



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 34 263 T2** 2006.07.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 818 461 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 34 263.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 111 798.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **11.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.01.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.07.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07H 1/08** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**18338196 12.07.1996 JP**

(73) Patentinhaber:

**Toyo Boseki K.K., Osaka, JP**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**DE, FR, GB, NL**

(72) Erfinder:

**Kuroita, Toshihiro, Tsuruga-shi, Fukui 914, JP;  
Kamimura, Hideki, Tsuruga-shi, Fukui 914, JP;  
Kawakami, Bunsei, Tsuruga-shi, Fukui 914, JP;  
Kawamura, Yoshihisa, Tsuruga-shi, Fukui 914, JP**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Isolierung von Ribonucleinsäuren.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Fachgebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure und ein Reagens dafür. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure mit hoher Reinheit in einfacher und zweckmäßiger Weise aus einer Probe, die die Ribonucleinsäure enthält, durch Verwendung eines nucleinsäurebindenden Trägers und auf ein Reagens dafür. Die vorliegende Erfindung kann auch auf eine automatische Nucleinsäure-Extraktionsvorrichtung angewendet werden.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Eine Desoxyribonucleinsäure (DNA) bildet das Genom, das die Information des Lebens trägt. Eine Ribonucleinsäure (RNA) ist ein wichtiges biologisches Polymer, das diese Information empfängt und an der Proteinbiosynthese und dergleichen im Körper beteiligt ist. Die Ribonucleinsäure wird grob in Messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA) unterteilt, die jeweils unterschiedliche Eigenschaften haben. Es gibt einige Viren, die eine Ribonucleinsäure als Genom verwenden, das die Information des Lebens trägt.

**[0003]** Eine Analyse der Ribonucleinsäure ergibt äußerst wichtige Informationen für die Gebiete der Biochemie, Gentechnik, klinische Diagnose und dergleichen. Die Isolierung von Ribonucleinsäure aus einem biologischen Material ist ein wesentlicher Schritt für eine solche Analyse. Es ist notwendig, eine Ribonucleinsäure mit größtmöglicher Reinheit zu verwenden, um gute Ergebnisse in Analysen zu erreichen, wie bei der Northern-Blot-Analyse, Reverse-Transcription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und dergleichen, die auf diesen Gebieten routinemäßig verwendet werden.

**[0004]** Im Allgemeinen kann eine Ribonucleinsäure nicht extrahiert werden, ohne Zellen aufzuschließen, und in diesem Stadium wird die Ribonucleinsäure in einem Gemisch mit Proteinen, Lipiden, Zuckern, Desoxyribonucleinsäure und dergleichen erhalten. Soweit eine Ribonucleinsäure durch Ribonuclease, die man universell in lebenden Organismen findet, leicht abgebaut wird, wird sie in Gegenwart eines Protein-Denaturierungsmittels oder in einem organischen Lösungsmittel isoliert, wodurch die Aktivität der Ribonuclease geschwächt wird. Das zu diesem Zweck am häufigsten verwendete Verfahren ist ein sogenanntes AGPC-Verfahren (Analytical Biochemistry, 162: 156–159 (1987)), das Folgendes umfasst: (1) Extrahieren eines biologischen Materials mit einer Guanidinthiocyanat-Lösung, danach Zugabe einer sauren Lösung, einer Phenollösung und einer Chloroformlösung, (2) Zentrifugieren des resultierenden Gemischs, um mit Phenol denaturierte Proteine und unlöslich gemachte Desoxyribonucleinsäuren in eine Zwischenschicht zwischen einer organischen Schicht und einer wässrigen Schicht abzutrennen, (3) Hinzufügen von Isopropanol zur wässrigen Schicht, um die Ribonucleinsäure darin unlöslich zu machen, und (4) selektives Ausfällen der Ribonucleinsäure durch Zentrifugation. Das AGPC-Verfahren ist insofern vorteilhaft, als man Ribonucleinsäure damit im Vergleich zu anderen Verfahren, die eine Ultrazentrifugation zum Isolieren von Ribonucleinsäure beinhalten, relativ leicht und effizient isolieren kann. Es erfordert jedoch eine giftige Substanz, wie Phenol und Chloroform, sowie einen ziemlich zeitaufwändigen Schritt, wie Isopropanolfällung, was wiederum dazu führt, dass ein unbedenklicheres und zeitsparenderes Verfahren notwendig ist, wenn mehrere Proben gleichzeitig in gemeinsamen Forschungsinstitutionen behandelt werden sollen.

**[0005]** Inzwischen wurde von Boom et al. (J. Clin. Microbiol., 28 (3): 495–503 (1990)) ein anderes, einfaches und zweckmäßiges Verfahren für die Extraktion von Nucleinsäure vorgeschlagen, bei dem Siliciumoxidteilchen als nucleinsäurebindender Träger verwendet werden. Dieses Verfahren beinhaltet (1) das Mischen eines biologischen Materials, einer neutralen Lösung, die aus Guanidinthiocyanat, EDTA und Triton X-100 besteht, und einer nucleinsäurebindenden festen Phase (Siliciumoxid), so dass die Nucleinsäure an die feste Phase gebunden wird, (2) das Abtrennen der festen Phase mit der daran gebundenen Nucleinsäure von der flüssigen Phase, (3) das Waschen der festen Phase mit einer Waschlösung, die Guanidinthiocyanat enthält, (4) das Waschen der festen Phase mit 70% Ethanol, (5) das Waschen der festen Phase mit Aceton, anschließend Trocknen derselben und (6) Eluieren der Nucleinsäure mit einem Eluenten. Dieses Verfahren erlaubt charakteristischerweise die Isolierung der Nucleinsäure ohne Verwendung eines Gifts wie Phenol oder Konzentration mit Isopropanol. Die nach diesem Verfahren erhaltene Ribonucleinsäure enthält eine große Menge Desoxyribonucleinsäure, so dass dieses Verfahren für die Isolierung von Ribonucleinsäure in großer Reinheit ungeeignet ist.

**[0006]** Als ein anderes Isolierungsverfahren für Nucleinsäure unter Verwendung eines Trägers, wie Silicium-

oxidteilchen, ist ein Verfahren bekannt, das das Adsorbieren einer Nucleinsäure in einem Agarose-Gel auf die Oberfläche von Glasteilchen in einer NaI-Lösung und das Abtrennen der Nucleinsäure aus der flüssigen Phase umfasst (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 615 (1979)). Was diesen Verfahren gemeinsam ist, ist die Tatsache, dass Siliciumoxid und Nucleinsäure in einer neutralen Lösung, die ein chaotropes Ion (d.h. ein einwertiges Anion mit einem größeren Innenradius), wie ein Iodid-Ion und ein Thiocyanat-Ion, enthält, gebunden werden. Diese Verfahren zielen jedoch hauptsächlich auf die Isolierung von Desoxyribonucleinsäure, wobei Ribonucleinsäure bisher nur in geringen Ausbeuten isoliert werden kann, und die Isolierung von Ribonucleinsäure allein ist nicht erreichbar. Wiederum sind diese Verfahren für die Isolierung von Ribonucleinsäure ungeeignet.

**[0007]** Ein weiteres Isolierungsverfahren (Lithiumfällungsverfahren) für Ribonucleinsäure wurde beschrieben, und es verwendet die chemische Eigenschaft, dass die Zugabe von Lithium-Ionen zu einer wässrigen Ribonucleinsäure-Lösung zur Insolubilisierung der Ribonucleinsäure führt (Molecular Cloning, 2. Aufl., 1.40 (1989)). Dieses Verfahren erfordert aber dennoch eine Zentrifugation mit hoher Drehzahl, um Ribonucleinsäure auszufällen. Die Entwicklung eines Isolierungsverfahrens für Ribonucleinsäure, das frei von solchen Schwierigkeiten ist, ist also wünschenswert.

#### Kurzbeschreibung der Erfindung

**[0008]** Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren, um eine Ribonucleinsäure schnell und sicher mit hoher Reinheit in einfacher und zweckmäßiger Weise aus einer Probe wie Zellen, zu isolieren, sowie ein Reagens dafür bereitzustellen.

**[0009]** Als Ergebnis verschiedener Untersuchungen wurde jetzt ein Verfahren bereitgestellt, das das Auflösen eines biologischen Materials, wie Zellen, in einer sauren Lösung, die ein Lithiumsalz und ein chaotropes Mittel enthält, und das In-Kontakt-Bringen derselben mit einem nucleinsäurebindenden Träger, wie Siliciumoxidteilchen, umfasst, wodurch die Ausbeute und die Reinheit der isolierten Ribonucleinsäure (d.h. die Selektivität) stark erhöht werden.

**[0010]** WO-A-95/34569 offenbart ein RNA-Absorptionsverfahren. RNA wird aus ihren wässrigen Lösungen, die ein Tensid und ein Lithiumsalz enthalten, auf Siliciumoxid absorbiert. Der pH-Wert der Lösung wird nicht angegeben.

**[0011]** US-A-5,155,015 beschreibt die selektive Isolierung von RNA durch Ansäuern der Lösung für die Absorption, die ein chaotropes Salz, wie Guanidin(iso)thiocyanat, enthält.

**[0012]** Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure bereit, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Mischen einer Probe, die die Ribonucleinsäure enthält, einer sauren Lösung, die ein Lithiumsalz und ein chaotropes Mittel enthält, und eines nucleinsäurebindenden Trägers, so dass die Ribonucleinsäure an den Träger adsorbiert wird, wobei es sich bei dem chaotropen Mittel um ein Guanidinsalz oder Harnstoff handelt, wobei die saure Lösung einen pH-Wert von nicht mehr als 6,0 hat;
- (2) Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers aus einer flüssigen Phase; und
- (3) Eluieren der Ribonucleinsäure von dem Träger.

**[0013]** Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Reagens zum Isolieren einer Ribonucleinsäure bereit, das Folgendes umfasst:

- (a) eine Lösung (pH nicht mehr als 6,0) für die Auflösung und Adsorption, die eine oder mehrere Lithiumverbindungen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat besteht, und ein chaotropes Mittel enthält, wobei es sich bei dem chaotropen Mittel um ein Guanidinsalz oder Harnstoff handelt;
- (b) einen nucleinsäurebindenden Träger, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Kieselsäure, Cellulose, Nitrocellulose, Latex und Hydroxyapatit besteht;
- (c) eine Waschlösung, die ein chaotropes Mittel enthält, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz, Harnstoff, Iodid, Perchlorat und (Iso)thiocyanat besteht;
- (d) eine Waschlösung, bei der es sich um einen Puffer mit einer geringen Salzkonzentration von nicht mehr als 100 mM handelt; und
- (e) eine Lösung zum Eluieren der Ribonucleinsäure von dem Träger.

**[0014]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Herstellen einer cDNA, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) das Umsetzen einer nach dem oben genannten Verfahren isolierten Ribonucleinsäure oder des in dem oben genannten Verfahren verwendeten ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einem Gemisch aus einer Reversen Transcriptase, einem Ribonuclease-Inhibitor, dNTPs, einem Primer für die Reverse Transcription und einem Puffer für die Reverse Transcriptionsreaktion; und
- (2) das Synthetisieren einer cDNA aus der Ribonucleinsäure.

**[0015]** Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung gehen aus den Unteransprüchen hervor.

**[0016]** Gemäß der vorliegenden Erfindung kann eine Ribonucleinsäure schnell und sicher, leicht und in hohen Ausbeuten aus verschiedenen biologischen Materialien isoliert werden. Die nach diesem Verfahren erhaltene Ribonucleinsäure kann zweckmäßigerweise für verschiedene Analysen, wie Northern-Blot-Analyse, RT-PCR-Analyse und dergleichen, verwendet werden.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen

**[0017]** [Fig. 1](#) zeigt ein Agarose-Gel-Elektrophorese-Bild von Ribonucleinsäure, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung bzw. nach dem Verfahren von Boom et al. aus K562-Zellen isoliert wurde.

**[0018]** [Fig. 2](#) ist ein Agarose-Gel-Elektrophorese-Bild, das das Ergebnis einer RT-PCR von Ribonucleinsäuren, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung aus K562 und HL60 isoliert wurden, mit BCR-abl-Fusions-mRNA als Target zeigt.

**[0019]** [Fig. 3](#) ist ein Elektrophoresebild, das das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von HCV-RNA zeigt, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung aus einem Serum isoliert wurde.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0020]** Die Probe, die in der vorliegenden Erfindung eine Ribonucleinsäure enthält, beinhaltet zum Beispiel Serum, Blut, Liquor, Gewebe, Urin, Stuhl, Speichel, Sperma, aus einem biologischen Material (z.B. Blut) isolierte Zellen, kultivierte Zellen und dergleichen. Die Ribonucleinsäure kann neben der endogenen Ribonucleinsäure, die aus diesen Proben stammt, auch exogene Ribonucleinsäure, die aus Viren, Bakterien oder Pilzen stammt, in vitro enzymatisch synthetisierte Ribonucleinsäure und andere beinhalten.

**[0021]** Gemäß der vorliegenden Erfindung werden eine Probe, die eine Ribonucleinsäure enthält, eine saure Lösung, die ein Lithiumsalz und ein chaotropes Mittel enthält, und ein nucleinsäurebindender Träger miteinander gemischt, so dass die Ribonucleinsäure an den Träger gebunden wird.

**[0022]** Die saure Lösung, die ein Lithiumsalz und ein chaotropes Mittel enthält, gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Lösung zum Auflösen und Adsorbieren einer Ribonucleinsäure. Das in der vorliegenden Erfindung zu verwendende Lithiumsalz unterliegt keiner besonderen Einschränkung, solange es in einer wässrigen Lösung ein Lithiumion erzeugen kann. Beispiele dafür sind anorganische Lithiumsalze und organische Lithiumsalze, wie Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat, wobei Lithiumchlorid besonders bevorzugt wird. Es wurde bestätigt, dass das Lithiumsalz im Vergleich zu einem Salz eines einwertigen Kations, das einen größeren Ionenradius besitzt, wie Natrium, leicht mit Ribonucleinsäure koordiniert.

**[0023]** Ein Fällungsverfahren für eine hochmolekulare Ribonucleinsäure, bei dem ein Lithiumion verwendet wird, wird verbreitet verwendet (Molecular Cloning, 2. Aufl., 1.40 (1989)). Gemäß diesen Verfahren wird das Lithiumion verwendet, um Ribonucleinsäure in einer Lösung unlöslich zu machen, und die unlöslich gemachte Ribonucleinsäure wird dann durch Zentrifugation oder Filtration gewonnen. Dagegen ist es in der vorliegenden Erfindung wichtig, eine Ribonucleinsäure auf einem nucleinsäurebindenden Träger, wie Siliciumoxid, unter solchen Bedingungen zu adsorbieren, dass die Ribonucleinsäure nicht unlöslich gemacht wird. Dabei ist die Gegenwart eines proteindenaturierenden (Protein unlöslich machenden) Mittels, wie Guanidinsalz und Harnstoff, in einem Reaktionsgemisch effektiv. Tatsächlich wird bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung eine Probe nicht unlöslich gemacht, solange sie in einer geeigneten Menge vorliegt, während es zur Koagulation von unlöslich gemachten Komponenten kommen kann, wenn sie in einer extrem großen Menge verwendet wird. In der vorliegenden Erfindung sollten unlöslich gemachte Ribonucleinsäure oder andere unlöslich gemachte Komponenten daher entfernt werden, oder die Menge der Probe sollte reduziert werden.

**[0024]** "Chaotropes Mittel" bedeutet eine Substanz, die eine Sekundär-, Tertiär- und/oder Quartärstruktur än-

dern kann, ohne einen Einfluss auf die Primärstruktur eines Proteins oder einer Nucleinsäure auszuüben. Beispiele für das chaotrope Mittel, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden soll, umfassen eine Verbindung, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz und Harnstoff besteht.

**[0025]** Beispiele für das Guanidinsalz, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden soll, sind ein anorganisches Guanidinsalz oder ein organisches Guanidinsalz, die im Allgemeinen für die Denaturierung eines Proteins verwendet werden, wie Guanidin-Hydrochlorid, Guanidiniumacetat, Guanidiniumphosphat, Guanidinium(iso)thiocyanat, Guanidiniumsulfat und Guanidiniumcarbonat. Es können auch zwei oder mehr der oben genannten Salze miteinander kombiniert werden, wobei das Guanidinsalz vorzugsweise eine hohe Konzentration von nicht weniger als 5 M aufweist.

**[0026]** Die Lösung zum Auflösen und Adsorbieren kann ein Tensid enthalten, um die Plasmamembran aufzureißen und/oder intrazelluläre Proteine löslich zu machen. Das Tensid unterliegt keiner besonderen Einschränkung, solange es allgemein verwendet werden kann, um eine Nucleinsäure aus Zellen und dergleichen zu extrahieren. Spezielle Beispiele dafür sind ein nichtionisches Tensid, wie Triton-Tensid und Tween-Tensid, und ein anionisches Tensid, wie Natrium-N-lauroylsarcosinat. In der vorliegenden Erfindung liegt ein nichtionisches Tensid vorzugsweise in einem Anteil von 0,01–0,5% vor.

**[0027]** Um die Ribonucleinsäure vor Ribonuclease zu schützen, kann ein Antioxidans, wie 2-Mercaptoethanol und Dithiothreitol, zu der Lösung zum Auflösen und Adsorbieren gegeben werden.

**[0028]** Eine bestimmte Art von Probe kann sich in der Lösung zum Auflösen und Adsorbieren gemäß der vorliegenden Erfindung nicht auflösen. Zum Beispiel haben Pflanzen, Hefe, Pilze und bestimmte Gram-positive Bakterien spezielle Zellwandstrukturen, die eine Isolierung von Ribonucleinsäure durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung verhindern. Wenn eine Ribonucleinsäure aus einer solchen Probe isoliert wird, wird jede Probe vorbehandelt (z.B. wird die Zellwand entfernt) und dann nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung behandelt.

**[0029]** In der vorliegenden Erfindung wird eine Probe, die unter sauren Bedingungen von nicht mehr als pH 6,0 in der oben genannten Lösung zum Auflösen und Adsorbieren aufgelöst wurde, mit einem nucleinsäurebindenden Träger, wie Siliciumoxidteilchen, in Kontakt gebracht. Damit dies erreicht werden kann, sollte die Lösung zum Auflösen und Adsorbieren mit einem geeigneten Puffer gepuffert werden. Der hier verwendete Puffer unterliegt keiner besonderen Einschränkung, solange er den pH-Wert der Lösung zum Auflösen und Adsorbieren auf nicht mehr als 6,0 einstellen kann. In der vorliegenden Erfindung wird am meisten bevorzugt ein Acetatpuffer oder Citratpuffer mit einem pH von 3–4 verwendet.

**[0030]** Die vorliegende Erfindung ist auch durch die Verwendung eines nucleinsäurebindenden Trägers, wie Siliciumoxid, Cellulose, Nitrocellulose, Latex und Hydroxyapatit, der in der oben genannten Lösung zum Auflösen und Adsorbieren an eine Ribonucleinsäure binden kann, gekennzeichnet. Der Ausdruck "Siliciumoxid" umfasst in diesem Zusammenhang kristallines Siliciumdioxid und andere Siliciumoxide, Diatomeenerde, Glaspulver und chemisch modifizierte Kieselsäure. Der nucleinsäurebindende Träger kann zum Beispiel ein Komplex aus der oben genannten Substanz und einem supermagnetischen Metalloxid sein. Bevorzugt ist ein Siliciumoxidträger, der ein supermagnetisches Metalloxid, wie Trieisentetroxid, enthält. Der nucleinsäurebindende Träger kann zum Beispiel in Form eines Teilchens, Filters, Reaktionsbehälters und dergleichen vorliegen, unterliegt jedoch keiner besonderen Einschränkung. Von diesen sind Teilchen im Hinblick auf die Effizienz der Adsorption und Elution bevorzugt, wobei die Teilchengröße je nach Verwendung in geeigneter Weise aus dem bevorzugten Bereich von 0,05–500 µm ausgewählt wird.

**[0031]** Der durch den oben genannten Schritt erhaltene ribonucleinsäuregebundene Träger wird aus der flüssigen Phase isoliert, indem man zum Beispiel die flüssige Phase durch Filtration oder Zentrifugation entfernt. Alternativ dazu kann ein Magnetfeld verwendet werden, um den ribonucleinsäuregebundenen Träger aus der flüssigen Phase zu isolieren. Wenn der Träger ein Filter oder Reaktionsgefäß ist, braucht die Flüssigkeit nur ausgeleert oder entfernt zu werden.

**[0032]** Der durch den oben genannten Schritt erhaltene ribonucleinsäuregebundene Träger wird zum Beispiel dadurch gewaschen, dass man den ribonucleinsäuregebundenen Träger zum Beispiel mit einem Vortexmischer in einer geeigneten Waschlösung suspendiert und den Träger aus der flüssigen Phase isoliert. Der ribonucleinsäuregebundene Träger wird vorzugsweise durch Zentrifugation, Filtration, Säulenmanipulation und dergleichen isoliert. Ein ribonucleinsäurebindender Träger, der ein supermagnetisches Metalloxid in den Teilchen enthält, kann leicht mit Hilfe eines Magneten isoliert werden, und dieser Modus ist am meisten zu bevor-

zugen.

**[0033]** Die Waschlösung der vorliegenden Erfindung enthält vorzugsweise ein chaotropes Mittel, vorzugsweise ein Guanidinsalz. Die Konzentration des Guanidinsalzes in der Waschlösung ist vorzugsweise nicht kleiner als 6 M. Diese Lösung kann ein Tensid enthalten und unterliegt keinerlei besonderen Einschränkung bezüglich ihres pH-Werts.

**[0034]** In der vorliegenden Erfindung wird der ribonucleinsäuregebundene Träger, der durch Waschen mit einer chaotropen Mittel enthaltenden Waschlösung erhalten wird, vorzugsweise weiterhin mit einem Puffer gewaschen, der eine geringe Salzkonzentration hat. "Geringe Salzkonzentration" bedeutet hier eine Salzkonzentration, bei der eine Reverse Transcription nicht wesentlich gehemmt wird, wenn dieser Puffer im endgültigen Eluat, das die Ribonucleinsäure enthält, vorhanden ist, und ein Beispiel dafür ist Wasser. In der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise ein Puffer mit einer Konzentration von nicht mehr als 100 mM verwendet, wobei Tris-Puffer besonders bevorzugt ist, obwohl es hier keinerlei Einschränkung gibt. Diese Lösung kann ein Tensid enthalten und unterliegt keiner besonderen Einschränkung bezüglich ihres pH-Werts.

**[0035]** Bei dem herkömmlichen Verfahren unter Verwendung eines Trägers zum Isolieren von Nucleinsäure wird in diesem Waschstadium ein organisches Lösungsmittel, wie Ethanol und Aceton, verwendet, so dass es notwendig ist, den Träger zu trocknen. Dagegen kann eine Ribonucleinsäure in der vorliegenden Erfindung ohne einen Trocknungsschritt eluiert werden. Dies ist äußerst vorteilhaft, um die für die Isolierung von Ribonucleinsäure notwendige Zeit zu verkürzen, sowie am meisten zu bevorzugen, um eine Kontamination, die dadurch verursacht wird, dass während des Trocknens ein offenes System vorliegt, zu verhindern. "Kontamination" bedeutet hier eine Kreuzkontamination zwischen Proben und die Gegenwart einer amplifizierten Nucleinsäure in PCR und dergleichen. Eine solche Kontamination gilt als Hauptursache für eine fehlerhafte Beurteilung bei der analytischen Diagnose von Infektionen durch RT-PCR.

**[0036]** Im Elutionsschritt der Ribonucleinsäure in der vorliegenden Erfindung wird eine Ribonucleinsäure von einem nucleinsäuregebundenen Träger eluiert, an den die Ribonucleinsäure adsorbiert wurde. Der zu diesem Zweck zu verwendende Eluent unterliegt keiner besonderen Einschränkung, solange er Ribonucleinsäure von dem Träger eluieren kann. Bevorzugt wird Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris-Puffer, 1 mM EDTA, pH 8,0). Außerdem kann die Elution durch Erhitzen beschleunigt werden. Die Temperatur, auf die erhitzt wird, unterliegt keiner besonderen Einschränkung, solange kein nachteiliger Einfluss auf die Ribonucleinsäure vorliegt. Eine bevorzugte Temperatur beträgt etwa 60°C. Die auf diese Weise eluierte Ribonucleinsäure kann ohne Entsalzung oder Konzentration, wie Dialyse und Ethanol-fällung, direkt für die cDNA-Synthese unter Verwendung einer Reversen Transcriptase verwendet werden. Sie kann auch ohne Elution vom Träger für eine Reverse Transcriptionsreaktion auf dem ribonucleinsäuregebundenen Träger verwendet werden.

**[0037]** Das Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure der vorliegenden Erfindung ermöglicht eine effiziente Isolierung von Ribonucleinsäure aus einer biologischen Komponente mit weniger Kontamination der Desoxyribonucleinsäure durch eine einfache Arbeitsweise ohne Verwendung eines schädlichen Lösungsmittels, so dass es zweifellos für einen Ribonucleinsäure-Reinigungs-Kit und eine Nucleinsäure-Extraktionsvorrichtung, die automatisch die Herstellung der festen Phase und die Ausgabe eines Reagens durchführt, verwendet werden kann. Außerdem kann die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhaltene Ribonucleinsäure für die Northern-Blot-Analyse oder als Matrize für die Amplifikation bei der RT-PCR-Analyse, für das in EP 0 329 822 offenbarte NASBA-Verfahren und dergleichen verwendet werden.

**[0038]** Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Mischen einer Probe, die die Ribonucleinsäure enthält, einer sauren Lösung (pH nicht mehr als 6,0), die eine oder mehrere Lithiumverbindungen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat besteht, und ein chaotropes Mittel enthält, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz und Harnstoff besteht, so dass die Ribonucleinsäure an den Träger adsorbiert wird;
- (2) Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers aus einer flüssigen Phase unter Verwendung eines Magnetfelds;
- (3) Waschen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einer Waschlösung, die eine Verbindung enthält, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz, Harnstoff, Iodid, Perchlorat und (Iso)thiocyanat besteht, und Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers unter Verwendung eines Magnetfelds;
- (4) Waschen des Trägers mit einem Puffer mit einer geringen Salzkonzentration von nicht mehr als 100 mM

und Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers unter Verwendung eines Magnetfelds; und  
 (5) Eluieren der Ribonucleinsäure mit einer Lösung, die die Ribonucleinsäure von dem Träger abtrennen kann.

**[0039]** Das Reagens zum Isolieren von Ribonucleinsäure der vorliegenden Erfindung umfasst zum Beispiel (a) eine Lösung (pH nicht mehr als 6,0) zum Auflösen und Adsorbieren von Ribonucleinsäure, wobei die Lösung eine oder mehrere Verbindungen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat besteht, und eine Verbindung, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz und Harnstoff besteht, enthält, (b) einen nucleinsäurebindenden Träger, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Kieselsäure, Cellulose, Nitrocellulose, Latex und Hydroxyapatit besteht, und der vorzugsweise ein supermagnetisches Metalloxid enthält, (c) eine Waschlösung, die eine Verbindung enthält, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz, Harnstoff, Iodid, Perchlorat und (Iso)thiocyanat besteht, (d) eine Waschlösung, bei der es sich um einen Puffer mit einer geringen Salzkonzentration von nicht mehr als 100 mM handelt, und (e) einen Eluenten zum Eluieren der Ribonucleinsäure von dem Träger.

**[0040]** Das Verfahren zur Herstellung von cDNA der vorliegenden Erfindung umfasst die Schritte (1) des Umsetzens der nach dem oben genannten Verfahren isolierten Ribonucleinsäure oder des in dem oben genannten Verfahren verwendeten ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einem Gemisch aus einer Reversen Transcriptase, einem Ribonuclease-Inhibitor, dNTPs, einem Primer für die Reverse Transcription und einem Puffer für die Reverse Transcriptionsreaktion und (2) des Synthetisierens einer cDNA aus der Ribonucleinsäure.

**[0041]** Es können Reverse Transcriptase von AMV und Reverse Transcriptase von M-MLV als Reverse Transcriptase sowie Tth-DNA-Polymerase verwendet werden. Die dNTPs sind ein Gemisch von dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Der Primer für die Reverse Transcription kann zum Beispiel ein sequenzspezifischer Primer, ein Oligo-dT-Primer, ein statistischer Primer oder dergleichen sein. Der Puffer für die Reverse Transcriptionsreaktion enthält anorganische Salze, wie  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$  und KCl, und hat einen pH-Wert, der so eingestellt ist, dass man eine optimale Reverse Transcriptionsreaktion erhält.

**[0042]** Die vorliegende Erfindung wird ausführlicher anhand von Beispielen beschrieben, die nicht als Einschränkung der Erfindung angesehen werden sollten.

#### Beispiel 1: Extraktion von Ribonucleinsäure aus kultivierten humanen Zellen

##### (1) Herstellung von K562-Zellen

**[0043]** Die Zellen der humanen Zelllinie K562 der chronischen myelogenen Leukämie (ATCC, CCL243) wurden 3 Tage lang bei 37°C in einem RPMI1640-Medium (Nissui Seiyaku), das 10% fetales Kälber-serum enthielt, kultiviert und dann zentrifugiert (1000 U/min, 5 min), um Überstand zu entfernen. Die Zellen wurden in PBS (–) (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,4 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 7,4) suspendiert. Die Zellen wurden mit einem Hämatometer gezählt und in einer Menge von  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Mikroröhrchen gegeben. Der Überstand wurde durch Zentrifugation mit 1000 U/min während 5 min entfernt, was ein Zellsediment ergab, das als Probe verwendet werden sollte. Dieselbe Arbeitsweise bei der humanen Zelllinie HL60 der promyeloischen Leukämie (ATCC, CCL240) ergab ein Zellsediment.

##### (2) Extraktion von Ribonucleinsäure

(a) Zu K562-Zell- und HL60-Zellsediment ( $1 \times 10^6$  Zellen), die oben in (1) hergestellt wurden, in Mikroröhrchen wurden jeweils 700 µl einer Lösung zum Auflösen und Adsorbieren (6 M Guanidin-Hydrochlorid, 1 M Lithiumchlorid, 0,2 M Natriumacetat-Hydrochlorid-Puffer (pH 3,0), 0,1% Triton X-100, 0,1 M 2-Mercaptoethanol) gegeben, und die Zellen wurden vollständig aufgelöst. Dazu wurde eine Suspension (20 µl) von magnetischen Siliciumoxidteilchen (0,5 g/ml, Teilchengröße 1–10 µl, enthält 30% Triesentetraoxid-Teilchen, spezifische Oberfläche 280 cm<sup>2</sup>/g, Oberflächenporendurchmesser 2–6 nm, Porenvolumen 0,025 ml/g; hergestellt von Suzuki Yushi) in Wasser gegeben, und es wurde 2 min lang bei Raumtemperatur mit einem Vortexmischer gemischt. Dann wurden die Mikroröhrchen auf ein Magnetstativ (MCP-M; hergestellt von Dynal) gestellt, um magnetische Siliciumoxidteilchen zu sammeln. Der Überstand wurde mit einer Pipette ent-

fernt. Die Mikroröhrchen wurden aus dem Magnetstativ entnommen, und 1 ml einer Waschlösung [6 M Guanidin-Hydrochlorid, 0,2 M Natriumacetat-Hydrochlorid-Puffer (pH 4,0)] wurde hinzugefügt. Unter Verwendung eines Vortexmischers wurde das Gemisch etwa 10 Sekunden lang gerührt, und die Mikroröhrchen wurden wieder auf das Magnetstativ gestellt, um magnetische Siliciumoxidteilchen zu sammeln, und dann wurde der Überstand entfernt. Dann wurden die Teilchen dreimal mit 10 mM Tris-Puffer (1 ml, pH 6,4) gewaschen, und der Puffer wurde vollständig entfernt. Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris-Puffer, 1 mM EDTA, 50 µl, pH 8,0) wurde hinzugefügt, und die magnetischen Siliciumoxidteilchen wurden durch Pipettieren suspendiert. Dann wurde die Suspension eine Minute lang auf 60°C erhitzt. Die Mikroröhrchen wurden wieder auf ein Magnetstativ gestellt, um magnetische Siliciumoxidteilchen zu sammeln, und der Überstand wurde gewonnen.

(b) Unter Verwendung dieser Probe und gemäß dem Verfahren von Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (3): 495–503 (1990)) wurde eine Ribonucleinsäure extrahiert. Eine Probe, L6-Puffer (900 µl, Guanidinthiocyanat 120 g, Tris-HCl-Puffer (pH 6,4) 100 ml, 0,2 M EDTA (pH 8,0) 22 ml, Triton X-100 2,6 g) und eine auf 1 g/ml eingestellte Suspension (40 µl) von Siliciumoxidteilchen (hergestellt von Sigma) wurden miteinander gemischt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zentrifugation bei 12 000 × g während 5 Minuten wurde der Überstand entfernt. Die Sedimente wurden in einem L2-Puffer (1 ml, Guanidiniumthiocyanat 120 g, 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,4) 100 ml) suspendiert und 5 Minuten lang mit 12 000 × g zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt, und die Sedimente wurden zweimal in derselben Weise mit 70% Ethanol (1 ml) gewaschen. Nach dem Waschen mit Aceton (1 ml) wurden die Sedimente bei 56°C getrocknet. Die Nucleinsäure wurde mit einem Tris-EDTA-Puffer eluiert. Nach 10 Minuten Erhitzen auf 56°C wurden Siliciumoxidteilchen durch Zentrifugation ausgefällt, und der Überstand wurde gewonnen.

### (3) Analyse von Ribonucleinsäure durch Agarose-Gel-Elektrophorese

**[0044]** Gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung und nach Boom et al. wurden eine Ribonucleinsäurelösung (9 µl), die aus K562-Zellen erhalten wurde, und eine Farbstofflösung (1 µl, 50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau) miteinander gemischt und in einen Schlitz in einem 1%igen Agarose-Gel gegeben. Unter Verwendung einer Mupid-Elektrophorese-Vorrichtung (hergestellt von Cosmo Bio) wurde das Gel 30 Minuten lang einer Elektrophorese in 1 × TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA·2Na) bei 100 V unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Minuten lang in eine Ethidiumbromidlösung eingetaucht, leicht mit Leitungswasser abgespült, und das angefärbte Gel wurde unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer Polaroid-Kamera photographiert. Bei diesem Verfahren konnten die aus Zellen stammende Desoxyribonucleinsäure (genomische DNA) sowie zwei typische Ribonucleinsäuren (28S-rRNA und 18S-rRNA), die in vergleichsweise großen Mengen in Zellen vorhanden sind, nachgewiesen werden. Das Migrationsmuster ist in [Fig. 1](#) gezeigt, wobei Spur 1 ein Molekulargewichtsmarker ist, bei dem es sich um ein HindIII-Abbauprodukt von λ-Phagen-DNA handelte, Spur 2 eine Ribonucleinsäure ist, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung isoliert wurde, und Spur 3 eine Ribonucleinsäure ist, die nach dem Verfahren von Boom et al. erhalten wurde. Wie aus [Fig. 1](#) hervorgeht, zeigte die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhaltene Ribonucleinsäure (rRNA) eine größere Ausbeute als die Ribonucleinsäure, die nach dem Verfahren von Boom et al. erhalten wurde, und weniger Kontamination mit Desoxyribonucleinsäure.

### (4) Amplifikation von BCR/abl-Fusions-mRNA durch RT-PCR

**[0045]** Unter Verwendung der Ribonucleinsäure, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, wurde BCR/abl-Fusions-mRNA, die spezifisch in K562-Zellen exprimiert wird, durch RT-PCR nachgewiesen. Zu Ribonucleinsäurelösungen (jeweils 5 ml), die von K562-Zellen und HL60-Zellen stammten und nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, wurden Reverse Transcriptase von M-MLV (hergestellt von Toyobo), Ribonuclease-Inhibitor (hergestellt von Toyobo), dNTPs, statistischer Primer und Reaktionspuffer gegeben, um eine optimale Konzentration zu erreichen. Davon wurden 20 µl 1 Stunde lang bei 37°C und 5 Minuten lang bei 95°C behandelt und dann auf Eis gekühlt. Zu einem Gemisch von Primern zur Amplifikation der BCR/abl-FusionsmRNA-Sequenz, dNTPs, Reaktionspuffer und Taq-DNA-Polymerase (hergestellt von Toyobo) wurden dann 5 µl der oben genannten cDNA-Lösung gegeben, die durch Reverse Transcriptionsreaktion erhalten wurde, so dass man eine Gesamtmenge von 50 µl erhielt, und ein Mineralöl (hergestellt von Sigma) wurde darüber geschichtet. Unter Verwendung eines DNA Thermal Cycler (hergestellt von Perkin Elmer Cetus) wurde ein Zyklus von 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 55°C und 1 Minute bei 72°C 30mal wiederholt.



## (5) Nachweis von Amplifikationsprodukten durch Agarose-Gel-Elektrophorese

**[0046]** Ein Amplifikationsprodukt (9 µl) und eine Farbstofflösung (1 µl, 50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau) wurden miteinander gemischt und in einen Schlitz in einem 1,5%igen Agarose-Gel gegeben. Unter Verwendung einer Mupid-Elektrophorese-Vorrichtung (hergestellt von Cosmo Bio) wurde das Gel 30 Minuten lang einer Elektrophorese in 1 × TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA·2Na) bei 100 V unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Minuten lang in eine Ethidiumbromidlösung eingetaucht, leicht mit Leitungswasser abgespült, und das angefärbte Gel wurde unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer Polaroid-Kamera photographiert. Als Ergebnis wurde eine Bande, die einem amplifizierten Fragment entsprach, das von der BCR/abl-Fusions-mRNA stammte, nur dann erkannt, wenn aus K562-Zellen extrahierte RNA als Matrice verwendet wurde, und eine solche Bande wurde im Falle von HL60-Zellen, die dieses Gen nicht exprimieren, nicht gefunden (**Fig. 2**). In dem in **Fig. 2** gezeigten Migrationsmuster ist Spur 1 ein Molekulargewichtsmarker, bei dem es sich um ein HincII-Abbauprodukt von ϕX174-Phagen-DNA handelte, Spur 2 ist ein RT-PCR-Amplifikationsprodukt von Ribonucleinsäure, die aus K562-Zellen stammt, und Spur 3 ist ein RT-PCR-Amplifikationsprodukt von Ribonucleinsäure, die aus HL60-Zellen stammt. Wie aus **Fig. 2** hervorgeht, ermöglichte das Verfahren der vorliegenden Erfindung die Isolierung von mRNA aus Zellproben, und die erhaltene mRNA erlaubte in ausreichendem Maße eine Analyse durch RT-PCR.

## Beispiel 2: Nachweis von Hepatitis-C-Virus-(HCV)-RNA durch RT-PCR

## (1) Extraktion von HCV-RNA aus einem Serum

**[0047]** Serumproben von Patienten mit Hepatitis C, die  $1 \times 10^5$  Kopien HCV/ml enthielten, wurden durch Verwendung eines normalen Serums in einer Verdünnungsreihe von  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  bzw.  $10^2$  Kopien/ml hergestellt. Jede Serumprobe (100 µl) wurde für die Extraktion von HCV-RNA nach dem Verfahren von Beispiel 1 (2) (a) verwendet.

## (2) Amplifikation von HCV-RNA durch RT-PCR

**[0048]** Die HCV-RNA wurde nach dem Verfahren von Okamoto et al. (J. Exp. Med., 60: 215–222 (1990)) durch RT-PCR analysiert. Zu der in (1) erhaltenen Lösung (5 µl) wurden Reverse Transcriptase von M-MLV (hergestellt von Toyobo), Ribonuclease-Inhibitor (hergestellt von Toyobo), dNTPs, statistischer Primer und Reaktionspuffer gegeben, um eine optimale Konzentration zu erreichen. Davon wurden 10 µl 1 Stunde lang bei 42°C und 5 Minuten lang bei 95°C behandelt und dann auf Eis gekühlt. Zu einem Gemisch von Primern zur Amplifikation des nichtcodierenden Bereichs von HCV-RNA, dNTPs, Reaktionspuffer und Taq-DNA-Polymerase (hergestellt von Toyobo) wurden dann 2,5 µl der oben genannten cDNA-Lösung gegeben, die durch Reverse Transcriptionsreaktion erhalten wurde, so dass man eine Gesamtmenge der Flüssigkeit von 25 µl erhielt, und ein Mineralöl (hergestellt von Sigma) wurde darüber geschichtet. Unter Verwendung eines DNA Thermal Cycler (hergestellt von Perkin Elmer Cetus) wurde ein Reaktionszyklus von 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 55°C und 1 Minute bei 72°C 30mal wiederholt. Dann wurde das durch diese Reaktionen erhaltenen Amplifikationsprodukt (1 µl) erneut in 30 PCR-Cyclen unter Verwendung von inneren Primern amplifiziert; 2-Stufen-PCR.

## (3) Nachweis von amplifizierter DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese

**[0049]** Ein Amplifikationsprodukt (9 µl) und eine Farbstofflösung (1 µl, 50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau) wurden miteinander gemischt und in einen Schlitz in einem 1,5%igen Agarose-Gel gegeben. Unter Verwendung einer Mupid-Elektrophorese-Vorrichtung (hergestellt von Cosmo Bio) wurde das Gel 30 Minuten lang einer Elektrophorese in 1 × TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA·2Na) bei 100 V unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Minuten lang in eine Ethidiumbromidlösung eingetaucht, leicht mit Leitungswasser abgespült, und das angefärbte Gel wurde unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer Polaroid-Kamera photographiert. Als Ergebnis wurde bis zu einem Serum von  $10^3$  Kopien/ml eine spezifische Amplifikationsbande nachgewiesen, und vom Virus stammende Ribonucleinsäure wurde effizient isoliert, was eine mögliche Analyse durch RT-PCR nahelegte (**Fig. 3**). In **Fig. 3** ist Spur 1 ein Molekulargewichtsmarker, bei dem es sich um ein HaeIII-Abbauprodukt von ϕX174-Phagen-DNA handelte, die Spuren 2–5 sind RT-PCR-Amplifikationsprodukte, wobei Ribonucleinsäuren, die aus Seren extrahiert wurden, welche  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  bzw.  $10^2$  Kopien HCV/ml enthielten, als Matrizen verwendet wurden, und Spur 6 ist ein RT-PCR-Amplifikationsprodukt, das unter Verwendung von Ribonucleinsäure, die aus normalem Serum extrahiert wurde, als Matrice erhalten wurde.

Beispiel 3: Extraktion von Ribonucleinsäure unter Verwendung von Lösungen zum Auflösen und Adsorbieren mit verschiedenen Zusammensetzungen

**[0050]** Unter Verwendung von Lösungen zum Auflösen und Adsorbieren mit verschiedenen Zusammensetzungen, die unten in Tabelle 1 gezeigt sind, und in derselben Weise wie in Beispiel 1 (2) (a) wurde Nucleinsäure aus der K562-Zelllinie ( $2 \times 10^6$  Zellen) extrahiert. Jeder Extrakt wurde einer Agarose-Gel-Elektrophorese unterzogen, und die Intensität der Bande wurde in drei Graden bewertet, wobei die Ergebnisse in Tabelle 1 gezeigt sind. In Tabelle 1 zeigt die Zahl der "+"-Zeichen den Grad der Intensität der Bande an, wobei größere Zahlen von "+"-Zeichen intensivere Banden bedeuten, "-" eine nicht nachweisbare Bande bedeutet, GuHCl Guanidin-Hydrochlorid ist und GuSCN Guanidinthiocyanat ist.

Tabelle 1

Nr.	Lösung zum Auflösen und Adsorbieren	28S-rRNA	18S-rRNA	Genomische DNA
1	5 M GuHCl, 1,5 M LiCl, 0,2 M NaOAc-HCl (pH 3,0)	+++	+++	-
2*	5 M GuHCl, 0,2 M NaOAc-HCl (pH 3,0)	++	++	+
3*	5 M GuHCl, 1,5 M LiCl, 0,2 M Tris-HCl (pH 6,5)	-	-	+++
4*	5 M GuHCl, 0,2 M Tris-HCl (pH 6,5)	-	-	+++
5	5 M GuSCN, 1,5 M LiCl, 0,2 M NaOAc-HCl (pH 4,0)	+++	+++	-
6*	5 M GuSCN, 0,2 M NaOAc-HCl (pH 4,0)	++	++	+
7*	5 M GuSCN, 1,5 M LiCl, 0,2 M Tris-HCl (pH 6,5)	-	-	+++
8*	5 M GuSCN, 0,2 M Tris-HCl (pH 6,5)	-	-	+++

\* nicht gemäß der Erfindung

**[0051]** Die Ergebnisse zeigen an, dass eine saure Lösung zum Auflösen und Adsorbieren, die ein Lithiumsalz und ein chaotropes Mittel enthält, die Selektivität des nucleinsäurebindenden Trägers bezüglich der RNA-Adsorption merklich verbesserte, was zu höheren RNA-Ausbeuten führte.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Mischen einer Probe, die die Ribonucleinsäure enthält, einer sauren Lösung, die ein Lithiumsalz und ein chaotropes Mittel enthält, und eines nucleinsäurebindenden Trägers, so dass die Ribonucleinsäure an den Träger adsorbiert wird, wobei es sich bei dem chaotropen Mittel um ein Guanidinsalz oder Harnstoff handelt, wobei die saure Lösung einen pH-Wert von nicht mehr als 6,0 hat;
- (2) Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers aus einer flüssigen Phase; und
- (3) Eluieren der Ribonucleinsäure von dem Träger.

2. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei das Guanidinsalz ein Vertreter ist, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Guanidin-Hydrochlorid, Guanidinacetat, Guanidinphosphat, Guanidin(iso)thiocyanat, Guanidinsulfat und Guanidincarbonat besteht.

3. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei die Probe, die die Ribonucleinsäure enthält, ein Vertreter ist, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Serum, Blut, Gewebe, Urin, Stuhl, Speichel, aus biologischem Material isolierten Zellen und kultivierten Zellen besteht.

4. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei das Lithiumsalz ein anorganisches Lithiumsalz oder ein organisches Lithiumsalz ist.

5. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei das Lithiumsalz wenigstens ein Vertreter ist, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat besteht.

6. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei der nucleinsäurebindende Träger Kieselsäure enthält.
7. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei der nucleinsäurebindende Träger ein Teilchen ist.
8. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei der nucleinsäurebindende Träger ein supermagnetisches Metalloxid enthält.
9. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, das nach der Isolierung des ribonucleinsäuregebundenen Trägers aus der flüssigen Phase weiterhin einen Schritt des Waschens des ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einer Waschlösung umfasst.
10. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, das nach der Isolierung des ribonucleinsäuregebundenen Trägers aus der flüssigen Phase weiterhin einen Schritt des Waschens des ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einer Waschlösung, die ein chaotropes Mittel enthält, umfasst.
11. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 10, das nach dem Waschen des Trägers mit der Waschlösung, die das chaotrope Mittel enthält, weiterhin einen Schritt des Waschens des ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einem Puffer mit einer geringen Salzkonzentration umfasst.
12. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 11, wobei der Puffer eine Salzkonzentration von nicht mehr als 100 mM hat.
13. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 11, das nach dem Waschen des Trägers mit dem Puffer weiterhin einen Schritt des Eluierens der Ribonucleinsäure unter Verwendung einer Lösung, die die Ribonucleinsäure eluieren kann, von dem ribonucleinsäuregebundenen Träger umfasst.
14. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei die Ribonucleinsäure von dem ribonucleinsäuregebundenen Träger eluiert wird, indem man den Träger erhitzt.
15. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei der nucleinsäurebindende Träger ein supermagnetisches Metalloxid enthält und der Träger, der die Ribonucleinsäure trägt, unter Verwendung eines Isolationsmagnetfelds aus der flüssigen Phase isoliert wird.
16. Verfahren zum Isolieren einer Ribonucleinsäure, das die folgenden Schritte umfasst:
  - (1) Mischen einer Probe, die die Ribonucleinsäure enthält, einer sauren Lösung (pH nicht mehr als 6,0), die eine oder mehrere Lithiumverbindungen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat besteht, und ein chaotropes Mittel enthält, wobei es sich bei dem chaotropen Mittel um ein Guanidinsalz oder Harnstoff handelt, und eines nucleinsäurebindenden Trägers, der ein supermagnetisches Metalloxid enthält, so dass die Ribonucleinsäure an den Träger adsorbiert wird;
  - (2) Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers aus einer flüssigen Phase unter Verwendung eines Magnetfelds;
  - (3) Waschen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einer Waschlösung, die ein chaotropes Mittel enthält, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Guanidinsalz, Harnstoff, Iodid, Perchlorat und (Iso)thiocyanat besteht, und Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers unter Verwendung eines Magnetfelds;
  - (4) Waschens des Trägers mit einem Puffer mit einer geringen Salzkonzentration von nicht mehr als 100 mM und Abtrennen des ribonucleinsäuregebundenen Trägers unter Verwendung eines Magnetfelds; und
  - (5) Eluieren der Ribonucleinsäure mit einer Lösung, die die Ribonucleinsäure abtrennen kann, von dem Träger.
17. Reagens zum Isolieren einer Ribonucleinsäure, das Folgendes umfasst:
  - (a) eine Lösung (pH nicht mehr als 6,0) für die Auflösung und Adsorption, die eine oder mehrere Lithiumverbindungen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Lithiumchlorid, Lithiumacetat, Lithiumcitrat, Lithiumcarbonat, Lithiumhydroxid und Lithiumborat besteht, und ein chaotropes Mittel enthält, wobei es sich bei dem chaotropen Mittel um ein Guanidinsalz oder Harnstoff handelt;
  - (b) einen nucleinsäurebindenden Träger, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Kieselsäure, Cellulose, Nitrocellulose, Latex und Hydroxyapatit besteht;
  - (c) eine Waschlösung, die ein chaotropes Mittel enthält, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Gu-

anidinsalz, Harnstoff, Iodid, Perchlorat und (Iso)thiocyanat besteht;

(d) eine Waschlösung, bei der es sich um einen Puffer mit einer geringen Salzkonzentration von nicht mehr als 100 mM handelt; und

(e) eine Lösung zum Eluieren der Ribonucleinsäure von dem Träger.

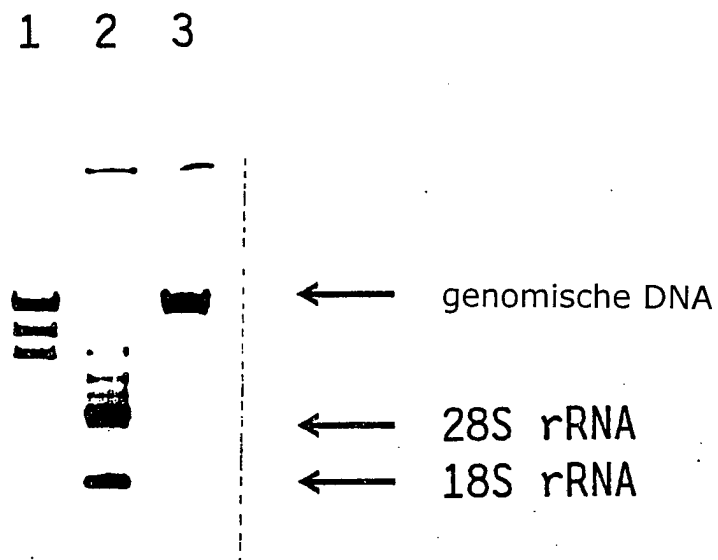
18. Reagens zum Isolieren einer Ribonucleinsäure gemäß Anspruch 17, wobei der nucleinsäurebindende Träger ein supermagnetisches Metalloxid enthält.

19. Verfahren zum Herstellen einer cDNA, umfassend das Umsetzen einer nach dem Verfahren von Anspruch 1 isolierten Ribonucleinsäure mit einem Gemisch aus einer Reversen Transcriptase, einem Ribonuclease-Inhibitor, dNTPs, einem Primer für die reverse Transcription und einem Puffer für die reverse Transcriptionsreaktion und Synthetisieren der cDNA aus der Ribonucleinsäure.

20. Verfahren zum Herstellen einer cDNA, umfassend das Umsetzen eines nach dem Verfahren von Anspruch 1 erhaltenen ribonucleinsäuregebundenen Trägers mit einem Gemisch aus einer Reversen Transcriptase, einem Ribonuclease-Inhibitor, dNTPs, einem Primer für die reverse Transcription und einem Puffer für die reverse Transcriptionsreaktion und Synthetisieren der cDNA aus der Ribonucleinsäure.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

# FIG. 1



# FIG. 2

1 2 3



gewünschtes  
Amplifikationsprodukt

# FIG. 3

