

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

77111

Eljárás magvak lizintartalmának a meghatározására

K I V O N A T

A találmány növényi magvak lizintartalmának a meghatározására vonatkozik immunmeghatározó eljárással. A találmány szerinti eljárás abban áll, hogy egy EF komplexet felismerő antitesttel hozzák érintkezésbe a magkivonatot, majd meghatározzák, hogy a magkivonat és az antitest között fellép-e kötés. Magkivonatként elsősorban növényi endospermiumból származó proteint alkalmaznak. E célra elsősorban kukorica, köles, cirok, rozs, búza, árpa, szójabab, napraforgó magvának vagy rizsmagnak a kivonatát alkalmazzák. Az alkalmazott antitest proteinként elsősorban EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint ismert fel.

A módszer elvi előnye, hogy a mag EF koncentrációja a mag lizintartalmával magas szintű korrelációban áll. A találmány továbbá egy készletre is vonatkozik, amely magvak lizintartalmának meghatározására alkalmazható, és a következőket tartalmazza: egy felületet, amely a magkivonatot megköti; egy első tartóedényt, amely az EF komplexet megköti antitestet tartalmazza; egy második tartóedényt, amely egy második antitest és jelzőanyag konjugátumát tartalmazza, ahol a második antitest az első antitestet megköti; és egy szert a meg nem kötött protein eltávolítására.



péld. alá írt

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft
Budapest

Eljárás magvak lizintartalmának a meghatározására

A találmány teljes általánosságban növények genetikai szelekciójának eszközeire, konkrétan magvak lizintartalmának a meghatározására vonatkozik.

A lizin emberek és számos, gazdasági szempontból fontos állat étrendjében esszenciális aminosav.

Az olyan magvak azonban, mint a kukorica, köles és cirok, a lizint csak csekély koncentrációban tartalmazzák. Ennek következtében az ilyen magvakból álló étrendet külön, általában költségesebb lizinforrásokkal kell kiegészíteni.

A mezőgazdasági kutatásnak lényeges céljává vált e magvak táplálkozási minőségének a javítása, különösen a kukorica (lásd összegzésben: Mertz és munkatársai: Science 145, 279 (1964); valamint Nelson: Adv. Cer. Sci. Tech. 3, 41 (1980)). A kukoricaprotein 1,5% lizint tartalmaz az emberi étrend viszont optimálisan megköveteli, hogy a protein 5%-a lizin legyen. Ezért a kutatás jelentős része a lizin kukoricamagvakban lévő koncentrációjának növelésével foglalkozik. A kukorica javított változatainak a kutatása általában alkalmazható más magvakra, így a cirokra és kölesre is, amelyeknek hasonló endosperm (spermán belüli) tulajdonságai és endosperm prote-

injei vannak (lásd: Shull és munkatársai: *Protoplasma* 171, 64 (1992)).

Mertz és munkatársai (lásd a fentebb idézett közleményt) felfedezése, a nagy lizintartalmú "opaque2" kukoricatörzs - amely fehérjetartalmában 3% lizint tartalmaz - számos vizsgálata ösztönzött, amelyek során a magvakat lizinttartalmuk alapján szelektálták. Kimutatták, hogy az opaque2 törzs lizinkoncentrációja magasabb, mint az őstörzsé, mivel az opaque2 magvak a mag endospermájából származó, lizinhiányos zein proteinfrakciót kisebb koncentrációban, és a lizint tartalmazó nem-zein proteinfrakciót magasabb koncentrációban tartalmazzák. Mivel az opaque2 endospermiuma szokatlanul lágy és keményítőszerű, ezt az úgynevezett "nagy lizintartalmú" kukoricát mindeddig szeléskörüen nem hasznosították. Folyamatosan fejlesztenek új törzseket az "opaque2" módosító génjeinek alkalmazásával a magvak szelekciója útján, amelyeket lizinttartalmuk mérésére alapoznak. Közelebbről lásd a következő helyen: "Nagy lizintartalmú, magas triptofántartalmú gabonamagvak felfedezése" *Quality Protein Maize*, szerk. Mertz, 1-8. old. (Am. Assoc., Cereal Chemists, 1992).

A magvak lizintartalma mérésének fontos lépése - amelyet a változatok, így az opaque2 törzs változatainak kifejlesztésében alkalmaznak - azonban lassú, költséges és a magmintákra káros hatású. Ennek oka az, hogy a mérési eljárás egy hosszadalmas hidrolízis lépést kíván, amelyet követ az aminosav-elemzés vagy közvetett mérés egy festékanyag kötődésének a módszerével (Mertz és munkatársai: *Science* 145, 279 (1964);

valamint Cereal Chem. 51, 304 (1974)). A lizinmérési módszer általában szintén több magvat kíván, hogy elegendő mennyiségű szövet álljon az elemzés rendelkezésére. Ez gátolja a genetikai keresztező kísérleteket, amelyek a többrendbeli utódokat csupán a lizin meghatározási eljárására igénylik.

Ezek a nehézségek a tökéletesített, magasabb lizintartalmú magvak fejlesztésének költségeit növelik, és a fejlesztést lassítják.

A proteinfrakcióból származó lizin mérésén kívül, az egyes magproteineket és azok lizintartalmát néha különböző fajtákon mérik. Damerval (Heredity 10, 38 (1993)) kimutatta, hogy az opaque2 kukoricafaj nagyobb lizintartalma legalább hat, nem azonosított nem-zein, a kukorica endospermiumában lévő polipeptid megnövekedett mennyiségéből származik. Hasonlóképpen Habben és munkatársai (Plant Molec. 23, 825 (1993)) olyan cDNS-t klónoztak, amely lizint tartalmazó proteineket kódol, és az őstípusú fajtával összehasonlítva az opaque2 kukoricafajtában nagyobb mennyiségű hosszabbító faktor 1α -t ("EF- 1α "), tripszin-gátlót, kataláz 2-t, NSP 113-at és RSP 40 mRNS-eket találtak, és viszonylag változatlan mennyiségben olyan mRNS-eket, amelyek más, lizint tartalmazó proteint, így szacharóz-szintázt kódolnak. Azt találták, hogy ebben a csoportban az EF- 1α protein 11% lizint tartalmaz. (Aquilat és munkatársai: Plant Molec. Biol. 17, 351 (1991)). Más mag-endospermiumból származó proteinek SDS-PAGE elemzése magasabb mennyiségű ADPG pirofoszforiláz fehérjét mutatott ki a nagy lizintartalmú opaque2 fajtában az őstípushoz képest (Habben és munkatársai idézett közleménye 831. és 833. old.). Jellegzetes

magproteineket néha immunológiai módszerekkel kvantifikálnak (lásd például: Paiva és munkatársai: Cereal Chemistry 68, 276 (1991)).

Mindeddig azonban nem valószínűsítették, és bizonyítékot sem hoztak fel arra vonatkozóan, hogy egyedi magproteinek vagy ezekkel kapcsolatos mRNS-ek a fentebb összegzett műszaki eljárásokkal mérhetők a magvak viszonylagos lizinkoncentrációjának meghatározására. Így továbbra is fennáll az igény egyszerű és gyors módszer (eljárás) iránt magvak lizintartalmának a meghatározására.

Találmányunkat az alábbiakban összegezzük.

A fentiek alapján a találmány tárgya javított módszer (eljárás) kidolgozása magvak lizintartalmának a mérésére.

A találmány egy további célja eljárás kifejlesztése különböző magváltozatok gyors és egyértelmű összehasonlítására.

A találmánynak ez a célja és egyéb céljai megvalósítása lehetővé válik egy egyszerű immunológiai módszerrel magvak lizintartalmának a meghatározására, amely egy anti-EF komplex antitestnek a magproteinek végbemenő kötődésén alapul. Ez az eljárás felhasználható új kukorica-, cirok-, köles-, búza-, árpa-, rozs-, szójabab-, napraforgó-, "canola"- és rizsváltozatok genetikai szelekciójára; és az előző módszerektől eltérően mérésenként csak egy magot igényel. Az eljárás nincsen korlátozva ép antitest alkalmazására, amely az EF komplexet megköti az immunmeghatározás kötési (kapcsolási) lépésében, hanem az eljárásban az antitest fragmentumait tartalmazó reagensek is felhasználhatók. A találmány továbbá diagnosztikai tesztkészle-

teket nyújt különböző formátumokban (kiviteli formákban) a mag lizintartalmának a kimutatására.

Az alábbiakban röviden leírjuk az ábrák magyarázatát.

Az 1. ábra regressziós viszonyt ábrázol különböző kukorica-genotípusokból eredő lizin EF-1 α ELISA mérésére és lizin mérésére.

A 2. ábra regressziós viszonyt szemléltet különböző kukorica-genotípusokból eredő szacharóz-szintáz mérésére és lizin mérésekre.

A 3. ábra regressziós viszonyt mutat be különböző kukorica-genotípusok ADPGáz mérése és lizin mérése között.

A következőkben részletesen bemutatjuk a találmány előnyös kiviteli formáit.

Szignifikáns korrelációt ismertünk fel a mag EF-1 α és a mag lizintartalmának immunológiai mérése között. Ennek megfelelően a találmány lehetővé teszi magvak lizintartalmának kimutatását például tenyésztési program keretében a lizintartalom javítása céljából, a magból származó EF komplex egyszerű mérése útján. Ebben a vonatkozásban az “EF komplex” olyan komponenst jelent a sejt proteinszintetikus mechanizmusában, amely a polipeptid hosszabbításában vesz részt. Az EF komplex EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint tartalmaz (Lauer és munkatársai: J. Biol. Chem. 268, 1644 (1984); amelyet teljes egészében hivatkozásként építünk be).

Magas szintű korreláció megfigyelése EF-1 α és lizin között magvakban meglepő, mert két másik lizint tartalmazó, magvakban lévő protein - a szacharóz szintáz és ADPG

pirofoszforiláz - mérési eredményei nincsenek korrelációban a mag lizintartalmával.

E megfigyelésünk eredményeként első ízben hasonlítható össze immunmeghatározó eljárással különböző magváltozatok lizintartalma. Ezek a módszerek természetesen gyorsabbak és könnyebbek, mint az eddigi, mag-lizintartalom mérésére alkalmazott eljárások. Pontosabban, a jelen találmány lehetővé teszi az EF komplex mérését nem több, mint egy magból nyert vizes magkivonatban.

A találmány szerinti EF komplex immunmeghatározást úgy végezzük, hogy kapcsolatba hozzuk az antitestet, vagy az antitestnek EF komplexet felismerő, kapcsoló fragmentumát, vagy az antitest egy komponensét a magproteinnel immunmeghatározás körülményei között, s így szignált gerjesztünk az antitestnek a proteinhez való kötésének válaszaként. Ez a szignálválasz jelzi a mag-lizin jelenlétét.

A lizin kimutatására alkalmas magkivonat előállítására olyan mag-előkészítési eljárások alkalmazhatók, amelyek a nem-zein proteint szolubilizálják. Az előnyös módszer abban áll, hogy fagyasztott vagy szárított magvakat mozsárban mozsártörővel finom porrá aprítunk vagy őrölünk, majd a proteinek alkalikus pufferban oldjuk, amely nátrium-dodecil-szulfátot és 2-merkapto-etanol tartalmaz (lásd Wallace és munkatársai fentebb idézett közleményét). A szolubilizált fehérjét immunmeghatározásban alkalmas pufferoldattal hígítva közvetlenül felhasználjuk, vagy tárolás után szolubilizált, fagyasztott vagy kicsapott formában végzett tárolás után alkalmazzuk.

A magkivonatot az antitesttel és jelzőanyaggal egyesítjük a jelen találmány szerinti immunmeghatározó eljárásban

Ebben a vonatkozásban az “antitest” mind monoklón, mind poliklón antitestekre vonatkozik. Ez az antitest az antitestek bármelyik csoportjához (például IgG, IgM, IgA) tartozhat. Monoklón antitest (Mab) termelésének céljára általában úgy járunk el, hogy limfocitákat izolálunk, és azokat mielómasejtekkel fuzionálva hibridómákat alakítunk ki. Ezt követően a klónozott hibridómákat olyan antitestek termelésére vonatkozóan szkrineljük, amelyek EF-1 α -hoz kötődnek. Az “antitesten” annak fragmentumait, úgy mint az anti-EF-1 α antitestek Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ és F(ab')₂ fragmentumait, valamint ilyen fragmentumok konjugátumait és az úgynevezett “antigént kötő proteineket” (egyláncú antitesteket) is értjük, amelyek anti-EF-1 α antitesteken alapulnak, például a 4 704 692 számú Egyesült Államok-beli szabadalom szerint, amelynek tartalmát hivatkozásként foglaljuk e leírásunkba. Más módon a Mab-okat vagy azok valamilyen fragmentumát a jelen találmány szerint a szokásos eljárások alkalmazásával állíthatjuk elő izolált DNS expressziója útján, amely egy ilyen Mab különböző szakaszait kódolja olyan gazdasejtekben mint az E. coli (Ward és munkatársai: Nature 341, 544 (1989)), vagy transzfektált rágsáló-mielómasejtekben (Gilliew és munkatársai: Biotechnol. 7, 799 (1989); valamint Nakatani és munkatársai: Biotechnol. 7, 805 (1989)).

Az EF-1 α bőségesen előforduló protein, amelyet számos növényfajban vizsgáltak (Carvalho és munkatársai: Arch. biochem. Biophys. 234, 591 (1984); valamint Aguilar és mun-

katársai: *Plant Molec. Biol.* 17, 351 (1991)). E leírásunkban a találmány szerinti antitest által megkötött fehérjét “EF-1 α ”-nak jelöljük, és ezen bármely fehérjét értünk, amelynek aminosavszekvenciája eléggé hasonló az EF-1 α -hoz, hogy az EF-1 α elleni antitesttel reagáljon. Így az EF-1 α kategóriába tartozik például egy “virenektin-szerű protein”, amelyet Zhu és munkatársai írtak le (*Plant Cell* 6, 393 (1994)), amelynek aminosavszekvenciája több mint 93%-ig azonos az EF-1 α aminosavszekvenciájával, s amely az anti-EF-1 α antitesthez kötődik.

E leírásunkban a “jelzőanyag” (Marker”-anyag) bármilyen molekulát jelent, amely valamilyen antitesthez konjugálódik (kapcsolódik), és egy immunmeghatározó eljárás során kimutatható szignált ad. A jelzőanyag lehet valamilyen katalizátor, és lehet nem-katalitikus molekula. Katalizátor-jelzőanyagként előnyös valamilyen enzim, például β -galaktozidáz, alkálikus foszfátáz vagy torma-peroxidáz, jóllehet nem-katalitikus jelzőanyag, így például valamilyen fluoreszcenciára vagy kemilumineszcenciára hajlamos egység is alkalmas.

A szakterületen jártas egyén számára az immunmeghatározó eljárások jól ismertek. Az immunmeghatározás alapját képező megközelítés a találmány szerinti alkalmazásra is adaptálható. Az immunmeghatározás alapja - a jelen találmány szerinti alkalmazásban - az anti-EF-1 α antitest kötődése a magkivonathoz. Bármilyen mérési kivitelezés, amely ezt a kötődést alkalmazza, alkalmas a találmány megvalósítására.

Különösen alkalmasak a heterogén jellegű immunmeghatározó módszerek. Egy előnyös forma szerint az endospermiumból extrahált proteineket valamilyen felületen

immobilizáljuk (rögzítjük). Ezt követi a felület érintkeztetése egy anti-EF-1 α antitesttel - amely jelzőanyaggal van konjugálva - ami lehetővé teszi a konjugátum proteinhez kapcsolódását a felületen. A meg nem kötött fehérje eltávolítása után, előnyösen a felületnek egy pufferolt nedvesítőszer-oldattal való mosása után a jelzőanyag szignált ad le a felülethez kötött antitest mennyiségének az arányában. Eljárhatunk úgy is, hogy a jelzőanyagot egy második antitesttel konjugálva adjuk, egy második kötési reakció céljából.

Alkalmasak továbbá homogén jellegű immunmeghatározások is, amelyek során az összes reakciók oldatban mennek végbe. Számos homogén immunmeghatározás - így az enzim-mel modulált immunmeghatározás (EMIT), a fluoreszcencia-polarizációs immunmeghatározás, valamint a szubsztrátum-hoz kapcsolt immunfluoreszcenciás immunmeghatározás - a szakterületen jártas személy számára jól ismertek.

Egy immunmeghatározás szignáljának az erőssége (mértéke) bármely célszerű formában kifejezhető, például a viszonyított szignálválaszban, az egységnyi proteinre vonatkoztatott szignálválaszban, egységnyi tömegre vonatkoztatott szignálválaszban, az 1 magra vonatkoztatott szignálválaszban, stb. Ha különböző törzsekhez vagy fajtákhoz tartozó magvakat hasonlítunk össze, akkor előnyös az immunmeghatározás szignálválaszának a kifejezése a mag tömegének egységében.

A fentiekben általánosságban leírtuk találmányunkat, azonban könnyebben érthető az alábbi példa alapján, amelyet illusztrálás céljából közlünk, s amellyel nem szándékunk találmányunk korlátozása. A példa szemlélteti a magas szintű korre-

lációt egyrészt egy fehérje mérése - amely anti-EF-1 α anti-testhez van kötve - másrészt a lizintartalom mérése között, amelyet a szokásos aminosavanalízissel hajtunk végre különböző kategóriákba tartozó kukoricafajták magvain. Ezzel ellentétben más, lizint tartalmazó magproteinek mérései nincsenek korrelációban a mag lizinttartalmának méréseivel.

Mintákat vettünk az Észak-Amerikából származó normális és opaque2 beltenyészetű W64A, B73 és Mo17 magvak endospermium-lisztjéből, valamint a szabadban megtermékenyített Tuxpeno, Tuxpeno opaque2 és Tuxpeno módosított opaque2 populációkból (amelyek Középamerikából származtak). Wallace és munkatársai (lásd az idézett közleményt) eljárásával előállítottuk a protein, zein és nem-zein frakciókat, és ezeket mikro-Kjeldahl analízissel mértük (AACC: Approved Methods of the AACC. Method 46-13. Amer. Assoc. Cereal Chemists, St. Paul, MN (1976)). A lisztmintákat 1 órán át rázókészüléken szobahőmérsékleten extraháltuk 0,0125 moláris nátrium-borát (pH 10)m 1% SDS és 2% merkaptó-etanol elegyével (az oldószernek a liszt mennyiségéhez viszonyított aránya 10:1). A szuszpenziókat 20 percig 5000 x g sebességgel centrifugáltuk, és a felülúszókat megtartottuk. Ezt az extrakciót kétszer ismételtük, és a felülúszókat összegyűjtöttük.

Az összes proteintartalom analízise céljából a magkivonatokat szárítottuk, és közvetlenül felhasználtuk. A zein/nem-zein meghatározás céljára a teljes proteinextraktumhoz 70% végkoncentráció eléréséig etanolt adtunk. Az elegyeket 2 órán át alkalmi rázással állni hagytuk, majd centrifugáltuk. A felülúszók tartalmazták a zein-frakciókat, a pelletek a nem-zein-frakciókat.

Az összes proteint, zeint, nem-zeint és a maradék proteineket nitrogénre elemeztük a mikro-Kjeldahl módszerrel. A proteinek mennyiségét úgy számítottuk ki, hogy a nitrogén-értékeket 6,25-tel szoroztuk. Előzetes vizsgálat arra utalt, hogy a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) jelenléte a nitrogénmeghatározást nem zavarta.

Az aminosavak analízisét úgy végeztük, hogy a mintát hidrolízisnek, perhangyasavas oxidációnak vetettük alá, majd ezt követően savas hidrolízist végeztünk a cisztein esetében és alkálikus hidrolízist a triptofán esetében (AQAC: Official Methods of Analysis, 15th ed. Method 15:982.30 E(a,b,c). The Association: Washington, D.C. (1990)). Az aminosavakat egy nagy teljesítményű kationcserélő oszloppal ellátott Beckman 6300 Amino Acid Analyzer alkalmazásával elkülönítettük, és elemeztük. Az aminosavakat az oszlopozás után ninhidrin-reakcióval mutattuk ki. Belső standardként norleucint használtunk.

Az aminmeghatározási mérések során a proteinek extrakcióját és a zein és nem-zein proteinek frakcionálását irodalom szerint végeztük (Wallace és munkatársai fentebb idézett közleménye). A nem-zein pelleteteket 1 ml 0,1 n NaOH és 1% SDS elegyben reszuszpendáltuk (ismét szuszpendáltuk), majd 1000-szeres térfogatú karbonát fedőpufferral hígítottuk (Clark és munkatársai a következő helyen: Methods in Enzymology, szerk. Weissbach és munkatársai, 742-766. old., Academic Press (1993)). Ezután a mintákat sorozathígítással kezeltük egy ELISA lemez üregeiben (Immulon2, Immulon4, Dynatech), és éjszakán át 4°C hőmérsékleten inkubáltuk. Az antigén felesle-

gét eltávolítottuk, az üregeket TTBS oldattal (25 mmól Tris-HCl, pH 7,5, 0,9% NaCl és 0,05% Tween 20) mostuk, és egy EF-1 α -ra specifikus antitestet (Zhu és munkatársai: Plant Cell 6, 393 (1994)) szacharóz szintázt vagy ADPGázt 1:1000 arányban TTBS-sel hígítottuk, és az üregekbe adtuk. A mintát tartalmazó ELISA lemezeket 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az antitest-oldatokat eltávolítottuk, az ELISA-lemez üregeit kétszer mostuk TTBS-sel, majd a jelzőanyaggal konjugált második antitestet (nyúl csirke elleni, alkálikus foszfátázzal konjugált antitest; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 1:4000 arányban TTBS-sel hígítottuk, és az üregekbe adtuk. Ezt a második kötési reakciót 2 órán át folytattuk. Az antitest-jelzőanyag oldatokat eltávolítottuk, és az ELISA-lemez üregeit TTBS-sel kétszer mostuk. Minden egyes üregbe 200 mikroliter alkálikus foszfátáz szubsztátum reagenst adtunk (Sigma, St. Louis), amelyet dietanol-aminos szubsztátum-pufferral hígítva készítettünk, (lásd Clark és munkatársai fentebb idézett közleményét). Az enzimes reakcióból származó szint 1 órán át fejlesztettük ki, majd 410 nm-re beállított Dynatech MR700 ELISA lemezleolvasón mértük az ELISA lemezek üregeiben megfigyelhető abszorbanciát. Az ELISA mérések céljára a proteinkoncentrációnak olyan tartományait választottuk, ahol az abszorbanciának a relatív antigén-koncentrációtól való függése minden egyes mérés esetére megközelítőleg lineáris volt a regressziós elemzés alapján.

Az 1. ábra mutatja, hogy az ELISA módszerrel, az anti-EF-1 α antitesttel nyert mérési eredmények magas szintű

korrelációt ($r=0,95$) mutatnak a magvak lizintartalmával. A 2. ábra mutatja, hogy a magvak szacharóz-szintáz tartalmának ELISA módszerrel végzett mérései nincsenek magas szintű korrelációban ($r=0,75$) a magvak lizintartalmával. A 3. ábra szemlélteti, hogy a magvak ADPGáz tartalmának ELISA módszerrel kapott mérései nincsenek magas szintű korrelációban ($r=0,46$) a magvak lizintartalmával.

Jóllehet a fentebb elmondottak egy különleges, előnyös megvalósításra vonatkoznak, nyilvánvaló, hogy a találmány nincsen erre korlátozva. Nyilvánvaló a szakterületen jártas személyek számára, hogy a közölt megvalósítási formákon különböző módosítások végezhetők, és ezek a módosítások elvárásunk szerint a találmány oltalmi körén - amelyeket az alábbi igénypontok határoznak meg - belül esnek.

Szabadalmi igénypontok

1. Immunológiai eljárás mag lizintartalmának a kiértékelésére, **azzal jellemezve**, hogy (a) a magkivonatot az EF komplexet felismerő antitesttel érintkezésbe hozzuk, majd (b) meghatározzuk végbemegy-e kötődés az antitest és a magkivonat között.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás **azzal jellemezve**, hogy a magkivonat endospermium-proteint tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a magkivonat kukoricamagkivonat, cirokmagkivonat, kölesmagkivonat, búzamagkivonat, árpamagkivonat, rozsmagkivonat, szójabab-magkivonat, "canola" magkivonat, napraforgó-magkivonat vagy rizsmagkivonat.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az antitest proteinként EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint ismer fel.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az antitest monoklón antitest, vagy annak kötődő fragmentuma.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a kötődő fragmentum Fv, egyláncú antitest, Fab, Fab', F(ab)₂ vagy F(ab')₂.

7. Készlet mag lizintartalmának meghatározásában történő alkalmazásra, amely tartalmaz:

- (a) egy felületet, amely a magkivonatot megköti;
- (b) egy első tartóedényt, amely az EF komplexet megköti antitestet tartalmazza;

(c) egy második tartóedényt, amely egy második antitest és egy jelzőanyag konjugátumát tartalmazza, ahol a második antitest megköti az első antitestet; és

(d) egy szert, a nem kötött protein eltávolítására.

8. A 7. igénypont szerinti készlet, ahol az EF komplexet megkötő antitest proteinként EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint ismer fel.

9. A 7. igénypont szerinti készlet, ahol a felület az EF komplexet megkötő antitesttel van bevonva.

10. A 9. igénypont szerinti készlet, ahol az antitest proteinként EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint köt meg.

11. Készlet mag lizintartalmának a meghatározására, amely tartalmaz:

(a) egy felületet, amely a magkivonatot megköti;

(b) egy tartóedényt, amely antitest-jelzőanyag konjugátumot tartalmaz, ahol az antitest specifikusan kötődik az EF komplexhez; és

(c) egy szert, a nem kötött protein eltávolítására.

12. A 11. igénypont szerinti készlet, ahol az antitest proteinként EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint ismer fel.

13. A 11. igénypont szerinti készlet, ahol a felület az EF komplexet megkötő antitesttel van bevonva.

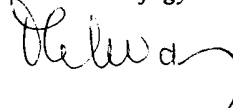
14. A 13. igénypont szerinti készlet, ahol az antitest proteinként EF-1 α , EF-1 $\beta\gamma$ és EF-2 proteint köt meg.

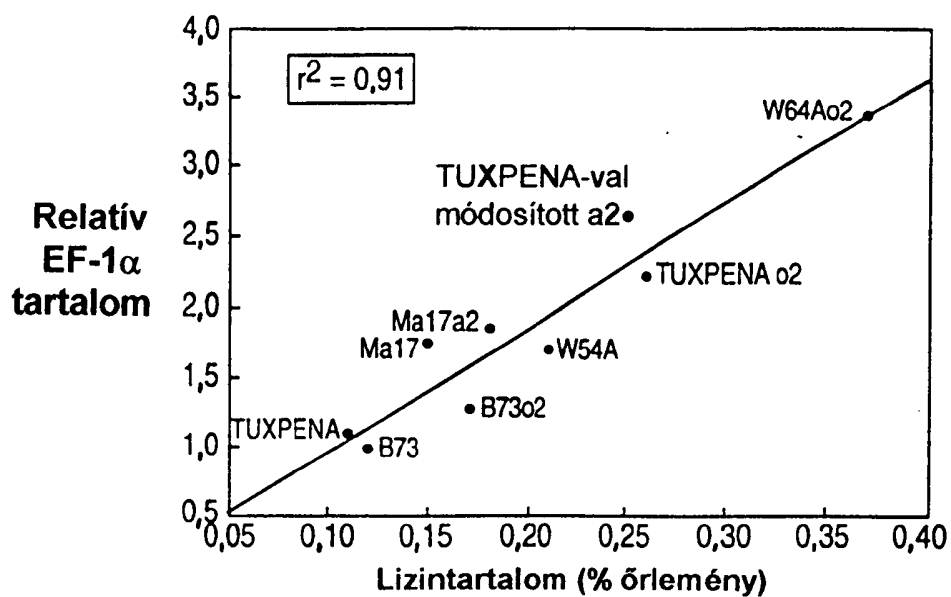


A meghatalmazott:

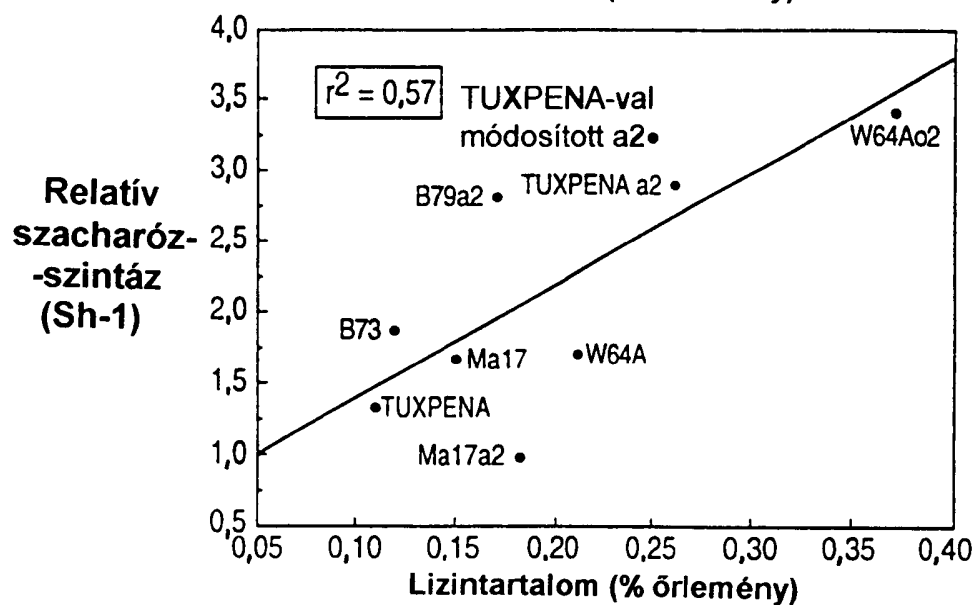
DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft

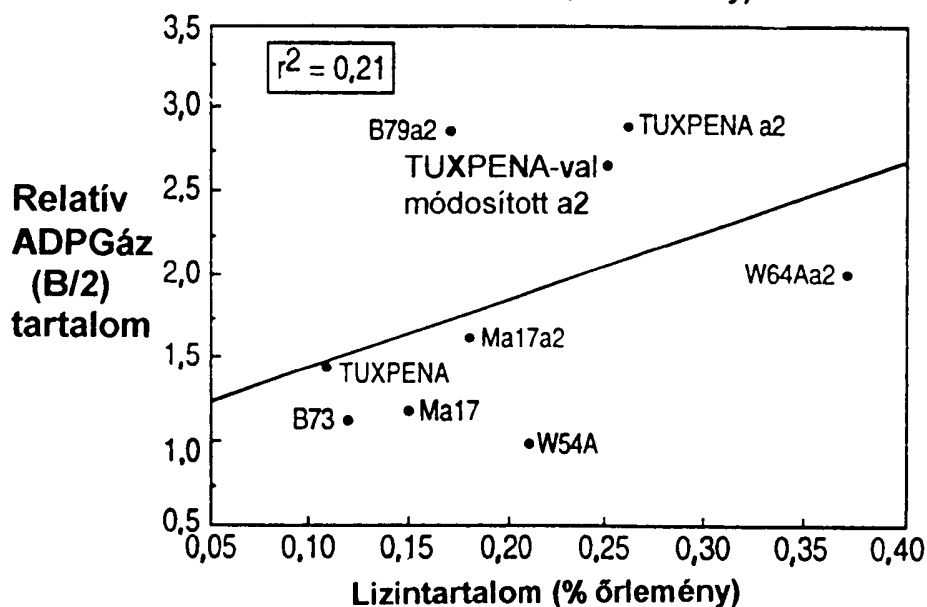




1. ábra



2. ábra



3. ábra