
Octrooiraad



Nederland

⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8100719**

⑲ NL

- ⑤④ **Microbiologisch bereid polypeptide met de aminozuur-orde van menselijk interferon, DNA en plasmiden, die voor deze volgorde coderen, microörganismen, die deze genetische informatie bevatten en werkwijze voor het maken daarvan.**
- ⑤① Int.Cl.: C12N 15/00, C07H 21/04, A61K 45/02.
- ⑦① Aanvrager: Hoechst Aktiengesellschaft te Frankfurt a/d Main, Bondsrepubliek Duitsland.
- ⑦④ Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②① Aanvraag Nr. 8100719.
- ②② Ingediend 13 februari 1981.
- ③② Voorrang vanaf 16 februari 1980.
- ③③ Land van voorrang: Bondsrepubliek Duitsland (DE).
- ③① Nummer van de voorrangsaanvraag: P 3005843 .
- ⑥② --

-
- ④③ Ter inzage gelegd 16 september 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Betr.: Microbiologisch bereid polypeptide met de aminozuurvolgorde van menselijk interferon, DNA en plasmiden, die voor deze volgorde coderen, microorganismen, die deze genetische informatie bevatten en werkwijze voor het maken daarvan.

Sedert meer dan 20 jaren is het bekend, dat interferon de virusproduktie verhindert. Onderzoekingen van de laatste jaren hebben voorts uitgewezen, dat interferon ook de celdeling remt en vele reacties van het immunosysteem reguleert. Al deze resultaten onderstrepen de grote therapeutische betekenis van interferon.

5 De hoeveelheden interferon, die tot dusver voor wetenschappelijke en therapeutische onderzoekingen konden worden gebruikt, werden uit fibroblast- en lymfocytenculturen gewonnen. Men is er met beide methoden evenwel niet in geslaagd, grote of ook slechts voor afzonderlijke problemen toereikende hoeveelheden aan interferon te bereiden. Dit is tegelijkertijd de oorzaak ervoor, dat de kennis op het interferengebied slechts zeer langzaam voortschrijdt en dat slechts zeer weinige van de dringend gewenste onderzoekingen op het kanker gebied konden worden uitgevoerd. Het is dus noodzakelijk, nieuwe wegen bij de produktie van
10 interferon in te slaan.

Een dergelijke weg wordt nu door de onderhavige uitvinding gegeven. Deze betreft de isolatie van nucleotidevolgorden, die de genetische code voor interferon bevatten, de synthese van DNA met deze specifieke nucleotidevolgorde en de transfer van dit DNA in een micro-
20 organisme als gastheer, waarin de replicatie en expressie van dit DNA plaatsvindt.

De uitvinding betreft in het bijzonder de vorming van genen voor fibroblast-interferon, de transfer van deze genen in een microbe-gastheer, replicatie van gastheer en gen, en expressie van het gen door
25 de gastheer. Daarbij ontstaat interferon-proteïne met de voor dit proteïne karakteristieke biologische en immunologische eigenschappen.

Voor het bereiken van de onderhavige doeleinden kan men op de volgende wijze tewerk gaan, waarbij de weergegeven weg als voorbeeld voor verscheidene bruikbare staat.

30 Menselijke fibroblasten worden bij aanwezigheid van een proteïne-synthese-remmer met behulp van polyinosinezuur/polycytidylzuur tot een maximale produktie van interferon-mRNA aangezet. De cellen worden gedenatureerd en het RNA als neerslag met een cesiumchloridecentrifug-

gering gewonnen. Na opnieuw neerslaan wordt uit dit RNA het mRNA via een oligo-dT-cellulosekolom afgescheiden. Het gewonnen mRNA wordt met behulp van het enzym reverse-transcriptase tot een RNA-DNA-dubbelstreng ge-
completeerd. Na afbraak van de RNA-streng wordt de DNA-streng (het com-
5 plementaire DNA = cDNA) met reverse transcriptase of het enzym polyme-
rase I tot een DNA-DNA-dubbelstreng (dsDNA) gecompleteerd.

Dit dubbelstrengige DNA moet nu in een plasmide worden ingebouwd. Daartoe is de verlenging van het 3'-uiteinde van het DNA, b.v. met dCMP-resten nodig. Het plasmide (b.v. pBR 322) wordt met het restrictie-
10 nuclease PstI opengesneden en b.v. met dGMP-resten verlengd. Bij samen-
voeging van het aldus verlengde DNA met een passend verlengd plasmide vindt base-paring tussen DNA en plasmide plaats. Dit circulair gemaakte molecuul wordt dan in microorganismen (vooral bacteriën, liefst E.coli,
zoals E. coli K 12 of X 1776) getransformeerd; de nog niet gesloten
15 bindingen worden door de enzymen van het microorganisme covalent ver-
knoopt. De getransformeerde microorganismen worden op agarplaten uit-
gestreken en op antibioticaresistenties, die door het gekozen plasmide en het toegepaste restrictienuclease gegeven zijn, geselecteerd.

Met behulp van immunologische en biologische proeven worden de
20 clonen, die interferonhoudende proteïnen vormen, uitgezocht. Deze
clonen worden gekweekt, de microorganismemassa afgecentrifugeerd, ge-
extraheerd en op interferongehalte onderzocht. De door ontsluiting van
de interferon producerende clonen gewonnen oplossing bevat interferon-
proteïne.

25 De onderhavige stappen kunnen op de volgende wijze worden uitge-
voerd:

1. Werkwijze voor het isoleren van RNA

a) De winning van interferon producerende fibroblastcellen.

Menselijke, neonatale voorhuidfibroblasten werden bij 37°C onder
30 toepassing van een geschikt cultuurmedium (b.v. Eagle's medium
MEM) (minimaal essentieel medium) plus foetaal kalverserum) in
rolkolven (Ø 10 cm, lengte 40 cm) in een aantal passages ver-
meerderd. Na bereiken van uitgewassen celculturen van de 25e tot
de 35e celverdubbeling wordt het vermeerderingsmedium door het
35 interferon-inductiemedium vervangen. Dit bestaat uit Eagle's MEM,

5 waaraan geschikte hoeveelheden van de fibroblast-interferon-inductor poly-inosinezuur : polycytidylzuur ($10-100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; in het actuele geval $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) en de proteïnesyntheseremmer cycloheximide ($10-100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; in dit geval $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) werden toegevoegd. Na incubatie van de celculturen bij 37°C gedurende 4-6 uren (in het onderhavige geval 5 uren) werd de bovenstaande vloeistof afgegoten.

b) Winning van RNA

10 De verkregen cellen werden in een denaturerend medium (4 M guanidiniumthiocynaat, 1 M mercaptoëthanol, 0,15 M natriumacetaat met pH 5,5) opgenomen en 1 minuut bij 0°C met een ultra-turrax gehomogeniseerd. Het homogenisaat werd 15 minuten bij 4°C met 20000 tpm gecentrifugeerd.

15 De bovenstaande vloeistof werd daarna op een oplossing (kussen) van 5 cm^3 5,7 M CsCl, 10 mM tris-hydroxyaminomethaan (tris), 10 mM ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA) met pH 7,6 als laag opgebracht en in een Beckman-SW 27 rotor 36 uren bij 20°C en 22.000 tpm gecentrifugeerd.

20 Er werd gevonden, dat in tegenstelling tot de opgave in de literatuur, een toevoeging van CsCl aan het lysaat moet worden vermeden, om een zo volledig mogelijke afscheiding van mRNA in de volgende reactietrap te bereiken. Na afloop van het centrifugeren werden de polyallomeer-buisjes in vloeibare stikstof ingevroren en de bodem van de buisjes, waarop zich het RNA-neerslag bevond, afgesneden. Het neerslag werd in een oplossing van 10 mM tris, 10 mM EDTA en 25 10% "sarcosyl" (N-lauryl-sarcosine-natriumzout) met pH 7,6 opgenomen en de suspensie bij 20.000 tpm 20 minuten gecentrifugeerd. Het verkregen neerslag werd nogmaals in dezelfde buffer opgenomen, 5 minuten op 65°C verwarmd en opnieuw gecentrifugeerd. De verenigde bovenstaande vloeistoffen werden 0,3 M aan natriumacetaat gemaakt, 30 met het 2,5-voudig volume ethanol gemengd en bij -20°C bewaard.

2. Winning van mRNA

35 Het RNA werd door afcentrifugeren uit de ethanoloplossing (20.000 tpm, 30 minuten, -5°C) afgescheiden en in 0,5 M NaCl, 10 mM tris met pH 7,5 opgelost. Deze oplossing werd op een oligo-dT-cellulosekolom (Collaborative Research, type 3), die met een zelfde buffer was ge-

equilibreerd, aangebracht en met 1 mM tris, pH 7,6 of gedestilleerd water geëluëerd. De elutie van het poly-A-houdende RNA (mRNA) kan door een extinctiemeting bij 260 nm worden gevolgd. Het aldus verkregen mRNA werd met natriumacetaat tot een eindconcentratie van 0,3 M begiftigd, het 2,5-voudig volume ethanol toegevoegd en de oplossing bij -20°C bewaard.

3. Winning van het cDNA

a) Winning van enkelstreng-cDNA

De omzetting van het mRNA in het overeenkomstige DNA (cDNA) vindt plaats met behulp van het enzym reverse-transcriptase. Het incubatiemengsel bevatte: 50 mM tris, pH 8,3, 10 mM MgCl₂, 30 mM 2-mercaptoëthanol, 0,5 mM aan alle 4 gewoonlijk voorkomende desoxyribonucleosidetrifosfaten (de trifosfaten van adenine, guanine, cytosine en thymidine), 100 µg/cm³ oligo-dT₁₂₋₁₈ (van Boehringer Mannheim) ca. 100 µg/cm³ gepolyadenyleerd RNA en 800 eenheden/cm³ reverse-transcriptase (van Life Science Inc., St. Petersburg, USA). Voor het volgen van de reactie kan een op de α-plaats met 32 P gemerkt desoxyribonucleosidetrifosfaat (specifieke activiteit 50 Ci/mmol) aan het mengsel worden toegevoegd. Het mengsel wordt 60 minuten bij 42°C geïncubeerd, waarna door een toevoeging van 20 mM EDTA de reactie wordt afgebroken. De oplossing wordt met een zelfde volume met water verzadigde fenol geëxtraheerd, de fenol door uitschudden met ether verwijderd en resten ether met stikstof afgedestilleerd. Niet ingebouwde desoxyribonucleosidetrifosfaten werden door kolomchromatografie over Sephadex G50 in 10 mM tris, pH 9,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA afgescheiden. Het geëluëerde cDNA werd door een toevoeging van 0,3 M natriumacetaat en het 2,5-voudig volume ethanol neergeslagen. Na centrifugeren werd het neerslag in 0,1 M NaOH opgenomen en 20 minuten bij 70°C geïncubeerd of in 0,3 M NaOH een nacht bij kamertemperatuur geïncubeerd. Het mengsel werd met 1 M HCl en 1 M tris op pH 7,6 gebracht.

b) Vorming van dubbelstreng-cDNA (ds DNA)

Voor een vorming van de tweede DNA-streng kan wederom het enzym reverse transcriptase of het enzym polymerase I worden gebruikt.

Vorming van dsDNA met reverse transcriptase:

Het incubatiemengsel (pH 8,3) bevatte 50 mM tris, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM 2-mercaptoëthanol, 0,5 mM van de bovengenoemde 4 desoxyribonucleosidetrifosfaten, $50 \mu g/cm^3$ cDNA en 800 eenheden/cm³ reverse transcriptase. De reactie werd 120 minuten bij 42°C uitgevoerd en door een toevoeging van EDTA tot een eindconcentratie van 20 mM afgebroken. Vervolgens vond de fenolextractie en een gelpermeatiechromatografie over Sephadex G50 als bovenbeschreven plaats.

Vorming van dsDNA met polymerase I:

Het incubatiemengsel (pH 6,9) bevatte 200 mM hepes, 0,5 mM van de bovengenoemde 4 desoxyribonucleosidetrifosfaten, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM 2-mercaptoëthanol en 70 mM KCl. Door een toevoeging van met 32 P gemerkte desoxyribonucleotiden (op de α -plaatsen) aan het incubatiemengsel kan de reactie worden gevolgd. De reactie werd met 800 eenheden/cm³ polymerase I gestart en 2 uren bij 15°C uitgevoerd. Door een toevoeging van 0,1% natriumdodecylsulfaat en $100 \mu g/cm^3$ RNA werd de reactie beëindigd. De oplossing werd als bovenbeschreven geëxtraheerd. De na de extractie verkregen oplossing werd op een Sephadex G50-kolom aangebracht en gechromatografeerd met 10 mM tris pH 9,0, 100 mM NaCl en 1 mM EDTA. Het geëluëerde DNA kan door zijn radioactiviteit worden bepaald en werd door een toevoeging van 0,3 M natriumacetaat en 2,5-voudige volume ethanol neergeslagen. Het ethanol-neerslag werd in een oplossing (pH 4,5) uit 300 mM NaCl, 30 mM natriumacetaat en 3 mM $ZnCl_2$ opgenomen en met 1500 eenheden/cm³ S1 nuclease (Boehringer Mannheim) gemengd. De reactie werd na 1 uur bij 37°C door een toevoeging van EDTA tot een eindconcentratie van 20 mM afgebroken. Vervolgens werd met fenol geëxtraheerd en met ethanol neergeslagen beide als bovenbeschreven.

c) Winning van cDNA met een éénreactorproces.

Alternatief kan het dsDNA uit het mRNA ook met een éénreactorproces worden gewonnen. Daarbij wordt de reactie van het reverse transcriptase als beschreven uitgevoerd, maar aan het incubatiemengsel nog 140 mM KCl toegevoegd. Na afloop van de reactie werd het

monster 4 minuten op 100°C verhit en het gevormde neerslag afgecentrifugeerd. Aan de bovenstaande vloeistof werd een gelijk volume 0,4 M hepes buffer (pH 6,9) toegevoegd, waarbij de bovengenoemde 4 desoxyribonucleotiden in de buffer 0,5 mM aanwezig waren.

5 Door een toevoeging van 800 eenheden/cm³ polymerase I werd de reactie als beschreven bij 15°C uitgevoerd en door een toevoeging van natriumdodecylsulfaat en RNA gestopt. Vervolgens werd als onder 3b) "vorming van dsDNA met polymerase I" verder gewerkt.

4. Verlenging van dd 3'-uiteinden van cDNA met dCTP (desoxycytosine-
10 trifosfaat).

Voor een inbouw in het plasmide is een verlenging van het 3'-uiteinde van het DNA met één van de bovengenoemde 4 desoxynucleotiden nodig. Voorts werden de 3'-uiteinden van het opengesneden plasmide met complementair desoxynucleotide verlengd. Bij samenvoeging van DNA
15 met plasmide vindt dan een baseparing tussen DNA en plasmide plaats. Dit weer cirkelvormig gemaakte molecuul kan voor een transformatie van bacteriën worden gebruikt; de nog niet gesloten bindingen worden door een enzymstelsel in bacteriën covalent verknoopt.

B.v. kunnen de 3'-uiteinden van cDNA met dCMP-resten (desoxycytosinemonofosfaatresten) en het plasmide met dGMP-resten (desoxyguanidinemonofosfaat-resten) worden verlengd. Bij toepassing van deze desoxynucleotiden op de beschreven wijze en bij opening van het plasmide door het restrictie-enzym Pst I wordt na inbouw van het vreemde DNA een Pst I-splitsingsplaats aan elke insertieplaats nieuw gevormd,
20 zodat na vermeerdering van het plasmide het geïnsereerde DNA voor verder onderzoek gemakkelijk weer met het restrictie-enzym Pst I kan worden uitgeknipt.

Het neerslag na de alcoholtoevoeging na afbraak met S1 nuclease werd in een waterige oplossing met pH 6,7 van 30 mM tris, 1 mM CoCl₂,
30 140 mM kaliumcacodylaat, 150 mM dCTP, 100 µg geautoclaveerd gelatinehydrolysaat en 0,1 M dithioërythritol opgelost. Voor het volgen van de reactie kan met 32 P-gemerkt dCTP worden gebruikt. De reactie werd door een toevoeging van terminaal desoxynucleotidyl-transferase op gang gebracht en 10 minuten bij 37°C uitgevoerd. Na afloop van de
35 reactietijd werd het monster in ijs geplaatst en door een radioactivi-

teitsmeting in met trichloorazijnzuur verkrijgbaar neerslag het aantal van de ingebouwde dCMP-resten bepaald. Bij de reactie moeten bij voorkeur ca. 10% van de oorspronkelijk aanwezige nucleotiden zijn geaaddeerd; indien dit niet het geval is kan door een toevoeging van
5 verder enzym de reactie worden voortgezet. Indien een te groot aantal dCMP-resten werd geaaddeerd, kan de gevormde keten met behulp van het enzym S1 nuclease worden ingekort.

5. Werkwijze voor het integreren van DNA in een plasmide.

Een geschikt circulair plasmide, b.v. pBR 322, werd met een
10 restrictieëndonuclease opengeknippt, dat slechts één volgorde op het plasmide erkent. Gunstig is het, wanneer deze splitsingsplaats achter een sterke of induceerbare promotor ligt en/of zo is gelocaliseerd, dat een antibioticaresistentie wordt beïnvloed.

Het aldus lineair gemaakte plasmide wordt daarna aan de 3'-uit-
15 einden met een van de vier desoxynucleotiden verlengd.

Dit wordt b.v. als volgt gedaan: 30 µg plasmide wordt met 50 eenheden Pst I restrictieëndonuclease bij aanwezigheid van 50 mM NaCl, 6 mM tris, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoëthanol en 0,1 mg/cm³ gelatine gedurende 40 minuten bij 37°C en een pH van 7,5 geïncubeerd. Ver-
20 volgens wordt met fenol en ether als beschreven geëxtraheerd en het opengeknippte plasmide met ethanol bij aanwezigheid van 0,3 M natriumacetaat neergeslagen. De verlenging van de 3'-uiteinden van het plasmide met dGTP (desoxyguanidinetrifosfaat) vindt plaats analoog de bovenbeschreven verlenging van cDNA met dCTP.

25 Het verlengde plasmide-DNA wordt dan in een oplossing (pH 8,0) van 0,1 M NaCl, 10 mM tris en 1 mM EDTA met het verlengde ds cDNA gemengd, 2 minuten op 56°C verwarmd, 2 uren bij 42°C geïncubeerd en daarna langzaam op kamertemperatuur afgekoeld. Het aldus verkregen hybride DNA wordt daarna voor een transformatie van E. coli gebruikt.

30 6. Clonering van hybrideplasmide in E. coli.

De bacteriën, b.v. E. coli X 1776, werden bij 37°C in 50 cm³ van een gebruikelijke voedingsbodem tot een optische dichtheid van A₆₀₀ = 0,5 - 0,6 gekweekt, gesedimenteerd, eenmaal met 10 mM tris pH 7,5 gewassen en daarna in 40 cm³ van een oplossing van 75 mM
35 CaCl₂, 5 mM MgCl₂ en 5 mM tris met pH 8,0 hersuspenseerd en 20 minuten

in ijs geïncubeerd. Daarna werden de cellen gesedimenteerd en in 2 cm³ 75 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM tris pH 8,0 hersuspendeerd.

0,2 cm³ van deze bacteriesuspensie werden vervolgens met 0,1 cm³ hybride-DNA-oplossing gemengd en 45 minuten op ijs geïncubeerd.

5 Daarna werd 90 seconden op 42°C verwarmd en vervolgens met 0,2 cm³ voedingsbodem gemengd. 50 - 75 mm³ van deze suspensie werden daarna op tetracycline en ampicillinehoudende agarplaten uitgestreken en op antibioticaresistentie geselecteerd.

7. Isolatie van stammen, die interferonhoudende proteïnen produceren.

10 a) Immunologische aantoning.

Met behulp van een door Broome en Gilbert (PNAS 75, 2746, (1978)) ontwikkeld proefsysteem werden de clonen op de expressie van interferonhoudende proteïnen onderzocht. Clonen, die interferonhoudende proteïnen vormen, werden door de binding van radioactieve antilichamen aan deze proteïnen met hieropvolgende autoradiografie zichtbaar, doordat een röntgenfilm op deze plaatsen werd gezwart. Daartoe werden tot 50 clonen per nitrocellulosefilm gedurende 2 dagen bij 37°C gekweekt. Vervolgens werden de filters op een agarblok gelegd, dat 1 mg/cm³ lysozyme bevatte; 15 op de bacteriekolonie werd een met interferon-antilichaam beklede PVC-folie gebracht, en daarna werd 2-3 uren bij 4°C geïncubeerd. De PVC-folie werd vervolgens 15 uren bij 4°C in een oplossing van met 132 jodium gemerkt interferon-antilichaam geïncubeerd. De specifieke activiteit van de oplossing bedroeg 20 ca. 1×10^6 cpm/cm³. Na kweken en drogen van de folie werd deze geautoradiografeerd.

b) Biologische aantoning.

De clonen werden in 50 cm³ van een gebruikelijke voedingsbodem bij 37°C een nacht gekweekt. Daarna werden de bacteriën gesedimenteerd, tweemaal met koude 10 mM tris met pH 8,0, 30 30 mM NaCl gewassen en in 20% saccharose in 30 mM tris, pH 8,0, 1 mM EDTA hersuspendeerd. Er werd vervolgens 10 minuten bij kamertemperatuur geschud, gesedimenteerd, gehersuspendeerd in ijskoud water en in een ijsbad gedurende 10 minuten geïncubeerd. De bacteriën werden daarna gesedimenteerd en de boven- 35

staande vloeistof op op zichzelf bekende wijze met een virusremmingsproef op het gehalte aan interferonhoudend eiwit onderzocht.

8. Winning van interferon-proteïne.

- 5 De clonen, die in de verschillende proeven een interferonactiviteit vertoonden, werden in de gebruikelijke voedingsbodems gekweekt, de bacteriën afgecentrifugeerd en met waterige buffers geëxtraheerd. De extractieoplossing bevatte interferonproteïne.

CONCLUSIES:

1. Microbiologisch verkregen polypeptide, dat de aminozuurvolgorde van menselijk interferon geheel of gedeeltelijk bevat.
2. Microbiologisch verkregen polypeptide volgens conclusie 1, dat de aminozuurvolgorde van menselijk fibroblast-interferon geheel of ge-
5 deeltelijk bevat.
3. cDNA, dat de aminozuurvolgorde van menselijk interferon volgens conclusies 1-2 codeert, verkregen met mRNA uit menselijke fibroblastcellen.
4. Plasmide, dat de aminozuurvolgorde van menselijk interferon volgens conclusies 1-2 codeert, verkregen volgens conclusie 3 en een plas-
10 mide, liefst plasmide pBR 322.
5. Microorganisme, speciaal *E. coli*, met de genetische informatie voor een biosynthese van het polypeptide volgens conclusies 1 of 2.
6. Werkwijze voor het vormen van het polypeptide volgens conclusies 1 of 2, met het kenmerk, dat men de genetische informatie voor de bio-
15 synthese van het polypeptide met fibroblast-mRNA wint, het verkregen gen op een op zichzelf bekende wijze in microorganismen brengt en die microorganismen op een op zichzelf bekende wijze uitselecteert en cultiveert, die dit polypeptide produceren.
7. Werkwijze voor het vormen van cDNA volgens conclusie 3, met het
20 kenmerk, dat men uit fibroblasten RNA wint, daaruit het mRNA isoleert en hiermede op een op zichzelf bekende wijze cDNA bereidt.
8. Werkwijze voor het bereiden van het plasmide volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat men een plasmide, liefst plasmide pBR 322, met het cDNA volgens conclusie 3 combineert.
- 25 9. Werkwijze voor het vormen van een microorganisme volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat men een microorganisme, liefst *E. coli*, met een plasmide volgens conclusie 4 transformeert.
10. Werkwijze voor het winnen van RNA, met het kenmerk, dat men een cesiumchloride-vrij lysaat op een waterige geconcentreerde cesium-
30 chlorideoplossing gelaagd aanbrengt, centrifugeert en het RNA wint.