

**MÓDSZER ÉS KÉSZLET FOSZFATÁZ-CÉLZÓ TOXINOK KIMUTATÁSÁRA,
VALAMINT A KIT ALKALMAZÁSA**

KIVONAT

A2

A találmány tárgyát foszfatáz-célzó toxinok kimutatására szolgáló vizsgáló módszer, készlet, valamint a készlet alkalmazása képezi. A találmány szerinti vizsgálati módszer különösen mikroalgák, így például cianobaktériumok vagy dinoflagelláták által termelt toxin kimutatására alkalmazható.

[Handwritten signature]

2001. 10. 31.

MÓDSZER ÉS KÉSZLET FOSZFATÁZ-CÉLZÓ TOXINOK KIMUTATÁSÁRA

A találmány tárgyát jellegzetesen mikroalgák, így például cianobaktériumok vagy dinoflagelláták által termelt foszfátáz-célzó toxinok kimutatására szolgáló vizsgáló módszer képezi.

A dinoflagelláták jellegzetesen egysejtű, fotoszintetizáló, kétostoros algák. Néhány tengeri dinoflagelláta (így például *Prorocentrum* faj vagy *Dinophysis* faj) foszfátáz-célzó toxinokat, úgymint okadainsavat és dinophysis toxint termel, amelyek emberbe jutva gasztrointesztinális panaszokat okoznak. Így ezek az algák problémákat okozhatnak, amennyiben megfertőzik az étkezési kagylók környezetét.

A cianobaktériumok, amelyek még kék-zöld algákként is ismertek, ugyancsak fotoszintetizáló szervezetek, amelyek főként vízi élőlények és a partmenti vizeket, nyílt tengeri vizeket és óceánokat, folyókat, tavakat és talajvizeket népesítik be, de lehetnek szárazföldiek is, amelyek az avarban és a talajban találhatók.

A cianobaktériumok számos fajtája és törzse, különösen a *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabena*, *Nodularia* és *Oscillatoria* fajok toxinokat termelnek, amelyek emberekbe vagy más emlősbe, madarakba vagy halakba jutva betegséget okozhatnak. Az ilyen toxinok bevitele két fő úton, így fertőzött víz ivásával vagy fertőzött tengeri állatok elfogyasztásával mehet végbe.

A cianobaktériumok és dinoflagelláták a toxinok két fontos típusát termelik. Neurotoxinokat, így például anatoxinokat és szaxitoxinokat, amelyek az áldozat bénulását okozzák, és ebből fakadóan az állapotot gyakran paralitikus kagylómérgezésnek nevezik. Az ilyen neurotoxinok okozta fertőzés nagyon ritka, viszont végzetes kimenetelű lehet.

A toxinok másik formája a protein-foszfátáz enzimekhez kötődik, és befolyásolja az enzimek protein szubsztrátumokat defoszforilező képességét, így inaktíválják a testsejtekben levő enzimeket. Ezek a toxinok viszonylag elterjedtek, és néhányuk (úgymint a dinoflagelláta toxinok, így az okadainsav vagy a



dinophysis toxin) hányingert, hányást és hasmenést okozhat, és ebből fakadóan az állapotot gyakran hasmenéses kagylómérgezésnek nevezik. Néhány protein-foszfatáz-célzó toxin tumor promoter, és az ezekkel a toxinokkal való érintkezés rákhoz vezethet. Más toxinok, például a mikrocisztin vagy a nodularin cianobaktérium-toxinok hepatotoxikusak és májkárosodáshoz vezethetnek. A foszfatáz-célzó toxinok közül a mikrocisztin, nodularin és okadainsav fordul elő a leggyakrabban.

A dinoflagelláta-toxin mérgezés leggyakoribb forrása a kagyló és a halmáj, a cianobaktérium-toxin mérgezés leggyakoribb oka a fertőzött víz ivása és/vagy a fertőzött vízben való fürdés. Úgy a cianobaktérium-, mint a dinoflagelláta-toxinok kagylóban és vízben is előfordulhatnak. Az alga-toxin mérgezésnek egy különösen elterjedt forrása az étkezési kagyló, mivel ezek toxin-termelő algákkal táplálkozva felhalmozzák a toxinokat. Más kagylóféleségek, így az osztrigák, óriáskagylók és fésűkagylók ugyancsak mérgezetten lehetnek.

Továbbá az ivóvíz, különösen a talajvízből származó készletek cianobaktériumokkal szennyeződhetnek, és így a toxinbevitel közvetlen forrásaként szolgálhatnak.

Ezért nyugtalanító, hogy a magas proteintartalmú egészséges táplálékként és/vagy élelmiszeradalékként algákat és/vagy cianobaktériumokat fogyasztani. Nem léteznek hivatalos útmutatók az összegyűjtött cianobaktériumok és algák toxintermelő törzsekkel való fertőzöttségének folyamatos ellenőrzésére, és különböző fajok, így például az *Anabena* vagy *Aphanizomenon* fajok piaci értékesítése különösen aggodalomra ad okot, mivel számos toxintermelő törzs található közöttük.

Amellett, hogy az algatoxinoknak való érintkezés rövidtávú kellemetlenségeket, orvosi ellátási költségeket, a kagylófeldolgozó-ipar járulékos költségeinek növekedését, kieső munkaórákat okoz, bizonyított - amint azt már a fentiekben említettük -, hogy a foszfatáz-célzó mikrocisztin és nodularin toxinok tumor-



promoterek, és feltételezik, hogy a klinikai vagy szubklinikai toxinmennyiségnek való ismételt érintkezés, különösen magas alkoholbevitellel vagy dohányzással társulva rákhoz, főleg májrákhoz vezethet.

Jelenleg számos különböző módszer létezik az algákból és cianobaktériumokból származó foszfatáz-célzó toxinok kimutatására és mennyiségi meghatározására. Egy szabványos módszer szerint az étkezési kagylót vagy más potenciálisan foszfatáz-célzó toxint tartalmazó forrást megőrlik, és az őrölt kagylószövet extraktumát egerekbe injektálják. A foszfatáz-célzó toxinnal való szennyezettséget és annak súlyosságát az egerek túlélésének függvényében határozzák meg [lásd: Stabell és mtsai., *Food. Chem. Toxicol.* **30**(2): 139-44 (1992)]. Nyilvánvaló, hogy ez egy időpazarló, durva és költséges módszer az ételek biztonsági és minőségi vizsgálatára.

Egy másik eljárás a hasmenéses kagylómérgezést okozó mérgek (DSP, Diarrheal Shellfish Poisons) azonosítására szolgáló módszerben [lásd: EP-A-554458 (Iatron Laboratories Inc.) szabadalmi iratban] a toxin elleni elsődleges és másodlagos antitest felhasználásával hagyományos szendvics módszert alkalmaznak.

Egy további módszer szerint kívülről (exogén módon) bevitt foszfatáz enzim aktivitásának csökkenését mérik, így azonosítva a foszfatáz-célzó toxinnak a jelenlétét a kagylóban. Ennek a módszernek a hátránya, hogy az étkezési kagyló vagy más kagyló szöveteinek őrlését igényli, így az endogén foszfatázok is felszabadulnak, ezek interferálnak a bevitt foszfatázzal, és rontják a vizsgálat érzékenységét és hitelességét [lásd Sim és Mudge, *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*, Eds. Codd, Jeffries, Keevil and Potter, Royal Society of Chemistry (1994), valamint US-A-5180665 (Charles Holmes) szabadalmi iratot].

Fennáll az igény tehát egy gyors, érzékeny és olcsó vizsgálatra vagy módszerre a foszfatáz-célzó toxinok kvantitatív és kvalitatív kimutatására, különösen a vízben, kagylóban és/vagy algák és cianobaktériumok ehető termékeiben jelen

levő alga és cianobaktérium foszfatáz-célzó toxinok kimutatására. Különösen egy olyan vizsgálati módszerre van igény, amely elég egyszerű ahhoz, hogy kevésbé képzett vagy képzetlen személyek, így például halászok vagy víztisztasági személyzet a helyszínen elvégezhesse, és a vizsgálat elvégzése nem igényel laboratóriumi felszerelést vagy különleges berendezéseket.

A találmány tárgya tehát egy vizsgálati módszer a protein-foszfatázokat gátló foszfatáz-célzó toxinok kimutatására, amely szerint egy immobilizált ligandummal borított szilárd hordozót érintkezésbe hozunk

(i) egy feltételezetten toxinnal fertőzött mintával és

(ii) egy nem-immobilizált ligandummal,

ahol a fenti immobilizált ligandum képes legalább egy fenti toxinhoz, nem-immobilizált ligandumhoz vagy a toxin és a nem-immobilizált ligandum komplexeihez kötődni, valamint a fenti nem-immobilizált ligandum képes legalább egy fenti immobilizált ligandumhoz, toxinhoz vagy a toxin és az immobilizált ligandum komplexeihez kötődni, és ahol az immobilizált ligandum azon részaránya, amely a toxinhoz, a nem-immobilizált ligandumhoz vagy a toxin és a nem-immobilizált ligandum komplexeihez kötődött, a fenti minta toxintartalmának a függvénye; és ahol a fenti immobilizált ligandum képes közvetlenül vagy közvetve egy detektálható jelet létrehozni, amikor nincs komplexben vagy a fenti toxinnal, a fenti toxin és nem-immobilizált ligandum komplexével vagy a fenti nem-immobilizált ligandummal van komplexben, vagy a fenti nem-immobilizált ligandum képes közvetlenül vagy közvetve egy detektálható jelet létrehozni, amikor nincs komplexben vagy amikor komplexben van;

elválasztjuk a kötött frakciót a nem kötött frakciótól; és

közvetlenül vagy közvetve meghatározzuk az immobilizált ligandumhoz kötött nem-immobilizált ligandumot (kötött frakció) vagy a vizes oldatban levő komplexet nem képző nem-immobilizált ligandumot (nem-kötött frakció);

ahol az (i) és (ii) összetevőket külön-külön, egymás után vagy egyidejűleg

vihetjük fel a szilárdhordozóra, és amennyiben külön-külön vagy egymás után visszük fel, azt tetszőleges sorrendben végezhetjük el.

A találmány egyik kiviteli alakja szerint a toxin meghatározása magába foglalhatja az immobilizált ligandumhoz közvetlenül vagy közvetve nem kötődött nem-immobilizált ligandum kimutatását. Amennyiben a nem-immobilizált ligandum verseng a toxinnal az immobilizált ligandumhoz való kötődésért, a nem kötött ligandum magas szintje a magas toxinkoncentráció jelenlétét mutatja. Amennyiben a nem-immobilizált ligandum komplexet képez az immobilizált ligandumhoz kötődött toxinnal, a magas nem kötött ligandum szint alacsony toxin koncentráció jelenlétére utal.

A találmány egy másik kiviteli alakja szerint a toxin meghatározása magában foglalja az immobilizált ligandumhoz közvetlenül vagy közvetve kötődött nem-immobilizált ligandum kimutatását. Ahol a nem-immobilizált ligandum verseng a toxinnal az immobilizált ligandumhoz való kötődésért, ott a magas szintű kötött ligandum az alacsony toxinkoncentráció jelenlétét mutatja. Ahol a nem-immobilizált ligandum komplexet képez az immobilizált ligandumhoz kötődött toxinnal, ott a magas kötött ligandumszint magas toxinkoncentráció jelenlétére utal.

Előnyösen a találmány tárgyát egy a foszfatáz-célzó toxinok, különösen alga- és cianobaktérium-toxinok kimutatására szolgáló kompetitív kötődési vizsgálat képezi, ahol a mintában levő toxinmolekulák a nem-immobilizált ligandummal versenyeznek az immobilizált ligandum korlátozott számú kötőhelyeiért, és az immobilizált ligandum kötőhelyeihez kötődött vagy nem kötődött nem-immobilizált ligandum mennyiségéhez viszonyítva határozzuk meg a mintában jelen levő bármely toxint.

A leírásban használt „meghatároz”, „kimutat” vagy „vizsgál” kifejezések egyaránt magukban foglalják a mennyiségi meghatározást, abban az értelemben, hogy a mintában jelen levő foszfatáz-célzó toxinok mennyiségének abszolút értékét határozzuk meg, valamint magukban foglalják a szemikvantitatív és kvalitatív

vizsgálatot vagy meghatározást is. A jelen levő toxinok mennyiségét mérőszámmal, aránnyal, százalékkal vagy moláris mennyiséggel állapíthatjuk meg vagy kimutathatjuk a mintában lévő toxinok jelenlétét vagy hiányát is. A találmány egyik előnyös kiviteli alakja szerint a toxinok jelenlétének vagy hiányának a kimutatását vagy a jelen levő toxin szemi-quantitatív meghatározását valósítjuk meg. Ebben az értelemben a toxinok „hiánya” jelentheti azt, hogy a toxinkoncentráció a vizsgálat kimutatási határa alatt, vagy egy biztonságosnak vagy tolerálhatónak ítélt szint alatt van.

A találmány szerinti vizsgálati módszerrel vizsgált minta bármely olyan feltételezetten foszfatáz-célzó toxinnal fertőzött minta lehet, amely valószínűsíthetően foszfatáz-célzó toxinokat termelő mikroorganizmusoknak történő expozíció révén fertőződhetett. Ilyen minták például víz, így tengervíz, friss víz, talajvíz, tavakból, folyókból, forrásokból, patakokból, tárolókból, ivóvíz készletekből vett víz, vagy egyszerű csapolással vagy pipetta felhasználásával extrahálással kagylóból kivont nedvesség, kagylók áztatóvíze, vagy algákból vagy cianobaktériumokból kivont valamilyen élelmiszer, élelmiszeradalék, táplálkozási kiegészítő, alternatív orvosság vagy hasonló termék lehet. Abban az esetben, ha a kagyló (így például az osztrigák) szabad vizet tartalmaz, a vizsgálat során egy abszorbens szubsztrátumot (a szilárd alapvázat) merítünk a szabad vízbe. Más módszerként az abszorbens szubsztrátumot egyszerűen a kagyló nedves húsához nyomjuk, így például miután nyílást törünk a kagylón.

A találmány előnyös kiviteli alakja szerint a vizsgált minta a kagyló felszíne vagy a kagylóból származó nedvesség.

A találmány szerinti módszer bármilyen kagylófajta, így fésűkagylók, garnéla rákok, étkezési kagylók vagy osztrigák, előnyösen étkezési kagylók vizsgálatára alkalmas. A találmány egy másik előnyös kiviteli alakja szerint a vizsgálandó minta az ilyen kagylók környezetéből vett vízminta, és egy további előnyös kiviteli alak szerint a vizet ivóvíz készletekből vesszük.



A vizsgálandó mintát alapjában véve nem kezelt módon vagy kívánt esetben bármely ismert módszerrel szűrve vagy a vizsgálat előtt víz, puffer-oldat vagy bármely vizes közeg hozzáadásával hígítva vizsgálhatjuk, vagy a vizsgálat előtt például hűtéssel vagy fagyasztással tartósíthatjuk.

Bármely toxinkötő ligandum felhasználható a találmány szerinti vizsgálati módszerben, így például immobilizált vagy nem-immobilizált ligandumokat, úgymint antitesteket, amelyek lehetnek poliklonálisak vagy monoklonálisak, vagy antitest fragmentumokat, így például $F(ab)$, $F(ab')_2$ vagy $F(v)$ fragmentumokat használhatunk. Az ilyen antitestek vagy antitest fragmentumok lehetnek egy- vagy kétvegyértékűek és hibridóma technikával állíthatóak elő vagy szintetikus eredetűek, így rekombináns DNS technika vagy kémiai szintézis termékei lehetnek. Egyláncú antitestek vagy más antitest származékok vagy mimetikumok is felhasználhatóak. Az antitesteket vagy antitest fragmentumokat a foszfatáz-célzó toxinok bármely epitopja, összetevője vagy szerkezete ellen termelhetjük vagy irányíthatjuk. Más módszerként a toxinhoz specifikusan kötődni képes kis szerves molekulát vagy peptidet, így oligopeptidet vagy polipeptidet, a toxinhoz affinitással rendelkező, például kombinatorikus kémiával vagy fág display könyvtárakból kiválasztott specifikus kötővegyületeket vagy DNS vagy RNS specifikus kötőszekvenciákat használhatunk.

Előnyösen a találmány szerinti toxinkötő ligandum egy protein foszfatáz enzim, és még előnyösebben a vizsgálati módszerben kötő ligandumként a protein foszfatáz 2A-t (pp2A) használjuk.

Ehhez hasonlóan a találmány szerinti módszerben másodikként használt ligandum bármely a toxinhoz, az első ligandummal kompetitív vagy nem-kompetitív módon kötődő ligandum lehet. Más módszerként a második ligandum bármely a toxinnal az első ligandumhoz való kötődésért versengő ligandum lehet. Előnyösen az első ligandum egy toxinkötő ligandum, még előnyösebben egy protein foszfatáz enzim. A két ligandum közül az egyiket immobilizálni kell, míg a má-

sik nem-immobilizált kell, hogy legyen, és a ligandumok közül legalább az egyik közvetlenül vagy közvetve kimutatható kell, hogy legyen. A találmány egyik előnyös kiviteli alakja szerint a nem-immobilizált ligandum eleget kell, hogy tegyen azoknak a funkcionális követelményeknek, mely szerint kompetitíven gátolja a toxin kötődését az immobilizált ligandumhoz, és közvetlenül vagy közvetve egy azonosítható jelet bocsát ki. Így a nem-immobilizált ligandum például egy olyan molekula lehet, amelyet bármilyen ismert formájú közvetlen vagy közvetett jelet kibocsátó csoporttal jelölhetünk meg. Ennek megfelelően az ilyen ligandumok lehetnek poliklonálisak vagy monoklonálisak antitestek vagy antitest fragmentumok, így például $F(ab)$, $F(ab')_2$ vagy $F(v)$ fragmentumok. Az ilyen antitestek vagy antitest fragmentumok lehetnek egy- vagy kétvegyértékűek, és előállíthatóak hibridóma technikával vagy szintetikusán, így rekombináns DNS technika vagy kémiai szintézis termékei lehetnek. Eglyáncú antitestek vagy más antitest származékok vagy mimetikumok, valamint kombinatorikus vagy fág display könyvtárakból kiválasztott kis szerves molekulák, peptidek, oligopeptidek vagy polipeptidek is felhasználhatóak. Az antitesteket vagy antitest fragmentumokat a foszfatáz-célzó toxinok bármely epitopja, összetevője vagy szerkezete ellen vagy a foszfatáz-célzó molekulát kötő ligandum ellen termelhetjük vagy irányíthatjuk. Más módszerként a toxinhoz vagy a toxint kötő ligandumhoz affinitással rendelkező vegyületet, így például a toxint specifikusan kötő kis szerves molekulát, peptidet, oligopeptidet vagy polipeptidet, a toxint kötő ligandumot, így például kombinatorikus kémiával vagy fág display könyvtárból kiválasztott kötővegyületet vagy specifikusan kötődő DNS vagy RNS szekvenciáit használhatunk.

Általában a jelzőcsoportot hordozó ligandum a közvetlenül kimutatható csoport, például valamilyen fém kolloid (így arany kolloid) kötőhelye, valamilyen kromofór vagy fluorofór (így például cianin, ftalocianin, merocianint, trifenilmetil, ekvinansz stb.) [lásd: Topics in Applied Chemistry, Infrared Absorbing Chromophores, edited by Matsuoka, Plenum Press, New York, NY, (1990), Topics

in Applied Chemistry, The Chemistry and Application of Dyes, Waring et al. Plenum Press, New York, NY, (1990), valamint Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Haugland, Molecular Probes Inc. (1996) könyvekben] radioaktív izotóppal jelzett vegyület, enzim, mágneses részecske, zavarosodást keltő anyag stb. vagy a közvetlenül kimutatható csoportot eleve hordozó anyag lehet. Amennyiben a jelzőcsoportot az immobilizált ligandum hordozza, az általában a közvetlenül kimutatható csoportot kötő helye lesz. Az ilyen kötőhely aktivált, vagy általánosabban - amikor a ligandum komplexet képez - inaktivált állapotban lehet.

Előnyösen a jelzőcsoportot a nem-immobilizált ligandum hordozza.

A találmány előnyös kiviteli alakja szerint a nem-immobilizált ligandum egy jelzett, így például enzim vagy kromofór vagy fluorofór jelzett hepatotoxin peptid, így például nodularin, mikrocisztin-LC vagy mikrocisztin-YR hepatotoxin vagy más módszerként okadainsav lehet.

Jóllehet radioaktív jelzés is alkalmazható, de mivel a mintát elsődlegesen helyben, laikus felhasználók által történő alkalmazásra szánják, előnyösebb a látható jelet adó jelzőcsoportok, így például kromofórok, fluorofórok, foszforeszkáló csoportok, zavarosodást keltő anyagok, gázképződést keltő anyagok használata.

Amennyiben a jelet képező csoport olyan anyag, amely csak az egyik ligandum kötőhelyéhez kötődik, a kötött frakció és a nem-kötött frakció elválasztását követően a megfelelő kötött vagy nem-kötött frakcióval hozható egyszerű érintkezésbe.

Általában, amennyiben a jelet a kötött frakcióból származtatjuk, azt előnyösen a szubsztrátumban, azaz a vízben hozzuk létre, így a ligandum kimutatása vagy képzése és kimutatása előtt a jel leöblíthető a nem-kötött frakcióról.

A találmány szerinti módszerrel bármely foszfatáz-célzó toxint termelő alga vagy cianobaktérium fajtát vagy törzset vizsgálhatunk, de a módszer különösen a

cianobaktérium toxint termelő törzsek, így például a *Microcystis aeruginosa*, *Anabena* fajok, *Nodularis spuragena* és *Anabena flus-aquae* vagy az algák toxint termelő törzsei esetében alkalmazható. Így például a mikrocisztin-LR-t és a mikrocisztin-YR-t a *Microcystis* fajok, a nodularin toxint a *Nodularia* fajok, és az okadainsav toxint a *Prorocentrum* fajok termelik.

A találmány szerinti vizsgálati módszerrel azonosítandó toxin ennek megfelelően bármely, algák vagy cianobaktériumok által termelt toxin lehet, de a találmány előnyös kiviteli alakja szerint a peptid toxinok lehetnek hepatotoxinok (amelyek közül a mikrocisztin és a nodularin a leggyakoribbak) vagy okadainsav.

Így a legáltalánosabb értelemben a találmány szerinti módszer a feltételezett foszfatáz-célzó toxinokkal szennyezett mintának a toxinkötő ligandummal és a fenti toxinnal a ligandum kötőhelyeiért egyidejűleg, sorban vagy külön-külön versengeni képes jelzőmolekulával történő egyszerű érintkezését foglalja magában. A jelzőmolekulát kívánt esetben a vizsgálandó mintával való érintkezését megelőzően a kötőligandumhoz kapcsoljuk, majd a jelzőmolekulát a szilárd fázishoz kötött vagy oldatban szabad formában határozzuk meg.

A kötött frakciót a jelzőmolekula vizsgálata előtt, szokásos módszerrel, így például kicsapással, centrifugálással, szűréssel, kromatográfiás módszerrel, kapilláris művelettel vagy egyszerű vízelvezetéssel elválaszthatjuk a nem-kötött frakciótól. A szilárd fázis bármely ismert formájú mérőpálca vagy szilárd mátrix, így például polimer vagy mágneses gyöngyök, úgymint Dynabeads® (gyártó cég: Dynal AS) formájában lehet. A találmány egyik előnyös kiviteli alakjában a toxinkötő ligandumot immobilizáló szilárd fázis Dynabeads® formában van.

Az alkalmazott, találmány szerinti kiviteli alaktól függően, a jelzőmolekulát a kötött vagy nem-kötött frakcióban, de előnyösen a kötött frakcióban határozzuk meg.

Az immobilizált molekulát bármely ismert módszerrel immobilizálhatjuk. Ilyen módszer például az, amelynek során a ligandumot valamely olyan ismert

szilárd hordozóhoz vagy mátrixhoz kötik vagy kapcsolják, amelyet elválasztás vagy immobilizálás céljából alkalmaznak vagy ajánlanak. Így például a szilárd fázis részecskék, lemezek, gélek, szűrők, membránok, rostok vagy kapillárisok, mikrotiter lemez, tubus vagy több lyukú lemez stb. formájában lehet, és előnyösen üvegből, szilícium-oxidból, latexből, polimer anyagból vagy mágneses gyöngyökből készülhet. A ligandum kötődését a szilárd anyaghoz a szakirodalomban jól ismert és széles körben alkalmazott módszerekkel végezhetjük el. A találmány előnyös kiviteli alakjaiban a szilárd fázis, amelyhez a foszfatáz-célzó toxinkötő ligandumot immobilizáljuk, Dynabeads® formában van.

A találmány szerinti vizsgálati módszer előnye, hogy nem igényel bonyolult laboratóriumi felszerelést, és a szakterületen kevésbé képzett vagy képzetlen személy is végrehajthatja. A vizsgálati módszer továbbá alkalmas otthoni, üzletben történő vagy helyszíni használatra, valamint fokozott laboratóriumi munkát és veszélyes vegyszereket nem igényel, gyorsan és egyszerűen végrehajtható.

A találmány szerinti vizsgálati módszer egyedi előnye a nagyon magas érzékenységi fok, amely kritikus jelentőségű, ha a toxinokat tartalmazó vizsgálandó mintában a toxin nagyon alacsony koncentrációban van jelen, így például ivóvíz vizsgálatakor vagy foszfatáz-célzó toxinokkal történő szennyezés meghatározásakor. A vizsgálat jellegzetesen alkalmas pikomoláris, azaz legfeljebb 10 pmol/l koncentrációk kimutatására. A vizsgálat előnyösen 15 és 560 pmol/l közötti koncentrációk kimutatására alkalmazható.

Az ismert módszerekhez képest a találmány szerinti vizsgálati módszer egy további előnye az, hogy a vizsgálandó mintában jelenlévő endogén foszfatáz nem befolyásolja. Az endogén foszfatáz különösen a kagylóból kivont mintákban lehet jelen.

A találmány egyik kiviteli alakjában a protein-foszfatázt egy szilárd hordozón immobilizáljuk, az immobilizált foszfatázt érintkezésbe hozzuk a vizsgálandó mintával, és a mintában lévő foszfatáz-célzó toxinok az immobilizált foszfatázhoz

kötődnek. A mintába a toxinokkal a foszfatázkötő helyekért versengő jelzőmolekula forrást is adagolunk. A jelzőmolekulák olyan mértékben szorítják ki a toxinmolekulákat a kötőhelyekről, ami a toxinmolekulák, valamint a jelzőmolekulák koncentrációjától függ. A kötött jelzőmolekulák kötődési aránya elősegíti a vizsgálandó mintában jelenlévő toxin meghatározását. Előnyös jelzések például a radioaktív-, kromofór- (ideértve a fluorofór) jelzéseket és az enzimjelzés, amely így kromogén vagy fluorogén terméket eredményez. A jelzés szomszédságában szcintilláció jön létre, és így a jelzés a fényszórásban mérhető változást hoz létre, amelyet figyelembe kell venni.

Egy másik kiviteli alakban a szilárd hordozón immobilizált jelzéssel blokkolt foszfatáz molekulákat érintkezésbe hozzuk a vizsgálandó mintával, és a mintában jelenlévő bármely foszfatáz-célzó toxin verseng a foszfatázhoz kötött jelzőmolekulákkal, és kiszorítja a szilárd fázisról a vizes fázisba, olyan mértékben, amely arányos a vizsgálandó mintában jelenlévő toxinmennyiséggel. A szilárd fázisban maradt kötött jelzőmolekula mennyisége elősegíti a vizsgálandó mintában jelenlévő toxin meghatározását.

A találmány tárgya még egy készlet, amely alkalmas cianobakteriális vagy alga foszfatáz célzott toxinok kimutatására. A találmánynak megfelelően a készlet tartalmaz:

egy szilárd fázist, amelyen immobilizáltuk a ligandumot;

egy nem-immobilizált ligandumot, amely előnyösen vizes oldatban van vagy az immobilizált ligandummal komplexet alkot - ahol a nem-immobilizált és az immobilizált ligandum mentesek bármilyen közvetlenül vagy közvetve kimutatható csoporttól; bármilyen olyan jelzőcsoporttól, amely kötődve a nem-immobilizált vagy az immobilizált ligandumhoz egy kimutatható jelt hozna létre; előnyösen a kimutatható csoport vagy jel bármilyen laboratóriumi eszköztől mentesen közvetlenül leolvasható.

Az egyik előnyös kiviteli alakban a találmány szerinti készlet tartalmaz:



egy szilárd fázist, amelyen immobilizáltuk a foszfatáz-célzó toxinokat kötő ligandumokat;

jelzőmolekulát, amely kompetitív módon gátolja a foszfatáz-célzó toxinok kötődését a toxinkötő ligandumhoz és így olyan jelet hoz létre, amely bármilyen laboratóriumi eszköztől mentesen közvetlenül leolvasható.

Az egyik különösen előnyös kiviteli alakban a találmány szerinti készlet tartalmaz:

mágnesesen elmozdítható polimer mikrogömböket, amelyen immobilizáltuk a protein-foszfatázt;

arany-szóllal jelzett peptid hepatotoxin molekulákat, amelyek kompetitív módon gátolják a cianobakteriális toxinok kötődését a protein-foszfatázhoz.

Egy további különösen előnyös kiviteli alakban a találmány szerinti készlet tartalmaz:

mágnesesen elmozdítható polimer mikrogömböket, amelyen immobilizáltuk a protein-foszfatázt;

arany-szóllal jelzett okadainsav molekulákat, amelyek kompetitív módon gátolják az algatoxinok kötődését a protein-foszfatázhoz.

A találmány tárgya még a készlett alkalmazása, amelynek megfelelően a kompetitíven kötődő kromofór (vagy fluorofór stb.) csoporttal jelzett ligandummal átítatott, a toxinkötő ligandumot immobilizáló porózus cellulózhordozót vizes vagy kagylófolyadék mintában pácoljuk, majd a telített hordozót egy előre meghatározott ideig (kivéve a mintából, vagy a minta előre meghatározott térfogatában hagyva) inkubáljuk, eltávolítjuk a nem-kötött jelzett ligandumot, így például a hordozót kimossuk toxinmentes vízzel vagy a hordozót előre meghatározott ideig előre meghatározott térfogatú toxinmentes vízben áztatjuk úgy, hogy a hordozó vagy az áztató víz színét ellenőrizzük. Kívánt esetben a hordozót előnyösen egy olyan állványhoz rögzítjük, amelyet kalibrációs színekkel jelöltünk meg, elősegítve a hordozó vagy az áztató víz színének összehasonlítását, és így meghatározhatjuk a

toxinkoncentrációt vagy azt, hogy a toxinkoncentráció egy vagy több küszöbérték alatt vagy fellett van.

A továbbiakban a találmányt az alábbi nem-korlátozó példákkal illusztráljuk.

Anyagok

A Mikrocisztin-YR-t, Mikrocisztin-LR-t, okadainsavat, nodularint, calyculin A-t és tautomycint a Calbiochem (San Diego, CA, USA) cégtől szereztük be. A hordozómentes Na^{125}I -dot és $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -t az Amersham (Little Chalfont, Nagy-Britannia) cégtől szereztük be. Az RIA tisztaságú albumint, ammónium-acetátot, Kloramin-T-t, dimetilszulfoxidot (DMSO), ditioeritritolt, EDTA-t, EGTA-t, glicerint, Hepes-t, Histone II-AS-t, nátrium-metabiszulfidot és tripszin inhibitort (szójabab) a Sigma (St Louis, MO, USA) cégtől szereztük be. Az acetonitrilt és a trifluorecetsavat (TFA) a Rathburn (Walkerburn, Skócia) cégtől szereztük be. A részlegesen tisztított protein foszfatáz 2A-t az Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) cégtől szereztük be, vagy pedig a tisztított formát Reskin és munkatársai (Eur. J. Biochem., 133: 455-461 o. (1983)) eljárása szerint állítjuk elő.

Mikrocisztin-YR jódozása

10 μg mikrocisztin-YR-t 1 mCi hordozómentes Na^{125}I -dal, kloramin T-jelenlétében Ciechanover és munkatársai [PNAS, 77: 1365-1368 (1980)] eljárásával jódozzuk. A jódozási reakciót követően a maradék jodidot Runnegar és munkatársai [Toxicon, 24: 506-509 (1986)] eljárásával, Sep-Pak[®] Plus oszlopon (gyártó cég: Waters, Milford, MA, USA) választjuk el a $[\text{}^{125}\text{I}]\text{mikrocisztin-YR}$ -től. A kapott $[\text{}^{125}\text{I}]\text{mikrocisztin-YR}$ -t acetonitril gradienssel eluálva átfuttatjuk egy 3x250 mm-es Inertsil ODS-2 (gyártó cég: Chrompack, Raritan, NJ, USA) HPLC oszlopon.

Kompetitív kötődési vizsgálat

A kompetitív kötődési vizsgálatot 0,5 ml térfogatban végezzük el, amelyet 50 mmol/l Hepes-sel (pH értéke 7,2), 1 mmol/l EDTA-val, 0,3 mmol/l EGTA-val, 1 mmol/l DTE-vel, 5 mmol/l MnCl_2 -vel, 0,5 mg/ml BSA-val és 0,2 mg/ml tripszin inhibitorral pufferezünk. A vizsgálati mintához 0 és 100 nmol/l közötti koncentrációk-



ban 100%-os DMSO-val hígított alga toxinokat adagolunk, úgy hogy a DMSO végkoncentrációja 10% legyen. A mintához 1 Ci/13 ng fajlagos aktivitású [125 I]mikrocisztin-YR-t adunk, így annak koncentrációja 13 pmol/l. A végén 30 pmol/l protein-foszfataz-2A-t adagolunk, majd a reakcióelegyet egy éjszakán át, jégfürdő felett inkubáljuk. A protein-foszfataz-2A-hoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR-t Sephadex® G-50 (gyártó cég: Pharmacia, Uppsala, Svédország) töltettel töltött 0,7x5 cm-es oszlopokat (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) alkalmazva gélszűréssel választjuk el a megmaradt szabad [125 I]mikrocisztin-YR-től. A 4°C-on végrehajtott elválasztáshoz 1 mmol/l EDTA-val és 0,3 mmol/l EGTA-val pufferezett 50 mmol/l Hepes (pH értéke 7,2) oldatot használunk. A protein-foszfataz-2A-hoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR frakciót összegyűjtjük, és szcintillációs detektorral meghatározzuk radioaktivitását. A [125 I]mikrocisztin-YR nonspecifikus kötődését egy olyan kontroll reakcióban határozzuk meg, ahol 1 μ mol/l-nyi feleslegben lévő [125 I]mikrocisztin-LR-t adagolunk.

1. példa

Mágneses gyöngyökhöz kapcsolunk protein-foszfataz-2A-t (közvetlenül a gyöngyökhöz vagy a foszfataz biotinezésével). Ezután az immobilizált protein-foszfatazt, a mintát és a radioaktív izotóppal jelzett toxinokat (például a [125 I]mikrocisztin-YR-t) összekeverjük. A reakcióelegyből mágneses erő alkalmazásával elkülönítjük az immobilizált protein-foszfatazt. A mágneses gyöngyökhöz lévő protein-foszfatazhoz társuló radioaktivitást szcintillációs méréssel határozzuk meg. A protein-foszfatazhoz társuló radioaktív jelzés mennyisége a mintában jelenlévő foszfatazkötő toxin függvényében csökken.

2. példa

Mágneses gyöngyökhöz kapcsolunk protein-foszfataz-2A-t (közvetlenül a gyöngyökhöz vagy a foszfataz biotinezésével). Ezután az immobilizált protein-foszfatazt összekeverjük a mintával, és a színes gyöngyökhöz kapcsolt toxinokkal. A reakcióelegyből mágneses erő alkalmazásával elkülönítjük az immobilizált pro-



tein-foszfátázt. A mágneses gyöngyökön lévő protein-foszfátázhoz társuló színes gyöngyöket szemmel vagy kis nagyítású mikroszkóppal (például Nikon TMS) határozzuk meg. A (mágneses gyöngyökhöz kapcsolt) protein-foszfátázhoz társuló színes gyöngyök száma a mintában jelenlévő foszfátázkötő toxin függvényében csökken.

3. példa

Mágneses gyöngyökhöz kapcsolunk protein-foszfátáz-2A-t (közvetlenül a gyöngyökhöz vagy a foszfátáz biotinezésével). Ezután az immobilizált protein-foszfátázt összekeverjük a mintával és immobilizált enzimet hordozó gyöngyökre immobilizált toxinokkal. Az enzim megfelelő kromogén- vagy fluorogén szubsztárummal történő inkubációval alkalmas egy detektálható (színes vagy fluoreszkáló) termék előállításra. A reakcióelegyből mágneses erő alkalmazásával elkülönítjük az immobilizált protein-foszfátázt. A mágneses gyöngyökön lévő protein foszfátázzal társuló színt vagy fluoreszcenciát spektroszkópiával, illetve fluorometriával határozzuk meg. A mágneses gyöngyökhöz társuló szín/fluoreszcencia a mintában jelenlévő foszfátázkötő toxin függvényében csökken.

4. példa

Szcintillációs vizsgálat

Streptavidinnal és szcintillálóanyaggal előzetesen bevont szondához (például FlashPlate PLUS Streptavidin SMP103, gyártó cég: NEN) protein-foszfátázt biotinezünk és immobilizálunk. A szondákhoz adagoljuk a mintát és a [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-t. Az immobilizált protein-foszfátázhoz kötődő [¹²⁵I]mikrocisztin-YR mennyiségét szcintillációs számlálóval határozzuk meg.

5. példa

[¹²⁵I]Mikrocisztin-YR protein-foszfataz-2A-hoz való kötődésének blokkolása különböző toxinok jelenlétében

Vizsgált vegyület ¹	IC ₅₀ ² (pmol/l)
nodularin	15
mikrocisztin-LR	17
mikrocisztin-YR	75
okadainsav	100
calyculin-A	251
tautomycin	562

¹ A vizsgált vegyületeket a fentiek szerint inkubáltuk [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-rel és protein-foszfataz-2A-val.

² Az IC₅₀ érték azt a koncentrációt jelenti, amely szükséges a protein-foszfataz-2A-hoz kötődő [¹²⁵I]mikrocisztin-YR 50%-os bénításához. A kapott értékeket a 3. ábrán bemutatott eljárással határoztuk meg. A bemutatott értékek 3 különböző vizsgálat eredményeinek átlagát jelenti.

6. példa

Exogén vegyületek hatása a kompetitív kötődési vizsgálatra a
protein-foszfataáz vizsgálathoz viszonyítva

Vizsgált vegyület ¹	% aktivitás ²	
	Kompetitív kötődési vizsgálat	Protein-foszfataáz vizsgálat
2 mmol/l ATP	103,3±0,2	9,8±3,4
0,5 mmol/l ATP	101,6±1,7	29,8±5,6
0,05 mmol/l NaPPi	101,4±4,1	14,2±1,2
50 mmol/l NaF	101,5±1,9	7,7±1,4
5 mmol/l NaF	102,0±3,3	62,6±0,4
1 mg/ml kazein	98,6±4,5	3,4±0,2
0,02 mg/ml kazein	98,9±6,1	33,3±4,9
5 mg/ml hiszton-2A	91,9±1,8	1,4±0,1
0,002 mg/ml hiszton-2A	95,2±4,7	63,6±4,0
0,5 mol/l NaCl	41,2±0,7	44,4±1,6
Tengervíz	34,8±0,4	NA
10% tengervíz	87,3±0,4	NA
10% DMSO	72,8±2,3	97,9±3,3
10% MeOH	73,9±0,5	87,4±4,1
10% acetonitril	90,4±5,4	88,2±2,7
0,4% Triton X-100	122,3±1,0	60,2±5,7
0,4% Nonidet P-400	106,0±2,0	61,1±1,3
0,4% CHAPS	90,9±9,9	138,0±34,4

¹ A protein-foszfataáz-2A-t 30 percen át, jégfürdőn előinkubáljuk az 50 mmol/l Hepes (pH értéke 7,2) pufferben oldott vegyületekkel vagy csak a pufferrel

(kontroll). A foszfatáz aktivitást a fentiekben ismertetett foszformentesítő vagy foszfohiszton eljárással határoztuk meg. A % aktivitást a kontroll reakcióhoz vonatkoztatva határoztuk meg.

- ² A kompetitív kötődési vizsgálatban az aktivitás a protein-foszfatáz-2A-nak [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-hez való kötődési képességét jelenti a pufferben oldott exogén vegyület jelenlétében a puffer oldathoz viszonyítva. A bemutatott értékek 3 különböző kísérlet eredményeinek átlagát $\pm$ SEM jelenti.

7. példa

A nodularin és mikrocisztin-LR kötődési vizsgálatok érzékenysége

toxin	(mol/l)	az [¹²⁵ I]mikrocisztin-YR kötődésének bénítása (%) ^a			
		milliQ víz	ivóvíz	tengervíz	tengervíz, 1/10 ^b
nodularin	1E-10	88,37±0,31	88,75±016	72,18±0,82	67,24±0,66
	5E-11	36,37±2,28	36,12±1,04	48,47±0,79	52,98±1,98
mikrocisztin-LR	1E-10	84,91±0,42	86,97±1,12	73,31±1,20	46,41±5,97
	5E-11	13,87±3,16	12,85±0,88	49,34±3,82	38,61±1,49

^a A nodularint és a mikrocisztin-LR-t a megadott koncentrációkban oldottuk milliQ-, ivó- és tengervízben. A kapott oldatok 300 ml-es alikvot mintáit a fentiek szerint vizsgáltuk a [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-rel való versengő képességüket a protein-foszfátáz-2A-hoz való kötődésben.

^b Tengervíz , amelyet 1/10 arányban milliQ vízzel hígítottunk.

A bemutatott értékek ±SEM átlagokat jelentenek

8. példa

Okadainsav ekvivalensek meghatározása HPLC vizsgálattal és protein-foszfataáz kötődési vizsgálattal kagyló extraktumokban

Extraktum ¹	OA ekvivalens HPLC vizsgálattal ²		OA ekvivalens kötődési vizsgálattal ³
	µg/g májpankreász	nmol/l	nmol/l
1	0	0	85
2	0	0	45
3	0	0	70
4	4	2480	2100
5	1,2	748	755
6	0,8	496	805

¹ Az extraktumokat norvég parton gyűjtött étkezési kagyló májpankreászából vontuk ki.

² Az extraktumok okadainsav ekvivalensét HPLC-vel vizsgáltuk.

³ Az extraktumokat 100%-os DMSO-val hígítottuk és a fentiek szerint vizsgáltuk a [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-rel való versengő képességüket a protein-foszfataáz-2A-hoz való kötődésben. Az okadainsav ekvivalens koncentrációkat 100 %-os DMSO-ban oldott okadainsav szabvány görbékkel való összehasonlítással határoztuk meg.

9. példa

A mellékelt ábrák

Az 1. ábrán protein-foszfataáz kötő toxinok meghatározására alkalmazható kompetitív kötődési vizsgálat vázlatos ábrázolása látható.

A protein-foszfataáz-2A-val együtt inkubáljuk a [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-t és egy másik protein-foszfataáz-2A-hoz irányított toxint. A foszfataázhoz való kötődésben a toxin verseng a [¹²⁵I]mikrocisztin-YR-rel. További mennyiségű toxin adagolása a foszfataázhoz kötődő [¹²⁵I]mikrocisztin-YR csökkenéséhez vezet és fordítva. Miután

a kötődési egyensúlyt elértük, a foszfatázhoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR-t gél-szűrési kromatográfiás módszerrel elválasztjuk a szabad [125 I]mikrocisztin-YR-től. A foszfatázhoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR-t tartalmazó frakciót összegyűjtjük, és a radioaktivitását szcintillációs számlálóval határozzuk meg.

A 2. ábrán különböző algatoxinok növekvő mennyiségének a protein-foszfatázt kötő [125 I]mikrocisztin-YR mennyiségére gyakorolt hatása látható.

30 pmol/l protein-foszfatáz-2A-t 35 pmol/l [125 I]mikrocisztin-YR (1Ci/13ng) jelenlétében inkubálunk 0-100 nmol/l az ábrán bemutatott, különböző algatoxinokkal. A protein-foszfatáz-2A-hoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR-t gél-szűrési kromatográfiás módszerrel választjuk el, majd radioaktivitását szcintillációs számlálóval határozzuk meg. Minden egyes görbe legalább 3 különböző kísérlet átlagát jelenti.

A 3. ábrán a kompetitív kötődési vizsgálattal meghatározott IC_{50} értékek láthatók a mikrocisztin-LR kötődése esetében.

A [125 I]mikrocisztin-YR protein-foszfatáz-2A-hoz való kötődését a nem kötött [125 I]mikrocisztin-YR (Co-Cx) és a kötött [125 I]mikrocisztin-YR (Cx) közötti arány és a mikrocisztin-LR koncentráció függvényében ábrázoltuk. A Co mikrocisztin-YR hiányában kötött [125 I]mikrocisztin-YR mennyiségét jelenti, és a Cx különböző koncentrációjú mikrocisztin-LR jelenlétében kötött [125 I]mikrocisztin-YR mennyiségét jelenti.

A 4. ábrán a protein-foszfatázhoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR stabilitását szemléltetjük feleslegben lévő mikrocisztin-LR jelenlétében.

1 nmol/l protein-foszfatáz-2A-t egy óra hosszat inkubálunk 100 pmol/l [125 I]mikrocisztin-YR jelenlétében. Egy óra után, a 0 időpontban a reakcióelegyhez 2 μ mol/l mikrocisztin-LR-t adagolunk. Az ábrán megadott időpontokban gél-szűrési kromatográfiás módszerrel és szcintillációs számlálóval, a fentiek szerint meghatározzuk a protein-foszfatáz-2A-hoz kötött [125 I]mikrocisztin-YR-t. Minden egyes görbe 4 különböző kísérlet átlagát jelenti.

Szabadalmi igénypontok

1. Vizsgálati módszer a protein foszfatázokat gátló, foszfatáz-célzó toxinok kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy valamilyen immobilizált ligandummal borított szilárd hordozót érintkezésbe hozunk

(i) valamilyen feltételezetten toxinnal fertőzött mintával és

(ii) valamilyen nem-immobilizált ligandummal,

ahol a fenti immobilizált ligandum képes legalább egy fenti toxinhoz, nem-immobilizált ligandumhoz vagy a toxin és a nem-immobilizált ligandum komplexeihez kötődni, valamint a fenti nem-immobilizált ligandum képes legalább egy fenti immobilizált ligandumhoz, toxinhoz vagy a toxin és az immobilizált ligandum komplexeihez kötődni, ahol az immobilizált ligandum azon részaránya, amely a toxinhoz, a nem-immobilizált ligandumhoz vagy a toxin és a nem-immobilizált ligandum komplexeihez kötődött, a fenti minta toxintartalmának a függvénye; és ahol a fenti immobilizált ligandum képes közvetlenül vagy közvetve egy detektálható jelet létrehozni, amikor nincs komplexben vagy a fenti toxinnal, a fenti toxin és nem-immobilizált ligandum komplexével vagy a fenti nem-immobilizált ligandummal van komplexben, vagy pedig a fenti nem-immobilizált ligandum képes közvetlenül vagy közvetve egy detektálható jelet létrehozni, amikor nincs komplexben vagy amikor komplexben van;

elválasztjuk a kötött frakciót a nem kötött frakciótól; és

közvetlenül vagy közvetve meghatározzuk az immobilizált ligandumhoz kötött (kötött frakció) vagy a vizes oldatban levő komplexet nem képző (nem-kötött frakció) nem-immobilizált ligandumot;

ahol az (i) és (ii) összetevőket külön-külön, egymás után vagy egyidejűleg vihetjük fel a szilárd hordozóra, és amennyiben külön-külön vagy egymás után visszük fel, azt tetszőleges sorrendben végezhetjük el.

2. Az 1. igénypont szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy a vizsgálandó foszfatáz-célzó toxin alga vagy cianobaktérium által termelt toxin.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*,

hogy a vizsgálandó toxin hepatotoxin vagy okadainsav.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy a vizsgálandó mintában levő toxinmolekulák versenyeznek a nem-immobilizált ligandummal az immobilizált ligandum korlátozott számú kötőhelyeiért, és az immobilizált ligandum kötőhelyeihez kötődött vagy nem-kötődött nem-immobilizált ligandum mennyiségéhez viszonyítva határozzuk meg a mintában jelen levő bármely toxint.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy a vizsgálattal a foszfatáz-célzó toxinok jelenlétét vagy hiányát határozzuk meg.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy a kagyló felszínét, a kagylóból származó szabad nedvességet, a kagylók környezetéből vett vízmintát vagy ivóvíz készletekből vett vizet vizsgálunk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy immobilizált vagy nem-immobilizált ligandumként antitestet vagy antitest fragmentumot használunk.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy protein foszfatáz enzimeként a ligandum kötő protein foszfatáz 2A-t használunk.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy valamely jelzőcsoportot hordozó immobilizált vagy a nem-immobilizált ligandumot alkalmazunk.

10. A 9. igénypont szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy valamely jelzőcsoportot hordozó nem-immobilizált ligandumot alkalmazunk.

11. A 10. igénypont szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy nem-immobilizált ligandumként jelzett hepatotoxin peptidet vagy jelzett okadainsavat használunk.

12. A 11. igénypont szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy hepatotoxinként nodularint, mikrocisztin-LC-t vagy mikrocisztin-YR-t használunk.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy szilárd hordozóként mérőpálcát vagy szilárd mátrixot használunk.

14. A 13. igénypont szerinti vizsgálati módszer, *azzal jellemezve*, hogy szilárd mátrixként polimert vagy mágneses gyöngyöket használunk.

15. Protein foszfatázt gátló, foszfatáz-célzó toxinok kimutatására alkalmas készlet, amely tartalmaz:

egy szilárd fázist, amelyen immobilizált ligandumot hordoz;

egy nem-immobilizált ligandumot, amely előnyösen vizes oldatban van, vagy az immobilizált ligandummal komplexet alkot - ahol a nem-immobilizált és az immobilizált ligandum mentesek bármilyen közvetlenül vagy közvetve kimutatható csoporttól; bármilyen olyan jelzőcsoporttól, amely kötődve a nem-immobilizált vagy az immobilizált ligandumhoz egy kimutatható jelet hozna létre; kívánt esetben a kimutatható csoport vagy jel bármilyen laboratóriumi eszköztől mentesen közvetlenül leolvasható.

16. A 15. igénypont szerinti készlet, ahol a kimutatandó foszfatáz-célzó toxin algák vagy cianobaktériumok által termelt toxin.

17. A 15. vagy 16. igénypont szerinti készlet, amely tartalmaz:

egy szilárd fázist, amelyen immobilizáltuk a foszfatáz-célzó toxinokat kötő ligandumokat;

jelzőmolekulát, amely kompetitív módon gátolja a foszfatáz-célzó toxinok kötődését a toxinkötő ligandumhoz, és így olyan jelet hoz létre, amely bármilyen laboratóriumi eszköztől mentesen közvetlenül leolvasható.

18. A 15-17. igénypontok bármelyike szerinti készlet, amely tartalmaz:

mágnesesen elmozdítható polimer mikrogömböket, amelyen immobilizáltuk a protein-foszfatázt;

arany-szóllal jelzett peptid hepatotoxin molekulákat, amelyek kompetitív módon gátolják a cianobakteriális toxinok kötődését a protein-foszfatázhoz.

19. A 15-17. igénypontok bármelyike szerinti készlet, amely tartalmaz:

mágnesesen elmozdítható polimer mikrogömböket, amelyen immobilizáltuk

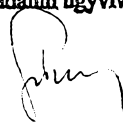
a protein-foszfátázt;

arany-szóllal jelzett okadainsav molekulákat, amelyek kompetitív módon gátolják az algatoxinok kötődését a protein-foszfátázhoz.

20. A 15-19. igénypontok bármelyike szerinti készlet alkalmazása foszfátáz-célzó toxinok kimutatására.

A meghatalmazott:

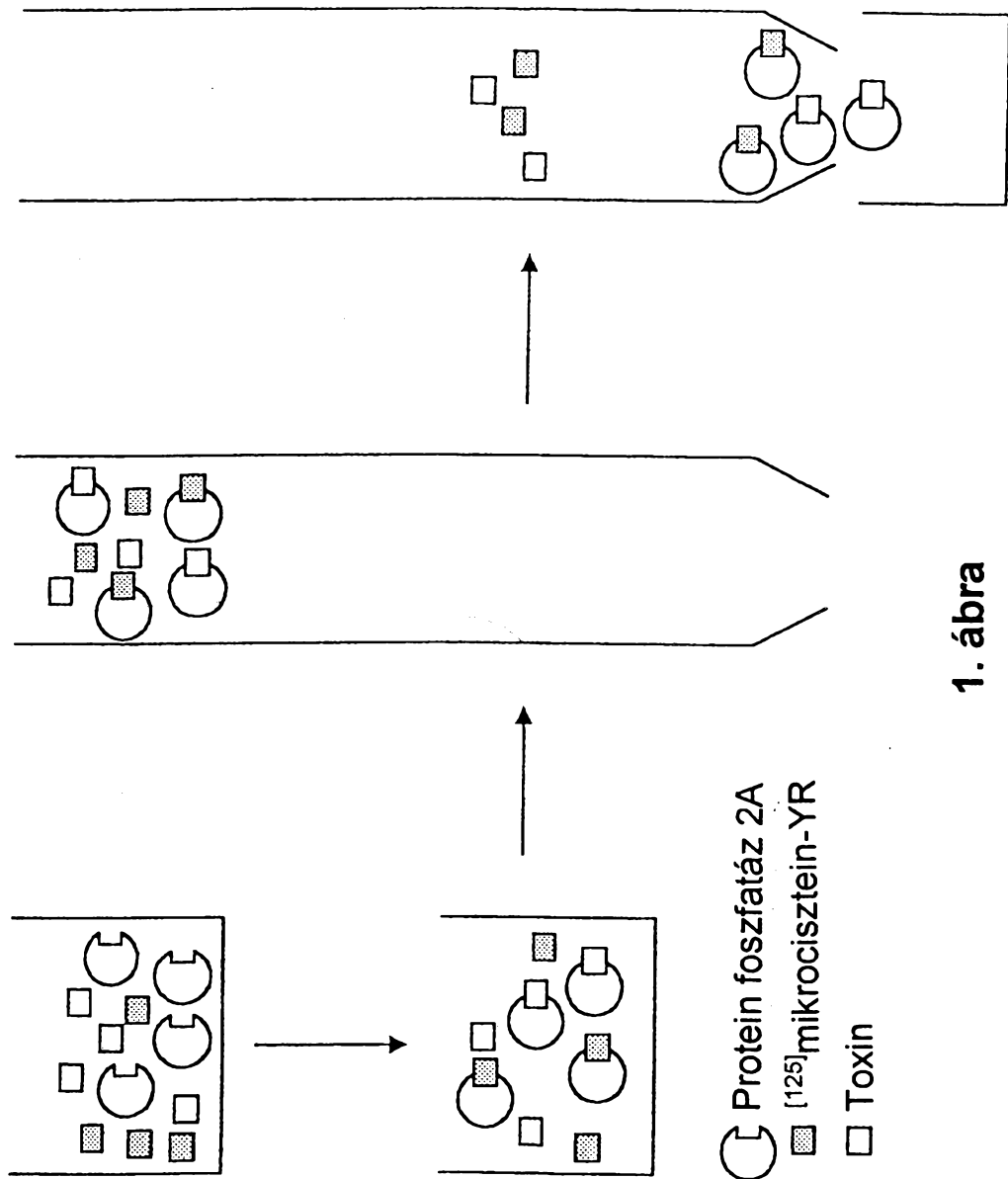
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
Dr. Gárdonyi Zoltánné
szabadalmi ügyvivő



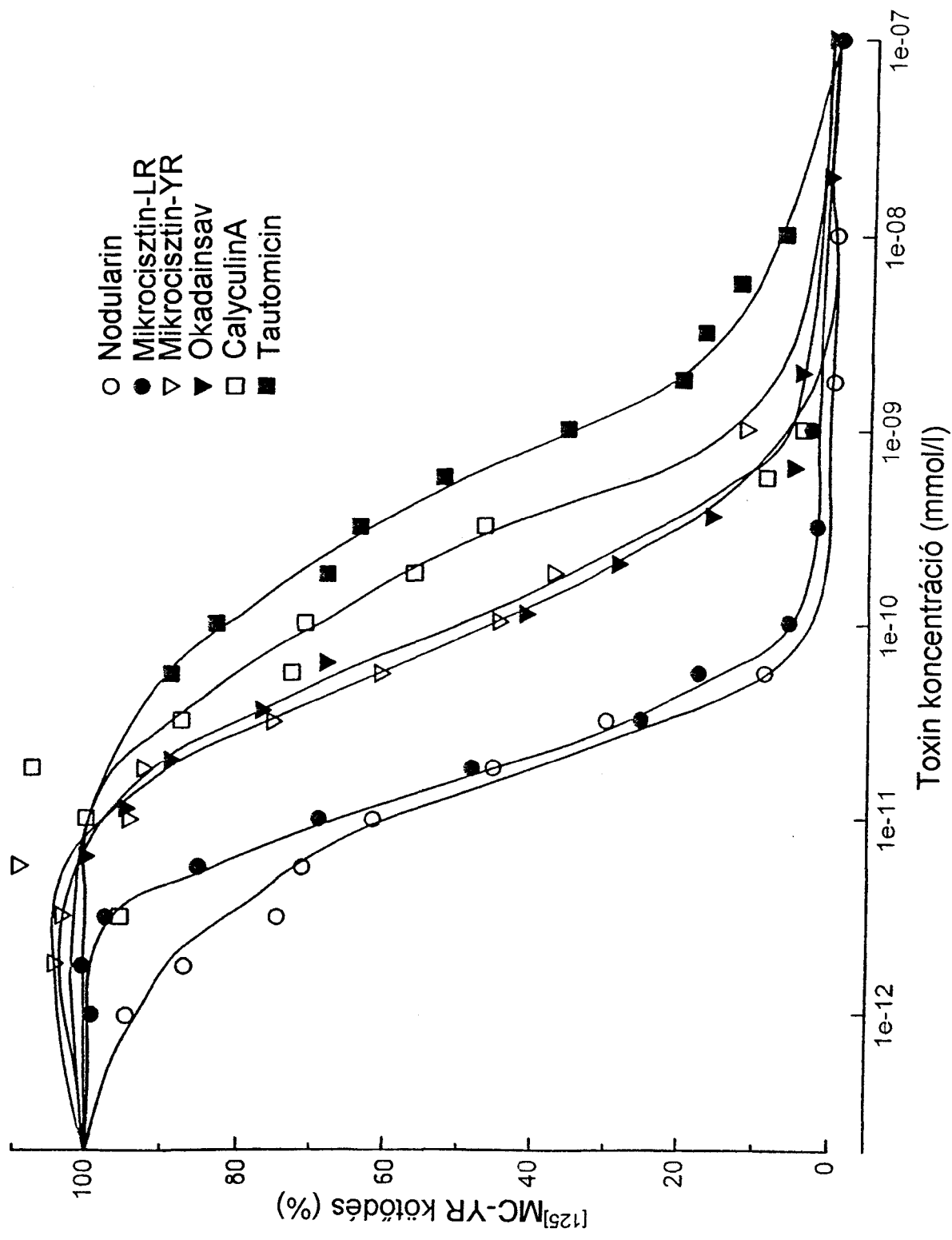
26+4=30 db

Dr. G

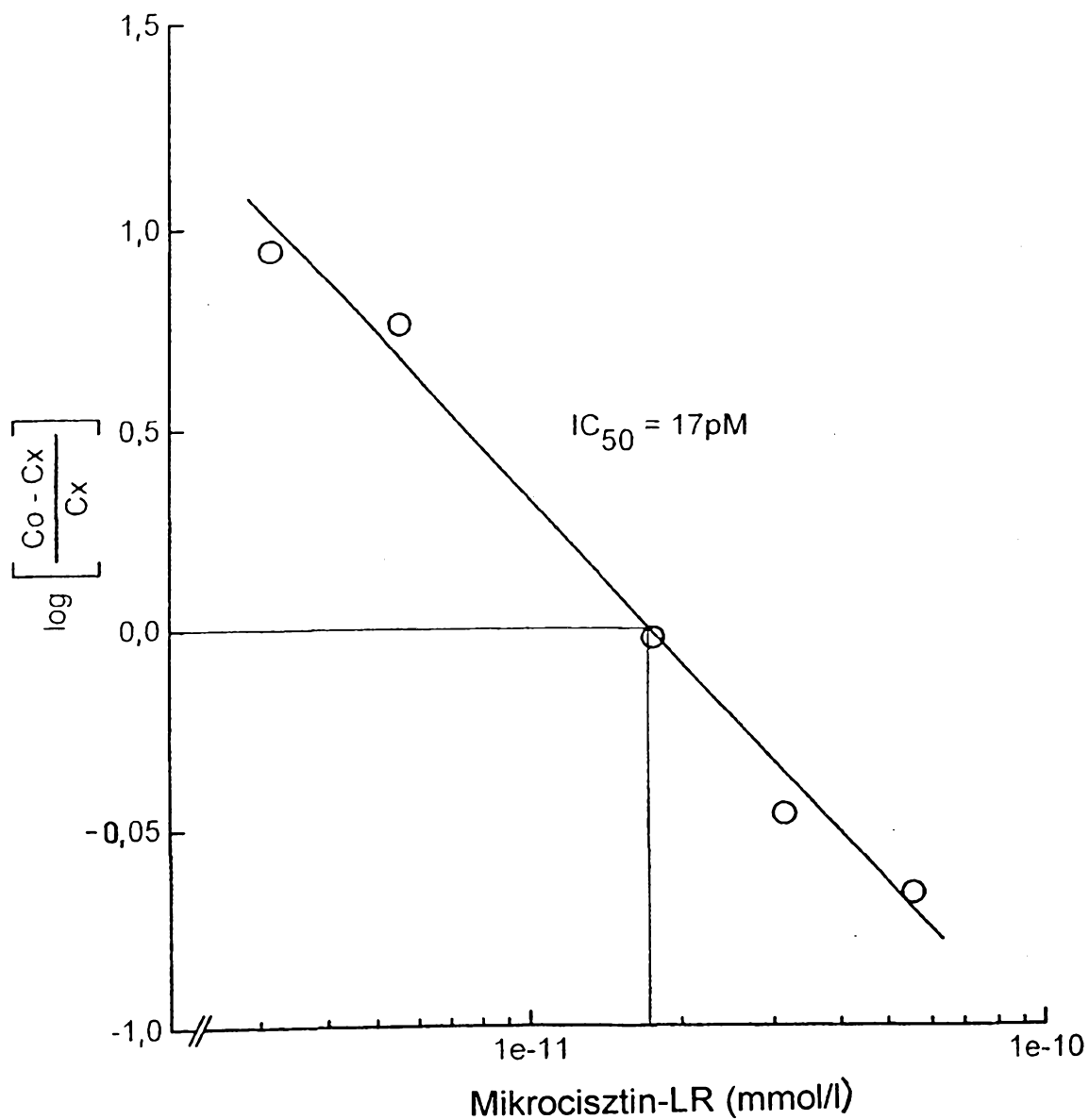
2001.06.21.



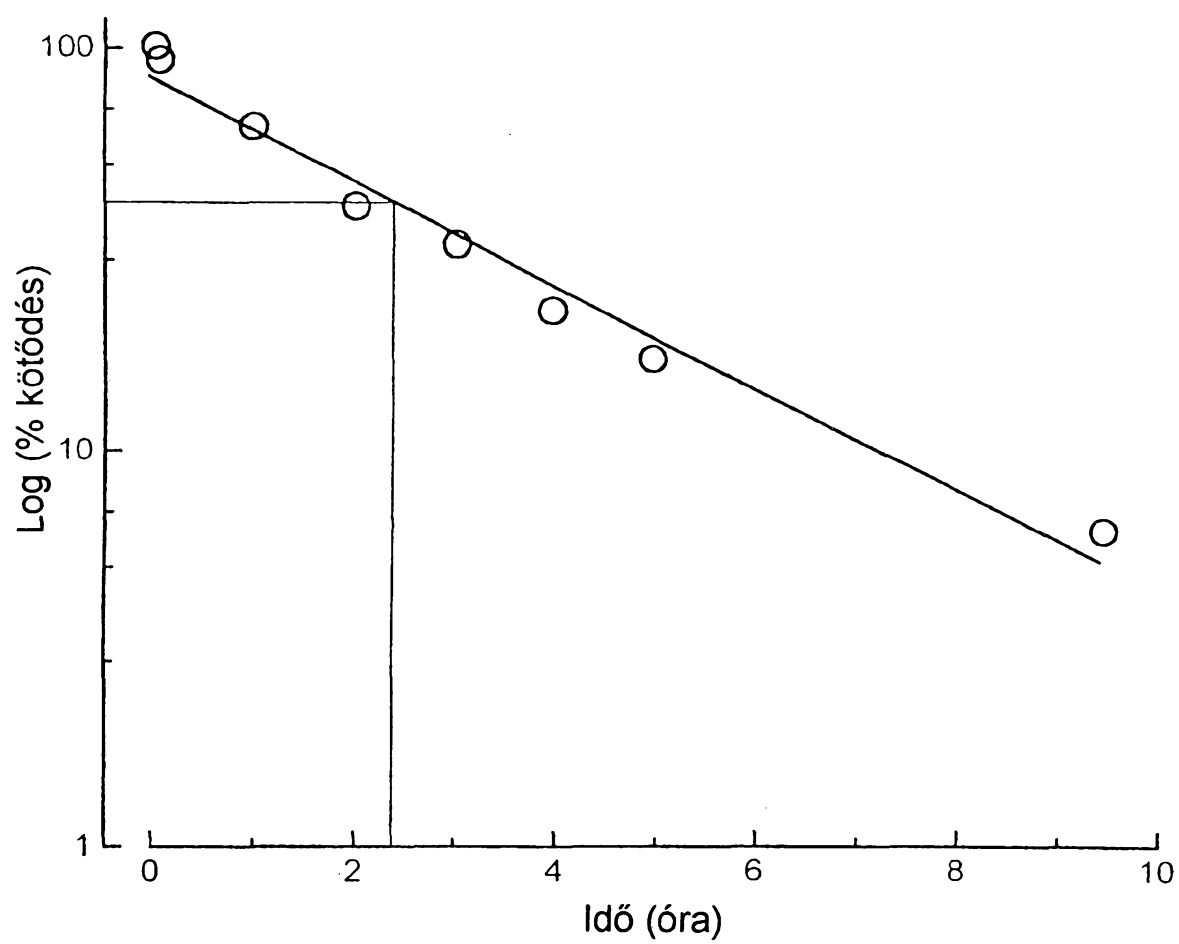
1. ábra



2. ábra



3. ábra



4. ábra