



75069

62.725/SZE

" A "

K I V O N A T

Módszer nukleinsav kimutatására ribopróbák, RNáz enzimes emésztés és
molekulatömeg-kizárásos kromatográfia alkalmazásával

AMGEN INC., THOUSAND OAKS, CA,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1994. 10. 19.

Elsőbbsége: 1993. 10. 22. (08/141,711),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/12044

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/12044

A találmány tárgya eljárás cél-nukleinsavszekvencia kimutatására RNS próba
alkalmazásával.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy az eljárás az alábbi lépésekből áll:

- a) szigorú körülmények között oldatban összehozzuk a nukleinsavmolekulák
állományát egy olyan RNS próbával, mely képes hibridizálni a cél-
nukleinsavszekvenciát kódoló célnukleinsavval, egy próba/célmolekula hibrid
nukleinsavmolekulát képezve;
- b) a hibridizációt követően az a) lépésnél szereplő oldatot RNáz-zal kezeljük;
- c) a próba/célmolekula hibrid nukleinsavmolekulákat elválasztjuk az oldat többi
alkotórészeitől;
- d) kinyerjük és detektáljuk a c) lépésnél szereplő próba/célmolekula hibrid
nukleinsavmolekulákat.

P9C02069

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

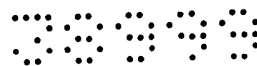
S.B. & K.

Szabványozási

Szakosztály Iroda

H-1062 Budapest, Andrássy út 115.

Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



62.725/SZE

|| A''

Módszer nukleinsav kimutatására ribopróbák, RNáz enzimes emésztés és
molekulatömeg-kizárásos kromatográfia alkalmazásával

AMGEN INC., THOUSAND OAKS, CA,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók:

MARTIN Francis, H., NEWBURY PARK, CA,

JACOBSEN Frederick, W., THOUSHAND OAKS, CA,

GREEN CALVERT L., HERMANDO, FL,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1994. 10. 19.

Elsőbbsége: 1993. 10. 22. (08/141,711),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/12044

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/11316

A találmány meghatározott nukleotidszekvenciák kimutatására szolgáló diagnosztikai módszerekkel foglalkozik. Közelebbről, a módszer olyan detektálható ribonukleinsav próbákat alkalmaz, melyek a kimutatandó nukleotid célszekvenciával komplementerek.

A nukleinsavhibridizáció egyike a legfontosabb fizikai jelenségeknek, melyeket a molekulárbiológusok használnak. Elsőként James Watson és Francis Crick ismerték fel 1953-ban a DNS kettős helikális modelljén keresztül, hogy az egyszálú nukleinsav molekula egy kétszálú hibridet képezve hibridizálni képes egy másik olyan nukleinsav molekulával, mely komplementer nukleotidszekvenciát kódol. 1961-ben Hal és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 47:131] részletesen leírják a komplementer nukleinsavmolekulának azt a képességét, hogy a nem-komplementer nukleinsavakban bővelkedő keverékekben nagy hatékonysággal és figyelemre méltó specifitással képesek kétszálú hibrideket képezni.

E kezdeti felfedezések óta a nukleinsavhibridizáció sok, ha nem valamennyi, molekulárbiológus számára alapvető technikává vált. A nukleinsav próbákat használják például humán, növényi és állati patogének jelenlétének diagnosztizálására, adott gének azonosítására és elkülönítésére, génfunkciók és szerkezetek tanulmányozására, genetikai rendellenességek vagy bizonyos betegségek genetikai fogékonyságának kimutatására, törvényszéki célokra és szövetekben és sejtekben adott nukleinsavak in situ hibridizációval történő kimutatására.

A különböző hibridizációs technikáknak széles tartománya áll rendelkezésünkre, kezdve a szilárd hordozón kötött nukleinsavmolekuláknak folyékony fázisból történő hibridizálásra való felhasználásától az in situ hibridizációig. Valamennyi nukleinsavhibridizációs technikán azonban egy közös elv vonul végig, nevezetesen a nukleotidszekvenciák specifikus bázispárosodása egy ismert szekvenciát kódoló

egyszálú nukleinsavmolekula (a „próba” molekula vagy szekvencia), valamint egy kiegészítő „cél” szekvenciát kódoló másik nukleinsav molekula - azaz a „cél” nukleinsavmolekula - között.

Mint valamennyi diagnosztikai eljárásnál és kutatási technikánál, fontos ismerv a gyorsaság, az érzékenység, a specifitás, a könnyű alkalmazhatóság és az alacsony felhasználási költség. Így például a fertőző betegségek hatásos kezelése olyan diagnosztikai eljárásokat igényel, melyekkel a kórokozó(k) kimutatható(k). Vírusok esetében több diagnosztikai módszer ismert. Az egyik ilyen módszer sejtenyészeteket használ fel a klinikai mintákból származó kórokozók elkülönítésére. Noha ez a kimutatási módszer igen érzékeny, ugyanakkor nagyon költséges, idő- és munkaigényes is, és csak speciális esetekben hajtható végre.

Adott vírusok jelenlétére szolgáló másik kimutatási módszer az immunvizsgálati eljárás, ami standardizált reagensek felhasználásával nagyszámú minta egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé. Ez az eljárás azonban attól függ, rendelkezésre áll-e a közvetlen detektáláshoz szükséges vírusos antigén elem vagy termelődik-e specifikus antitest. Nyilvánvaló, hogy, ha a vírus termelése és/vagy izolálása nem megoldott, vagy, ha a vírusos antigének termelődése gyenge, vagy a gazdaszervezetet nem stimulálja immunválaszra, akkor a vírus jelenlétét kimutató más módszerre van szükség. Az egyik ilyen módszer a nukleinsavhibridizáció.

A nukleinsavhibridizáció betegségokozó baktériumok kimutatására is felhasználható. A szokásos baktériumdiagnosztizáló eljárások a minta festésén és mikroszkópos vizsgálatán alapszanak. Noha ez az eljárás gyors, de érzéketlen és nem-specifikus lehet. Ezért a legtöbb mintát tenyésztik a baktériumok felszaporítása és az adott bakteriális kórokozó azonosítása céljából. Az antitest reaktivitáson, a kémiai reaktivitáson és/vagy különféle táptalajok iránti szelektivitáson alapulva azután levonhatjuk az adott baktérium jelenlétére való következtetésünket. Minthogy a

módszerekhez a baktériumokat tenyésztetni kell, az azonosítás időt vesz igénybe, ami egy naptól néhány hétig terjedhet. Túl az idő- és költségtényezőkön, ezek a szokásos baktériummeghatározási eljárások téves eredményekhez vezethetnek az olyan baktériumok esetében, melyeknél a tenyésztési körülmények nem specifikusak vagy nincs specifikus antitestválasz. Természetes, hogy gyorsabb, pontosabb és olcsóbb diagnosztikai módszerekre van szükség.

A fertőző ágens - legyen az baktérium, gomba vagy vírus - jelenlétének kimutatása mellett, lehetőségünk nyílik a nukleinsavak specifikus nukleotidszekvenciájának kimutatására is. Ez az eljárás tehát az orvosi gyógyászatban felhasználható a genetikai betegségek diagnosztizálásánál is. Ezek a betegségek az egyén DNS-ének megváltozásával kapcsolatosak. Ezek a változások kiterjedhetnek csak egy nukleotid megváltozására - annak deléciója, beépülése vagy cseréje révén (például a sarlós sejtvesztésnél) -, olyan nagy kromoszómális rendellenességre, ami már fénymikroszkóppal is megfigyelhető, mint amilyen a triszómia 21 (Down szindrómával kapcsolatban) vagy olyan, a nagy kiterjedésű transzlokációra vagy delécióra, amelyek bizonyos neoplasztikus betegségekkel kapcsolatosak, mint amilyen a leukémia vagy más betegségek. A nukleinsav próbák többek között segítségünkre lehetnek abnormális fenotípusok diagnosztizálásánál, bizonyos örökletes betegségekre való hajlam megállapításánál, vagy annak megállapításánál, hogy valaki egy genetikai rendellenesség génjeit vagy génjét hordozza-e és a születés előtti diagnózis felállításánál.

A betegségek diagnosztizálása mellett, a nukleinsavhibridizáció hatékony kutatási eszköz is, lehetővé téve a kutatók számára a génszerkezet, génműködés és génszerveződés alapvető aspektusainak tanulmányozását. Ez a technika lehetővé teszi még fel nem fedezett gének azonosítását és elkülönítését, valamint eszközt nyújt ismert gének transzkripció szabályozásának analíziséhez.

Jelenleg már több nukleinsavhibridizációs módszer van. A különféle nukleinsavak hibridizációs reakciójának kinetikája jólismert; lásd: Britten és munkatársai, *Methods Enzymol.* 16. köt., 363. old. (1974); Kohne és munkatársai, *Biochemistry*, 16:5329 (1977); Orosz és munkatársai, *Biopolymer*, 16:1183 (1977). Röviden, ha a két reagáló szál egyike feleslegben van jelen (a „hajtó”), a reakciósebesség csökken, ha a hajtó koncentrációja csökken. Ennek ellenkezője is igaz, azaz, növelve a hajtó koncentrációját, fokozódik a hibridizáció sebessége. Hasonlóképpen, a hőmérséklet ugyancsak befolyásolja a hibridizáció sebességét. A megfelelő hosszúságú szálaknál a maximális sebességet akkor érjük el, ha a hibridizációt 15-50°C-kal a T_M (az „olvadáspont”: az a hőmérséklet, melynél a kettős szálak 50 %-a egyes szálakká disszociált) alatt végezzük. 0,4 M elektrolit - például nátrium-klorid - koncentráció alatt a nukleinsavhibridizáció reakciósebességét az ionerősség is befolyásolja. E felett a sókoncentrációnak már kisebb befolyása van a sebességre. Extrém magas sókoncentráció - például 2-4 M vagy nagyobb - azonban lényegesen megnöveli a nukleinsavhibridizáció sebességét; lásd például a 0 229 442 számú európai szabadalmi bejelentés (közzétéve: 1987. július 22-én).

A fő korlátozó tényező azonban az alap-reakciósebesség. A reakcióidő néhány órától napokig változhat. A hibridizáció sebességének növelésére különböző technikákat fejlesztettek ki, úgymint térfogatkizárás az RNS:DNS hibridizációknál [Renz és munkatársai, *Nucl. Acid. Res.*, 12:3435-3444 (1984)], többfázisú emulziók a DNS:DNS reakciókhoz [Vank Nes és munkatársai, *Nucl. Acid. Res.*, 10:8061-8067 (1982)], beállított sókoncentráció DNS:DNS és DNS:RNS hibridizációknál [Khone és munkatársai, *Biochemistry*, 16:5329 (1977)] és egy vagy több nukleinsavkicsapó ágens alkalmazása [0 229 442 számú európai szabadalmi bejelentés, lásd fent).

A hibridizációs reakció sebessége mellett más tényezők is fontosak. Így például, a szokásos szűrős hibridizációs technikánál, ahol a célnukleinsav - rendszerint DNS -

egy alkalmas szubsztráthoz (például nitrocellulóz vagy nejlon membránhoz) kötött, további olyan lépések jelentkeznek, melyek időt és jártasságot igényelnek. Ide tartozik a célnukleinsavat tartalmazó minta felvitele a szűrőre, a célnukleinsav denaturálása és tartós hozzákötése a szubsztráthoz, a hibridizációs reakció elvégzése a nukleinsav próbával, a nem hibridizálódott próba kimosása és végül a hibridek láthatóvá tétele (ez általában autoradiográfiával történik, amikor radioaktívan jelzett próbákat alkalmazunk).

A szűrőn történő hibridizációs módszer reprodukálhatóságát különféle tényezők befolyásolják. Ilyen a szűrőn kötve maradt minta mennyisége, a kötődés heterogenitása és a minta pontos lokalizálása. Ezek a tényezők a mennyiségi meghatározások variabilitását okozhatják és megnehezítik az eljárás automatizálását. Továbbá a szűrőhöz kötött célnukleinsavnak csak egy kis része képes hibridizálódni a próbával, csökkentve ezáltal az érzékenységet.

E hátrányok közül több elkerülhető, ha szendvics hibridizációs eljárást alkalmazunk, ahol két nukleinsav próbát használunk, melyek a célnukleinsav különböző szekvenciáival komplementerek. A diagnosztikai készlet általában tartalmaz már egy, a specifikus pozíciókhoz kötött egyik próba ismert mennyiségét tartalmazó szubsztrátot. A szükséges előkészítő lépések után a célnukleinsavat hibridizáljuk az első, kötött próbával. A célnukleinsav/első próba hibridjeit detektáló második próbát vagy a célnukleinsavat tartalmazó mintával vagy a célnukleinsavnak az első próbához való hibridizációja után adjuk a rendszerhez. Részletesebb leírást nyújt a 4 925 785 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom.

A hordozóhoz kötött próbával vagy célnukleinsavval végzett hibridizáción kívül végezhetünk oldott (vagy folyékony) állapotban lévő hibridizációt is. Nobrega és munkatársai [Anal. Biochem., 131:141-151 (1983)] leírnak egy eljárást RNS kimutatására, melynél az oldatban végzett hibridizációhoz DNS próbákat alkalmaznak. A hibridizálás után a nem hibridizálódott próbát a kettős szálú próba/célnukleinsav

hibridtől agaróz-gélelektroforézissel választják el. A hibrid nukleinsavakat ezután autoradiográfiával mutatják ki.

1987-ben Thompson és Gillespie [Anal. Biochem., 163:281-291 (1987)] beszámolnak róla, hogy a célnukleinsavat tartalmazó biológiai mintát kaotropikus oldatban oldják, majd a feleslegben adott próbanukleinsavval közvetlenül az oldott mintában hibridizálnak. A nukleinsavakat nitrocellulózra való szűréssel összegyűjtik és autoradiográfiával vagy szcintillációs számlálással detektálják. Úgy találták, hogy az RNS próbák előnyösebbek, mert a szűrés után RNáz-os kezeléssel és szűréssel eliminálni lehet a próba és a nem-komplementer célmolekulák között létrejött komplexeket.

Pellergino és munkatársai [BioTechniques 5(5):452-459 (1987)] módosítással javítják Thompson és Gillespie fenti eljárását, ezáltal nagyobb kimutathatósági érzékenységet érnek el. Eljárásuknál a minta sejtjeinek guanidin-tiocianátos szétbontását alkalmazzák, és a hibridizációs analízist alacsony koncentrációban lévő RNS-sel végzik. Ha a célnukleinsav RNS, a hibridizáció 44 órán át tart, ezt követi egy RNáz-os kezelés, hogy elbontsák a nem hibridizálódott próbát, mielőtt a próba/célnukleinsav hibridet kicsapják egy nitrocellulóz vagy nejlon membránra. Ha azonban a célmolekula DNS, a hibridizáció 30 órán át tart, majd ezt követi a nitrocellulóz membránon keresztül történő szűrés. A szűrőt ezután RNáz-zal kezelik, hogy a nem hibridizálódott próbát elbontsák. A radioaktivitást mindkét esetben szcintillációs számlálással mérik.

A hírvívő RNS (mRNS) mennyiségi méréséhez McKnight és munkatársai [Methods Enzymol., 159. köt. 299-311 (1988)] oldott állapotban történő hibridizációt használtak. Eljárásukban a célszekvenciát kódoló, betöményített és előzetesen tisztított össznukleinsavat egy éjszakán át oldatban egy specifikus RNS próbával hibridizálják. A reakcióelegyben a célmolekula feleslegben van és alacsony az ionerősség.

Ezt követi egy RNáz-os kezelés, majd egy triklór-ecetsavas (TCA) lecsapás egy szilárd hordozóra. A radioaktivitást folyadék szcintillációs számlálással mérik.

A 0 278 220 európai szabadalmi bejelentés (közzétéve: 1988. augusztus 17-én) kvantitatív nukleinsavhibridizációs vizsgálatot ír le biológiai mintákban lévő DNS vagy RNS célmolekulák kimutatására. A módszerben a célnukleinsavak nyers vagy tisztított állományát alkalmazzák. Csaknem bármilyen specifikus hosszúságú próba elkészíthető a primer extenziós módszerrel, ahol a próba hosszának szabályozása a nukleotidok egyikének korlátozott koncentrációjával történik. Az adott próbát aztán oldatban hibridizálják a célmolekulával. A hibridizációs elegy ionerőssége 0,15 és 0,9M közé esik, a hibridizáció általában 16 órán át tart. A hibridizáció után a nem-hibridizálódott próbát a kétszálú hibridtől kizárásos kromatográfiával választják el, lehetővé téve, hogy a célmolekulához kötött próbát elválasztva detektálják, anélkül tehát, hogy a nem-hibridizált próba erős háttérrel adna. A tér-fogatkizárásos oszlopról származó mintában a radioaktivitást szcintillációs számlálással mérik.

Ellentétben a fenti módszerekkel, a találmány szerinti eljárás a nyers, nem tisztított biológiai mintákban lévő célnukleinsavak - legyen az DNS vagy RNS - egy nap vagy még rövidebb idő alatt elvégezhető, érzékeny kimutatására nyújt lehetőséget. Az eljárás az oldott állapotban történő hibridizációs reakcióhoz egy meghatározott RNS próbát alkalmaz, ezt követi az RNáz-os emésztés, az oszlopkromatografálás, majd a próba/célmolekula hibrid detektálása.

A találmány leírásában használt kifejezéseket az alábbiak szerint értelmezzük, hacsak másként nem jelezzük.

„Hibridizáció” - egymásnak megfelelő (komplementer) nukleotidszekvenciákat tartalmazó két, nukleinsavmolekula felmelegítés utáni lassú lehűtéssel végrehajtott összekapcsolása („annealing”), ahol a nukleinsavmolekulák egymástól eltérő forrásból származnak. „Renaturáció” - a hibridizációtól eltérően, olyan két komplementer,

egyszálú nukleinsavmolekula újbóli asszociációját jelenti, melyeket előzőleg denaturláltunk. „Szigorú” hibridizációról beszélünk, ha a hibridizációs körülmények az egymásnak megfelelő nukleotidszekvenciák összekapcsolódását (annealingjét) elősegítik, de a nem komplementer molekulákét gátolják. A hibridizációt befolyásoló tényezők: a próba mérete és nukleotid összetétele, a hőmérséklet, a sókoncentráció, az ionerősség, a pH, a reaktánsok koncentrációja, más molekulák jelenléte, ideértve a kootropikus molekulákat, stb.

„Hibrid” - a „cél” nukleinsavmolekula és a „próba” nukleinsavmolekula hibridizációjának eredményeként létrejött kettős szálú nukleinsavmolekula. Az itt használt „hibrid” kifejezésen RNS/DNS és RNS/RNS kettősöket értünk, hacsak másként nem jelezzük. A „cél”nukleinsavmolekula lehet DNS vagy RNS. A „próba” nukleinsavmolekula RNS és magába foglalhat számos nukleotid-analógot és/vagy nem-nukleotid adduktot is. A nukleinsavmolekulák „állománya” egy vagy potenciálisan sokkal több nukleotidszekvenciát kódoló nukleinsavmolekulák elegye. Az „állomány” vagy tartalmazza, vagy nem, a keresett - azaz „cél”- nukleotidszekvenciát. Az adott célnukleinsav-molekula jelenlétére és, ha szükséges, mennyiségére csak az adott próbával történő hibridizáció és az azt követő vizsgálati lépések után lehet következtetni.

A találmány tárgya javított eljárások, meghatározott nukleinsavszekvenciák kimutatására. Általánosságban elmondva, az eljárás áll: (1) a nukleinsavak állományának és egy RNS próbának oldatban történő összehozásából, ahol az RNS próbát úgy tervezzük meg, hogy hibridizálódjon a célnukleinsav-szekvenciát kódoló molekulákkal. A „szigorú” körülményeket úgy választjuk meg, hogy egy próba/célmolekula kettős szálú hibrid keletkezzen; (2) a nem hibridizálódott próbamolekulákat RNázal elbontjuk; (3) elválasztjuk a hibrid nukleinsavakat a reakcióelegy többi alkotórészeitől; (4) kinyerjük és detektáljuk a próba/célmolekula hibrideket.

A találmány egyik szempontja, hogy milyen típusú célnukleinsav-molekulákat kívánunk detektálni. Az egyik megvalósítási módnál a célnukleinsav-szekvenciát DNS, míg a másiknál RNS kódolhatja. Mindegyik esetben származhat a nukleinsavak állománya biológiai mintából. Egyik sajátos eset, amikor a célnukleinsav-szekvencia egy kórokozó, közelebbről vírus, baktérium vagy gomba jelenléte jelzi.

Egy másik megvalósítási módnál a neoplazmát - legyen az jóindulatú vagy rosszindulatú - detektáló sajátos célnukleinsav jelenlétét vagy hiányát mutatjuk ki. A jelenlévő célnukleinsav mennyisége is meghatározható, Egy további megvalósítási módnál öröklődő genetikai betegség vagy genetikai marker megléte mutatható ki az adott célnukleinsav-szekvencia kimutatása révén. Továbbá, egy adott öröklődő genetikai rendellenességhez specifikus genetikai marker kapcsolódhat. További megvalósítási módok a törvényszéki vizsgálatoknál és a génexpresszió analízisnél nyújtanak alkalmas vizsgálati módszereket. E módszerek egyaránt irányulhatnak a célszekvencia lokalizációjára és mennyiségi meghatározására is.

A találmány további szempontja az RNS próbához kovalensen kötődő, detektálható jelzőanyagokra irányul. A detektálható jelzőanyagok révén kimutatható a próba/célmolekula hibrid jelenléte. Alkalmas detektálható jelzőanyagok lehetnek például a radioizotópok, fluoreszcens molekulák, kemilumineszcens molekulák, specifikus kötőpárok tagjai, de a jelzőanyagok nemcsak az említettekre korlátozódnak. A találmány egyik megvalósítási módjánál radioizotópot használunk detektálható jelzőanyagként. A mellékelt módszereknél alkalmazott radioizotópok: a ^3H , ^{125}I , ^{32}P és ^{35}S . Előnyös megvalósítási mód, melynél a ^{35}S szolgál jelzőként, de más megvalósítási módnál használhatunk ^{32}P -t. Egyik alternatív megvalósítási mód, ahol specifikus kötőpárt alkalmazunk, különösen avidint vagy sztreptavidint, melyekből aztán biotinnal komplexet képzünk.

A találmány további szempontja azokra a körülményekre irányul, melyek között az oldott állapotban végrehajtott hibridizációt végezzük. Az olyan környezeti tényezők, mint a hőmérséklet, pH és az elektrolitkoncentráció, fontos szerepet játszanak. Előnyös megvalósítási módnál az oldott állapotban történő hibridizációt 15-30°C-kal a próba/cél-molekula hibrid olvadáspontja alatt végezzük; az előnyös pH tartomány 6,6-7,2, az elektrolitkoncentráció 2,0-3,5 M. Különösen előnyös, ha a kémhatás $\text{pH} = 6,9 \pm 0,2$, még előnyösebb, ha a $\text{pH} = 6,9 \pm 0,05$ és az elektrolitkoncentráció RNS-hez $2,75 \pm 0,2\text{M}$, még előnyösebben $2,75 \pm 0,05\text{M}$. Ha a célnukleinsav DNS, az elektrolitkoncentráció gyakran valamivel alacsonyabb, általában $2,5 \pm 0,2\text{M}$. Egy másik előnyös megvalósítási módnál az oldott állapotban végzett hibridizáció $84 \pm 4^\circ\text{C}$ hőmérsékleten történik, amikor a célnukleinsav RNS. Ugyanez DNS célnukleinsav esetében $72 \pm 4^\circ\text{C}$.

A találmány további szempontja arra az időtartamra irányul, mely az oldott állapotban történő hibridizációhoz szükséges. Az egyik megvalósítási módnál ez az időtartam 1-8 óra, különösen előnyös, ha 2 óra.

A találmány további szempontjának tárgya a próba/célmolekula hibrid elválasztása az elegy többi alkotórészétől. Előnyös megvalósítási mód, ha az elválasztásnál molekulatömeg-kizárásos kromatográfiát alkalmazunk.

A találmány egy másik szempontja a próba/célmolekula hibrid kimutatásához használt módszerre irányul. Az egyik megvalósítási mód, hogy folyadékszintillációs módszert alkalmazunk.

Az ábrák rövid ismertetése:

Az 1. ábra a detekciós számítások tipikus behatároltságát mutatja be. A pSP65/HPV16 célnukleinsavnál, ha az itt leírt módszer szerint próbaként HPV 16 B fragmens ribopróbát alkalmazunk, a kimutathatósági határ 0,04 amól célnukleinsav.

A 2. ábra grafikusan mutatja be a $\text{Na}_{1,5}\text{H}_{1,5}\text{PO}_4$ koncentrációjának hatását a DNS célnukleinsav detektálásának hatékonyságára.

A 3. ábra a ribopróba-oszlopkromatográfiás vizsgálat elúciós profilja. A próba/célmolekula hibrid elválasztására S200 oszlopot használunk. A célnukleinsav egy RNS, amit az elegy más komponenseitől, ideértve a lebontott, nem hibridizálódott próba fragmenseit, választunk el.

A 4. ábra a ribopróba-oszlopkromatográfiás vizsgálatához CL-4B gyantát használunk; ezen választjuk el a próba/célmolekula hibridet - ahol a célnukleinsav ez esetben egy DNS - az elegy többi alkotórészétől, ideértve a lebontott, nem hibridizálódott próba fragmenseit. Az ábrán az elúciós profil látható.

Az 5. ábra PF 4 mRNS expressziója különböző koncentrációjú PMA-val kezelt HEL sejtekben.

A 6. ábra a PF 4 mRNS expressziószintje a PMA indukciót követő különböző időpontokban.

Az alábbi részletes leírásban, melyben a találmány előnyös gyakorlati megvalósításait ismerhetjük meg, a szakember számára megnyilvánul a találmány szerinti eljárás sokoldalúsága és számos előnye.

A találmány gyors, érzékeny, kvantitatív vizsgálati eljárást nyújt célnukleinsav biológiai mintában való kimutatására. Az oldott állapotban végzett hibridizálást detektálható jelzett RNS próbával végezzük. A célnukleinsavak állományát tartalmazó biológiai minta a leírt módszer esetében nem igényel előzetes tisztítást. A tisztított vagy részben tisztított minta azonban ugyanúgy felhasználható az eljáráshoz. Abban az esetben, ha a minta nyers vagy csak részben tisztított, detergens(ek)sel és/vagy proteáz(ok)zal kezeljük, hogy a nukleinsavakat szabaddá tegyük és oldatba vigyük.

Ha a célnukleinsav-szekvencia kettős szálú, a próbanukleinsavhoz történő hibridizációja előtt denaturálni kell. A denaturáció történhet például alkalikus

körülmények között vagy melegítéssel. Amint a célnukleinsav egyszálú lesz, hozzáhibridizálható oldott állapotban egy specifikus RNS próbához. A hibridizáció általános szempontjai és módszerei megtalálhatók a „Molecular Cloning” című könyvben (szerk.: Sambrook és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory, 2. kiadás 1989), mint sok más olyan technika, amit ez a találmány felhasznál.

A hibridizálás után a nem hibridizálódott, egyszálú RNS próba RNáz-zal elbontható. Amikor a célnukleinsav RNS, a nyert hibrid egyszálú részei hasonló módon elemészthetők. Az ilyen lebontás eredményeként viszonylag rövid RNS/RNS hibrideket kaphatunk, ellentétben azzal az esettel, amikor ugyanaz a célnukleinsav-szekvencia egy DNS molekulában található, ami ellenáll az ilyen módon történő lebontásnak. A nem hibridizálódott RNS próba lebontása után, a reakcióelegyet molekulatömegkizárásos kromatográfiának vetjük alá, hogy elválasszuk a kettős szálú próba/célmolekula hibridmolekulákat a lebontott próba fragmenseitől. A próba/célmolekula hibridek aztán elkülöníthetők, kimutathatók és mennyiségileg meghatározhatók.

Ez a nukleinsav kimutatási módszer igen érzékeny. Továbbá ezek a módszerek igen gyorsak is, egy személy a teljes eljárást képes egy munkanapnál rövidebb idő alatt elvégezni. Érzékenysége és gyorsasága révén a találmánynak sok potenciális felhasználási lehetősége van. Így például, felhasználható adott kórokozók - legyenek vírusok, baktériumok, gombák vagy kórokozók csoportjai - jelenlétének kimutatására és mennyiségének mérésére szöveti mintákban; genetikai és neoplazmás betegségek diagnosztizálására vagy bizonyos betegségek előzetes jelzésére; törvényszéki célok megvalósítására. Ez a módszer továbbá felhasználható a molekuláris biológia területén, szövetek vagy sejtvonalak specifikus génjei expressziós szintjének kimutatására és mérésére, valamint a génexpresszió szabályozásának tanulmányozására.

Hogy hogyan alkalmazható a módszer az orvosi diagnosztizálásban, azt a humán papilloma vírus példáján mutatjuk be. 1976-ban írták le, hogy a papilloma vírus

kapcsolatban van az ember genitális rákjaival [Hausen, H., Cancer Res., 36:794 (1976); Hausen H. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 78:1 (1977); Kredier és munkatársai, Nature, 317:639-641 (1985)]. Előzőleg úgy tudták, hogy a humán papilloma vírus (HPV) főként jóindulatú daganatokat indukál, ideértve a bőr és a nemi szervek nyálkahártyájának szemölcsseit. Ma tudjuk, hogy a HPV kicsi, csupasz vírus, ami kb. 8000 bázispárból álló, gyűrű alakú, episzomális genomot tartalmaz. Ma már a HPV több altípusa ismert. A HPV rendszerezése az altípusok ismert DNS szekvenciájának homolgiáján alapszik. Új HPV típust definiálunk, ha az ismert altípusokkal szemben a szigorú körülmények között végrehajtott kereszthibridizáció (DNS/DNS) 50 %-osnál kisebb. Több, mint 50 HPV altípust azonosítottak, és legalább nyolc esetben a teljes nukleotidszekvenencia ismert.

Antitesten alapuló HPV diagnosztikai eljárás kifejlesztése reménytelennek bizonyult, főként azért, mert a sejtkultúrában történő vírusszaporítás sikertelen volt. A specifikus antigén detektációs eljárás hiánya miatt a nukleinsavhibridizáció bizonyult előnyös HPV diagnosztáló eljárásnak. A múltban „csepp-blotot”, „szendvics-blotot”, in situ hibridizációt és „Southern-blotot” használtak. Ezek mindegyike azonban szűrőn végrehajtott hibridizációt igényel. Ezen túlmenően, noha az in situ hibridizáció hisztológiai analízist is lehetővé tesz, ezek a technikák munkaigényesek és néhány esetben súlyos háttérproblémákkal járnak.

Ismeretes, hogy a 6, 11, 16, 18 és 31 típusú HPV a nemi szervek elváltozásaiban fordul elő. Lásd: Gissmen és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:560-563 (1983); Durst és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:3812-3815 (1983); Burshart és munkatársai, EMBO, 3:1151 (1984); Lorinez és munkatársai, J. Virol., 58:225 (1986). A 16 és 18 típusú HPV a méhnyak-, a vulva- és a péniszrák 80 %-ában fordul elő, míg a 6 és 11 típusú HPV gyakrabban a genitáliák szemölcsseivel és jóindulatú elváltozásaival kapcsolatos [Hypia és munkatársai, lásd fent]. A hibridizációs

vizsgálatok továbbá arra vallanak, hogy a 6 és 11 típusú HPV közeli rokonságban van egymással, míg a 16, 18, 31 és 33 típusú HPV között a rokoni kapcsolat távolabbi és a kereszthibridizáció gyenge. A fertőző HPV törzsnek transzformáló hatása van, ami nagymértékben attól függ, hogy a HPV DNS beépül-e vagy episzómális állapotban marad. A jóindulatú elváltozások a legtöbb esetben episzómális HPV DNS-sel kapcsolatosak, míg a nemi szervek terjedő rákos megbetegedéseinél a vírus integrált állapotban van [Dubt és munkatársai, J. Gen. Viral., 66:1515 (1985)].

A HPV fertőzés jelenlegi gyógy módja a sebészeti beavatkozás, azaz kriogénus eljárással, lézerrel, stb. eltávolítják az érintett területeket. Ha a betegség korai állapotában történik a beavatkozás, a prognózis jó. Gyakran előfordul azonban a kiújulás, és ezért a jelenlévő HPV típus meghatározása fontos a megfelelő kezelés szempontjából. Nyilvánvaló tehát, hogy a diagnózis felállításának elősegítése és a HPV fertőzött betegek kezelése szempontjából szükség van egy pontos, érzékeny és nem költséges vizsgálati eljárásra.

A jelen találmány ribopróba módszerei sokkal specifikusabbak és kisebb háttérhibával járnak, mint a megfelelő DNS próbákat alkalmazó eljárások. A jelen találmány szerinti HPV diagnózis kimutatási határa vagy érzékenysége alacsonyabb, mint 0,1 HPV kópia/humán genom. A HPV genomok viszonylag alacsony szekvenciahomológiája, vagyis a magas típus-specifitása miatt lehetséges HPV típus-specifikus nukleinsavpróbákat készíteni. A kezdeti HPV diagnózis elvégezhető az adott HPV típusokra specifikus próbák keverékével vagy olyan próbák keverékével, melyek a HPV erősen konzervált régióival hibridizálódnak. A jelenlévő adott HPV típus azonosítása aztán olyan típus-specifikus próbák alkalmazásával történhet, melyek a HPV genom erősen típus-specifikus régióival reagálnak.

Amint az a fentiekben leírtakból világosan kitűnik, nagy specifitású és érzékeny nukleinsav vizsgálati módszerek fejleszthetők ki, melyek a fertőző ágensek sokaságára

alkalmazhatók. Ezen túlmenően gyors, hatékony és nem költséges eljárást írunk le, mely alkalmas olyan diagnosztikai eljárások kifejlesztésére, melyekkel az adott kórokozó altípusait is meg tudjuk különböztetni. A találmány szerinti eljárás felhasználható az orvosi és törvényszéki alkalmazási területen kívül is, a módszerek például felhasználhatók a génexpresszió és szabályozás tanulmányozására.

Minthogy egy szervezet élete folyamán sok gén különböző időben és/vagy különböző mértékben expresszál, nagy érdeklődés irányult azokra a tényezőkre és körülményekre, melyek befolyásolják és szabályozzák a géneknek ezt az eltérő kifejeződését. Így például valamennyi emlős rendelkezik egy vérképző rendszerrel, mely pótolja az egészséges szervezetben előforduló valamennyi típusú vérsejtet, beleértve a fehérvérsejteket (neutofilek, makrofágok és bazofil/hízósejtek), a vérrögzítő sejteket (megakariociták, vérlemezek) és a vörösvérsejteket (eritrociták). Jelenleg úgy tudjuk, hogy specifikus polipeptidek (növekedési faktorok és telepképzést stimuláló faktorok) irányítják a vérképző rendszer különböző komponenseinek szaporodását, differenciálódását és érését.

Amint fentebb említettük, a megakariociták a vérképző rendszer komponensei. Ezek a sejtek egy fejlődési folyamaton mennek keresztül az őssejtektől a magnélküli vérlemezek ezreiké való végső differenciálódásig, amit egy szétesés rosszul ismert folyamata szabályoz. Ezalatt az érési folyamat alatt a megakariociták a felületükön számos vérlemez-fehérjét termelnek és/vagy fejeznek ki. Ezek között a fehérjék között van a vérlemezfaktor 4 (PF4) [Ryo és munkatársai, J. Cell. Biol, 96:515 (1983) és a vérlemezéből származó növekedési faktor (PDGF) [Ryo és munkatársai, lásd fent).

A megakariociták érése és a vérlemez képződése fiziológiailag szabályzott folyamat. Az érést gyorsítja a trombocitopénia [Corash és munkatársai, Blood, 70:177 (1987)] és gátolja a trombocitózis [Jackson és munkatársai, Blood, 63:768 (1984)]. Ezeket a folyamatokat úgy tűnik hormonok irányítják, minthogy az interleukin-6

beadása in vivo növeli a vérlemezek számát [Ishibashi és munkatársai, Blood, 74:1241 (1989)]. Az eritropoietin, az interleukin-3 és a granulocita-makrofág telepképzést stimuláló faktor pozitív hatással van a különféle in vitro megakariocita rendszerekre [Bruno és munkatársai, Blood, 73:671 (1989)].

A megakariociták ritkasága és törékenysége miatt nehéz e sejteknek a vizsgálatokhoz tiszta populációjához hozzájutni. Ráadásul a megakariociták érése szakaszokra oszlik a vérlemez-specifikus fehérjék expresszáldása vagy morfológiai tulajdonságaik alapján, de ezek a szakaszok élesen nem különülnek el egymástól, emiatt a fejlődési folyamat tanulmányozása nehéz. Ezért az in vitro vizsgálatokhoz olyan fenntartható (nem elpusztuló) sejtvonalakat alkalmaznak, például humán eritroleukémia sejteket (HEL) [Martin és munkatársai, Science, 216:233 (1982)], melyek a megakariocita rokonságra utaló fenotípusos és biokémiai markereket expresszálnak. Ismert, hogy ha a HEL sejteket forbolészterekkel kezelik, drámaian megnő a PF 4 expresszáldása [Tebilio és munkatársai, EMBO, 3:453 (1984)].

A PF 4 protein megakariocitában szintetizálódó fehérje, ami a vérlemez α granulátumába csapódik ki, néha a vérlemez felszabadulása előtt. Minthogy a megakariocita érését úgy látszik polipeptid növekedési faktorok szabályozzák, a PF 4 mRNS expressziószintjét különféle növekedési faktorokkal és forbal-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) való kezelés után vizsgáltuk. A PF 4 mRNS expressziószintjét a jelen találmány szerinti nukleinsavhibridizációval követtük nyomon.

A PF 4 mRNS expressziószintjeinek analízise azt mutatja, hogy a mRNS szintézis indukálása nem gyors, minthogy a PF 4 mRNS nem éri el a maximális szintet az indukciót követő 24-48. órára, ami arra utal, hogy a PF4 mRNS szintézis indukciója a PMA stimuláció közvetett hatásaként jelentkezik, minthogy néhány gén a PMA hozzáadása után néhány perccel aktivizálódik. A PDGF expressziószintjének vizsgálatához ugyancsak a találmány szerinti diagnosztikai eljárást alkalmaztuk a PMA

stimuláció után. Az eredmények azt mutatják, hogy aPDGF-t kódoló gén expressziójára nincs hatással még olyan körülmények között sem, ahol a PF 4 mRNS expressziója maximális [Hunt és munkatársai, Exp. Hematol., 19:779-784 (1991)].

Amint az a fentiekből látható, az itt leírt nukleinsavhibridizációs módszerek széles körben alkalmazhatók a molekuláris biológia területén, kezdve a kórokozó fertőzések és örökletes betegségek orvosi diagnosztizálásától a kutatási irányultságú génexpressziós vizsgálatokig. A találmány szerinti módszerrel kapcsolatosan az alábbi eljárások alkalmazhatók.

A próba jellemzése

A találmány szerinti módszernél alkalmazott próba RNS-ből áll, mely komplementer a meghatározandó célnukleinsavval. A próbák a nagyszámú technika bármelyikével elkészíthetők, lásd: Sambrook és munkatársai (fent). Előnyös eljárás, mikor a próba nukleotidszekvenciáját kódoló, klónozott vagy polimerázzal végzett lánc-amplifikációval előállított DNS molekulát RNS polimerázzal átírjuk. Minthogy több bakteriofág RNS polimeráz és azok specifikus promotere ismert, e szekvenciákat tartalmazó transzkripciós klónozó vektorok változatai a kereskedelemből beszerezhetők vagy a szakterületen ismertek. Ezek a vektorok tartalmazhatják egyetlen bakteriofág RNS polimeráz promoterét vagy két különböző polimerázét, határosan az összetett klónozó helyel, melybe a próba nukleotidszekvenciáját kódoló DNS klónozott. Ha megfelelő RNS polimerázzal ribonukleotidok jelenlétében - melyek közül egy vagy több detektálható jelzőanyaggal megjelölt - végezzük a transzkripciót, nagy mennyiségben kapjuk meg a nagyspecifitású ribopróbákat, melyek a beépített DNS molekula kódoló vagy nem-kódoló szálának felelnek meg.

Az alábbi eljárásokat alkalmaztuk a későbbiekben ismertetett példánál felhasznált valamennyi ribopróba előállításához. Transzkripciós vektorként a pGEM-3

(Promega, Madison, WI, USA; 1989/90 kat. sz., p 2131) vektort használtunk. Mindegyik ribopróba transzkripcióját T7 RNS polimerázzal végeztük. Amint azonban fentebb is említettük, a találmány szerinti eljárásnál a próbák elkészítéséhez ettől eltérő rendszerek is rendelkezésre állnak.

A próba szintézise

Valamennyi T7 RNS polimerázzal végzett, itt leírt transzkripció reakciót az alábbi körülmények között hajtjuk végre: 40 mM Trisz-HCL, pH = 7,5; 6 mM magnézium-klorid, 2 mM spermidin, 10 mM nátrium-klorid, 10 mM ditiotritol (DTT), 15 μ M ^{35} S-UTP (New England Nuclear, kat.sz. NEG-039H), 500 μ M CTP, ATP, GTP és 75-100 ng izolált DNS templát funkcionálisan kapcsolt T7 promoterral, amit a transzkripció vektorból izoláltunk a megfelelő restrikciós endonukleázzal történő emésztés és agaróz-gélelektroforézis után. Megjegyzendő, hogy az RNS szintézis gyorsasága fokozottan csökken, ha az UTP koncentrációja kisebb, mint 12 μ M. A keletkezett RNS transzkriptáns mérete a nukleotid előanyagok koncentrációjától függ.

A tipikus transzformációs reakciót az alábbiak szerint hajthatjuk végre: 500 μ l-es Eppendorf csőbe teljesen beszárítunk 120 pmól ^{35} S-UTP-t. A ^{35} S-UTP-t felszuszpendáljuk a következő elegyben (nem hűtött): 3,3 μ l DePC kezelt víz (beállító térfogat, ami ahhoz szükséges, hogy a T7 RNS polimeráz második hozzáadása előtt az össztérfogat 7,9 μ l legyen), 1,6 μ l 5x transzkripció puffer (200 mM Trisz-HCl, pH = 7,5 (37°C-on mérve), 30 mM magnézium-klorid, 10 mM spermidin és 50 mM nátrium-klorid), 0,8 μ l 100 mM DTT, 0,4 μ l 40 egység/ml koncentrációjú RNasin (Promega). Ezután hozzáadunk 1,2 μ l nukleotid oldatot, ami CTP, ATP és GTP nukleotidokból egyaránt 10 mM koncentrációjú ; 0,4 μ l (75-100 ng) templát DNS oldatot és 0,2 μ l 20 egység/ μ l koncentrációjú T7 RNS polimerázoldatot. Ezt az elegyet 40°C hőmérsékleten tartjuk 30

percen át, majd további 0,2 µl (4 egység) T7 RNS polimerázoldatot adunk hozzá, és újabb 30 percen át 40°C hőmérsékleten tartjuk az elegyet.

Amint a ribopróba szintézise teljes, a DNS templátot 2,7 µl (2,7 egység) RNáz mentes DNáz oldatot (Promega Biotech) és 0,8 µl 5x transzkripció puffer (lásd fent) hozzáadásával és a reakcióelegy 37°C hőmérsékleten történő inkubálásával elbontjuk. 20 perc elmúltával 0,6 µl 2 %-os SDS oldatot adunk az elegyhez, és az inkubációt 72°C hőmérsékleten végezzük 20 percen át. Végül 34 µl TE + 10 mM nátrium-klorid, 4 µl RNasin és 0,8 µl 500 mM DTT oldatokat adunk a reakcióelegyhez.

Radioizotóp beépítése a próbába

Annak megállapítására, hogy hány százalék ³⁵S-UTP épült be a ribopróbába, a reagáltatott transzkripció reakcióelegy kis mennyiségét, általában térfogatának 1-10 %-át, meghígítjuk és kromatografáljuk. A hígított oldatnak legtöbbször 1 %-át használjuk a kromatografáláshoz, rácsöppentve azt a kromatográfiás mátrix meghatározott helyére. Alkalmos kromatográfiás mátrix lehet a papír, például a DE81 papír (Whatman, Clifton, NJ, USA) vagy az üveglemezen lévő szilikaréteg (vékonyréteg-kromatográfiához, TLC).

A kromatografáláshoz olyan oldószert használunk, melyben a be nem épült ribonukleotidok a front közelében haladnak, míg a polinukleotidok, mint például a ribopróbák a felcseppentés helyén maradnak. A kromatografálást követően a mátrixot sávokra vágjuk, és megmérjük minden sáv radioaktivitását. A háttérsugárzás levonása után, az egyes sávokra kapott eredményeket összeadjuk, és kiszámítjuk a radiokatív nukleotid polinukleotidba történt beépülésének százalékát oly módon, hogy a felcseppentés helyét tartalmazó sáv radioaktivitását elosztjuk az össz-radioaktivitással és szorozzuk százszal.

Az itt ismertetett módszereknél a ribopróbába való ^{35}S -UTP beépülés általában 80 %-os. A számított beépülési mértékkel megszorozva egy adott ribopróba szintézis reakcióelegyének adott mennyiségben mért radioaktivitását, meghatározhatjuk a ribopróbának nyilvánítható jel nagyságát, kizárva a nem-beépült nukleotidokból származó jelet. Ez az eljárás úgy a tisztított, mint a nem tisztított ribopróbáknál alkalmazható a ^{35}S -UTP beépülésének mennyiségi meghatározásához.

A ribopróbák tisztításához oszlopkromatográfiát használhatunk, eltávolítva így a jelzett, be nem épült ribonukleotidokat [lásd: Berger és munkatársai, *Methods in Enzymology*, 152. köt., 638-639. oldal (1987)].

Az alábbi példákban az ismertetésre kerülő eljárások bármelyike használható annak kiszámítására, hogy a próbába ténylegesen milyen százalékban épült be a radioizotóp. Az első ilyen eljárásnál az egyes ribopróbaszintéziseknél beépülő ^{35}S -UTP (vagy más radioizotóp) mennyiségének meghatározásához a fenti reakcióelegyből eltávolítunk 1 μl -t és hozzáadjuk 49 μl TE + 10 mM nátrium-klorid oldathoz. Ebből az oldatból 0,5 μl -t felcseppentünk egy 15x1 cm méretű DE81 papírcsíkra. A kromatografálást 0,3 M ammónium-formiát oldattal végezzük, amíg a front el nem éri a papírcsík hosszának 80-90 %-át. Ezután a papírcsíkot néhány darabra vágjuk, és mindegyik papírcsíkdarabot behelyezzük egy-egy szcintillációs csőbe. A csövekhez 15 ml Liquiscint^R-et (National Diagnostics) adunk, és a számlálást Beckman folyadékszcin-
tillációs számlálóban végezzük. Az eredményekből a beépülés százalékos mértéke kiszámítható.

A beépülési százalék megállapításához használhatunk vékonyréteg-kromatografálást is. Egy 8x4 cm méretű PEI-Cellulose F (E. Merck 5579-7) réteget előzetesen beáztatunk 100 %-os etanolban, majd megszáritjuk. 0,5 μl 50-szeresére hígított végső reakcióelegyet (amint azt az előzőekben már leírtuk) cseppentünk fel a rétegre. Mellé-
cseppentünk 0,5 μl , 250-szeresre hígított, a transzkripcióhoz felhasznált

^{35}S -UTP oldatot. A kromatografálást 1 M lítium-klorid oldattal végezzük. Amint a front kb. 3 cm távolságra elmozdult, a cellulózártéget megszárítjuk és autoradiográfiát végzünk. Denzitométerrel (Gilford Response II. Ciba-Corning Diagnostics Corp., Pleasanton, CA, USA) kiértékelve a kapott filmet, meghatározhatjuk, mennyi ^{35}S -UTP épült be a próbába.

Standardizálás

Hogy egy klinikai mintában elvégezhesük a célmolekula mennyiségi meghatározását, standard görbét kell készítenünk. Ehhez egy hibridizációs (vagy titrációs) sorozatot készítünk, ahol az egyes méréseknél a radioaktívan jelölt próba állandó mennyiségét (cpm-ben mérve) reagáltatjuk az ismert méretű, koncentrációjú és szekvenciájú célnukleinsav változó mennyiségével. Egy adott ribopróbával komplementer DNS célmolekula alkalmas forrása lehet az a DNS klán vagy fragmens, melyet templátként használunk a ribopróba szintéziséhez. A cél DNS koncentrációját a hibridizációs elegyhez való meghígítás előtt spektroszkópos vagy fluoreszcenciás módszerrel határozhatjuk meg.

A ribopróbával komplementer cél RNS molekula elkészítéséhez előnyös eljárás, ahol ugyanannak a DNS molekulának az ellentétes szálát használjuk fel, ami ribopróba templátként szolgált, a jelzőnukleotid - például a radioaktív ^{35}S -UTP - nyomnyi mennyiségeinek jelenlétében. Ehhez felhasználhatjuk a templát DNS molekulát fordított orientációban beépítve, mint ahogy a próba elkészítésénél volt (ekkor ugyanazt az RNS polimerázt használjuk, amit a próba elkészítésénél alkalmaztunk), vagy a másik esetben ugyanazt a klónt használjuk, de két különböző típusú RNS polimerázt alkalmazunk. Ez utóbbi esetben ugyanazt a DNS templátot írjuk le, de az egyik RNS polimeráz a DNS egyik végénél szomszédos promotert ismeri fel, míg a másik típusú RNS polimeráz a beépített DNS másik végénél lévő promotert ismeri fel és ott kötődik

meg. Ehhez az utóbbi módszerhez jól felhasználható a pGEM-3 plazmidvektor vagy hasonló összeállítású vektorok.

Függetlenül a cél RNS szintéziséhez használt rendszertől, a keletkezett cél RNS koncentrációja kiszámítható a bevitt UTP mennyiségéből és specifikus aktivitásából, a célmolekulába beépült UTP mért frakciójából és az egyes cél RNS molekulákban lévő uridin (U) számából. A beépült ^{35}S -UTP koncentrációja cpm (percenkénti beütés) μl értékben kifejezve kiszámítható a mért ^{35}S -UTP beépülési százalék és a cpm/ μl reakcióelegy szorzatából. Az eredményt aztán elosztjuk a cél RNS cpm/amól ($1 \text{ amól} = 10^{-18} \text{ mól}$ vagy $6,023 \times 10^{-5} \text{ molekula}$) értékben kifejezett specifikus aktivitásával, amit a bevitt UTP cpm/amól értékben kifejezett specifikus aktivitásának a cél RNS-ben lévő uridinmaradék számával történő megszorzásával számolunk ki, megkapva a célmolekula amól/ μl transzkripció reakcióelegy értéket.

A próbavizsgálat érzékenységét (cpm/amól) megkapjuk, ha egy állandó mennyiségű (cpm-ben mérve) próbát hibridizálunk egy változó mennyiségű (beleértve a nullát is) célmolekulával (próba komplementer). A hibridizáció, RNáz emésztés és próba/célmolekula hibrid tisztítása után, a célmolekulát nem tartalmazó mintánál kapott értéket kivonjuk a célmolekulát tartalmazó egyes minták jelének értékéből. Ezt a korrigált értéket elosztjuk az egyes minták célmolekuláinak amól értékével, így megkapjuk a jel/amól célmolekula értéket. Ettől eltérő módon egy standard görbét is készíthetünk, melynél a korrigált jel értékeket ábrázoljuk az amól célmolekula értékekkel szemben; vagy a meredekséget és az ordináta különbséget kiszámoljuk a két mennyiség logaritmikus lineáris regressziójának felhasználásával.

Az alábbi példákban a különböző ribopróbákat 2,0, 0,5 és 0,0 amól célvegyülettel - nevezetesen a plazmidvektorral, melyből a különböző próbák származnak - szemben standardizáljuk. A célmolekulák különböző állományait 1,5 ml-es Sarstedt centrifugacsövekben készítettük el az alábbiak szerint:

A 2,0 amól állomány összetétele: 24 µl TE(+) (5,0 µl 20 %-os nátrium-dodecil-szulfát, 8,9 µl 2,25 M ditiotritol, 986 µl TE), 6,0 µl 1,0 amól/µl plazmid célmolekula és 120 µl HP+TE(+) [62,5 µl 2 µg/µl HPDNS (humán placenta DNS, Sigma, St. Louis, MO, USA) vízben szuszpendálva, majd néhányszor 22-es injekciós tűn átnyomjuk, ezt követően ultrahanggal kezeljük, fenollal, kloroformmal extraháljuk, etanollal lecsapjuk, majd TE-ben ismét felsuszpendáljuk és 937,5 µl TE(+)].

A 0,5 amól célmolekula állomány összetétele: 28,5 µl TE(+), 1,5 µl 1,0 amól/µl célplazmid és 120 µl HP+TE(+). A 0,0 amól célmolekula állomány összetétele: 30 µl TE(+) és 120 µl HP+TE(+).

Ezután minden egyes csőhöz 15 µl 2 M sósavat adva, a cél DNS-t lebonjuk és denaturáljuk. Az elegyet 1 percen át inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd 15 µl 4 m nátrium-hidroxid-oldatot adunk hozzá és ezt követően forró vízfürdőben inkubáljuk 2 percen át. A csöveket 2 percen keresztül lehűtjük, majd 10 másodpercen át centrifugáljuk. Minden elegyből kiveszünk két 60 µl-es mintát, és a kivéteket külön csövekbe visszük a hibridizációhoz.

A kimutatás határa

A jelen találmány szerinti eljárás adott ribopróbára vonatkozó érzékenységi határt (a kimutatás határát) kiszámíthatjuk, ha a célnukleinsav különböző, ismert mennyiségeit használjuk a próba állandó mennyiségeivel (cpm-ben mérve). Például 0,0 amól, 0,5 amól és 2,0 amól célmolekula mennyiségeket használhatunk a vizsgálati detektálhatóság megállapításához. Először az alkalmazott számlálóberendezés, például folyadékszintillációs számláló, háttér adatát kell meghatározni a háttérjel standard szórása mellett. Ez elvégezhető néhány, csak a szcintillációs folyadékkal mért cpm érték átlagolásával. Ezután az egyes minták korrigált szignálját határozzuk meg, az egyes mintáknál kapott jelek értékéből (előnyösen két azonos minta értékének

átlagából) levonva a számláló háttér értékét (cB). Ezek után meghatározzuk a minták jelének normalizált értékét, kivonva a célmolekula nélkül kapott jel korrigált értékét (0,0 amól célmolekulát tartalmaz az elegy) a célmolekula jelenlétében mért korrigált jelértékből és a kapott eredményt elosztjuk a célmolekula amóiban kifejezett mennyiségével.

Egy adott mennyiségű célmolekula detektálhatósági határát kiszámíthatjuk, ha a célmolekula nélkül mért korrigált jelértéket és a számláló standard szórásának háromszorosát (statisztikai céllal kiválasztott szorzó, hogy 99 %-os vagy annál nagyobb konfidencia szintet érjünk el) összeadjuk, és az összeget elosztjuk az adott mennyiségű célmolekulára kapott normalizált jelértékkel. 0,5 amól célmolekulára vonatkozó példát adunk meg az 1. ábrán. Ezt az információt, tudva, hogy a vizsgálathoz hány sejtet használtunk fel, alkalmazhatjuk a minimális DNS vagy mRNS molekula/sejt azon értékének kiszámolásánál, ami az eljárással detektálható. Végül megállapítható egy adott mennyiségű célmolekulához tartozó jel/zaj arány, egy adott mennyiségű célmolekulánál kapott korrigált jelértéket elosztva a 0,0 amól célmolekulával kapott korrigált jelértékkel. Az alkalmazott módszerrel könnyen elérhető kimutathatósági határ RNS esetében: 0,2 amól, ha a célszekvenciát DNS tartalmazza: 0,3 amól.

Hibridizáció

A találmány szerinti valamennyi hibridizációt oldott állapotban végezzük. A hibridizáció sebessége függ a hőmérséklettől, a sókoncentrációtól és az ionerősségtől, a pH értéktől, a reaktánsok koncentrációjától, valamint más molekulák, például dextrán-szulfát, polietilén-glikol, stb. jelenlététől.

A $\text{Na}_{1,5}\text{H}_{1,5}\text{PO}_4$ különböző koncentrációjának hatását a 2. ábrán mutatjuk be. Valamennyi standardizációs hibridizációnál 86 μl 4,8 M $\text{Na}_{1,5}\text{H}_{1,5}\text{PO}_4$ oldathoz hozzáadunk 60 μl denaturált cél DNS oldatot, majd az elegyet vortexoljuk. 4 μl

megfelelő, ^{35}S -jelzett ribopróbát (kb. 15000 cpm) adunk minden egyes csőhöz, a tartalmukat összekeverjük, az oldatot rövid ideig (10 mp) centrifugáljuk, majd 72°C hőmérsékleten inkubáljuk.

RNáz-os emésztés

A próbaként használt RNS nem hibridizált molekuláit a hibridizáció után RNáz-zal lebonjuk, ezáltal csökkentjük a nem hibridizált próbáknak tulajdonítható háttérét. Az RNáz enzim ellenálló tulajdonságai miatt az RNáz-os emésztéshez számos reakció-körülményt alkalmazhatunk.

Az RNáz-os emésztés elvégezhető például a következő körülmények között: A hibridizáció után minden csőhöz hozzáadunk 12 μl RNase Mix-et [10 mM Trisz puffer, pH = 8; 1 mM EDTA, 5200 egység/ml RNáz T1 (Boehringer Mannheim, kat. sz. 109207) és 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ RNáz A-t (Sigma, Type 1-A, kat. sz. r 4875). A csövek tartalmát vortexoljuk, 10 mp-en át centrifugáljuk és 10 percre 37°C hőmérsékletre helyezzük. 10 perces RNáz-os kezelés után 195 μl formamidos festékkeveréket [99,9 % formamid (reagens minőségű) és 0,1 % bróm-fenol-kék] adunk a reakcióelegyhez és vortexolunk. Ezek után a minta molekulatömeg-kizárásos kromatografálása kész.

Molekulatömeg-kizárásos kromatografálás

A molekulatömeg-kizárásos kromatografálás a különböző molekulatömegek alapján választja el a vegyületeket egymástól. Ennél az eljárásnál poliakrilamid, Sepharose, keresztkötéses Sepharose, agaróz, keresztkötéses agaróz, dextrán és más hasonló anyag granulált keverékét használjuk mátrixként, hogy a próba/célmolekula hibridet elválasszuk a nem hibridizálódott, egyszálú ribopróba RNáz által lehasított ribonukleotidjaitól. Az elválasztás az alkalmazott mátrixanyag porozitásának következménye. A kis pórusokkal rendelkező mátrix, lehetővé teszi, hogy a kis molekulák, mint amilyenek a szabad nukleotidok, belépjenek a mátrixba, míg a nagy molekulák,

például a próba/célmolekula hibridek kizáródnak. Ha a mátrixot egy kromatográfiás oszlopba töltjük, a kizárt térfogat gyorsan áthalad az oszlopon. Ezzel szemben az oldatban lévő kisebb molekulák belépnek a mátrixba, és mozgásuk a tényleges molekulasúllyal fordított arányban lassul le.

A találmány eljárásához használható mátrix anyag például: Sephadex^R G50, G100 és G200 (Pharmacia, Piscataway, NJ., USA), Sepharose^R CL-2B, CL-4, CL-6B, S-200, S-400 és S-1000 (Pharmacia) és P-20, P-60, P-100 és P-200 (BioRad Corp., Hercules, CA, USA). Az egyes kísérletekhez a mátrixot a várt próba/célmolekula méretétől függően választjuk meg. A hibrid méretét gyakran meghatározza, hogy a célnukleinsavat RNS vagy DNS tartalmazza. Ha RNS tartalmazza a célszekvenciát és az alkalmazott ribopróba rövidebb, mint a célmolekula, a célmolekula túlnyúló, nem-hibridizálódott, egyszálú része az RNáz-os emésztés alatt lehasad. Egy azonos (nukleotid szekvencia tekintetében), de DNS alapú célmolekula nem fog lebomlani és egy nagy próba/célmolekula hibrid marad meg. Ennek eredményeként, különféle oszlopmátrixra lehet szükség, hogy megfelelően elválaszthassuk a próba/célmolekula hibridet a nem hibridizálódott, lebontott próbamolekuláktól. Például a 3. ábrán annak eredményét mutatjuk be, amikor egy 163 ribonukleotidból álló PF-4 ribopróbát hibridizáltunk a komplementer RNS célmolekulához. RNáz-os lebontás után az oldat alkotórészeit egy 1x16 cm méretű CL-4B oszlopon választottuk el.

A találmány szerinti eljárás hatékonyságát úgy fokozzuk, hogy a 2 órás hibridizáció után a kívánt molekulákat kiszűrő mátrixot tartalmazó oszlopot az alábbiak szerint készíthetjük el: 22 ml 50 %-os Sepharose CL-4B gyantát (előzőleg kimosva az oszloppufferrel: TE + 10 mM NaCl) tartalmazó zagyot beleöntünk egy 1x20 cm méretű csőbe (BioRad, kat.sz. 737-1020). Mindegyik oszlopot átmossuk 12 ml oszloppufferrel, és addig hagyjuk a folyadékot lecsöpögni, amíg az oszloppuffer eléri a mátrix felső felszínét, ekkor az oszlop alját elzárjuk.

3,2 ml oszloppuffert rétegzünk óvatosan az oszlop tetejére. A nagyobb sűrűségű, nukleinsavat tartalmazó hibridizációs mintát óvatosan az előbb említett 3,2 ml puffer alá rétegezzük, mint a puffer és a mátrix köztesrétegét. Megnyitjuk az oszlopot, megindítva az átfolyást. Mindegyik oszlopot addig hagyjuk lecsöpögni, amíg az előzőleg felvitt oszloppuffer el nem éri a mátrix felső felszínét. Az eluens első 3,2 ml-ét eldobjuk. Minden oszlopra ráviszünk további 2,5 ml oszloppuffert. Az oszlopokat szárazra futtatjuk, és az efluent - az „üres térfogatot” - összegyűjtjük.

Az efluens gyűjtése után a próba/célmolekula hibridet detektáljuk és/vagy mennyiségét meghatározzuk. Az alkalmazott detektálási módszer a felhasznált jelzetségtől függ. Ha a jelzés radioizotóppal történt, a detektáláshoz felhasználhatjuk a gamma vagy fotografikus detektálást, autoradiográfiát és főként a folyadék szcintillációs számlálást. Ha egy specifikusan kötődő pár (ideértjük az antitesteket és a specifikus antigénjeiket) egyik tagja kovalensen kötődik a próbához, a pár másik tagját felhasználhatjuk a detektálásra vagy mennyiségi meghatározásra. Ha a jelző egy enzim vagy enziminhibitor, az enzimatis aktivitás megléte vagy hiánya használható fel a vizsgálathoz. Emellett más detektálható jelzőanyagok is alkalmazhatók, például fluoreszcens vagy kemilumineszcens markerek, stb.

Amikor detektálható jelzőanyagként radioizotópokat használunk, a kimutatás és a mennyiségi meghatározás előnyös módja a folyadék szcintillációs eljárás. Például 2,5 ml üres térfogatot tartalmazó mintát gyűjtünk az oszlopról egy 20 ml-es folyadék-szcintillációs üvegcsőbe, és hozzáadunk 5 ml fluoros oldatot, előnyösen Liquiscint^R-et (National Diagnostics, Manville, NJ, USA) (ha a minta ³⁵S-sel jelölt). A csövet lezárjuk, tartalmát vortexoljuk és a mintát Beckman LS 100 szcintillációs számlálóban értékeljük 100-1000 ablakbeállításnál.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák a jelen találmány előnyös kivitelezési módjait szemléltetik, de semmiképpen nem

korlátozzák a találmány oltalmi körét. Az 1. és 2. példa a klinikai mintákban lévő HPV jelenlétének kimutatására irányul, melyhez ribobpróbákat alkalmazunk; a 3. példa a találmány olyan alkalmazását szemlélteti, hogyan tanulmányozhatjuk a megakarióták génexpresszióját, in vitro modellben vizsgálva az mRNS szintet.

1. példa

HPV próba elkészítése

Bizonyos szöveti rendellenességek és rákok diagnózisának megállapításánál és kezelésénél a HPV fertőzöttség, a jelenlévő HPV típusának megállapítása fontos. A következő eljárásnál ismertetjük a klinikai minták HPV jelenlétére irányuló analízisét és a HPV típusának azonosítását nagy típusspecifitású HPV régiókkal komplementer RNS próbák felhasználásával. Négy RNS próbát alkalmazunk, melyek mindegyike egy adott HPV típusra - 6, 11, 16 és 18 típus - specifikus.

A próba elkészítése

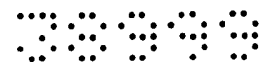
A HPV 6 [Schwartz és munkatársai, EMBO J., 2:2361-2368 (1983)], a HPV 11 [Dartmann és munkatársai, Virol., 151:124-130 (1986)], a HPV 16 [Seedorf és munkatársai, Virol., 145:181-185 (1985)] és a HPV18 [Cole és munkatársai, J. Mol. Biol., 193:599-608 (1987)] típusok teljes nukleotidszekvenciája ismert. Abból a célból, hogy vektorokat termeljünk, melyekből az eljárásunkban alkalmazott specifikus RNS próbákat elkészíthessük, a különböző HPV altípusok nukleotidszekvenciáit tartalmazó klónokból származó HPV DNS-t olyan plazmidokba klónozzuk, melyek képesek a beépített DNS molekuláról készülő mRNS szintézisének irányítására.

a) HPV6

A HPV episzomális monomereket tartalmazó teljes celluláris DNS 10 µg-ját genitális szemölcs klinikai mintájából nyerjük. Ezt a DNS-t Bam H1 enzimmel hasítjuk és egy azonos módon hasított λL47 vektorba [Loenen és munkatársai, Gene, 10:249

(1980)] klónozzuk. Azért választottuk a λ L47 vektort a klónozáshoz, mert elfogadja az 5-19 kb. hosszúságú Bam HI inszerteket. Minthogy a humán DNS jobbára kisebb fragmensekre hasad, mint az inszertméret alsó küszöbje, a HPV DNS feldúsulása (< 10-szeres) érhető el ennek a vektornak felhasználásával. A ligálás után a reakciótermékeket fertőző fágokba visszük a Gigapack^R (Vector Research Systems) in vitro pakkoló rendszerével. Ezzel a rendszerrel a tipikusan elérhető pakkolási hatékonyság: $0,2 \times 10^8$ - $1,0 \times 10^8$ plakk-képző egység (pfu)/ μ g λ DNS. A pakkolt fágreszecskékkel integrált P2 fágot tartalmazó E.coli LE 392 törzset transzfektálunk. Mindegyik pakkoló elegyből kiveszünk egy 50 μ l-es kivétet, ami nem tartalmaz 50.000-nél több fágreszecskét, és hozzáadjuk 0,3 ml, friss, log fázisban lévő LE392 tenyészetéhez, amit 0,2 % maltózzal kiegészített LB táptalajon (Sambrook és munkatársai, lásd fent) növesztettünk. A keveréket 37°C hőmérsékleten, rázatás nélkül 20 percen át inkubáltatva, hagyjuk, hogy a fágok adszorbeálódjanak a sejtekhez. Az adszorpció után minden mintához hozzáadunk 6,5 ml, 10 mM magnézium-szulfátot tartalmazó, 0,7 %-os megolvasztott fedő (top) agarózt, amit 47°C hőmérsékleten tartottunk, enyhe keverés után a keveréket száraz, előmelegített 150 mm-es LB agarlemezekre öntjük. Amint a fedő- agaróz (top agar) megszilárdult, a lemezeket 37°C hőmérsékletre helyezzük, amíg a plakkok éppen kezdenek összeérni.

A lemezeket 1 órára 4°C hőmérsékletre helyezzük. A plakkokat 60 mp-en át ráfektetett nitrocellulóz szűrővel (Scheichen and Schuell) kiemeljük. Az eltávolított szűrőket DNS-es oldalukkal felfelé 0,5 n nátrium-hidroxid és 1,5 M nátrium-klorid oldattal éppen hogy csak átitatott Whatman 3MM papírra fektetjük, hogy denaturáljuk a fágreszecskéket. 1-5 perces denaturálás után mindegyik szűrőt átvisszük egy olyan Whatmann 3MM papírra, amit éppen hogy csak átitattunk egy semlegesítő oldattal



(1,5 M nátrium-klorid, 0,5 M Trisz-HCL, pH = 7,4) és ezen hagyjuk 5 percen át. A semlegesítés után a szűrőket lapos tálban lévő 2xSSC oldatba (0,3 M nátrium-klorid, 0,03 M nátrium-citrát) merítjük, majd a DNS-es oldalával felfelé száraz Whatmann 3MM papírra fektetjük. Ugyanezzel az eljárással a lemezeket egy második szűrőt is kezelünk, azzal a különbséggel, hogy a második szűrőt 3 percen át hagyjuk a lemezen feküdni.

Miután valamennyi szűrő légszáraz lett, Whatmann 3MM papírok közé rétegeltük és vákuumban 2 órán át sütjük 80°C hőmérsékleten. A szűrőket szobahőmérsékletre hűtjük, lapos tálban lévő 2xSS oldatban teljesen átnedvesítjük. Szűrőnként 2 ml prehibridációs pufferben (6xSSC, 0,1 % nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 5x Denhardts, 50 µg/ml nyíróerővel aprított lazac-sperma) prehibridizálunk 55°C hőmérsékleten 4 órán át gyenge kevertetés mellett. A prehibridizációs puffert eltávolítjuk, és hibridizációs puffert teszünk helyébe, ami ugyanazokat az alkotórészeket tartalmazza, mint a prehibridizációs puffer. Ehhez hozzáadunk 10⁶ cpm/ml ³²P-végjelölt oligonukleotid próbát ([SEQ ID NO:1]: 5'-CAC TGC TGG ACA ACA TGC ATG GAA G-3'), amit Caruthers és munkatársai [Science, 320:281-285 (1985)] módszerével készítettünk el (mint minden más, ebben a találmányban használt oligonukleotidot). A hibridizációt 60°C hőmérsékleten végezzük 16 órán át, majd a szűrőket eltávolítjuk, gyenge rázogatóssal 200 ml 2xSSC, 0,1 % SDS oldatban mossuk 60°C hőmérsékleten 30 percen át. Ezt a mosást kétszer megismétljük.

Azért, hogy a próbával komplementer DNS molekulákat tartalmazó plakkokat azonosítsunk, elkészítjük az alaposan kimosott szűrők autoradiográfiáját. Az exponált Röntgen-film előhívása után a filmen megjelöljük a szűrők elhelyezkedését. Az egyes lemezekről készült duplikátumokat összehasonlítva, megállapítjuk a pozitívnak vélhető plakkok számát. A potenciálisan pozitív plakkok közül hatot kiemelünk egy kis, eldobható üvegpipettával a lemeznek azt a területét izolálva, ami megfelel a filmen lévő

jelnek. Mindegyik kiemelt darabot 1 ml, 1 csepp kloroformot tartalmazó SM oldatba (literenként 5,8 g nátrium-klorid, 2 g magnézium-szulfát-7 víz, 50 ml Trisz-HCl puffer, pH = 7,5, 5 ml 2 %-os zselatin vízzel 1 l-re kiegészítve, autoklávozással sterilizálva) helyezzük.

Minden egyes lemezdarabot megtitrálunk, hogy mennyi a jelenlévő plakk-képző egységek száma. A titrációhoz sorozathígítást készítünk 100 µl lemezdarab 1 ml SM oldatban készült keverékéből. A hígítási sor minden tagjának 50 µl-ével transzfektálunk 0,3 ml friss LE392 tenyészetet a fentiekben leírtak szerint. Az adszorpció után az oldatokat 3 ml fedő agarózzal keverjük össze és 90 mm-es LB lemezekre visszük. 37°C hőmérsékleten történő 12 órás kinövesztés után meg tudjuk határozni minden egyes lemezdarabkánál a plakk-képző egységek (pfu) számát. A szám ismeretében egy másik transzfektációt végzünk most már úgy megtervezve, hogy a 90 mm-es lemezen 500 jól elkülönülő plakkot kapjunk. Az előzőekben leírtak szerint szűrővel kiemeljük a plakkokat a lemezről, majd a szűrőt ugyanazzal a próbával hibridizáljuk. Ez a plakk-tisztítási eljárás egy tisztított λL47 klónt eredményezett, ami valószínűleg tartalmazza a HPV6 genomot.

Ténylegesen, hogy megállapítsuk melyik klónok tartalmazzák a HPV6 DNS-t, az egyes klónok DNS-ét a lemez-lizációs módszerrel (Sambrook és munkatársai, lásd fent) tisztítjuk. A kapott DNS-t Bam HI enzimmel emésztjük és 0,7 %-os agaróz gélen elektroforetizáljuk. Ezután Southern blot-ot végzünk [Sambrook és munkatársai, lásd fent; Southern E. M., J. Mol. Biol. 98:503 (1975)]. Ugyanazt a próbát használjuk a blothoz való hibridizáláshoz, amellyel megállapítottuk, hogy melyik λL47 klón tartalmazza a HPV6 DNS-t. Az autoradiográfia azt mutatta, hogy mind a négy klón tartalmazza a HPV6 DNS-t.

A HPV6 DNS-t tartalmazó klónok egyikéből, melyet mi λ47 HPV6a-1-ként jelöltünk, származó DNS-t BAM HI enzimmel emésztjük és 0,7 %-os agarózgélen

elektroforetizáljuk. A HPV6 genomnak megfelelő méretű 7,9 kb-ú sávot kivágjuk, és a DNS-t Sambrook és munkatársai (lásd fent), Parker és munkatársai [Methods Enzymology, 65:358-363 (1980)] módszerével extraháljuk. A HPV6 DNS-t pGEM-3-ba ligáljuk, amit előzőleg BAM HI enzimmel hasítottunk és a vektor inszert nélküli újrázáródásának megakadályozására bakteriális alkalikus foszfáttal (BAP) kezeltünk.

Ezt a ligátumot E.coli DH1 (ATCC 33849) törzs tenyészetéhez adjuk és 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB lemezre visszük. Az egyik klónt - pGEM-3:HPV6(+) kiválasztjuk további felhasználásra. A pGEM-3:HPV6(+) szubklónt Sau 96I enzimmel emésztjük. A ragadós végeket T4 DNS polimerázzal vakká tesszük [Sambrook, lásd fent]. Ezeket a fragmenseket Sma I enzimmel emésztett pGEM-3-hoz ligáljuk, mely T7 és SP6 promoter szekvenciákat tartalmaz az összetett klónozóhely ellentétes végein. A szubklónban lévő HPV genom különböző részeit a restrikciós enzimes feltérképezéssel állapítjuk meg, ami megerősíti a DNS szekvenciát [Sanger és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463 (1977)].

A különböző szubklónokból ezután kipreparáljuk a ribopróbákat. Először a plazmid DNS-t Pvu II és Hind III enzimekkel hasítjuk, hogy felszabadítsuk a T7 RNS polimeráz promoterével funkcionális kapcsolatban lévő HPV6 DNS-nek megfelelő inszertet. Az emésztés termékeit 1 %-os agarózgélben elektroforizáljuk. A kívánt Pvu III/Hind III fragmensek elektroelúcióval történő kinyerése és tisztítása után nagy specifitású RNS alapú próbákat állítunk elő 0,2-1,0 µg DNS jelenlétében szobahőmérsékleten történő átírással, amit a fentiekben leírtak szerint hajtunk végre. A különböző HPV6 specifikus ribopróbákat humán placenta DNS-sel hibridizáljuk a Slot-blot eljárás szerint (Sambrook és munkatársai, lásd fent). Néhány próba kereszt-hibridizálódik a humán DNS-sel, de a pGEM-3:HPV6.1 [A(+)] jelű szubklóntól - ami a HPV 6 genom 1072-2214 bázispárjai közötti (Schwartz és munkatársai, lásd fent), A-

-fragmentsként jelölt részét tartalmazza - származó ribopróba nem mutat kereszthibridizációt, és ezt használjuk fel az oszlop és blot vizsgálatokhoz.

b) HPV 11

A HPV 11-re specifikus ribopróba elkészítéshez használt vektor előállításánál a fentiekben ismertetett eljáráshoz hasonlóan használunk. A vulváris kondilóma szövetmintájából 10 µg teljes sejt DNS-t extrahálunk. A kinyert DNS-t Bam HI enzimmal emésztjük és hasonló módon felnyitott λL47-hez ligáljuk. A ligátumot működő fág-részecskébe pakkoljuk a Gigapack^R rendszer felhasználásával (amint azt fent a HPV6-tal kapcsolatban már leírtuk), majd LE392P2 törzsbe transzfectáljuk, amint azt a HPV6-nál tettük.

Kilemezelés és kinövesztés után a plakkok kiemelése a fentiekben leírtak szerint történik. Ebben az esetben azonban az egyes lemezekről származó egyik duplikátot a HPV „korai” génjeire specifikus próbával vizsgáljuk, míg a másik duplikátot a szűrővizsgálatot a HPV 11 „késői” génjeire specifikus próbával végezzük el. Mindegyik esetben a szűrőn kötött DNS-t egy éjszakán át 50 ml prehibridizációs pufferben prehibridizáljuk 55°C hőmérsékleten gyenge kevertetés mellett. Az előhibridizáció után a prehibridizációs oldatot lecseréljük 6 ml hibridizációs oldattal, ami 916000 cpm/ml 5³²P-végjelölt „késői” próba oligonukleotidot tartalmaz [SEQ ID NO:2; 5'-CTG TGG TAG ATA CCA CAC GCA GTA C-3']. A jelzett „korai” próbával szűrővizsgált szűrők esetében 6 ml hibridizációs oldatot használunk, ami 683.000 cpm/ml 5³²P-végjelölt „korai” próba oligonukleotidot tartalmaz [SEQ ID NO:3; 5'-CAC TGC TGG ACA ACA TAGC ATG GAA G-3']. Mindegyik szűrőt kb. 9 órán át hibridizáljuk 55°C hőmérsékleten, mely idő után a hibridizációs hőmérsékletet újabb 6 órára 60°C-ra emeljük. A hibridizációt követően valamennyi szűrőt kétszer 45 percen át mossuk 6xSSC, 0,1 % SDS oldatban először szobahőmérsékleten, majd 60°C-on. A szűrőket kétszer 45 percen át mossuk 2xSSC, 0,1 % SDS oldatban

szobahőmérsékleten. Az autoradiográfiás kiértékelés sokkal szigorúbb mosási körülményeket igényel, így a szűrőket újra mossuk 2xSSC oldatban 4 órás gyenge kevertetés mellett 60°C hőmérsékleten, majd 10 órán át ugyanezen a hőmérsékleten 0,2xSSC oldatban.

A potenciálisan pozitív plakkokat (azokat, melyek úgy a „korai”, mint a „késői” próbákkal hibridizálódnak) autoradiográfiával azonosítjuk. Hét potenciálisan pozitív plakkot emeltünk ki további analízisre. A plakkok tisztítása (ugyanúgy végezve, mint ahogyan a HPV6 esetében fentebb leírtuk) megerősítette, hogy valamennyi eredeti λ L47 izolátum tartalmazza a HPV 11 genomot. A klónokból a DNS-t a szokásos lemez-lizálással és folyékony táptalajon való tenyésztéssel (Sambrook és munkatársai, lásd fent) növeljük fel és nyerjük ki. Ezt a DNS-t azután restrikciós analízisnek vetjük alá, hogy megbizonyosodjunk a teljes HPV 11 genom jelenlétéről. Az egyik klónból - λ L47.11.1 - származó DNS-t Bam H1 enzimmel emésztjük. A restrikciós emésztés termékeit agaróz gélelektroforézissel választjuk szét. A vírus genomnak megfelelő 7,93 kb-ú sávot kivágjuk a gélből, az előzőekben leírtak szerint eluáljuk és Bam HI enzimmel hasított, BAP enzimmel kezelt pSP65 plazmidvektorba [Progega; Melton és munkatársai, Nucl. Acids Res., 12:7035-7056 (1984)] klónozzuk. A kompetens DH1 sejtek transzformálása után, a HPV 11-et tartalmazó klónt pSP65.11.5(+) jelöléssel ellátva, megőriztük.

A pSP65.11.5(+) plazmidot Fok I enzimmel emésztjük. Az emésztésből származó 3' túlnyúló véget vakká tesszük T4 DNS polimeráz 3' exonukleáz aktivitásának felhasználásával. pGEM-3-ban szubgenomiális klónokat hozunk létre viszonylag nagy típuspecifitású két régióval. Az egyik klón - pGEM-3:11.1.3 α - HPV 11 genom 2415-4157 nukleotidok közötti Fok I/Hpa I fragmensét tartalmazza (Dortmann és munkatársai szekvenciája, lásd fent).

A pGEM-3:11.1.3 nagy specifitású ribopróbát eredményez (a pGEM-3:11.1.3 plazmidot Pvu II és Hind III enzimekkel emésztjük, a keletkezett DNS fragmenseket elkülönítjük és a DNS molekulát a fentiekben leírt módon átírjuk), az összes további kísérletnél ezt használjuk fel. A teljes hosszúságú HPV 11 klónból [pSP65-11.5(f)] előállított RNS próbák a humán DNS-sel erősebb kereszthibridizációt adnak.

c) HPV 16

A HPV 16 specifikus ribopróbák előállításához használt vektort hasonló módon készítjük el, mint a HPV6 és a HPV 11 esetében. HPV fertőzést mutató morfológiájú orális szöveti rendellenesség mintájából 10 µg teljes sejt DNS 16-ot különítünk el. Ezt a DNS-t Bam HI enzimmal hasítjuk és Bam HI enzimmal emésztett λL47-be klónozzuk. A nyert DNS-t fertőző fágreszecskekbe pakkoljuk a fentiekben leírt módon, majd a LE392P2 törzset fertőzzük. Plakkképzés után a plakkokat kiemeljük. A szűrőt 60°C hőmérsékleten hibridizáljuk két olyan oligonukleotid próbával, ami a HPV 16 genom „korai” és „késői” régióira specifikus. A HPV 16 „korai” próbával (SEQ ID NO:4; 5'-AAG CAG AAC CGG ACA GAG CCC ATT A-3') való hibridizációnál 0,5 pmól (1×10^7) „korai” próbát alkalmazunk, míg a HPV 16 „késői” próbánál 0,1 pmól ($0,2 \times 10^7$) HPV 16 „késői” próbát (SEQ ID NO:5; 5'-CTT GCC TCC TGT CCC AGT ATC TAA G-3') használunk a filter duplikátok szűrővizsgálatához.

Hibridizáció után a szűrőket 6xSSC, 0,1 % SDS oldattal kétszer 20 percen át mossuk szobahőmérsékleten, majd egyszer 55°C hőmérsékleten. A szűrők autoradiográfiás vizsgálatával tíz feltehetően pozitív plakkot (olyat, ami a HPV 16 „korai” és „késői” próbáival egyaránt hibridizál) kaptunk, amelyeket elkülönítettünk és tisztítottunk. A restriktációs analízis szerint ezek közül hét tartalmazta a HPV 16 genomot. Az elkülönített klónokat kinövesztjük, belőlük a DNS-t kinyerjük és tisztítjuk. Az egyes

izolátumokból nyert DNS kivétjét Bam HI enzimmal hasítjuk, felszabadítva a 7,9 kb-ú HPV 16 genomiális fragmenst. Egyik izolátum - adott esetben az λ L47.16.2 jelűt - DNS-ét agaróz gélek elektroforézissel tisztítjuk, és a kivágott gélseletekből a DNS-t kioldjuk. Ezt a DNS-t klónozzuk egy előzetesen Bam HI enzimmal hasított és BAP enzimmal kezelt pSP65 plazmidba. Transzformáció után az egyik HPV 16 genomot tartalmazó klónt eltettük a további vizsgálatokhoz; jele: pSP65.16.8(+).

A pSP65.16.8(+)-t Fok I enzimmal emésztjük. A T4 DNS polimeráz 3' exonukleáz aktivitását használjuk fel a 3' vég túlnyúló szálának leemésztésére. A kapott vak végső DNS fragmenseket a pGEM-3 Sma I helyeinél ligáljuk. Néhány nagy HPV 16 szubklónt tartalmazó klónt megvizsgálunk, hogy milyen mértékben kereszthibridizálódik a humán DNS-sel Southern bloton és oldott állapotban. Egy 1211 nukleotidból álló, pGEM-3:HPV16B(-) jelzéssel ellátott szubklónt, ami a 7904 bp-ú HPV-16 genomban a 683. és a 7376. nukleotid között van (Seedorf és munkatársai, lásd fent) elkülönítünk a T7 promoterrel szomszédos ribopróbák szintézisére.

Az RNS próbákat a pGEM-3:HPV16B(-) szubklónból nyerjük, a plazmidot Pvu II enzimmal hasítva felszabadítunk egy 1081 bázispárból álló fragmenst a HPV 16 genomból, ami funkcionális kapcsolatban van a pGEM-3-ból származó T7 promoterrel. A fragmens elkülönítése után a fentiekben leírtak szerint szintetizáljuk az RNS próbákat.

d) HPV 18

A HPV 18 szubtípusra specifikus ribopróbákat ugyancsak elkészítjük. A HPV 18 gyakran integrálódik a humán genomba, ellentétben az episzomális formában maradóval. A HeLa sejtekről (ATCC, CCL 2) ismert, hogy tartalmaznak néhány HPV 18 DNS integrált szubgenom kópiát három különböző hosszúságú Hind III fragmensben. A Papilloma Virus Workshop (Cold Spring Harbor, N. Y.; 1986. szeptember) keretében

bemutatott, a HeLa sejtekben lévő HPV 18 szekvenciát és térképadatokat használjuk fel a λ L47-ben lévő HeLa könyvtár előállítására és szűrővizsgálatára az alábbiak szerint.

A HeLa sejtekből a DNS-t a „Molecular Cloning” (Maniatis és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) módszereivel izoláljuk. 50 μ l össztérfogatban 30 μ g HeLa DNS-t emésztünk Hind III enzimmel. A teljes mértékű emésztés után a reakcióelegyet először fenollal, majd kloroformmal és végül dietil-éterrel extraháljuk. A DNS-t etanollal lecsapjuk. A lecsapás után a DNS-t egy éjszakán át újra szuszpendáljuk 25 μ l TE-ben. 6 μ l ilyen Hind III-mal emésztett HeLa DNS-t hozzáigálunk 1 μ g Hind III kezelt λ L47 karokhoz. 6,73 kb - 21,6 kb nagyságú inszertek hatékonyan pakkolhatók a Hind III-mal kezelt λ L47 karok felhasználásával. 4 μ l ligációs elegyet Gigapack^R rendszer alkalmazásával (lásd fent) fertőző fágrészecskébe pakkolunk. A pakkolási reakció titrálása után, tíz transzfektálást végzünk. Mindegyik transzfektálásnál 50 μ l pakkoló eleggyel transzfektálunk 100 μ l friss, log-fázisban lévő VCS257 (Gigapack kitben kapható) sejttenyészetet, majd 7 ml fedő agarózban 150 mm-es LB agarlemezre lemezelünk. A plakkok kialakulása után, a fentiek szerint leírt módon a plakkokat duplikátban kiemeljük, majd denaturáljuk és sütjük.

Tíz szűrőt 100 ml prehibridációs pufferben a fentiek szerint előhibridizálunk 55°C hőmérsékleten. A szűrőket ezután 50 ml hibridizációs pufferben hibridizáljuk 60 órán át. Azokat a szűrőket, melyeket először helyeztünk a lemezekre két, ³²P-kinázzal kezelt, HPV-specifikus a 96-21 [SEQ ID NO:6] és a 96-22 [SEQ ID NO:7] oligonukleotid keverékével reagáltatjuk 42°C hőmérsékleten. A második szűrőket a HPV 18 specifikus 96-19 [SEQ ID NO:8] és 96-23 [SEQ ID NO:9] próbákkal reagáltatjuk 38°C hőmérsékleten. A hibridizáció után a szűrőket szobahőmérsékleten egyszer és a hibridizációs hőmérsékletükön kétszer mossuk 6xSSC, 0,5 % SDS oldatban, majd kétszer 4 órán át 6xSSC, 0,1 % SDS oldatban a hibridizációs hőmérsékletükön. A szűrők egymást követő autoradiografálása után öt határozottan duplikált jelet azono-

sítunk. A megfelelő plakkokat kiemeljük, tisztítjuk és kinövesztjük. Így a HPV 18 genom részeit tartalmazó klónokhoz jutunk, amit restrikciós analízissel verifikálunk. Jelzett HPV 18 DNS próbákkal végrehajtott Southern blottingot és DNS szekvencia-analízist is végzünk. Egy klónt - esetünkben a λ HPV-18.3 jelzéssel ellátott - kiválasztunk a további vizsgálatokhoz.

A λ HPV-18.3 klónból Hind III enzimmel kihalásztunk egy HPV 18 DNS részt. A HPV 18 genom 4298 bázispárból álló fragmense szabadul fel. A gélen történő tisztítás és eluálás után, ezt a fragmenst Hind III enzimmel emésztett pGEM-3-ba ligáljuk. Csak egy olyan HPV-18 klónt nyertünk - pHPV18H - , mely tartalmazta a HPV 18 genom kívánt részét. Érdekes módon, a pHPV18H a pGEM-3 két kópiáját is tartalmazta.

A pHPV18H-t különféle restrikciós enzimes emésztésnek vetjük alá és a különböző fragmenseket Hind III/Pst I emésztette pGEM-3-ba klónozzuk. Több olyan szubklónt sikerül azonosítani, ami a restrikciós feltérképezés és a szekvencia homológia szerint megfelel HPV 18 régióknak. Az egyik szubklón - amit pHPV18-92 jelöléssel láttuk el - a HPV 18 genom 3,5 kb-ú részét tartalmazza és különösen specifikus RNS próbákat szolgáltat (alacsony humán DNS kereszthibridizáció), ha a Pvu II fragmenst (T7 promotert tartalmaz, a HPV 18 1944 bázispárjából áll, ami a 7857 bázispárú HPV 18 genom 6766. és 853. nukleotidjai között van; Cole és munkatársai, lásd fent) használjuk a HPV6, HPV 11 és HPV 16 RNS próbák előállításánál ismertetett módszerekkel a ribopróbák előállítására. A pHPV18-92 ugyancsak tartalmaz nem humán DNS-t.

2. példa

Amennyiben már rendelkezünk a HPV6, 11, 16 és 18 típusokra specifikus ribopróbákkal, a különböző szövetminták szűrővizsgálatát el tudjuk végezni, azzal a céllal, hogy megállapítsuk a HPV jelenlétét. Ha bármelyik minta HPV jelenlétére utal,

újboldi szűrővizsgálattal az egyes típus-specifikus próbákat felhasználva, további minősítést és mennyiségi mérést végezhetünk. Ebben a példában 172 nőtől nyert cervikális szövetmintát vizsgálunk a HPV fertőzésre vonatkozólag. A vizsgálatoknál a „slot blot” és a ribopróba-oszlop eljárásokat alkalmazzuk. 98 mintát olyan nőktől nyertünk, melyeknél a HPV fertőzés magas rizikója állt fenn. A „magas rizikó”-jú minősítést azért kapták, mert az University of Alabama, Birmingham betegek voltak, mint szexuális úton átvitt betegségben szenvedők. A másik 74 vizsgált mintát az átlagos lakossági populációból nyertük, ezeket a nőket a HPV fertőzés szempontjából „alacsony rizikójú” minősítéssel illettük. Az alábbiakban a ribopróba oszlop eljárásnak két változatát ismertetjük, melyek közül az elsőt használtuk az analízishez, noha bármelyik módszer alkalmazható a találmány megvalósításánál.

a) Ribopróba-oszlop vizsgálati eljárás; 1. módszer

A 172 minta mindegyikét két részre osztjuk. Az egyik csoportot használjuk a „slot blot” analízishez, a másikat a találmányban leírt ribopróba-oszlop eljáráshoz. Mindkét csoport mintáit az alábbiak szerint lizáljuk. A klinikai mintát behelyezzük egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és 30 mp-en át centrifugáljuk 10.000 g-én, hogy a sejtek leülepedjenek. A felülúszót eldobjuk, az üledéket 1,0 ml PBS-ben (10 mM dinátrium-hidrogén-foszfát, 138 mM nátrium-klorid, pH = 7,4) szuszpendáljuk. A sejteket ismét üleptítjük 30 mp-es 12.000 g-én történő centrifugálással, és a felülúszót eldobjuk. Az üledéket 300 µl lizáló pufferben (10 mM Trisz, pH = 8, 1 mM EDTA, 20 mM DTT, 0,1 % SDS és 50 µg/ml proteináz K) szuszpendáljuk vortexolással.

A sejteket lizáljuk, a szuszpenziót 15 percen át szobahőmérsékleten állva hagyva a lizáló pufferben. Egyperces, 12.000 g-én történő centrifugálással üleptítjük a sejtörmeléket.

A „slot blot” analízishez használt mintáknál a felülúszót kétszer fenollal, egyszer fenol/kloroform eleggyel és egyszer kloroformmal extraháljuk. A felülúszót átvisszük

egy új csőbe, a DNS-t 0,1 térfogatnyi 3 M nátrium-acetát oldat és 2 térfogatnyi etanol hozzáadásával lecsapjuk. Az összekevert és 20 percen át szárazjégen tartott keverékből a nukleinsav csapadékot 15 perces, 12.000 g-en történő centrifugálással összegyűjtjük, 70 %-os etanollal átöblítjük, szárítjuk és 30 µl TE oldatban szuszpendáljuk. Mindegyik mintából 5 µl-t cseppentünk GeneScreen Plus^R-ra. A felcseppentett DNS-t denaturáljuk és semlegesítjük, majd blotonként 1,5 ml térfogatban előhibridizálunk 56°C hőmérsékleten. Négy óra elmúltával 8×10^6 cpm/ml próbalegyet adunk hozzá (2×10^6 cpm/ml a HPV6, 11, 16 és 18 ribopróbák mindegyikéből, a fentiekben ismertetett módon elkészítve). Egy éjszakán át történő hibridizálás után másfél órán át mossuk a blotokat 0,1xSSC, 0,1 % SDS oldatban 56°C hőmérsékleten, majd elvégezzük az autoradiográfiát. A „slot blot” vizsgálatnál a 74 alacsony rizikójú mintából négy hibridizálódott a próbaleggyel, míg a magas rizikójú 98 mintából 26 minta.

A ribopróba-oszlopon vizsgált minták esetében a lizálás után a sejttörmelékot centrifugálással üleptítjük, minden mintából 50 µl-t átviszünk egy 1,5 ml-es csavaros tetejű Sarsedt csőbe hibridizáláshoz. A megmaradt lizált mintákat -80°C hőmérsékleten tartjuk.

A hibridizálás előtt az 50 µl mintában lévő DNS-t 10 µl 1 M nátrium-hidroxid oldat hozzáadásával denaturáljuk, majd 5 percen át szobahőmérsékleten tartjuk. A denaturálás után 86 µl 4,8 M $\text{Na}_1,5\text{H}_{1,5}\text{PO}_4$ oldatot adunk minden csőhöz, és a tartalmukat vortexoljuk. 4 µl ^{35}S -jelzett RNS próbát adunk a csövekhez. A próbalegy a PHV6, 11, 16, illetve 18 típusra specifikus próbákból egyenként kb. 20 amól - 15.000 cm - mennyiséget tartalmaz. A csövek tartalmát vortexoljuk, majd 10 mp-en át centrifugáljuk. A hibridizációs reakciót 2 órán át végezzük 72°C hőmérsékleten.

Miután a hibridizáció teljessé válik, a nem-hibridizálódott ribopróbát 12 µl RNáz (lásd fent) hozzáadásával elbontjuk. A mintákat 10 mp-en ismét centrifugáljuk, majd 10

percre 37°C hőmérsékletre helyezzük. Az RNáz-os reakciót 195 µl formamid-festék (lásd fent) hozzáadásával leállítjuk és vortexoljuk. A mintákat Sepharose^R Cl-4B oszlopra visszük (az oszlopok elkészítését az előzőekben már ismertetett módon végezzük). A kapott eredményeket az I. táblázatban foglaltuk össze.

I. T Á B L Á Z A T

A ribopróba-oszlop vizsgálat eredményei

<u>cpm</u>	<u>minták száma (db)</u>	<u>cpm</u>	<u>minták száma (db)</u>	<u>cpm</u>	<u>minták száma (db)</u>
0	2	18	1	96	1
1	3	19	0	99	1
2	2	20	1	106	1
3	5	21	1	118	1
4	13	24	1	132	1
5	14	25	1	239	1
6	19	27	1	224	1
7	25	37	1	277	1
8	8	38	1	368	1
9	7	42	1	399	1
10	11	50	1	421	1
11	2	55	1	549	1
12	8	56	1	672	1
13	11	59	1	870	1
14	2	62	1	935	1
15	0	64	1	1680	1
16	2	85	1	4200	1
17	4	90	1		

A ribopróba-oszlop vizsgálati eljárás kimutathatósági hatását 21 cpm-nél állapítottuk meg, így azokat a mintákat tekintjük a HPV fertőzöttség szempontjából pozitívnak, amelyek cpm értéke 22 vagy e felett van. A 74 alacsony rizikójú nő közül négyenél állapítottunk meg HPV fertőzést. Ezzel szemben a magas rizikójú nők esetében 98 közül 27 bizonyult HPV fertőzöttnek. Azoknál a mintáknál, ahol a „slot blot” módszerrel fertőzést állapítottunk meg, minden esetben megállapítottuk a ribopróba-oszlop vizsgálattal is. Fontos, hogy a ribopróba-oszlop módszerrel eggyel több személynél állapítottunk meg HPV fertőzöttséget, amit a „slot blot” módszerrel nem mutattunk ki. Ezt az eredményt később megerősítettük (lásd alább). Amint az eredmények jelzik, a leírt ribopróba-oszlop diagnosztikai eljárás jobb a nukleinsav-hibridizáción alapuló, eddig alkalmazott eljárásoknál, mint amilyen a „slot blot” eljárás is, úgy gyorsaságát, mint érzékenységét illetően.

Azoknál a mintáknál, ahol pozitív HPV fertőzést találtunk, egy újabb szűrővizsgálatot végeztünk HPV 16 és 18 típusokra specifikus ribopróbákkal, a fertőzés megléte és HPV szubtypusok közötti összefüggésnek köszönhetően. Mindegyik HPV pozitív minta duplikátját újra vizsgáltuk a fentiekben leírt ribopróba-oszlop eljárással, azonban ezeknél a vizsgálatoknál vagy csak HPV 16 vagy csak HPV 18 típusra specifikus ribopróbákat alkalmaztunk. A fenti vizsgálatokban pozitív 31 minta közül 25-nél találtuk úgy, hogy HPV 16 típussal, 4-nél, hogy HPV 18 típussal fertőzött és egy nő volt, aki egyidejűleg HPV 16 és 18 mintával is fertőzött volt. Annál az egy nőnél, aki negatívnak bizonyult „slot blot” eljárás szerint, de HPV pozitív volt az oldott állapotban végzett hibridizációnál, megállapítást nyert, hogy közeli rokon HPV 33 típussal fertőzött [Cole és munkatársai, J. Vir., 58(3):991-995 (1986)], miután a mintából nyert vírus DNS-t kinyertük, klónoztuk és megállapítottuk a szekvenciáját.

b) Ribopróba-oszlop vizsgálati eljárás; 2. módszer

A második ribopróba-oszlop HPV kimutatási eljárás az első eljárás egyszerűsített változata. A cél az volt, hogy csökkentsük úgy a vizsgálatához szükséges összidőt, mint a tényleges munka idejét. Az első, fenti eljárás általában 290 percet igényel a kezdettől a befejezésig (feltéve, hogy az eljárásban jártas végzi a műveletet), melyből kb. 130 perc az az idő, mely a vizsgálatot végzőtől tényleges részvételt igényel. Ezzel szemben az egyszerűsített eljárásnál ezek az időtartamok 235, illetve 85 percre rövidülnek, ezáltal 35 perc, illetve közel 0,75 óra időt takarítunk meg.

A javított eljárásnál a klinikai mintát közvetlenül 500 µl lizáló pufferbe (lásd fent) gyűjtjük, ami nem tartalmaz proteináz-K-t. A sejteket ezután 50 µl/ml végkoncentrációt eredményező proteináz-K hozzáadásával (a törzsoldat koncentrációja 10 µg/ml) és vortexolással, majd 15 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálással lizáljuk. A sejttörmelékét 1 percen, 12.000 g-en történő centrifugálással ülepitjük. 150 µl felülúszót átviszünk egy csavaros kupakú, 1,5 ml-es Sarstedt centrifugacsőbe, és a megmaradt mintát -80°C hőmérsékleten tároljuk.

A hibridizálást 270 µl premix hozzáadásával indítjuk el, ami 258 µl 4,8 M $\text{Na}_{1,5}\text{H}_{1,5}\text{PO}_4$ oldatot és 13 µl ^{35}S -jelzett ribopróba oldatot (kb. 15.000 cpm) tartalmaz. A reakcióelegy összekeverése után 2 órán át hibridizálunk 72°C hőmérsékleten, majd 12 µl RNáz oldatot (lásd fent) adunk hozzá, 10 mp-en át centrifugálunk, 10 percen át 37°C hőmérsékleten inkubálunk és végül 460 µl formamid-festék hozzáadásával a reakciót leállítjuk. Ezeket a mintákat, a kissé nagy hibridizációs térfogatuk ellenére, Sepharose^R CL-4B oszlopon kromatografáljuk és az első módszernél leírt módon értékeljük.

3. példa

A PF-4 mRNS szintjének meghatározása

A vérlemezzel kapcsolatos PF 4 fehérjét kódoló gén különféle expresszálsának vizsgálatához HEL sejteket használunk, melyek a megakarióta sejt rokonságára utaló

fenotípusos és biokémiai markereket expresszálnak. A vizsgálatoknál e sejteket kemikáliákkal és különféle növekedési faktorokkal kezeljük. Az alacsony alapszintű PF 4 mRNS expresszióról ismert, hogy szignifikánsan megnő forbal-észteres kezelés hatására [Tabilio és munkatársai, EMBO, J., 3:445 (1984)]. A vizsgálatoknál a HEL sejteket 10 % fetális szarvasmarhaszérummal, 200 μ M glutaminnal és antibiotikumokkal - 100 egység/ml penicillin, 100 μ g/ml sztreptomycin - kiegészített RPMI-1640 tápközegben tartjuk 37°C hőmérsékleten és 5 % CO₂-t tartalmazó légtérben.

A PF 4 mRNS indukciót farbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA; Sigma, kat. sz.

P-8134) váltjuk ki. A PMA-ból etanolban 10⁻³M oldatot készítünk és -80°C hőmérsékleten tároljuk. 2x10⁵ HEL sejttel beoltunk 2 ml PRMI-1640 tápközeget, amit előzőleg kiegészítettünk 200 μ M glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel, 100 μ g/ml sztreptomocinnel, 2 % fetális szarvasmarhaszérummal és 0, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, illetve 10⁻¹⁰ M PMA-val. A tenyészeteket 37°C hőmérsékleten és 5 % CO₂-t tartalmazó légtérben inkubáljuk 72 órán át, majd a sejteket összegyűjtjük és mikrocentrifugacsövekbe visszük. A lemezekhez tapadó sejteket 0,05 %-os (tömeg/térfogat) tripszinoldattal szabadítjuk fel. Az élő sejtek mennyiségét tripán-kék festéssel határozzuk meg. A sejteket szoba- hőmérsékleten üleptjük és a felülúszót eldobjuk. A tripán-kék festéssel kapott eredményt figyelembe véve a sejttöledéket olyan térfogat lizáló pufferben (0,2 % SDS, 10 mM Trisz, pH = 8,0, 1 mM EDTA, 20 mM DTT és 100 μ g/ml proteináz-K) szuszpendáljuk, hogy 3x10³ sejt/ μ l várt sejtkoncentrációt kapjunk. A lízist vagy közvetlenül ezután végezzük, vagy a szuszpenziót a felhasználásig -80°C hőmérsékleten tartjuk.

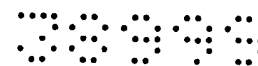
A lizátumban lévő tényleges sejtszám meghatározásához 50 μ l kivétet vízzel 1 ml-re hígítunk és 260 nm-en spektrofotometriásan analizálunk, vakként egy hasonlóan hígított lizálópuffert használva. A kapott abszorbancia értéket összehasonlítjuk ismert

mennyiségű sejtet tartalmazó standard lizátum abszorbancia értékével. Az A_{260} érték és a lizátumban lévő sejtek száma között egyenes összefüggés van.

A PMA indukálás után PF 4 mRNS szint mennyiségi mérését PF4 specifikus RNS próbákkal történő hibridizálással végezzük. A felhasznált RNS próbákat az alábbiak szerint állítjuk elő: Az irodalomban leírt [Poncz és munkatársai, Blood, 69:219-223 (1987)] PF 4 DNS 106-266 bázispárok közötti nukleotidszekvenciával azonos szekvenciát kódoló kettős szálú DNS molekulát hozunk létre két olyan oligonukleotid előállításával, melyek a 3' végnél 22 bázispárú komplementer régióval rendelkeznek. A teljesen kettős szálú hibridet Sambrook és munkatársai (lásd fent) eljárása szerint készítjük el az E.coli DNS polimeráz I Klenow fragmensével a négy nukleotid jelenlétében.

Ezt a vak végű DNS fragmenst ligáljuk a pSP65 (lásd fent) plazmidvektorba, amit előzőleg Sma I enzimmal hasítottunk és baktériumból származó alkalikus foszfáttal kezeltünk, hogy eltávolítsuk az 5' foszfátokat, megakadályozandó a vektor önmagával történő ligálódását. A pSP65 vektor az SP6 bakteriofág promotert tartalmazza közvetlen szomszédságában annak az összetett záróhelynek, ahol a 160 bázispárú fragmenst klónoztuk. A ligálás után két klónt - R12 és R4 - szelektálunk. Az egyes klónok DNS szekvencia analízise azt bizonyítja, hogy az R12 klón használható az RNS próba előállítására, míg az R4 klón a próbával komplementer RNS molekulák előállítására.

Az RNS próbákat az alábbiak szerint elvégzett eljárással készítjük el. Az R12-t teljesen lebontjuk Hind III enzimmal, hogy éppen az inszerthez kapcsolódó 3' végnél linearizáljuk a plazmidot. A reakcióelegyet fenol/kloroform eleggyel extrahálva, eltávolítjuk a restrikciós enzimet. A fenol/kloroformos kezelés után az oldatot kloroformmal extraháljuk. A DNS-t lecsapjuk és vízben (vagy 10 mM Trisz, 1 mM EDTA oldatban) szuszpendáljuk 0,25 µg/µl koncentráció mellett.



Az egyes próba-előállító transzkripció reakciót 100, 20 vagy 3 μ l teljes térfogatban végezzük a próba szükséges mennyiségétől függően. Az oldatokat és a reagenseket a következő sorrendben adjuk és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten - nem 4°C hőmérsékleten - tartjuk a komponensek adagolása előtt. 100 μ l térfogatban a transzkripció reakciót az alábbiak szerint végezzük: Steril 0,5 ml-es Eppendorf csőbe annyi DePC-kezelt vizet adunk [100 ml törzsoldatot készítünk 10 ml 10 %-os DePC (diethyl-pirokarbonát) vízmentes etanolban készült oldatát adva 100 ml, steril edényben lévő vízhez, az oldatot 5 percen át hagyjuk szobahőmérsékleten állni, majd 5 percen keresztül 90°C hőmérsékleten melegítjük, végül szobahőmérsékletre hűtjük], hogy a végső térfogat a kívánt 100 μ l legyen. Ezután 20,0 μ l 5x transzkripció puffert (200 mM Trisz-HCl, pH = 7,5 37°C-on, 30 mM magnézium-klorid, 10 mM spermidin és 50 mM nátrium-klorid), majd 10 μ l 100 mM DTT oldatot adunk a csőbe. Ezt követően 4,0 μ l RNasinTM ribonukleázgátlót adunk az elegyhez, hogy a végkoncentráció 1 egység/ μ l legyen. Az RNasinTM adagolását 20,0 μ l frissen készített ribonukleotid törzsoldat - ami 2,5 mM ATP-t, CTP-t, GTP-t (10 mM törzsoldatokból, amiket pH = 7-re semlegesítettünk) tartalmaz - és 25 μ l ³⁵S - UTP (New England Nuclear, kat. sz.; NEG 039H) oldat követi. Végül 2 μ l linearizált R12 (2-5 μ g) oldatot és 10-20 egység SPG RNS polimerázt adunk a reakcióelegyhez. 60-120 percen át inkubálunk 37-40°C hőmérsékleten. Általában 5-10 μ g RNS próbát kapunk μ g DNS templátonként.

Az RNS próba elkészítéséhez egy, a fentiektől eltérő másik eljárást is alkalmazhatunk. Ennél is szobahőmérsékleten adjuk az oldatot, a reagenseket és a reakcióelegyet nem tartjuk jégen. Elsőként annyi DePc-kezelt vizet adunk a steril csőbe, hogy a 20 μ l végső térfogatot elérjük, majd 4,0 μ l 5x transzkripció puffert, ezt követően 2,0 μ l 100 mM DTT oldatot, 0,8 μ l RNasinTM-t, 4,0 μ l 2,5 mM ATP, CTP és GTP oldatot (előzőleg elkészítve 10 mM ribonukleotid törzsoldatok, pH = 7, azonos térfogatának elegyítésével), majd 2,4 μ l 100 mM UTP (végkoncentráció 12 μ M) oldatot

adagolunk. Templátként 1,0 μ l térfogatban 0,2-1,0 μ g R12 DNS-t adunk az elegyhez. Ezt követi 5,0 μ l ^{35} S-jelzett UTP (New England Nuclear, kat. sz.: NEG 039H), végül 0,5-1,0 μ l (5-15 egység) SP6 RNS polimeráz oldat. A reakcióelegyet 37-40°C hőmérsékleten inkubáljuk 60 percen át.

Miután az RNS szintézis - bármelyik fent leírt módszerrel végezve - teljes, az R12 DNS templátot RNáz mentes DNáz-zal elbontjuk, μ g DNS-ként 1 egység enzimet használva. A DNS lebontás 15 perc alatt történik 37°C hőmérsékleten. Ezután fenol/ /kloroform eleggyel, majd csak kloroformmal extrahálunk. Az RNS próbákat 0,1 térfogat 3 M nátrium-acetát és 2,5 térfogat etanol hozzáadásával és 1 órán át tartó -20°C hőmérsékleten történő inkubálással lecsapjuk. Mikrocentrifugában 12.500 percenkénti fordulatszámmal 15 percen át tartó centrifugálással a próbát összegyűjtjük, a ribopróba üledéket kétszer mossuk 70 %-os etanollal, majd Savant készülékben csökkentett nyomáson szárítjuk. A ribopróbát tartalmazó csapadékot 50 μ l DePC-vízben szuszpendáljuk 20 mM DTT, 50 μ g/ μ l részlegesen hidrolizált poliadenilsav és 1 egység/ μ l RNasinTM jelenlétében. Ekkor az oldat általában $2,5 \times 10^6$ cpm/ μ l aktivitású.

A teljesen lefuttatott transzkripció reakcióval elkészített próba mennyiségének meghatározásához egy másik egyszálú RNS molekulát készítünk, mely olyan ribonukleotid szekvenciával rendelkezik, ami komplementer az R12-ből készült szekvenciával. Ezt az RNS molekulát az R4 teljesen lefuttatott transzkripciójával állítjuk elő. A mennyiségi meghatározáshoz használt próba elkészítéséhez az RNS próba elkészítésének fentiekben leírt eljárását használjuk, azzal a különbséggel, hogy a 0,2 mM (végső koncentráció) jelzetlen UTP mellett csak nyomnyi ^{35} S-UTP-t alkalmazunk. Az R12-ből származó próba mennyiségi meghatározásánál titrációs vizsgálatok sorozatát végezzük el. Mindegyik titrációs vizsgálatnál ugyanazt a próbamennyiséget - nevezetesen 20.000 cpm-t - használjuk és növeljük a célmolekula mennyiségét (adott esetben az R4-ből származó próbát). Mindegyik vizsgálatnál a 2×10^9 cpm/ μ g specifikus

aktivitású próba feleslegben van jelen. Mindegyik titrációs hibridizálást 100 μ l végtérifogatban végezzük, és a reakcióelegy alkotórészei: 2,7 M $\text{Na}_{1,5}\text{H}_{1,5}\text{PO}_4$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ részlegesen hidrolizált poliadenilsav és 20 mM DTT. A hibridizációt 84°C hőmérsékleten végezzük 2 órán át, majd a reakcióelegyet lehűtjük, RNáz-zal emésztjük 37°C hőmérsékleten 20 percen keresztül, hozzáadva 10 μ l 500 egység RNáz T₁ és 3 μg forralt RNáz A enzimet tartalmazó oldatot (5x10⁵ egység/ml RNáz T₁ és 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNáz A frissen készült törzsoldatokból összeállítva).

Amint az RNáz-os emésztés teljes, 240 μ l formamidot adunk minden egyes titrációs elegyhez. A 350 μ l reakcióelegyet 4,1 ml gyantaágy-térifogatú Sephacryl^R S-200 (Pharmacia) oszlopra visszük, amit előzőleg oszlop pufferrel (10 mM Trisz-HCl, pH = 8,0, 1 mM EDTA és 50 mM NaCl) egyensúlyoztunk ki. Az oszlopot sapkával elzárjuk, hogy az oszlopon átfolyás ne történjen. 2,0 ml oszlop puffert viszünk minden oszlopra, és a sapka eltávolításával hagyjuk, hogy a puffer átfolyjon az oszlopon. 2,35 ml kizáródási térifogatnyi eluátumot gyűjtünk minden oszlopról egy-egy szcintillációs csőbe. 5 ml (kb. 2 térifogatnyi) Liquiscin folyadék hozzáadása után elvégezzük a hibridet tartalmazó minták folyadékszintillációs mérését.

A titrációs oldatok megadják a cél mRNS egyes tömegeihez tartozó jelértékek standard görbéjét. Minthogy a célmolekula és a próba ismert méretű, a keletkezett jel nagysága összefüggésbe hozható a próba/célmolekula hibridben résztvevő cél RNS molekula számával.

A celluláris PF 4 mRNS szintjének mennyiségi meghatározását úgy végezzük el, hogy 70 μ l próbakeveréket hozzáadunk 30 μ l sejtlizátumhoz oly módon, hogy az oldott állapotban történő hibridizáció ugyanolyan körülmények között történjen, mint a titrációs vizsgálatoknál. A hibridizálást, majd az RNáz-os emésztést és a molekulaki-zárásos kromatográfiát a fentiekben leírtak szerint végezzük. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy sejtenként két PF 4 mRNS molekulát is detektálhassunk.

Az 5. ábra adatai mutatják, hogy a PF 4 mRNS HEL sejtekben történő expresszáció a PMA serkenti. A PMA koncentráció logaritmikus növekedésével lineárisan növekszik a PF 4 mRNS expressziója. A PF 4 mRNS expressziójára gyakorolt PMA indukció kinetikáját is vizsgálhatjuk a fentiekben leírt oldott állapotban történő hibridizációs módszerrel, különböző ideig stimulálva a HEL sejteket PMA-val. A PF4 mRNS expressziójának indukálása és maximumának elérése 24-48 órás stimuláció után érhető el, lásd 6. ábra. A reakcióválasz kinetikáját a PMA koncentráció nem befolyásolja. Ez az elhúzott expresszió arra vall, hogy a PF 4 mRNS szintézis a PMA kezelésnek egy másodlagos következménye lehet. Ezt a hipotézist megerősítette az a kísérlet, amikor a HEL sejteket cikloheximid jelenlétében (2 µg/ml) vagy távollétében stimuláltuk 10^{-8} M PMA-val.

II. T Á B L Á Z A T

pma	cikloheximid	PF 4 mRNS
	(2 µg/ml)	molekula/sejt
0	-	48
0	+	29
10^{-8}	-	1174
10^{-8}	+	24

HEL sejtekben a PMA indukálta PF 4 mRNS expresszió de novo fehérjeszintézist igényel, minthogy a fenti konstitutív PF 4 mRNS szint nem emelkedik, ha a fehérjeszintézist cikloheximiddel gátoljuk.



SZEKVENCIALISTA

(1) Általános adatok:

- i) Alkalmazók: Amgen Inc.
- ii) A találmány címe: Módszer nukleinsav kimutatására ribopróbák, RNáz enzimés emésztés és molekulatömeg-kizárásos kromatográfia alkalmazásával.
- iii) A szekvenciák száma: 9
- iv) Levelezési cím:
 - (A) címzett: Amgen Inc
 - (B) utca: Amgen Center
1840 Dehaviland Drive
 - (C) város: Thousand Oaks
 - (D) állam: California
 - (E) ország: USA
 - (F) kódszám: 91320-1789
- v) A komputer adatai:
 - (A) médium típus: lemez, 3,5 in., DS, 1,4 MB
 - (B) komputer: Apple Macintosh
 - (C) operációs rendszer: Macintosh OS 7,0
 - (D) software: Microsoft Word Version 5,1a
- vi) A jelenlegi alkalmazási adatok:
 - (A) alkalmazási szám:
 - (B) a lajstromszám adatai:
 - (C) klasszifikáció

2) SEQ ID NO:1 adatai:

- i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossza: 25 nukleotid
- (B) típusa: nukleinsav
- (C) szálszerkezet: egyszálú
- (D) topológia: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO:1

CACTGCTGGA CAACATGCAT GGAAG

3) SEQ ID NO:2 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossza: 25 nukleotid
- (B) típusa: nukleinsav
- (C) szálszerkezet: egyszálú
- (D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 2

CTGTGGTAGA TACCACACGC AGTAC

4) SEQ ID NO:3 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossza: 25 nukleotid
- (B) típusa: nukleinsav
- (C) szálszerkezet: egyszálú
- (D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 3

CACTGCTGGA CAACATGCAT GGAG

5) SEQ ID NO:4 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossza: 25 nukleotid
- (B) típusa: nukleinsav

(C) szálszerkezet: egyszálú

(D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 4

AAGCAGAACC GGACAGAGCC CATTA

6) SEQ ID NO: 5 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossza: 25 nukleotid

(B) típusa: nukleinsav

(C) szálszerkezet: egyszálú

(D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 5

CTTGCCTCCT GTCCAGTAT CTAAG

7) SEQ ID NO: 6 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossza: 20 nukleotid

(B) típusa: nukleinsav

(C) szálszerkezet: egyszálú

(D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 6

ACATGAGCTG GGCACTATAG

8) SEQ ID NO: 7 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

(A) hossza: 20 nukleotid

(B) típusa: nukleinsav

(C) szálszerkezet: egyszálú

(D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 7

GTTGCAGCAC GAATGGCACT

9) SEQ ID NO: 8 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossza: 20 nukleotid
- (B) típusa: nukleinsav
- (C) szálszerkezet: egyszálú
- (D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 8

TCTAGAATTA GAGAATTAAG

10) SEQ ID NO: 9 adatai:

i) A szekvencia jellemzői:

- (A) hossza: 20 nukleotid
- (B) típusa: nukleinsav
- (C) szálszerkezet: egyszálú
- (D) topológiája: ismeretlen

xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 9

GGGCTCTAAA TGCAATACAA

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás cél-nukleinsavszekvencia kimutatására RNS próba alkalmazásával, azzal j e l l e m e z v e, hogy az eljárás az alábbi lépésekből áll:

- a) szigorú körülmények között oldatban összehozzuk a nukleinsavmolekulák állományát egy olyan RNS próbával, mely képes hibridizálni a célnukleinsav-szekvenciát kódoló célnukleinsavval, egy próba/célmolekula hibrid nukleinsavmolekulát képezve;
- b) a hibridizációt követően az a) lépésnél szereplő oldatot RNáz-zal kezeljük;
- c) a próba/célmolekula hibrid nukleinsavmolekulákat elválasztjuk az oldat többi alkotórészeitől;
- d) kinyerjük és detektáljuk a c) lépésnél szereplő próba/célmolekula hibrid nukleinsavmolekulákat.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a cél-nukleinsavszekvenciát egy DNS molekula kódolja.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a cél-nukleinsavszekvenciát egy RNS molekula kódolja.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, ahol a nukleinsavmolekulák állománya biológiai mintából származik.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a cél-nukleinsavszekvencia virális, bakteriális vagy gomba kórokozó jelenlétét jelzi a biológiai mintában.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a kórokozó egy vírus.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a kórokozó egy baktérium.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a kórokozó egy gomba.

9. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a cél-nukleinsavszekvencia neoplazma jelenlétét jelzi.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, ahol a neoplazma jóindulatú.
11. A 9. igénypont szerinti eljárás, ahol a neoplazma rosszindulatú.
12. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a cél-nukleinsavszekvencia örökölhető genetikai betegség meglétét jelzi.
13. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a cél-nukleinsavszekvencia egy genetikai marker.
14. A 13. igénypont szerinti eljárás, ahol a genetikai marker örökölhető genetikai betegséggel kapcsolatos.
15. A 13. igénypont szerinti eljárás, ahol a genetikai marker neoplazma jövőbeli kifejlődésével kapcsolatos.
16. A 13. igénypont szerinti eljárás, ahol a genetikai markert bírósági analízisekre használják.
17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol az RNS próba detektálható jelzőanyagot tartalmaz, ami lehet radioizotóp, fluoreszcens molekula, kemilumineszcens molekula vagy specifikusan kötődő pár tagjai.
18. A 17. igénypont szerinti eljárás, ahol a detektálható jelzőanyag radioizotóp, ami lehet ^3H , ^{125}I , ^{32}P vagy ^{35}S .
19. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol a radioizotóp ^{32}P .
20. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol a radioizotóp ^{35}S .
21. A 17. igénypont szerinti eljárás, ahol a specifikusan kötődő pár: avidin/biotin.
22. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nukleinsavmolekulák állománya és az RNS próba 15 percnél nem rövidebb, de 8 óránál nem hosszabb ideig reagál egymással.
23. A 22. igénypont szerinti eljárás, ahol a nukleinsavmolekulák állománya és az RNS próba 2 órán át reagál egymással.



24. A 22. igénypont szerinti eljárás, ahol az RNS próba mennyisége feleslegben van a célnukleinsav mennyiségéhez képest.

25. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a módszert a jelenlévő cél-nukleinsavszekvencia mennyiségének meghatározására használjuk.

26. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a szigorú körülmények jelentése:

- a) a hőmérséklet 15-30°C-kal van alacsonyabban a próba/célmolekula hibrid oldadási pontjánál;
- b) a kémhatás pH = 6,6-7,2; és
- c) az elektrolitkoncentráció 2,0-3,5 M.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a célnukleinsav egy RNS és a hőmérséklet $84 \pm 4^\circ\text{C}$.

28. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a célnukleinsav egy DNS és a hőmérséklet $72 \pm 4^\circ\text{C}$.

29. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a kémhatás pH = $6,9 \pm 0,2$.

30. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a kémhatás pH = $6,9 \pm 0,05$.

31. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol az elektrolitkoncentráció $2,75 \pm 0,2$ M.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, ahol az elektrolitkoncentráció $2,75 \pm 0,05$ M.

33. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol az elektrolitkoncentráció $2,5 \pm 0,2$ M.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, ahol az elektrolitkoncentráció $2,5 \pm 0,05$ M.

35. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a próba/célmolekula hibrid nukleinsav-molekulákat molekulatömeg kizárásos kromatográfiával választjuk el az oldat többi komponensétől.

36. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a próba/célmolekula hibridet folyadékszintillációval detektáljuk.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

az I.B.G. & K. Nemzetközi

szabadalmi iroda tagja

11-1062 Budapest, Andrássy út 113.

tel: 24-950. Fax: 34-24-323

1. ÁBRA

Ribopróba érzékenységi határ

Korrigált jel (S-cB) = jelértékből (cpm) kivonva a háttérérték (cpm)

Normalizált jel (S cpm/amól) = célmolekula jelenlétében kapott korrigált jelértékből kivonva a célmolekula nélkül kapott korrigált jelérték és ez az érték osztva a célmolekula amólban kifejezett mennyiségével.

Jel/zaj arány (S/N) = a célmolekula jelenlétében kapott korrigált jelérték osztva a célmolekula nélkül kapott korrigált jelértékkal.

SD = a számláló standard szórása

Érzékenységi határ ($LoD_{3\Delta}$) =

$$\frac{[(\text{célmolekula távollétében kapott korrigált jelérték}) + 3x SD]}{\text{normalizált jelérték}}$$

Példa: cB = $54,1 \pm 2,4$ cpm (5 mérés átlaga)

0,0 amól célmolekula jelenlétében: 56,0 cpm (2 mérés átlaga)

korrigált jelérték: 1,9 cpm

0,5 amól célmolekula jelenlétében: 168,8 cpm (2 mérés átlaga)

korrigált jelérték: 114,7 cpm

2,0 amól célmolekula jelenlétében: 550,6 cpm (2 mérés átlaga)

korrigált jelérték: 496,5 cpm

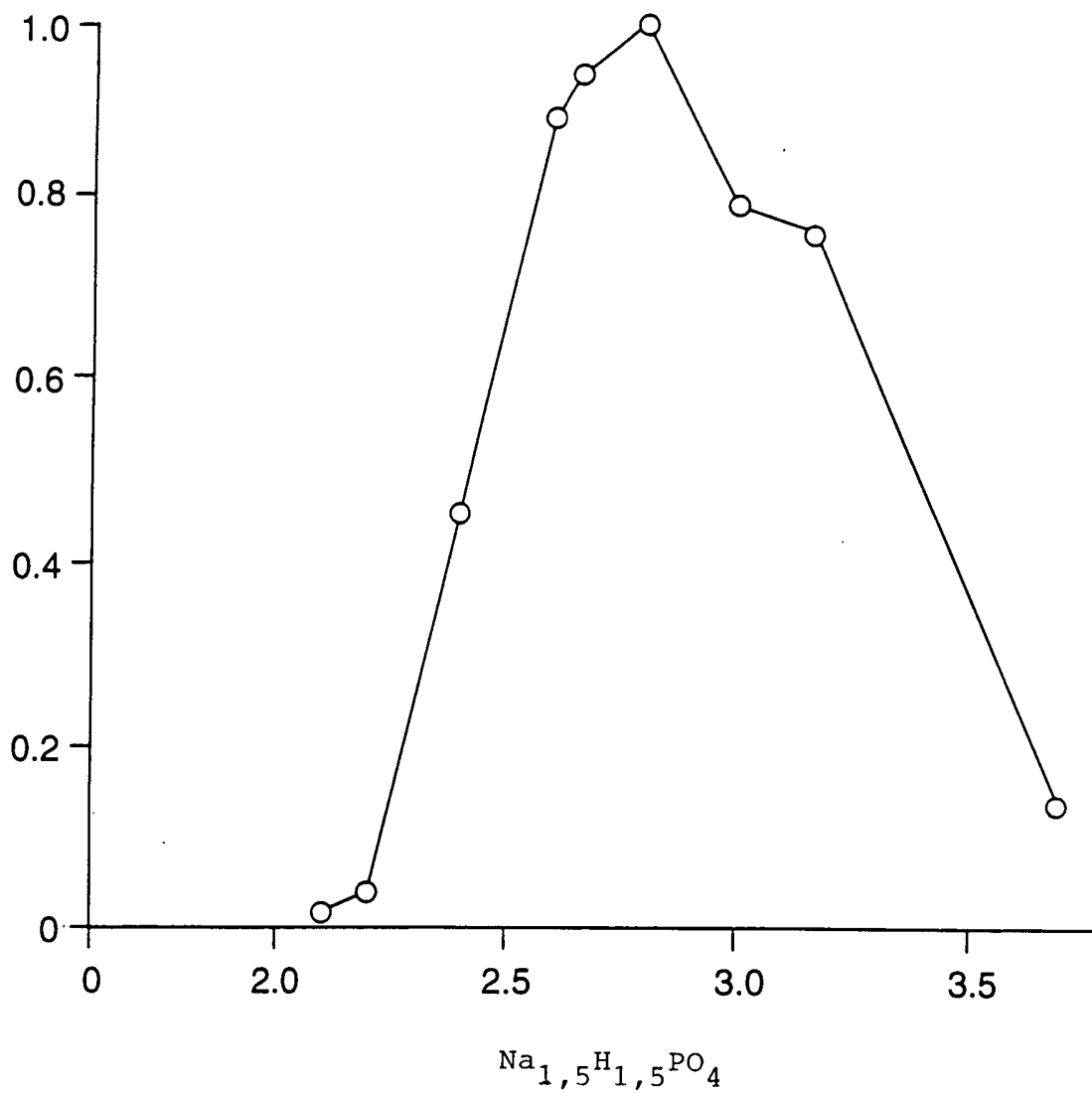
$LoD_{3\Delta}$ 0,5 amól célmolekula esetében:

$$S \text{ cpm/amól} = \frac{(114,7 \text{ cpm} - 1,9 \text{ cpm})}{0,5 \text{ amól}} = 225,6 \text{ cpm/amól}$$

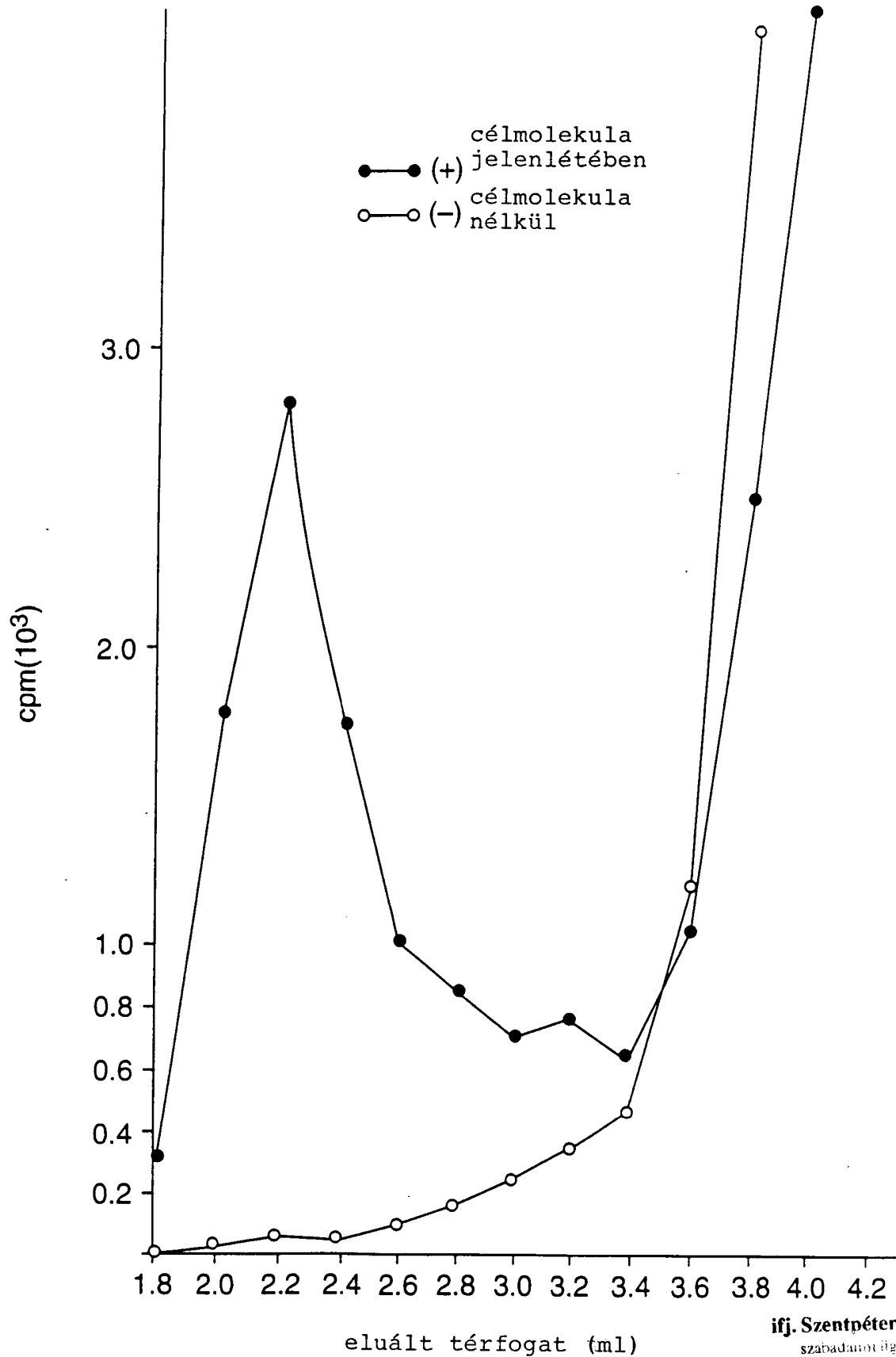
$$S/N = 114,7 \text{ cpm} / 1,9 \text{ cpm} = 60,4$$

$$LoD_{3\Delta} = \frac{[(1,9 \text{ cpm}) + 3x 2,4 \text{ cpm}]}{225,6 \text{ cpm/amól}} = 0,04 \text{ amól}$$

2. ÁBRA



3.ÁBRA



ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

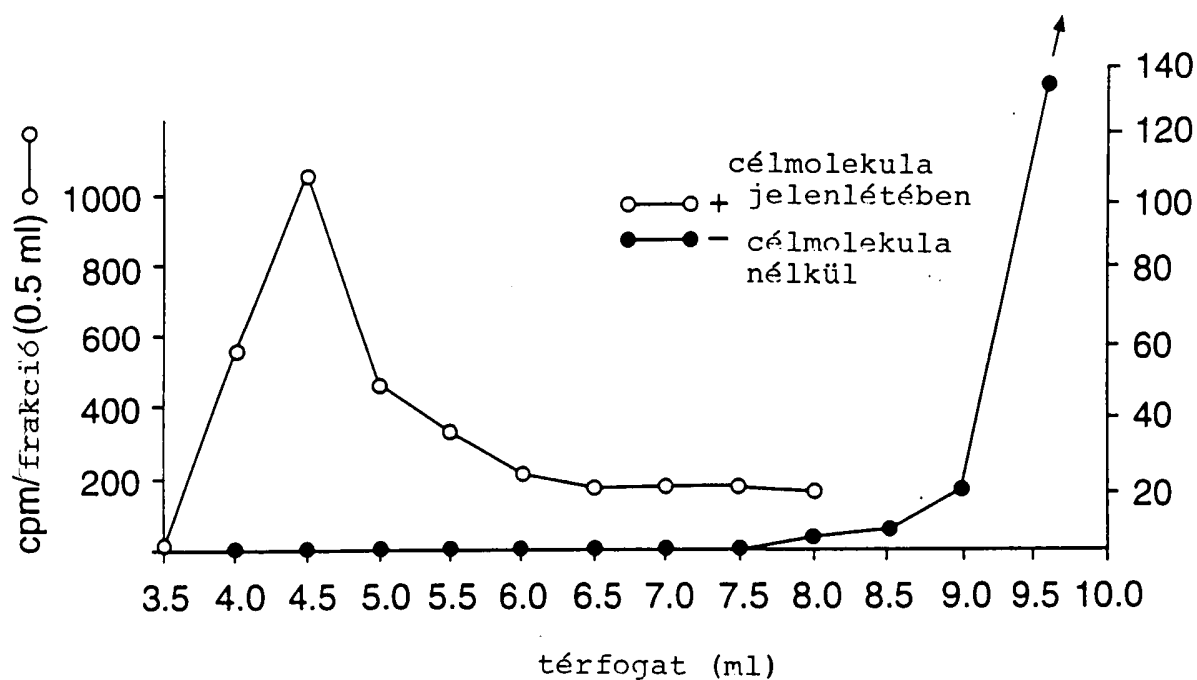
Sz.B.G. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda

H-1069 Budapest, Árpád út 13.

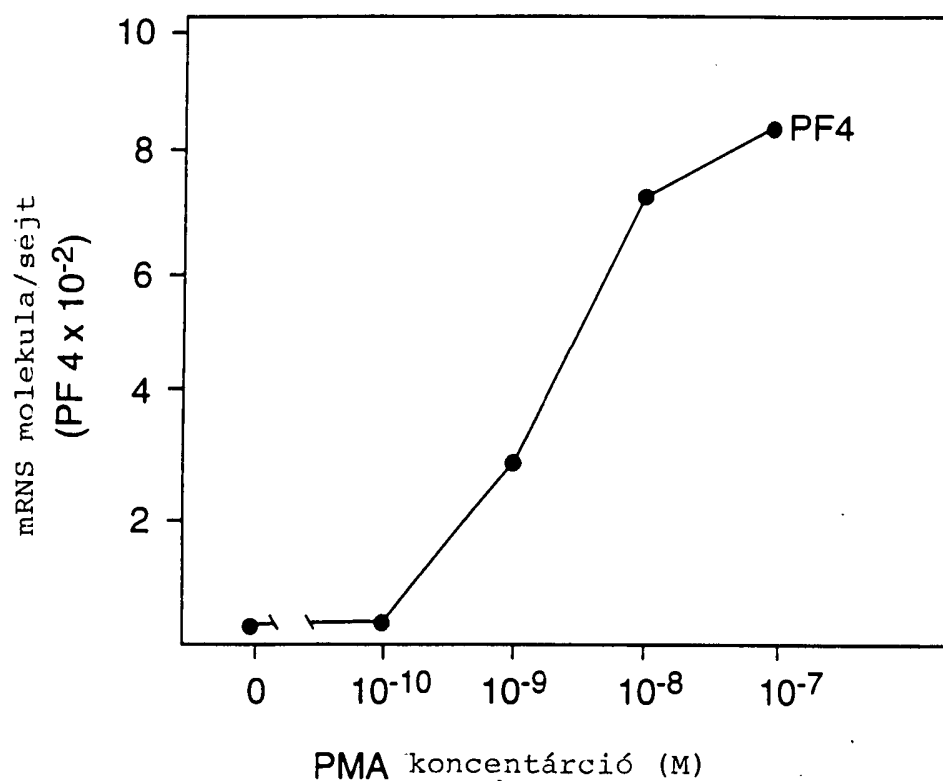
Tel.: 06-1/24-323

4. ÁBRA



ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzeti Szabadalmi
Hivatalnál
11-1062 Budapest
2010.06.10.

5. ÁBRA



ifj. Szentpéteri Ádám

szociális ügyvivő

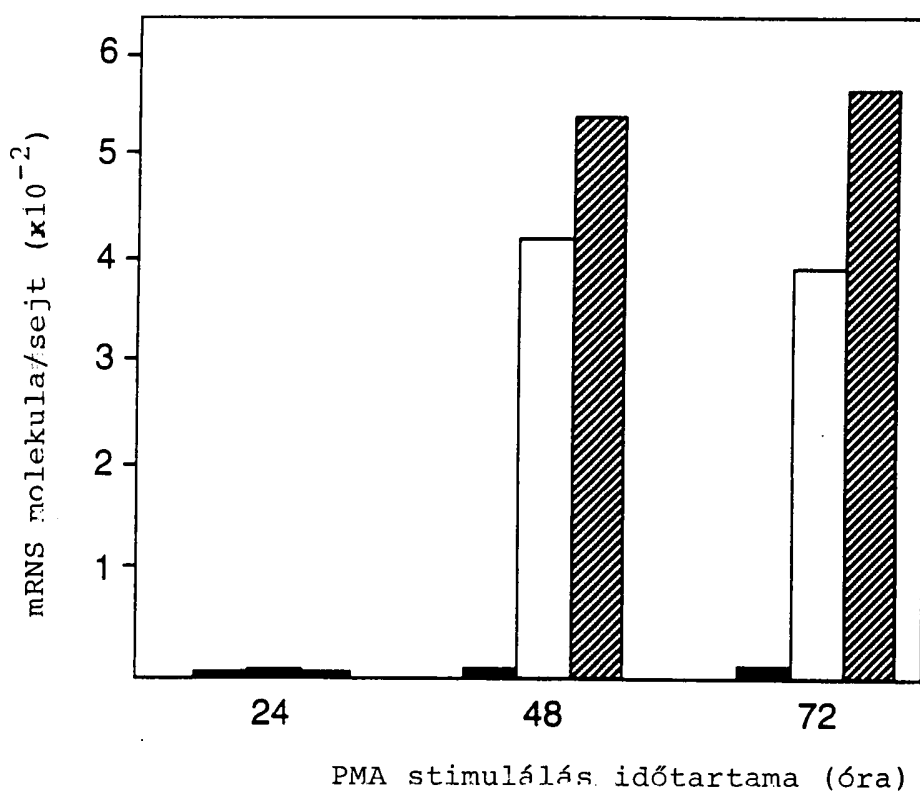
az S.F.G. & K. Nemzeti közszolgálat

Szociális Irodája

H-1062 Budapest, Árpád köz 11.

Tel: 24990, Fax: 24991

6. ÁBRA



ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

az S.B.G. & Partners Kft. részéről

Szabadalmi Iroda Kft.

H-1063 Budapest, Rózsavirág köz 1.

Tel: 930, Fax: 930