

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2007 (01.11.2007)

PCT

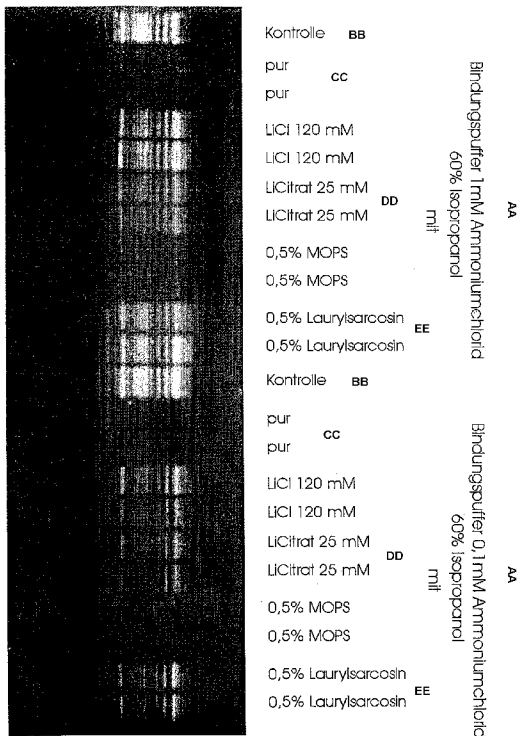
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/121717 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2007/000689
- (22) Internationales Anmeldedatum:
18. April 2007 (18.04.2007)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2006 019 650.3 25. April 2006 (25.04.2006) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **INVITEK GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNIK & BIODESIGN MBH** [DE/DE];
Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BENDZKO, Peter** [DE/DE]; Ifflandstr. 32, 12623 Berlin (DE). **JOOS, Hans** [DE/DE]; Föhner Strasse 12, 13353 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: **BAUMBACH, F.**; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FORMULATIONS AND METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS FROM COMPLEX STARTING MATERIALS AND SUBSEQUENT COMPLEX GENETIC ANALYSIS

(54) Bezeichnung: FORMULIERUNGEN UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS BELIEBIGEN KOMPLEXEN AUSGANGSMATERIALIEN UND NACHFOLGENDE KOMPLEXE GENANALYTIK



AA... Binding buffer 1/0.1mM ammonium chloride / 60% isopropanol
with
BB... control
CC... pure
DD... Li citrate
EE... lauryl sarcosine

(57) Abstract: The invention relates to formulations and a method without chaotropic components, for the isolation of nucleic acids with binding to a solid phase, in particular, of DNA from complex starting materials containing a lysis/binding buffer system with at least one antichaotropic salt component, wherein the concentration of the antichaotropic salt component is between 0.001 mM and 0.1 M, preferably 0.1 mM, a solid phase and a known washing and eluting buffer. The lysis/binding buffer system can be present in the form of an aqueous solution or as a solid formulation in ready-to-use reaction vessels. All support materials which have application for isolation by means of chaotropic reagents can function as solid phases, preferably glass fibre matting, glass membranes, silicon supports, ceramics, zeolites, or materials with negatively-functionalised surfaces or chemically modified surfaces which can be made to carry a negative charge potential. The invention further relates to a method for isolation of nucleic acids, in particular of DNA, from complex starting materials using the inventive formulations, characterised by the lysis of the starting material, binding of the nucleic acid to a support material, washing the nucleic acids bonded to the support and elution of the nucleic acids.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Formulierungen und Verfahren ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien, die ein Lyse/Bindungspuffersystem enthalten, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist, wobei die Konzentration der antichaotropen Salzkomponente zwischen 0,001 mM und 0,1 M, vorzugsweise 0,1 mM beträgt, sowie ferner

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2007/121717 A1



RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer. Das Lyse/Bindungspuffersystem kann als wässrige Lösung vorliegen oder als feste Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäßen. Als feste Phase können alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotroper Reagenzien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger, Keramiken, Zeolithe oder Materialien, die negativ funktionalisierte Oberflächen besitzen oder chemisch modifizierte Oberflächen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierungen, das durch Lyse des Ausgangsmaterial, Bindung der Nukleinsäuren an ein Trägermaterial, Waschung der am Träger gebundenen Nukleinsäuren und Elution der Nukleinsäuren gekennzeichnet ist.

Formulierungen und Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien und nachfolgende komplexe Genanalytik

5 Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Formulierungen ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien und Mengen enthaltend
10 ein Lyse/Bindungspuffersystem, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist, eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer. Das Lyse/Bindungspuffersystem kann als wässrige Lösung vorliegen oder als feste Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäßen. Als
15 feste Phase können alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotroper Reagenzien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger Keramiken, Zeolithe oder Materialien, die negativ funktionalisierte Oberflächen besitzen oder chemisch modifizierte Oberflächen aufweisen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können.

20 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierungen, das durch Lyse des Ausgangsmaterial, Bindung der Nukleinsäuren an ein
25 Trägermaterial, Waschung der am Träger gebundenen Nukleinsäuren und Elution der Nukleinsäuren gekennzeichnet ist, wobei ggf. die nachfolgende Amplifikation von ausgewählten Sequenzabschnitten und ggf. eine nachfolgende Analyse der vervielfältigten Genabschnitte in ein und der selben Reaktionskavität durchgeführt werden kann. Die Anwendungsgebiete der Verfahren sind alle mit DNA-
30 Isolierungen sich beschäftigenden Laboratorien, wie forensische Medizin, Lebensmitteldiagnostik, medizinische Diagnostik, Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik und alle anderen angrenzenden Gebiete.

Unter klassischen Bedingungen erfolgt die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben dadurch, dass die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien
35 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").

5 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
10 geringen Maße gesundheitsgefährdend.

Verschiedene alternative Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterialien ermöglichen die aufwendige und gesundheitsschädigende Phenol-/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren
15 zu umgehen sowie eine Reduzierung der zeitlichen Aufwendungen zu erreichen.

Alle diese Verfahren basieren 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
20 Agarosegelen. Die Methode kombiniert die Auflösung der die zu isolierende DNA-Bande enthaltende 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
25 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
30 (Marko, M.A., Chipperfield, R. und Birnboim, H.G., 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387).

Darüber hinaus existieren heute weltweit auch eine Vielzahl von Reagenziensystemen, vor allem zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus
35 Agarosegelen und für die Isolierung von Plasmid DNA aus bakteriellen Lysaten, aber auch für die Isolierung von längererkettigen Nukleinsäuren (genomische DNA, zelluläre Gesamt-RNA) aus Blut, Geweben oder auch Zellkulturen.

Alle diese kommerziell verfügbaren Kits basieren auf dem hinlänglich bekannten Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger unter Anwesenheit von Lösungen unterschiedlicher chaotroper Salze und verwenden als
5 Trägermaterialien Suspensionen feingemahlener Glaspulver (z.B. Glasmilk, BIO 101, La Jolla, CA), Diatomenerden (Fa. Sigma) oder auch Silicagele. (Diagen, DE 41 39 664 A1).

Ein für eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen praktikables Verfahren zur
10 Isolierung von Nukleinsäuren ist in US 5,234,809 (Boom) dargestellt. Dort ist ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus nukleinsäurehaltigen Ausgangsmaterialien durch die Inkubation des Ausgangsmaterials mit einem chaotropen Puffer und einer DNA-bindenden festen Phase beschrieben. Die chaotropen Puffer realisieren sowohl die Lyse des Ausgangsmaterials als auch die
15 Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phase. Das Verfahren ist gut geeignet, um Nukleinsäuren aus kleinen Probenmengen zu isolieren und findet speziell im Bereich der Isolierung viraler Nukleinsäuren seine praktische Anwendung.

Spezifische Modifikationen dieser Verfahren betreffen den Einsatz von neuartigen
20 Trägermaterialien, welche für bestimmte Fragestellungen applikative Vorteile zeigen (Invitek GmbH WO-A 95/34569).

Entscheidende Nachteile von Verfahren der Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien auf der Basis der Inkubation des
25 Ausgangsmaterials mit einem chaotropen Puffer und einer festen Phase bestehen aber u.a. darin, dass der durch die chaotropen Puffer zu realisierende Zellaufschluss nicht für alle Materialien einsetzbar ist bzw. auch für größere
Mengen an Ausgangsmaterialien nur extrem ineffizient und unter einem großen
Zeitaufwand funktioniert. Darüber hinaus sind mechanische
30 Homogenisierungsverfahren notwendig, wenn z.B. DNA aus Gewebeproben isoliert werden soll. Weiterhin müssen für verschiedene Fragestellungen auch immer verschieden hohe Konzentrationen unterschiedlicher chaotroper Puffer eingesetzt werden. Das Verfahren ist damit in keiner Weise universell einsetzbar.

35 Probleme, die durch eine ggf. schwierige Lyse des Ausgangsmaterials entstehen, können durch eine Reihe von kommerziell verfügbaren Produkten für die Nukleinsäureisolierung (speziell für die Isolierung genomischer DNA aus

komplexen Ausgangsmaterialien) zwar gelöst werden, haben aber den großen Nachteil, dass es sich nicht mehr um ein klassisches „Single Tube“-Verfahren handelt, das das Verfahren gemäß US-Patent kennzeichnet, da die Lyse des Ausgangsmaterials in einem gebräuchlichen Puffer unter Einbeziehung eines proteolytischen Enzyms erfolgt. Die für die nachfolgende Bindung der Nukleinsäuren an z.B. Zentrifugationsmembranen notwendigen chaotropen Ionen müssen nach erfolgter Lyse dem Lyseansatz extra zugegeben werden. Sie können aber nicht Bestandteil des Lysepuffers sein, da die proteinerstörende Funktion chaotroper Salze bekannt ist und natürlich sofort das für eine effiziente Lyse notwendige proteolytische Enzym ebenfalls zerstören würde.

Trotz einer Reihe von Nachteilen haben sich deshalb die Methoden der Nukleinsäureisolierung unter der Verwendung chaotroper Salze weltweit durchgesetzt und werden mittels kommerziell verfügbarer Produkte millionenfach eingesetzt. Diese Systeme sind extrem einfach in ihrer Durchführung und verfahren immer nach dem Prinzip der Lyse des Ausgangsmaterials, der nachfolgenden Bindung der Nukleinsäure an die feste Phase einer Glas- oder Silikamembran, welche sich in einem Zentrifugationssäulchen an einer Trägersuspension befindet, dem Waschen der gebundenen Nukleinsäuren und der nachfolgenden Elution der Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Ionenstärke.

Alle diese Systeme beruhen auf der Bindung der Nukleinsäuren an die jeweiligen Trägeroberflächen in Anwesenheit chaotroper Salze, d.h. mindestens eine Pufferlösung enthält als Hauptkomponente ein chaotropes Salz. Dies betrifft u.U. schon den Lysepuffer oder bei Systemen unter Einbeziehung proteolytischer Enzyme einen notwendigen Bindungspuffer, welcher nach der erfolgten Lyse des Ausgangsmaterials zugegeben wird.

Die Basis für chaotrope Salze sind die Reihen von Hofmeister zur Aussalzung von negativ geladenen, neutralen oder basischen Eiweißlösungen. Die chaotropen Salze sind dadurch charakterisiert, Proteine zu denaturieren, die Löslichkeit unpolarer Substanzen in Wasser zu erhöhen sowie hydrophobe Wechselwirkungen zu zerstören. Gerade diese Eigenschaften bewirken nach dem Stand der Technik auch mit Puffersystemen chaotroper Salze die übergeordnete Struktur des wässrigen Milieus zu zerstören um so die Bindung der Nukleinsäuren an ausgewählte feste Phasen zu vermitteln. Die bekanntesten Vertreter zur

Nukleinsäureisolierung sind, Natriumperchlorat, Natriumjodid, Kaliumjodid, Guanidiniothiocyanat und Guanidinhydrochlorid. Sie sind jedoch zum einen kostenintensiv und zum anderen teilweise toxisch oder ätzend.

5 Auf diesem Stand der Technik existieren bis zum heutigen Tag eine sehr große Anzahl an Patentanmeldungen sowie an erteilten Patente, wobei es sich dabei immer um Verfahrensvarianten handelt, wie z.B. die Verwendung neuer Trägermaterialien oder effizientere Waschpuffer etc., wobei das Grundprinzip immer die Verwendung chaotroper Salze zur Bindung an eine feste Phase aus
10 Silicamaterialien darstellt.

Später wurde gefunden (EP 1 135 479, Inhaber: InViTek Gesellschaft für Biotechnologie & Biodesign mbH), dass eine Vielzahl ganz unterschiedlicher Salze als Bestandteile von ggf. auch an sich üblichen Lyse/Bindungspuffersystemen für
15 die Bindung von Nukleinsäuren an klassische Trägermaterialien auf Basis von Glas oder Silica ausreichend sind. Die besten Ergebnisse konnten dabei mit Salzen erreicht werden, welche nach ihren chemisch-physikalischen Charakteristika die absolut entgegengesetzten Wirkungen in bezug auf die für die Nukleinsäurebindung bisher verwendeten chaotropen Salze aufweisen, Salze, die
20 somit als antichaotrop bezeichnet werden können. So konnten mit Lyse/Bindungspuffern, deren Hauptkomponente z.B. Ammoniumsalze anstelle chaotroper Salze waren (kommerzielle Extraktionskits), bei Extraktionen genomischer DNA aus unterschiedlichen komplexen Ausgangsmaterialien (z.B. Blut, Gewebe, Pflanzen) unter Konstanz der bisher üblichen anderen
25 Reaktionskomponenten, Trägermaterialien sowie bei völlig gleichem Reaktionsablauf mindestens dieselben quantitativen sowie qualitativen Resultate erreicht werden. Das bedeutet, dass mit einem Salz welches Proteine nicht denaturiert, sondern stabilisiert, welches die Löslichkeit unpolarer Substanzen in Wasser nicht erhöht, sondern absenkt sowie welches hydrophobe
30 Wechselwirkungen nicht zerstört, sondern verstärkt, es genauso möglich ist, Nukleinsäuren, auch aus komplexen Ausgangsmaterialien zu isolieren, aufzureinigen und den an sich üblichen Applikationen zuzuführen. Antichaotrope Komponenten sind im vorliegenden Zusammenhang Ammonium-, Cäsium-, Natrium- und/oder Kaliumsalze, vorzugsweise Ammoniumchlorid. Gemäß EP 1
35 135 479 werden diese antichaotropen Salzkomponenten in Ionenstärken von 0,1 M bis 8 M eingesetzt.

Völlig überraschend wurde nun gefunden, dass auch bei deutlich niedrigeren Konzentrationen der antichaotropen Salzkomponenten die gewünschte Wirkung erzielt werden kann. Die vorliegende Erfindung betrifft dem gemäß Formulierungen und Verfahren ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien, die ein Lyse/Bindungspuffersystem enthalten, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist, wobei die Konzentration der antichaotropen Salzkomponente zwischen 0,001 mM und 0,1 M, vorzugsweise 0,1 mM beträgt, sowie ferner eine feste Phase und an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer.

Das Lyse/Bindungspuffersystem weist außerdem an sich bekannte Detergenzien und ggf. Zusatzstoffe auf, so z.B. Tris-HCl, EDTA, Polyvinylpyrrolidone, CTAB, TritonX-100, N-Lauryl-Sarkosin, Natriumcitrat, DTT, SDS und/oder Tween. In einer bevorzugten Ausführungsvariante enthält das Lyse/Bindungspuffersystem zur Bindung an die feste Phase einen Alkohol, wie z.B. Ethanol und Isopropanol und ggf. Enzyme, vorzugsweise Protein-abbauende Enzyme, z.B. eine Proteinase.

Die Erfindung ermöglicht somit über die Verwendung der neuartigen Kompositionen von Lyse/Bindungspuffern auf der Basis von antichaotropen Salzen in sehr geringer Konzentration für die Nukleinsäureisolierung, speziell für die Isolierung genomischer DNA, basierend auf der Bindung der Nukleinsäuren an die an sich gebräuchlichen unterschiedlichen festen Phasen aus Silica bzw. Glasmaterialien, die Nutzung eines alternativen Chemismus als essentiellern Bestandteil von entsprechenden Testkits (Formulierungen).

Das erfindungsgemäße Verfahren unter Einbeziehung von antichaotropen Salzen folgt dabei den von der praktischen Laborroutine bekannten Verfahrensabläufen für die Nukleinsäureisolierung und ist charakterisiert durch:

30

1. Lyse des Ausgangsmaterials
2. Bindung der Nukleinsäuren an eine feste Phase
(Zentrifugationssäule oder Suspension)
3. Waschen der gebundenen Nukleinsäuren
- 35 4. Elution der Nukleinsäuren mit einem an sich bekannten Niedrigsalzpuffer.

Die Erfindung ermöglicht eine hocheffiziente und schnelle Isolierung von

Nukleinsäuren, besonders genomische DNA aus jedem beliebigen und ggf. komplexen Ausgangsmaterial. Die für die Bindung notwendigen antichaotropen Ionen können selbst bei Einbeziehung von proteolytischen Enzymen Bestandteil des Lyse/Bindungspuffers sein. Das erfindungsgemäße Verfahren ist damit
5 einfach handhabbar und universell einsetzbar.

Die Realisierung der Nukleinsäureisolierung, insbesondere von DNA, aus beliebigen Ausgangsmaterialien erfolgt durch die Inkubation des die Nukleinsäure enthaltenden Ausgangsmaterials ohne Verwendung chaotroper Substanzen, die
10 mit dem

- Lyse/Bindungspuffersystem, welches eine wässrige Lösung umfasst, die eine antichaotrope Salzkomponente, mindestens ein Detergenz, ggf. Zusatzstoffe und ggf. ein Enzym aufweist,
- und einer beliebigen festen Phase, vorzugsweise Glasfaservliese,
15 Glasmembranen, Gläser, Zeolithe, Keramik sowie andere Siliciumträger in Kontakt gebracht werden,

wodurch die Lyse des Ausgangsmaterials und die nachfolgende Bindung der DNA an die feste Phase erfolgt. Anschließend wird die gebundene Nukleinsäure nach an sich bekannten Methoden gewaschen und die DNA von der festen Phase
20 gelöst.

Bei bestimmten Extraktionsprotokollen kann der Lyseansatz ggf. mit einem zusätzlichen Detergenz, einem Alkohol oder einem Detergenz/Alkohol-Gemisch versetzt werden.

25 Bevorzugte Ausgangsmaterialien sind kompakte Pflanzenmaterialien, wie z.B. Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc., klinisch relevanten Proben, wie z.B. Vollblut; Gewebe, Mikrobioptate, paraffinierte Materialien, ercp-Proben, Tupfermaterial von Abstrichen, Lebensmittel, wie z.B. Fisch, Wurst, Konserven, Milch, forensischen
30 Proben, wie z.B. Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren und andere Proben, die DNA enthalten.

Bevorzugte Ionen im Sinne der Erfindung sind die in der Hofmeister-Serie dargestellten antichaotropen Ammoniumionen, Cäsiumionen sowie Kalium- und
35 Natriumionen oder Kombinationen dieser Ionen, vorzugsweise Ammoniumchlorid. Es können durch die Verwendung der antichaotropen Salze, die proteinstabilisierend wirken, als essentielle Bestandteile eines Lysepuffers in einer

bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auch proteolytische Enzyme, wie z.B. Proteinase K, zur Unterstützung und Effektivierung des Lyseprozesses zugesetzt werden.

5 Puffersysteme des Standes der Technik mit den bekannten chaotropen Salze können bei den notwendigen hohen Ionenstärken, wie sie allgemein für eine quantitative Isolierung von Nukleinsäuren gefordert werden, keine proteolytischen Enzyme enthalten. Sie müssen somit immer nachträglich für die Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phasen zugesetzt werden.

10

Als Detergentien in den erfindungsgemäßen Lysepuffern/Bindungspuffern werden bevorzugt anionische, kationische oder neutrale, wie z.B. SDS, Triton X-100, Tween oder CTAB eingesetzt.

15

Nach der erfolgten Lyse des Ausgangsmaterials wird die Suspension ggf. durch einen kurzen Zentrifugationsschritt von noch nicht vollständig lysierten Bestandteilen abgetrennt und mit dem DNA-bindenden Material direkt inkubiert bzw. wie schon beschrieben nach Zugabe mit einem zusätzlichen Detergenz, einem Alkohol oder einem Detergenz/Alkohol-Gemisch mit der festen Phase

20 inkubiert. Gegebenenfalls befinden sich im Lysepuffersystem zusätzlich geringe Konzentrationen ($< 50 \text{ mM}$) an EDTA und/oder Tris-HCl. Für die Isolierung von DNA aus sehr stark verunreinigten Ausgangsmaterialien erfolgt bevorzugt auch der Zusatz von 2-4% Polyvinylpyrrolidon oder anderen bekannten Substanzen zum Puffersystem zur selektiven Bindung von inhibitorischen Komponenten.

25

Als Bindungsmaterialien für die zu isolierende DNA haben sich z.B. kommerziell verfügbare Glasfaservliese in Zentrifugationssäulen, Siliziumverbindungen wie SiO_2 unterschiedlicher Teilchengröße hervorragend bewährt. Damit können alle die Materialien verwendet werden, welche für die Isolierung von Nukleinsäuren

30 mittels chaotroper Puffer genutzt werden.

35

Nach der Inkubation mit dem DNA-bindenden Material erfolgt die Abtrennung des Lysates vom Bindungsmaterial durch einen kurzen Zentrifugationsschritt. Nachfolgend wird in an sich bekannter Weise mit einem Waschpuffer z.B. bestehend aus mindestens 50% Ethanol und gegebenenfalls einer geringen Salzkonzentration z.B. NaCl gewaschen, das Trägermaterial wird getrocknet und die gebundene DNA mittels eines an sich bekannten Niedrigsalzpuffers (Tris-HCl;

TE; Wasser) und bei einer bevorzugten Temperatur von 50-70°C eluiert.

Eine weitere Ausführungsvariante der Erfindung besteht darin, dass zur Lyse von schwer aufschließbaren Ausgangsmaterialien, z.B. kompakten Gewebeproben, Haarwurzeln bzw. zur Optimierung der Lyseeffizienz und zur Reduzierung notwendiger Lysezeiten der Zusatz von proteolytischen Enzymen, vorzugsweise Proteinasen, wie z.B. Proteinase K, erfolgt.

Die Erfindung ermöglicht somit auf neuartigen Kombinationen antichaotroper Salze als essentiellen Bestandteilen von Lysepuffermixturen universell einsetzbare Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, aus allen DNA enthaltenden Ausgangsmaterialien wie auch aus beliebigen Mengen an unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien, wobei alle die bisher eingesetzten Trägermaterialien und deren Ausführungen genauso effizient eingesetzt werden können, wie auch die bisher praktizierten Vorschriften der Isolierung von Nukleinsäuren identisch nutzbar sind.

In seiner allgemeinsten Anwendungsvariante kann mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens aus allen dem Stand der Technik entsprechenden für eine DNA-Extraktion ausgewählten komplexen Ausgangsmaterialien eine Nukleinsäureextraktion durchgeführt werden, d.h. mittels des neuen universellen Puffersystem kann die hocheffiziente Lyse und nachfolgende Nukleinsäurebindung an einen mineralischen Träger aus kompakten Pflanzenmaterialien (z.B. Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc.), aus klinisch relevanten Proben (z.B. Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen), aus Lebensmitteln (z.B. Fisch, Wurst, Konserven, Milch), aus forensischen Proben (z.B. Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren) wie auch aus anderen Ausgangsmaterialien erfolgreich, extrem einfach und sehr schnell durchgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht auch darin, dass die Isolierung von DNA dabei sowohl aus extrem geringen Ausgangsmaterialien (z.B. Isolierung von DNA aus 1 µl Vollblut; Haarwurzel, Mikrobiopsie < 1 mg) als auch aus sehr großen Mengen an Ausgangsmaterialien wie z.B. 50 ml Vollblut; 1 g Gewebematerial, <1g Pflanzenmaterial hocheffizient durchgeführt werden kann.

Neben einer allgemeinsten Ausführungsvariante erlauben Optimierungen des Extraktionsverfahrens bezogen auf spezifische Applikationen sogar eine fast quantitative Isolierung der in der Ausgangsprobe enthaltenen DNA-Mengen.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich auch hervorragend für die Konzipierung von automatisierbaren Systemen, bei welchen bekanntermaßen der Preis/Präparationen ein entscheidendes Auswahlkriterium ist.

10 Die erfindungsgemäßen Formulierungen ermöglichen in überraschender Weise den Zugang zu weiteren hochinteressanten und neuartigen Applikationen auf dem Gebiet der Nukleinsäureisolierung und Diagnostik.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind die vorliegenden neuen Lyse/Bindungspuffersysteme, die mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweisen, in der Lage Nukleinsäuren an feste Phasen zu binden, die eine negativ geladene Oberfläche besitzen oder Oberflächen, die ein negatives Ladungspotential aufweisen.

20 Aus dem Stand der Technik sind Verfahren und Mittel zu Nukleinsäurereinigung bekannt, wobei die Nukleinsäurebindung an chemisch modifizierte feste Phasen erfolgt (United States Patent: 5,523,392; Purification of DNA on Aluminium Silicates and Phosphosilicates; United States Patent: 5,503,816; Silicates Compounds for DNA Purification; United States Patent: 5,674,997; DNA purification on modified Siligates; United States Patent: 5,438,127; DNA Purification by solid phase extraction using a PCl_3 modified glass fiber membrane; United States Patent: 5,606,046; DNA purification by solid phase extraction using trifluormetric acid washed glass fiber membrane; United States Patent: DNA purification by solid phase extraction using glass fiber membrane previously treated with trifluoroacetic acid, and then with fluoride ion, hydroxyd ion, or BCl_3 ;

30 United States Patent: 5,610,291: Glass fiber membranes modified by treatment with SiCl_3 , AlCl_3 , or BCl_3 and washing with NaOH to set as a DNA adsorbant; United States Patent: 5,616,701: DNA purification by solid phase extraction using a hydroxide-washed glass fiber membrane; United States Patent: 5,650,506: Modified glass fiber membranes useful for DNA purification by solid phase extraction).

35

Bedingung für diese Nukleinsäurebindung ist dabei immer, dass die für die

Bindung verwendeten Membranen durch chemische Modifizierungsreaktionen mit positiven Ionenladungen dotiert werden. Damit liegt auf der Hand, dass es zwischen der positiv geladenen Oberfläche der eingesetzten Membranen und der negativen Ionenladung des Phosphatrückgrats von Nukleinsäuren durch
5 Coulombsche Wechselwirkungen eine Bindung ergeben wird. Insofern wird das der Fachwelt hinlänglich bekannte Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an positive geladene feste Phasen genutzt, welches bekanntermaßen z.B. für DNA/RNA-Blotting-Techniken an positiv geladenen Nylon-Filtern schon viele Jahre eine Standardapplikation darstellt.

10

Ein ganz wesentlicher Nachteil dieser beschriebenen Verfahren besteht allerdings darin, dass diese nicht zur Nukleinsäureisolierung geeignet sind, d.h. es ist komplett unmöglich Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien zu isolieren. Ausgangsmaterial sind immer schon bereits isolierte Nukleinsäuren,
15 welche wie in den zitierten US-Patentschriften dargestellt, in an sich bekannter Weise isoliert werden müssen. Insbesondere ein Aspekt erscheint dem Fachmann dabei unklar. Die beschriebenen Bindungsbedingungen (Bindung unter physiologischen Pufferbedingungen) und Elutionsbedingungen sind identisch. Es ist nicht zu ersehen wie unter denselben Pufferbedingungen zur Bindung der
20 Nukleinsäuren an die positiv geladene Membran auch wieder die Nukleinsäuren von der Membran abgelöst werden können.

20

Letztlich können die dargestellten Mittel und das dazugehörige Verfahren eine nur sehr enge praktische Anwendung besitzen. Bekannt sind auch synthetisch hergestellte Oligonukleotide an die positiven Oberflächen zu binden. Dies erfolgt
25 dabei wiederum unter Ausnutzung Coulombscher Wechselwirkungen, d.h. auf der Basis der Verknüpfung positiver und negativer Ladungen z.B. über modifizierte Oligonukleotide (Verknüpfung mit Aminolinkern oder Phosphatlinkern). Auch diese Varianten ermöglichen nicht die Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien.

30

Wie ausführlich dargestellt, existieren alternative Formen der Nukleinsäurebindung zur Reinigung an Membranen mit ausreichender positiver Ladung, die keine Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren darstellen. Die Bindung der Nukleinsäuren erfolgt durch Coulombsche Kräfte, basierend auf
35 Wechselwirkungen zwischen positiven Ionenladungen der Membranen und der negativen Ionenladungen des Nukleinsäurenrückgrats. Dieses Prinzip erscheint damit logisch erklärbar.

35

Basierend auf der erfindungsgemäßen Isolierung von Nucleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien mit antichaotropen Salze wurde folgendes gefunden. So zeigte sich, dass sich auch negativ geladene Oberfläche oder
5 Oberflächen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können, für die Bindung von Nucleinsäuren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Lyse/Bindungspuffersysteme eignen.

Die erfindungsgemäß eingesetzten negativ funktionalisierten Oberflächen oder mit potentiell negativen Modifizierungen ausgestattete Oberflächen werden nach an
10 sich bekannten Verfahren erzeugt. Als geeignet hat sich z.B. die photochemische Kopplung einer Acetylgruppe, Carboxylgruppe oder Hydroxylgruppe an die Oberfläche eines Reaktionsgefäßes gezeigt.

Mit der vorliegenden Verfahrensvariante ermöglichen sich völlig neue
15 Perspektiven für eine komplexe Nucleinsäureanalytik. Es zeigte sich nämlich, dass für die Bindung der Nucleinsäure an negative oder potentiell negative Oberflächen die Nucleinsäure wie bei allen bisher beschriebenen Varianten nicht schon isoliert sein muss. Die Bindung erfolgt aus dem Lysereaktionsansatz heraus, d.h. die die Nucleinsäure enthaltende Ausgangsprobe wird lysiert und die frei werdenden
20 Nucleinsäuren binden an die negativ geladene Oberfläche (z.B. an eine Mikrottestplattenkavität oder ein Reaktionsgefäß).

Durch die erfindungsgemäße Verfahrensvariante können nunmehr völlig neuartige
25 „Single Tube“ und Einschritt-Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien realisiert werden. Solche Verfahren bieten in ihrem Anwendungsspektrum für die Nutzer riesige Vorteile (Einfachheit; Billigkeit; Reduzierung von Abfall, Schnelligkeit, Routinetauglichkeit, Automatisierbarkeit u.a.m.)

30 Eine weitere Anwendung dieser Verfahrensvariante besteht außerdem darin, nicht nur die Extraktion der Nucleinsäuren in einer Reaktionskavität zu realisieren, sondern auch eine folgende Targetamplifikation und ggf. nachfolgende Analytik im selben Reaktionsgefäß durchzuführen, ggf. Hybridisierungsreaktionen durchzuführen oder Sequenzierungen an festen Phasen ablaufen zu lassen.

35 Auf dieser Basis wird z.B. ein 0.5 ml PCR-Reaktionsgefäß mittels der Fachwelt bekannter Techniken mit einer negativ geladenen oder potentiell negativen

funktionalen Gruppe modifiziert. Dazu eignet sich z.B. die photochemische Kopplung einer Acetylgruppe, Carboxylgruppe oder Hydroxylgruppe an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes. In das Reaktionsgefäß wird dann die für die Nucleinsäureisolierung ausgewählte Probe gegeben (z.B. Vollblut) und mit einem Lysepuffer, enthaltend die antichaotrope Salzfraktion z.B. Ammoniumchlorid, ein Detergenz und ein proteolytisches Enzym versetzt und das Gefäß bei 70°C für 5 min. inkubiert.

Zur Maximierung der Nucleinsäurenbindung kann nach der Lyse des Ausgangsmaterials noch ein Detergenz/Alkohol-Gemisch pipettiert werden. Der Ansatz wird dann für kurz inkubiert und nachfolgend aus dem Reaktionsgefäß abgegossen. Die Nucleinsäure befindet sich nun an der funktionalisierten Oberfläche des Reaktionsgefäßes gebunden und wird nachfolgend mit einem alkoholischen Waschpuffer kurz gespült und der Alkohol wird durch Inkubation bei z.B. 70°C entfernt. Die Elution der gebundenen Nucleinsäuren erfolgt weiter fachgemäß durch die Zugabe eines Niedrigsalzpuffers (z.B. 10 mM Tris-HCl) in das Reaktionsgefäß und eine kurze Inkubation (z.B. 2 min) bei z.B. 70°C. Die Nucleinsäure ist so für nachfolgende Verwendungen verfügbar.

Wie dargestellt laufen alle Reaktionen der Nucleinsäureisolierung aus einem komplexen Ausgangsmaterial in einem Reaktionsgefäß ab; d.h. Lyse des Ausgangsmaterials, Bindung der Nucleinsäuren; Waschen der gebundenen Nucleinsäuren und Elution der Nucleinsäuren werden in und mit einem Reaktionsgefäß realisiert.

Die den momentan weltweit am Häufigsten genutzten Extraktionskits der Fa. Qiagen benötigen für die Abfolge von Lyse, Bindung, Waschen und Elution jeweils eine Filterkartusche und mindestens 4 separate Reaktionsgefäße eingeschlossen sind des weiteren multiple Zentrifugationsschritte.

Das erfindungsgemäße Verfahrensvariante erlaubt im Gegensatz dazu die Extraktion der Nucleinsäure ohne einen einzigen Zentrifugationsschritt. Daraus läßt sich auch ein enormer zeitlicher Vorteil ableiten. Diese Vorteile beziehen sich auch auf die beschriebenen Nucleinsäureextraktionsverfahren des zitierten US 5,234,809 von Boom.

Neben der möglichen Extraktion von Nucleinsäure kann die gebundene

Nukleinsäure aber auch an der Oberfläche des beschriebenen 0.5 ml Reaktionsgefäßes verbleiben und z.B. nachfolgend durch Zugabe eines kompletten PCR-Reaktionsmixes (Primer, Nukleotide, Polymerasepuffer, Taq Polymerase, Magnesium) gleich für eine PCR-Applikation verwendet werden, d.h. Extraktion und Amplifikation laufen dann im selben Reaktionsgefäß ab.

Diese Beispiele illustrieren die enormen Vorteile und breite Anwendbarkeit, die aus der Erfindung ableitbar sind. Sie ermöglicht in einer Ausführungsvariante den kompletten Vorgang von Probenvorbereitung über Amplifikation und ggf. auch Analytik in z.B. einer Reaktionskavität. Damit ergeben sich mit der Bereitstellung von modifizierten Reaktionsgefäßen (oder auch anderen festen Oberflächen) und den geeigneten Lyse/Bindungspuffern neue Standards in molekularbiologisch und vor allem Nukleinsäure-Diagnostik bearbeitenden Laboratorien, wobei durch die neuen potentiellen applikativen Lösungen vor allem auch die hinlänglich bekannten Probleme der Probenkontaminationen drastisch reduziert werden.

Ein weiterer Vorteil und auch eine weitere Applikation besteht darin, dass die oberflächenfixierten Nukleinsäuren an der Oberfläche auch zumindest längere Zeit stabil fixiert und somit für eine spätere Bearbeitung verfügbar sind, d.h. die PCR-Reaktion muss sich nicht zwingend sofort der Extraktion anschließen. Ein weiteres Anwendungsfeld ist die vollautomatisierte Nukleinsäureextraktion und ggf. Analytik unter Verwendung der hier beschriebenen mit negativen oder mit potentiell negative Ladungen tragenden Oberflächen, vorzugsweise Plastikoberflächen geeigneter Reaktionskavitäten z.B. Mikrottestplatten).

Die erfindungsgemäßen Lyse/Bindungspuffersysteme mit den antichaotropen Salzen als Hauptkomponenten einschließlich ggf. eines proteolytischen Enzyms können auch als feste Formulierung bereitgestellt. Dazu werden die Mischungen aus Salzen und Detergenzien, Zusatzstoffen und ggf. Enzymen in gebräuchlichen Reaktionsgefäßen aliquotiert und für mehrere Stunden bei 95 °C inkubiert oder nach an sich bekannten Verfahren lyophilisiert und so in eine feste Formulierung überführt.

Diese feste Formulierungen in fertigen komplexen Reaktionsmischen für die Nukleinsäureisolierung sind langzeitlagerstabil, d.h. auch die biologische Aktivität der proteolytischen Enzymkomponente bleibt bei einer Langzeitlagerung (siehe Ausführungsbeispiel) bestehen. Die Herstellung der festen Formulierung von

Lysepuffermischen erfolgte dabei ohne den Zusatz von an sich bekannten protektiven Zusatzstoffen, einfach durch eine Kältelyophilisierung.

Alle kommerziell angebotenen Testkits zur Nukleinsäurenextraktion enthalten die
5 notwendigen Komponenten einzeln, bestimmte Lösungen müssen durch den
Anwender erst hergestellt werden und darüber hinaus sind die Lösungen in ihrer
Haltbarkeit eingeschränkt. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass der Nutzer
während der Isolierung von Nukleinsäuren unter Verwendung z.Z. gebräuchlicher
Testkits multiple Pipettierschritte für verschiedene Einzellösungen einhalten muss.
10 Dies erhöht vor allem im Bereich der medizinischen Diagnostik das
Kontaminationsrisiko dramatisch. Nachteilig ist ferner auch, dass durch die z.B.
existierenden Beladungsgrenzen von weit gebräuchlichen
Zentrifugationssäulchen, welche hauptsächlich für die Nukleinsäureisolierung
angewendet werden, auch die Menge des Ausgangsmaterials stark begrenzt ist.
15 Dies liegt darin begründet, dass zum Ausgangsmaterial noch die für die Extraktion
notwendigen Lyse- und Bindungspuffer zugegeben werden müssen.

Durch die Bereitstellung einer festen Formulierung als lagerstabiler Lysemix auf
der Basis antichaotroper Salze werden alle die bestehenden Probleme in ganz
20 einfacher Form gelöst.

Diese Formulierung hat folgende Vorteile:

1. Langzeitlagerung von „Ready to use“ Lysepuffermischen
2. Stabilisierung von proteolytischen Enzymen in fertigen Lysemixturen und deren
25 Langzeitlagerung
3. Einsatz von größeren Mengen an Ausgangsmaterialien bei gleicher
Dimensionierung von bestehenden Zentrifugationssäulchen (z.B.
Verdreifachung der Ausgangsmenge)
4. Reduzierung von Kontaminationsrisiken durch die Reduzierung von
30 Pipettierschritten und Lösungen
5. Probenaufnahme im fertigen Lysemix auch außerhalb des Labors und deren
ggf. Langzeitlagerung
6. stabiler Probenversand und Kühlung

35 Die fertigen festen, stabilen Lysepuffermische bestehend aus einer Vielzahl von
Einzelkomponenten; einschließlich ggf. proteolytischen Enzymen sind einfach
handhabbar (auch von Personen ohne Sachkenntnisse), da die Reaktion einfach

durch Zugabe einer Probe, die die zu isolierende Nukleinsäure enthält, gestartet wird. Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass die Mixturen entsprechend ihrer Inhaltstoffe Haltbarkeiten von mindestens 6 Monaten aufweisen, wodurch auch ein Transport der Probe bei Umgebungstemperatur kein
5 Problem mehr darstellt.

Der Vorteil der festen Formulierungen basiert darauf, dass für die Lyse von Nukleinsäuren (NAs) enthaltenden Probenmaterialien eine diese NAs enthaltende Probe lediglich in das Reaktionsgefäß mit dem enthaltenden lagerstabilen
10 Lysepuffer überführt wird und ggf. durch die Zugabe von Wasser, die Probe im jeweiligen Reaktionsgefäß lysiert wird. Aufwendige und kontaminationsbelastende multiple Pipettierschritte entfallen gänzlich. Vor allem für die Sammlung und Aufarbeitung von klinischen und forensischen Proben unter Feldbedingungen sind durch die erfindungsgemäße Formulierung die bekannten Probleme gelöst und es
15 steht eine einfach zu handhabende Formulierung zur Verfügung.

Überraschenderweise zeigte sich dann ebenfalls in der praktischen Durchführung, daß nach Zugabe des zu lysierenden Ausgangsmaterials ggf. bei Zugabe einer festen Probe nach Zugabe von H₂O die feste Formulierung unter
20 Standardreaktionsbedingungen problemlos wieder in eine flüssige Phase überführbar ist.

Das Lyse/Bindungspuffersystem kann als wässrige Lösung vorliegen oder als feste Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäßen.

25 Als feste Phase können alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotroper Reagentien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger und Aerosile oder Trägermaterialien, die eine negativ geladene Oberfläche besitzen oder chemisch modifizierte Oberflächen aufweisen, die in ein negatives Ladungspotential besitzen.

30 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung der genannten Formulierungen, das durch Lyse des Ausgangsmaterial, Bindung der Nukleinsäuren an ein
35 Trägermaterial, Waschung der am Träger gebundenen Nukleinsäuren und Elution der Nukleinsäuren gekennzeichnet ist.

Aufgrund der erzielten DNA-Qualität ist es auch zur präparativen Isolierung und Aufreinigung für DNA zum Einsatz in der Gentherapie gut geeignet.

Gegenstand der Erfindung sind auch lagerstabile und einsatzfertige feste Formulierung von Lysepuffersystemen für die Nukleinsäureisolierung auf der Basis antichaotroper Salzen, die als „Ready-to-Use“-Mixe einsatzfertig in konventionellen Reaktionsgefäßen vorliegen. Die festen Formulierungen der Lysepufferansätze werden durch die Zugabe von lediglich der Probe (bei flüssigen Proben wie z.B. Vollblut, Speichel, Zellsuspensionen, Serum, Plasma, Liquor), bei festen Ausgangsmaterialien wie Gewebe, Haarwurzeln, Blutspuren an festen Oberflächen, Zigarettenkippen deparaffinierte Gewebe u.a.m. zusätzlich durch Zugabe von Wasser aktiviert und realisieren die Lyse des Ausgangsmaterials. Nach erfolgter Lyse des Ausgangsmaterials wird der Lyseansatz in an sich bekannter Weise ggf. nach Zugabe einer ethanolische Lösung bzw. eines Alkohol/Detergenz-Gemisches mit den Verwendung findenden nukleinsäurebindenden festen Phasen jeglicher Form (Suspension, Zentrifugationssäulchen) inkubiert. Die nachfolgende Bindung der Nukleinsäuren an die jeweiligen festen Phasen, das Waschen der gebundenen Nukleinsäuren und die finale Elution erfolgen wie schon beschrieben nach dem Stand der Technik.

Mit diesen festen Formulierungen sind neuartige Lösungen vor allem für die Anwendungsgebiete jeglicher Form von Nukleinsäurendiagnostik gegeben.

Hervorgehoben werden soll noch einmal, dass die Erfindungsvariante in einem Einschnitt-Verfahren und in einem „Single Tube“-Verfahren die Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien, ggf. Targetamplifikationen und ggf. nachfolgende Analytik des amplifizierten Nukleinsäureabschnittes ermöglicht. Ausgangsmaterial muss dabei nicht eine schon isolierte Nukleinsäure sein, sondern ist das komplexe die Nukleinsäure enthaltende Ausgangsmaterial. Die für die Bindung der Nukleinsäure benötigte Oberfläche enthält negative oder potentiell negative funktionale Gruppen. Die Bindung der Nukleinsäure wird in einem Lyse/Bindungspuffer realisiert, wobei die für die Bindung der negativ geladenen Nukleinsäure an die negative funktionalisierte Oberfläche benötigten Ionen aus antichaotropen Salzen stammen.

Damit sind realisierbar:

1. „Single Tube“-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien

2. „Single Tube“-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien und nachfolgende Targetvervielfältigung

3. „Single Tube“-Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien, nachfolgende Targetvervielfältigung und nachfolgende Analytik des vervielfältigten Nukleinsäureabschnittes.

Das bedeutet sowohl Nukleinsäure-Isolierung aus unterschiedlichsten DNA enthaltenen Ausgangsmaterialien ggf. Targetvervielfältigung und ggf. Analytik finden in ein und der selben Reaktionskavität oder ggf. auf ein und der selben Reaktionsoberfläche statt.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen und das universelle Verfahren zur Bindung von Nukleinsäuren an festen Phasen zur Isolierung, Aufreinigung und nachfolgenden komplexen molekularen Analytik von Nukleinsäuren aus beliebigen Ausgangsmaterialien und Mengen, welche Nukleinsäuren enthalten, stellen eine neuartige Plattformtechnologie für die Entwicklung von integrativen vollautomatisierbaren genanalytischen Systemen dar, die es ermöglichen, Probenvorbereitung, Targetvervielfältigung und Targetanalytik in einer Reaktionskavität zu realisieren.

Die Erfindung wird anschließend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Ausführungsbeispiel:

Bindung von DNA an eine Festphase

1µg eines DNA-Längenstandards (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas) wurde in einem Puffer, bestehend aus in der Abbildung dargestellten Komponenten auf eine Zentrifugationssäule mit einer Glasfasermembran (Micro Spin Säule, Safeclick) überführt. Danach folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm und Verwerfen des Filtrates. Nach Trocknung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm für 2min) erfolgte die Zugabe von 10µl eines Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,0) und Elution der DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm.

Jeweils 10µl der eluierten DNA wurden anschließend auf ein Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (Abbildung 1).

Patentansprüche

1. Formulierungen ohne chaotrope Bestandteile zur Isolierung von Nukleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase, insbesondere von DNA aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien enthaltend
5
- ein Lyse/Bindungspuffersystem, das mindestens eine antichaotrope Salzkomponente aufweist,
- eine feste Phase,
- an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer,
10 dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der antichaotropen Salzkomponenten zwischen 0,001 mM und 0,1 M beträgt, vorzugsweise 0,1 mM.
2. Formulierungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die antichaotrope Komponente ein Ammonium-, Cäsium-, Natrium- und/oder
15 Kaliumsalz ist, vorzugsweise Ammoniumchlorid.
3. Formulierungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse/Bindungspuffersystem Detergenzien und ggf. Zusatzstoffe aufweist.
- 20 4. Formulierungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass Detergenzien und Zusatzstoffe Tris-HCl, EDTA, Polyvinylpyrrolidone, CTAB, TritonX-100, N-Lauryl-Sarkosin, Natriumcitrat, DTT, SDS und/oder Tween sind.
5. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,
25 dass das Lyse/Bindungspuffersystem zur Bindung an die feste Phase einen Alkohol aufweist.
6. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse/Bindungspuffersystem Enzyme, vorzugsweise Protein-
30 abbauende Enzyme, aufweist.
7. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse/Bindungspuffersystem als wässrige Lösung vorliegt.
- 35 8. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse/Bindungspuffersystem als feste lagerstabile Formulierung in einsatzfertigen Reaktionsgefäßen vorliegt.

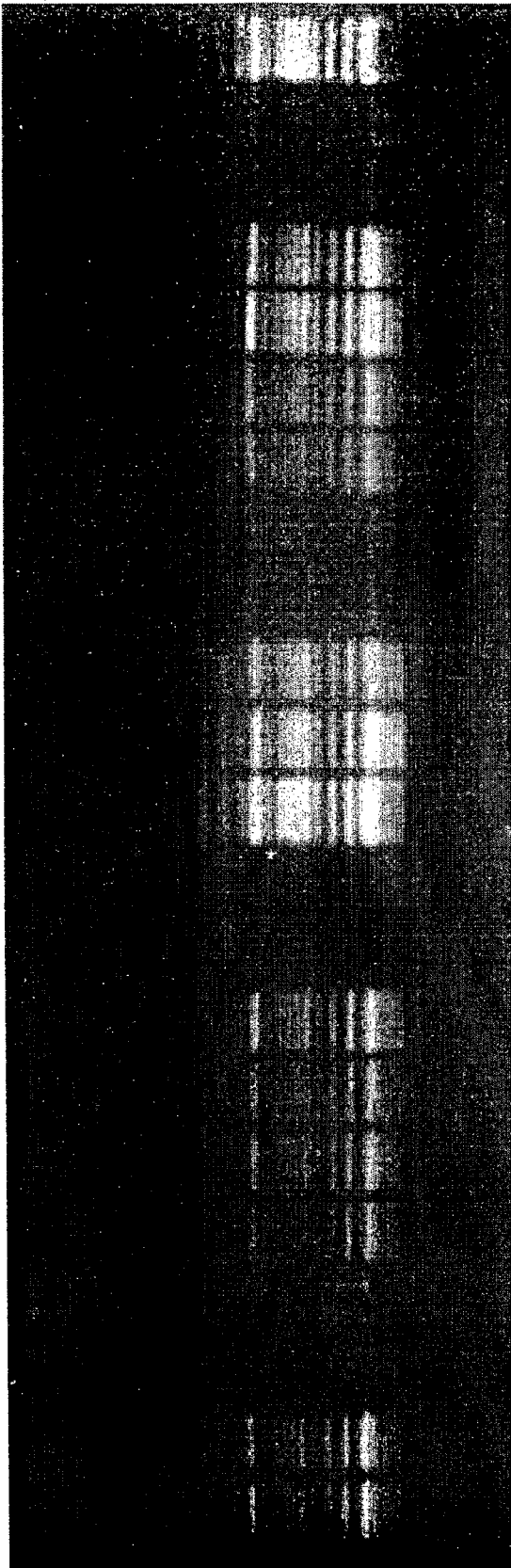
9. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Phase alle Trägermaterialien fungieren, die zur Isolierung mittels chaotroper Reagentien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Gläser, Zeolithe, Keramik, Siliciumträger.
10. Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Phase Trägermaterialien fungieren, die eine negativ funktionalisierte Oberfläche besitzen oder funktionalisierte Oberflächen aufweisen, die in ein negatives Ladungspotential überführt werden können.
11. Formulierungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des Trägermaterials mit einer Acetylgruppe, Carboxylgruppe oder Hydroxylgruppe modifiziert ist.
12. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung von Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausgangsmaterial lysiert wird, die Bindung der Nukleinsäuren an eine feste Phase erfolgt, die am Träger gebundenen Nukleinsäuren gewaschen werden und die Elution der Nukleinsäuren erfolgt.
13. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man das DNA enthaltende Material mit einem
- Lyse/Bindungspuffersystem, umfassend eine wässrige Lösung, die eine antichaotrope Salzkomponente, mindestens ein Detergenz, ggf. Zusatzstoffe sowie ggf. ein proteolytischen Enzym enthält, und
 - mit einer festen Phase ggf. unter Zusatz eines Alkohols in Kontakt bringt,
 - anschließend wäscht und die Nukleinsäure von der festen Phase löst.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass Ausgangsmaterialien kompakte Pflanzenmaterialien, wie Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc., klinisch relevante Proben, wie Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen, Lebensmittel, wie Fisch, Wurst, Konserven, Milch, forensischen Proben, wie Haarwurzeln, Zigarettkippen, Blutspuren und andere Proben, die DNA enthalten, sind.

15. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren, insbesondere von DNA, aus beliebigen komplexen Ausgangsmaterialien unter Verwendung von Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und 10 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass
- 5 - das Ausgangsmaterial in einem „Single Tube“- bzw. Einschritt-Verfahren mit einer negativ funktionalisierten Oberfläche oder dessen Oberfläche chemisch so modifiziert ist, dass sie in ein negatives Ladungspotential überführt werden kann, in Kontakt gebracht und lysiert wird ,
 - die Bindung der Nucleinsäure die Oberfläche erfolgt,
 - 10 - die gebundene Nucleinsäure gewaschen und ggf. eluiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass negativ funktionalisierte Oberflächen entsprechend modifizierte planare Oberflächen, Filtermembranen, herkömmliche Plastikgefäße oder Mikrottestplatten sind.
- 15
17. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure anschließend im gleichen Reaktionsansatz einer Amplifikationsreaktion ausgewählter Sequenzabschnitte unterzogen und ggf. daran anschließend eine Analyse der Gensequenzen durchgeführt wird.
- 20
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure anschließend im gleichen Reaktionsansatz hybridisiert oder sequenziert wird.
- 25
19. Verwendung antichaotroper Komponenten in einem Lyse/Bindungspuffersystem gemäß Anspruch 1 zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren unter Bindung an eine feste Phase.
20. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass antichaotrope Komponenten Ammonium-, Cäsium-, Natrium- und/oder Kaliumsalze sind, vorzugsweise Ammoniumchlorid.
- 30
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse/Bindungspuffersystem als wässrige Lösung eingesetzt wird.
- 35
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse/Bindungspuffersystem als feste lagerstabile Formulierung

vorliegt.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 24 zur präparativen Isolierung und Aufreinigung für DNA zum Einsatz in der Gentherapie.

Abb. 1



Kontrolle

pur

pur

LiCl 120 mM

LiCl 120 mM

LiCitrat 25 mM

LiCitrat 25 mM

0,5% MOPS

0,5% MOPS

0,5% Laurylsarcosin

0,5% Laurylsarcosin

Kontrolle

pur

pur

LiCl 120 mM

LiCl 120 mM

LiCitrat 25 mM

LiCitrat 25 mM

0,5% MOPS

0,5% MOPS

0,5% Laurylsarcosin

0,5% Laurylsarcosin

Bindungspuffer 1 mM Ammoniumchlorid
60% Isopropanol
mit

Bindungspuffer 0,1 mM Ammoniumchlorid
60% Isopropanol
mit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2007/000689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 C12N15/00

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)
C12Q C12N

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 practical, 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	WO 00/34463 A (INVITEK GMBH [DE]; HILLEBRAND TIMO [DE]; BENDZKO PETER [DE]) 15 June 2000 (2000-06-15) cited in the application claims 1-25 page 8, line 16 - line 25 the whole document	1-23
X	WO 2005/021748 A (QIAGEN GMBH [DE]; HIMMELREICH RALF [DE]; WERNER SABINE [DE]) 10 March 2005 (2005-03-10) claims 1,9,10,12,29,30 the whole document	1,2,5,7, 9-12,14, 15,19-21
A	WO 03/046178 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; CHARLTON HENRY [GB]) 5 June 2003 (2003-06-05) page 13	

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	*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
E earlier document but published on or after the international filing date	*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
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)	*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 September 2007	Date of mailing of the international search report 20/09/2007
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schmitt, Anja
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2007/000689

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	US 2007/042384 A1 (LI WEIWEI [US] ET AL) 22 February 2007 (2007-02-22) the whole document	1-23
E	----- WO 2007/065934 A (AJ INNUSCREEN GMBH [DE]; TIMO HILLEBRAND [DE]) 14 June 2007 (2007-06-14) claims 2,5,9-15 the whole document -----	1-5,7,9, 12,14-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/DE2007/000689

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0034463	A	15-06-2000	AT 230022 T	15-01-2003
			AU 771681 B2	01-04-2004
			AU 6186299 A	26-06-2000
			CA 2352472 A1	15-06-2000
			CN 1332798 A	23-01-2002
			DE 19856064 A1	29-06-2000
			DK 1135479 T3	07-04-2003
			EP 1135479 A1	26-09-2001
			JP 2002531126 T	24-09-2002
			NO 20012700 A	30-07-2001
			RU 2241004 C2	27-11-2004
			US 2001041332 A1	15-11-2001
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
WO 2005021748	A	10-03-2005	EP 1510577 A1	02-03-2005
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
WO 03046178	A	05-06-2003	AU 2002343043 A1	10-06-2003
			EP 1448775 A1	25-08-2004
			JP 2005510239 T	21-04-2005
			US 2007117090 A1	24-05-2007
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
US 2007042384	A1	22-02-2007	NONE	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
WO 2007065934	A	14-06-2007	DE 102005059217 A1	14-06-2007
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2007/000689

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12Q1/68 C12N15/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12Q C12N		
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	WO 00/34463 A (INVITEK GMBH [DE]; HILLEBRAND TIMO [DE]; BENDZKO PETER [DE]) 15. Juni 2000 (2000-06-15) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-25 Seite 8, Zeile 16 - Zeile 25 das ganze Dokument	1-23
X	WO 2005/021748 A (QIAGEN GMBH [DE]; HIMMELREICH RALF [DE]; WERNER SABINE [DE]) 10. März 2005 (2005-03-10) Ansprüche 1,9,10,12,29,30 das ganze Dokument	1,2,5,7, 9-12,14, 15,19-21
A	WO 03/046178 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; CHARLTON HENRY [GB]) 5. Juni 2003 (2003-06-05) Seite 13	
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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* älteres Dokument, 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 erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen 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 13. September 2007		Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts 20/09/2007
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schmitt, Anja

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 2007/000689

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	US 2007/042384 A1 (LI WEIWEI [US] ET AL) 22. Februar 2007 (2007-02-22) das ganze Dokument -----	1-23
E	WO 2007/065934 A (AJ INNUSCREEN GMBH [DE]; TIMO HILLEBRAND [DE]) 14. Juni 2007 (2007-06-14) Ansprüche 2,5,9-15 das ganze Dokument -----	1-5,7,9, 12,14-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2007/000689

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0034463	A	15-06-2000	AT 230022 T 15-01-2003
			AU 771681 B2 01-04-2004
			AU 6186299 A 26-06-2000
			CA 2352472 A1 15-06-2000
			CN 1332798 A 23-01-2002
			DE 19856064 A1 29-06-2000
			DK 1135479 T3 07-04-2003
			EP 1135479 A1 26-09-2001
			JP 2002531126 T 24-09-2002
			NO 20012700 A 30-07-2001
			RU 2241004 C2 27-11-2004
			US 2001041332 A1 15-11-2001
			WO 2005021748
WO 03046178	A	05-06-2003	AU 2002343043 A1 10-06-2003
			EP 1448775 A1 25-08-2004
			JP 2005510239 T 21-04-2005
			US 2007117090 A1 24-05-2007
US 2007042384	A1	22-02-2007	KEINE
WO 2007065934	A	14-06-2007	DE 102005059217 A1 14-06-2007