

TENTAMEN PRAKTISCHE VAARDIGHEDEN DEEL A - CHEMIE

Geachte heer/mevrouw,

5

Biotest B.V. is een bedrijf dat zich toelegt op het ontwikkelen van testen, werkwijzen en kits voor het isoleren van nucleïnezuren uit biologisch materiaal als zodanig. Daardoor moet het mogelijk worden, om snel en geautomatiseerd nucleïnezuur te isoleren uit

10

biologisch materiaal als zodanig en beschikbaar te maken voor allerlei verder onderzoek aan en met het geïsoleerde nucleïnezuur. Het is hierbij van groot belang, dat de testen en werkwijzen een zo klein mogelijk aantal stappen omvatten. Bovendien dienen de gebruikte materialen en chemicaliën van eenvoudige aard te zijn en tegen relatief lage kosten te verschaffen.

15

Wij menen thans een nieuwe test te hebben ontwikkeld voor het snel en eenvoudig isoleren van nucleïnezuur uit een biologisch materiaal als zodanig. Voor deze nieuwe test is de aard van het nucleïnezuur (DNA en RNA, zoals mRNA en tRNA, elk in welke configuratie dan ook) van geen belang.

20

De test is gebaseerd op het inzicht om voor het afscheiden van de nucleïnezuren gebruik te maken van adsorptie. Als adsorptiemateriaal hebben wij gevonden en experimenteel aangetoond dat silica voldoet.

25

Uit een oriënterend literatuuronderzoek zijn twee documenten naar voren gekomen.

Document D1 beschrijft onder andere de immobilisatie van gezuiverd mRNA uit een mengsel met een chaotroop op een glasvezelfilter en ook op een nitrocellulose-filter.

30

Document D2 beschrijft het afscheiden van DNA uit bacteriofaag (een faag is een virus dat zich vermeerdert in een bacterie). Hierbij worden de bacteriofagen door middel van precipitatie met azijnzuur afgescheiden uit het kweekmedium.

Het azijnzuur-precipitaat wordt vervolgens op een glasvezelfilter gebracht, nadien behandeld met een chaotroop bevattende buffer en als laatste gewassen.

Na het wassen is het op het glasvezelfilter achtergebleven DNA van de bacteriofagen geschikt voor hybridisatie-experimenten op het glasvezelfilter.

- 5 Wij verzoeken u, rekening houdende met deze documenten D1 en D2, een Nederlandse octrooiaanvraag voor te bereiden, die ons voor deze nieuwe ontwikkeling de beste bescherming biedt.

Als biologisch materiaal kan gebruik gemaakt worden van bloed, bloedplasma,
10 bloedserum, bloedcelfracties, urine, feces, hersenvocht, sperma, traanvocht, weefsel, celculturen, plantaardig materiaal, bacteriën, gisten en schimmels. Van bepaalde typen plantaardig materiaal, bacteriën (met name gram-positieve bacteriën) en bepaalde gisten en schimmels is het daarin aanwezige nucleïnezuur niet zondermeer beschikbaar voor isolatie. Deze biologische materialen bezitten een speciale celwandstructuur die niet uiteen valt
15 onder invloed van de werking van de gebruikte chaotroop. Voor deze biologische materialen is het vereist dat een monstervoorbereiding plaatsvindt, waardoor het nucleïnezuur toegankelijk wordt gemaakt voor de chaotroop. Deze voorbereiding bestaat uit een cellysis met een lyserend middel, waarna het verkregen lysaat wordt gebruikt in de test. Als lyserend middel kan bijvoorbeeld gebruik gemaakt worden van trypsine.

20

In de test wordt het biologische materiaal, eventueel na voorbereiding, gemengd met een voldoende hoeveelheid chaotroop (als chaotroopbuffer) en silica. Het vrijgemaakte nucleïnezuur bindt aan de silica. Vervolgens wordt de silica met het daaraan gebonden nucleïnezuur gewassen met een wasbuffer. Tenslotte wordt het gebonden nucleïnezuur van
25 de silica geïsoleerd door elutie met behulp van een elutiebuffer.

30

De chaotroop is een verbinding, die in staat is om de secundaire, tertiaire en eventueel quaternaire structuur van eiwitten en nucleïnezuren open te breken, maar de primaire structuur, dat wil zeggen de aminozuurvolgorde respectievelijk nucleotide-volgorde, blijft intact. Voorbeelden van de chaotroop zijn guanidinium (iso)thiocyanaat en guanidine

hydrochloride. Daarnaast kunnen ook natriumjodide (NaI), kaliumjodide, natrium(iso)thiocyanaat, ureum en combinaties daarvan gebruikt worden. Met grote voorkeur wordt als chaotroop bij de test gebruik gemaakt van guanidinium thiocyanaat, omdat daarmee de grootste opbrengst wordt verkregen. De chaotroop wordt als

5 chaotroopbuffer toegepast.

Essentieel voor de test is het gebruik van een vaste adsorptiefase, dat wil zeggen silicadeeltjes die in staat zijn om in een oplossing nucleïnezuur te binden in aanwezigheid van een chaotroop. Onder silica wordt verstaan SiO_2 kristallen en elke andere vorm van siliciumoxide, zoals amorfe siliciumoxide, glaspoeeder en glasvezels. Ook alkylsilica, silica alumina of silica geactiveerd met NH_2 groepen zijn geschikt voor gebruik bij de test. De silicadeeltjes hebben om praktische redenen een grootte die in hoofdzaak is gelegen tussen 0,05 en 500 μm . Het heeft voorkeur silicadeeltjes te gebruiken met een grootte die veelal is gelegen tussen 0,1 en 200 μm . Silicadeeltjes met een grootte tussen 1 en 200 μm hebben de

10 meeste voorkeur aangezien de nucleïnezuurbindende capaciteit van silicadeeltjes groter is naar mate de deeltjes kleiner zijn. Een bijzondere uitvoeringsvorm bestaat uit relatief kleine kolommen van glas of kunststof met daarin op bekende wijze aangebracht een bed van silicadeeltjes. Deze van een silicabed voorziene kolommen kunnen aan onze afnemers worden toegeleverd en zijn direct geschikt voor gebruik in de test. Met name zijn deze

15 kolommen geschikt voor gebruik in geautomatiseerde analyse-apparatuur waarin honderden testen per dag kunnen worden uitgevoerd bij een minimum aantal van uit te voeren handelingen.

In het algemeen wordt het aan de silicadeeltjes gebonden nucleïnezuur gewassen met een wasbuffer. Dit kan een chaotroopbuffer zijn die is gebruikt voor het vrijmaken van het nucleïnezuur uit het biologische materiaal als zodanig.

25

De silicadeeltjes, met daaraan gebonden nucleïnezuur, wordt gemengd met de wasbuffer die na sedimentatie van de silicadeeltjes kan worden afgezogen. Het blijkt nodig om één of een aantal wasstappen uit te voeren. Eventueel is het mogelijk om als laatste wasstap een wassing uit te voeren met een alcohol-water-oplossing (bij voorkeur met 70% ethanol) ten

30

einde verliezen door desorptie te minimaliseren. Hierna kan met aceton een droging worden uitgevoerd.

5 Tenslotte vindt voor het isoleren van het geadsorbeerde en gewassen nucleïnezuur een elutie plaats met een elutiebuffer. Geschikte elutiebuffers zijn bijvoorbeeld Tris.HCl+EDTA-buffer en een zogenaamde PCR-buffer. In principe kan als elutiebuffer elke buffer worden toegepast die een lage ionensterkte bezit. Met name wordt een elutiebuffer gebruikt die geschikt is voor directe toepassing in het daarna volgende onderzoek aan en met het afgescheiden nucleïnezuur.

10

De gehele test kan worden uitgevoerd in een relatief klein reactievat, bijvoorbeeld een bekende Eppendorff-buis van polypropreen met een volume van 1,5 ml, maar zoals hierboven aangegeven ook in een kleine kolom met eenzelfde volume. Het uiteindelijk geïsoleerde nucleïnezuur is aanwezig in een relatief klein volume, bijvoorbeeld kleiner dan 15 100 µl. Het geïsoleerde nucleïnezuur is vrij van nucleïnezuur afbrekende enzymen en is van hoge zuiverheid en kan direct dienen als substraat voor verschillende enzymen, zoals DNA polymerasen, bijvoorbeeld Taq-DNA-polymerasen, DNA-restrictie-enzymen, DNA-ligase, reverse transcriptase en dergelijke.

20 Het hierna gegeven voorbeeld illustreert de uitvinding en de daarin gebruikte materialen.

VOORBEELD

In de handel verkregen silica wordt gebruikt en bezit een deeltjesgrootteverdeling van 0,5 tot 10 µm. 80% van de deeltjes heeft een grootte die is gelegen tussen 1 en 5 µm. 60 g van 25 deze silica werd gesuspenderd in aqua bidest. Na afzuigen van de bovenstaande vloeistof werd 600 µl 32% (w/v) HCl toegevoegd. De suspensie werd afgezogen totdat ongeveer 60 ml resteerde.

30 Na toevoeging van 60 µl 32% (w/v) HCl werd de gevormde suspensie afgevuld in monsters van 4 ml in flesjes met een volume van 6 ml. Deze silicasuspensie werd gebruikt in de navolgende experimenten. In deze experimenten werden houders met de volgende oplossing en buffers gebruikt.

Een houder bevat chaotroopbuffer (die ook als wasbuffer kan worden gebruikt) en bestaat uit 120 g guanidiumthiocyanaat in 100 ml 0,2 M EDTA oplossing met een pH 8.

5 Een houder bevat wasbuffer die bestaat uit 120 g guanidiumthiocyanaat in 0,1 M Tris.HCl oplossing met een pH 6.4.

Een houder bevat elutiebuffer die bestaat uit 10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA oplossing met een pH 7,5.

10

EXPERIMENT 1

Voor het isoleren van DNA uit bloedserum, bloed, waterige feces of urine werd gebruik gemaakt van een Eppendorff-buis (1,5ml) die is gevuld met 900 µl chaotroopbuffer en 40
15 µl silicasuspensie.

Vervolgens werd 50 µl biologisch materiaal toegevoegd en werd innig gemengd gedurende 5-10 seconden. Vervolgens liet men het mengsel bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten staan. Na opnieuw innig mengen werd gecentrifugeerd gedurende 15 sec bij
20 12000xg en werd de bovenstaande vloeistof afgezogen. Vervolgens werd gewassen met de chaotroopbuffer en daarna twee maal gewassen met 70% ethanol en tenslotte één maal met aceton. De pellet werd gedroogd bij 35 °C gedurende 10 minuten. Vervolgens werd het DNA geëluëerd met 50 µl elutiebuffer. Na centrifugatie gedurende twee minuten bij
25 12000xg werd een bovenstaande vloeistof verkregen die het geïsoleerde DNA bevatte.

25

EXPERIMENT 2

Uit humaan plasma, traanvocht en urine werd het totale nucleïnezuur (DNA + RNA) geïsoleerd. Een glazen kolom met daarin aangebracht een bed van silicadeeltjes (80 µl silica suspensie) werd gebruikt. Het biologisch materiaal werd gemengd met 900 µl

chaotroopbuffer en na innig mengen gebracht op de silicakolom. Onder overdruk werd de vloeistof door het silicabed heen gedrukt. Vervolgens werd het silicabed gewassen met de wasbuffer, met 70% ethanol (2x) en één maal met aceton. Elke wasbewerking werd onder druk uitgevoerd. Tenslotte werd op het silicabed 50 µl elutiebuffer gebracht en werd
5 opnieuw onder verhoogde druk door het silicabed heen geëluëerd en werd het eluaat opgevangen dat het uit het biologisch materiaal geïsoleerde nucleïnezuur bevatte.

Onderzoek van het geïsoleerde nucleïnezuur uit beide experimenten toonde aan dat de opbrengst aan geïsoleerde nucleïnezuur groter is dan 95% en dat geen selectieve
10 afscheiding van een bepaald type nucleïnezuur heeft plaatsgevonden. Het nucleïnezuur was geschikt voor hybridisatie-experimenten, waarbij door koppeling met gemerkte complementaire nucleïnezuursequenties de identiteit van het nucleïnezuur kan worden vastgesteld. Het nucleïnezuur bleek ook geschikt voor directe toepassing in PCR en in
15 (amplificeren) van een deel van een nucleïnezuursequentie.

20

25

Document D1: Immobilization of mRNA onto filtermaterial.

30

Using direct RNA immobilization it is possible to develop a new cloning procedure for the screening of nucleic acid.

We have found that mRNA dissolved in a chaotropic salt, such as NaI and when such an extract is passed through a filter such as nitrocellulose membrane or glass fibers the mRNA binds to the filter material.

- 5 The following experiment was done to demonstrate the ability of the binding of mRNA to these filter materials. Human HeLa cells grown in tissue culture were labeled with radioactive uridine. The radioactive RNA was purified from these cells by conventional phenol extraction procedures. The purified radioactive RNA was made in 0.5 M NaCl and passed over a column of oligo(dT)-cellulose, this is a column matrix which binds mRNA and
10 which does not adsorb other RNA. The mRNA was eluted from the column with 0.01 M Tris, pH 9.

The purified mRNA was precipitated from ethanol and dissolved in 0.01 M Tris.HCl, pH 7.0. The mRNA solution was combined with 0.813 volumes of supersaturated NaI (2,5g/ml
15 0.01 M Tris.HCl, pH 7.0). The mRNA solution was passed through a glass fiber filter (Whatman GFC) or nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, BA 85). The filters were washed with 2.7 M NaCl, 0,27 M Nacitrate, pH 7. Radioactive counting revealed that 96% of the radio-activity was present on the filter materials.

- 20 In a second experiment the purified mRNA was bound to nitrocellulose directly from dissolved cells. Cells from a cell line, were released from a culture flask with 0.025% trypsin and washed with 0.5 m NaCl, 0.14 M phosphate buffer, pH 6.8. Packed cells (0.1 g) were suspended in 0.5 ml of 0.5 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 7.2. The cells were treated with the enzymes DNAase and proteinase K in order to remove DNA and
25 proteins.

The practically deproteinized and DNA free cell lysate was combined with 0.813 volumes
30 of the supersaturated NaI in 0.01 M Tris.HCl, pH 7.0). The solution was passed slowly through a nitrocellulose membrane. The RNA filter was washed with 0.01 M Tris.HCl, pH 7.0. Finally, the nitrocellulose membrane was dried at 80 °C for two hours in order to bake the mRNA irreversibly to the nitrocellulose membrane.

Using labeled probes it was verified that the mRNA bound to the nitrocellulose membranes was available for hybridization experiments and that about 80% of the mRNA was retained.

5

10

15

20

Document D2: A simple and rapid procedure for the preparation of DNA of the bacteriophage M13

The bacteria JM103 was transfected with the bacteriophage M13. Clear plaques were
5 picked and grown in 1 ml culture medium for 6 hours. The bacteria were removed from the
culture medium by centrifugation and the remaining suspension comprised the
bacteriophage M13. In a subsequent precipitation step 10 μ l acetic acid was added to 0.1
ml of this bacteriophage M13 suspension in an Eppendorf tube. After mixing was the
supernatant removed and the phage pellet was transferred onto a 7 mm diameter glass fibre
10 filter (GF/C from Whatman International Limited).

This bacteriophage M13 material on the glass fiber filter was treated and washed with
twice 1 ml 4M guanidine hydrochloride, 10 mM Tris.HCl pH 7.1, 1 mM EDTA in order to
bind the bacteriophage M13 DNA to the glass fiber filter.

15

Subsequently, the filter was washed with 1 ml 4M guanidine hydrochloride, 10 mM
Tris.HCl pH 7.1, 1 mM EDTA.

The glass fiber filter was contacted with a radiolabeled probe characteristic for
20 bacteriophage M13 DNA. Radioactive counting revealed that by this simple and rapid
procedure bacteriophage M13 DNA was immobilized on a glass fiber filter.