némi magasabb jeleket kaptunk), feltételezzük, hogy a hosszú oligonukleotid szálak orientációja nem merőleges a hullámvezető felszínére.

A 204-mereknek – amelyek egy nagyobb célszekvenciából képződtek PCR révén – csak egy korlátozott mennyisége volt képes az optikai szálhoz való kapcsolódásra, ez feltehetően ahhoz vezetett, hogy a koncentráció a hullámvezető felszínén viszonylag alacsony. Ez magyarázhatja azt, hogy a válasz a 7. ábrán látható módon a platót gyorsan eléri, összevetve a 2. ábrán látható lefutással, ahol azonos időskála alkalmazása mellett a jel folyamatosan emelkedik (ahol a rögzített génpróba nagyobb koncentrációjú, 100-szoros vagy nagyobb mértékben töményített oldatból kovalensen kötött). Ha a kötődés mértékeként inkább a platómagasságot választottuk, mint a kibocsátott jel változását, a rögzített próba mennyiségének korlátozása lehetővé tette, hogy hamarabb érjük el a telítettséget.

A találmány molekuláris alapját a 8. ábrán mutatjuk be, ahol a 8A–C. és 8D–F. ábrák a találmány szerinti eljárás első, illetve második előnyös megvalósítási módjára vonatkoznak. A 8A. ábrán egy, a cél (B) DNS-szekvenciára jellemző oligonukleotidszekvencia egy részével komplementer (A) oligonukleotidszekvencia van rögzítve az evanescens hullámdetektor hullámvezetőn a fent leírt eljárással. A 8B. ábrán a rögzített oligonukleotidot hibridizációs körülmények mellett a vizsgált minta oldatának tesszük ki, és a (B) DNS-szekvencia az (A) szekvenciához hibridizálódik. A 8C. ábrán a mintaoldatot egy fluoreszcenciával jelzett (C) oligonukleotidot tartalmazó oldattal helyettesítjük, amely a cél oligonukleotid hibridizálatlan maradékával komplementer, ebben az esetben ugyancsak hibridizálásnak kedvező körülményeket választunk, és hasonló módon hibridizálódást érünk el. Hibridizálódás esetén a fluoreszcenciát a hullámvezető evanescens zónájában lévő fény fluoreszkálásra készíti.

A 8D. ábrán az (A) komplementer szekvenciát az előzők szerint az evanescens hullámdetektor hullámvezető felszínén rögzítjük; a 8E. ábrán egy mintaoldatot PCR-körülmények mellett két primerrel, a (D) és (E) primerekkel kezeljük, mindkettő a (B) cél jellemző szekvencia valamely végén lévő jellemző szekvenciának megfelelő. Azt a primert, amely a szekvenciának a rögzített (A) oligonukleotiddal ellentétes végén hibridizálódik, fluoreszcenciával jelezzük, és így a reakciótermék egy fluoreszcenciával jelzett (F) célszekvencia. A 8F. áb-

rán az (A) rögzített szekvenciát hibridizációs körülmények mellett egy mintaoldatnak tesszük ki, és az (F) fluoreszcenciával jelzett célszekvenciának az (A) szekvenciához való hibridizálása mutatható ki az evanescens hullámdetektor által indukált fluoreszcencia révén.

A 8. ábrán bemutatott eljárás egy előnyös formája szerint PCR vagy más fajlagos sokszorozási beépítéses eljárás alkalmazásakor az (A) rögzített oligonukleotidot úgy választjuk meg, hogy ne legyen képes (D) és (E) primerekkel való kötődésre, így ezek feleslege nem eredményezi a rögzített helyek blokkolását. Így ennél a formánál az (A') oligonukleotid a (B) szekvenciában központibb részen hibridizálódik (F) egy részéhez, mint a (D) primer, ami azt eredményezi, hogy (F) nem fluoroforhordozó vége a 8G. ábrán bemutatott.

A találmánynak azt a megvalósítási módját, amelyben beépülő színezéket alkalmazunk, bár itt konkrétan nem mutatjuk be, úgy valósítjuk meg, amint az legjobban a 8A. és 8B. ábrákon szerepel, ahol ezeket a lépéseket a színezék jelenlétében vagy későbbi hozzáadásával valósítjuk meg. Az erre a célra alkalmas színezékek, és a kölcsönhatás körülményei a szakirodalomban, például a Latt és Wohlleb; *Chromosoma* (Berl.) 52, 297–316 (1975); Jorgenson és munkatársai; *Chromosoma* (Berl.) 68, 287–302 (1978) és Jennings és Ridler; *Biophysics of Structure and Mechanism*, 10, 71–79, (1983) szakirodalmi helyen megtalálhatók.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás növényi vagy állati szövetek, mikroorganizmusok vagy sejtmentes szabad RNS vagy DNS kimutatására, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására, amely eljárás abban áll, hogy

(i) gondoskodunk egy oligonukleotidról, amely a vizsgálandó anyag RNS-ére vagy DNS-ére jellemző oligonukleotidszekvencia egy részével vagy egészével komplementer, és ezt egy kritikus frekvencia alatt alkalmazott (evanescens) hullámdetektor-berendezés hullámvezetőjén rögzítjük;

(ii) az (i) lépésben nyert rögzített oligonukleotidot kitesszük az anyag egy mintája oldatának vagy az abból származó DNS- vagy RNS-anyagnak olyan körülmények mellett, amelyek mellett a jellemző oligonukleotidszekvenciával bíró DNS vagy RNS hibridizál vele;

(iii) az (i) lépés szerinti rögzített oligonukleotidot vagy a mintából származó nukleinsavanyagot fluoreszcenciás úton kimutatható szerrel kapcsoljuk a (ii) lépésben végrehajtott DNS- vagy RNS-hibridizálás előtt, alatt vagy után úgy, hogy a fluoreszcenciásan kimutatható anyag a hibridizált termékkel kötődjön, de ne kötődjön a hibridizálatlan rögzített oligonukleotiddal;

(iv) mérjük a (iii) lépésben kötött fluoreszcenciásan kimutatható szert egy kritikus frekvencia alatt alkalmazott hullámdetektor-berendezéssel, és ennek mennyisége alapján mutatjuk ki a vizsgálandó anyag jelenlétét, azonosítjuk azt, és/vagy mérjük mennyiségét,

azzal jellemezve, hogy a jellemző szekvencia mennyiségét fajlagos szekvenciasokszorozási eljárással dúsítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fajlagos szekvencia sokszorozását evaneszcens hullámdetektor hullámvezetővel érintkezésben lévő oldatban hajtjuk végre.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fluoreszcencián kimutatható anyagként olyan fluoreszcencián kimutatható beépülő színezéket alkalmazunk, amely a hibridizációs termék duplexébe épül be, és a színezék nem kötődik a hibridizálatlan rögzített oligonukleotidokhoz.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fajlagos szekvenciasokszorozást polimeráz láncreakció-sokszorozással (PCR) vagy ligáz láncreakcióval (LCR) valósítjuk meg.

5. Az 1., 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fluoreszcencián kimutatható anyagként egy olyan fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidot alkalmazunk, amely az 1. igénypont (ii) lépése szerinti hibridizált jellemző szekvenciával hibridizálódásra képes.

6. Az 1., 3., 4. vagy 5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan fluoreszcencián kimutatható anyagot alkalmazunk, amely fajlagos szekvenciasokszorozó primerként tud működni, így olyan fluoreszcencián kimutatható sokszorozási terméket nyerünk, amely evaneszcencián kimutatható, ha egy hullámvezetőn rögzített oligonukleotiddal hibridizálódik.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fajlagos szekvenciasokszorozó primer egy polimeráz láncreakció primer.

8. Az 1. vagy 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

(i) gondoskodunk egy olyan oligonukleotidról, amely a kimutatandó anyag RNS-ének vagy DNS-ének jellemző oligonukleotidszekvenciájának egy részével komplementer, és amely egy evaneszcens hullámdetektor hullámvezető felszínén rögzített;

(ii) gondoskodunk egy fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidról, amely a jellemző szekvencia maradékának egészével vagy egy részével komplementer;

(iii) az (i) lépés szerinti rögzített oligonukleotidot egy olyan oldattal hozzuk össze, amely a vizsgálandó anyagot vagy az abból származó DNS-t vagy RNS-t tartalmazza, az érintkeztetést olyan körülmények között valósítjuk meg, amelyek mellett ezek az oligonukleotidszekvenciával hibridizálódni képesek;

(iv) a (iii) lépés szerinti anyag oldatát egy olyan oldattal helyettesítjük, amely a (ii) lépésből származó fluoreszcencián kimutatható komplementer oligonukleotidot tartalmazza; és

(v) a kötött, fluoreszcencián kimutatható oligonukleotid mennyiségét mérjük az evaneszcens hullámdetektor-berendezéssel, és ezt vonatkoztatjuk a mintában lévő célszubsztancia jelenlétére, azonosítására és/vagy mennyiségi meghatározására.

9. Az 1., 6. vagy 7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

(i) gondoskodunk egy olyan oligonukleotidról, amely a kimutatandó anyag RNS-ének vagy DNS-ének jellemző oligonukleotidszekvenciájának egy részével komplementer, és amely egy evaneszcens hullámdetektor hullámvezető felszínén rögzített;

(ii) gondoskodunk egy olyan fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidról, amely a jellemző szekvencia maradéka egészével vagy egy részével azonos;

(iii) a vizsgálandó anyagból származó mintán a (ii) lépés szerinti fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidnak a primerek egyikeként való alkalmazásával sokszorozási reakciót hajtunk végre, hogy ezzel a jelen lévő jellemző szekvenciákat megsokszorozzuk, és egyidejűleg beépítsük a fluoreszcencián kimutatható szert;

(iv) az (i) lépés szerinti, a hullámvezetőn rögzített komplementer oligonukleotidot a (iii) lépés szerinti reakcióelegynek tesszük ki olyan körülmények mellett, amelyeknél a sokszorozási terméknek a rögzített oligonukleotiddal való hibridizációja bekövetkezik;

(v) a rögzített oligonukleotiddal hibridizált fluoreszcencián detektálható oligonukleotidot az evaneszcens hullámdetektor hullámvezetővel mérjük, és a kapott eredményt a mintában eredetileg jelen lévő, sokszorozott anyag mennyiségére vonatkoztatjuk.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hullámvezetőként egy prizmat, lemezt vagy szálal alkalmazunk.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hullámvezetőt egy szabályzott hőmérsékletű környezetben helyezük el.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hullámvezetőt egy szabályozott hőmérsékletű kamrában helyezük el.

13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hőmérséklet olyan szabályozhatóságát valósítjuk meg, amelyben a komplementer szekvenciáknak a cél RNS- vagy DNS-szekvenciákhoz való hibridizálódásának szigorúsága szabályozható, vagy a polimeráz láncreakció denaturációs, hibridizációs és kiterjesztési hőmérsékleti ciklusai megvalósíthatók.

14. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fluoreszcencián kimutatható komplementer oligonukleotidokat úgy biztosítjuk, hogy a megfelelő oligonukleotidokra fluoreszcens jelet viszünk fel egy olyan egység felvitelével, amelyhez egy fluoreszcens anyag kötődhet, vagy egy olyan enzim vagy katalizátor révén, amely fluoreszcens anyag létrehozására képes.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a komplementer oligonukleotidra fluoresceint viszünk.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az oligonukleotidra egy olyan enzimet vagy katalizátort viszünk, amely fluoreszcens anyag létrehozására képes, és a fluoreszcenciának az evaneszcens hullámdetektor-berendezéssel való leolvasását megelőzően ennek az enzimnek vagy katalizátornak a szubsztáját adjuk be.

17. Az 1–16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az anyagot RNS-ének vagy

DNS-ének hasítására restrikciós endonukleázokkal előkezeljük.

18. Az 1–17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy komplementer vagy azonos oligonukleotidokként egymástól függetlenül 5–30 bázis hosszúságú oligonukleotidokat alkalmazunk.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 10–25 bázis hosszúságú oligonukleotidokat alkalmazunk.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 15–20 bázis hosszúságú oligonukleotidokat alkalmazunk.

21. Az 1., 2., 3., 4., 14., 15., 16. vagy 17. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban való alkalmazásra szolgáló vizsgálati kit, *azzal jellemezve*, hogy

(A) a kimutatandó, azonosítandó vagy mennyiségileg meghatározandó anyag RNS-ére vagy DNS-ére jellemző oligonukleotidszekvencia részével vagy egészével komplementer oligonukleotidot tartalmaz egy evaneszcens hullámdetektor-berendezés hullámvezetője felszínén rögzítve, és

(B) egy fluoreszcencián kimutatható beépülő színezéket tartalmaz.

22. Az 1., 3., 4., 5., 8., 14., 15., 16. vagy 17. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban való alkalmazásra szolgáló vizsgálati kit, *azzal jellemezve*, hogy

(A) egy evaneszcens hullámdetektor-berendezés hullámvezetője felszínén rögzített állapotban tartalmaz egy olyan oligonukleotidot, amely a kimutatandó, azo-

nosítandó és/vagy mennyiségileg meghatározandó anyag RNS-ére vagy DNS-ére jellemző oligonukleotidszekvencia egy részével komplementer, és

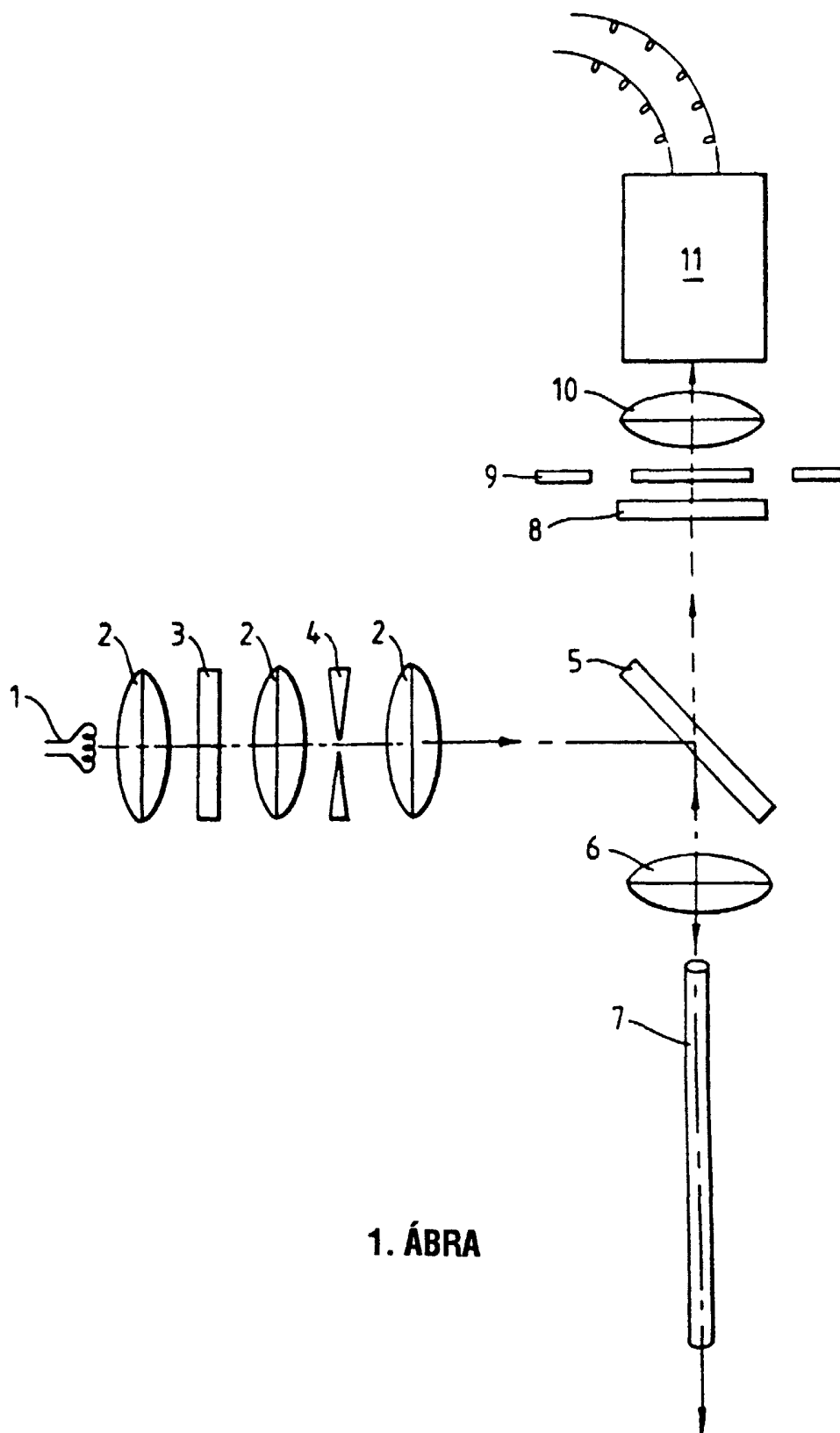
5 (B) egy fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidot, amely a jellemző szekvencia maradékának egészével vagy egy részével komplementer.

23. Az 1., 3., 4., 5., 6., 7., 9., 14., 15., 16. vagy 17. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban való alkalmazásra szolgáló vizsgálati kit, *azzal jellemezve*,
10 hogy

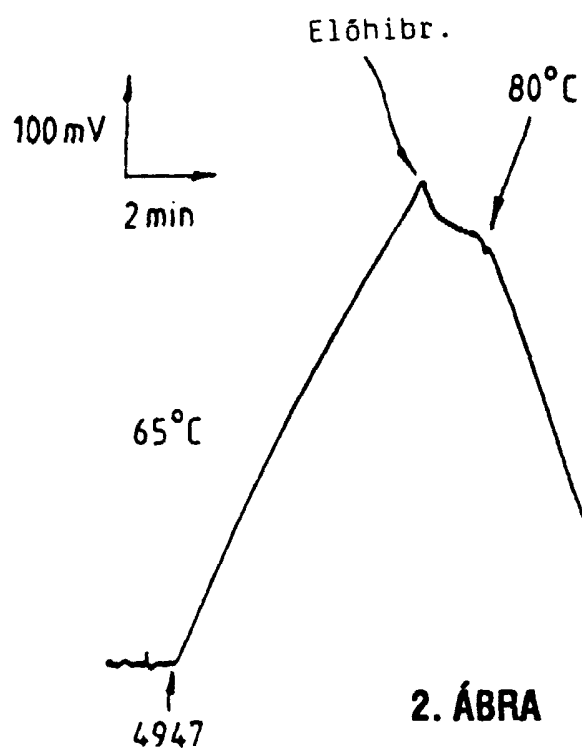
(A) egy evaneszcens hullámdetektor-berendezés hullámvezetője felszínén rögzítetten egy olyan oligonukleotidot tartalmaz, amely a kimutatandó, azonosítandó és/vagy mennyiségileg meghatározandó anyag RNS-ére vagy DNS-ére jellemző oligonukleotidszekvencia egy részével komplementer, és tartalmaz

15 (B) egy fluoreszcencián kimutatható oligonukleotidot, amely a jellemző szekvencia maradékának egészével vagy egy részével azonos.

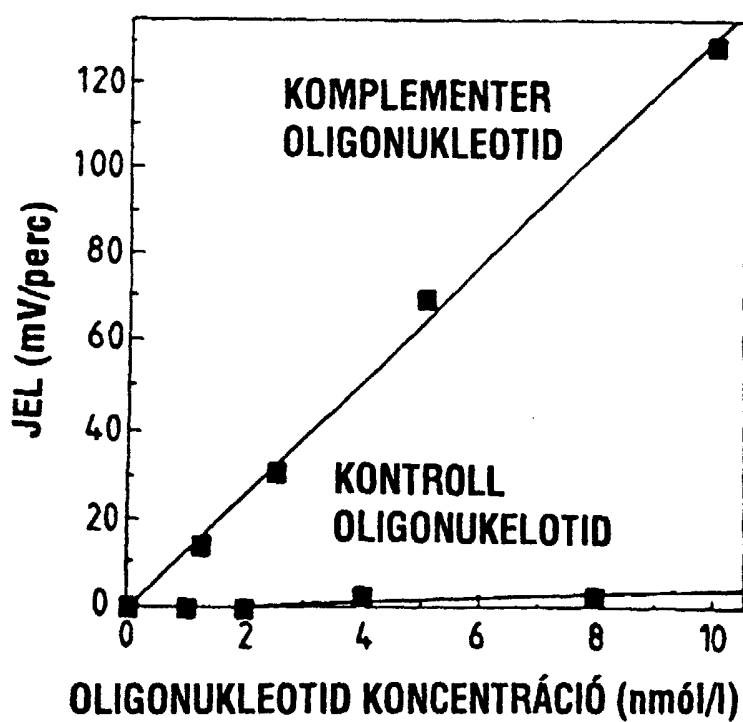
20 24. Az 1–20. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban való alkalmazásra szolgáló vizsgálati kit, *azzal jellemezve*, hogy olyan oligonukleotidokat tartalmaz, amelyek a kimutatandó, azonosítandó és/vagy mennyiségileg meghatározandó anyag RNS-ére vagy DNS-ére jellemző oligonukleotidszekvencia egészével vagy egy részével komplementerek, és ezzel együtt tartalmaz még
25 olyan reagenseket, amelyek a fenti oligonukleotidoknak egy evaneszcens hullámdetektor-berendezés hullámvezetőjén való rögzítéséhez szükségesek.



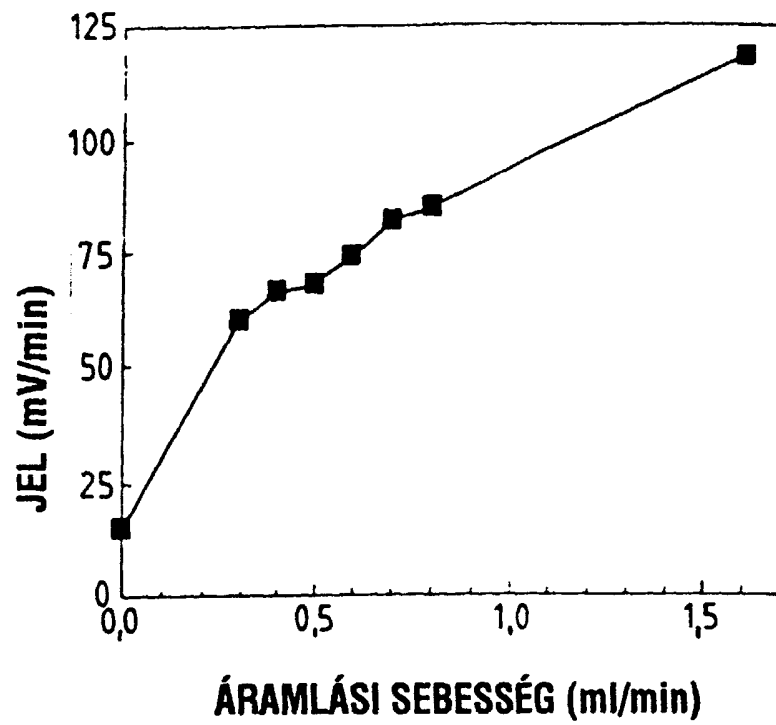
1. ÁBRA



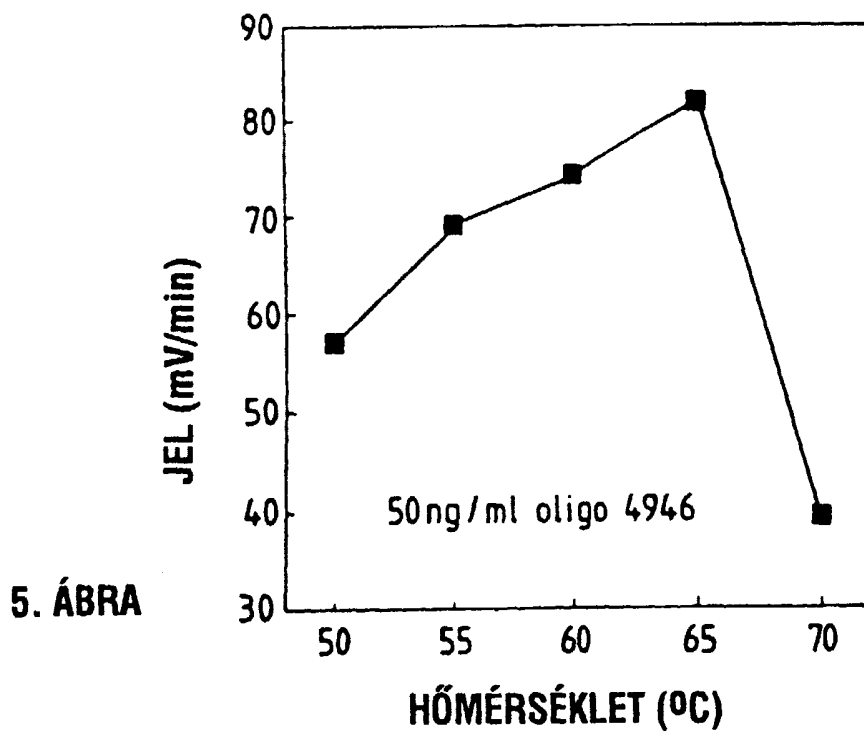
2. ÁBRA



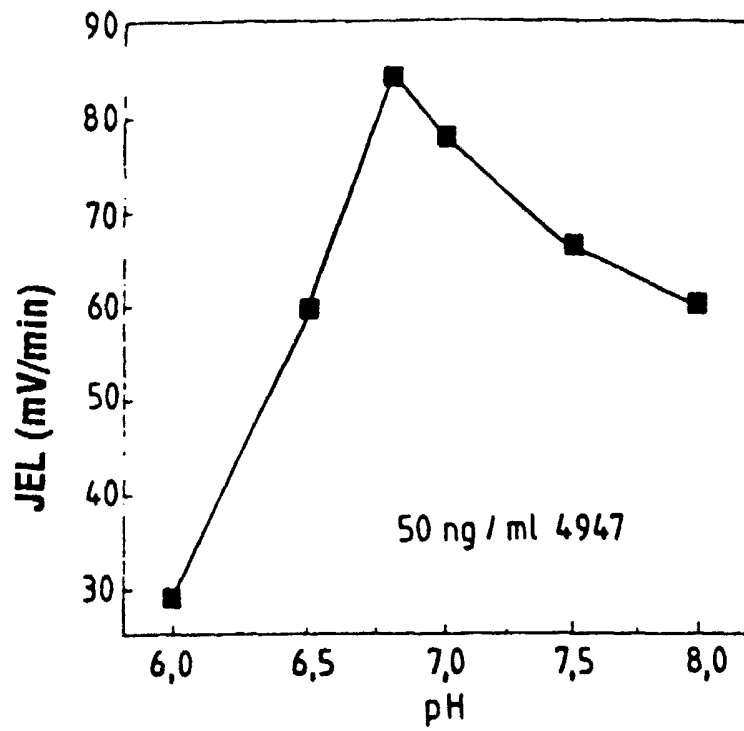
3. ÁBRA



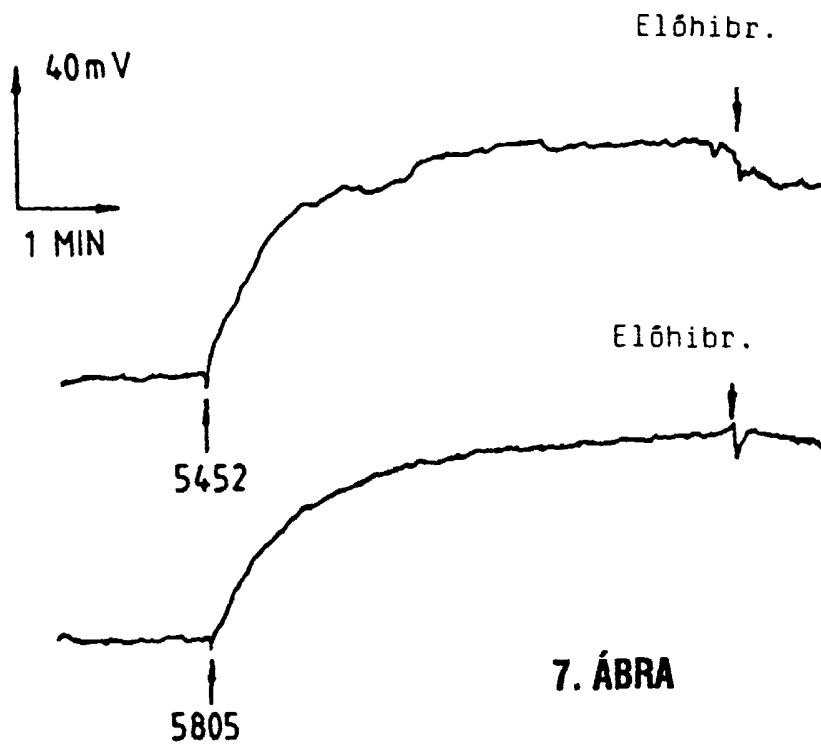
4. ÁBRA



5. ÁBRA



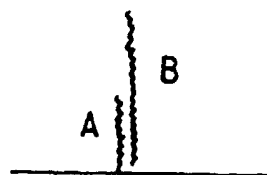
6. ÁBRA



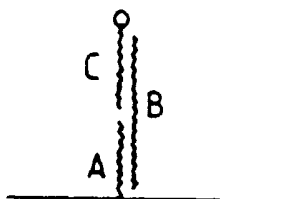
7. ÁBRA



8A.ÁBRA



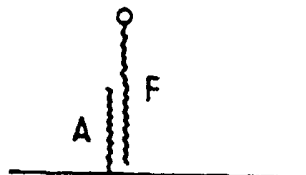
8B.ÁBRA



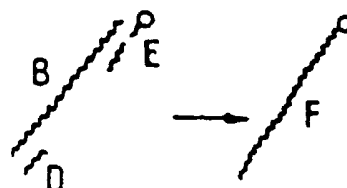
8C.ÁBRA



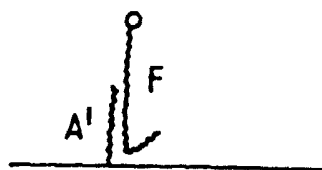
8D.ÁBRA



8F.ÁBRA



8E.ÁBRA



8H.ÁBRA