

**GLUTATION-S-TRANSFERÁZ EGY VAGY TÖBB IZOENZIMJÉNEK
KIMUTATÁSÁN ALAPULÓ, SZERVI ÁLLAPOT ÉRTÉKELÉSÉRE
ALKALMAS, GYORS VIZSGÁLATI ELJÁRÁS**

K I V O N A T

A találmány tárgyát egy, glutation-S-transzferáz egy vagy több izoenzimjének különböző biológiai eredetű folyadékokban történő kimutatásán alapuló, a vizsgált személy szervi állapotának gyors értékelésére alkalmas eljárás képezi. A szerv állapota lehet pl. egy immunológiai vagy toxikológiai behatást követő szervkárosodás. Az eljárás megvalósítása során az izoenzimre specifikus, annak legalább pikomoláris mennyiségben történő kimutatására elegendő érzékenységű, részecskejelölt, GST elleni antitestet kontaktusba hozzák egy biológiai eredetű mintával, amely feltehetően tartalmazza az izoenzimet, majd a részecskejelölt antitest izoenzimmel képződött komplexét befogják egy immobilizált „befogó” antitest segítségével, ami vizuálisa észlelhető jelet eredményez. Az eljárás lehetővé teszi GST-izoenzim kimutatását és meghatározását jellemzően 30 perces nagyságrendbe eső időtartam alatt, az immobilizált GST elleni antitesttel való kezdeti kontaktustól számítva. Az eljárás kivitelezése egyszerű, ezért pl. betegek is használhatják otthonukban arra, hogy kövessék szervezetükben a megfelelő GST-izoenzim szintjét, máj- vagy veseátültetés után.

A k i D

1984. 11. 05.

Ellátó által

Képviselő:

Danubia Szabadalmi Védjegy Iroda Kft.

Budapest

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

**GLUTATION-S-TRANSZFERÁZ EGY VAGY TÖBB IZOENZIMJÉNEK
KIMUTATÁSÁN ALAPULÓ, SZERVI ÁLLAPOT ÉRTÉKELÉSÉRE
ALKALMAS, GYORS VIZSGÁLATI ELJÁRÁS**

A találmány tárgyát egy, szervi állapot értékelésére alkalmazható gyors vizsgálati eljárás képezi glutation-S-transzferázok (GST-k) kimutatására és/vagy meghatározására. A találmány tárgyát képezi továbbá egy, GST elleni, részecskejelölt antitestet tartalmazó reagenskészlet az eljárás megvalósítására.

A találmány szerinti megoldás fő előnye egyszerűségében rejlik, vagyis abban, hogy kevés tudományos képzettséggel, vagy azzal sem rendelkező személyek is alkalmazhatják saját egészségi állapotuk nyomon követésére, ugyanakkor krízisszituációkban is gyors és hiteles információt nyújt.

A GST-k családjának tagjai főként az α -, β -, θ -, és π -osztályba sorolható izoformák, amelyeket különböző gének kódolnak. Ezek az enzimek egy sor xenobiotikum (idegen eredetű biológiai anyag) eltávolítását végzik, főként glutationhoz konjugálva azokat. A májban legnagyobb mennyiségben az alfa-GST (α GST) található meg, egyenletes eloszlásban. Ezzel szemben a pi-GST (π -GST) főként az epevezeték szegélyező epiteliális sejtekben található. Hasonló egyedi eloszlás figyelhető meg a vese esetében, ahol az α GST a proximális tubulusokban helyezkedik el, a π GST előfordulása pedig a nephron disztális tubuláris régiójára korlátozódik. Mindebből az a követ-

keztetés adódik tehát, hogy akár a plazma, akár a vizelet GST-szintjének mérése lehetővé teszi a vizsgált személy mája illetve veséje állapotának nyomon követését. Valóban, számos szerző alkalmazott GST-méréseket mind máj-, mind vesekárosodások értékelésére olyan személyekben, akiken előzőleg szervátültetést hajtottak végre, vagy akik máj vagy vese toxinjainak hatására szervkárosodást szenvedtek [ld. pl. Trull, A.K. és mtsai., Transplantation, 58, 1345-1351 (1994)].

Jelenleg az ilyen jellegű méréseket leggyakrabban radioimmunológiai vizsgálati eljárásokkal („radioimmunoassay”, RIA) végzik. Mostanában azonban számos, mikrotiter-lemez felhasználásán alapuló enzimes immunológiai vizsgálati eljárás („enzyme immunoassay”, EIA) vált kereskedelmi forgalomban hozzáférhetővé a Biotrin International Limited cégtől (Mount Merrion, County Dublin, Írország), amely lehetővé teszi α - és π GST-szintek mérését biológiai eredetű folyadékokban. Ezek az EIA-k, a kezdeti kétkedés ellenére, egyre szélesebb körben válnak elfogadottá a tudományos közösségen belül [vö. Beckett, G.J. és Hayes, J.D., Advances in Clinical Chemistry, 30, 325, (1993)]. Így tehát sokak számára, akik ezen a területen dolgoznak, a RIA jelenti az egyetlen választási lehetőséget a kimutatási módszerek közül. Jelen pillanatban mindkét módszernek vannak korlátai, mivel egyaránt speciális felszerelés és magasan képzett, hozzáértő személyzet szükséges ahhoz hogy a mérés során jelentéssel bíró és pontos eredmények szülessenek. Az ilyen vizsgálati eljárások viszonylag lassúak, elkezdésüktől befejezésükig 2 órán át vagy még tovább tartanak. Ennek megfelelően szükség van egy, GST-k mérésére alkalmas, gyorsabban megvalósítható vizsgálati eljárásra.

A GST-izoenzimek kimutatására szolgáló eljárások sokszor éppen egyre bonyolultabbak lesznek, mint azt az időfelbontásos immunofluorimetriás vizsgálati eljárás („Time-Resolved ImmunoFluorometric Assay”, TR-IFMA) alkalmazása is alátámasztja. Tianen, P. és mtsai. [Clin. Chem., 42(2) 334

(1996)] összehasonlították az enzimes immunológiai vizsgálati eljárást (EIA) és a TR-IFMA-t az α -GST esetében. Az alkalmazott EIA a Hepkit volt (a Biotrin International, Dublin védjegye). Az eredmények azt mutatták, hogy a mérések közötti pontosság jobb volt a Hepkit, mint a TR-IFMA esetében. Ugyanakkor a TR-IFMA kivitelezése munkaigényesebbnek is bizonyult a Hepkiténél, mivel több ismétlést (négyet) és több mosást igényelt. Világos tehát, hogy a GST kimutatása és mennyiségi jellemzése érdekében végzett jelenlegi kutatás munkaigényesebb és bonyolultabb kimutatási rendszerek, mint pl. a TR-IFMA kifejlesztésére koncentrált.

Szervátültetésen keresztülment, vagy máj illetve vese számára toxikus vegyületek hatásának kitett, és ennek következtében szervkárosodást szenvedett személyek állapotát gondosan nyomon kell követni. Ez különösen igaz szervátültetésen keresztülment személyek esetében, akik immun-suppresszív hatóanyagokkal (különösen ciklosporinnal) végzett, hosszú ideig tartó terápiás kezelésben részesülnek az átültetés után. Mihelyt ezek a személyek elhagyják a kórházat, állapotukat folyamatosan nyomon kell követni, ami jelenleg azt jelenti, hogy gyakran vissza kell térniük a megfelelő kórházi egységbe, hogy a kellő GST és egyéb vizsgálati eljárások elvégezhetőek legyenek. Eszerint tehát igen kívánatos volna, ilyen személyeknek módja volna önmaguk állapotának megfigyelésére, ami csökkentené a kórházi látogatások számát, és ami még fontosabb, idejekorán jelezné a betegnek és az orvosnak a beavatkozás szükségességét, ha a GST-szint normálisnál magasabb lenne.

Egy olyan eljárás tehát, amely lehetővé tenne egy gyorsabb és egyszerűbb megvalósítási formát a GST meghatározására plazmában, vizeletben vagy más biológiai eredetű folyadékban, mint pl. az epe, különösen előnyös lenne, mivel lehetővé tenné az orvosnak, hogy akár a sérült beteg májának, akár veséjének állapotát nyomon kövesse anélkül, hogy időrabló és drága kórházi tesztekre kényszerítene igénybe vennie.

Egy másik terület, ahol erre a gyorsan megvalósítható vizsgálati eljárásra szükség van, a szervek beültetés előtti vizsgálata illetve az *ex vivo* kísérletezés. Jelenleg nincs általánosan elfogadott eljárás egy donorszerv értékelésére a befogadóba való átültetés előtt. Következőleg lehetetlen pontosan előre megmondani az átültetési műtét végső kimenetelét a donorszerv kezdeti minőségének elbírálása alapján. Bármilyen eljárás, amely hozzájárulna a donorszerv átültetés előtti értékeléséhez, nagymértékben segítené a műtét végső kimenetelének becslését, és lehetővé tenné az orvos számára, hogy korábban beavatkozzon egy átültetés utáni segítő terápiával a beültetett szövet rossz minőség következtében bekövetkező vesztesége vagy a kilökődés megelőzése érdekében.

A normális szervfenntartó műveletek részeként a donorszervet speciális reagensekkel hozzák egyensúlyba vagy áramoltatják át (pl. Wisconsin Egyetem pufferrel) a szervdonorból végzett eltávolítás után. Ez és más hasonló reagensek segítenek fenntartani a szerv épségét alacsony hőmérsékleteken (4-10°C) *ex vivo* mielőtt a befogadóba beültetik azokat, és ezeket használják arra is, hogy a tárolt szervet testhőmérsékletre (37°C) hozzák egyensúlyba mielőtt sebészetileg beültetnék a befogadóba. Így az *ex vivo* szövetsérülés, amit a fenti faktorok bármelyike okozhat, nyomon követhető a szerv enzimvesztése révén.

Gyors vizsgálati eljárások ismeretesek. Az EP 0291 194 B1-es számú európai szabadalom pl. feltár (és rá oltalmat is igényel) egy analitikai teszt-készüléket és egy, a készülék alkalmazásával elvégezhető analitikai eljárást, amelyek megfelelnek otthoni, klinikai illetve orvosi sebészeti alkalmazásra, és amely a leírás szerint gyors analitikai eredményt ad, miközben a felhasználótól csupán minimális hozzáértést és részvételt követel. A GST-ről azonban nem történik említés. A markerként alkalmazható hormonok szintje egy terhes nőben, mint pl. az emberi magzatburok gonadotropin (HCG) általában nagyobb koncentrációban van jelen, és így könnyebben kimutatható,

mint a GST-k szintje olyan típusú betegekben, amelyekről az eddigiekben beszéltünk, és amelyek számára a megemelkedett GST-szint kritikus, sőt életveszélyes klinikai események előrejelzője lehet.

A GST izoformái közötti különbségtétel enzimaktivitás mérése alapján nehéz, mint az jól dokumentált [Beckett, G.J. és Hayes, J.D., (1993) Id. fent]. Amint azt fent jeleztük, más kutatók RIA-t [Clinica Chimica Acta 184, 269 (1989)] illetve TR-IFMA-t [Tianen, P., és Karhi, K.K., Clin. Chem., 40(2), 184 (1994)] alkalmaztak GST-k kimutatására. Ezen módszerek mindegyikével biomolekulák igen érzékenyen kimutathatók. Azonban mindegyik módszer speciális felszerelést és képzett kezelőszemélyzetet kíván. A TR-IFMA-hoz pl. egy speciális időfelbontásos fluoriméter kell.

Nyilvánvaló tehát, hogy szükség van egy olyan eljárásra, amely nem szakértők számára vagy krízisszituációban is megfelelő, gyors és könnyen használható. Krízisszituációra példaként átültetés utáni máj- vagy vesekárosodás, illetve paracetamol túladagolásnak köszönhető potenciális májrendellenesség szolgál.

A találmány tárgyát képezi tehát egy, a glutation-S-transzferáz (GST) egy vagy több izoenzimjének különféle biológiai folyadékokban végzett kimutatásán alapuló eljárás szervi állapot gyors értékelésére személyben azal jellemezve, hogy egy, részecskével jelölt. az említett izoenzimre specifikus GST elleni antitestet - amely eléggé érzékeny ahhoz, hogy az említett izoenzimet legalább pikomoláris mennyiségben kimutassa - kontaktusba hozunk az izoenzimet feltételezhetően tartalmazó, biológiai eredetű folyadékkal, majd egy immobilizált „befogó” antitesthez kötjük a részecskejelölt antitest-izoenzim komplexet, ily módon látható jelet hozunk létre.

A „gyors” a leírásban használt értelemben azt jelenti, hogy a GST-izoenzim kimutatása vagy meghatározása a részecskejelölt anti-GST-vel jellemzően elvégezhető egy 30 perces nagyságrendű időtartam alatt a kezdeti kontaktustól kezdve.

A leírásban használt értelemben szervi állapotnak nevezzük az immunológiai vagy toxikológiai sérülést követő szervkárosodást is.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti megoldás fő előnye egyszerűségében rejlik, vagyis abban, hogy kevés tudományos képzettséggel, vagy azzal sem rendelkező személyek is alkalmazhatják saját egészségi állapotuk nyomon követésére, illetve abban, hogy a fent leírt típusú krízisszituációkban gyors információt nyújt.

Nyilvánvaló, hogy sem komplikált felszerelés, sem bonyolult laboratóriumi műveletek nem szükségesek a vizsgálati eljárás elvégzéséhez, az eredmények értékeléséhez és interpretálásához. Az elvégzésnek és értékelésnek ez az egyszerűsége szignifikáns különbséget jelent a GST kimutatására szolgáló jelenlegi eljárásokhoz képest.

A GST előnyösen máj vagy vese eredetű α GST, π GST vagy μ GST.

Legelőnyösebben a GST máj vagy vese eredetű α GST vagy π GST.

GST kimutatására szolgáló bármely gyors vizsgálati eljárás esetében különösen szükség van egy, GST-vel szemben kellő affinitású antitestre.

Az α GST esetében egy olyan affinitású poliklonális antitestet termeltünk, amely az α GST-t 6,5 ng/ml-es koncentrációban mutatta ki, amint azt az alábbiakban leírjuk. Ez az antitest nagymértékben hozzájárul az eljárás érzékenységéhez.

A találmány szerinti megoldás megvalósítása során általában előnyösen olyan antitestet alkalmazunk, amely 5 ng/ml-es koncentrációban mutatja ki a GST izoenzimeket. Az antitest monoklonális és poliklonális is lehet.

A szilárd fázishoz kötött GST elleni antitest előnyösen poliklonális antitest, még előnyösebben poliklonális IgG. Egyes esetekben azonban, mint pl. a π GST esetében a szilárd fázisú antitest előnyösen monoklonális.

A GST elleni antitestet előnyösen ismert típusú nitrocellulóz membránhoz kötjük, mint pl. amit a "Schleicher and Schuell GmbH"-től (Németország) szerezhetünk be. Az ilyen membránok természetüknél fogva kötik a fehérjé-

ket, köztük az immunglobulinokat. Szakember számára nyilvánvaló azonban, hogy számos ismert szilárd hordozó természetsszerűleg alkalmazható a befogó antitest hordozójaként. Ezeket a hordozókat a leírásban általában szilárd fázisnak nevezzük.

Előnyösen a nitrocellulóz membrán pórusmérete 5-10 μm között van.

A nitrocellulóz membránon a nem specifikus kötődést szabadon választhatóan blokkolhatjuk a vizsgálati eljárás megvalósítási formájától függően, amint azt az alábbiakban leírjuk. Előnyösen, a nem specifikus helyek blokkolását elvégezhetjük fehérjével, pl. marha szérum albuminnal vagy tejfehérjével végzett, vagy valamilyen polimerrel, pl. polivinil-pirrolidonnal végzett kezeléssel, magától értetődő módon.

A szilárd hordozó felépítése többféle lehet, pl. lehet olyan típusú, mint amelyet a fent említett EP 0 291 194 B1-es számú európai szabadalom tár fel, feltéve, hogy a GST elleni antitest rendelkezik a szükséges specifitással.

A GST elleni antitest specifitásán a leírás szerinti értelemben az antitest adott GST-hez történő kötődésének affinitását értjük. Ezt az affinitást a vizsgált anyag kimutatható koncentrációjában fejezzük ki elméletibb mennyiségek helyett, mint pl. a specifikus affinitás (K_a) egy adott koncentrációnál.

A szilárd fázist elhelyezhetjük egy műanyag tokban és egyik, vagy mindkét végén elláthatjuk „kanóccal”, hogy elősegítsük az immunológiai vizsgálati eljárás komponenseinek kromatográfiás mozgását.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott biológiai eredetű folyadék lehet epe, plazma, szérum vagy vizelet, előnyösen plazma, szérum vagy vizelet.

A biológiai eredetű folyadék lehet hígított vagy hígítatlan(tiszta).

A biológiai eredetű folyadék lehet szerven átáramoltatott folyadék is, és így a találmány szerinti eljárás alkalmas szerv értékelésére beültetés előtt, vagy ex vivo vizsgálatok során.

Mint azt fent állítottuk, nem létezik általánosan elfogadott eljárás donor szervek értékelésére. Kimutattuk, hogy a gyors GST-kimutatás szervén átáramoltatott folyadékokban a találmány szerinti eljárás segítségével lehetséges, és ez mintegy az *ex vivo* szervi állapot markerének tekinthető. A kimutatás gyorsasága lényeges ebben az esetben, mivel a donor szerv egyirányú és állandó *ex vivo* hipoxiát szenved, amely végül irreverzibilis károsodáshoz vezet, azaz beültetésre alkalmatlanná teszi a szervet. Ezért bármely, szervek állapotának értékelését lehetővé tevő teszt igen hasznos az orvos számára.

A biológiai eredetű folyadékot kontaktusba hozzuk a részecskejelölt GST elleni antitesttel oly módon, hogy a kimutatandó GST izoenzim kössön a részecskejelölt GST elleni antitesthez mielőtt azt a szilárdfázisú immobilizált antitesttel kontaktusba hoznánk. Jelölőként alkalmazható részecskék lehetnek pl. kolloid részecskék, latex részecskék vagy fémszolok részecskéi. Fémszolok részecskéi előnyösen 15-40 nm-es tartományba eső átmérőjű aranyrészecskék lehetnek. Ilyen aranyrészecskék kereskedelmi forgalomban kaphatók, pl. a Janssen Life Sciences Products cég forgalmazza őket.

A részecskejelölt GST elleni antitestet elhelyezhetjük úgy is, hogy szomszédos legyen bármely készülék azon végével, amelyre a mintát felvisszük, hogy a találmány szerinti eljárás megvalósítása során kontaktusba kerüljön a biológiai eredetű folyadékkal.

A részecskejelölt GST elleni antitest alkalmazása azt jelenti, hogy nincs szükség amplifikációs lépésre. Így tehát a GST-izoenzimek részecskejelölt GST elleni antitesttel végzett kimutatása során a kimutatás egyszerűen a közvetlen antitest-antigén kölcsönhatáson alapulhat, amennyiben részecskejelölt antitesteket alkalmazunk az antigén kimutatása vagy a kölcsönhatás vizualizálása során az ezzel járó előnyökkel a fent leírt szituációkban.

Mindez igen meglepő, mivel a technika állása alapján nyilvánvaló, hogy a tudományos társadalomban némi kétkedés él még az EIA-k GST kimuta-

tására történt alkalmazásának tekintetében is, még akkor is, ha amplifikáló rendszert alkalmazunk, amely növeli a kimutatás érzékenységét.

A szilárd fázis bármely végének „kanóccal” történő ellátása a fent leírtak szerint különösen előnyös amennyiben egy GST elleni, részecskejelölt IgG-t alkalmazunk, mivel elősegíti a jelölt IgG kromatográfiás mozgását. Nitrocellulóz membrán esetében pl., ha kanóccal látjuk el a membrán mintafelviteli végét és a másik végét is, ezzel elősegítjük az arannyal jelölt, előzőleg a membránra permetezett IgG kromatográfiás mozgását. Továbbá tisztított GST-t helyezhetünk el az immobilizált GST elleni IgG felett a membránon, ami belső műveleti kontrollként működik a GST elleni, arannyal jelölt IgG konjugáló funkcióját ellenőrzendő.

A találmány ezen megvalósítási módja szerint a biológiai eredetű mintában jelenlevő folyadék felfuszpendálja a GST elleni, arannyal jelölt IgG-t, és bármely jelenlevő GST-izoenzim az arannyal jelölt IgG-hez köt. Ez a komplex migrál azután felfelé vagy a membrán mentén a felső kanóc vonzó hatásának eredményeképpen. Amennyiben elegendő GST izoenzim van jelen, a GST-IgG (a GST elleni, arannyal jelölt IgG) komplex immobilizálódik a membránra ott, ahol a kötött GST elleni IgG jelen van. Ez pozitív jelet eredményez, jelezve, hogy a mintában GST van jelen. A feleslegben levő GST elleni, arannyal jelölt IgG konjugátum a műveleti kontrollként alkalmazott GST-vel köt a membránon.

Nyilvánvaló az is, hogy amikor a részecskejelölt antitestet alkalmazzuk antigén kötésére biológiai mintában, a kötött GST meghatározását egyetlen lépésben is elvégezhetjük olyan eljárással, amelyet „on pot” vizsgálati eljárásnak írhatunk le.

A találmány tárgyát képezi egy reagenskészlet GST kimutatására szolgáló fent meghatározott eljárás kivitelezésére, amely tartalmaz egy, GST-izoenzimre specifikus, GST elleni antitestet a leírásban ismertetettek szerint.

A leírásban ismertetett vizsgálati eljárás megvalósítási formája különbözik a fenti EIA és RIA típusú immunológiai vizsgálati eljárásoktól két fő szempontból. Először, az antigénkimutatás sorrendje különbözik amennyiben a találmány szerinti eljárás megvalósítása során az antigén először a részecskejelölt antitesthez („particle labelled antibody”, PLA) köt, majd ez az antigén-PLA komplexet fogja be az immobilizált befogó antitest, ami pozitív jelet eredményez. Így tehát nem szükséges semmilyen közbenső lépés, mint pl. membránmosás a nem kötött anyag (pl. a vizelet, a vér vagy a szervén átáramoltatott folyadék más komponensei) eltávolítása érdekében, vagy pl. bármilyen amplifikáló reagens hozzáadása a kötött antigén-PLA komplex kimutatása érdekében. A komplex valójában „öndetektáló”.

Ez az elrendezés élesen elkülönül a GST immunológiai kimutatására szolgáló jelenleg használatos eljárásoktól (EIA, RIA), amelyek esetében az antigén először egy immobilizált, „befogott” antitesttel kerül kapcsolatba majd számos, alapos, a nem kötött illetve zavaró komponensek eltávolítására szolgáló mosási művelet után kell hozzáadni az antitest konjugátumot (antitest-enzim vagy radioaktívan jelölt antitest) az antigén-antitest komplexhez a kötött antigén kimutatása végett. Abban az esetben, amikor antitest-enzim konjugátumokat alkalmazunk, minden esetben egy újabb reagens, a szubsztrát is szükséges, ami színes terméké alakulva jelzi a kötött enzim jelenlétét.

Mind az enzimes, mind a radioimmunológiai vizsgálati eljárási módszerek drága és bonyolult felszerelést követelnek, hogy lehetővé tegyék a kutató vagy a laboratóriumi technikusok számára a kísérleti adatok értelmezését. Amikor találmány szerinti, gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárást alkalmazunk a GST immunológiai detektálására, és az eredményt egyszerűen egy szín (csík) jelenléte vagy hiánya jelzi, ez azok számára is könnyen interpretálható, akik nem szakértők.

Az ismert vizsgálati eljárási rendszerek és a találmány szerinti eljárás közötti különbségek másik fő területét már fent említettük, ennek pedig központi jellemvonása az, hogy a találmány szerinti vizsgálati eljárás megvalósítási formájában nem szükséges a jelet amplifikálni a GST immunológiai kimutatása végett. Valójában, a találmány szerinti megoldásban a GST gyors kimutatásához szükséges érzékenységet maga a vizsgálati eljárás megvalósítási formája biztosítja. A részecskejelölt antitesten és a befogó antitesten kívül nem szükséges más, külső amplifikáló reagens. A GST immunológiai kimutatására szolgáló más eljárások mindegyikének esetében szükség van valamilyen jelfelerősítő módszerre, mint pl. egy színes termék enzimátikus előállítása (EIA), fluoreszcenciás jelerősítés Eu^{3+} -jelölt antitestek alkalmazásával (TR-IFMA), vagy atommag részecskeemissziójával kapcsolatos jelamplifikálás (azaz radioaktív detektálás, RIA).

Az alábbiakban megadjuk a rajzok rövid leírását:

Az 1. ábra egy, a találmány szerinti, gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárás bemutatása, amelyet az jellemez, hogy arannyal jelölt α -GST elleni IgG-t és membránhoz kötött α -GST elleni IgG-t alkalmazunk a 2. és a 3. példában leírt módon.

A 2. ábra egy, a találmány szerinti, gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárás bemutatása, amelyet az jellemez, hogy arannyal jelölt α -GST elleni IgG-t és membránhoz kötött α -GST elleni IgG-t alkalmazunk a 4. példában leírt módon.

Az alábbiakban a találmány szerinti megoldást példák segítségével részletesebben is ismertetjük.

1. példa. α GST tisztítása és antiszérum előállítása tisztított α GST segítségével α GST tisztítása

Az emberi májat hullaboncolás útján nyertük. A máj homogenizálását 113,2 g máj 400 ml, alábbi összetételű homogenizáló pufferhez (pH 7,2) való hozzáadásával végeztük el:

10 mM nátrium-foszfát

250 mM szacharóz

1 mM EDTA.

Ezt követte a sejtroncsolás, ami 2 percig tartott, 4 °C-on, egy Waring (a „Waring” védjegy) turmixgépben. A kapott homogenizátumot 11500 g-vel 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk és újra lecentrifugáltuk 48000 g-vel, 45 percig. A végső felülúszót alaposan kidializáltuk 20 mM Tris-HCl ellenében pH 7,8-on és 4°C-on. A dialízis befejeztével a dializátumot felvittük egy S-hexyl-GSH-Sepharose® affinitási oszlopra. Az α GST specifikusan kötődött erre az oszlopra, ahonnan 0,3 mM S-hexil-GSH-val eluáltuk.

Ezután elvégeztük az alábbi minőségellenőrzést:

1. Az így tisztított α GST-t SDS-PAGE-val tisztának találtuk.
2. A tisztított α GST reagált az α GST elleni antiszérummal, de a π - vagy μ GST elleni antiszérummal nem.
3. Az izoelektromos fókuszálás két csíkot mutatott 8,5-ös és 7,8-as pI-knél (izoelektromos pontoknál). A tisztított B₁ (α GST) egy csíkot mutatott pI 8,5-nél. Ennek megfelelően feltételezzük, hogy a pI 7,8-as csík az α GST-t dimerként tartalmazó B₂ lehet.

Emberi α GST elleni antiszérum előállítása

Emberi α GST elleni antiszérum előállítását az alábbiakban leírtak szerint végeztük el, a megadott előirat alapján, a feltüntetett időtartam alatt, nyulakban (belső azonosító: syncor G és H)

1. nap:

Egy nyúl füléből 5 ml preszérumot veszünk próbavéreztetésként, majd összekeverünk 0,5 ml emberi α GST antigént (100 μ g) azonos térfogatú Freund teljes adjuvánssal. Az antigént és az adjuvánst homogenizáljuk amíg jó emulziót nem kapunk. Ezt a keveréket injektáljuk be azután az előzőleg megvágott nyúl hátának több pontján, szubkután.

28. nap:

Egy nyúl füléből 5 ml preszérumot veszünk próbavéreztetésként, majd összekeverünk 0,5 ml emberi α GST antigént azonos térfogatú Freund teljes adjuvánssal. Az antigént és az adjuvánst homogenizáljuk amíg jó emulziót nem kapunk. Ezt a keveréket injektáljuk be azután a nyúl hátának több pontján, szubkután.

42. nap:

Próbavéreztetésként 10 ml vért veszünk a nyúl füléből.

56. nap:

Egy második megerősítő immunizálást végzünk a nyúlon a 28. napival azonos módon.

70. nap:

Próbavéreztetésként 10 ml vért veszünk a nyúl füléből. Amennyiben a titer elegendően magas, a nyulat feláldozzuk, és annyi vért veszünk, amennyit csak lehetséges.

Antitest tisztítás:

10 ml antiszérumot (nyúl) felviszünk egy 10 ml térfogatú Protein-A-Sepharose oszlopra, amelyet előzőleg sós foszfát pufferrel („phosphate buffer saline”, PBS) hoztuk egyensúlyba. A nyúl IgG (a teljes mennyiség) kötődik a Protein A oszlophoz, és 0,1 M glicin alkalmazásával pH 3,0-n eluálható. A tisztaságát SDS-PAGE-vel állapítjuk meg, a működőképességét pedig (az anti-GST aktivitást) mikrotiter-lemez burkolással, „dot-blot” és

Western-blot analízissel és direkt konjugálással torna peroxidázhoz („horseradish peroxidase”, HRP).

A mikrotiter lemez burkolása során az α GST elleni antitest koncentrációja 1 μ g/ml volt 9,6-os pH-jú 0,1 M-os nátrium-karbonát pufferben.

Az α GST elleni IgG és a HRP konjugátumának alkalmas koncentrációja 77 ng/ml volt, egy olyan, α GST kimutatására szolgáló enzimes immunológiai vizsgálati eljárásban alkalmazva, ahol az α GST kimutatási tartománya 0-50 ng/ml volt. Ez az eredmény jelzi az antitest nagy érzékenységét, mivel normálisan az ilyen immunológiai vizsgálati eljárásokban (pl. azon EIA esetén, amelyet a Biotrin International Limited, Mount Merrion, County Dublin, Írország, a „Mukit” márkanéven hoz forgalomba, illetve más cégek EIA-reagenskészletei esetében is) az egyéb IgG-HRP-konjugátumok szükséges koncentrációja nagyobb mint 700-7000 ng/ml.

2. példa

Részecske-alapú vizsgálati eljárás α GST kimutatására

1. Az α GST elleni IgG-t (0,5 mg/ml PBS-ben) vonalban nitrocellulóz membránból kivágott szalagokra (3*8 cm) permeteztünk. A membránkészítés során nem alkalmaztunk blokkoló lépést. Egy ilyen lépés azonban hozzájárulhat a szalagok stabilitásához és redukálhatja a nem specifikus kötődést.

2. Az α GST elleni antitesteket (15 és 40 nm átmérőjű) aranyrészecskékkel való jelölését egy szerződéses előállító végezte el, akinek részére mi biztosítottuk az antitestet. A jelölt antitesteket 0,1%-os (vegyesszázalék) nátrium-azidos oldatban, 7,2-es pH-jú 2 mM nátrium-tetraborát pufferben tároltuk.

A vizsgálati eljárás végrehajtása

1. Az α GST-tartalmú mintákat összekevertük adott térfogatú GST elleni, arannyal jelölt IgG-vel a következő oldószer alkalmazásával:

1% marha szérum albumin

1% TWEEN-20

PBS-ben, pH 7,2-n,

majd az alábbiakban leírtak szerint megvizsgáltuk.

2. Az előzetesen α GST elleni IgG-vel burkolt (1-3 mm széles) nitrocellulóz membránt a keverékbe merítettük és 3-5 percig ott hagytuk.

A vizsgálat

A gyors vizsgálati eljárást a következő mintákon végeztük el (a minták sorszámai 1-5-ig terjednek):

1. minta α GST 25 μ g/ml-es (25 mg/l) koncentrációban.
2. minta Három ismert α GST koncentrációjú, hígított vizeletminta, rendre: a) 6,01, b) 18,34, c) 1,03 ng/ml az 1/5 arányú hígítás előtt.
3. minta A hígítószer magában.
4. minta π GST.
5. minta α GST 50 ng/ml-es koncentrációban (50 μ g/l).

Eredmények

1. minta A 25 μ g/ml-es minta esetében olyan jelet kaptunk, amely azt mutatja, hogy még a normális vizeletbeli α GST-szintnél 1000* magasabb szintnél sem figyelhető meg a "hook effektus" (hamis pozitív jel).
- 2.a-2.c. A mindhárom, 1/5 arányban hígítópufferrel meghígított vizeletmintában jelenlévő α GST-t kimutattuk, és a jelintenzitás az eredeti α GST-koncentrációnak megfelelő aránnyal azonos arányú volt, három, egymástól független személy megfigyelése szerint.
3. minta Amikor csupán a hígítószer vizsgáltuk a gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárással, nem figyeltünk meg jelet.
4. minta Nem figyeltünk meg jelet.

5. minta Az oldat egy tiszta, kimutatható jelet adott a vizsgálati eljárás végrehajtása után.

3. példa

Részecske-alapú vizsgálati eljárás α GST kimutatására

1. Az α GST elleni IgG-t (egér eredetű, monoklonális antitest; 1 mg/ml PBS-ben) nitrocellulóz membránból kivágott szalagokon (0,5*4 cm) immobilizáltuk.
2. A szalagokat blokkoltuk a következőképpen: 30 percig szobahőmérsékleten 2%-os (vegyesszázalék) sovány tej és 2%-os (vegyesszázalék) polivinil-pirrolidon 0,5% (vegyesszázalék) Tween-20-at tartalmazó sós tris pufferrel készült oldatában pH 7,4-en inkubáltuk.
3. A szalagokat desztillált vízzel öblítettük és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk.
4. Az α GST elleni antitesteket (40 nm átmérőjű) aranyrészecskékkel való jelölését egy szerződéses előállító végezte el, akinek részére mi biztosítottuk az antitestet. A jelölt antitesteket 0,1%-os (vegyesszázalék) nátrium-azidos oldatban, 7,2-es pH-jú 2 mM nátrium-tetraborát pufferben tároltuk.

A vizsgálati eljárás végrehajtása

1. Az α GST-tartalmú mintákat összekevertük adott térfogatú GST elleni, arannyal jelölt IgG-vel, 0,5% (vegyesszázalék) Tween-20-at tartalmazó, 7,4-es pH-jú sós tris pufferben.
2. Az előzetesen α GST elleni IgG-vel burkolt nitrocellulózmembrán-szalagot a keverékbe merítettük és 5 percig ott hagytuk.

A vizsgált minták

A gyors vizsgálati eljárást a következő mintákon végeztük el:

1. minta α GST 250 ng/ml-es koncentrációban.
2. minta A hígító puffer magában.

Eredmények

1. minta Az oldat egy tiszta, kimutatható jelet adott a vizsgálati eljárás végrehajtása után.
2. minta Amikor csupán a hígítószerrel vizsgáltuk a gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárással, nem figyeltünk meg jelet.

Az eljárás elve és az eredmények értékelése a 2. és a 3. példák esetében

Az arannyal jelölt α GST elleni IgG felfelé vándorol a membránban. Ha a keverékben α GST van jelen, a GST elleni, arannyal jelölt IgG α GST-vel képzett komplexe hozzáköt az immobilizált α GST elleni IgG-hez a membránon rózsaszín-piros csíkot (csapadék) adva. Amennyiben nincs jelen α GST a keverékben, a GST elleni, arannyal jelölt IgG kromatográfiásan egészen a membrán tetejéig vándorol és nem ad megfigyelhető csíkot (csapadékot).

Az eljárást bemutatjuk az 1. ábrára hivatkozva is. Az 1. ábrán egy általános formában ábrázolt, 10-zel jelölt, nitrocellulózmembrán-szalag látható, amint éppen egy, 11-gyel jelölt edényben levő biológiai eredetű folyadékba merül, amely folyadék tartalmazza a GST elleni, arannyal jelölt IgG-t. Az immobilizált α GST elleni IgG 1-3 mm-es csíkja a 12-es számnál szaggatott vonallal van jelölve. A minta áramlásának irányát a 10-es nitrocellulóz membránon nyíllal jelöltük. A GST elleni, arannyal jelölt IgG megköti az α GST-t, amennyiben az jelen van, felfelé vándorol a membránon és "befogja" az immobilizált - 12-essel jelölt - IgG. A 10-zel jelölt nitrocellulóz membránt 3-5 percig hagyjuk érintkezni a mintával, majd eltávolítjuk, amint azt az A és B szalagok vázlatos rajza jelzi. Amennyiben α GST jelen van, (pozitív eredmény) egy rózsaszín-piros csík (csapadékcsík) figyelhető meg, az A szalagon bemutatott módon. Amennyiben nincs jelen α GST, (negatív eredmény) nem keletkezik a 12-zel jelölt rózsaszín-piros csík a B szalagon bemutatott módon. Az 1. ábrán bemutatott elrendezés csupán szemléltető jellegű, és egy kereskedelmi forgalomba hozható megvalósítási mód esetén a GST elleni, arannyal jelölt IgG-t általában (mint mozgó fázist) a nitrocellulóz

membrán 13-assal jelölt mintafelviteli vége közelében lenne célszerű elhelyezni.

A találmány szerinti gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárás sajátos előnyei nyilvánvalóak, ugyanis csupán egyetlen lépésből áll a vizsgálat végrehajtása. Emellett nyilvánvaló az is, hogy a találmány szerinti gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárás jelentős mértékben jobb, mint egyéb, hagyományos mikrotiter-lemezen alapuló immunológiai vizsgálati eljárások.

4. példa

Részecske-alapú vizsgálati eljárás α GST kimutatására

1. Az α GST elleni IgG-t (egér eredetű, monoklonális antitest; 1 mg/ml PBS-ben) nitrocellulóz membránból kivágott szalagokon (0,5*4 cm) immobilizáltuk a szalag tetejétől kb. 1 cm-re.
2. A szalagokat blokkoltuk a következőképpen: 30 percig szobahőmérsékleten 2%-os (vegyesszázalék) sovány tej és 2%-os (vegyesszázalék) polivinil-pirrolidon 0,5% (vegyesszázalék) Tween-20-at tartalmazó sós tris pufferrel készült oldatában pH 7,4-en inkubáltuk.
3. A szalagokat desztillált vízzel öblítettük és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk.
4. Az α GST elleni antitesteket (40 nm átmérőjű) aranyrészecskékkel való jelölését egy szerződéses előállító végezte el, akinek részére mi biztosítottuk az antitestet. A jelölt antitesteket 0,1%-os (vegyesszázalék) nátrium-azidos oldatban, 7,2-es pH-jú 2 mM nátrium-tetraborát pufferben tároltuk.
5. α GST elleni, arannyal jelölt antitesteket vittünk fel a nitrocellulóz membránra kb. a szalag tetejétől 3 cm-re. Az arannyal jelölt antitestek felvitele előtt egy alsó réteg 30%-os(vegyesszázalék)szacharózoldatot vittünk fel a szalag ugyanezen területére, desztillált vízben.

A vizsgálati eljárás végrehajtása

1. Az α GST-tartalmú mintákat felvittük a nitrocellulózmembrán-szalagokra.

A vizsgált minták

A gyors vizsgálati eljárást a következő mintákon végeztük el:

1. minta α GST 250 ng/ml-es koncentrációban, hígító pufferként 0,5% (vegyesszázalék) Tween-20-at tartalmazó sós tris pufferrel készült, pH 7,4-es oldatban
2. minta α GST 25 ng/ml-es koncentrációban, hígító pufferként 0,5% (vegyesszázalék) Tween-20-at tartalmazó sós tris pufferrel készült, pH 7,4-es oldatban.
3. minta A hígító puffer magában.
4. minta Két ismert α GST koncentrációjú, hígított szerven átáramoltatott folyadékminta, rendre: a) 6716, b) 29295 ng/ml, az 1/20 arányú hígítás előtt.
5. minta Három ismert α GST koncentrációjú, hígított szérumminta, rendre: a) 26,62, b) 119,34, c) 251,86 ng/ml az 1/20 arányú hígítás előtt.
6. minta Három ismert α GST koncentrációjú, hígított epeminta, rendre: a) 7,26, b) 31,93 c) 68,12 ng/ml az 1/20 arányú hígítás előtt.
7. minta Ismert α GST koncentrációjú, hígított vizeletminta: 88,07 ng/ml az 1/20 arányú hígítás előtt.

Eredmények

1. minta Egy tisztán észlelhető jelet kaptunk a vizsgálati eljárás végrehajtása után.
2. minta Egy tisztán észlelhető jelet kaptunk a vizsgálati eljárás végrehajtása után.

3. minta Amikor csupán a hígítószerrel vizsgáltuk a gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárással, nem figyeltünk meg jelet.
4. minta Mindkét, szerven átáramoltatott folyadékmintában kimutattuk az α GST jelenlétét.
5. minta Nem kaptunk jelet, amikor a 26,62 ng/ml koncentrációjú α GST-t (az 1/20 arányú hígítás előtt) tartalmazó mintát vizsgáltuk, jelezve, hogy a vizsgálati eljárás nem mutatja ki a normális szérum szintnek megfelelő α GST-szintet. A 119,34 és 251,86 ng/ml koncentrációjú (az 1/20 arányú hígítás előtt) mintákban az α GST kimutatható volt.
6. minta Nem kaptunk jelet, amikor az (1/20 arányú hígítás előtt) 7,26 és a 31,93 ng/ml α GST-t tartalmazó epemintákat vizsgáltuk, ami jelzi, hogy a vizsgálati eljárás nem mutatja ki az α GST ilyen szintjeit.
7. minta A vizeletmintában jelenlevő α GST-t kimutattuk.

Az eljárás elve és az eredmények értékelése a 4. példa esetében

Amint a vizsgált minta vándorol a nitrocellulóz membrán mentén, keveredik az α GST elleni, arannyal jelölt antitestekkel a membránszalagon. Ha a keverékben α GST van jelen, a jelölt α GST elleni antitestek megkötik az α GST-t antigén-antitest komplexet képezve. Ez a komplex felfelé vándorol a szalagon és hozzáköt az immobilizált α GST elleni IgG-hez a membránon rózsaszín-piros csíkot (csapadék) adva. Amennyiben nincs jelen α GST a keverékben, a GST elleni, arannyal jelölt antitestek egészen a membrán tetejéig vándorolnak és nem adnak megfigyelhető csíkot (csapadékot).

Az eljárást bemutatjuk az 2. ábrára hivatkozva is. Az 1. ábrán egy általános formában ábrázolt, 20-szal jelölt, nitrocellulózmembrán-szalag látható; 21-gyel jelölt végéhez közel a 22-vel jelölt területet α GST elleni, arannyal jelölt antitestek vannak. A 20-szal jelölt szalagon, feljebb a 23-mal jelölt területen, egy csíkban, immobilizált, α GST elleni antitestek vannak. A mintát a

21-gyel jelölt végre visszük fel, az pedig a szalag mentén a 24-gyel jelölt vég felé vándorol. Eközben keveredik az α GST elleni, arannyal jelölt antitestekkel a 22-vel jelölt helyen, és az α GST, ha jelen van a mintában, kötődik az arannyal jelölt antitestekhez antitest-antigén komplexet alakítva ki. Ez a komplex kötődik a GST elleni IgG-hez, ami a 23-mal jelölt helyen van immobilizálva, és rózsaszín-piros vonalként jelentkezik. Amennyiben nincs a mintában jelen α GST, nem keletkezik ez a rózsaszín-piros vonal a 23-mal jelölt helyen.

5. példa

Részecske-alapú vizsgálati eljárás π GST kimutatására

1. π GST elleni IgG-t (egér eredetű, monoklonális; 0,6 mg/ml, PBS-ben) csöpögtettünk nitrocellulózmembrán-szalagokra (1 μ l/pötty=0,6 μ g). A membránkészítés során nem alkalmaztunk blokkoló lépést, ennek beiktatása azonban elősegítheti a szalag stabilitását és redukálhatja a nem specifikus kötődést.
2. π GST elleni (nyúl eredetű, poliklonális) antitesteket jelöltünk (40 nm átmérőjű) aranyrészecskékkel egy szerződéses előállító segítségével, aki nek a részére az antitesteket mi biztosítottuk. A jelölt antitesteket 0,1%-os nátrium-azidban 2 mM-os nátrium-tetraborát hígítópufferben (pH 7,2) tároltuk.

A vizsgálati eljárás lépései

1. A π GST-tartalmú mintákat (egyenként 10 μ l-esek, koncentrációjuk 1-500 μ g/ml) összekevertünk egy adott térfogatú (50 μ l) arannyal jelölt, π GST elleni IgG-vel és az alábbi hígítószer 140 μ l-ével:

1% marha szérum albumin

1% TWEEN-20 (A %-ok vegyesszázalékot jelentenek)

PBS-ben, pH 7,2

és az alábbiakban leírtak szerint megvizsgáltuk azokat.

2. Az előzetesen π GST elleni IgG-vel (0,6 μ g/pötty) burkolt nitrocellulóz membránt a keverékbe merítettük és 3-15 percig ott hagytuk.

A vizsgálat

A gyors vizsgálati eljárást a következő mintákon hajtottuk végre.

1-4. minta π GST-t tartalmazó puffer;

5. minta puffer önmagában; és

5-15. minta π GST-t tartalmazó vizelet, epe és plazma, az 1. táblázat szerint.

A 7. és 8. mintába (vizelet) és a 12. valamint a 13. mintába (plazma) tisztított π GST-t juttattunk. Az epeminták azonban saját pGST-t tartalmaztak.

1. táblázat

minta száma	kezdeti konc. (ng/ml)	végző konc. (ng/ml)	jelenlévő mennyiség(ng)
1	500 000	25 000	5 000
2	50 000	2 500	500
3	5 000	250	50
4	1 000	50	10
5	0	0	0
6 (vizelet)	30	1,5	0,3
7 (vizelet)	1 000	50	10
8 (vizelet)	5 000	250	50
9 (epe)	150	7,5	1,5
10 (epe)	>5 000	>250	>50
11 (epe)	3730	186.5	37.2
12 (plazma)	1 000	50	10
13 (plazma)	5 000	250	50
14 (plazma)*	1 000	250	50
15 (plazma)	120	6	1.2

*(50 μ l minta + 50 μ l arannyal jelölt, π GST elleni IgG és 100 μ l hígítópuffer)

Eredmények

Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat	
minta száma	eredmények
1. minta	igen
2. minta	igen
3. minta	igen
4. minta	igen
5. minta	nem
6. minta	nem
7. minta	igen
8. minta	igen
9. minta	nem
10. minta	igen
11. minta	igen
12. minta	igen
13. minta	igen
14. minta	igen
15. minta	nem

A fenti eredményekből látható, hogy a π GST kimutatható a vizelet-, az epe- és a plazmamintákban. A vizsgálati eljárás érzékenysége úgy tűnik, 50 ng körül van, de valószínű, hogy az eljárás optimalása ezt a szintet javíthatná. Biológiai mintákban azonban (pl. epében és szöveten átáramoltatott közegben) megfigyelték már a π GST ilyen szintjét.

A vizsgálati eljárás ezen megvalósítási formájában monoklonális-poliklonális antitest-szendvics alkalmazása bizonyult szükségesnek ahhoz, hogy kimutathassuk a π GST-t. Lehetséges azonban, hogy ha elegendően érzékeny poliklonális antitestet azonosítanánk, ez az IgG működőképesnek

bizonyulna a vizsgálati eljárás megvalósítása során (ahogy az a fentiekben leírt, α GST kimutatására szolgáló gyors megvalósítási formájú vizsgálati eljárás esetében is volt). Másik lehetőségként elképzelhető, hogy egy monoklonális-monoklonális típusú vizsgálati eljárás szintén kielégítő eredmény adna.

6. példa

Részecske-alapú vizsgálati eljárás π GST kimutatására

1. π GST elleni IgG-t (egér eredetű, monoklonális; 0,6 mg/ml, PBS-ben) immobilizáltunk nitrocellulózmembrán-szalagokra (0,5*4 cm).
2. A csíkokat blokkoltuk a következőképpen: 30 percig inkubáltuk őket szobahőmérsékleten 2%-os sovány tej és 2%-os polivinil-pirrolidon sós tris-pufferrel készült oldatában, pH 7,4-en, 0,5% Tween-20 jelenlétében (a %-ok vegyesszázalékok).
3. A szalagokat desztillált vízzel öblítettük, majd 1 órán keresztül szárítottuk szobahőmérsékleten.
4. π GST elleni antitesteket jelöltünk (40 nm átmérőjű) aranyrészecskékkel egy szerződéses előállító segítségével, akinek a részére mi biztosítottuk az antitesteket. A jelölt antitesteket 0,1%-os nátrium-azidban 2 mM-os nátrium-tetraborát hígítópufferben (pH 7,2) tároltuk.

A vizsgálati eljárás lépései

1. A π GST-tartalmú mintákat összekevertünk egy adott térfogatú arannyal jelölt, π GST elleni IgG-vel 7,4-es pH-jú sós tris-puffert alkalmazva hígítópufferként, amely 0,5% (vegyesszázalék) Tween-20-at tartalmazott.
2. Az előzetesen π GST elleni IgG-vel (0,6 μ g/pötty) burkolt nitrocellulóz membránt a keverékbe merítettük és 30 percig ott hagytuk.

A vizsgálat

A gyors vizsgálati eljárást a következő mintákon hajtottuk végre.

1. minta π GST 250 ng/ml-es koncentrációban
2. minta hígítópuffer önmagában

Eredmények

1. minta: egy tiszta, detektálható jelet kaptunk a vizsgálati eljárás végrehajtása során.

2. minta: nem kaptunk jelet, amikor a hígítópuffert önmagában vizsgáltuk.

Az eljárás elve és az 5. és 6. példában kapott eredmények értelmezése

Az arannyal jelölt π GST elleni IgG felfelé vándorol a membránban. Ha π GST van jelen a keverékben, az arannyal jelölt IgG π GST-vel képzett komplexe az immobilizált π GST elleni monoklonális IgG-hez köt a membránon, és egy rózsaszín-piros csíkot (csapadékot) hoz létre. Amennyiben nincs a mintában π GST, az arannyal jelölt π GST elleni IgG a kromatográfiásan a membrán tetejére vándorol, ekkor nem figyelhetünk meg csíkot (csapadékot).

Nyilvánvaló, hogy a vizsgálati eljárás ezen megvalósítási formája lényeges előrelépést jelent, ha a hagyományos mikrotiter-lemez alapú vizsgálati eljárásokkal hasonlítjuk össze, mivel csupán egyetlen lépésből áll a végrehajtása.

7. példa

Részecske-alapú vizsgálati eljárás π GST kimutatására

1. π GST elleni IgG-t (egér eredetű, monoklonális; 0,6 mg/ml, PBS-ben) immobilizáltunk nitrocellulózmembrán-szalagokra (0,5*4 cm) a szalag tetejétől kb. 1 cm-re eső területen.
2. A csíkokat blokkoltuk a következőképpen: 30 percig inkubáltuk őket szobahőmérsékleten 2%-os sovány tej és 2%-os polivinil-pirrolidon sós tris-pufferrel készült oldatában, pH 7,4-en, 0,5% Tween-20 jelenlétében (a %-ok vegyesszázalékok).
3. A szalagokat desztillált vízzel öblítettük, majd 1 órán keresztül szárítottuk szobahőmérsékleten.
4. π GST elleni antitesteket jelöltünk (40 nm átmérőjű) aranyrészecskékkel egy szerződéses előállító segítségével, akinek a részére az antitesteket mi

biztosítottuk. A jelölt antitesteket 0,1%-os nátrium-azidban 2 mM-os nátrium-tetraborát hígítópufferben (pH 7,2) tároltuk.

5. Az arannyal jelölt antitesteket a nitrocellulózmembrán-szalagokra vittük fel a szalag tetejétől kb. 3 cm-re eső területre. Az arannyal jelölt antitestek felvitele előtt a szalagra egy alsó réteget vittünk fel 30% desztillált vízzel készült cukoroldatból.

A vizsgálati eljárás lépései

1. A π GST-tartalmú mintákat felvittük a nitrocellulózmembrán-szalagokra.

A vizsgálat

A gyors vizsgálati eljárást a következő mintákon hajtottuk végre.

1. minta π GST 250 ng/ml-es koncentrációban, 0,5% Tween-20-at tartalmazó, pH 7,4-es sós tris-pufferben mint hígítópufferben.
2. minta π GST 25 ng/ml-es koncentrációban, 0,5% Tween-20-at tartalmazó, pH 7,4-es sós tris-pufferben mint hígítópufferben.
3. minta hígítópuffer önmagában

Eredmények

1. minta: egy tiszta, detektálható jelet kaptunk a vizsgálati eljárás végrehajtása során, a jel intenzitása pedig egyenesen arányos volt a π GST-koncentrációval.
2. minta: nem kaptunk jelet, amikor a hígítópuffert önmagában vizsgáltuk.

Az eljárás elve és a 7. példában kapott eredmények értelmezése

Ahogy a vizsgált minta vándorol a nitrocellulózmembrán-szalag mentén, keveredik az arannyal jelölt, π GST elleni antitestekkel a szalagon. Amennyiben π GST van jelen a mintában, a jelölt π GST elleni antitestek hozzákötődnek a π GST-hez, és így antigén-antitest komplex keletkezik. Ez a komplex köt azután a szalagon immobilizált, π GST elleni IgG-hez, rózsaszín-

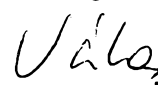
piros jelet hozva létre. Amennyiben nincs jelen a mintában π GST, a jelölt, π GST elleni antitestek a szalag tetejére vándorolnak és nem figyelhetünk meg csíkot. Ez az eljárás tehát megfelel annak, amelyet a 4. példában leírtunk és a 2. ábrán mutatunk be.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás Glutation-S-transzferáz egy vagy több izoenzimjének különböző biológiai folyadékokban történő kimutatására, szervi állapot gyors értékelésére egy vizsgált személyben azzal jellemezve, hogy az izoenzimre specifikus, részecskejelölt, GST elleni antitestet, amely elég érzékeny ahhoz, hogy az izoenzimet legalább pikomoláris mennyiségben kimutassa, kontaktusba hozunk egy, az izoenzimet feltételezhetően tartalmazó biológiai eredetű folyadékmintával, és a részecskejelölt antitestnek izoenzimmel képzett komplexét egy immobilizált "befogó" antitest segítségével "befogjuk", amivel vizuálisan észlelhető jelet hozunk létre.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy GST-izoenzimként alfa-GST-t (α GST) mutatunk ki.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy GST-izoenzimként pi-GST-t (π GST) mutatunk ki.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy GST elleni antitestként poliklonális antitestet alkalmazunk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy GST elleni antitestként egy, α GST-t 6,5 ng/ml-es koncentrációban is kimutató affinitású, α GST elleni antitestet alkalmazunk.
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a "befogó" antitestet nitrocellulóz membránhoz kötjük.
7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nitrocellulóz membránon előforduló nem specifikus kötőhelyeket blokkoljuk.
8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a biológiai eredetű folyadékot meghígítjuk.
9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy biológiai eredetű folyadékként epét, plazmát, szérumot vagy vizeletet alkalmazunk.

10. Az 1-8-ig terjedő igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy biológiai eredetű folyadékként szerven átáramoltatott folyadékot alkalmazunk, és az eljárást arra használjuk, hogy egy szervet beültetés előtt vagy ex vivo kísérletezés során értékeljük.
11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy részecskékként aranyrészecskéket alkalmazunk, amelyek átlagos átmérője a 15 és 40 nm közötti mérettartományba esik.
12. Reagenskészlet az 1-11-ig terjedő igénypontok bármelyike szerinti eljárás megvalósítására, amely GST-izoenzimre specifikus, részecskejelölt, GST elleni antitestet tartalmaz.

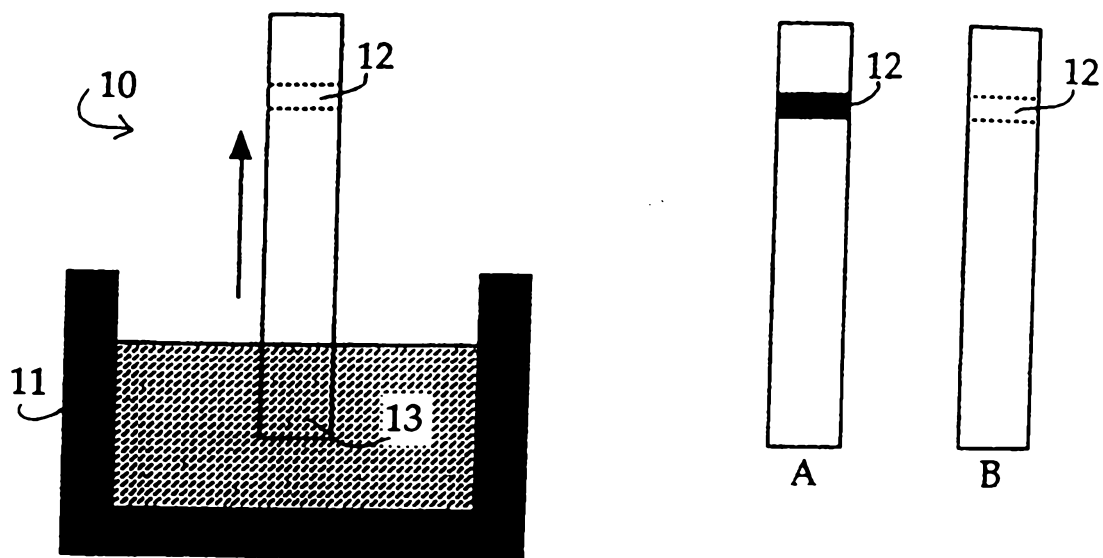
A bejelentő helyett
a meghatalmazott:

 
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
1.

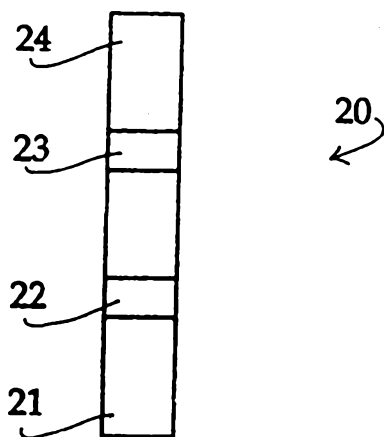
29 oldal + 4 oldal

H

09.10.05.



1. ábra



2. ábra