

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**204 080 B**

(21) A bejelentés száma: 6580/88  
(22) A bejelentés napja: 1988. 12. 22.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
87/5696 1987. 12. 23. FI

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 12 M 1/00**

**C 12 P 19/34**

(40) A közzététel napja: 1989. 12. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1991. 11. 28. SZKV 91/1

(72) Feltalálók:

Kalkkinen, Nisse Erkki Juhani, Espoo (FI)  
Söderlund, Hans Erik, Espoo (FI)

(73) Szabadalmas:

Orion Corporation Ltd., Espoo (FI)

(54)

## Berendezés és eljárás nukleinsavak sokszorozására

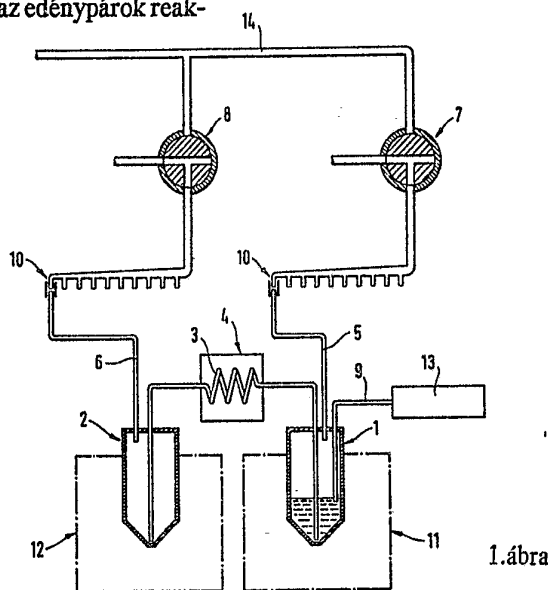
(57) KIVONAT

A találmány tárgya berendezés nukleinsavak amplifikálására, állandósult körülmények között, ahol a berendezés egy vagy több edénypárt alkotó reakcióedényt (1, 2) tartalmaz, amelyeket cső (3) köt össze egymással, valamint az edénypárok reakcióedényeinek (1, 2) hőmérsékletét szabályozó hőmérséklet szabályozót (11, 12) és legalább egy — a folyadékot az egyik reakcióedényből (1 vagy 2) a másik reakcióedénybe (2, vagy 1) átvivő — folyadéktranszfer rendszert tartalmaz.

A folyadéktranszfer rendszer az edénypárok reak-

cióedényeihez (1, 2) vezető gázcsöveket (5, 6) tartalmaz, és a gázcsövek (5, 6) gázáramlást vezérlő szelepekkel (7, 8) vannak ellátva.

A találmány tárgya továbbá eljárás nukleinsavak amplifikálására oly módon, hogy a polimerizációs reakcióhoz szükséges reagenseket és egy egyszálú célnukleinsavat tartalmazó reakcióelegyet különálló reakcióedényekben (1, 2) inkubálják, majd a nukleinsavat melegítéssel denaturálják a reakció optimális hőmérsékletén (1. ábra).



1. ábra

A leírás terjedelme: 5 oldal, 4 ábra

**HU 204 080 B**

A jelen találmány tárgya berendezés és eljárás nukleinsavaknak állandósult körülmények között végzett automatizált amplifikálására. A találmány tárgya továbbá az eljárás során használt eldobható berendezés-rész is.

A nukleinsavak amplifikálását leírják a 4 683 194 sz., a 4 683 195 sz. és a 4 683 202 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, valamint a 200 362 sz., a 229 701 sz. és a 237 362 sz. európai közrebocsátási iratokban is, továbbá a 2 202 328 sz. nagy-britanniai szabadalmi leírásban. Az amplifikálás során a reakcióelegyet, amely a cél-nukleinsavat, a két megfelelő primert, valamint a DNS-polimerázt tartalmazza megfelelő puffer-oldatban, először megfelelő hőmérsékleten inkubálják, hogy a DNS polimerizálódjon. Ezután a polimerizációs reakcióban keletkező kétszálú DNS-t melegítéssel denaturálják, majd a reakcióelegyet olyan hőmérsékletre hűtik vissza, amelyen a primer molekulák újra képesek hibridizálni a cél-DNS-sel. Ha szükséges, akkor a reakcióelegy hőmérsékletét a DNS-polimeráz működéséhez optimális értékre állítják, és DNS-polimerázt adnak hozzá. A leírt lépéseket annyiszor ismételik meg, ahányszor a kívánt eredmény eléréséhez szükséges.

Az amplifikálást általában manuálisan végzik, mégpedig a tesztcsőveket többször átrakva egyik helyről a másikra. A módszer végrehajtása lassú és nehézkes. Ha hőmérsékletváltozásra érzékeny polimerázt használnak, akkor a csöveket időnként ki kell nyitni. Továbbá, hogy homogén reakcióelegyet állítsanak elő, ahhoz az is szükséges, hogy a csövek faláról a hűtési lépésben odakondenzált reakcióelegyet lecentrifugálják. Emiatt nem lehetséges a lépés automatizálása. További hátrány, hogy az ismétlések során a reakciókörülmények nem maradnak szükségszerűen azonosak. Ez problémát jelent, még hőstabil enzim alkalmazása esetén is, mivel a hőstabilitás ellenére a polimeráz könnyen tönkremegy, ha túl hosszú ideig tartják a denaturálás hőmérsékletén.

A 236 069. sz. európai közrebocsátási irat olyan egykamrás berendezést ismertet, amelyben a nukleinsavak amplifikálását számítógépes vezérléssel végzik, a reakcióelegyet ugyanabban az edényben hevítve és hűtve. Ebben a berendezésben azonban csak hőstabil polimeráz használható. A gyakorlatban a hőstabil polimeráz csak néhány reakcióciklus során marad aktív. Ugyanis problematikus egy reakcióelegyet pontosan a megfelelő sebességgel fűteni és hűteni, mivel a reaktor és a benne lévő reakcióelegy hőmérséklete mellett, a környező berendezés hőmérsékletét is be kell állítani. A környező berendezés vagy annak egy részének hőkapacitása összemérhető a kistérfogatú (körülbelül 100 mikroliter) reakcióelegy hőkapacitásával. Ezért könnyen előfordul, hogy a reakcióelegy túl hosszú ideig marad az amplifikáláshoz előnytelen hőmérsékleten. Különösen a denaturálás hőmérsékletének és időtartamának szabályozása jelent problémát. Ha a hőmérséklet túl alacsony, akkor a denaturálás nem fog az amplifikáláshoz szükséges mértékben végbemenni. Másrészt viszont, ha a polimeráznak kell túl hosszú

ideig a denaturálás hőmérsékletén lenni, akkor tönkremegy.

A jelen találmány tárgya berendezés és eljárás a fent említett hátrányok kiküszöbölésére. A jelen találmány szerinti berendezést használva lehetővé válik, hogy teljesen önműködően, kezelőt igénylő külön lépések nélkül, egy vagy több nukleinsav amplifikálását egyszerre, állandósított (standardizált), előírt reakciókörülmény között végrehajthassuk.

A találmány szerinti kétkamrás berendezésben eleendő pontossággal és sebességgel lehet a helyes denaturálási hőmérsékletet és időtartamot szabályozni. A találmány szerinti módszer és berendezés használható nukleinsavak amplifikálására, tekintet nélkül arra, hogy a használt polimeráz hőstabil-e vagy sem.

A találmány tárgya eljárás nukleinsavak amplifikálására, amely során a polimerizálás végrehajtására egy vagy több egyláncú cél-nukleinsavat, megfelelő primereket, dezoxinukleotid-trifoszfátokat és DNS-polimerázt megfelelő puffer-oldatban tartalmazó reakcióelegyet inkubálunk egy reakcióedényben, majd a reakcióelegyet megfelelő eljárással átvisszük egy másik reakcióedénybe a nukleinsavak denaturálása céljából, majd a denaturálás után ebből a reakcióedényből a reakcióelegyet visszavisszük az eredeti reakcióedénybe, megfelelő eljárást alkalmazva. Az amplifikáló berendezést úgy szabályozzuk, hogy azt reakcióedényt, amelyben a nukleinsav polimerizációja lezajlik, a hőmérsékletet a polimerizáló enzimek működéséhez szükséges optimális hőmérsékleten tartjuk; míg azt a reakcióedényt, amelyben a denaturálást véghezvük, a denaturáláshoz szükséges optimális hőmérsékleten tartjuk. A reakcióelegyet a denaturáló edényből a polimerizáló edénybe egy hőcserélőn keresztül juttatjuk. A hőcserélőben a denaturált reakcióelegyet előnyösen olyan hőmérsékletre hűtjük, amelyen a primerek képesek a cél-DNS-sel hibridizálni.

A találmány tárgya továbbá berendezés az eljárás kivitelezésére. A berendezés egy vagy több, előnyösen párban elhelyezett reakcióedényeket tartalmaz. Az edénypár két olyan reakcióedényből áll, amelyek egymással egy vagy több csővel vannak összekötve az összeköttetés létrehozására.

A berendezést elláthatjuk külön hőcserélővel is, amelyen a csövek közül legalább az egyik keresztülmelegy, vagy maga a cső is lehet ilyen hőcserélő. Minden egyes reakcióedény hőmérsékletszabályozóval van ellátva, amely például egy termosztáttal ellátott fűtőblokk lehet. A berendezés tartalmazhat ezenkívül egy folyadéktranszfer rendszert, a reakcióelegynek az egyik reakcióedényből a másikba való átjuttatására. Azt a reakcióedényt, amelyben a polimerizáció lejátszódik, megfelelő adagoló berendezéssel láthatjuk el a DNS-polimeráz és/vagy a reagensek hozzáadása céljából.

A találmány szerinti eljárást és berendezést a következő ábrákon mutatjuk be részletesen, ahol az

1. ábra a találmány szerinti berendezés általános elvét mutatja be a polimerizációs lépések ismertetése során, a

2. ábra azt a berendezés elrendezést szemlélteti, amelyben a folyadékot abba a reakcióedénybe visszük át, amelyben a DNS-polimeráz denaturálása lejátsszódik,
3. ábra a DNS-polimeráz denaturáló lépését mutatja be a berendezésben, végül
4. ábra azt a lépést mutatja be a berendezésben, amelyben a folyadékot abba a reakcióedénybe visszük át, amelyben a polimerizációs reakció lejátsszódik.

Az 1. ábra egy előnyös megvalósítási módot ismerteti, amelyben a reakcióelegy az 1 reakcióedényben van, amelyben a polimerizációs reakció lejátsszódik. A 3 cső vezet az első 1 reakcióedényből a második 2 reakcióedénybe. A 3 cső előnyösen tefloncső, amelynek belső átmérője 0,3–0,5 mm. A 3 csővel kapcsolatban lehet egy 4 hőcserélő. A 4 hőcserélőt lehet helyettesíteni egyszerűen azzal, hogy megnöveljük a 3 cső hosszát. Az 1 és 2 reakcióedények légmentesen zárnak. A 3 cső végének minden 1, 2 reakcióedényben az edényfenékig kell érnie, hogy a teljes folyadékmenyiséget át tudjuk vinni a 3 csővön keresztül a másik 1 vagy 2 reakcióedénybe. Emiatt előnyös az 1, 2 reakcióedény fenekének egy lefelé domborodó formát adni, hogy a folyadék a fenék legalacsonyabb pontja felé folyjon. Az természetesen előnyös, ha a 3 cső végét a mélyedés aljára helyezzük. Az 1 és 2 reakcióedényekhez 5 és 6 gázcsövek vezetnek még egy-egy 10 gázelosztó közbeiktatásával. Ezek az 5, 6 gázcsövek pedig mikroprocesszorral vezérelt 7, 8 szelepekből felépített szeleprendszerhez kapcsolódnak, például az 1. ábrán látható 7 és 8 szelepek háromállású elektromágneses szelepek. Az megoldható, hogy ha szükség van rá, hogy miközben a gázt az egyik, pl. 1 reakcióedényhez a 7 szelepen keresztül áramoltatjuk, aközben a másik, pl. 2 reakcióedényhez vezető 6 gázcső 8 szelepét lezárjuk acélból, hogy a fölösleges gáz kiáramolhasson a környező levegőbe és ezáltal lehetőségessé váljon a folyadék átáramlása az egyik, 1 reakcióedényből a másikba. Az alkalmazható gáz inert gáz, például nitrogén vagy argon.

Egy 13 adagoló berendezésen, és a 13 adagoló berendezéshez kapcsolódó 9 csővön keresztül szükség esetén lehetséges még DNS-polimerázt vagy más reagenst adagolni az 1 reakcióedénybe. Ha egyszer egymással párhuzamosan több mintát amplifikálunk, akkor az 1 és 2 reakcióedényekből felépülő hasonló edénypárokat az 5 és 6 gázcsöveken keresztül a 10 gázelosztókhoz kapcsoljuk, amely a megfelelő gázmenyiséget a 7 és 8 szelepekhez eljuttatja.

Az 1. ábrán a polimerizációs reakció lejátsszódik le éppen, a 7 és 8 szelepek az 5 és 6 gázvezetékek irányába zárva vannak, ugyanakkor a külső légtér felé nyitva vannak. Egy 11 hőmérsékletszabályozó segítségével az 1 reakcióedényt a polimerizáció számára optimális hőmérsékleten tartjuk.

A 2. ábrán a polimerizációs reakció lejátsszódása után a reakcióelegyet a 3 csővön keresztül átjuttatjuk az 1 reakcióedényből a 2 reakcióedénybe, az 1 reakcióedénybe az 5 gázcsővön keresztül belépő gáz nyo-

másának felhasználásával. Így a 7 szelep átvált a gázt átvezető helyzetébe, lehetővé téve, hogy a gáz az 5 csővől beáramoljon az 1 reakcióedénybe. A 8 szelep ugyanakkor lezárja a gázbevezetést a 6 gázcsőve, és kinyitja a kivezető nyílását, hogy a fölös gáz kiáramoljon. A gáznyomás előnyösen 0,1–1,0 bar értékű.

A 3. ábrán a denaturálás lejátsszódik le a 2 reakcióedényben, amelynek hőmérsékletét a 12 hőmérsékletszabályozóval a megfelelő értékre állítjuk be. Mind a 7, mind a 8 szelepek gázáramlást lezáró helyzetbe kerülnek, így a folyadék nem juthat át az egyik 1 vagy 2 reakcióedényből a másikba.

A 4. ábra szerint pedig a reakcióelegyet visszajuttatjuk a 2 reakcióedényből az 1 reakcióedénybe. A 8 szelep ekkor nyitva van az elosztó 14 gázcső és a 6 gázcsővön keresztül a 2 reakcióedénybe. A gáznyomása alatt a folyadék átáramlik az 1 reakcióedénybe. Az átáramoltatást előnyösen olyan sebességgel folytatjuk le, hogy legyen idő a hibridizációs reakció lejátsszódására. A 7 szelep kinyílik, így a fölösleges gáz kiáramolhat, hogy helyet adjon az 1 reakcióedénybe áramló folyadéknak. Ha szükséges, DNS-polimerázt adagolhatunk még a 9 csővön keresztül.

Az 1–4. ábrákon bemutatott lépéseket többször meg lehet ismételni mikroprocesszoros vezérléssel, így az amplifikálás automatikusan lejátsszódik.

A találmány semmilyen módon nem korlátozódik a fentiekben leírt és az 1–4. ábrákon bemutatott, előnyös megvalósítási módra, számos más variáció lehetséges a kivitelezésre. A fent leírt berendezésben például vákuumot is alkalmazhatunk megnövelt gáznyomás helyett, így a folyadékot a szívóhatás viszi át az egyik 1 vagy 2 reakcióedényből a másikba. Kivitelezhető tehát egy olyan amplifikáló berendezés is, amelyben a folyadék áramoltatását vákuummal hozzuk létre. A reakcióelegyet átjuttathatjuk az egyik, pl. 1 reakcióedényből a másik pl. a 2 reakcióedénybe folyadékszivattyú segítségével. Ebben az esetben az 5 és 6 gázcsövekre nincs szükség. Lehetséges például megfordítható áramlási irányú szivattyú használata is, és ekkor az 1 és 2 reakcióedények között csak a 3 csőre van szükség. A nukleinsavak fenti amplifikálását ribonukleinsavról reverz transzkriptáz enzimmel kapott komplementer DNS-sel is elvégezhetjük.

A találmány szerinti berendezés egy olyan további, lehetséges kiviteli alakot tartalmaz, amelynél az 1 vagy 2 reakcióedények és az azokat összekötő 3 cső egy eldobható berendezésrészte képez. A 3 cső előnyösen üvegből készül. Egyébként a berendezés ezzel az eldobható berendezésrészlettel ugyanúgy alkalmazható az eljárás foganatosítására, ahogy azt a korábbiakban leírtuk.

Az amplifikáló reakciók sorozata előnyösen az 1. ábrán bemutatott lépéssel indul, azaz az amplifikáláshoz szükséges reagenseket és az egyszálú cél-nukleinsavat a DNS-polimeráz működéséhez optimális hőmérsékleten tartjuk és inkubáljuk. Ha a cél-nukleinsav eredetileg kétszálú, akkor az első lépés előtt egyszálúvá kell tenni. Az természetesen lehetséges, hogy az amplifikáló berendezést használjuk a cél-nuklein-

sav denaturálására, ebben az esetben az egész reakció-sorozat a 3. ábrán bemutatott lépéssel indul. Denaturálásnál általában előnyös hosszabb időt felhasználni, mint az amplifikálás során.

A reakciósorozatban alkalmazott optimális hőmérsékletet és időtartamot a cél-nukleinsav, valamint a használt primer és DNS-polimeráz alapján határozzuk meg. A területen jártas szakember maga is képes beállítani a berendezést, és kiválasztani az adott időpontban végrehajtandó amplifikáló reakciónak megfelelő körülményeket.

Számos különböző eljárás lehetséges, a DNS-polimeráz hozzáadásától függően. Az enzimet lehet folyamatosan vagy megszakításokkal juttatni abba az 1 vagy 2 reakcióedénybe, amelyben a polimerizációs reakció lejátszódik. Ha hőstabil enzimet használunk, akkor azt a reakció legelején beletesszük a reakcióedénybe, és azután csak szükség esetén pótoljuk. Nem szükséges további enzim hozzáadása, ha azt immobilizált formában vagy lassan felszabaduló formában vittük a reakcióedénybe. Ha az enzim immobilizálva van, akkor természetesen nem távozik a reakcióedényből. Ha a lassan felszabaduló formát használjuk, akkor fontos, hogy a DNS-polimeráz felszabadulását úgy szabályozzuk, hogy koncentrációja megfelelő maradjon a szükséges számú reakcióciklusok során.

A 4 hőcserélő hőmérsékletét a használt primer hossza és nukleotid sorrendje alapján határozzuk meg. Ha a primer hibridizációs hőmérséklete lényegesen különbözik a polimerizációs enzim optimális hőmérsékletétől, akkor a reakcióedény hőmérsékletét előnyösen úgy szabályozzuk, hogy a primernek legyen ideje hibridizálni már a 4 hőcserélőben. A polimerizációs enzim hőstabilitását is figyelembe vehetjük a 4 hőcserélő szabályozásánál, biztosítva, hogy a reakcióedény megfelelő mértékben lehűljön, mielőtt kapcsolatba kerül az enzimmel. A denaturált nukleinsavat tartalmazó oldat retenciós idejét a 4 hőcserélőben a 3 cső hosszúságával, valamint a denaturáló 1 vagy 2 reakcióedénybe bevezetett gáz nyomásával szabályozhatjuk, vagy ennek megfelelően a vákuum vagy a folyadékcszivattyú hatékonyságának változtatásával.

## SZABADALMIIGÉNYPONTOK

1. Berendezés nukleinsavak amplifikálására, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több edénypárt alkotó reakcióedényt (1, 2) tartalmaz, amelyeket cső (3) köt össze egymással, valamint az edénypárok reakcióedényeinek (1, 2) hőmérsékletét szabályozó hőmérsékletszabályozót (11, 12) és legalább egy — a folyadékot az egyik reakcióedényből (1 vagy 2) a másik reakcióedénybe (2 vagy 1) átvívó — folyadéktranszfer rendszert tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a folyadéktranszfer rendszer az edénypárok reakcióedényeihez (1, 2) vezető gázcsöveket (5, 6) tartalmaz, és a gázcsövek (5, 6) a gázáramlást vezérlő szelepekkel (7, 8) vannak ellátva.

2. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jelle-*

*mezve*, hogy egy — a reagensek és/vagy minták hozzáadása és kivételére szolgáló — adagoló berendezést (13) és az adagoló berendezéshez (13) kapcsolódó csövet (9) tartalmaz.

5 4. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióedényeket (1, 2) összekötő cső (3) egy hőcserélőn (4) van keresztülvezetve.

5 5. A 2. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a szelepek (7, 8) mikroprocesszor által vezéreltek.

10 6. A 2. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a gázcsövek (5, 6) gázelosztókhoz (10) kapcsolódnak, a gázelosztók (10) egy elosztó gázcsővel (14) vezérlő szelepek (7, 8) útján vannak összekötve.

15 7. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióedényeket (1, 2) összekötő cső (3) teljesen a reakcióedények (1, 2) aljáig leérő cső.

20 8. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy minden egyes reakcióedénynek (1, 2) az alja lefelé domború kialakítású.

20 9. A 4. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a reagenst adagoló berendezés (13) egy folyamatosan üzemelő berendezés.

25 10. A 4. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a reagenst adagoló berendezés (13) időszakosan működő berendezés.

30 11. A 2. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióedényeket (1, 2) tartalmazó edénypár, valamint a reakcióedényeket (1, 2) összekötő cső (3) egy eldobható berendezésrészt képez.

30 12. Eljárás nukleinsavak amplifikálására, ahol a következő eljárási lépéseket hajtjuk végre az alábbi sorrendben:

35 (i) a polimerizációs reakcióhoz szükséges megfelelő primereket, dezoxinukleotid-trifoszfátokat, DNS-polimerázt és egy egyszálú cél-nukleinsavat megfelelő puffer-oldatban tartalmazó reakcióedényet inkubálunk,

(ii) a reakcióedényben jelenlévő bármely nukleinsavat melegítéssel denaturáljuk,

40 (iii) a reakcióedényet hűtjük,

(iv) ha szükséges, DNS-polimerázt adunk hozzá,

(v) ugyanazt a reakcióciklust ismételtük az adott esetben szükséges alkalommal,

45 *azzal jellemezve*, hogy az (i) és (ii) lépéseket külön reakcióedényekben n(1, 2) hajtjuk végre a reakció optimális hőmérsékletén.

50 13. A 12. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a denaturált nukleinsavat lehűtjük mielőtt abba a reakcióedénybe visszük, amelyben a polimerizáció történik.

50 14. A 12. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióedényeket egyik reakcióedényből a másikba gáznyomással visszük át.

55 15. A 12. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a (iv) lépésben a DNS-polimerázt folyamatosan adagoljuk.

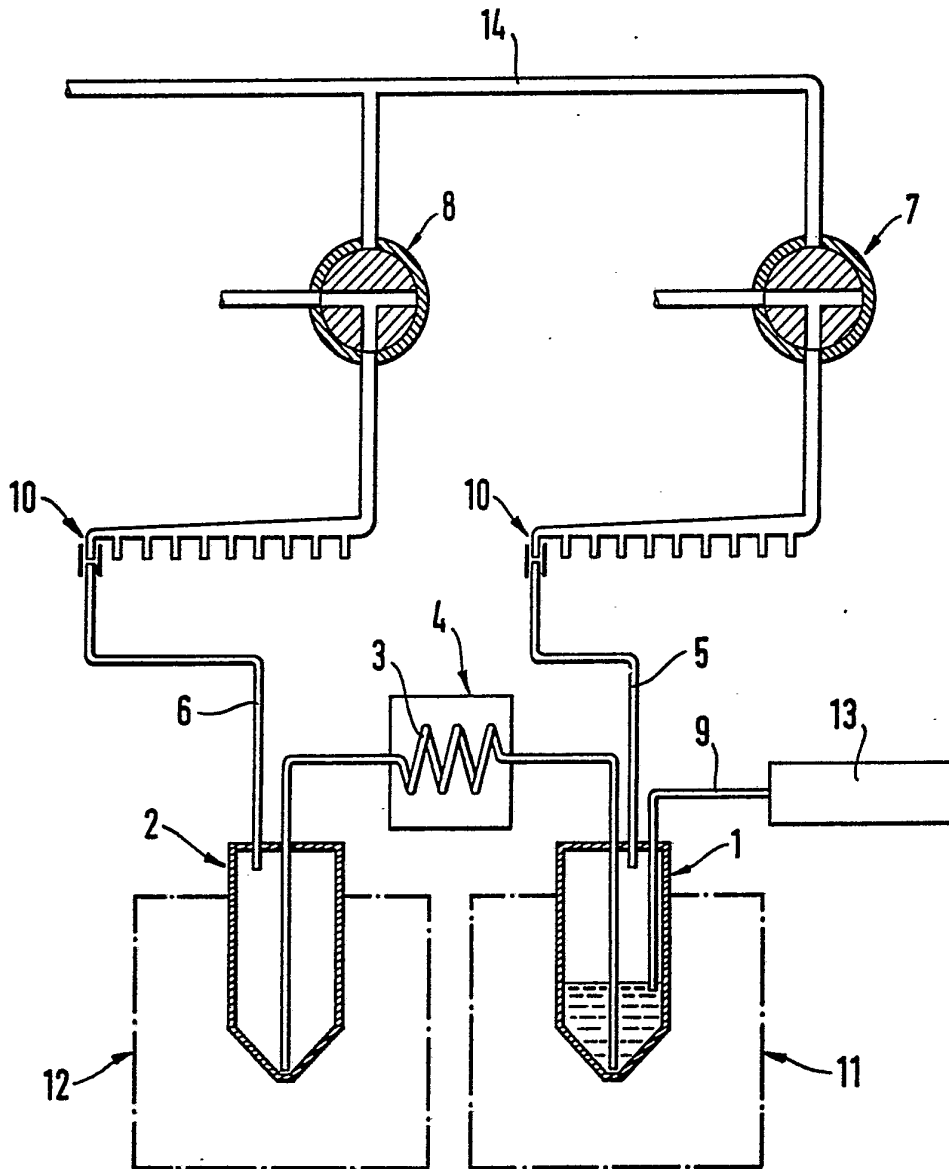
55 16. A 12. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a (iv) lépésben a DNS polimerázt szakaszosan adagoljuk.

60 17. A 12. igénypont szerinti berendezés, *azzal jelle-*

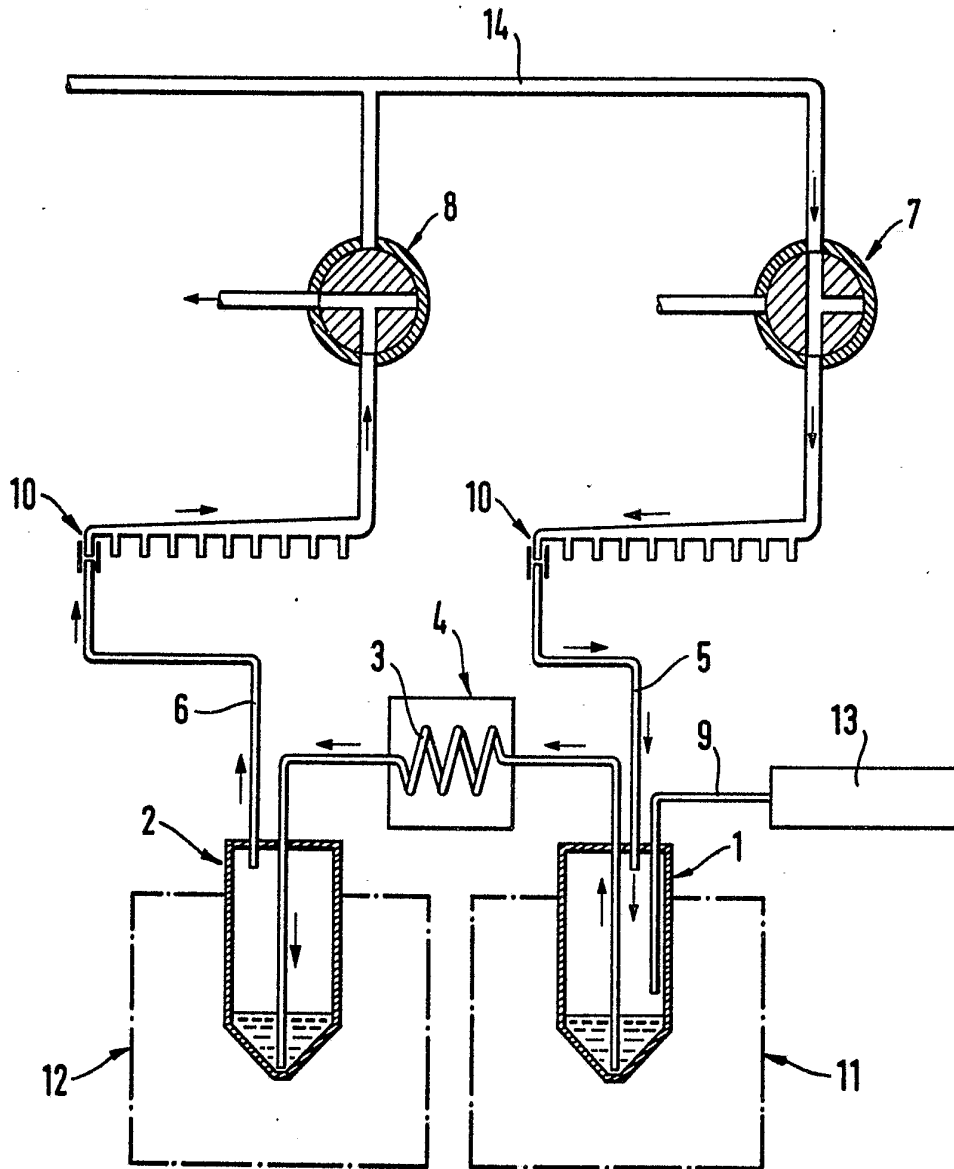
*mezve, hogy a (i) lépésben a reakcióedényben a DNS-polimeráz immobilizált formában van jelen.*

*18. A 12. igénypont szerinti berendezés, azzal jelle-*

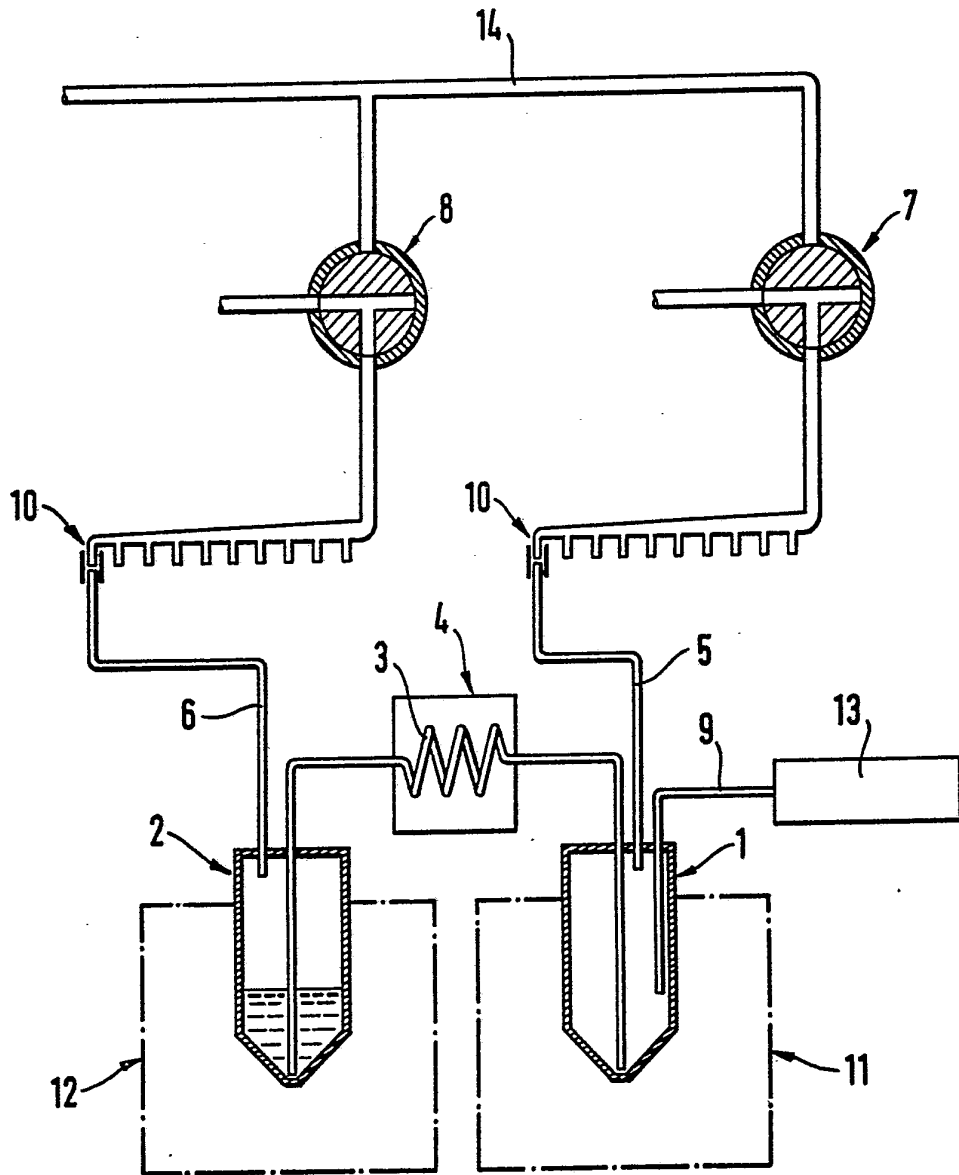
*mezve, hogy az (i) lépésben a reakcióedényben a DNS-polimeráz lassan felszabaduló formában van jelen.*



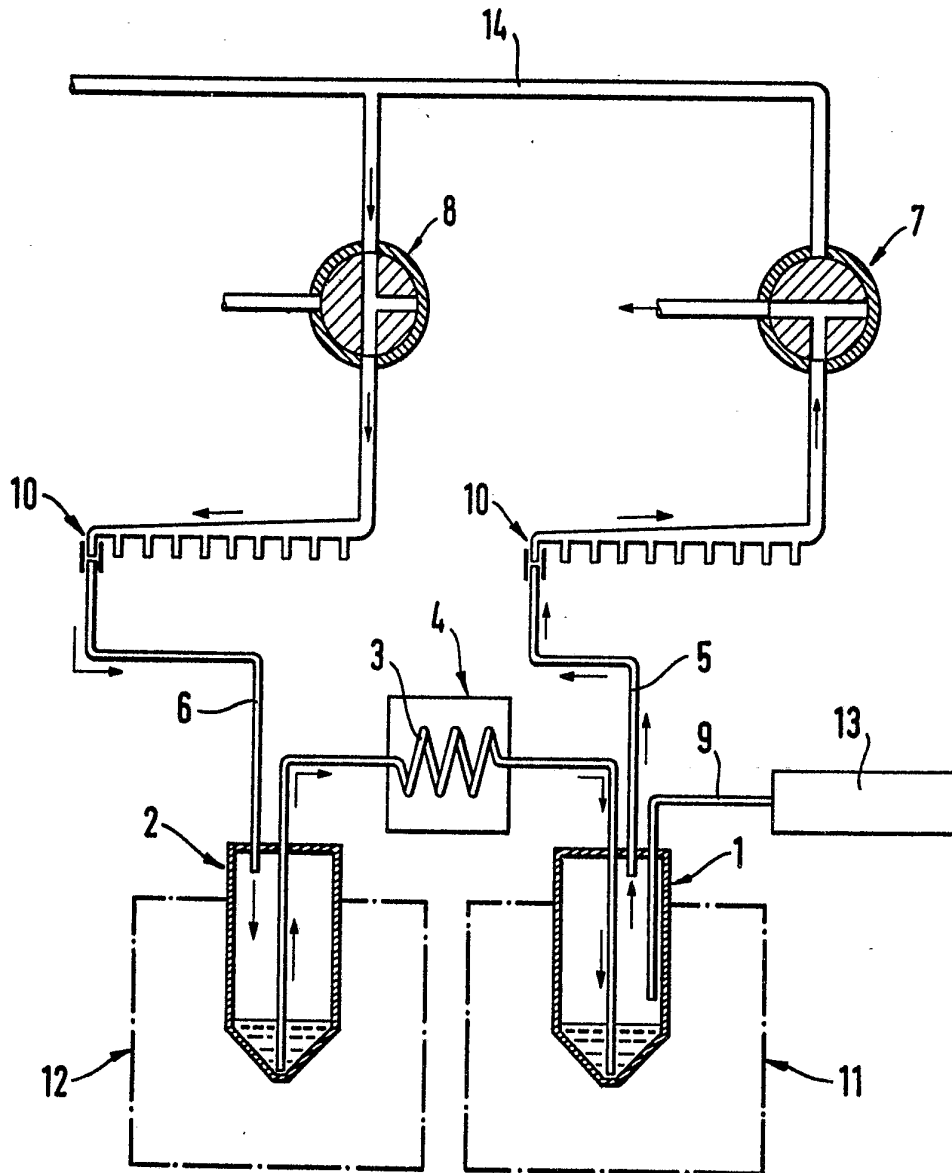
1. ábra



2. ábra



**3. ábra**



4. ábra