

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum
Internationales Büro



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2016/169678 A1

**(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum**
27. Oktober 2016 (27.10.2016)

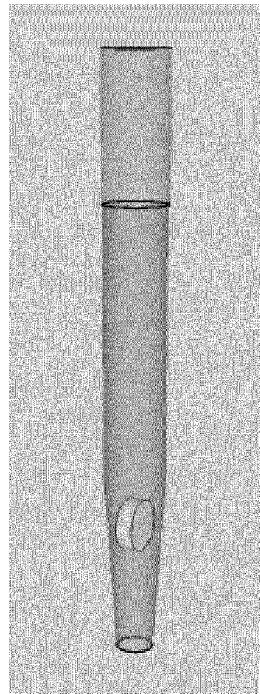
- (51) Internationale Patentklassifikation:** *C12N 15/10 (2006.01) G01N 1/40 (2006.01)*
- (21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2016/054179
- (22) Internationales Anmeldedatum:** 26. Februar 2016 (26.02.2016)
- (25) Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:**
- 10 2015 207 481.1 23. April 2015 (23.04.2015) DE
- 10 2015 211 393.0 19. Juni 2015 (19.06.2015) DE
- 10 2015 211 394.0 19. Juni 2015 (19.06.2015) DE
- (71) Anmelder:** AJ INNUSCREEN GMBH [DE/DE]; Robert-Roessle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (72) Erfinder:** HILLEBRAND, Timo; Bogenstrasse 29, 15366 Hoppegarten (DE). STROH, Thorsten; Rudolstaedter Strasse 96, 10713 Berlin (DE).
- (74) Anwälte:** WEHLAN, Helmut et al.; Wehlan & Wehlan, Moellendorffstr. 49, 10367 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR EXTRACTING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN

Figur 1



(57) Abstract: A device and method for extracting nucleic acids, comprising a hollow body, preferably a pipette tip, through which a fluid is guided, characterized in that a material with a rough or structured surface is arranged in this hollow body such that the material can be washed around with a fluid. After lysis of the sample and adjusting necessary binding conditions for the adsorption of the nucleic acids on the carrier material, the formulation is "pipetted past" the nucleic acid binding material located vertically in the pipette tip multiple times by means of a pipette process. The nucleic acids bind to the material. Subsequently, washing buffers are also "pipetted past" the nucleic acid binding material. A drying step subsequently takes place. Finally, the eluent is in turn "pipetted past" the nucleic acid binding material multiple times, said material being arranged vertically, and the bound nucleic acid is thereby dissolved. The nucleic acid is now available for necessary downstream application.

(57) Zusammenfassung: Vorrichtung und Verfahren zur Extraktion von Nukleinsäuren, umfassend einen Hohlkörper, vorzugsweise eine Pipettenspitze, durch den eine Flüssigkeit geleitet wird, dadurch gekennzeichnet, dass in diesem Hohlkörper ein Material mit rauer oder strukturierter Oberfläche so angeordnet ist, dass es von einer Flüssigkeit umspült werden kann. Nach Lyse der Probe

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

und Einstellung notwendiger Bindungsbedingungen für die Adsorption der Nukleinsäuren an das Trägermaterial wird der Ansatz mittels eines Pipettierungsvorganges am vertikal in der Pipettenspitze verbrachten nukleinsäurebindenden Material mehrmals "vorbei pipettiert". Die Nukleinsäuren binden an das Material. Nachfolgend werden Waschpuffer ebenfalls am nukleinsäurebindenden Material "vorbei pipettiert". Danach erfolgt ein Trocknungsschritt. Final wird das Elutionsmittel wiederum mehrmals am vertikal angeordneten nukleinsäurebindenden Material „vorbei pipettiert“ und dabei die gebundene Nukleinsäure abgelöst. Die Nukleinsäure liegt nun für notwendige downstream-Applikation vor.

Vorrichtung und Verfahren zur Extraktion von Nukleinsäuren

[0001] Gegenstand der Erfindung ist eine neuartige Vorrichtung, mit der Nukleinsäuren schnell und hocheffizient sowie quantitativ isoliert oder aufgereinigt werden können. Die neuartige Vorrichtung zur Extraktion von Nukleinsäuren kann sowohl für eine manuelle Extraktion im Labor als auch unter Feldbedingungen eingesetzt werden. Besondere Vorteile offenbart es im Kontext mit der Automatisierung von Nukleinsäureextraktionen.

[0002] Unter klassischen Bedingungen erfolgt die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben dadurch, dass die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, teilweise auch unter Verwendung von proteinabbauenden Enzymen aufgeschlossen, die austretenden Nukleinsäurefraktionen über Phenol-/ Chloroform- Extraktionsschritte gereinigt und die Nukleinsäuren mittels Dialyse oder Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase gewonnen werden (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning"). Diese "klassischen Verfahren" zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen und besonders aus Geweben sind sehr zeitaufwendig (teilweise länger als 48 h), erfordern einen erheblichen apparativen Aufwand und sind darüber hinaus auch nicht unter Feldbedingungen realisierbar. Außerdem sind solche Methoden auf Grund der verwendeten Chemikalien wie Phenol und Chloroform in einem nicht geringen Maße gesundheitsgefährdend.

[0003] Die nächste Verfahrensgeneration zur Isolierung von Nukleinsäuren basiert auf einer von Vogelstein und Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615 - 619) entwickelten und erstmals beschriebenen Methode zur präparativen und analytischen Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die Methode kombiniert die Auflösung der die zu isolierende DNA- Bande enthaltenden Agarose in einer gesättigten Lösung eines chaotropen Salzes (NaJ) mit einer Bindung der DNA an Glaspartikel. Die an die Glaspartikel fixierte DNA wird anschließend mit einer Waschlösung (20 mM Tris HCl [pH 7,2]; 200mM NaCl; 2 mM EDTA; 50% v/v Ethanol) gewaschen und danach von den Trägerpartikeln abgelöst. Diese Methode erfuhr bis heute eine Reihe von Modifikationen und wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt für unterschiedliche Verfahren der Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Herkünften angewendet und ist letztlich die Basis für fast alle kommerziell verfügbaren Kits zur manuellen wie auch automatisierten Isolierung von Nukleinsäuren. Darauf hinaus gibt es eine Vielzahl von Patenten und Veröffentlichungen, die sich auf das Basisprinzip der Isolierung von Nukleinsäuren beziehen, welches von Vogelstein und Gillespie erstmals publiziert wurde und ggf. weitere Vorteile innehaben.

Diese Varianten betreffen sowohl die Verwendung unterschiedlicher mineralischer Trägermaterialien als auch die Art der für die Bindung der Nukleinsäuren eingesetzten Puffer. Beispiele sind u.a. die Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger unter Anwesenheit von Lösungen unterschiedlicher chaotoper Salze, bei welchen als Trägermaterial feingemahlene Glaspulver (BIO 101, La Jolla, CA), Diatomenerden (Fa.Sigma) oder auch Silicagele bzw. Silicasuspensionen oder Glasfaserfilter oder mineralische Erden (DE 41 39 664 A1; US 5,234,809; WO-A 95/34569 DE 4321904; DE 20207793) zum Einsatz kommen. All diese Patente basieren auf der Anbindung von Nukleinsäuren an ein mineralisches Trägermaterial auf der Basis von Glas oder Silizium unter Anwesenheit chaotoper Salzlösungen. In neueren Patentschriften wird offenbart, dass für die Adsorption von Nukleinsäuren an die dem Fachmann bekannten und eingesetzten mineralischen Materialien auch sogenannte antichaotische Salze als Bestandteil von Lyse-/ Bindungspuffer- Systemen sehr effizient und erfolgreich eingesetzt werden können (EP 1135479). Zusammenfassend kann man den Stand der Technik also dahingehend beschreiben, dass Nukleinsäuren an mineralische Materialien in Anwesenheit von Puffern, die chaotische oder antichaotische Salze enthalten oder auch in Anwesenheit von Puffern die Mischungen chaotischer und antichaotischer Salze enthalten, binden und auf diesem Wege dann auch isoliert werden können. Dabei gibt es auch Vorzugsvarianten, bei denen zusätzlich aliphatische Alkohole zur Bindungsvermittlung eingesetzt werden. Dem Fachmann ist auch bekannt, dass alle gängigen kommerziellen Produkte zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren auf dieser Grundlage basieren. Die eingesetzten mineralischen Träger liegen dabei in Form von losen Schüttungen, in Form von Filtermembranen oder auch in Form von Suspensionen vor. Für die Durchführung von automatisierten Extraktionsabläufen werden häufig paramagnetische oder magnetische Partikel eingesetzt. Dabei handelt es sich z.B. um silicatische Materialien, die einen magnetischen oder paramagnetischen Kern besitzen oder aber auch um Eisenoxydpartikel, deren Oberfläche so modifiziert wird, dass diese die für die Anbindung der Nukleinsäuren notwendigen Funktionalitäten tragen. Um insbesondere automatisierte Extraktionen einfacher durchführen zu können, wurden modifizierte Pipettenspitzen eingesetzt. Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie die zur Anbindung von Nukleinsäuren notwendigen Trägermaterialien (poröse mineralische Trägermaterialien oder poröse Anionenaustauscher etc.) bereits enthalten. So beschreibt die Patentschrift DE3717211 eine Pipettenspitze mit einem porösen Chromatographiematerial für die Isolierung von Nukleinsäuren. Die Patentschrift EP1951904 offenbart eine Pipettenspitze, bestehend aus einem Ober- und Unterteil, zwischen welchem sich ebenfalls ein poröses chromatographisches

Trägermaterial befindet und welche für die automatisierte Isolierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden soll. Eine modifizierte Pipettenspitze zur Extraktion von Nukleinsäuren ist auch in der Offenlegungsschrift US2013/0078619 offenbart. Auch in dieser Pipettenspitze befindet sich ein poröses mineralisches Trägermaterial (poröses Glas) zur direkten Anbindung von Nukleinsäuren. All diesen modifizierten Pipettenspitzen ist gemeinsam, dass es sich um ein poröses chromatographisches Material handelt (lose Schüttung oder fester poröser Körper). Diese Trägermaterialien befinden sich immer horizontal innerhalb der Pipettenspitze. Die zu prozessierenden Flüssigkeiten strömen durch das eingesetzte poröse Material. Der Extraktionsablauf basiert darauf, dass nach Lyse der Probe und Einstellung notwendiger Bindungsbedingungen für die Adsorption der Nukleinsäuren an das Trägermaterial, dieser Ansatz mittels eines Pipettierungsvorganges durch das poröse Trägermaterial gezogen wird. Die Nukleinsäuren binden an das Trägermaterial. Nachfolgend werden Waschpuffer durch das Trägermaterial pipettiert. Danach erfolgt ein Trocknungsschritt (häufiges Auf- und Abpipettieren oder Anlegen von Vakuum). Final wird das Elutionsmittel durch das Trägermaterial pipettiert. Dabei wird die gebundene Nukleinsäure vom Trägermaterial abgelöst. Die Verwendung von Trägermaterial enthaltenden Pipettenspitzen soll den (insbesondere) automatisierten Ablauf von Nukleinsäureextraktionen deutlich vereinfachen. Obwohl diese Ideen schon teilweise relativ alt sind (die Patentschrift DE3717211 datiert vom 22.5.1987), hat sich ein solches Verfahren nicht durchgesetzt. Die Ursache liegt dabei in einigen grundsätzlichen Problemen:

- 1) Das Pipettieren von Nukleinsäure enthaltenden Lysaten hoher Viskosität funktioniert nur eingeschränkt oder führt zum vollständigen Verschluss des chromatographischen Materials. Damit ist keine Extraktion möglich.
- 2) Das Pipettieren von Lysaten über ein poröses Material führt zur Schaumbildung. Dieses wird mit der zunehmenden Anzahl von Pipettierschritten verstärkt und kann den Extraktionsprozess ebenfalls unmöglich machen.
- 3) Die Entfernung von alkoholischen Komponenten aus einem porösen Material ist schwierig und ist oftmals nicht zufriedenstellend gelöst.

[0004] Zum Stand der Technik gehört auch die Offenlegungsschrift WO 01/05510 A1. Darin wird ein Hohlkörper beschrieben, der magnetische Partikel enthält. Über die Oberflächeneigenschaften dieser Magnetpartikel werden keine Angaben gemacht. Die Nukleinsäureanbindung mittels Magnetpartikeln erfolgt normalerweise mittels glatter Eisenpartikel. Die Oberflächeneigenschaften spielen im Stand der Technik keine Rolle, nur die magnetischen Eigenschaften.

[0005] Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zu Grunde, die bekannten Probleme zu lösen und ein einfaches und schnelles Verfahren der Extraktion von Nukleinsäuren mittels einer modifizierten Pipettenspitze zu ermöglichen.

- 5 [0006] Die Aufgabe wurde gemäß den Merkmalen der Patentansprüche gelöst. Gemäß Anspruch 1 wird eine Vorrichtung zur Extraktion von Nukleinsäuren bereitgestellt, umfassend einen Hohlkörper, durch den eine Flüssigkeit geleitet wird, wobei in diesem Hohlkörper ein Material mit rauer oder strukturierter Oberfläche so angeordnet ist, dass es von einer Flüssigkeit umspült werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform fungiert 10 als Hohlkörper eine Pipettenspitze. Das Material mit rauer oder strukturierter Oberfläche hat eine solche Größe, dass es aus der Pipettenspitze unten nicht herausgelangen kann und unterscheidet sich damit von den im Stand der Technik beschriebenen magnetischen Partikeln (WO 01/05510 A1). Die Ansprüche 2 bis 6 beschreiben bevorzugte Ausführungsformen der Vorrichtung. Die Erfindung umfasst auch ein Gerät nach dem walk-away-Prinzip, welches die 15 Vorrichtung verwendet. Außerdem wird ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren mittels der Vorrichtung beschrieben. Dieses Verfahren ist durch folgende Schritte gekennzeichnet:
- 20 a) Eine lysierte biologische Probe wird mit mindestens mit einer Substanz, die die Polarität der wässrigen Lösung senkt oder mit einem Mittel zur Anbindung von Nukleinsäuren an eine feste Phase versetzt
- b) Aufziehen dieser Mischung unter a) mit einer Pipettenspitze, in der sich ein raues oder strukturiertes Material gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 befindet und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, wobei sich die Flüssigkeit dabei am Material vorbei bewegt und die Nukleinsäuren an dem rauen oder strukturierten Material präzipitieren – und damit an 25 die feste Phase angebunden werden
- c) Entfernen der Pipettenspitze aus der Probe
- d) Eintauchen der Pipettenspitze in eine Waschpufferlösung und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, wobei sich die Flüssigkeit dabei am Material vorbei bewegt.
- e) Trocknung der Pipettenspitze zur Entfernung des restlichen Alkohols vom Waschpuffer
- 30 f) Ablösen der Nukleinsäure mit einem Elutionspuffer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Elutionspuffers, wobei sich der Elutionspuffer dabei am Material vorbei bewegt.

[0007] Überraschender Weise kann dies mit einfachen Mitteln erreicht werden. Es wurde entdeckt, dass man ein nukleinsäurebindendes Material nicht horizontal in eine Pipettenspitze verbringt, sondern vertikal, so dass an einer oder an beiden Seiten des nukleinsäurebindenden Materials die Flüssigkeit unbehindert vorbeifließt kann. In einer anderen Ausführungsform 5 kann die Pipettenspitze auch mit einem nukleinsäurebindenden partikulärem Material der Art befüllt sein, das sich zwischen diesem Material ausreichend große Hohlräume befinden, so dass eine Flüssigkeit ebenfalls an diesem Material verbeifließt und nicht durch dieses Material hindurch. Eine weitere mögliche Ausführungsform besteht darin, dass in eine Pipettenspitze sich ein oberflächenstrukturiertes Material befindet. In diesem Fall fließt die Flüssigkeit ebenfalls an den „Strukturen“ des Materials vorbei. Alle diese Ausführungsformen bedeuten 10 letztlich, dass die für die Isolierung von Nukleinsäuren eingesetzten Flüssigkeiten nicht durch ein chromatographisches Material hindurch, sondern an einem nukleinsäurebindenden Material vorbei bewegt. Die Basis, dass sich mit dem erfindungsgemäßen Mittel Nukleinsäuren aus flüssigen Proben isolieren lassen basiert dabei auf einem völlig neuartigen 15 Prinzip. Dieses unterscheidet sich grundlegend von den bekannten Prinzipien der Isolierung von Nukleinsäuren an chromatographische Trägermaterialien. Es zeigt sich, dass es wesentlich ist, dass das für die Anbindung der Nukleinsäuren eingesetzte Material eine raua 20 Oberfläche aufweist oder dass es sich um ein oberflächenstrukturiertes Material handelt, was die Glattheit durch die Struktur an der Oberfläche (diese kann geordnet oder auch ungeordnet sein) aufhebt. In Summe ist es notwendig, dass innerhalb der Pipettenspitze durch das verbrachte Material eine zwei/dreidimensionale Struktur entsteht, an welche Nukleinsäuren adsorbieren können. Die Anbindung der Nukleinsäure scheint darauf zu basieren, dass die in 25 der Probe enthaltenen Nukleinsäuren nach Inkontaktbringen der Probe mit einer rauen Oberfläche an der rauen Oberfläche, einer strukturierten Oberfläche oder einem zwei/dreidimensionalen Netzwerk präzipitiert. Dies erfolgt dabei dadurch, dass durch die Zugabe z.B. eines Alkohols die Polarität der Umgebung geringer wird und sich dadurch die Löslichkeit der Nukleinsäure reduziert. Überraschenderweise funktioniert die „Präzipitation“ 30 der Nukleinsäure an diesen beschriebenen Oberflächen extrem effizient bei hoher Ausbeute und Reinheit.

[0008] Der Kern der Erfindung besteht somit darin, dass sich freie oder durch Lyse freigesetzte Nukleinsäuren in einer wässrigen Umgebung befinden, deren Polarität mittels organischer Substanzen so eingestellt ist, dass sich die Löslichkeit der Nukleinsäure reduziert und nachfolgend diese wässrige Umgebung in die erfindungsgemäße Pipettenspitze eingezogen wird, so dass dann die Nukleinsäure am in der Pipettenspitze verbrachten

Material/Netzwerk vorbei bewegt wird (die kann durch mehrmaliges pipettieren erfolgen) und an der Oberfläche des Materials/Netzwerks präzipitiert und nachfolgend die präzipitierte DNA von der Oberfläche wieder abgelöst wird und zur Verfügung steht. Optional kann die an der Oberfläche präzipitierte Nukleinsäure auch gewaschen und nach Waschschritten abgelöst werden.

[0009] Der praktische Extraktionsablauf mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens basiert damit auf folgenden Schritte. Nach Bereitstellung einer Nukleinsäure enthaltenen Probe in einer wässrigen Form werden die für die Präzipitation der Nukleinsäuren notwendigen Bedingungen eingestellt, dass die Nukleinsäure an das in der Pipettenspitzen verbrachte Material präzipitieren kann. Der Ansatz wird mittels Pipettierungsvorgänge am vertikal in der Pipettenspitze verbrachten nukleinsäurebindenden Material „vorbei pipettiert“. Die Nukleinsäuren präzipitieren an das Material. Nachfolgend können optional Waschpuffer ebenfalls am nukleinsäurebindenden Material „vorbei pipettiert“ werden. Danach erfolgt ein Trocknungsschritt (z.B. häufiges Auf- und Abpipettieren). Final wird das Elutionsmittel wiederum mehrmals am vertikal angeordneten nukleinsäurebindenden Material „vorbei pipettiert“ und dabei die gebundene Nukleinsäure abgelöst. Die Nukleinsäure liegt nun für notwendige downstream-Applikation vor. Das Verfahren ist extrem schnell und einfach in der Durchführung und erlaubt die Isolierung von Nukleinsäuren in einer extrem hohen Ausbeute und Reinheit. Es gibt keine Probleme mit viskösen Lösungen und keine Probleme mit der Entfernung von alkoholischen Komponenten bzw. mit einer extremen Schaumbildung, wie dies alles bei der Verwendung horizontal angeordneter poröser Trägermaterialien oder bei Pipettenspitzen, die mit einem porösen chromatographischen Material gefüllt sind, der Fall ist. Das Verfahren ist universell einsetzbar und kann sowohl automatisiert als auch manuell durchgeführt werden. Es ist in idealster Weise für den Einsatz einer automatisierten Nukleinsäureextraktion geeignet, da die notwendigen Schritte zur Anbindung von Nukleinsäuren, zum Waschen der gebundenen Nukleinsäuren sowie zum Ablösen der Nukleinsäuren nur noch multiple Pipettierschritte sind. Dabei umgeht die erfindungsgemäße Pipettenspitze die bekannten Nachteile aus dem Stand der Technik, welche durch die bisherige konstruktive Anordnung bzw. Befüllung von Pipettenspitzen mit porösen chromatographischen Materialien bedingt sind.

[0010] Die einzusetzenden vertikal in die Pipettenspitze verbrachten Materialien zur Anbindung von Nukleinsäuren können extrem unterschiedlich sein. Neben mineralischen Materialien können auch modifizierte Plastikmaterialien eingesetzt werden, deren Oberfläche nicht glatt, sondern rau oder strukturiert sind. Dazu zählen auch sogenannte

Kompositmaterialien, die Mischungen aus Polymeren und z.B. organischen Komponenten als auch anorganische Komponenten sowie Kompositmaterialien. Wesentlich ist nur die Bereitstellung einer angerauten bzw. strukturierten Oberfläche (keine glatte Oberfläche) bzw. die Verbringung von Material in die Pipettenspitze, das zur Ausbildung eines

- 5 zwei/dreidimensionalen Netzwerkes führt, wobei die Nukleinsäuren dann an diese Struktur präzipitieren. Die Architektur des Materials ist ebenfalls nicht limitierend (rund, rechteckig, etc.). Dabei kann es sich auch um mehrere Materialien handeln (z.B. mehrere Granulate). In einfachen Ausführungsformen kann allein schon eine in die Pipettenspitze verbrachte Schraube für die Isolierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden.
- 10 Wichtig ist nur, dass das Material in eine Pipettenspitze verbracht wird und jederzeit von einer Flüssigkeit umspült werden kann, ohne dass die Flüssigkeit durch das eingebrachte Material hindurch muss. Auch kann eine Pipettenspitze eingesetzt werden, in welcher sich (aus einem Spritzgussteil gefertigt) dass Bindungsmaterial schon befindet und dieses nicht mehr in die Spitze verbracht werden muss. Vorteilhaft ist auch die Verwendung von rauem, 15 magnetischen Material. Solch ein Material ist als Granulat unter dem Markennamen TECACOPM® bekannt.

[0011] Der Begriff „raue Oberfläche“ ist so zu verstehen, dass durch Berühren oder durch Ansicht der Oberfläche erkennbar ist, dass diese nicht glatt ist. Dabei kann es sich aber auch 20 um eine Oberfläche handeln, die eine Struktur aufweist (z.B. Rillen). Durch diese Struktur ist die Glattheit der Oberfläche aufgehoben, auch wenn die Struktur, also die Rillen, selbst glatt sein kann. Erfindungsgemäß werden solche Oberflächen als „strukturierte Oberflächen“ bezeichnet. Falls durch Ansicht oder Berühren der Oberfläche nicht erkennbar ist, ob eine 25 Oberfläche glatt oder rau ist, kann ein Test durchgeführt werden, bei dem ein Laserstrahl auf diese Oberfläche gerichtet wird. Bei einer glatten Oberfläche wird der Laser nur in Hauptrichtung an der Oberfläche reflektiert. Bei rauen Oberflächen erfolgt eine Streuung in alle Raumrichtungen. Ein solcher Test ist auf der Web-Seite der Universität Kiel beschrieben 30 worden (http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/semitech_en/kap_3/illustr/oberflaechenstruktur.pdf

30

[0012] Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Die Ausführungsbeispiele stellen dabei keine Limitierung der Erfindung dar.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Manuelle Extraktion von Nukleinsäure aus NIH 3T3 Zellen mittels des erfundungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung einer modifizierten Pipettenspitze

- 5 [0013] In eine 1 ml Pipettenspitze (Fa. Sarstedt) wurde eine Scheibe aus Polyethylen senkrecht im letzten Drittel fixiert. Eingesetzt wurden 5×10^5 NIH 3T3 Zellen. Die für die Isolierung der Nukleinsäuren eingesetzte Extraktionschemie wurde dabei teilweise aus dem kommerziellen Extraktionskit innuPREP Blood DNA Kit/IPC16X (Analytik Jena AG) genommen. Mittels eines 10 Lysepuffers (Lysis Solution CBV) sowie von Proteinase K wurden die Zellen bei 60°C für 15 min lysiert. Die Lyse erfolgte in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß. Nach Lyse wurde der Ansatz mit 400 µl Isopropanol versetzt. Nachfolgend wurde die modifizierte Pipettenspitze eingesetzt und mittels einer Pipette wurde der Ansatz 20 x auf- und abpipettiert. Danach wurden 3 weitere 2 ml- Reaktionsgefäße mit den alkoholischen Waschpuffern (Washing Solution LS, 15 80%iger Ethanol, 80%iger Ethanol) befüllt. Die Pipettenspitze wurde dann sukzessive in die jeweiligen Waschpuffer getaucht und es wurde jeweils 5 x auf- und abpipettiert. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Spitze getrocknet und damit der restliche Ethanol entfernt. Die Elution der gebundenen Nukleinsäure erfolgte mit 100 µl Elution Buffer. Dieser wurde wiederum in ein 2 ml- Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde 30 x auf- und abpipettiert. Nach 20 Entfernung der Pipettenspitze liegt die isolierte Nukleinsäure im Reaktionsgefäß vor. Das Verfahren ist extrem einfach und schnell.
- [0014] Der Nachweis der isolierten Nukleinsäure erfolgte mittels spektrophotometrischer Messung.

- 25 [0015] Ergebnisse spektrophotometrische Vermessung

	Probe	Konzentration (ng/ µl)	Ausbeute (µg)	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₃₀
1	ca. 1×10^5 NIH 3T3 Zellen	264	26,4	1.95	2,10
2	ca. 1×10^5 NIH 3T3 Zellen	228	22,8	1.94	2,09
3	ca. 1×10^5 NIH 3T3 Zellen	222	22,2	1.97	2.11

- [0016] Wie die Ergebnisse zeigen, ist es mit dem erfundungsgemäßen Mittel möglich, allein unter Verwendung einer Standard Extraktionschemie und mittels weniger Pipettierschritte mit

einer Standardpipette Nukleinsäure zu binden und zu isolieren. Es zeigt sich, dass die Ausbeuten extrem hoch sind.

5 **Beispiel 2: Automatisierte Extraktion von Nukleinsäure aus NIH 3T3 Zellen mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens und unter Verwendung einer modifizierten Pipettenspitze sowie unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Extraktionsautomaten**

[0017] Die automatisierte Extraktion wurde mit dem Extraktionsautomaten InnuPure C16 (Analytik Jena AG) durchgeführt. Dieser Extraktionsautomat basiert auf einer Magnetpartikel-Nukleinsäureextraktion.

Für die Durchführung einer Nukleinsäureextraktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden die Pipettenspitzen, die für den Extraktionsautomaten genutzt werden, so geändert, dass sie dem erfindungsgemäßen Mittel entsprechen. In die Pipettenspitzen wurde in das untere Drittel vertikal, eine aus einem angerauten Polymer hergestellte Scheibe eingebracht, die das Lumen nicht verschließt und somit die Pipettierfunktion der Pipettenspitzen erhalten bleibt. Es wurden dabei angeraute Scheiben aus verschiedenen Materialien eingesetzt.

Für die Nukleinsäureextraktion wurden jeweils 5×10^5 NIH 3T3 Zellen eingesetzt. Die für die Isolierung der Nukleinsäuren eingesetzte Extraktionschemie wurde dabei teilweise aus dem kommerziellen Extraktionskit innuPREP Blood DNA Kit/IPC16X (Analytik Jena AG) genommen. Mittels eines Lysepuffers (Lysis Solution CBV) sowie von Proteinase K wurden die Zellen bei 60°C für 15 min in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß lysiert.

[0018] Nachfolgend wurde das automatisierte Verfahren des Innupure C16 für die Aufreinigung der Nukleinsäuren verwendet. Die für die Extraktion benötigten Lösungen lagen in einer vorbefüllten Deep Well-Platte vor. Die oben beschriebenen Lysate wurden in Kavitäten gegeben, die mit 400 μl Isopropanol befüllt waren. Diese Lösung wurde daraufhin mittels der Pipettenspitze derart durchmischt, dass die Lösung seitlich an der in der Spitze eingebrachten Scheibe vorbeiströmt. Es wurden 100 Wiederholungen durchgeführt.

[0019] Danach wurde sukzessive in drei weiteren Kavitäten, die alkoholische Waschpuffer (Washing Solution LS, 80%iger Ethanol, 80%iger Ethanol) enthielten je 5x durchmischt.

[0020] Im Anschluss an den letzten Waschschritt wurde die erfindungsgemäße Spalte und die in ihr enthaltene Scheibe durch 200x Pipettieren von Luft getrocknet und damit der restliche Ethanol entfernt. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte durch 120x durchmischen mit 100 μl Elution Buffer, der durch das Gerät zuvor auf 50°C temperiert worden war. Das

Gesamtvolumen an Elution Buffer betrug 200 μ l.

[0021] Das Verfahren ist extrem einfach und schnell und zeigt, dass kommerziell verfügbare Extraktionsautomaten für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem dazu korrespondierenden erfindungsgemäßen Mittel eingesetzt werden können. Der zeitliche

5 Aufwand im Vergleich zu einer Magnetpartikel-basierten Extraktion ist viel geringer.

Der Nachweis der isolierten Nukleinsäure erfolgte mittels spektrophotometrischer Messung.

[0022] Ergebnisse der spektrophotometrischen Vermessung:

Material	Konzentration (ng/ μ l)	Ausbeute (μ g)	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₃₀
Polymilchsäure				
1	31,67	6,34	1,95	2,19
2	25,18	5,04	1,8	2,11
BioFila linen				
3	56,23	11,25	1,87	2,17
4	67,63	13,52	1,85	2,18
Polycarbonat				
5	38,12	7,62	1,79	2,13
6	21,9	4,38	2,14	2,36
Polyhydroxyalkanoat				
7	30,33	6,06	1,89	2,02
8	42,49	8,5	1,85	2,13
Acryl-Nitril-Styrol				
9	27,26	5,45	1,9	1,87
10	32,03	6,4	1,76	2,13
Polystyrol				
11	28,85	5,77	1,83	2,02
12	4,75	0,95	1,42	1,3
Polyethylen				
13	25,43	5,09	1,76	1,53
14	48,43	9,96	1,85	1,82

10

[0023] Eine gelelektrophoretische Analyse der isolierten Nukleinsäure zeigt Figur 2.

[0024] Dargestellt ist die in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäure, die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens isoliert wurde. Die Proben

15 wurden von links nach rechts, beginnend mit Probe 1 aufgetragen.

[0025] Wie die Ergebnisse zeigen, ist es mit dem erfindungsgemäßen Mittel, das aus unterschiedlichen Polymeren bestehen kann, möglich, allein unter Verwendung einer Standard Extraktionschemie und mittels weniger Pipettierschritte mit einer Standard Pipettierplattform, Nukleinsäure zu Binden und zu isolieren. Es zeigt sich, dass die Ausbeuten 5 extrem hoch sind.

Beispiel 3: Automatisierte Extraktion von Nukleinsäure aus Blutzellen mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens und unter Verwendung von Pipettenspitzen, welche 10 unterschiedliche Materialien zur Isolierung von Nukleinsäuren enthalten sowie unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Extraktionsautomaten

[0026] Die automatisierte Extraktion wurde mit dem Extraktionsautomaten InnuPure C16 (Analytik Jena AG) durchgeführt. Dieser Extraktionsautomat basiert auf einer 15 Magnetpartikel-Nukleinsäureextraktion.

Für die Durchführung einer Nukleinsäureextraktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden die Pipettenspitzen, die für den Extraktionsautomaten genutzt werden, so geändert, dass sie dem erfindungsgemäßen Mittel entsprechen. Es wurden drei unterschiedliche Spitzen eingesetzt:

[0027] Typ 1: Pipettenspitze enthaltend ein dreidimensionales Netzwerk aus Metall (dazu 20 wurde ein kommerziell verfügbarer sog. Metall Putzschwamm (Edelstahlspirale) genutzt, von welchem etwas Material abgeschnitten wurde. Dieses Material wurde in die Pipettenspitze gestopft. Es entsteht ein dreidimensionales Netzwerk, an welchem die Lösung vorbei 25 pipettiert wird).

Typ 2: Pipettenspitze mit zwei gegeneinander gesteckten verzinkten Holzschrauben (diese stellen gemäß der Beschreibung eine strukturierte Oberfläche dar)

Typ 3: Pipettenspitze mit 4 Plastgranulaten, deren Oberfläche zuvor angeraut wurde. Diese 30 Plastgranulate aus Polyethylen stellen gemäß der Beschreibung ein Material mit einer rauen Oberfläche dar. Ferromagnetisches Material mit Polypropylen.

[0028] Für die Nukleinsäureextraktion wurden jeweils Blutzellen aus 2 ml Vollblut, welche zuvor isoliert worden waren eingesetzt. Die Blutzellen wurden in 200 µl 1 PBS resuspensiert. Die für die Isolierung der Nukleinsäuren eingesetzte Extraktionschemie wurde dabei teilweise

aus dem kommerziellen Extraktionskit innuPREP Blood DNA Kit/IPC16 (Analytik Jena AG) genommen. Der gesamte Extraktionsablauf wurde automatisiert mittels des Gerätes Innupure C16 (Analytik Jena AG) durchgeführt. Das Gerät basiert auf einem walk-away Prinzip. Dazu wird eine Deep Well Platte mit den benötigten Reagenzien vorbefüllt. Sukzessive wird dann 5 die Pipettenspitze (mit den erfindungsgemäßen Modifikationen) in die einzelnen Kavitäten geführt und die jeweiligen Lösungen werden mittels auf- und abpipettieren in die Pipettenspitze aufgezogen und an dem in der Pipettenspitze enthaltenem Material vorbei pipettiert.

[0029] Als erstes wurde die Zellsuspension in die erste Kavität der vorbefüllten Deep Well 10 Platte überführt. In dieser Kavität befindet sich der Lysepuffer sowie Proteinase K. Die Lyse erfolgte dabei der Art, dass das Lysat mittels der erfindungsgemäßen Pipettenspitze multiple Male auf – und abpipettiert wurde. Nach Lyse wurde das Lysat in die nächste Kavität überführt. In dieser Kavität befindet sich Isopropanol. Wiederum wurde multiple Male auf und abpipettiert und somit die Flüssigkeit permanent in das Innere der Pipettenspitze gezogen 15 und dabei an dem in der Pipettenspitze befindlichem Material vorbei. Bei diesem Schritt bindet die Nukleinsäure an das Material. Nach diesem Schritt wurde die Pipettenspitze in die nächsten Kavitäten bewegt. In diesen befinden sich alkoholische Waschpuffer. Die gebundene Nukleinsäure wird somit wiederum durch multiple Pipettierungsvorgänge gewaschen. Nach 20 Trocknung der Pipettenspitze wurde diese in eine weitere Kavität bewegt, in welcher sich Wasser befindet. Mittels auf-und abpipettieren wird die Nukleinsäure vom Material abgelöst und liegt final in gelöster Form vor. Damit ist der gesamte Extraktionsprozess vollständig automatisiert abgearbeitet.

[0030] Das Verfahren ist extrem einfach und schnell und zeigt, dass kommerziell verfügbare 25 Extraktionsautomaten für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem dazu korrespondierenden erfindungsgemäßen Mittel eingesetzt werden können. Der zeitliche Aufwand im Vergleich zu einer Magnetpartikel-basierten Extraktion ist viel geringer.

[0031] Der Nachweis der isolierten Nukleinsäure erfolgte mittels spektrophotometrischer 30 Messung.

[0032] Ergebnisse der spektrophotometrischen Vermessung:

Material	Konzentration (ng/ µl)	Ausbeute (µg)	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₃₀
Spitze mit dreidimensionaler				

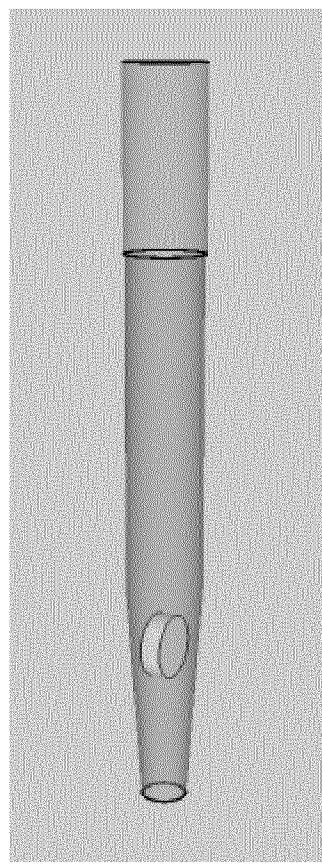
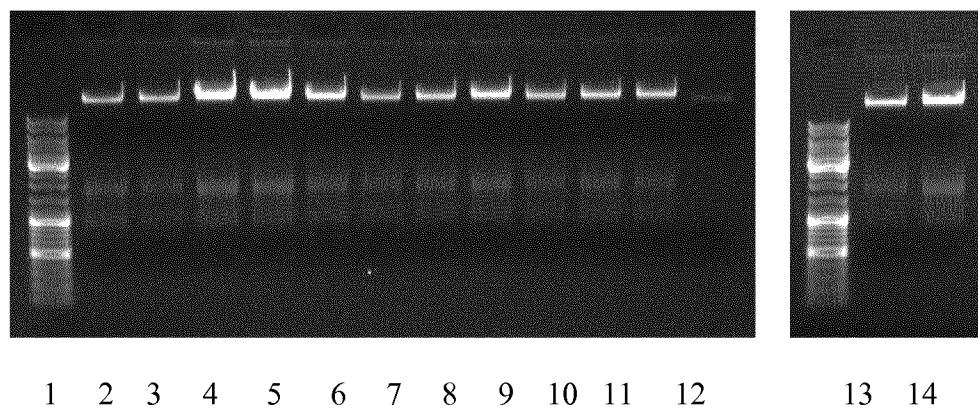
Struktur (Edelstahlwolle)				
1	62	24,8	1,8	1,9
2	70	28,0	1,8	1,9
3	75	30,0	1,8	2,0
Spitze mit verzinkten Schrauben				
1	38	15,2	1,7	1,6
2	42	18,0	1,8	1,8
3	45		1,7	1,7
Spitze mit rauem Plastgranulat aus PE				
1	80	32,0	1,8	2,2
2	94	37,6	1,8	2,2
3	102	40,8	1,8	2,2

[0033] Figur 1: zeigt eine exemplarische Darstellung der vertikal in den Hohlkörper
eingebrachten Scheibe aus einem nukleinsäurebindenden Polymermaterial; dargestellt ist eine
5 exemplarische Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mittels, welches für die
Nukleinsäureextraktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Extraktion von Nukleinsäuren, umfassend einen Hohlkörper, durch den eine Flüssigkeit geleitet wird, dadurch gekennzeichnet, dass in diesem Hohlkörper ein Material mit rauer oder strukturierter Oberfläche so angeordnet ist, dass es von einer Flüssigkeit umspült werden kann.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Hohlkörper, um eine Pipettenspitze handelt und das Material eine Größe hat, die verhindert, dass es aus der Pipettenspitze austritt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem eingebrachten Material um ein raues oder strukturiertes Polymermaterial, ein Kompositmaterial mit rauer Oberfläche oder um ein Material handelt, dass mittels 3D-Druck erzeugt wurde.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem eingebrachten Material mit rauer oder strukturierter Oberfläche um ein Material mit nicht-glatter Metall-, Kunststoff- oder Gummi-Oberfläche handelt.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem eingebrachten Material um Schrauben, Metallschwämme oder Granulate, verdrillte Materialien bzw. 2- oder 3-dimensionale Netzstrukturen oder um rauen magnetischen Partikel handelt.
6. Vorrichtung einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Hohlkörper, um eine Pipettenspitze handelt, die an der Innenwand aufgeraut ist oder an deren Innenwand das eingebrachte Material immobilisiert ist.
7. Gerät nach dem walk-away-Prinzip zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, umfassend mindestens eine der Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Gerät nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Pipettierautomaten oder einen Extraktionsautomaten darstellt.

9. Verfahren zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - a) Eine lysierte biologische Probe wird mit mindestens mit einer Substanz, die die Polarität der wässrigen Lösung senkt oder mit einem Mittel zur Anbindung von Nukleinsäuren an eine feste Phase versetzt
 - b) Aufziehen dieser Mischung unter a) mit einer Pipettenspitze, in der sich ein raues oder strukturiertes Material gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 befindet und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, wobei sich die Flüssigkeit dabei am Material vorbei bewegt und die Nukleinsäuren an dem rauen oder strukturierten Material präzipitieren.
 - c) Entfernen der Pipettenspitze aus der Probe
 - d) Eintauchen der Pipettenspitze in eine Waschpufferlösung und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, wobei sich die Flüssigkeit dabei am Material vorbei bewegt.
 - e) Trocknung der Pipettenspitze zur Entfernung des restlichen Alkohols vom Waschpuffer
 - f) Ablösen der Nukleinsäure mit einem Elutionspuffer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Elutionspuffers, wobei sich der Elutionspuffer dabei am Material vorbei bewegt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Substanz zur Senkung der Polarität der wässrigen Lösung organische Lösungsmittel, vorzugsweise Alkohole, eingesetzt werden.
11. Automatisches Verfahren gemäß Anspruch 9 mittels eines Pipettierautomaten oder einen Extraktionsautomaten.

Figur 1**Figur 2**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/054179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 G01N1/40
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 37 17 211 A1 (DIAGEN INST MOLEKULARBIO [DE]) 1 December 1988 (1988-12-01) cited in the application abstract; figures 1-2 examples 2, 5, 8 claims 1-2, 5-6, 10-14 ----- X AKONNI: "TruTip - Breaking the speed limit on ultra-rapid nucleic acid extraction", INTERNET CITATION, 16 November 2010 (2010-11-16), pages 1-8, XP002753497, Retrieved from the Internet: URL: http://www.akonni.com/docs/TruTip%20Br ochure.pdf [retrieved on 2010-11-16] the whole document ----- -/-	1-4, 6, 9, 10 1-3, 6-11 -/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 15 June 2016	Date of mailing of the international search report 27/06/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Barz, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/054179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DARRELL P CHANDLER ET AL: "Rapid, simple influenza RNA extraction from nasopharyngeal samples", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 183, no. 1, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 8-13, XP028483393, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2012.03.002 [retrieved on 2012-03-07]</p> <p>abstract; figure 1</p> <p>Materials and methods</p> <p>-----</p>	1-6,9,10
X	<p>HOLMBERG R C ET AL: "High-throughput, automated extraction of DNA and RNA from clinical samples using TruTip technology on common liquid handling robots", JOVE, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, US, no. 76, 1 June 2013 (2013-06-01), pages e50356-1, XP002753498, ISSN: 1940-087X, DOI: 10.3791/50356 [retrieved on 2013-06-11]</p> <p>abstract; figure 1</p> <p>Diskussion</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>VOGELSTEIN B ET AL: "PREPARATIVE AND ANALYTICAL PURIFICATION OF DNA FROM AGAROSE", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 76, no. 2, 1 February 1979 (1979-02-01), pages 615-619, XP002906050, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.76.2.615</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/054179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 3717211 A1	01-12-1988	DE 3717211 A1 WO 8809201 A1	01-12-1988 01-12-1988

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/054179

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N15/10 G01N1/40
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 37 17 211 A1 (DIAGEN INST MOLEKULARBIO [DE]) 1. Dezember 1988 (1988-12-01) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildungen 1-2 Beispiele 2, 5, 8 Ansprüche 1-2, 5-6, 10-14 -----	1-4, 6, 9, 10
X	AKONNI: "TruTip - Breaking the speed limit on ultra-rapid nucleic acid extraction", INTERNET CITATION, 16. November 2010 (2010-11-16), Seiten 1-8, XP002753497, Gefunden im Internet: URL: http://www.akonni.com/docs/TruTip%20Br ochure.pdf [gefunden am 2010-11-16] das ganze Dokument -----	1-3, 6-11
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. Juni 2016

27/06/2016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barz, Wolfgang

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DARRELL P CHANDLER ET AL: "Rapid, simple influenza RNA extraction from nasopharyngeal samples", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, Bd. 183, Nr. 1, 1. März 2012 (2012-03-01), Seiten 8-13, XP028483393, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2012.03.002 [gefunden am 2012-03-07]</p> <p>Zusammenfassung; Abbildung 1</p> <p>Materials and methods</p> <p>-----</p>	1-6,9,10
X	<p>HOLMBERG R C ET AL: "High-throughput, automated extraction of DNA and RNA from clinical samples using TruTip technology on common liquid handling robots", JOVE, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, US, Nr. 76, 1. Juni 2013 (2013-06-01), Seiten e50356-1, XP002753498, ISSN: 1940-087X, DOI: 10.3791/50356 [gefunden am 2013-06-11]</p> <p>Zusammenfassung; Abbildung 1</p> <p>Diskussion</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>VOGELSTEIN B ET AL: "PREPARATIVE AND ANALYTICAL PURIFICATION OF DNA FROM AGAROSE", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, Bd. 76, Nr. 2, 1. Februar 1979 (1979-02-01), Seiten 615-619, XP002906050, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.76.2.615</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/054179

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 3717211 A1	01-12-1988 DE WO	3717211 A1 8809201 A1	01-12-1988 01-12-1988