



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT**

82988

C (12) Patentansökningsbeskrivning
Inte meddelad enligt 10:10 10:05 10:01

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

G 01N 33/569, C 12Q 1/64

(21) Patentihakemus - Patentansökning	852673
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	05.07.85
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	05.07.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	07.01.86
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.91
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
06.07.84 US 628310 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Becton, Dickinson and Company, Mack Centre Drive, Paramus, N.J., USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Rose, Phillip Stephen, 9127 Kilbribe Rose, Baltimore, Md., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä Chlamydia trachomatiksesta saatujen mikrobiproteiinien valmistamiseksi
immunomääritystä varten
Förfarande för framställning av mikrobproteiner, som erhållits ur Chlamydia trachomatis,
för immunologiska bestämningar**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 59624 (C 12P 21/00),
Analytical Biochemistry vol. 100 (1979) p. 64-69

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää näytteen preparoimiseksi immuunitutkimusta varten, jossa menetelmässä mikrobiproteiini liuotetaan detergentin avulla korotetussa lämpötilassa ja alkali- tai maa-alkalimetalli-ionin läsnäollessa. Detergentti liukenee korotetussa lämpötilassa. Metallionin läsnäolo tekee detergentistä kuitenkin alemmissa lämpötiloissa liukenemattoman, niin että sen häiriövaikutus immuunitutkimukselle estetään. Eräs erityissovellus on Chlamydia trachomatisin ulomman kalvon pääproteiinin liuottaminen.

Uppfinningen avser ett förfarande för preparering av ett prov för immunanalys, i vilket förfarande ett mikrobprotein löses med hjälp av en detergent vid förhöjd temperatur och i närvaro av en alkali- eller jordalkalimetalljon. Vid förhöjd temperatur löser sig detergenten. Närvaron av metalljonen gör emellertid detergenten olöslig vid lägre temperaturer så att dess störande inverkan på immunanalysen förhindras. En specialtillämpning är lösandet av huvudproteinet i den yttre membran hos Chlamydia trachomatis.

Menetelmä Chlamydia trachomatiksesta saatujen mikrobiproteiinien valmistamiseksi immunomääritystä varten

5 Tämä keksintö koskee menetelmää Chlamydia trachomatiksesta saatujen mikrobiproteiinien valmistamiseksi immunomääritystä varten. Toisin sanoen keksintö koskee detergenttien käyttö proteiinin liuottamiseen proteiinien antigeenisten ominaisuuksien esille saamiseksi hävittämättä mahdollisuutta havaita proteiiniantigeeni immunomäärityksessä.

10 Detergentit on pitkään tiedetty reagensseiksi, joilla voidaan liuottaa monia biokemiallisia aineita, erityisesti mikrobien proteiineja ja proteiinikompekseja. Tämä mahdollisuus on hyödyllinen proteiinien antigeenien, jotka sitten voidaan havaita immunomääritysmenetelmin, vapauttamiseksi tai paljastamiseksi. Antigeeniliuoksessa oleva detergentti kuitenkin estää immunomäärityksen estämällä antigeenin sitoutumisen kiinteään faasiin immobilisoituun vasta-aineeseen. Tähän mennessä ei ole ollut saatavana käytännöllistä, halpaa menetelmää tämän detergentin haitallisen vaikutuksen estämiseksi immunomäärityksessä. Se, että näytettä yksinkertaisesti laimennetaan, on epätyytyttävää. Jos esimerkiksi immunomääritysnäytettä laimennetaan liuotuksen jälkeen siten, että detergenttipitoisuus ei enää haittaa määrittystä, johtaa samalla tapahtuva antigeenipitoisuuden aleneminen antigeenitasoon, joka on tutkimuksen havaitsemisrajan alapuolella. Myöskään antigeenin alkupitoisuuden nostaminen immunomääritysnäytteessä sellaiseksi, että antigeenipitoisuus näytteen laimennuksen jälkeen on havaittavuusrajan yläpuolella, ei useinkaan ole käytännössä mahdollista, koska näytteet ovat usein väistämättä pieniä. Siten alalla on tarve saada aikaan menetelmä proteiinien liuottamiseksi detergentin avulla, joka menetelmä ei samanaikaisesti estä immunomäärityksiä.

15
20
25
30
35

Erityissovellutus, johon detergenttejä voidaan menestyksellisesti käyttää, on Chlamydia trachomatisin ulomman kalvon pääproteiinin liuotus. Tämä mikro-organismi on toinen luokan Chlamydiales heimon Chlamydiaceae kahdesta lajista. Toinen laji on Chlamydia psittaci. Chlamydia trachomatisin suunnilleen 15 eri kantaa ovat etiologisia agensseja joukolle ihmisen silmä- ja genitaal sairauksia, trakooma, sulkeumasidekalvontulehdus, lokeronivusajos, "epäspesifinen" eli nongonokokkaalinen virtsaputkentulehdus ja peräsuolentulehdus mukaan luettuina. C. trachomatis-infektio on levinnyt koko ihmisyyhteisöön. On arvioitu, että C. trachomatis on esimerkiksi syynä useisiin miljooniin nongonokokkaalisiin virtsaputkentulehdustapauksiin vuosittain.

Koska C. trachomatisin aiheuttamat sairaudet ovat laajalle levinneitä, on luotettava, yksinkertainen ja halpa testi tämän organismin läsnäolon toteamiseksi hyvin toivottava, jotta voitaisiin ryhtyä asianmukaiseen hoitoon. Ainoa nykyään käytössä oleva serologinen testi on mikroimmunofluoresenssitesti. Tämä testi vaatii kuitenkin C. trachomatis -kantojen käyttöä serologisen testin antigeenina. Valmiuksia tämän testin tekemiseksi on lisäksi vain rajoitetussa määrässä laboratorioita koko maailmassa. Testi on hyvin työläs, aikaavievä ja vaikea suorittaa.

Tämä keksintö koskee menetelmää näytteen preparoimiseksi immunomääritystä varten ja se on erityisen käyttökelpoinen mikrobisoluproteiininäytteiden, kuten Chlamydia trachomatisin ulomman kalvon pääproteiininäytteiden preparoimiseen. On havaittu, että tämä nimenomainen proteiini on lajispesifinen antigeeni ja siten käyttökelpoinen immunomäärityksessä tämän organismin läsnäolon toteamiseksi infektoituneessa yksilössä.

Ennen kuin organismien, kuten C. trachomatisin soluproteiineja voidaan käyttää immunomäärityksessä, tulee

proteiinia sisältävää soluseinää muuttaa sillä tavalla, että asianmukainen vasta-aine tunnistaa proteiinin. Detergenttikäsittely on havaittu tehokkaaksi tähän tarkoitukseen. Erityisen arvokkaita soluseinäproteiinin liuottamisessa ovat ionittoman detergentin lauryylisulfaatin suolat. Detergentin myöhemmin tehtävälle immunomääritykselle aiheuttaman häiriön estämiseksi tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä sisällytetään alkali- tai maa-alkalimetallionia detergenttiliuokseen. Detergentti on liukenevaa korkeissa lämpötiloissa tällaisten ionien läsnäollessa. Alemmissa lämpötiloissa, kuten huoneenlämpötilassa, detergentti saostuu ja voidaan mahdollisesti poistaa ennen immuunitutkimuksen tekemistä.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että sekoitetaan Chlamydia trachomatikesta saatu mikrobi-proteiininäyte vesiliuokseen, joka sisältää proteiinin liuottavan määrän ionista detergenttiä, jolla on alkali- tai maa-alkalimetalli-ioni kationina näyteliuoksen saamiseksi; inkuboidaan näytettä korotetussa lämpötilassa riittävän pitkään proteiinin liuottamiseksi; ja jäädytetään näyteliuos yhdisteen, jossa on alkali- tai maa-alkalimetalli-ioni kationina, läsnäollessa, joka yhdiste toimii lämpötilasta riippuvana saostavana yhdisteenä, joka siten saa aikaan detergentin saostumisen liuoksesta huoneenlämpötilassa tai hieman sen yläpuolella, mutta ei vaikuta detergentin liukoisuuteen korotetuissa lämpötiloissa, yhdisteen kationin ollessa eri kuin detergentin kationi.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään lämpötilasta riippuvaa saostusainetta proteiinin saostavan detergenttimäärän poistamiseen immunomääritysnäytteestä. Detergentit ovat hyvin tehokkaita proteiinia liuottavia aineita, erityisesti mikrobisoluproteiineille, kuten Chlamydia trachomatisin ulomman kalvon pääproteiinille. Koska detergentit kuitenkin häiritsevät immunomääritystä estämällä antigeenin sitoutumisen, täytyy ne poistaa näyteliu-

oksesta ennen tutkimuksen tekemistä.

On havaittu, että kun näyteliuokseen sisällytetään yhdistettä, joka sisältää alkali- tai maa-alkalimetallionia, alenee detergentin, kuten lauryylisulfaatin, liukoisuus veteen suuresti huoneenlämpötilassa tai vähän sen yläpuolella (ts. noin 30 °C:ssa tai sen alapuolella), mutta vaikutus liukoisuuteen on pieni tai olematon korotetuissa lämpötiloissa. Koska näillä yhdisteillä on kyky saada aikaan detergentin lämpötilasta riippuvainen saostuminen, kutsutaan niitä joskus tästedes saostaviksi yhdisteiksi. On ymmärrettävä, ettei tämä tarkoita sitä, että yhdisteet itse saostavat detergentin, vaan sitä, että ne vain saavat aikaan saostumisen. Alkali- ja maa-alkalimetalleilla tarkoitetaan alkuaineiden jaksollisen järjestelmän ryhmien I ja II alkuaineita, joihin kuuluvat muiden muassa litium, natrium, kalium, magnesium, kalsium ja barium. Siten voidaan esimerkiksi natrium- tai litiumlauryylisulfaatin ja kaliumionin vesiliuosta käyttää mikroproteiinin liuottamiseen korotetussa lämpötilassa. Liuos jäähdytetään sitten suunnilleen huoneenlämpötilaan tai vähän sen yläpuolelle, mikä saa aikaan detergentin saostumisen. Detergentti voidaan mahdollisesti poistaa sentrifugoimalla tai suodattamalla. Poistettiinpa saostunut detergentti tai ei, tehdään immunomääritys sitten proteiininäytteestä detergentin häiritsemättä. Koska saostavalla yhdisteellä ei ole mitään osaa keksinnössä ennen jäähdytysvaihetta, se voidaan lisätä liuokseen proteiinin liuotuksen jälkeen alussa tapahtuvan detergenttiin yhdistämisen sijasta.

Soveltuviin detergentteihin keksinnön yhteydessä käytettäviksi kuuluvat lauryylisulfaatit, kuten natriumdodekyylisulfaatti ja litiumdodekyylisulfaatti. Detergenttiä on liuoksessa yleensä läsnä pitoisuutena noin 0,01 - 2,0 % (paino/tilavuus). Pitoisuus on mielellään noin 0,01 - 1,0 % (paino/tilavuus), edullisesti noin 0,05 -

0,1 % (paino/tilavuus).

Saostavaa yhdistettä on läsnä liuoksessa noin 0,01 - 2,0 mol/l. Pitoisuus on mielellään noin 0,01 - 1,0 mol/l, edullisesti noin 0,05 - 1,0 mol/l. Mitä tahansa vesiliukoista yhdistettä, jossa on alkali- tai maa-alkalimetalli-ioni kationina, voidaan käyttää. Yhdiste voi olla esimerkiksi fosfaatti-, kloridi- tai karbonaattisuola. Kulloinkin käytettävän saostavan yhdisteen valintaan vaikuttaa käytettävä detergentti. Esimerkiksi natriumdodekyylisulfaatti saostuu parhaiten huoneenlämpötilassa riittävien kalium-, kalsium- tai bariumionipitoisuuksien vaikutuksesta, kun taas litiumdodekyylisulfaatti saostuu riittävän hyvin edellä mainittujen ionien lisäksi myös magnesium- ja natriumionien vaikutuksesta.

Detergentin ja saostavan yhdisteen vesiliuos lisätään näytteeseen, kuten kohdunkaulasta tai virtsaputkesta otettuun sivelynäytteeseen. Näyte sekoitetaan perinpohjin detergentin ja saostavan yhdisteen vesiliuoksen kanssa, jolloin saadaan näyteliuos. Sekoittaessa näyteliuos huoneenlämpötilassa, detergentti jää liukenematta. Liuos, jossa detergentti on liukenemattomana, kuumennetaan huoneenlämpötilasta noin 60 - 120 °C:seen ja pidetään tässä lämpötilassa noin 5 - 30 minuuttia. Tässä inkubointilämpötilassa detergentti liukenee ja liuottaa mikrobioteiinin, jolloin antigeeni paljastuu immuunimääritystä varten.

Inkuboinnin jälkeen liuos jäähdytetään nopeasti jäähaudetta tai muuta sopivaa keinoa käyttäen riittävän alhaiseen lämpötilaan detergentin saostamiseksi. Vaihtoehtoisesti voidaan liuosta jäähdyttää hitaasti, kunnes se saavuttaa huoneenlämpötilan. Soveltuvaa puskuria, kuten fosfaattipuskuria (esimerkiksi liuosta, joka sisältää 0,2 mol/l natriumfosfaattia ja 0,1 % (paino/tilavuus) naudan seeriumalbumiinia, pH 7,4), voidaan lisätä ennen inkubointia tai sen jälkeen. Puskuri pitää liuoksen pH:n alueella noin 6,5 - 8,0. Jäähdytyksen jälkeen voidaan saostunut

detergentti poistaa tai se voidaan jättää liuokseen. Jos detergentti jätetään liuokseen, sillä on vähäinen vaikutus tai ei ollenkaan vaikutusta immunomääritykseen, koska se ei ole liuoksessa.

5 Kuten edellä mainittiin, on tämän keksinnön mukai-
sen menetelmän erityiskäyttökohde Chlamydia trachomatisin
liuokseen saattaminen. C. trachomatisin ulomman kalvon
pääproteiini muodostaa noin 60 % mikro-organismien ulomman
kalvon koko proteiinimäärästä ja sen koko eli alayksikön
10 molekyylipaino on 38 000 - 44 000 daltonia keskimääräisen
molekyylipainon ollessa 39 500 daltonia. Tästedes käyte-
tään tästä C. trachomatisin ulomman kalvon pääproteiini-
ryhmästä helppouden vuoksi lyhennettä MP 39,5, joka tulee
ilmauksesta "ulkomembraanin pääproteiini, jonka alayksikön
15 molekyylipaino on 39 500 daltonia". MP 39,5 on lajispe-
sifinen antigeeni siinä mielessä, että testattuna kaikkien
C. trachomatis -serotyyppeiden vasta-aineita vastaan se rea-
goi lajispesifisesti. Antigeenina MP 39,5 tarjoaa perus-
tan kaikkien C. trachomatis -serotyyppeiden identifioinnil-
le.
20

Antigeenin, kuten MP 39,5:n, vastaisia lajispesi-
fisiä vasta-aineita voidaan muodostaa soveltuvin inoku-
lointimenettelyin laboratorioeläimissä, kuten hiirissä
ja/tai kaniineissa. Eläimissä kehitettyjä vasta-aineita
25 voidaan käyttää infektion tutkimiseen muissa nisäkkäissä.
Nämä tutkimukset voidaan tehdä hyvin tunnetuin menette-
lyin, joita käytetään tutkittaessa bakteeriantigeenin läs-
näoloa infektoituneessa kohteessa. Kun monospesifisten
vasta-aineiden muodostaja on varmistettu antigeenilla ino-
kuloitujen koe-eläinten joukosta, voidaan nisäkkäistä,
30 joiden epäillä olevan infektoituneita, saadut näytteet
tutkia joko suoraan tai epäsuoraan tutkimusmenettelyin.
Sellaiset tutkimusmenetelmät kuin entsyymiin liitetty im-
muuniabsorbenttimääritys tai radioimmuunimääritys ovat
35 soveltuvia näihin tarkoituksiin.

Suorassa tutkimuksessa antigeenin vastainen monospesifinen vasta-aine kiinnitetään kovalenttisesti tai ei-kovalenttisesti kiinteäfaasikantajasysteemiin. Tällaisten menetelmien yhteydessä totutulla tavalla voi kantajasysteemi olla lasia, muovia tai vastaavaa materiaalia. Kiinteäfaasikantajaa ja siihen liitettyä monospesifistä vasta-ainetta voidaan inkuboida keksinnön mukaisella tavalla preparoidun, infektoituneesta yksilöstä aiemmin otetun näytteen kanssa.

Monospesifinen vasta-aine, joka on ennalta leimattu radionuklidilla tai liitetty entsyymiin tunnetuin menetelmien, tasapainotetaan sitten kantajasysteemiä vastaan. Näytteessä mahdollisesti läsnäoleva antigeeni, joka on sidottu kantajasyteemillä olevaan vasta-aineeseen, sitoutuu puolestaan radionuklidileimattuun tai entsyymiin liitettyyn vasta-aineeseen. Jos käytetään radionuklidileimatua vasta-ainetta, voidaan sitten määrittää näytteen jäännösradioaktiivisuus. Kun käytetään entsyymiin liitettyä vasta-ainetta, lisätään entsyymille spesifistä substraattia kiinteän kantajan sisältävään reaktioseokseen ja tuloksena oleva värinmuutos rekisteröidään spektrofotometrisesti. Tätä värinmuutosta verrataan näytteiden, jotka tiedetään vapaiksi antigeenista, aiheuttamaan värinmuutokseen. Antigeenin, kuten MP 39,5:n, läsnäolo nisäkäsnäytteissä voidaan täten tutkia suoraan.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää epäsuoria tutkimusmenetelmiä. Tarkemmin ilmaistuna antigeeni voidaan sitoa kovalenttisesti tai ei-kovalenttisesti soveltuvaan kiinteäfaasikantajasysteemiin. Infektoituneeksi epäillystä yksilöstä otettu näyte preparoidaan edellä kuvatulla tavalla. Sitten näyte sekoitetaan tunnettuun määrään tämän antigeenin vastaista radionuklidileimatua tai entsyymiin liitettyä vasta-ainetta, joka on aiemmin eristetty laboratorioeläimestä. Näytevasta-aineseosta voidaan sitten inkuboida kiinteäfaasikantajasyteemin ja siihen liittyneen

antigeenin kanssa.

Kiinteän kantajasysteemin radioaktiivisuus tai entsyymiin liitetyn systeemin värinmuutos mitataan ja niitä verrataan standardinäytteisiin, jotka on käsitelty samalla tavalla eivätkä sisällä antigeenia.

Kliinisen näytteen, jonka epäillään sisältävän tiettyä mikro-organismia, kyky estää radionuklidileimatujen tai entsyymiin liitettyjen vasta-aineiden sitoutumista kiinteään kantajaan osoittaa antigeenin läsnä- tai poissaolon näytteessä. Mahdollisesti esiintyvä esto on osoitus infektiosta.

Tällaisia tutkimusmenetelmiä tuntevat tietävät muitakin soveltuvia tutkimusmenetelmiä.

Esimerkki 1 valaisee tämän keksinnön mukaista menetelmää *C. trachomatis* MP 39,5:n yhteydessä käytettynä. Taulukossa I verrataan vertailuimmunomääritystä määritykseen, jossa käytetään keksinnön mukaisesti preparaoitua näytettä.

Esimerkki 1

450 µl:aan fosfaattipuskuriin (0,2 mol/l natriumfosfaattia ja 0,1 % (paino/tilavuus) naudan seerumialbumiinia, pH 7,4) valmistettua *Chlamydia trachomatis* -varastoliuosta lisättiin kaliumkloridia riittävä määrä näytteen kaliumionipitoisuuden säätämiseksi 0,1 mol/l:ksi. Sitten lisättiin noin 50 µl liuosta, joka sisälsi 1 paino-% SDS (natriumdodekyylisulfaattia) vedessä ja kuumennettiin näyte 100 °C:seen. Näytettä inkuboitiin tässä lämpötilassa 10 minuuttia ja jäädytettiin sitten huoneenlämpötilaan jäähauteessa SDS:n saostamiseksi. Sitten tehtiin immunomääritykset suhteissa 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16 laimennetuille varastoliuoksille poistamatta saostunutta detergenttiä. Vertailunäyte preparaoitiin muuten samalla tavalla, mutta kaliumkloridin lisäys jätettiin tekemättä. Taulukossa 1 esitettävät tulokset osoittavat, että *Chlamydia* suhteen positiivinen tulos on saavutettavissa paljon laimeammilla

liuoksilla kuin vertailunäytteestä, johon ei lisätty saostusainetta. Tämä osoittaa herkkyuden huomattavan parantumisen.

5 Tässä on kuvattu parasta tapaa ja edullisia suoritustemuotoja. Keksintöön voidaan myös tehdä muunnoksia ja muutoksia.

Taulukko I

10	Chlamydia-kantaliuoksen ¹ laimennussuhde	EIA-tulokset ²	
		Esimerkin mukaisesti käsitelty	Käsittelemätön (vertailunäyte)
	1:16	0,53	0
	1:8	0,94	0
	1:4	1,31	0,11
	1:2	1,65	0,27
15	Laimentamaton	1,81	0,45

¹laimentamattomassa liuoksessa 5×10^7 perusyksikköä/ml
0,02 M natriumfosfaattipuskurissa

²ilmaistu aallonpituudella 450 nm mitatun absorbanssin optisen tiheyden S/N-suhteena.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä Chlamydia trachomatiksesta saatujen mikrobiproteiinien valmistamiseksi immunomäärittystä varten,
5 t u n n e t t u siitä, että

sekoitetaan Chlamydia trachomatiksesta saatu mikrobiproteiininäyte vesiliuokseen, joka sisältää proteiinin liuottavan määrän ionista detergenttiä, jolla on alkali- tai maa-alkalimetalli-ioni kationina näyteliuoksen saami-
10 seksi;

inkuboidaan näytettä korotetussa lämpötilassa riittävän pitkään proteiinin liuottamiseksi; ja

jäähdytetään näyteliuos yhdisteen, jossa on alkali- tai maa-alkalimetalli-ioni kationina, läsnäollessa, joka
15 yhdiste toimii lämpötilasta riippuvana saostavana yhdisteenä, joka siten saa aikaan detergentin saostumisen liuoksesta huoneenlämpötilassa tai hieman sen yläpuolella, mutta ei vaikuta detergentin liukoisuuteen korotetuissa lämpötiloissa, yhdisteen kationin ollessa eri kuin detergentin kationi.
20

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergenttiä on läsnä näyteliuoksessa pitoisuutena noin 0,01 - 2,0 % (paino/tilavuus).

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että saostavaa yhdistettä on läsnä liuoksessa pitoisuutena noin 0,01 - 2,0 mol/l.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste sisältää
30 kationin, joka on natrium-, kalium-, kalsium-, barium- tai magnesiumioni.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että näyteliuosta inkuboidaan lämpötilassa noin 60 - 120°C noin 5 - 30 minuuttia.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergenttiä on läsnä liuok-
sessa pitoisuudessa noin 0,01 - 1,0 % (paino/tilavuus).

5 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että yhdistettä on läsnä liuok-
sessa pitoisuutena noin 0,01 - 1,0 mol/l.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että liuos sisältää puskuria
liuoksen pH:n pitämiseksi arvossa noin 6,5 - 8,0.

10 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergentti on lauryyli-
sulfaatti.

15 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste on vesiliu-
koinen suola.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergentti on natrium-
dodekyylisulfaatti ja saostavassa yhdisteessä on kationi,
joka on kalium-, kalsium- tai bariumioni.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että liuosta inkuboidaan lämpö-
tilassa noin 100 °C noin 10 minuuttia.

25 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste on kalium-
kloridi ja sitä on läsnä liuoksessa pitoisuutena noin
0,05 - 1,0 mol/l.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergenttiä on läsnä pitoi-
suutena noin 0,05 - 1,0 % (paino/tilavuus).

30 15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergentti on litium-
dodekyylisulfaatti.

35 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että liuosta inkuboidaan lämpöti-
lassa noin 100 °C noin 10 minuuttia.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste on kalium-
kloridi ja sitä on läsnä liuoksessa pitoisuutena noin
0,05 - 1,0 mol/l.

5 18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että detergenttiä on läsnä pitoi-
suutena noin 0,05 - 0,1 % (paino/tilavuus).

10 19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että näyteliuos tutkitaan radio-
immunomäärityksellä.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että liuos tutkitaan radio-
immunomäärityksellä.

15 21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste lisätään
näyteliuokseen ennen kuumennusvaihetta.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste lisätään
näyteliuokseen inkubointivaiheen jälkeen.

20 23. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste lisätään
näyteliuokseen ennen kuumennusvaihetta.

25 24. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että saostava yhdiste lisätään
näyteliuokseen inkubointivaiheen jälkeen.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av mikroprotein, som erhållits ur *Chlamydia trachomatis*, för immunologiska bestämningar, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

blandar ett mikroproteinprov, som erhållits ur *Chlamydia trachomatis*, med en vattenlösning av proteinlösande kvantitet av en jonisk detergent, som har en alkali- eller en jordalkalimetalljon som katjon, för att få en provlösning;

inkuberar provet vid en förhöjd temperatur tillräckligt länge för att lösa proteinet; och

kyler provlösningen i närvaro av en förening, som har en alkali- eller en jordalkalimetalljon som katjon, vilken förening fungerar som en temperaturberoende utfällande förening som sålunda åstadkommer att detergenten fälls ut ur lösningen vid rumstemperatur eller något däröver, men inte inverkar på detergentens löslighet vid förhöjda temperaturer, varvid föreningens katjon är en annan än detergentens katjon.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att detergenten är närvarande i provlösningen i en koncentration på ca. 0,01 - 2,0 % (vikt/volym).

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen är närvarande i lösningen i en koncentration på ca. 0,01 - 2,0 mol/l.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen innehåller en katjon, som är en natrium-, kalium-, kalcium-, barium- eller magnesiumjon.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att provlösningen inkuberas vid en temperatur på ca. 60 - 120 °C ca. 5 - 30 minuter.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att detergenten är närvarande i
provlösningen i en koncentration på ca. 0,01 -1,0 % (vikt-
/volym).

5 7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att föreningen är närvarande i en
lösning i en koncentration på ca. 0,01 - 1,0 mol/l.

10 8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att lösningen innehåller en buffert
för att hålla lösningens pH vid ett värde på ca. 6,5 -
8,0.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att detergenten är laurylsulfat.

15 10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den utfällande lösningen är ett
vattenlösligt salt.

20 11. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att detergenten är natriumdodekyl-
sulfat och den utfällande lösningen innehåller en katjon
som är en kalium-, kalcium- eller bariumjon.

12. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att lösningen inkuberas vid en tem-
peratur på ca. 100°C i ca. 10 minuter.

25 13. Förfarande enligt patentkravet 12, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen är ka-
liumklorid och den är närvarande i lösningen i en koncen-
tration på ca. 0,05 - 1,0 mol/l.

30 14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att detergenten är närvarande i en
koncentration på ca. 0,05 - 0,1 % (vikt/volym).

15. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att detergenten är litiumdodekylsul-
fat.

35 16. Förfarande enligt patentkravet 15, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att lösningen inkuberas vid en tem-

peratur på ca. 100 °C i ca. 10 minuter.

17. Förfarande enligt patentkravet 16, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen är ka-
liumklorid och den är närvarande i provlösningen i en kon-
5 centration på ca. 0,05 -1 mol/l.

18. Förfarande enligt patentkravet 17, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att detergenten är närvarande i en
koncentration på ca. 0,05 - 0,1% (vikt/volyum).

19. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e -
10 t e c k n a t därav, att provlösningen undersöks med
radioimmunologisk bestämning.

20. Förfarande enligt patentkravet 18, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att lösningen undersöks med radio-
immunologisk bestämning.

21. Förfarande enligt patentkravet 19, k ä n n e -
15 t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen till-
sätts i provlösningen före upphettningsskedet.

22. Förfarande enligt patentkravet 19, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen till-
20 sätts i provlösningen efter inkubationsskedet.

23. Förfarande enligt patentkravet 20, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen till-
sätts i provlösningen före upphettningsskedet.

24. Förfarande enligt patentkravet 20, k ä n n e -
25 t e c k n a t därav, att den utfällande föreningen till-
sätts i provlösningen efter inkubationsskedet.