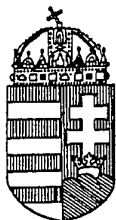


(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**204 559 B**

- (21) A bejelentés száma: 4464/88  
(22) A bejelentés napja: 1988. 08. 26.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
306365 1987. 08. 26. DD  
306366 1987. 08. 26. DD  
306367 1987. 08. 26. DD

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 12 N 11/16**  
C 12 Q 1/00  
C 12 Q 1/48

- (40) A közzététel napja: 1990. 03. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltalálók:  
dr. Hunger, Hans-Dieter, Zepernick (DE)  
dr. Behrendt, Gerhard, Schulzendorf (DE)  
dr. Schmidt, Gerhard, Berlin (DE)

(73) Szabadalmas:  
Akademie der Wissenschaften der DDR,  
Berlin (DE)

(54) **Eljárás enzimmel kapcsolt molekuláris szondák előállítására és ezek segítségével biomolekulák kimutatására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás enzimmel kapcsolt molekuláris szondák előállítására, amelyek biomolekulák enzimreakció alapján történő kimutatására alkalmazhatók. A biomolekulák kimutatása úgy történik, hogy az oldatban vagy egy gélben található vagy egy I szilárd fázison kötött biomolekulát egy enzimmel kapcsolt molekuláris szondával felismertetnek, a molekuláris szondához kapcsolt vagy onnan lehasított enzimet egy szubsztráttal, egy kosubsztrát jelenlétében reagáltatják, és az átalakított szubsztrátot egy II vagy III szilárd fázison kimutatják. A találmány különösen olyan molekuláris szondákra vonatkozik, amelyek aminoglükózid-foszfotranszferázhoz vannak kapcsolva.

**HU 204 559 B**

A találmány tárgya eljárás enzimmel kapcsolt új molekuláris szondák előállítására, és ezek segítségével biomolekulák kimutatására.

A találmány szerinti eljárással előállított molekuláris szondák biomolekulák enzimikus reakción alapuló kimutatására alkalmazhatók. A szondák a molekulárbiológia, orvostudomány, biológia, genetika, fitopatológia, géntechnológia, mezőgazdaság és állatgyógyászat terén hasznosíthatók.

Biomolekulák enzimmel kapcsolt molekuláris szondákkal történő kimutatása ismert. E célra eddig mind immunreaktív szondákat (1. például *Immunoenzymatic Techniques*, Hrsg. S. Avrameas et al., Elsevier Science Publishers Acids, Res., 12, 3435–3444, 1984), mind más biomolekulához specifikus affinitásmutató szondákat kapcsolnak enzimekhez. Kapcsolóenzimként többnyire alkalikus foszfatázokat, galaktozidázt, glükamilázt, glükóz-oxidázt, glükoronidázt, laktát-dehidrogenázt, laktoperoxidázt, peroxidázokat, ribonukleázokat és tirozinázt alkalmaztak molekuláris szondákhoz, szokásos térhálósító szerekkel történő kapcsolásra (S. Avrameas, T. Teynck, J. L. Guesdon, *Scand. J. Immunol.*, 7–23, 1978). A kimutatási reakciókban alkalmazott enzimek mindeddig a fent említettekre korlátozódtak, azaz ezek közül csak korlátozott számú alkalmaztak. Ennek a korlátozásnak egyik alapja az, hogy más szubsztrátok nehezen mutathatók ki. Eddig túlnyomórészt olyan szubsztrátokat alkalmaztak, amelyek az enzimreakció után színes reakcióterméket adnak. A szilárd fázison megkötött biomolekulák kimutatási eljárásánál az enzimmel kapcsolt szondák segítségével az átalakított szubsztrát kimutatását eddig mindig vagy ugyanazon a szilárd fázison, amelyen a biomolekula helyezkedett el, vagy az oldatban tudták megoldani. Egy ilyen kimutatási eljárás elvi lefolyását például R. H. Yolken ismerteti az *Immunoenzymatic Techniques* id. h. 274. oldalán, egy antigén meghatározása kapcsán (immunológiai kimutatás):

1. Egy, a meghatározandó antigén elleni 1 antitestet egy mikrotiterlap falán rögzítenek;
2. Hozzáadják a tesztanyagot, a jelen levő antigént az antitest megköti;
3. Mosások után egy enzimmel kapcsolt 2 antitestet adnak hozzá. Ez az 1 antitesttel kötött antigénnel reagál;
4. Mosások után egy szubsztrátot adnak hozzá. A mikrotiterlap falán rögzített enzim (1 antitest – antigén – 2 antitest – enzim) a szubsztrátot látható formára alakítja. Az oldatban mérhető színintenzitás arányos a tesztanyagban levő antigén mennyiségével.

Ezeknél a kimutatási eljárásoknál többnyire vízoldható reakciótermékek képződnek. A vízben nem oldódó termékek a hordozóanyagokon kicsapódnak.

Az eddig alkalmazott enzimek tulajdonságai következtében az ezeken a szondákon közvetlenül megkötött enzimek nem alkalmazhatók extrém körülmények között (például hibridizációs körülmények, magas hőmérséklet vagy detergens jelenlétében).

Olyan biomolekulák kimutatásakor, ahol a biomolekula szilárd fázison van rögzítve, eddig a kimutatást

mindig ugyanazon a szilárd fázison végezték, amelyen a célmolekula található (például egy antigén kimutatása blotting után nitrocellulózra poliakrilamidgélből peroxidázzal kapcsolt antitestekkel).

- 5 Ennél a kimutatásnál az antigént a poliakrilamidgél-elektroforézis után először egy sík felületű hordozóanyagra viszik át, és ott rögzítik. A hordozóanyagot, amelyen az antigén található, ezután enzimmel kapcsolt antitest jelenlétében inkubálják, amelyhez így az antigén hozzákötődik. Mosás után, amelynek során a felesleges, enzimmel kapcsolt antitest kimosódik, egy oldható szubsztrátot, például diamino-benzidint vagy 4-klór-naftolt adagolnak, hidrogén-peroxid jelenlétében. A peroxidáz a szubsztrátot vízben oldhatatlan, színes terméké alakítja (diamino-benzidin: barna, 4-klór-naftol: ibolya), amelyek azokon a helyeken, ahol az antigén-antitest-peroxidáz-komplex található, a hordozón kicsapódnak, és így az antigén helyzetét a felosztott proteinegyben a hordozóanyagon jelölik.
- 20 Ilyenkor tehát az antigént ugyanazon a hordozóanyagon, amelyen rögzítve van, színesen jelölik. Az ilyen hordozóanyagok újrafelhasználása a színezéssel végzett enzimikus kimutatási reakciók után nehezen oldható meg, mert a kötött színezékmolekula legtöbbször mellékreakciót indít, és így a következő lépésekben háttérproblémákat okoz.

A színreakciókkal végzett kimutatási eljárások érzékenysége mindig kisebb, mint a radioaktív kimutatási eljárásoké. A specifikus nukleinsav-szekvenciák enzimmel kapcsolt hibridizációs szondákkal végzett kimutatása elvileg hasonlóan megy végbe. Különösen a nagyon kis mennyiségű biológiai anyagokból végzett nukleinsavszekvencia-kimutatásoknál, például minimális DNS-mennyiségekből egyes gének kimutatásánál szükséges lényegesen érzékenyebb kimutatási módszereket alkalmazni.

Eddig nem volt lehetőség arra, hogy biomolekulákat enzimmel kapcsolt szondák segítségével a biomolekulától független hordozófelületen mutassunk ki.

- 40 Molekuláris szondaként számos kémiai vegyület és biomolekula említhető, amelyek specifikus affinitást mutatnak más biomolekulákhoz, és így azok kimutatására vagy affinitás kromatográfiás tisztítására alkalmasak. Ilyen szondák például:
  - 45 – immunreaktív szondák, például antitestek, antiszérumok, immunológiailag reaktív fehérjék;
  - hibridizációs szondák, például különböző lánchoszúságú nukleinsavfragmensek, DNS- és RNS-molekulák;
  - 50 – fehérjék, amelyek egy másik biomolekulához specifikus affinitást mutatnak, például avidin, lektin, sztreptavidin;
  - szerves vegyületek, amelyek biomolekulákhoz specifikus affinitást mutatnak, például biotin.
- 55 A molekulárbiológiában specifikus biomolekulák (célmolekulák) kimutatása úgy történik, hogy a célmolekula a molekuláris szondával reagál (például immunreakcióban, hibridizáláskor), majd a szondákat vagy közvetlenül jelölik (például radioaktívan, fluoreszcens színezéssel), vagy egy második kimutatórendszerrel

kapcsolják, amely egy további specifikus reakcióval a célmolekula kimutatását eredményezi, (például színezék leválasztása, majd fotografikus kiértékelés). Az ilyen kimutatási eljárásokat számos publikációban ismertették, és ezek a technika állása szerint ismertek. Az ilyen kimutatási reakciókban enzimek kapcsolása szondákhoz fokozódó szerephez jut, lásd például *Immunoenzymatic Techniques*, id. h. és *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 15, Hrsg. R. H. Burdon und P. H. van Knippenberg, Kapitel 11, Preparation of Enzyme – Antibody or Other Enzyme Macromolecule Conjugates, S. 221–278, Amsterdam stb. (Elsevier Sciences Publishers) 1985.

Számos enzimet kapcsolnak már például antitestekhez (S. Avrameas, T. Ternynck, J. L. Guesdon, id. h.): alkali- kú foszfatázok, galaktozidáz, glükóamináz, glükóz-oxi- dáz, glükoronidáz, laktát- dehidrogenáz, laktoperoxidáz, peroxidáz, ribonukleáz, tirozináz. Avrameas és munkatársai szerint az enzimeknek, amelyeket molekuláris szondákon történő rögzítéshez alkalmazunk, bizonyos általános követelményeknek meg kell felelniük:

1. Magas specifikus aktivitás és a szubsztrát magas átfolyási aránya;
2. Jó stabilitás szobahőmérsékleten, és a működési hő- mérsékleten;
3. Semmi vagy nagyon csekély aktivitásvesztés a kapcsolás után;
4. Könnyű hozzáférhetőség nagy tisztaságú formában könnyen hozzáférhető anyagokból vagy egyszerű preparálás.

Ezeknek a feltételeknek az eddig alkalmazott enzi- mek csak részben felelnek meg. A kimutatási reakciók- ban leggyakrabban alkalmazott enzimek a peroxidázok és az alkali- kú foszfatázok. Az enzimek viszonylag csekély termostabilitása különösen a hibridizációs re- akciókban történő alkalmazáskor (például 48 óra hosszát 65 °C-on) okoz nehézséget, illetve teszi az alkalmazást lehetetlenné.

Az eddig alkalmazott enzimek egy további hátránya, hogy ezeket általában színes reakciókban alkalmazzák kimutatásra, ahol viszonylag gyenge kimutatási érzé- kenység érhető el. A <sup>32</sup>P-ral jelzett foszfát átvitelével lényegesen érzékenyebb kimutatás lenne lehetséges, mint az említett eljárással. A <sup>32</sup>P-ral jelzett foszfát egy szubsztrátra történő átvitelét egy szondához kapcsolt enzim segítségével azonban még nem írták le.

Enzimek molekuláris szondákra történő kapcsolá- sakor kapcsolóreagensként rendszerint azonos funk- ciós csoportokat tartalmazó bifunkcionális molekulá- kat, például glutáraldehid [1. például Avrameas, Bull. Soc. Chim. Biol. (1968) 50, S. 1 169 ff], benzokinon [1. például M. Renz, CH. Kurz (1984), Nucl. Acids Res. 8, 3435–3444], biszimidóészter [1. például W. C. Mentzer et al., J. Protein Chem. (1982) 1, 141–155] vagy különböző funkciós csoportokat tartalmazó bi- funkciós molekulákat alkalmaznak, például azido- aril-oxi-szukcinimid [1. például T. H. Ji és J. Ji Anal. Biochem. (1982) 20, 372–8], azido-aril-tio-ftálimid [1. például R. B. Moreland et al., Anal. Biochem. (1982) 121, 321/6].

A biotin-avidinnek (streptavidinnek) egyre nagyobb a jelentősége, mivel alkalmazásával egy, a 8-szorosig fokozódó kaszkáderősítés érhető el (1. például 4 463 090 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A kimutatórendszer legtöbbször streptavidinhez vagy biotinhoz kapcsolt peroxidázból vagy alkali- kú foszfatázból áll, úgy, hogy a kimutatáshoz színreakciót alkalmaznak. A jelenleg legérzékenyebb hibridizációs eljárásban (például az emberi DNS-ből az egyes gének kimutatása) ezek a szondához kapcsolt enzimmel vég- zett, nem radioaktív kimutatási eljárások a közvetlen radioaktívan jelzett nukleinsavszondákhoz képest alul- maradnak. Különösen ezen a területen van szükség olyan módszerekre, amelyek lényegesen magasabb ki- mutatási érzékenységgel rendelkeznek.

Az eddig alkalmazott szondákkal egyrészt a bio- tin/avidin kaszkád alkalmazása mellett is csak a 8-szo- rosig terjedő erősítés érhető el, amelynek során azon- ban ugyanazon a szilárd hordozón dolgoznak. Színezék leválasztásán alapuló kimutatási eljárások során ilyen erősítés nem érhető el, ezen kívül a kicsapódott színe- zék következtében a biomolekula újrafelhasználása rendszerint nem lehetséges.

Az enzimmel kapcsolt szondákkal végzett kimuta- táshoz eddig a színezékeljárást kötötték, amelyeknek során az autoradiográfias módszerek nagyobb kimuta- tási érzékenységet nem használták ki. A radioaktív ki- mutató jelének felerősítéséhez jelenleg nem állnak rendelkezésre enzimek, amelyek minden reakciólépés körülményeihez megfelelnek.

A találmány célja, újfajta, enzimmel kapcsolt mole- kuláris szondák, ezek előállításának és ezen újfajta, enzimmel kapcsolt molekuláris szondák alkalmazásá- val biomolekulák fokozott érzékenységgel történő ki- mutatási eljárásának biztosítása.

A feladat tehát az volt, hogy molekuláris szondákat kapcsolóképes enzimekkel kapcsoljuk, és biomoleku- lák kimutatására olyan eljárást dolgozzunk ki, amely- nek során ezeket az enzimmel kapcsolt molekuláris szondákat, a kötéshez és az átalakított szubsztrát ki- mutatásához speciális szilárd fázist alkalmazva magas ki- mutatási érzékenységet érjünk el.

A találmány szerinti eljárás, biomolekulák enzimmel kapcsolt molekuláris szondákkal történő kimutatására, azzal jellemezhető, hogy az oldatban megtalálható vagy gélben vagy egy első szilárd fázison kötött bio- molekulát egy enzimmel kapcsolt molekuláris szonda felismer, a molekuláris szondához kapcsolt vagy leha- sított enzimet egy szubsztráttal egy segédsubstrát jelenlétében reagáltatjuk, és az átalakított szubsztrátot egy második vagy harmadik szilárd fázison kimutatjuk.

A találmány szerinti eljárással először biztosítunk olyan módszert, amelynek során a biomolekula felis- merési lépése és kimutatási lépése a kimutatási eljárás- ban különböző fázisokon, például két hordozófelületen megosztott enzimekkel megy végbe, és így a második fázison a felerősítési lehetőségek az enzimreakcióval teljesen kihasználhatók.

A találmány szerinti eljárásnak számos változata le- hetséges, amelyek azonban ugyanazon elvi lépésekből

állnak. A biomolekulák kimutatása a találmány értelmében tehát a következő lépésekből áll:

a) Felismerési lépés, amelyben az enzimmel kapcsolt molekuláris szondák az oldatban, gélben található vagy szilárd, I fázisra kötött, specifikus affinitással rendelkező biomolekulához kapcsolódnak;

b) Mosási lépés, amelyben a főlöleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk és/vagy leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés, amelyben a szubsztrátot egy kosubsztrát jelenlétében az enzimmel átalakítjuk;

d) Elválasztási lépés, amelyben az át nem alakított kosubsztrátot és adott esetben a szubsztrátot kimossuk vagy leválasztjuk;

d) Kiértékelési lépés, amelyben az átalakított szubsztrátot egy szilárd, II vagy III fázison mérjük vagy alkalmas kimutatási eljárással kimutatjuk.

A fenti lépések mindegyikében további számos variációra van lehetőség a biomolekulák kimutatási módszereinek sokfélesége alapján. Így például elképzelhető, hogy a kimutatandó biomolekula oldatban vagy szilárd fázison megkötve van jelen. Ilyenkor a szilárd fázis nemcsak szemcsés vagy sík felületű hordozó lehet, hanem gél is, amelyben a biomolekulák szabadon mozoghatnak, vagyis nem megkötve vannak jelen. Gélek lehetnek a molekulárbiológiában szokásosan alkalmazható agarózgélek és poliakrilamidgélek, amelyeket rendszerint az elválasztási műveletben alkalmaznak.

A mosási és elválasztási lépésekben szintén számos variációra van lehetőség, mivel ezek számos részlepből állnak, amelyeket ismert módon végzünk. Így például a szilárd fázison végzett mosást különböző, a rendszerhez beállított pufferral végezhetjük. Szükség lehet azonban arra is, hogy egy vagy több komponenszt leválasszunk, ami oszlopok, elválasztógélek vagy kromatográfiás módszerek segítségével történhet. Másrészt lehetőség van arra, hogy csak a biomolekulákból és az enzimhez kapcsolt molekuláris szondából álló komplexet válasszuk le, majd az enzimreakció-lépésben mutassuk ki. Lehetséges az is, hogy a lépések egyikében az enzimet a szondától ismét elválasszunk, majd a kimutatást a szubsztráttal és a kosubsztráttal történő reakció alapján egy szilárd fázison végezzük.

Számos lehetőség van tehát az enzimreakció-lépés kivitelezésére. Történhet oldatban, vagy végezhető szilárd fázison vagy gélben. Ha az enzimreakció-lépést például oldatban végezzük, akkor a szubsztrát átalakítási termékét végül egy szilárd fázison kell megkötni és kimutatni. Ez azt jelenti, hogy egy olyan hordozóanyagot kell rendelkezésre állnia, amely az átalakított szubsztrátot szelektíven megköti. Ha azonban az enzimreakció-lépést már szilárd fázison végeztük, azaz a szubsztrát és/vagy az enzim, amelyet még a biomolekulából és molekuláris szondából álló komplexhez kapcsolunk vagy abból lehasítunk, egy szilárd hordozón található, akkor a szubsztrátot a szilárd fázison alakítjuk át, majd kimutatjuk, amelynek során az át nem alakított kosubsztrátot gondosan leválasztjuk. Ha az enzim, amelyet a biomolekulából és molekuláris szondából álló komplexből lehasítottunk, oldatban

vagy gélben található, akkor is történhet ez az átalakulás szilárd fázison, majd az átalakított szubsztrát ezen kimutatható. Az át nem alakított szubsztrátot ilyenkor is leválaszthatjuk, ez azonban a legtöbb esetben nem szükséges.

Az előnyös lehetőségek közül egyet a következőkben közelebbről leírunk.

#### *I. változat*

a) A biomolekulákat gélben vagy más elválasztó- és hordozóanyagban szétválasztjuk, és a biomolekulákat tartalmazó géleket vagy más elválasztó- és hordozóanyagokat egy oldattal, amely egy enzimmel kapcsolt molekuláris szondát tartalmaz, érintkeztetjük, amelynek során a biomolekula és a szonda egymással reagál, úgy, hogy egy, a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex keletkezik a gélben (felismerési lépés);

b) A mosási lépésben a főlöleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát a gélből kimossuk vagy leválasztjuk;

c) Az enzimreakció-lépésben a gél egy második géllal vagy elválasztó- és hordozóanyaggal hozzuk érintkezésbe, amely a szubsztrátot és a kosubsztrátot tartalmazza, és a szubsztrátot átalakítjuk;

d) Az elválasztási lépésben a második gélt vagy elválasztó- és hordozóanyagot a hozzáadott szubsztráttal együtt egy III szilárd fázissal érintkeztetjük, amelyen az átalakított szubsztrát szelektíven megkötődik;

e) A mosási lépések után a kimutatási lépésben a III szilárd fázison levő átalakított szubsztrátot radioaktivitás mérésével, autoradiográfiával vagy más alkalmas kimutatási módszerekkel kimutatjuk.

Ennek az eljárásnak egy speciális esetében az a) és b) lépések után a gél, amely a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplexet tartalmazza, egy kosubsztrát jelenlétében egy II szilárd fázissal érintkeztetjük, amelyen a szubsztrát meg van kötve, és az enzimatikusan átalakított szubsztrátot a II szilárd fázison mutatjuk ki.

Ez a speciális módszer alkalmas arra is, hogy enzimtesztben az enzim hatékonyságát vizsgáljuk, ezáltal a találmány szerinti eljárás egy további alkalmazási módját kapjuk.

#### *II. változat*

a) A felismerési lépésben az enzimhez kapcsolt molekuláris szonda és a biomolekula oldatban található, és ott kapcsolódnak;

b) A mosási lépésben a főlöleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát elválasztjuk;

c) Az enzimreakció-lépésben a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex enzimet az oldatban egy kosubsztrát jelenlétében a szubsztráttal reagáltatjuk;

d) Az elválasztási lépésben az enzimatikusan átalakított szubsztrát elválasztása a főlöleges kosubsztráttól egy, a szubsztrátot szelektíven kötő szilárd III fázison történik;

e) A kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a szilárd III fázison mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

A b) lépést, azaz a főlöleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szonda elválasztását például oszlopon, különösen affinitásoszlopon vagy affinitáshatással rendelkező részecskék szuszpenzióján végezhetjük. Ezen változat szerint az enzimreakció-lépést úgy végezhetjük, hogy az enzim a szondához van kapcsolva, és ez a biomolekulához kapcsolódik, vagy úgy, hogy az enzimet egy közelségi lépésben a szondából és biomolekulából álló komplexről lehasítjuk. Ilyenkor a hasítás történhet az enzim és a molekuláris szonda közötti kötőhelyeken (azaz reverzibilis kötéstől van szó) vagy abban a molekulaláncban, amelyet az enzim és a molekuláris szonda kapcsolásához alkalmaztunk. Ilyen hasítás természetesen nemcsak ebben a változatban lehetséges, hanem a találmány szerinti eljárás más változataiban is.

### III. változat

a) A felismerési lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát a szilárd I fázison megkötött biomolekulához kapcsoljuk;

b) A mosási lépésben a főlöleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk és/vagy leválasztjuk;

c) Az enzimreakció-lépésben a szilárd I fázison kötött, a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex enzimet egy oldatban található szubsztráttal és kosubsztráttal reagáltatjuk;

d) A leválasztási lépésben az át nem alakított kosubsztrátot és adott esetben a szubsztrátot leválasztjuk, és az átalakított szubsztrátot egy szilárd III fázisra kötjük;

e) A kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a szilárd III fázison mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

Ebben a változatban mind a biomolekula, amelyre a molekuláris szonda kapcsolódott, mind pedig az átalakított szubsztrát szilárd fázison található. Ezek a szilárd fázisok lehetnek azonosak, vagy inkább mindig a speciális biomolekulához és az átalakított szubsztráthoz választjuk meg ezeket.

Az enzimreakció-lépést ebben az esetben is vagy a teljes, szondából, biomolekulából és kapcsolt enzimből álló komplexszel, vagy a lehasított enzimmel hajtjuk végre, mint a II. változatban ismertettük.

Ennek a változatnak egy további variációja az, amikor a szilárd I fázist, a hozzákapcsolt biomolekulával és az ahhoz kapcsolódott molekuláris szondával együtt az a) és b) lépések után egy géllal vagy más elválasztó és hordozóanyaggal bevonjuk, amelyekben a szubsztrát és kosubsztrát található, így az enzimreakció végbemegegy és a gélből az átalakított szubsztrátot egy szilárd III fázisra visszük át.

### IV. változat

Ez a változat a találmány szerinti eljárás egy előnyös kiviteli módja. Az eljárási lépéseket a következőképpen hajtjuk végre:

a) A felismerési lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát egy szilárd I fázison megkötött biomolekulára kapcsoljuk;

5 b) A mosási lépésben a főlöleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk és/vagy elválasztjuk;

c) Az enzimreakció-lépésben az I fázison megkötött, a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex enzimet egy szilárd II fázison megkötött szubsztráttal, egy, az oldatban található kosubsztrát jelenlétében reagáltatjuk;

10 d) Az elválasztási lépésben a főlöleges kosubsztrátot kimossuk vagy leválasztjuk;

e) A kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a II szilárd fázison mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

15 Ennél a változatnál lehetővé válik – ami a biomolekulák kimutatásának teljesen újfajta módszere –, hogy két szilárd hordozót, különösen sík felületű hordozót egymással érintkeztessünk, és az enzimreakciót úgy indítsuk be, hogy az oldathoz adjuk a kosubsztrátot. Sík felületű hordozóként előnyösen például a 296 754–2 számú NDK-beli szabadalmi bejelentésben ismertetett hordozókat alkalmazzuk. Lehetséges azonban olyan részecskéket egymással átalakítani, amelyek különbözőképpen vannak bevonva, többek között mágneses manggal rendelkező műanyag részecskéket is.

20 A c) reakciólépésben az enzim lehet a molekuláris szondához kapcsolva, vagy abból lehasítva. Ez utóbbi eset különösen akkor előnyös, ha szubsztrátként DNS-t alkalmazunk, és az enzim például egy ligáz vagy más helyreállító enzim.

A felismerési lépésben minden eljárási változatban lehetséges, hogy a reakció már itt szétágazzon, vagy az, hogy a biomolekula és az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda közé további molekulákat kapcsoljunk. Ez az érzékeny enzimek esetén előnyös lehet. Lehetséges ilyenkor, hogy ismert avidin/biotin rendszereket alkalmazzunk, és így egy lehetséges felerősítést már a felismerési lépésben kihasználjunk. Ilyenkor a felismerési lépés utolsó lépcsőjében az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda nem közvetlenül a biomolekulát ismeri fel, hanem a kaszkád előtérbe kerülő reakciópartner molekuláját. Így a felismerési lépésben lehetővé válik, hogy a biomolekulát egy vagy több felismerési rendszerben egy vagy több reakciófokozatban egy vagy több specifikus affinitást mutató molekula ismerje fel, illetve egy vagy több molekulával reagáltassuk, és a molekuláris szondával kapcsolt enzim ezen molekulák legalább egyikével reagáljon.

50 Szilárd fázisként számos molekula alkalmas, amelyek a technika állása szerint ismertek, és amelyeket a biomolekula hordozóanyagaként alkalmazhatunk. Szilárd I fázisként, amelyhez a biomolekula kapcsolódik, egy kovalensen, ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kötő hordozót alkalmazhatunk. Elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kötnek például a mikrocellulózok és a polivinilidén-difluorid, míg a poliamidok (például xilénmembránok) vagy a töltött poliamidok, valamint a dietil-amino-alkil-cellulózok ionosan kötnek. Kovalensen kötő hordozók például a cellulózszármazékok, például diazo-

benzil-oxi-metil-cellulózok, klórciánnal aktivált cellulózok (például 220 316 számú NDK-beli szabadalmi bejelentés). Alkalmazható polisztirol, aktiválással vagy anélkül (szulfonált vagy aminált/diazotált formában) vagy kémiaiilag aktivált üveg. A szilárd I fázist a találmány szerinti eljárásban előnyösen sík felület formájában alkalmazzuk.

A szilárd II fázis egy olyan hordozó, amely meg tudja kötni a szubsztrátot, amely viszont a molekuláris szondákhoz kapcsolt enzimtől függ. Itt is – a szubsztráttól függően – kovalensen, ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatáson alapulva kötő hordozók alkalmazhatók, ahogyan ezt fentebb ismertettük. Így tehát szilárd II fázisként szintén alkalmazható nitrocellulóz, polivinilidén-difluorid, poliamid, töltéssel rendelkező poliamid, dietil-amino-etil-cellulóz, klórciánnal aktivált cellulóz, aktivált polisztirol, kémiaiilag aktivált üveg vagy más cellulózszármazék. Mindenekelőtt alkalmazhatók ionosan kötő cellulózok, például foszforcellulózok (a cellulóznak egy foszforsavval készült terméke, amely a cellulóz anhidroglükózegységein foszforsavcsoportokat tartalmaz), karboxi-metil-cellulózok vagy klórciánnal és egy, aminocsoportokat és karbonsav-, foszforsav- vagy szulfonsavcsoportokat tartalmazó vegyülettel módosított cellulóz, amint azt például a 296 754-2 vagy a 237 844 számú NDK-beli szabadalmi leírásban ismertetik.

A szilárd II fázis előnyösen optikailag áteresztő közeg formájában, például film formájában van kialakítva, amely a szubsztrátot meg tudja kötni. Az ilyen anyagok különösen előnyösek rutinszerű kiértékelésnél, például gyógyászati meghatározó eljárásokban, mivel így nagyszámú próba egyidejűleg gépileg értékelhető ki. A szilárd II fázist előnyösen sík felületű anyag formájában alkalmazzuk, a filmek a sík felületű anyag egy optikailag áteresztő formáját jelentik.

A szilárd III fázis, amely a szubsztrátot és/vagy az enzimatikusan átalakított szubsztrátot szelektíven megkötheti, egy gél vagy más leválasztó- és hordozóanyag lehet. Ez a szilárd III fázis szintén lehet kovalensen, ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kötő hordozó. Mivel az átalakított szubsztrát a legkülönbözőbb tulajdonságokkal rendelkezhet, ebben az esetben elvileg ugyanazok az ismert anyagok alkalmazhatók, amelyeket a fentiekben ismertettünk, nevezetesen nitrocellulózok, polivinilidén-difluorid, poliamid, módosított poliamid, diazo-benzil-oxi-metil-cellulózok, dietil-amino-etil-cellulózok, klórciánnal aktivált cellulózok, aktivált polisztirol, kémiaiilag aktivált üveg, foszforcellulóz, karboxi-metil-cellulóz vagy klórciánnal és egy, aminocsoportot és karbonsav-, foszforsav- vagy szulfonsavcsoportot tartalmazó vegyülettel módosított cellulóz. A szilárd III fázis szintén alkalmazható optikailag áteresztő közeg formájában. Itt ugyanazok a lehetőségek és előnyök állnak fenn, mint a szilárd II fázis esetén. A szilárd III fázis segítségével végzett kimutatást előnyösen egy sík felületű anyaggal végezzük, amely például fém, membrán vagy szálal anyagból készült lap formájában alkalmazható. A cellulóanyagokat papír formájában alkalmazhatjuk.

Az optikailag áteresztő szilárd fázisok esetén, különösen akkor, ha ezek fém formájában vannak kialakítva, a kiértékelést optikai módszerekkel, például színes termékek esetén denzitometriával, kolorimetriával vagy fotografikus úton végezzük. A biomolekulákat a szilárd I fázisra szokásos módszerekkel lehet felvinni. Így különösen gélben vagy más leválasztó- vagy hordozóanyagon végzett szétválasztás után úgynevezett átviteli technikákkal (blotting- módszer) foltok formájában.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös kiviteli formájában az oldatban, gélben vagy egy szilárd I fázison kötött biomolekulákat egy aminoglikozid-foszfortranszferázzal kapcsolt molekuláris szonda ismeri fel, a molekuláris szondához kapcsolt vagy arról lehasított aminoglikozid-foszfortranszferáz a szubsztráttal egy kosubsztrát jelenlétében reagál, és a foszforilezett szubsztrátot egy szilárd II vagy III fázison mutatjuk ki. Az eljárást a következő fontosabb lépésekkel hajtjuk végre:

a) Felismerési lépés, amelyben az aminoglikozid-foszfortranszferázzal kapcsolt molekuláris szonda az oldatban vagy gélben található, vagy egy szilárd I fázison megkötött, specifikus affinitással rendelkező biomolekulával kapcsolódik;

b) Mosási lépés, amelyben a fölösleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk és/vagy leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés, amelyben a szubsztrát foszforilezését a szubsztrát és az aminoglikozid-foszfortranszferáz reakciójával egy kosubsztrát jelenlétében végezzük;

d) Leválasztási lépés, amelyben az át nem alakított kosubsztrátot és adott esetben a szubsztrátot kimossuk vagy leválasztjuk;

e) Kiértékelési lépés, amelyben a foszforilezett szubsztrátot egy szilárd II vagy III fázison mérjük vagy speciális kimutató eljárással kimutatjuk.

Az aminoglikozid-foszfortranszferázok olyan enzimek, amelyek az adenzin-trifoszfátból (ATP) egy foszfátmaradék lehasítása mellett ezt a foszfátmaradékot egy foszforilezhető szubsztrátra átviszik. A szubsztrát lehet oldatban, egy hordozóba zárva vagy egy szilárd fázison kapcsolva. Az ATP ebben a reakcióban kosubsztrátként vesz részt.

Ha ATP helyett  $^{32}\text{P}$ -ral jelzett ATP-t ( $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP) alkalmazunk, az aminoglikozid-foszfortranszferáz a  $^{32}\text{P}$ -ral jelzett foszfátot viszi át a szubsztrátra. A molekuláris szondán kapcsolt enzim ezt a reakciót nemcsak egyszer hajtja végre, hanem addig, amíg a következő három körülmény teljesül:

- Szubsztrát jelenléte,
- kosubsztrát (azaz ATP, illetve  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP) jelenléte,
- az enzim mozgásának biztosítása a szubsztrát irányába.

A találmány szerinti eljárás szempontjából fontos, hogy minden enzimmolekula több foszfátmaradékot vigyen át több szubsztrátmolekulára úgy, hogy legalább tízszeres felerősítési faktor adódjon, amely azonban legtöbbször ennél nagyobb. Ezzel az eljárással abban a fázisban, ahol a szubsztrát található, a molekuláris szondának egy felerősített másolata képződik. A

találmány szerinti eljárással tehát a kimutatást nem abban a fázisban végezzük, amelyben a molekuláris szonda, hanem abban, amelyben a szubsztát található. Amennyiben egy molekuláris szondánál több, szubsztátot és kosubsztátot tartalmazó fázis van jelen (kétoldalasán vagy egymás után), a kimutatandó biomolekuláról több felerősített replika képződik. Az eredeti biomolekuláról a szondából és az enzimből álló komplex szokásos módszerrel lehasítható, és a kimutatás egy másik, adott esetben szintén aminoglükózid-foszfotranszferázval kapcsolt molekuláris szondával végezhető.

A transzferázok között az aminoglükózid-foszfotranszferázok különleges helyet töltenek be, amint azt a következő megféle tények mutatják:

- magas termostabilitással rendelkeznek, az enzim 100 °C-ra történő melegítés után is megtartja aktivitását, így magas hőmérsékleten is lehetséges hosszabb inkubációs idő;
- jó detergens stabilitással rendelkeznek, az enzim másodlagos struktúrájának detergenssekkel történő megváltoztatása ellenére enzimatikusan aktív marad;
- specifikus aktivitásuk magas;
- könnyen hozzáférhető, és mikroorganizmusok sejtlizátumból könnyen nyerhető.

Az aminoglükózid-foszfotranszferázok kiválóan teljesítik tehát azokat a követelményeket, amelyek egy olyan enzimmel szemben fennállnak, amelyet más biomolekulához kívánunk kapcsolni, amint ezt S. Avremes a *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1968) 50, S. 1 169 ff. helyen ismerteti. Ezek mikrobiológiailag előállíthatók, amint ezt például B. Reiss, R. Sprengel, H. Will és H. Schaller a *Gene* (1984) 30, 211–218. helyen ismerteti. A molekuláris szondák aminoglükózid-foszfotranszferázokhoz történő kapcsolásának számos lehetősége alapján a biomolekulák kimutatására számos módszer adódik. Először is a kapcsoláshoz alkalmas szondaként alkalmazhatók immunreaktív szondák, nukleinsavak, proteinek, illetve biomolekulához affinitást mutató kémiai vegyületek. Immunreaktív szondák a monoklonális és poliklonális antitestek, antiszérumok, fehérjék, különösen a protein A, természetben előforduló vagy szintetikus előállított peptidek. Nukleinsavként alkalmazhatók az egyszálú, kétszálú vagy részben kétszálú DNS vagy ennek fragmense, oligodezoxiribonukleozidok, RNS vagy fragmensei vagy oligoribonukleotidok. Biomolekulához specifikus affinitást mutató proteinek például az avidin, streptavidin, pretamin, zselatin, fetain, pepstatin, lektin és sok más enzim. Biomolekulához affinitást mutató kémiai vegyületek például a biotin, n-amino-fenil-bórsav és a Cibacron Blue F3GA. Más biomolekulához specifikus affinitást mutató előnyös protein az avidin és a streptavidin. Biomolekulához affinitást mutató kémiai vegyület előnyösen a biotin. Enzimeként két nagy csoport jöhet számításba, a transzferázok (E.C. 2 csoport) és a ligázok (E.C. 6 csoport). A transzferázok közül különösen azok előnyösek, amelyek radioaktívan jelzett csoportot visznek át, például az aciltranszferázok (E.C.2.3),

foszfort tartalmazó csoportokat átvivő enzimek (E.C.2.7) vagy a DNS-polimerázok (E.C.2.7.7.7). A találmány szerinti eljárásban különösen a következő enzimek alkalmazhatók:

- 5 Proteinkináz: (E.C.2.7.1.37),  
Aminoglükózid-foszfotranszferáz (E.C.2.7.1), különösen Kanamicin-foszfotranszferáz (E.C.2.7.1.95),  
T4-polinukleotid-kináz (E.C.2.7.1.78),  
Nukleotidil-transzferázok (E.C.2.7.7),
- 10 DNS-polimerázok (E.C.2.7.7.7),  
Polinukleotid-adenil-transzferáz (E.C.2.7.7.19),  
DNS-nukleotidil-oxo-transzferáz (E.C.2.7.7.31),  
Revertáz (E.C.2.7.7.49),  
Foszfor-észtert képző enzimek (repair enzymes) (E.C.6.5),  
DNS-ligázok (E.C.6.9.11).

A fenti enzimek mindegyike egy speciális szubsztáttal reagál.

- 20 A következőkben felsorolt szubsztátok tehát nem mindegyik enzimhez tartoznak, hanem csak azokhoz, amelyekre nézve a szubsztát specifikus. Némely szubsztát azonban több enzimhez is alkalmas, rendszerint azonban eltrő mechanizmussal és különböző módon alakulnak át vagy különféle reakciótermékeket képeznek. A szubsztátok tehát a következők: kloramfenikol, aminoglükózid-antibiotikumok, különösen a kanamicin, neomicin, gentamicin és paromomicin, foszforilezhető fehérjék, például hisztonok; DNS, RNS, dezoxiribo- vagy ribooligonukleotidok, dezoxi- vagy ribopolinukleotidok, kettős szálú DNS, egyszálú DNS és primerje (Starter).

- 30 Az enzimeknek szubsztátjuk mellett egy kosubsztátra is szükségük van. Ez a kosubsztát az az építőkö, amely a szubsztát átalakításához szükséges. Az aciltranszferázok esetén ez a kosubsztát például egy <sup>14</sup>C- vagy <sup>3</sup>H-nel jelzett acetát lehet. A foszfotranszferázok esetén a kosubsztát rendszerint adenzin-trifoszfát és/vagy <sup>32</sup>P-ral jelzett adenzin-trifoszfát (ATP). Emellett a 4-dezoxinukleozid-trifoszfát is átvihető (az adenzin, guanozin, citozin és timidin trifoszfátjai). A dezoxinukleozid-trifoszfát jelzése történhet  $\alpha$ - vagy  $\gamma$ -helyzetben, és az enzimtől függően az egyik vagy másik forma alakul át. A <sup>32</sup>P mellett a dezoxinukleozid-trifoszfátok <sup>38</sup>S-nel, <sup>3</sup>H-nel vagy <sup>128</sup>I-dal is jelezhető, és
- 45 az összes nukleozid vagy csak egy nukleozid lehet jelezve.

- 50 A kosubsztát lehet továbbá egy biotinilezett nukleotid, így az enzimreakció után, például avidinhez vagy streptavidinhez kötött enzimmal végzett reakció után a színezék kiértékelését végezhetjük.

Kosubsztátként alkalmazhatók továbbá már jelzett DNS vagy dezoxiribopolinukleotidok, adott esetben nem jelzett molekulákkal elegyítve, amelyek a ligázok kosubsztátjaként jöhetnek számításba.

- 55 A találmány szerinti eljárásban enzimeként előnyösen aminoglükózid-foszfotranszferázokat alkalmazunk. Ezek különösen az aminoglükózid-neomicin-foszfotranszferáz I és II, amelyeket kanamicin-foszfotranszferázként vagy APH 6, illetve APH 3 jellel is jelölnek. Az aminoglükózid-foszfotranszferázok

szubsztrátjai az aminoglükózid-antibiotikumok vagy az aminociklitol-antibiotikumok [lásd K. L. Rinehardt, J. Infect. Diseases (1969) 119, 345–50]. Ezek például a neomicin, kanamicin, gentamicin és tobramicin. Szubsztrátként előnyös a kanamicin vagy a neomicin. Koszubsztrátként jelzett vagy nem jelzett adenzin-trifoszfátot (ATP) használunk. A kimutatáshoz rendszerint  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-t alkalmazunk, amely nem jelzett ATP-vel lehet keverve.

A találmány szerinti eljárásban előnyösen a biomolekula kimutatására előnyösen aminoglükózid-foszfotranszferázt alkalmazunk, az eljárás több lépésből áll, amelyek szintén különbözőképpen végezhetők, így erre a speciális enzimszóra számos kiviteli forma lehetséges. A kiviteli forma a biomolekula fajtájától, formájától, adott esetben hordozóhoz történő kapcsolásának módjától, a szubsztrát megkötésének módjától stb.-től függ.

A kimutatandó biomolekulák lehetnek oldatban, gélben vagy elválasztási lépések után szilárd hordozón, felteljárás után szilárd hordozóra átvitt formában gélen történt elválasztás után sík felületű hordozón stb. Az elválasztás, átvitel és a biomolekula hordozón történő rögzítése szakember számára ismert eljárás, ezért ezt itt nem ismertetjük.

Miután a biomolekulákat a kimutatandó formába hoztuk, a találmány értelmében a következő lépéseket végezzük:

a) Felismerési lépés, amelyben az aminoglükózid-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szonda a specifikus affinitással rendelkező biomolekulával kapcsolódik;

b) Mosási lépés, amelyben a főlegesen, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk vagy leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés, amelyben a molekuláris szondához kapcsolt aminoglükózid-foszfotranszferáz a szubsztráttal, egy koszubsztrát részvétele mellett reagál;

d) Leválasztási lépés, amelyben az átalakított koszubsztrátot és adott esetben a szubsztrátot kimossuk, illetve leválasztjuk;

e) Kiértékelési lépés, amelyben a foszforilezett szubsztrátot mérjük, vagy speciális kimutató módszerrel kimutatjuk.

A lépések mindegyikének az elvégzése meghatározott paraméterekhez kötődik, amelyek kombinálhatók, és így az eljárásváltozatok nagy számát teszik lehetővé. A változatokban minden lépés esetén különböző körülmények lehetségesek, így az egyes reakciókörülmények nem az általános, hanem egy meghatározott példát mutatnak be. (Lásd a későbbiekben leírt példákat.)

A foszforilezett szubsztrát kimutatása például szcintillációs számlálóval vagy autoradiográfiás úton történhet. Az autoradiográfia különösen a sík felületű hordozók esetén előnyös. Alkalmazhatunk azonban bármilyen kimutató eljárást is, így például letapogató vagy lumineszcenciás módszert.

A találmány szerinti eljárásban az előnyös kiviteli módban is az egyes lépések esetén különböző variá-

ciók lehetségesek. Ezen variációk némelyikét a következőkben ismertetjük.

### 1. Kiviteli változat

A biomolekulákat gélben vagy más leválasztó- és hordozóanyagban elválasztjuk.

a) Felismerési lépés: A biomolekulákat tartalmazó elválasztóanyagot egy olyan oldattal érintkeztetjük, amely az aminoglükózid-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szondát tartalmazza, úgy, hogy a biomolekula és a szonda egymásra rakódjon, így egy, a biomolekulából és az enzimezhez kapcsolt szondából a gélben egy komplex alakul ki;

b) Mosási lépés: A gélből kimossuk a főlegesen, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát;

c) Enzimreakció-lépés: A gél, amely a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt szondából álló komplexet tartalmazza, egy második géllal érintkeztetjük, amely a szubsztrátot és a koszubsztrátot tartalmazza, úgy, hogy ilyen körülmények között a szubsztrát foszforileződjön;

d) A második gélt, amely a foszforilezett szubsztrátot tartalmazza, egy szilárd III fázissal hozzuk érintkezésbe, amelyre a foszforilezett szubsztrát szelektíven megkötődik;

e) A főlegesen szubsztrát és/vagy koszubsztrát eltávolítására végzett mosási lépések után a foszforilezett szubsztrátot a szilárd III fázison a radioaktivitás mérésével vagy autoradiográfiával meghatározzuk.

Az I. kiviteli változat további változatában a c) enzimreakció-lépést úgy végezzük, hogy a gél, amely a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplexet tartalmazza, a koszubsztrát jelenlétében egy szilárd II fázissal érintkeztetjük, amelyhez a szubsztrát van kapcsolva, és a foszforilezett szubsztrátot a szilárd II fázison mutatjuk ki.

### 2. Kiviteli változat

Ebben a változatban a biomolekula, adott esetben több biomolekula elegye és az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda oldatban található.

a) Felismerési lépés: A molekuláris szonda, amelyhez egy aminoglükózid-foszfotranszferázt kapcsoltunk és a kimutatandó biomolekula oldatban található és az oldatban kapcsolódnak egymáshoz;

b) Mosási lépés: A főlegesen, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés: Az aminoglükózid-foszfotranszferázt, amely a molekuláris szondához van kapcsolva és ez a komplex a biomolekulához kapcsolódott, szubsztráttal és koszubsztráttal az oldatban átalakítjuk;

d) Leválasztási lépés: Az át nem alakított koszubsztrátot és adott esetben szubsztrátot leválasztjuk;

e) Kiértékelési lépés: A foszforilezett szubsztrát aktivitását mérjük.

### 3. Kiviteli változat

Ez a változat egy további lehetőséget jelent, amikor a biomolekula és a jelzett molekuláris szonda oldatban vannak jelen, azonban a kimutatást egy szilárd fázison kell végezni.

a) Felismerési lépés: A kimutatandó biomolekula és a molekuláris szonda, amelyhez egy aminoglükózid-foszfotranszferázt kapcsolunk, oldatban található, és ott egymással reagálnak;

b) Mosási lépés: A főlegesen, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés: Az aminoglükózid-foszfotranszferázt, amely a molekuláris szondához van kapcsolva, és ez a komplex a biomolekulához kapcsolódott, az oldatban a szubsztráttal és a kosubsztráttal reagáltatjuk;

d) Leválasztási lépés: A főlegesen kosubsztráttól a foszforilezett szubsztrátot úgy választjuk le, hogy egy, a szubsztrátot szelektíven kötő III hordozót alkalmazunk;

e) Kiértékelési lépés: A foszforilezett szubsztrát aktivitását mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

#### 4. Kiviteli változat

A találmány szerinti eljárás ezen változatában a biomolekula egy szilárd fázison, például sík felületű hordozón vagy egy polimer részecskékből álló diszperzió megkötve helyezkedik el, és a rákapcsolódott, enzimmel kapcsolt molekuláris szondával az oldatban található szubsztráttal és kosubsztráttal reagál.

a) Felismerési lépés: A szilárd I fázison megkötött biomolekulára az aminoglükózid-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szondát kapcsoljuk;

b) Mosási lépés: A főlegesen, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk vagy leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés: A szilárd I fázison megkötött, a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex az oldatban található szubsztráttal és kosubsztráttal reagál;

d) Leválasztási lépés: Az át nem alakított kosubsztrátot és adott esetben szubsztrátot leválasztjuk, és a foszforilezett szubsztrátot adott esetben egy szilárd III fázisra kötjük;

e) Kiértékelési lépés: A foszforilezett szubsztrát aktivitását az oldatban vagy adott esetben egy szilárd III fázison mérjük, vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

Ezt az eljárásváltozatot az enzimreakció-lépés változtatásával tovább variálhatjuk, és pedig úgy hajthatjuk végre, hogy a szilárd I fázist a megkötött biomolekulával és az erre kapcsolt, enzimmel kapcsolt molekuláris szondával egy másik géllal vonjuk be, ahol a gélben a szubsztrát és a kosubsztrát található, az enzimreakció elvégzése után a gélből a foszforilezett szubsztrátot egy szilárd III fázisra visszük át. A gélben tehát a szubsztrát és a kosubsztrát oldatban található, de mintegy „bezárt” állapotban.

#### 5. Kiviteli példa

Ez a változat egy újfajta szendvicseljárást jelent, amelyben mind a szonda, mind a szubsztrát egy szilárd fázison van megkötve, és az oldatban csak a kosubsztrát található. Ez az elrendezés különösen előnyös, mivel a két szilárd fázis megválasztásával a biomolekula molekuláris szondára történő kötése, a szubsztrát kötése, és az enzimreakció teljesen különböző reakciókörülmények között hajtható végre, a biomolekulából és

az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló megkötött komplexet tartalmazó szilárd fázis változatlanul megmarad, így többször felhasználható, vagy a szonda kimosható és adott esetben másikkra cserélhető, így a kimutatás többféle szondával végezhető.

a) Felismerési lépés: Egy szilárd I fázisra kötjük a biomolekulát, és erre egy aminoglükózid-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szondát kapcsolunk;

b) Mosási lépés: A főlegesen, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk és/vagy leválasztjuk;

c) Enzimreakció-lépés: A szilárd I fázison megkötött, a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex aminoglükózid-foszfotranszferázt egy szilárd II fázison kötött szubsztráttal, egy oldatban található kosubsztrát jelenlétében reagáltatjuk;

d) Leválasztási lépés: A főlegesen kosubsztrátot kimossuk vagy leválasztjuk;

e) Kiértékelési lépés: A szilárd II fázison található foszforilezett szubsztrát aktivitását mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

A találmány szerinti eljárás minden kiviteli változatánál lehetséges, hogy a felismerési lépésben a biomolekula és az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda reakcióját ne közvetlenül, hanem közvetlen lépéseken keresztül végezzük. A biomolekulát lehet először például egy avidinnel vagy streptavidinnel, illetve biotinnel kapcsolt szondával reagáltatni, majd ezt egy biotinnel, illetve avidinnel vagy streptavidinnel kapcsolt aminoglükózid-foszfotranszferázzal reagáltatni. Ez az elv mindaddig általánosítható, míg a felismerési lépésben a biomolekulát egy vagy több felismerési rendszerrel és egy vagy több reakciólépésben egy vagy több, specifikus aktivitással rendelkező molekula ismeri fel, vagy egy vagy több molekulával reagál, és az aminoglükózid-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szonda ezen molekulák közül legalább eggyel reagál. Így további felerősítést érhetünk el, sőt az eljárás egyszer vagy többször ismételtető.

Az is lehetséges továbbá, hogy a felismerési és mosási lépés után az enzimreakció-lépést úgy hajtsuk végre, hogy a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplexet a kapcsolási helynél az aminoglükózid-foszfotranszferázból és molekuláris szondából ismét lehasítsunk, azaz a kapcsolás olyan reagensekkel történik, amelyek vagy maguk hasíthatók, vagy a kapcsolás legalább az egyik reakciópartnerre nézve reverzibilis. Az enzim azután az oldatban vagy egy másik szilárd fázison megkötve a kosubsztrát jelenlétében az oldatban található, vagy egy szilárd fázison megkötött szubsztrátot foszforilezhet.

A találmány szerinti eljárás előnyös kiviteli formájában a biomolekulák, szondák és szubsztrátok megkötésére alkalmazott hordozó szintén különböző formában lehet jelen, így például por, granulátum, gél, gömb, szál, továbbá diszperzió, emulzió, latex, film, oszlop-töltet, mátrix, lap vagy általában sík felületű hordozó formájában. Az anyagok lehetnek természetes vagy mesterséges polimerek vagy ezek elegye. A kötés kovalens kötés formájában történik, ha a szilárd fázis

megfelelő vegyülettel, például klórciánnal vagy brómcíánnal aktiválva van. A kötés ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatás alapján is történhet.

Szilárd I fázisként ennek megfelelően olyan hordozóanyagok alkalmasak, amelyek mind a háromféle kötést lehetővé teszik. Elektrosztatikus, azaz hidrofób, dipol-dipol vagy van der Waals-erők alapján kötő szilárd fázisok, például többek között a nitrocellulóz és a polivinilidén-difluorid. Ionos erők alapján a kötő szilárd fázisok például a módosított, ionosan töltött poliamidok, különösen a nylonmembránok, ionos csoportokkal szubsztituált cellulózok, mint például a dietil-amino-etil-cellulóz és a szulfonált polisztirol. Kovalensen kötő szilárd fázisok például a diazo-benzil-oximetil-cellulóz, klórciánnal aktivált cellulóz, brómcíánnal aktivált cellulóz és az aktivált polisztirol vagy üveg. Alkalmazható továbbá a kémiaiilag aktivált üveg, amely ionos és/vagy kovalens kötést tesz lehetővé. A találmány szerinti eljárásban különösen előnyösen alkalmazhatók a fenti anyagokból készült sík felületű hordozók.

A szilárd II fázis mindenekelőtt egy negatív töltéssel rendelkező ionosan kötő hordozó vagy kovalensen kötő hordozó lehet. Negatívan töltött ionos hordozóként előnyös például a foszforcellulóz, karboxi-metil-cellulóz és a klórciánnal módosított cellulóz, amelyet ezután olyan vegyületekkel alakítanak át, amelyek legalább egy aminocsoportot és egy karbonsav-, foszforsav- vagy szulfonsavcsoportot tartalmaznak a molekulában, mint azt például a 237 844 számú NDK szabadalmi leírás ismerteti. Kovalensen kötő hordozóként ugyanazok az anyagok alkalmasak, mint amelyeket a szilárd I fázis esetén felsoroltunk. Különösen előnyös a találmány szerinti eljárásban, ha szilárd II fázisként sík felületű anyagot alkalmazunk.

A szelektív módon kötő szilárd III fázis egy negatívan töltött ionos hordozó. E célra szintén cellulózszármazékok vagy szulfonilezett polisztirol vagy karbonsavcsoportokat tartalmazó akriláttal bevont anyagok alkalmasak. Előnyös például a foszforcellulóz, karboxi-metil-cellulóz vagy a 237 847 számú NDK szabadalmi leírás szerinti cellulózszármazékok, amelyeket cellulózból állítunk elő úgy, hogy klórciánnal aktiválunk, majd olyan vegyülettel reagáltatunk, amely a molekulában legalább egy aminocsoportot és legalább egy karbonsav-, foszforsav- vagy szulfonsavcsoportot tartalmaz.

A szubsztrát szilárd fázisra történő kapcsolásának előnyös eljárását ismerteti a 254 012 számú NDK szabadalmi leírás. Az enzim molekuláris szondára történő kapcsolása különböző eljárásokkal történhet, amelyek az illető enzimek kapcsán le vannak írva. A szonda és az enzim kapcsolása például kovalens módon számos bifunkciós kapcsolóreagenssel történhet. Ilyen kapcsolóreagens például a glutáraldehid, benzokinon, biszszukcinimidil-észter, mint például bisz-szulfoszukcinimidil-suberát és diszszukcinimidil-tartarát, biszimidátok, mint például dimetil-suberimidát és dimetil-adipimidát, azidok, mint például N-5-azido-2-nitro-benzil-oxi-szukcinimid vagy 4,4'-ditio-bisz(fenil-azid). A

kapcsolómolekula két különböző csoportot tartalmazhat, vagy adott esetben a molekulában redukív vagy fotokémiai módon lehasítható csoportok lehetnek. Ilyen kapcsolóreagens például N-szukcinimidil-(4-azido-fenil)-1,3'-ditio-propionát vagy szulfoszukcinimidil-2-(m-azido-o-nitro-benzamido)-etil-1,3'-ditio-propionát.

Ezenkívül a szondát és az enzimet közvetlen kovalens kötéssel is kapcsolhatjuk egymáshoz. Ilyen kapcsolás történhet például kondenzálószerrek, mint például karbodiimidek jelenlétében.

Az enzim molekuláris szondára történő kötése történhet ionos kötéssel is. Ionos kötést kialakíthatunk például közvetlenül a proteín és a DNS között. Rend szerint azonban olyan reagenseket alkalmazunk, amelyek a kötést lehetővé teszik, így például alkalmazhatunk különböző mólmennyiségű polietilén-vinileket, polielektrolitokat vagy amfolitokat.

Mivel az enzimek hidrofóbok és hidrofilek lehetnek, az is lehetséges, hogy ezeket a molekuláris szondára elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kössük. Elektrosztatikus kölcsönhatás alatt a van der Waals-erőket, dipol-dipol kölcsönhatást és a hidrogénhid-kötéseket értjük.

Egy különleges eset az, amikor jelzett molekuláris szondaként fúziós proteint alkalmazunk, amely vagy természetes módon fordul elő vagy géntechnikai módszerrel állítottuk elő. Ilyenkor az enzim és a molekuláris szonda már egymással össze van kapcsolva.

A molekuláris szonda és az enzim kapcsolási helye hasítható (például enzimatikusan).

A találmány szerinti eljárás előnyös kiviteli formájában az aminoglukozid-foszfortranszferáz molekuláris szondára történő kapcsolása új módszer, és így az előállított, enzimmel jelzett molekuláris szondák is új termékek. A találmány értelmében az aminoglukozid-foszfortranszferázokat a molekuláris szondára közvetlenül vagy egy közbülső vegyületen keresztül kapcsoljuk.

Meglepő módon úgy találtuk, hogy az aminoglukozid-foszfortranszferázok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek ezeket biomolekulák kimutatására jelfelerősítés közben különösen alkalmassá teszik. Ezek a különleges tulajdonságok a következők:

- Magas termostabilitás: az enzimek még 100 °C-ra történő melegítéskor is megtartják aktivitásukat, a tárolási stabilitás követelményének megfelelnek, hosszú inkubációs időt biztosítanak akár a biomolekula és szonda felismerési reakciója alatt, akár az enzim és szubsztrát reakciója során;

- Detergenssekkel szemben stabilak: ezek az enzimek más enzimektől eltérően, szekunder struktúrájuknak detergenssek által okozott megváltoztatása ellenére enzimatikusan aktívak maradnak;

- Magas specifikus aktivitás: <sup>32</sup>P-ral jelzett foszfát egy szubsztrátra történő átvitelével radioaktívan jelzett szubsztrátok állíthatók elő;

- Könnyen hozzáférhetőek: az aminoglukozid-foszfortranszferázok mikroorganizmusok sejtlizátumából könnyen nyerhetőek.

Az aminoglukozid-foszfortranszferázok azon képessége, hogy az enzimek számára kedvezőtlen reakciókö-

rülmények között károsodás nélkül radioaktívan jelzett foszfátot tudnak átvinni, és hogy a szokásos hibridizációs körülmények között (azaz 48 óra hosszat 65 °C-on) képesek működni, világosan mutatja ezen enzimek különleges mivoltát, ami ezeket a kimutatási eljárásokban különösen alkalmassá teszi.

A találmány szerinti eljárással előállított, enzimmel kapcsolt molekuláris szondák segítségével olyan reakcióterméket állítunk elő, amely erősen radioaktív és így könnyen kimutatható. A kimutatás még a célmolekula olyan koncentrációjánál is sikerül, amely más kimutatási eljárásokban nem érzékelhető.

Aminoglükozid-foszfotranszferázokkal történő kapcsolásokhoz alkalmas molekuláris szondák például:

a) immunreaktív szondák, különösen monoklonális vagy poliklonális antitestek, antiszérumok, proteinek, különösen protein A peptidek (akár természetes, akár szintetikus vagy géntechnikai úton előállított peptidek);

b) nukleinsavak vagy ezek származéka vagy fragmense, különösen egyszálú DNS vagy fragmense, kettős szálú vagy részben kettős szálú DNS vagy fragmensei, oligodezoxinukleozidok, RNS vagy fragmensei vagy oligoribonukleotidok vagy géntechnológiai úton előállított hibridizációs szondák;

c) egy másik biomolekulára, például streptavidinre, avidinre, lektinre vagy bizonyos kapcsolható enzimekre nézve specifikus affinitást mutató proteinek;

d) egy biomolekulára, különösen biotinra, m-aminofenil-bórsavra vagy Cibacron Blue F3GA-ra nézve affinitást mutató kémiai vegyületek.

Az aminoglükozid-foszfotranszferázokat aminociklitol-foszfotranszferázokként is jelölik. Ide tartozik az ismert neomicin-foszfotranszferáz I és II (kanamicin-foszfotranszferáz I és II, lividomicin-foszfotranszferáz; lásd Nomenklatur M. J. Haas, J. E. Dowding, *Methods in Enzymology* (1975) 43, S. 611–617 és *Enzyme Nomenclature* 1984, Nomenclature Committee, International Union of Biochemistry, Academic Press, New York, 1984), streptomycin-foszfotranszferáz (rövidítés: NPT I, illetve NPT II; APH O-foszfotranszferáz jelöléssel, például APH 6; lásd K. L. Rinehardt idézett helyen. Az említett aminoglükozid-foszfotranszferázok közül a találmány szerinti enzimmel kapcsolt molekuláris szondában a neomicin-foszfotranszferáz I és II előnyös.

Az enzim izolálható genetikai úton manipulált gazdaszervezetekből vagy vad törzsekből ilyen eljárásokat ismertet, például B. Reiss, R. Sprengel, H. Will, H. Schaller, *Gene* (1984) *Chemother.* (1986) 18, Suppl. C, 93–102.

Az enzim molekuláris szondára történő kapcsolása számos módszerrel és reagenssel történhet. Így történhet például kémiai átalakítással, kovalens kötés kialakítása közben, például bifunkciós reagensekkel történő átalakítással vagy kondenzálószerkezet jelenlétében végzett kondenzálással. Egy másik kiviteli formában egy másik molekuláris szondából és jelzőenzimből álló vegyületet ionos kötéssel állítjuk elő, például polielektrolitok, amfolitok vagy olyan reagensek jelenlétében végzett reakcióval, amelyek mindkét molekulával ionos kötést képeznek. Egy további kiviteli formában a

molekuláris szondát és a jelzőenzimet elektrosztatikus kölcsönhatás kialakítása közben kapcsoljuk egymáshoz, például a két molekula valamelyikének módosításával vagy tenzidekkel végzett átalakítással. Egy további kiviteli formában természetesen előforduló, szintetikus vagy géntechnikai úton előállított, enzimből és proteinekből álló fúziós proteineket alkalmazunk enzimmel kapcsolt molekuláris szondaként.

Az enzim és a molekuláris szonda kapcsolásának jelenleg rendelkezésre álló lehetőségeinek a nagy számból egy előnyös eljárást és az így előállított terméket ismertettük, szakember számára azonban nyilvánvaló, hogy az itt ismertetetteken kívül más bifunkcionális molekula és más eljárás ugyanúgy alkalmazható, különösen géntechnikai eljárás vagy termék, és így szintén a találmány szerinti, enzimmel kapcsolt molekuláris szonda állítható elő. A találmány szerinti eljárás egyik előnyös kiviteli formája enzimmel kapcsolt molekuláris szondák előállítására az aminoglükozid-foszfotranszferáz és a molekuláris szonda kémiai vegyületeken keresztül kovalens módon történő kapcsolásával abban áll, hogy kapcsoló vegyületként 1 és 150 atom közötti hosszúságú vegyületet vagy vegyületláncot alkalmazunk, és ez a lánc egy vagy több gyűrűszerkezetet tartalmazhat.

A kapcsolással a szonda felismerőképessége a biomolekulára nézve, illetve az enzim működőképessége jelentése csökkenhet.

A találmány szerinti, enzimmel kapcsolt molekuláris szonda előállítása során a kovalens kötés történhet például glutáraldehid, p-benzokinonon, biszszukcinimidil-észteren, biszimidáton és/vagy azidon keresztül. Biszszukcinimidil-észterek, például bisz-2-(szukcinimido-oxi-karbonil-oxi)-etil-szulfon, bisz(szulfoszukcinimidil)-szuberát, diszszukcinimidil-szuberát, diszszukcinimidil-tartarát, ditio-bisz(szukcinimidil-propionát), 3,3'-ditio-bisz(szukcinimidil-szukcinát), etilén-glikol-bisz(szukcinimidil-szukcinát), etilén-glikol-bisz(szulfoszukcinimidil-szukcinát), bisz-2-szulfoszukcinimidil-oxi-karboxi-oxi-etil-szulfon és diszulfoszukcinimidil-tartarát. Biszimidátok például dimetil-adipimidát, dimetil-3,3'-ditio-bisz(propionimidát), dimetil-pimelinimidát, dimetil-szuberimidát stb., azidok, például N-5-azido-2-nitro-benzoil-oxi-szukcinimid, p-azido-fenacil-bromid, p-azido-fenil-glioxál, N-(4-azido-fenil-tio)ftálimid, 4,4'-ditio-bisz(fenil-azid), 4-azido-fenil-1,4-ditio-va-savimid-etil-észter, 4-fluor-3-nitro-fenil-azid, N-hidroxi-szukcinimidil-4-azido-benzoát, N-hidroxi-szukcinimidil-4-azido-szalicilsav, 4-azido-benzo-savimid-metil-észter, 2-diazo-3,3,3-trifluor-propionil-klorid, p-nitro-fenil-2-diazo-3,3,3-trifluor-propionát, N-szukcinimidil-6-(4'-azido-2'-nitro-fenil-amino-hexan oát). Ide tartoznak a találmány szerinti szondák előállításához alkalmazható olyan hasítható kapcsolóreagensek, amelyek a felismerési eljárásban ismét hasíthatók, és így az enzimreakció szabad, mozgékony enzimmel végezhető el, amely kinetikai előnyt jelent.

Ilyen hasítható kapcsolóreagensek például N-szukcinimidil-(4-azido-fenil)-1,3-ditio-propionát, szulfoszukcinimidil-2-(m-azido-o-nitro-benzamido)-etil-1,3'-ditio-

propionát, szulfoszukcinimidil-2-(p-azido-szalicil-amido)-etil-1,3'-ditio-propionát.

Az enzim és a molekuláris szonda közvetlen kapcsolása is lehetséges. Ezt például a két molekulakondenzáló szer, például karbodiimidek jelenlétében végzett kondenzálásával hajtuk végre.

A fúziós proteinek a molekuláris szonda és az enzim kovalens kapcsolásának egy speciális esete. Ezeket többnyire géntechnikai úton állítjuk elő, előállíthatók azonban szintetikus úton is, ilyenkor a szondaproteint és az enzimet peptidkötéssel kapcsoljuk egymáshoz.

A géntechnikai úton előállított fúziós proteinek esetén a szondaproteinre és az enzimre vonatkozó genetikai információ szomszédos, és általános leolvasási mintában egy genetikai vektorban helyezkedik el, azonban a szondát és az enzimet kódoló DNS-darab közé további aminosavszekvenciát (például proteáz hasítási helyet) kódoló DNS-fragmens iktatható be, vagy bizonyos DNS-fragmensek ismételt előfordulhatnak (például több szondamolekulából és/vagy enzimmolekulából álló fúziós proteinek előállítása esetén).

A vektorban található információt a gazdaszervezet, például baktérium, mint például E.coli egy aminosavszekvenciára fordítja le, és a fúziós protein mikrobiológiai úton nyerhető.

A találmány szerinti eljárás, illetve a találmány szerinti eljárással előállított, enzimmel kapcsolt molekuláris szondának egy másik előnyös kiviteli formája egy olyan vegyület, amely a szondát és a jelzett enzimet ionos csoportokon keresztül kapcsolva tartalmazza. Ilyen célra olyan vegyületek alkalmazhatók, amelyek mind az enzimet, mind a molekuláris szondát ionosan kötik, ilyen például a polietilénimin, polielektrolitok vagy amfolitok.

A találmány szerinti eljárás egy harmadik előnyös kiviteli formája szerint a molekuláris szondát és az enzimet elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kapcsoljuk. Az elektrosztatikus kölcsönhatásokhoz tartozik például a hidrofób-hidrofób, dipol-dipol kölcsönhatás van der Waals-erőkön és hidrogénhídon keresztül kapcsolódó kötések.

A találmány szerinti eljárás az aminoglükozid- foszofotranszferázal jelzett molekuláris szondák előállítására abban áll, hogy egy molekuláris szondára vagy molekuláris szondák elegyére egy aminoglükozid-foszofotranszferázt kapcsolunk. Szondaként alkalmazhatók a már említett immunreaktív szondák, nukleinsavak, proteinek vagy kémiai vegyületek. Aminoglükozid-foszofotranszferázként alkalmazhatók előnyösen például a neomicin-foszofotranszferáz I és II. A nomenklatura és az eljárás kivitelének további változataira a fent elmondottak érvényesek.

A találmány szerinti eljárás egyik kiviteli formája az enzimmel kapcsolt molekuláris szondák előállítására abban áll, hogy az aminoglükozid-foszofotranszferázt a molekuláris szondához egy direkt kovalens kötés létrehozásával vagy kapcsolóreagensekkel kovalens módon kapcsoljuk. Kapcsolóreagenseként a már említettek alkalmazhatók. A reakciókörülmények a szonda, az aminoglükozid-foszofotranszferáz és a kapcsolóreagens faj-

tjától függenek, azonban a kapcsolat végrehajtására leírt standard módszerek alkalmazhatók. A kapcsolási változat esetén azonban arra kell figyelni, hogy az előnyös kiviteli forma esetén egy 1-150 atomos lánc-, illetve adott esetben gyűrűrendszert tartalmazó közbülső csoportot alkalmazunk, amely az enzimmel kapcsolt molekuláris szondában lehetővé teszi, hogy lehetőleg nagyszámú szubsztrátmolekula legyen elérhető. A kötést előnyösen glutaraldehiddel, p-benzokinonnal, biszszukcinimidil-észterekkel, biszimidátokkal vagy azidokkal végezzük, amint ezt már korábban említettünk.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös kiviteli formája az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda előállítására abban áll, hogy a kapcsolást ionos kötések képzésével hozzuk létre. A kapcsolat ilyenkor például közvetlenül egy protein (enzim) és egy DNS, mint molekuláris szonda között alakulhat ki. Előnyösek azok a változatok, amelyeknél a kapcsolat egy vagy több kémiai vegyületen keresztül történik, amelyekkel mindkét reakciópartner ionos kötést tud alkotni. Ilyen vegyületek például a különböző móltómegeű polietiléniminek, polielektrolitok vagy amfolitok, továbbá az oligomer vagy polimer vegyületek, amelyek a molekulában töltést tartalmaznak.

A találmány szerinti eljárás egy harmadik kiviteli formájában az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda előállítására az enzim és a molekuláris szonda kapcsolásához elektrosztatikus kölcsönhatást használunk. Az ilyen elektrosztatikus kölcsönhatások lehetnek hidrofób-hidrofób vagy dipol-dipol, vagy van der Waals-erőkön, illetve hidrogénhidakon keresztül történő kötés.

A találmány szerinti eljárás egy negyedik kiviteli formája az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda előállítására abban áll, hogy genetikai vagy szintetikus úton fúziós proteineket állítunk elő, amelyekben a szonda és az enzim közvetlenül egymáshoz van kapcsolva. Vektorok és fúziós proteinek előállítására általános előírások találhatók T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. A következő példában egy hasonló előírást ismertetünk egy újfajta fúziós protein előállítására, amely neomicin-foszofotranszferáz II és protein A komponensekből áll, amely egy új eljárás.

A találmány szerinti eljárás biomolekulák kimutatására enzimmel kapcsolt molekuláris szondák segítségével a biomolekulák kimutatásának egy új elvét jelenti. Molekuláris szonda alkalmazása a rákapcsolt enzimmel és a szubsztrát szilárd fázison történő kimutatása nagyszámú kiviteli formát tesz lehetővé. Az eljárás számos biomolekula kapcsán alkalmazható, és így általánosan használható. Az alkalmazáskor legalább 10-szeres általában azonban ennél magasabb erősítési faktor érhető el. Az elérhető erősítés az alkalmazott anyagtól és a választott eljárási változattól függ, a speciális esetre azonban konkrétan megadható. A meghatározott változat szerinti eljárás során a különböző kiviteli formák következtében lehetőség van arra, hogy az alkalmazott biomolekulát több szondával mutassuk ki,

azaz a foltok újra felhasználhatók. A találmány szerinti eljárás alkalmazása nem korlátozódik a leírt eljárási változatra, hanem abból további változat alakítható ki. Biomolekulák aminoglikozid-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szondák segítségével, a találmány szerinti eljárás előnyös kiviteli formája szerint végzett kimutatásakor lehetséges, hogy biomolekulákat molekuláris szondával nagyobb érzékenységgel mutassunk ki, mint az eddig lehetséges volt.

A biomolekulák kimutatása történhet egy második elválasztott szilárd fázison is, így a biomolekula nem károsodik és újra felhasználható marad. Egy ilyen indirekt kimutató eljárásnak a genetikában, genetikai betegségek és vírusfertőzési termékek kimutatása esetén nagy jelentősége van, mivel a kimutatás több szondával végezhető, a biológiai molekulák terhelést jelentő inkubációkkal nem károsodnak, és végül magasabb erősítési faktor érhető el, mint ami mindeddig lehetséges volt.

A találmány szerinti eljárás előnyös kiviteli formájával előállított, enzimmel kapcsolt molekuláris szondák szokatlan tulajdonságokkal rendelkező új termékek, és különösen biomolekulák kimutatási eljárásában alkalmazhatók.

Az előnyösen alkalmazott enzimek, az aminoglikozid-foszfotranszferázok jó stabilitást mutatnak minden kimutatási lépésben, azaz a találmány szerinti jelzett molekuláris szondák hibridizációs eljárásokban, 65 °C hőmérsékleten is alkalmazhatók. Ezen szondák alkalmazásával az autoradiográfiás kimutatásban igen magas erősítési faktor érhető el. Ilyen erősítés az enzimmel kapcsolt szondák esetén eddig nem volt elérhető.

Így például a proteinkimutatás 10 pg mennyiségű anyagból lehetséges.

Proteinek kimutatása az eddigi módszerekkel, például autoradiográfiásan <sup>125</sup>J-protein A-val 10 ng körüli mennyiség esetén -70 °C-on 1-3 napig tartott. A találmány szerinti eljárással az említett esetben az autoradiográfia ideje 30 perctől 1 óráig terjed szobahőmérsékleten és erős jelet ad.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal szemléltetjük közelebbről.

#### *Alkalmazott pufferoldatok:*

PRS: 8 g NaCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 12 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KCl vízben oldva és 1 literre feltöltve, pH=7,4.

TBS: 0,15 M NaCl, 50 mmól Trisz(hidroximetil)-amino-metán (Trisz), pH=7,4.

GET: 2,5 mmól Trisz/HCl, pH=8,0, 5 mmól glükóz, 1 mmól etilén-diamin-tetraecetsav, tetranátriumsó (EDTA). Lizáló puffer: 125 mmól Trisz/HCl, pH=6,8, 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 20% glicerin, 10% β-merkaptó-etanol.

Elúciós puffer: 20 mmól Trisz/HCl, pH=7,4, 10 mmól ditiotritol, 0,1% SDS.

Oldópuffer: 100 ml 20 mmól Trisz/HCl-ban, pH=8,8, feloldunk 48 g karbamidot és hozzáadunk 1% Nonidet NP 40-et és 10% merkaptó-etanolt.

Enzim-puffer: 20 mmól Trisz/HCl, pH=7,2, 125 mmól NH<sub>4</sub>Cl, 20 mmól MgCl<sub>2</sub>, 10 mmól ditiotritol.

#### *1. példa*

##### *Poliklonális antitest kapcsolása kanamicin-foszfotranszferázzal*

- 1 ml anti-humán-szérumalbumin-antiszérumot (nyúl) 5 0,9 tömeg% nátrium-klorid jelenlétében 1 óra hosszat, szobahőmérsékleten 10 mg benzokinon 0,3 ml etanollal készült oldatával reagáltatunk. A benzokinon fölöslegét ezután egy Sephadex G25 oszlop segítségével leválasztjuk, és a benzokinon-antitest-komplexet frakcionáljuk. 10 Az egyes frakciókat immunesztrel szérumalbuminnal (HSA) vizsgáljuk. A keresett frakciót egy éjszakán át, szobahőmérsékleten sötétben 1 mg kanamicin-foszfotranszferáz 1 ml 1 mól/l-es bikarbonátpufferrel készült oldatával (pH=9) reagáltatjuk. A reakcióterméket 15 egy éjszakán át 0,9%-os nátrium-klorid-oldattal szemben dializáljuk, és így alkalmazzuk. A dialízis után alikvotokra oszthatjuk fel, és -20 °C-on tárolhatjuk, vagy az antitest-benzokinon-kanamicin-foszfotranszferáz terméket közvetlenül immunológiai reakcióban alkalmazhatjuk.

#### *2. példa*

##### *HSA immunológiai kimutatása kanamicin-foszfotranszferázzal kapcsolt antitest segítségével, az átalakított szubsztrát III szilárd fázison történő kimutatásával*

- Különböző jelzőfehérjék és HSA elegyét poliakrilamidgél (PAA-gél) elektroforetikusan megosztjuk, és nitrocellulózszűrőre visszük át (Blot). Ezeket a foltokat az 1. példa szerinti módon előállított kanamicin-foszfotranszferázzal kapcsolt antitesttel TBS-ben (Trisz(hidroximetil)-amino-metánnal pufferolt 0,9%-os konyhasóoldat) és 1% zselatinban 4 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk (1:500 arányú hígítás). Ezután a foltot a ráakódott, enzimmel kapcsolt antitesttel 4•15 35 percig TBS-sel mossuk, és 30 percig 37 °C-on reakciópufferben előállított 1%-os agarózzal inkubáljuk, amely a következő anyagokat tartalmazza: 20 mmól/l Trisz-HCl, pH=7,2, 125 mmól/l NH<sub>4</sub>Cl, 1 mmól/l ditiotritol, 20 mmól/l MgCl<sub>2</sub>, 2 mmól/l adenzin-trifoszfát 40 (ATP), amely 1 μCi γ-<sup>32</sup>P-ATP/ml és 20 ng/ml kanamicint tartalmaz. Az agarózzal ezután foszforcellulóz sík felületű hordozóra helyezük, és a kanamicint a foszforcellulózra átvisszük (cellulózalap, 0,5 kg tömeg/3 óra/szobahőmérséklet). A <sup>32</sup>P-ral jelzett kanamicin kimutatását a foszforcellulóz sík felületű hordozó autoradiográfiás mérésével végezzük (2 óra, szobahőmérséklet).

#### *3. példa*

##### *HSA immunológiai kimutatása kanamicin-foszfotranszferázzal jelzett antitest segítségével egy szilárd II fázison*

- A humán szérumot 1,5%-os agarózzal elektroforetikusan felosztjuk. A gélt szobahőmérsékleten 1 óra hosszat kanamicin-foszfotranszferázzal kapcsolt antitesttel 2% szarvasmarhaszérum-albumin (RSA) tartalmazó TBS-sel inkubáljuk (1:500 arányú hígítás), majd 1 óra hosszat TBS-sel mossuk.

- A gélt ezután fél óra hosszat a 2. példa szerinti reakciópufferben inkubáljuk, amely a következő anyagokat tar-

talmazza: 20 mmól/l Trisz-HCl, pH=7,2, 125 mmól/l NH<sub>4</sub>Cl, 1 mmól/l ditioeritrol, 20 mmól/l MgCl<sub>2</sub> és 2 mmól/l ATP, amely 1 μCi <sup>32</sup>P-γ-ATP-t tartalmaz. Ezután érintkezésbe hozzuk egy, a 296 754-2 számú NDK szabadalmi bejelentés szerinti módon előállított hordozóval, amely cianur- kloriddal, majd szulfonilsavval átalakított cellulózból áll, és amelyhez ionosan kanamicin van kapcsolva, majd 30 percig 37 °C-on állni hagyjuk. A II hordozót 30 percig vízzel mossuk, majd a szubsztráttal és a foszforilezett szubsztráttal reagáltatjuk, ezután 1 óra hosszat szobahőmérsékleten autoradiografáljuk, és így a <sup>32</sup>P-ral jelzett kanamicint a II hordozón kimutatjuk, miáltal a HISA jelenlétét az elválasztógélen igazoljuk.

#### 4. példa

*Protein A kapcsolása neomicin-foszfotranszferáz II-vel glutaraldehyd segítségével*

a) NPT II elektroforetikus tisztítása *E.coli* lizátumból

NPT II-t nagy mennyiségben elválasztó *E.coli* sejtenyészet (pRK 89) sejttömegének 10 ml-ét 1 ml lizáló pufferrel felvesszük, 1 percig ultrahanggal kezeljük, 3 percig főzzük, majd újra kezeljük ultrahanggal. A sejtmadarékokat 5 percig 4 °C-on centrifugáljuk. A sejtlizátumot preparatív poliakrilamid-SDS-gélre felvisszük, és elektroforetikus elválasztjuk.

A gél tét jéghideg vízzel leöblítjük és 0,25 mól/l-es kálium-klorid hideg oldatába állítjuk, míg a proteincsíkok sötét alsó alap fölött jól fel nem ismerhetők. Az NPT II csíkokat szikével kivágjuk, és a gél felaprítjuk. A protein eluálására a gél eluálót pufferrel befedjük, és 3 óra hosszat szobahőmérsékleten rázatjuk. A puffer kicserélése után egy éjszakán át tovább eluáljuk.

A kapott oldatokat 6000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, a maradékot négyszeres térfogatú acetonnal felvesszük, és 2-3 óra hosszat -20 °C-on állni hagyjuk. Ezután 0 °C-on 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk.

A csapadékot 1 rész 20 mmól/l-es Trisz-HCl-ből (pH=7,4) és 4 rész acetontól álló oldattal hidegen mossuk, és újra centrifugáljuk. A csapadékot 200 μl oldópufferrel oldjuk, majd 20 mmól/l-es nátrium-foszfát-pufferrel szemben (pH=7) egy éjszakán át dializáljuk (500 ml, kétszer cserélve 4 °C). A végső térfogat körülbelül 200 μl, és körülbelül 200 μg NPT II-t, csekély *E.coli* proteinmaradékot tartalmaz.

#### b) Kapcsolás glutaraldehyddel

400 μg (Pharmacia AB) és 400 μg az a) lépés szerint tisztított NPT II-t együttesen egy 1,5 ml térfogatú dializálócsőben PBS-sel szemben dializálunk (16 óra, 4 °C, 800 ml, kétszer cserélve). Ezután a dializált oldatot egy üvegcsőbe töltjük át, és hozzáadunk 6 μl glutaraldehydet (25%-os oldat, Serva gyártmány), és 2 óra hosszat szobahőmérsékleten enyhe rázás közben reagáltatjuk. Ezután a terméket visszatöltjük a dializálócsőbe, és PBS-sel (4 óra, 4 °C), majd 16 óra hosszat TBS-sel szemben (4 °C, 800 ml, kétszer cserélve) dializáljuk. A dialízis után a reakcióterméket egy üvegcsőbe áttöltjük, és 4 °C-on tároljuk. Kontrollelektroforézissel (10%

SDS-poliakrilamidgél) kivett 20 μl-es próbákat a kapcsolás előtt és utána elválasztunk és analizálunk (254 029 számú NDK szabadalmi leírás szerinti szilárd fázisú NPT II teszt). A vizsgálatok azt mutatják, hogy az NPT II és a protein A teljes mennyisége nagymolekulájú terméké térhálósodott. Az enzimaktivitás a kapcsolás után szinte teljes mértékben megmarad. Ha a kapcsolás nem megy végbe teljesen, a glutaraldehydes térhálósítást megismételhetjük, illetve az át nem alakított protein A egy Sephadex G50 oszloppal elválasztható.

Az előállított termék antitesttel jelzett biomolekulák kimutatására alkalmazható.

#### 5. példa

15 *Neomicin-foszfotranszferáz II kapcsolása anti-burgonyavírus-immunglobulinhoz glutaraldehyd segítségével*

400 μg, a 4. a) példa szerint előállított és tisztított NPT II-t 1 mg anti-burgonyavírus-immunglobulinnal együtt egy 1 ml-es dializálócsőben PBS-sel szemben (800 ml, kétszer cserélve) 16 óra hosszat 4 °C-on dializálunk. A dializált próbát áttöltjük egy üvegcsőbe, és hozzáadunk 5 μl glutaraldehydet (25%-os oldat, Serva), és 2 óra hosszat enyhe rázás közben szobahőmérsékleten reagáltatjuk. Ezután az elegyet visszatöltjük a dializálócsőbe, és PBS-sel szemben 4 °C-on 1 óra hosszat, majd TBS-sel szemben (800 ml, kétszer cserélve) 4 °C-on 16 óra hosszat dializáljuk. Ezután a reakcióterméket egy üvegcsőbe áttöltjük, és 4 °C-on tároljuk. Egy napi érés után a kapcsolási termék, a glutaraldehyddel kapcsolt NPT II-vel jelzett antitest a burgonyavírusnak növényi nedvekből pikogramm nagyságrendben történő immunológiai kimutatására alkalmazható.

#### 6. példa

*Protein A-NPT II fúziós vektor előállítás, kifejezése és a fúziós protein kinyerése*

A pRIT 2 protein A-fúziós protein vektor [B. Nilson, L. Abrahmsen, N. Uhlen, EMBO Journal 4 (4), (1985) 1 075-1 080] multiklónozó helyére klasszikus klónozó módszerrel (BamHI, EcoRI hasítás, T4-ligálás), nyitott leolvadókeretbe beépítjük az *E.coli*-ből származó NPT II gént (Tn5) [S. Brenner, Nature 329, (1987), 21]. Az *E.coli* (NF1) transzformálása és a megfelelő klónok ampicillin-rezisztencia alapján történő kiválasztása szokásos módszerrel történik [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor-Laboratory (1982)].

A protein A-NPT II fúziós proteinklónok tenyésztését NB1 folyékony tápközegben (Immunpraeparate Berlin, NDK) végezzük, egy éjszakai előtenyésztés után, 6 óra hosszat 30 °C-on. A hőmérséklet 42 °C-ra történő emelése után a fúziós protein kifejeződik (Pr promotor a lambda-fágból). Két óra múlva a sejteket centrifugáljuk, GET-pufferrel egyszer mossuk, GET-pufferben szuszpendáljuk, és 10<sup>10</sup> sejtet tartalmazó adagokban Eppendorf-csővekben újra centrifugáljuk. A sejteket adagokban -20 °C-on tároljuk, így a fúziós protein kinyeréséhez rendelkezésre állnak. A fúziós

protein kinyeréséhez az Eppendorf- csőben való  $10^{10}$  sejtet 1 ml 20 mmól/l Trisz-HCl-pufferrel (pH=6,8) 0 °C-on újra szuszpendáljuk, és ötször rövid ideig ultrahangos kezelésnek vetjük alá. Jégben történt lehűtés után háromszor újra rövid ideig ultrahanggal kezeljük. A sejtmarradékokat 4 °C-on 5 percig centrifugáljuk. A felülúszót óvatosan lepipettázzuk, és egy másik Eppendorf-csőbe átvisszük. A sejtlizátumot ilyen formában alkalmazzuk kimutatási reakcióhoz, vagy -20 °C-on tároljuk.

#### 7. példa

##### *Géntechnikailag előállított protein A-NPT II-fúziós protein térhálósítása glutáraldehiddel*

A 6. példa szerinti módon sejtlizátumot állítunk elő. Ebből a lizátumból 50 µl-t a kontrollelektroforézishez egy Eppendorf-csőbe átpipettázzunk. A lizátumot egy dializálócsőbe töltjük, és PBS-sel szemben dializáljuk (4 °C, 16 óra, 800 ml kétszer cserélve). Ezután a dializátumot áttöltjük egy üvegcsőbe, és ehhez 3 µl glutáraldehidet (25%-os oldat, Serva) adunk, és 2 óra hosszat szobahőmérsékleten, enyhe rázás közben inkubáljuk. ezután a reakcióelegyet visszatöltjük a dializálócsőbe, és először 3 óra hosszat 4 °C-on PBS-sel szemben, majd egy éjszakán át TBS-sel szemben (4 °C, 800 ml, kétszer cserélve) dializáljuk. A dializált elegyet a dializálócsőből egy üvegcsőbe töltjük, és 4 °C-on tároljuk. 50 µl-t a kontrollelektroforézishez kiveszünk.

A kivett mintákat egy 10% SDS/poliakrilamidgélén megosztjuk, és szilárd fázison NPT II teszttel  $^{32}$ P-γ-ATP és kanamicin segítségével vizsgáljuk. A vizsgálat azt mutatja, hogy a kapcsolás során a protein A-NPT II-fúziós protein (móltömeg kb. 60 000 kD) teljes egészében nagymolekulájú terméké térhálósodott. A kapcsolási termék enzimaktivitása teljes egészében megmaradt. A kapott termék azonnal alkalmazható antitesttel jelzett antigének kimutatására.

#### 8. példa

##### *Géntechnikai úton előállított protein A-NPT II-fúziós protein kapcsolása további NPT II molekulákkal glutáraldehid segítségével*

A 6. példa szerinti módon sejtlizátumot állítunk elő, és ehhez hozzáadunk 100 µg, a 4. példa szerinti módon előállított és elektroforézissel tisztított NPT II-t. Az elegyet 16 óra hosszat PBS-sel szemben dializáljuk (1,5 ml-es dializálócső, 800 ml, kétszer cserélve, 4 °C). A dializált elegyet egy üvegcsőben 3 µl glutáraldehiddel (25%-os oldat, Serva) rázás közben 2 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk. A kapcsolás végbemenetelét elektroforézissel és szilárd fázisú NPT II teszttel ellenőrizzük.

A kapcsolás után az elegyet először PBS-sel, majd TBS-sel szemben dializáljuk (mindkét esetben 4 °C, 800 ml, kétszer cserélve). A dializált kapcsolási terméket 4 °C-on tároljuk. A termék antitesttel jelzett antigének kimutatására alkalmazható.

#### 9. példa

##### *Streptavidin és NPT II kapcsolása glutáraldehid segítségével*

100 µg Streptavidint és 400 µg, a 4. példa szerinti módon előállított NPT II-t a 8. példa szerinti módon PBS-sel szemben dializáljuk (1 ml csőtérfogat), majd hozzáadunk 5 µl glutáraldehidet (25%-os oldat, Serva), és 1 óra hosszat szobahőmérsékleten enyhe rázás közben reagáltatjuk. A reakcióelegyet először PBS-sel, majd TBS-sel szemben dializáljuk (mindkét esetben 4 °C, 4 óra, 800 ml, kétszer cserélve). A dializált terméket 4 °C-on tároljuk. A kapcsolás végbemenetelét elektroforézissel és szilárd fázisú NPT II teszttel ellenőrizzük.

15 A kapcsolási termék biotinnal jelzett biomolekulák (például biotinezett DNS) kimutatására alkalmazható.

#### 10. példa

##### *NPT II és protein A kapcsolása egy toluol-diizocianát-prepolimer segítségével a) Kapcsolóreagens előállítása*

17,4 g frissen desztillált toluilén-diizocianát-2,4-et nitrogénatmoszférában 50 °C-ra melegítünk. Keverés közben, 50–55 °C-on lassan (kb. 30 perc alatt) hozzácsepegtetünk 30 g polietilén-glikol 600-at (ioncserélőn tisztítva és 3 óra hosszat 80 °C-on 13,3 Pa nyomáson víztelenítve) és 0,05 g cianur-kloridot. Az adagolás befejezése után az elegyet még 4 óra hosszat 60 °C-on keverjük. Ezután 50 °C-on 13,3 Pa nyomáson gáztalanítjuk (izocianát-ekvivalens: 453).

100 mg kapott prepolimert feloldunk 500 mg acetóban. Az oldódás befejezése után ebből az oldatból 0,3 ml-t erős keverés közben 700 ml vízbe permetezünk. Az így kapott emulziót azonnal használhatjuk.

##### *b) Kapcsolás*

800 µl, a 4. példa szerinti módon kapott lizátumot 100 µg NPT II-vel egy Eppendorf-csőben összekeverünk 150 µg protein A-val és 15 µl vízzel. Ehhez az oldathoz hozzáadunk 200 µl fenti kapcsolóreagenst, és 1 óra hosszat enyhén rázzuk. Az elegyet 15 percenként jól összekeverjük. 1 óra reakcióidő után újabb 100 µl frissen előállított kapcsolóreagenst adunk hozzá, és további 1 óra hosszat reagáltatjuk. Ezután a reakció leállítására az elegyhez hozzáadunk 150 µl lizinoldatot (200 µg), és 30 percig szobahőmérsékleten rázatjuk. A kapcsolás végbemenetelét elektroforézissel és szilárd fázisú NPT II teszttel vizsgáljuk. A nagymolekulájú kapcsolási termék teljes enzimaktivitást mutat.

50 A termék antitesttel kapcsolt biomolekulák kimutatására alkalmazható.

#### 11. példa

##### *Protein A-NPT II-fúziós protein biológiai térhálósítása*

50 µl, a 6. példa szerinti módon előállított, protein A-NPT II-fúziós proteint tartalmazó sejtlizátumot 5 µl nyúl-antiegér-antiszérummal keverjük, és 4 °C-on egy éjszakán át inkubáljuk. A protein A-NPT II-fúziós proteínból és a nyúl-antiegér-antitestből képződött komp-

lexet második antitestként egy, az első antitesttel (egér) végzett végzett antigénkimutatáshoz alkalmazhatjuk. Így enzimátikus kimutatást (NPT II) végzünk.

#### 12. példa

##### *Lektin kapcsolása glutáraldehiddel neomicin-foszfoztransferáz II- höz*

200 µg Phaseolus vulgaris lektint 400 µg, a 4. példa szerinti módon előállított, tisztított NPT II-vel együtt PBS-sel szemben dializálunk (1 ml csőtér fogat, 4 °C, 800 ml kétszer cserélve, éjszakán át). A dializálócső tartalmát egy gázcsőbe töltjük, és hozzáadunk 5 µl glutáraldehidet (25%-os oldat, Serva), és egy óra hosszat szobahőmérsékleten, enyhe rázás közben reagáltatjuk. A reakcióelegyet ismét PBS-sel szemben, majd TBS-sel szemben dializáljuk (mindkét esetben 4 °C, 4 óra, 800 ml, kétszer cserélve). A dializált reakcióterméket 4 °C-on tároljuk. A kapcsolás teljességét és az enzimaktivitást elektroforézissel és szilárd fázisú NPT II teszttel vizsgáljuk. A kapcsolási termék megfelelő szénhidrátok glikoproteineken történő kimutatására alkalmazható.

#### 13. példa

##### *Humán szérumalbumin immunológiai kimutatása proteinfoltt alapján nitrocellulózon, proteinmentes blokkoló körülmények között (protein A-NPT II- füziós protein alkalmazásával)*

Humán szérumalbumint (HSA) tartalmazó proteinek-ből készült, nanogramm-pikogramm nagyságrendű sorozathígítást SDS-PAA-gélen elektroforézissel megosztunk, és elektrotranszfer segítségével nitrocellulóz-membránra visszük át. Ezután a nitrocellulóz-membránt (Blot) 30 percig levegőn szárítjuk, majd 1 térfogat% Tween 20-at tartalmazó TBS-ben egy óra hosszat 37 °C-on blokkoljuk. A további blokkolást 0,2 térfogat% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel 30 percig végezzük (I blokkolás).

Anti-HSA-immunglobulin-antiszérummal (nyúl) végzett inkubálást 1:200 arányú hígításban egy óra hosszat szobahőmérsékleten végzünk. Ezután 0,1 térfogat% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel egy óra hosszat szobahőmérsékleten mossuk (hatszor cserélve). Újabb 0,2 térfogat% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel végzett blokkolás után (30 perc, szobahőmérséklet) (II blokkolás) hozzáadunk 50 µl, a 6. példa szerinti módon előállított, protein A-ból és NPT II-ből álló füziós proteint tartalmazó lizátumot, és szobahőmérsékleten enyhe rázás közben inkubáljuk. Ezután a nitrocellulóz-membránt (Hybond C, Amersham International) egy óra hosszat TBS-sel mossuk (hatszor cserélve).

Egy, a 254 012 számú NDK szabadalmi leírás szerinti cianur-kloriddal aktivált cellulózt és szulfonilsavval előállított és kanamicinnel töltött hordozót egy üveglapra helyezünk, és egy enzimpufferrel árasztjuk el, amely a <sup>32</sup>P-γ-ATP-t 2 millió beütés/perc/ml koncentrációban tartalmazza (specifikus aktivitás 150 TBq/mmol). A fenti módon a nitrocellulózon kapott foltokat az elektrotranszfernél géloldallal a nedves, kanamicint tartalmazó hordozóra helyezjük. Ezután a nitrocellulóz-membránt

még egyszer átítatjuk a <sup>32</sup>P-γ-ATP-t tartalmazó enzimpufferrel, és végül lefedjük egy ugyanolyan méretű üveglappal. A rendszert minden oldaláról egy polietilénfóliával lezárjuk, és egy óra hosszat 37 °C-on inkubáljuk, ezalatt az üveglapokat egy súllyal enyhén összenyomjuk. Az inkubáció után a rendszerből a kanamicint tartalmazó hordozót eltávolítjuk, és egy óra hosszat kétszer desztillált vízzel mossuk. A nitrocellulóz-membránt azonnal egy újabb kanamicint tartalmazó hordozóra helyezjük, és <sup>32</sup>P-γ-ATP-t tartalmazó enzimpufferrel átívedvesítjük, és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáljuk. Ezután kétszer desztillált vízzel mossuk. A kiértékelést az érintkeztetésben alkalmazott, kanamicint tartalmazó hordozó autoradiográfiájával végezzük. A nitrocellulóz-membránt kétszer desztillált vízzel történő mosás után (<sup>32</sup>P-γ-ATP-től mentes) kontrollképpen együtt autoradiografáljuk.

Az érintkeztetésben alkalmazott hordozó autoradiogramja alapján a HSA-csíkok helyzete pikogramm nagyságrendig fekete csíkok formájában mutatkozik a radiográfián (expozíció 30 perc, szobahőmérsékleten, röntgenfilm HS 11, VEB ORWO Wolfen).

Mivel proteinmentes blokkoló körülményeket alkalmaztunk, a nitrocellulóz-membránon a protein Ponceau S segítségével színreakcióval kimutatható (színezés: 2 perc, színtelenítés vízzel 5 percig). A kiértékeléshez az érintkeztetéshez alkalmazott hordozó autoradiogramját a színezett nitrocellulózfoltoakra helyezjük, így a csíkok pontosan hozzárendelhetők.

#### 14. példa

##### *HSA immunológiai kimutatása nitrocellulózon proteinblokkoló körülmények között végzett proteinfoltt megosztása után*

A 13. példa szerinti módon járunk el, azzal a különbséggel, hogy az I blokkolást 0,5 tömeg% zselatint tartalmazó TBS-sel (1 óra) és 0,25 tömeg% zselatint tartalmazó TBS-sel (30 perc), valamint a második blokkolást 0,25 tömeg% zselatint tartalmazó TBS-sel (30 perc) végezzük.

A kiértékelést a 13. példa szerinti módon, az érintkeztetésben alkalmazott hordozó autoradiográfiájával végezzük.

#### 15. példa

##### *α-Fetoprotein immunológiai kimutatása folttesztben nitrocellulózon*

α-Fetoprotein (AFP) hígítási sorát nitrocellulóz membráncsíkokra (Hybond C, Amersham Int.) csepegtetjük, és szobahőmérsékleten 30 percig szárítjuk. Az I blokkolást TBS-sel és 1% Tween 20-szal 1 óra hosszat 37 °C-on, majd 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel 30 percig szobahőmérsékleten végezzük. Ezután HSA elleni monoklonális antitesttel (egér, 1:1000 arányú hígítás) inkubáljuk, majd 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel mossuk, utána 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel blokkoljuk, ezután egy második antitesttel (nyúl-antiegér) 1 óra hosszat inkubáljuk (1:500 arányú hígítás). 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel 1 óra hosszat szobahőmérsékleten végzett mosás után újra 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel blokkoljuk.

Ezután hozzáadunk 35 µl, a 6. példa szerinti módon előállított, protein A-NPT II-fúziós proteint tartalmazó E.coli lizátumot, és 1 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk. TBS-sel végzett mosás után (1 óra, szobahőmérséklet) a nitrocellulóz- membránt a kanamicinnel töltött hordozóval (254 012 számú NDK szabadalmi leírás szerint előállítva) érintkezésbe hozzuk, és a kimutatást a 13. példa szerinti módon elvégezzük. A kimutatási határ a pikogramm nagyságrendben van.

#### 16. példa

*Burgonyavírus kimutatása NPT II-vel kapcsolt antitest segítségével a növényi nedvek nitrocellulózra történő cseppentése után (kimutatás a 254 029 számú NDK szabadalmi leírás szerinti hordozón)*

*a) Neomicin-foszfotranszferáz II kapcsolása anti-burgonyavírus-monoglobulinhoz glutáraldehid segítségével*

400 µg, a 4. a) példa szerint előállított és tisztított NPT II-t és 1 mg anti-burgonyavírus-immunoglobulint egy dializálócsőbe TBS-sel szemben együtt dializálunk (dializálócső térfogata 1 ml, 16 óra, 4 °C, 800 ml kétszer cserélve). A dializált próbát ezután egy üvegcsőbe töltjük át, és hozzáadunk 3 µl glutáraldehidet (25%-os oldat, Serva), és két óra hosszat enyhe rázás közben szobahőmérsékleten reagáltatjuk. Ezután a kapcsolási elegyet a dializálócsőbe visszatöltjük, és először PBS-sel szemben (4 °C, éjszakán át), majd TBS-sel szemben (4 °C, 800 ml kétszer cserélve, 16 óra hosszat) dializáljuk. A reakcióterméket üvegcsőbe töltjük át.

#### b) Kimutatás

Burgonyalevélből készült kiperéselt nedv hígítási sorát nitrocellulóz-membránra cseppentjük, és 30 percig szárítjuk. Ezután a membránt 1 óra hosszat 37 °C-on 1% Tween 20-at tartalmazó TBS-ben, majd 30 percig szobahőmérsékleten 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-ben blokkoljuk. Ezután a fenti kapcsolási terméket 1:200 arányú hígításban hozzáadjuk, és 1 óra hosszat inkubáljuk. TBS-sel végzett mosás után a radioaktív kimutatást a kanamicinnel töltött hordozórételen a 13. példa szerinti kontakteljárással végezzük. A kimutatási határ a pikogramm nagyságrendben van.

#### 17. példa

*Burgonyavírus kimutatása protein A-NPT II-fúziós proteinnel a növényi nedvek nitrocellulózra történő cseppentéséből (kontakteljárás P 81)*

Burgonyalevél kiperéselt nedvéből hígítási sort készítenk a 16. példa szerinti módon. A blokkolás után azonban 1 óra hosszat anti-burgonyavírus-immunoglobulinnal (nyúl) (1:1000 arányú hígítás) inkubáljuk. 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel végzett mosás után újra 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel blokkoljuk, majd 50 µl, a 6. példa szerinti módon előállított lizátumot adunk hozzá, és 1 óra hosszat inkubáljuk. TBS-sel végzett mosás után a 13. b) példa szerinti kontakteljárással végezzük a kimutatást.

Kanamicinnel töltött hordozóként foszforcellulózt (P 81, Whatman, Nagy-Britannia) alkalmazunk. Az enzimpufferben 10 millió beütés/perc/ml specifikus aktivitású <sup>32</sup>P-γ-ATP-t alkalmazunk.

5 A kiértékelést a foszforcellulóz-hordozók vízzel végzett mosása után (1 óra) autoradiográfiásan végezzük. Az érzékenység szintén a pikogramm nagyságrendben van.

#### 18. példa

10 *HSA immunológiai kimutatása protein A-NPT II-fúziós protein segítségével nylonmembránra történő cseppentés után (kontakteljárás: kanamicinnel töltött foszforcellulóz)*

HSA hígítási sorát nylon membráncsík (Hybond N, Amersham, Int.) cseppentjük, és 30 percig száradni hagyjuk. Az I blokkolást 2 óra hosszat 3% szarvasmarhaszérum-albumint (RSA) tartalmazó TBS-ben, majd 30 percig 1% RSA-t tartalmazó TBS-ben végezzük. A II blokkolást 1% RSA-t tartalmazó TBS-ben végezzük. 20 Az eljárást a 13. példa szerinti módon végezzük. A kiértékelést a foszforcellulóz (P 81) hordozó autoradiográfiájával végezzük.

#### 19. példa

25 *HSA immunológiai kimutatása proteinfolt-eljárással nitrocellulóz- membránon proteinmentes blokkoló körülmények között*

Az eljárást a 13. példa szerinti módon végezzük, kanamicinnel töltött hordozóként foszforcellulózt (P 81, Whatman) alkalmazunk.

30 A kiértékelést a foszforcellulóz autoradiográfiájával végezzük röntgenfilm segítségével (expozíció: 15 perc, szobahőmérséklet).

#### 20. példa

35 *HSA immunológiai kimutatása proteinfolt-módszerrel nitrocellulózon proteinmentes blokkoló körülmények között (kontakteljárás neomicinnel töltött foszforcellulózzal)*

40 A 13. példa szerinti módon járunk el, antibiotikummal töltött hordozóként neomicinnel töltött foszforcellulózt alkalmazunk (foszforcellulóz inkubálása 30 percig 400 mg neomicint tartalmazó 60 ml vízzel készült oldattal, majd mosás vízzel 30 percig).

45 A kiértékelést a foszforcellulóz autoradiográfiájával végezzük röntgenfilm segítségével (expozíció 15 perc, szobahőmérséklet).

#### 21. példa

50 *HSA immunológiai kimutatása proteinfolt-eljárással nitrocellulózt nitrocellulózon proteinmentes blokkoló körülmények között (érintkeztetés kontaktcellulózzal és kanamicinnel enzimreakció-pufferben)*

55 A 13. példa szerinti módon járunk el, kontakteljárás-ként azonban foszforcellulózt (P 81, Whatman) alkalmazunk előzetes antibiotikummal történő feltöltés nélkül.

Az enzimpufferhez 4 mg/ml kanamicint adunk.

60 A kiértékelést a foszforcellulóz autoradiográfiájával végezzük.

**22. példa****Proteinfoltok újrafelhasználása**

A nitrocellulózson (Hybond C) levő proteinfoltokat a 13. példa szerinti eljárás elvégzése után 75 °C-on kétszer 15 percig eluáló pufferrel mossuk, amely 3% SDS-t, 0,1 mól/l β-merkaptó-etanolt tartalmaz TBS-ben, így az első antitestet, beleértve az enzimmel jelzett szondát is, eluáljuk. Mosás után újra blokkolást végzünk 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel, és a 13. példában ismertetett eljárást megismételjük. Az első és második eljárás kontakthordozóját együtt autoradiografáljuk. A proteinfoltok újrafelhasználása után intenzitáscsökkenés nem állapítható meg.

**23. példa****HSA immunológiai kimutatása nitrocellulózson proteinfoltok formájában, proteinmentes blokkoló körülmények között (kontakthordozó: kanamicinnel feltöltött karboxi-metil-cellulóz)**

Az eljárást a 13. példa szerinti módon végezzük, kontakthordozóként azonban kanamicinnel töltött karboxi-metil-cellulózt (CM-membránok, Renner GmbH, NSZK) alkalmazunk. A kiértékelést a CM-membránok autoradiográfiájával végezzük.

**24. példa****HSA immunológiai kimutatása nitrocellulózson proteinfolt formájában, proteinmentes blokkoló körülmények között (protein A és NPT II toluilén-düizocianát-2,4-prepolimerrel készült kapcsolási terméke segítségével)****A) Az enzimmel jelzett szonda előállítás**

a) NPT II elektroforetikus tisztítása E.coli lizátumból  
10 ml E.coli sejtenyészet (pRK, NPT II-t nagy mennyiségben kifejezve) sejttömegét 1 ml lizáló pufferrel felvesszük, és ultrahanggal kezeljük. A sejtmarradékot 4 °C-on centrifugáljuk. A sejtlizátumot preparatív PAA/SDS gélen elektroforetikusan megosztjuk. A gél vízrel történt mosás után hideg 0,25 mól/literes KCl-oldatba helyezük, a láthatóvá váló NPT II csíkokat egy szikével kivágjuk, és felaprítjuk. A proteint eluáló pufferrel 3 óra hosszat szobahőmérsékleten eluáljuk. Az eluálással kapott oldatot centrifugáljuk, a maradékot négyeszeres mennyiségű hideg acetonnal 3 óra hosszat -20 °C-on állni hagyjuk. Ezután 0 °C-on lecentrifugáljuk. Mosás után a csapadékfázist 200 µl oldópufferben oldjuk, és 20 mmól/l nátrium-foszfát-pufferrel szemben egy éjszakán át 4 °C-on dializáljuk. A kb. 200 µl végtérfogatban kb. 200 µg NPT II található.

**b) Kapcsolás**

A kapcsoláshoz 17,4 g frissen desztillált toluilén-düizocianát-2,4-ból és 30 g polietilén-glikol 600-ból 50-60 °C-on prepolimert készítünk. 100 mg prepolimert 500 mg acetonban oldunk, a teljes oldódás után az oldatból 300 mg-ot 700 mg vízzel emulgeálunk.

800 µl az a) lépésben kapott lizátumot egy Eppendorf-csőben elkeverünk 150 µg protein A 150 µl vízzel készült oldatával. Ehhez az oldathoz hozzáadunk 200 µl, a fenti módon előállított emulziót, és 1 óra hosszat rázás közben

reagáltatjuk. Egy óra múlva újabb 100 µl frissen előállított emulziót adagolunk, és még egy óra hosszat reagáltatjuk. Ezután 200 µg lizin 150 µl vízzel készült oldatával 30 percig szobahőmérsékleten leállítjuk.

**c) Kimutatás**

A 13. példa szerinti módon járunk el, a géntechnikai úton előállított protein A-NPT II-fúziós protein helyett azonban 50 µl fenti módon előállított kapcsolási terméket alkalmazunk enzimmel jelzett szondaként. A kimutatást autoradiográfiásan végezzük.

**25. példa****HSA immunológiai kimutatása CCA-papírra történt cseppentéssel (254 012 számú NDK szabadalmi leírás szerinti kontakthordozó)**

HSA hígítási sorát CCA-papírra (134 025 számú európai szabadalmi leírás szerint előállítva) cseppentjük, és 30 percig levegőn száradni hagyjuk. Ezután a hordozót 10% szulfonilsavat és 10% trietanol-amint tartalmazó oldatban (pH=7,5) 1 óra hosszat szobahőmérsékleten enyhe rázás közben inkubáljuk. Az I blokkolást 0,5% zselatint tartalmazó TBS-ben, majd 30 percig 0,25% zselatint tartalmazó TBS-ben végezzük. Ezután a 14. példa szerinti eljárást hajtjuk végre. A kiértékelés a 254 012 számú NDK szabadalmi leírás szerinti kontakthordozó és a CCA-papír autoradiográfiájával történik. Mindkét hordozó a <sup>32</sup>P-γ-ATP-vel jelzett kanamicin kimutatása alapján értékelhető.

**26. példa****HSA immunológiai kimutatása negatív papírra történt cseppentés után (foszforcellulóz kontakthordozó)**

Negatív hordozót CCA-papírból és szulfonilsavból a 237 841 számú NDK szabadalmi leírás alapján készítünk. Erre a hordozóra HSA hígítási sorát cseppentjük, és blokkolószerként (I és II blokkolás) 10% szulfonilsavat és 10% trietanol-amint tartalmazó oldatot (pH=7,5) alkalmazunk. Kanamicinnel töltött hordozóként kanamicinnel töltött foszforcellulózt (P 81, Whatman) alkalmazunk. A kimutatást a 13. példa szerinti módon végezzük. A HSA kimutatása a két hordozó autoradiográfiájával történik.

**27. példa****HSA immunológiai kimutatása hidrofób hordozóra történt cseppentés után (254 012 számú NDK szabadalmi leírás szerinti kontakthordozó)**

Hidrofób hordozót úgy állítunk elő, hogy a 134 025 számú európai szabadalmi leírás szerinti CCA-papírt ekvimoláris mennyiségű di-n-oktil-aminnal és szulfanilsavval mint nátriumsóval reagáltatjuk. Erre a hordozóra visszük fel a HSA hígítási sorát. A cseppeket szobahőmérsékleten 30 perc alatt megszáritjuk, majd még további 15 percig száradni hagyjuk. Az I és II blokkolás TBS-sel és zselatinnal történik a 14. példa szerint. A továbbiakban a 13. példa szerinti módon járunk el.

A kiértékelést a két hordozó autoradiográfiájával végezzük.

## 28. példa

*HSA immunológiai kimutatása nitrocellulózra proteinfolek formájában (kontakthordozó foszforcellulóz) és a kimutatási reakció felerősítésével*

Nitrocellulózra (Hybond C. Amersham) hígítási sort cseppentünk, és a 13. példa szerinti módon blokkoljuk. Az első antitesttel történő inkubálás után 1 óra hosszat 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel mossuk, majd újra blokkoljuk (TBS+0,2% Tween 20), majd hozzá-

adunk 10 µg protein A-t 10 ml oldatban, és enyhén rázzuk. Ezután újra mossuk 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel, és újra blokkoljuk. Ezután hozzáadunk 10 µl HSA-antihumán szérumalbumin-protein A-NPT II-fúziós proteint (a 6. példa szerinti 50 µl lizátumból előállítva, 50 µ HSA és 50 µl anti-HSA-immunglobulin/nyúl, inkubációs hőmérséklet 4 °C, egy éjszakán át), és 1 óra hosszat inkubáljuk. Ezután TBS-sel mossuk, és a 13. példa szerinti kontakteljárásban kanamicinnel töltött hordozóval érintkeztetjük. A kiértékelés a kontakthordozó autoradiográfiájában történik (30 perc szobahőmérsékleten).

## 29. példa

*α-Fetoprotein immunológiai kimutatása nitrocellulózra történt cseppentés után (254 012 számú NDK szabadalmi leírás szerinti kontakthordozó), felerősítés a térhálóított protein A-NPT II-fúziós protein antitestével*

Első lépésben a 15. példa szerinti módon járunk el. Az első antitesttel (monoklonális) végzett inkubáció után 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel mossuk, és 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-sel blokkoljuk. Ezután hozzáadjuk 50 µl biológiai úton térhálóított protein A-NPT II-fúziós proteint (lásd 11. példa), és 1 óra hosszat inkubáljuk.

TBS-sel végzett mosás után (1 óra) a 15. példa szerinti módon járunk el. A kiértékelést a kontakthordozó 20 percig szobahőmérsékleten végzett autoradiográfiájával végezzük.

## 30. példa

*HSA immunológiai kimutatása (enzimreakció-oldat)*

HSA hígítási sorát külön-külön kör alakú nitrocellulózszűrőre (Hybond C. Amersham Int.) cseppentjük (felület 0,5 cm<sup>2</sup>), majd a 13. példa szerinti módon járunk el. Protein A-NPT II-fúziós proteinnel végzett inkubálás után a szűrőket 1 óra hosszat TBS-sel mossuk, majd egyenként műanyag tartályokba helyezük. Mindegyikhez hozzáadunk 0,5 ml enzimpuffert, 1 mg kanamicint és <sup>32</sup>P-γ-ATP-t (10 millió beütés/perc/ml, specifikus aktivitás 5000 Ci/mmól/l) és 1 óra hosszat 37 °C-on reagáltatjuk. A nitrocellulóz-membránokat kivesszük, egy foszforcellulózból készült szűrőt (P 81, 1 cm<sup>2</sup>) helyezünk rá, és 30 percig rázzuk. A foszforcellulózszűrőket le vesszük, 1 óra hosszat vízzel mossuk, megszáritjuk és szcintillációs számlálóban mérjük. A kiértékelést közvetlenül a radioaktivitás mért értékéből végezzük (kontrollként egy nitrocellulózszűrőt HSA nélkül kezelünk).

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás enzimmel kapcsolt molekuláris szondák előállítására, *azzal jellemezve*, hogy molekuláris szondákat közvetlenül vagy egy közbülső vegyületen keresztül egy aminoglikozid-foszfotranszferázzal kapcsolunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy molekuláris szondaként immunreaktív szondát alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immunreaktív szondaként egy mono- vagy poliklonális antitestet, antiszérumot, egy proteint vagy egy peptidet alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy proteinként protein A-t alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy molekuláris szondaként egy vagy több természetben előforduló, kémiai vagy géntechnikai úton előállított nukleinsavat vagy ezek származékát, vagy ezek fragmensét alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsavként egyszálú DNS-t vagy annak fragmensét, kettős szálú vagy részben kettős szálú DNS-t vagy annak fragmensét, oligodezoxiribonukleotidot, RNS-t vagy annak fragmensét vagy oligoribonukleotidot alkalmazunk.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nukleinsavként géntechnikai úton előállított hibridizációs szondát alkalmazunk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy molekuláris szondaként egy biomolekuláris szondához specifikus affinitást mutató proteint alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy proteinként avidint, streptavidint vagy kapcsolható enzimet alkalmazunk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy molekuláris szondaként egy biomolekulához specifikus affinitást mutató kémiai vegyületet alkalmazunk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kémiai vegyületként biotint alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminoglikozid-foszfotranszferázként neomicin-foszfotranszferáz I-et vagy II-t alkalmazunk.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aminoglikozid-foszfotranszferáz kapcsolását a molekuláris szondára egy kovalens, egy vagy több közbekapcsolt molekulán keresztül történő kovalens kötés kialakításával végezzük.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapcsoláshoz glutáraldehidet, p-benzokinont, biszszukcinimidil-észtert, biszimidátot és/vagy azidokat alkalmazunk.

15. Az 1., 13. vagy 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy közbekapcsolt molekulaként 1–150 atom hosszúságú, adott esetben egy vagy több gyűrűrendszert tartalmazó csoportokat alkalmazunk.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aminoglikozid-foszfotranszferáz molekuláris szondára történő kapcsolását ionos kötés kialakításával,

egy vagy több, mindkét komponenssel ionos kötést kialakító kémiai vegyületen keresztül végezzük.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapcsoláshoz polietilénimint alkalmazunk.

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapcsolást hidrofób vagy más elektrosztatikus kölcsönhatáson keresztül végezzük.

19. Az 1-5., 8. vagy 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fúziós proteinként egy, proteínből és aminoglikozid-foszfotranszferázból álló gén-technikai úton előállított fúziós proteint alkalmazunk.

20. Eljárás biomolekulák enzimmel kapcsolt molekuláris szondával történő kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy oldatban, gélben vagy egy I szilárd fázison található biomolekula felismerésére egy az 1. igénypont szerinti enzimmel kapcsolt molekuláris szondát adagolunk, a molekuláris szondához kapcsolt vagy arról lehasított enzimet egy kosubsztrát jelenlétében egy szubsztráttal reagáltatjuk, és az átalakított szubsztrátot egy II vagy III szilárd fázison kimutatjuk.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biomolekula kimutatására a következő lépéseket végezzük:

(i) felismerési lépés, amelyben az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát az oldatban vagy gélben található vagy egy I szilárd fázison kötött, specifikus affinitással rendelkező biomolekulával kapcsoljuk;

(ii) mosási lépés, amelyben a felesleges, enzimmel kapcsolt molekuláris szondát kimossuk és/vagy leválasztjuk;

(iii) enzimreakció-lépés, amelyben a szubsztrátot egy kosubsztrát jelenlétében az enzimmel átalakítjuk;

(iv) leválasztási lépés, amelyben az át nem alakított kosubsztrátot és adott esetben a szubsztrátot kimossuk vagy leválasztjuk;

(v) kiértékelési lépés, amelyben az átalakított szubsztrátot egy II vagy III szilárd fázison mérjük vagy alkalmas kimutató eljárással kimutatjuk.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) felismerési lépésben a biomolekulát gélben vagy más megosztó vagy hordozóanyagban megosztjuk, és a biomolekulát tartalmazó megosztó- és hordozóanyagot egy, az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát tartalmazó oldattal érintkeztetjük, így a gélben vagy a megosztó- és hordozóanyagban a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplexet hozunk létre; a (ii) mosási lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda főlegét a gélből vagy megosztó- és hordozóanyagból kimossuk; a (iii) enzimreakció-lépésben a gélt vagy megosztó- és hordozóanyagot egy második, a szubsztrátot és a kosubsztrátot tartalmazó géllal vagy megosztó- és hordozóanyaggal érintkeztetjük, és a szubsztrátot átalakítjuk; a (iv) leválasztási lépésben a második, az átalakított szubsztrátot tartalmazó gélt vagy leválasztó- és hordozóanyagot egy szilárd III fázissal érintkeztetjük, és az átalakított szubsztrátot ehhez kapcsoljuk, és mosási lépések után az (v) kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a III szilárd fázison radioaktivitás mérésével vagy autoradiográfiásan vagy más módon kimutatjuk.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) és (ii) lépések után a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplexet tartalmazó gélt vagy megosztó- és hordozóanyagot egy, a szubsztrátot megkötvő tartalmazó II szilárd fázissal, egy kosubsztrát jelenlétében érintkeztetjük, és az enzimatikusan átalakított szubsztrátot a II szilárd fázison kimutatjuk.

24. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) felismerési lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát és a biomolekulát oldatban alkalmazzuk és kapcsoljuk, a (ii) mosási lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda főlegét leválasztjuk, a (iii) enzimreakció-lépésben a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló komplex enzimet a kosubsztrát jelenlétében a szubsztráttal oldatban reagáltatjuk, a (iv) leválasztási lépésben az enzimatikusan átalakított szubsztrát kosubsztrát-főlegétől történő elválasztását egy, a szubsztrátot szelektíven kötő III szilárd fázissal végezzük, az (v) kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a III szilárd fázison mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

25. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) felismerési lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát egy I szilárd fázisra kötött biomolekulára kapcsoljuk, a (ii) mosási lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda főlegét kimossuk és/vagy leválasztjuk, a (iii) enzimreakció-lépésben a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló, I szilárd fázison megkötött komplex enzimet oldatban található szubsztráttal és kosubsztráttal reagáltatjuk, a (iv) leválasztólépésben az át nem alakított kosubsztrátot és adott esetben szubsztrátot leválasztjuk, és az átalakított szubsztrátot egy III szilárd fázisra kötjük, a (v) kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a III szilárd fázison mérjük, vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az I szilárd fázist a rákötött biomolekulával és az erre kötött enzimmel kapcsolt molekuláris szondával az (i) és (ii) lépések után a (iii) enzimreakció-lépésben egy olyan géllal vagy más elválasztó- és hordozóanyaggal rétegezzük be, amelyben a szubsztrát és a kosubsztrát található, majd a leválasztólépésben a gélből vagy elválasztó- és hordozóanyagból az átalakított szubsztrátot egy III szilárd fázisba visszük át, és az (v) kiértékelési lépésben ott határozzuk meg.

27. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) felismerési lépésben egy kapcsolt enzimmel jelzett molekuláris szondát egy I szilárd fázison kötött biomolekulára kapcsolunk, a (ii) mosási lépésben az enzimmel kapcsolt molekuláris szonda főlegét kimossuk és/vagy leválasztjuk, a (iii) enzimreakció-lépésben a biomolekulából és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondából álló, I szilárd fázison kötött komplex enzimet egy II szilárd fázison kötött szubsztráttal, egy oldatban található kosubsztrát jelenlétében reagáltatjuk, a (iv) leválasztólépésben a kosubsztrát főlegét kimossuk vagy leválasztjuk, és az (v) kiértékelési lépésben az átalakított szubsztrátot a II szilárd fázison mérjük vagy autoradiográfiásan meghatározzuk.

28. A 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) felismerési lépésben a biomolekulát egy vagy több felismerőrendszerben egy vagy több specifikus affinitással rendelkező molekulában ismerjük fel, vagy egy vagy több molekulával reagáltatjuk, és az enzimmel kapcsolt molekuláris szondát ezen molekulák közül legalább eggyel reagáltatjuk.

29. A 20., 21. és 25–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy I szilárd fázisként, amelyhez a biomolekulát kapcsoljuk, egy kovalensen, ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kötő hordozót alkalmazunk.

30. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hordozóként nitrocellulózt, polivinilidén-difluoridot, poliamidot, töltött poliamidot, diazo-benzil-oximetil-cellulózt, dietil-amino-etil-cellulózt, cianur-kloriddal aktivált cellulózt, aktivált polisztirolt vagy kémiaiilag aktivált üveget használunk.

31. A 29. vagy 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az I szilárd fázist sík felületű anyag formájában alkalmazzuk.

32. A 20., 21., 23. vagy 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy II szilárd fázisként egy, a szubsztrátot kötő hordozót alkalmazunk.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szubsztrátot kötő hordozóként egy kovalensen, ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatáson keresztül kötő hordozót alkalmazunk.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hordozóként nitrocellulózt, polivinilidén-difluoridot, poliamidot, töltött poliamidot, diazo-benzil-oximetil-cellulózt, dietil-amino-etil-cellulózt, cianur-kloriddal aktivált cellulózt, aktivált polisztirolt, kémiaiilag aktivált üveget, foszforcellulózt, karboxi-metil-cellulózt vagy cianur-kloriddal és egy, aminocsoportot és egy karbonsav-, foszforsav- vagy szulfonsavcsoportot tartalmazó vegyülettel módosított cellulózt alkalmazunk.

35. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a II szilárd fázist egy optikailag áteresztő anyag formájában alkalmazzuk.

36. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a II szilárd fázist egy sík felületű anyag formájában alkalmazzuk.

37. A 20–22. és 24–26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy III szilárd fázisként egy, a szubsztrátot és/vagy az enzimatikusan átalakított szubsztrátot szelektíven kötő gélt, leválasztó- és hordozóanyagot alkalmazunk.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szelektíven kötő gélként vagy leválasztó- vagy hordozóanyagként egy kovalensen, ionosan vagy elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kötő hordozóanyagot alkalmazunk.

39. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hordozóként nitrocellulózt, polivinilidén-difluoridot, poliamidot, töltött poliamidot, diazo-benzil-oximetil-cellulózt, dietil-amino-etil-cellulózt, cianur-kloriddal aktivált cellulózt, aktivált polisztirolt, kémiaiilag aktivált üveget, foszforcellulózt, karboxi-metil-cellulózt vagy cianur-kloriddal és egy, aminocsoportot és egy

karbonsav-, foszforsav- vagy szulfonsavcsoportot tartalmazó vegyülettel módosított cellulózt alkalmazunk.

40. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a III szilárd fázist egy optikailag áteresztő anyag formájában alkalmazzuk.

41. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a III szilárd fázist egy sík felületű anyag formájában alkalmazzuk.

42. A 21., 35. vagy 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (v) kiértékelési lépést az optikailag áteresztő anyagon nem radioaktív eljárással, optikai módszerrel végezzük.

43. A 25–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biomolekulát az I szilárd fázisra cseppentéssel vagy gélen vagy más megosztó- és hordozóanyagon történő megosztás után foltkészítő eljárással visszük fel.

44. A 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) eljárás enzimreakció-lépését a molekuláris szondára kapcsolt enzimmel vagy az arról lehasított enzimmel végezzük.

45. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmel kapcsolt molekuláris szondaként egy mono- vagy poliklonális antitestet, antiszérumot, proteint, peptidet, egyszálú, kétszálú vagy részben kétszálú DNS-t vagy ennek egy fragmensét, oligodezoxiribonukleotidot, egy másik biomolekulához specifikus affinitást mutató proteint vagy egy biomolekulához affinitást mutató kémiai vegyületet alkalmazunk.

46. A 45. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy másik biomolekulához specifikus affinitást mutató proteinként avidint vagy streptavidint alkalmazunk.

47. A 45. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy biomolekulához affinitást mutató kémiai vegyületként biotint alkalmazunk.

48. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmel kapcsolt molekuláris szondaként egy, az enzimhez kovalensen kapcsolt szondát alkalmazunk.

49. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmel kapcsolt szondaként, egy glutaráaldehid-del, benzokinonnal, biszszukcinimidil-észterrel, biszimidáttal vagy azidénnel kapcsolt molekuláris szondát alkalmazunk.

50. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmel kapcsolt molekuláris szondaként egy, ionos kötéssel kapcsolt molekuláris szondát alkalmazunk.

51. Az 50. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmel kapcsolt molekuláris szondaként egy, polietiléniminen keresztül kapcsolt molekuláris szondát alkalmazunk.

52. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmel kapcsolt molekuláris szondaként egy, hidrofób vagy más elektrosztatikus kölcsönhatás alapján kapcsolt molekuláris szondát alkalmazunk.

53. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy jelzett molekuláris szondaként egy enzimből és molekuláris szondából álló fúziós proteint alkalmazunk.

54. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kovalensen kapcsolt molekuláris szondáról az enzim lehasítható.

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hasítást fotokémiai vagy redukciós úton végezzük.

56. A 20., 44. és 48–52. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmal kapcsolt molekuláris szondaként egy, az enzimmal kapcsolt reverzibilisen kapcsolt molekuláris szondát alkalmazunk.

57. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminoglükózid-foszfotranszferázként egy kanamicin-foszfotranszferázt alkalmazunk.

58. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminoglükózid-foszfotranszferázként egy neomicin-foszfotranszferázt alkalmazunk.

59. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimmal kapcsolt molekuláris szondaként kanamicin-foszfotranszferázzal kapcsolt molekuláris szondát alkalmazunk.

60. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként kloramfenikolt alkalmazunk.

61. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként aminoglükózid-antibiotikumot alkalmazunk.

62. A 20–28. és 57. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként kanamicint, neomicint, gentamicint vagy paromomicint alkalmazunk.

63. A 20–28. és 58. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként foszforilezhető proteint alkalmazunk.

64. A 66. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy foszforilezhető proteinként hisztont alkalmazunk.

65. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként egy RNS-t, DNS-t, dezoxiribo- vagy ribooligonukleotidot vagy egy dezoxiribo- vagy ribopolinukleotidot alkalmazunk.

66. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként egy kettős szálu DNS-t alkalmazunk.

67. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként egy RNS-t alkalmazunk.

68. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként egy egyszálú vagy kétszálú DNS-t alkalmazunk.

69. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként egy egyszálú DNS-t és egy primert alkalmazunk.

70. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szubsztrátként egy kettős szálu DNS-t alkalmazunk.

71. A 20–28. és 60. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként egy  $^{14}\text{C}$ -nel vagy  $^3\text{H}$ -nel jelzett acetátot alkalmazunk.

72. A 20–28., 57–58. és 61–63. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként ATP-t és/vagy  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-t alkalmazunk.

73. A 20–28., 66., 68. és 69. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként a négy dezoxiribonukleozid-trifoszfát elegyét alkalmazzuk, a dezoxiribonukleozid-trifoszfátok közül egyet vagy többet  $\alpha$ -helyzetben  $^{32}\text{P}$ -ral jelzett formában.

74. A 20–28., és 67. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -ATP vagy  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -ATP és ATP elegyét alkalmazzuk.

75. A 20–28., 66., 68. és 69. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként egy  $^{35}\text{S}$ -nel,  $^3\text{H}$ -nel vagy  $^{125}\text{I}$ -dal jelzett dezoxinukleozid-trifoszfátot vagy jelzett és adott esetben nem jelzett dezoxinukleozid-trifoszfátok elegyét alkalmazzuk.

76. A 20–28., 66., 68. és 69. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként egy biotinilezett dezoxinukleozid-trifoszfátot alkalmazunk.

77. A 20–28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy koszubsztrátként DNS-t vagy jelzett DNS-t és/vagy dezoxiribopolinukleotidokat alkalmazunk.