



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327582**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20005546	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.05.06 PCT/FR98/00912
(22)	Inng.dag	2000.11.03	(85)	Videreføringdag	2000.11.03
(24)	Løpedag	1998.05.06	(30)	Prioritet	1998.05.06, WO, PCT/FR98/00912
(41)	Alm.tilgj	2000.11.03			
(45)	Meddelt	2009.08.24			

(73) Innehaver Sophie Tuffet, 15, rue de Cadaujac, Bordeaux, FR
David Georges de Souza, 15, rue de Cadaujac, Bordeaux, FR
Joseph Portier, 9, rue de Gzaillan, Gradignan, FR
Jacques Bonnet, 3, allé Albert Camus, Pessac, FR
Guy Campet, 5, place de l'Estandit, Canejan, FR
Thierry Noel, 24, rue du Cerons, Bordeaux, FR

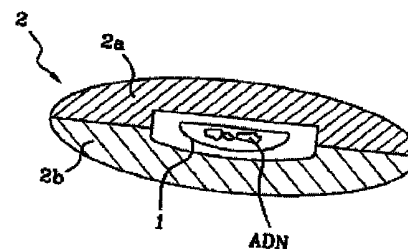
(72) Oppfinner Sophie Tuffet, 15, rue de Cadaujac, Bordeaux, FR
David Georges de Souza, 15, rue de Cadaujac, Bordeaux, FR
Joseph Portier, 9, rue de Gzaillan, Gradignan, FR
Jacques Bonnet, 3, allé Albert Camus, Pessac, FR
Guy Campet, 5, place de l'Estandit, Canejan, FR
Thierry Noel, 37, rue du Lac, Lyon, FR

(74) Fullmektig Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for langtidsbevaring av DNA-molekyler samt konserveringsinnretning egnet for samme formål
(56)	Anførte publikasjoner	US 5565318 A
(57)	Sammendrag	

En fremgangsmåte for langtidsoppbevaring av DNA-molekyler samt en innretning for gjennomføring av fremgangsmåten.

Det beskrives en fremgangsmåten for langtidsoppbevaring av DNA-molekyler der DNA etter ekstrahering og rensing på en hvilken som helst egnet teknisk måte av konvensjonell eller ikke-konvensjonell type underkastes en innkapsling i en tett, ikke-oksyderbar, metallisk kapsel (1) idet DNA-molekylet på forhånd er avfuktet.



Oppfinnelsen finner anvendelse ved oppbevaring av DNA.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for langtidsbevaring av DNA-molekyler, særlig DNA molekyler av human opprinnelse, samt konserveringsinnretning egnet for det samme formål.

- 5 Selv om DNA-molekylet er relativt stabilt, har arkeogenetiske studier vist at de kan bevares i millioner av år under gunstige betingelser men de kan imidlertid også brytes ned i fravær av konservering i en slik omgivelse.

Blant de årsaker som kan forårsake endring av DNA kan man anføre innvirkning av
10 ioniserende stråling som γ - eller røntgenstråling, innvirkning av ultrafiolett stråling eller enzymatisk eller kjemisk oksidasjon og hydrolyse.

US5565318 tilveiebringer en metode for langtidslagring av biologisk materiale, deriblant DNA. Metoden omfatter trinnet med å blande en vandig løsning av materialet
15 med en kopolymer. Blandingen blir så fordelt som dråper på et inert medium. Dråpen blir så tørket under egnede forhold, slik som under en strøm av nitrogen.

Foreliggende oppfinnelse tar sikte på å tilveiebringe en oppbevaringsteknikk for DNA i en omgivelse som bevarer de ovenfor beskrevne virkningseffekter.

20

Et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for langtidsbevaring av DNA-molekyler kjennetegnet ved at den omfatter, etter ekstrahering og rensing av DNA ved enhver egnet teknikk av konvensjonell eller ikke-konvensjonell type, å gjennomføre en innkapsling, i en atmosfære bestående av en eller
25 flere inerte gasser hvor fuktighetsgraden er ≤ 1 ppm vann, av DNA-molekylet, som på forhånd er avfuktet, i en tett, ikke-oksyderbar metallkapsel.

I en utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse blir det angjeldende DNA, før den fysiske innkapsling, underkastet en kjemisk innkapsling ved omhylling i en egnet
30 (ko)polymer.

Videre er det foretrukket at den kjemiske innkapsling gjennomføres ved hjelp av et hybrid bestående av nevnte (ko)polymer, organiske molekyler og/eller uorganiske salter, for forsterket beskyttelse av DNA mot ultrafiolette eller ioniserende stråler.
35 Nevnte hybrid består foretrukket av en (ko)polymer og tungmetallioner.

I en ytterligere utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse blir (ko)polymeren og de eventuelle organiske eller uorganiske additiver oppløst i et oppløsningsmiddel, som derefter fordampes inntil det oppnås en viskøs gel, hvorefter en på forhånd bestemt mengde DNA i suspensjon i en alkoholisk oppløsning anbringes i gelen og det hele 5 tørkes ved en egnet temperatur inntil det oppnås en fast blokk inneholdende DNA.

Det er foretrukket at den kjemiske innkapsling følges av en innkapsling i en tett, ikke-oksyderbar, metallisk kapsel (1) under en atmosfære bestående av en eller flere inerte gasser.

10

En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er kjennetegnet ved at kapselen anbringes i en tett beholder som er motstandsdyktig mot støt og knusing.

En ytterligere utførelsesform er kjennetegnet ved at DNA før innkapsling i 15 metallkapselen (1) anbringes på en glassplate. Glassplaten 3 kan som eksempel ha en diameter på 7 mm og en høyde på 1,2 mm idet platen 3 er innelukket på tett måte i kapselen 1.

Det angjeldende DNA henger ved glassplaten 3 som som eksempel kan ha en diameter 20 på 7 mm og en høyde på 1,2 mm idet platen 3 er innelukket på tett måte i kapselen 1.

Et andre aspekt ved oppfinnelsen vedrører en konserveringsinnretning for langtidsbevaring av DNA-molekyler som er ekstrahert og renses ved enhver egnet teknikk, konvensjonell eller på annen måte, egnet for innkapsling av det tidligere 25 avfuktede DNA molekyl eller egnet for innkapsling av DNA som tidligere har vært utsatt for kjemisk innkapsling ved omhylling i en egnet (ko)polymer, i en atmosfære bestående av en eller flere inerte gasser hvor fuktighetsgraden er ≤ 1 ppm vann, kjennetegnet ved at den består av en kapsel av formbart metall eller metallisk legering og som oppviser oksidasjonsstabile og ikke-kontaminerende egenskaper ovenfor DNA, 30 lukket på tett måte ved hjelp av et lokk på en hvilken som helst egnet måte og særlig forsegling.

I en mulig utførelsesform ifølge det andre aspekt ved oppfinnelsen er innretningen innelukket i en beholder i et materiale valgt blant gruppen keramikk, kompositter, 35 metaller og polymerer.

En utførelsesform ifølge det andre aspekt ved oppfinnelsen er kjennetegnet ved at innretningen , i det indre av metallkapselen, omfatter en glassplate på hvilken det angjeldende DNA er lagt.

- 5 Det er foretrukket at platen består av et natrium-kalsium glass.

Det således innkapslede DNA kan teoretisk oppbevares i flere titalls tusen år, avskjermet mot ioniserende stråling, ultrafiolett stråling, kjemiske angrep eller mekaniske belastninger.

10

Ved hver prøvetaking blir kapselen åpnet, den ønskede mengde DNA hentet ut og resten efterlates i kapselen idet tetthetsbetingelsene rekonstitueres. Det uthentede DNA blir så rehydratisert for analyse.

- 15 En slik kondisjonering bidrar til å sikre en langvarig preservering av det genetiske arvestoff som befinner seg beskyttet særlig mot oksidasjon og ioniserende og ultrafiolett stråling samt andre kjemiske eller mekaniske påvirkninger.

20 Andre karakteristika og fordeler vil fremgå av beskrivelsen nedenfor av utførelsesformer av oppfinnelsens fremgangsmåte, en beskrivelse som kun er gitt som eksempel og under henvisning til de vedlagte figurer som viser en konstruksjon i henhold til oppfinnelsen.

Før anvendelse av oppfinnelsen blir DNA ekstrahert og renset.

25

Dette kan gjøres på en hvilken som helst konvensjonell eller annen metode. Det angjeldende DNA kan ekstraheres fra hvilke som helst organismeceller.

30 Som eksempel blir DNA ekstrahert fra blod eller hårposer, celler fra spytt, slimhinner eller hudceller. Man gjennomfører så en renseprosess i flere trinn, nemlig: disagregering av cellene, eliminering av proteiner ved enzymatisk fordøyning, isolering/ekstrahering av DNA, forsterkning ved polymerisering hvis nødvendig og konservering mot endringsfaktorer.

- 35 Det således preparerte DNA foreligger i form av et precipitat i alkohol.

Protokollen ovenfor er velkjent og kan erstattes av en hvilken som helst annen eksisterende eller ny fremgangsmåte.

5 Det angjeldende DNA blir så ifølge oppfinnelsen bragt i en rustfri eller ikke-oksyderbar samt tett metallkapsel. En slik fysisk innkapsling gjennomføres i en atmosfære bestående av en eller flere inerte gasser, for eksempel edelgassene, og som oppviser en meget lav fuktighetsgrad (≤ 1 ppm vann) idet atmosfæren befinner seg ved atmosfærisk trykk.

10 Dette gjennomføres for eksempel ved hjelp av et konvensjonelt tørkeskap.

Kapselen som generelt vist med 1 i figur 1 i den vedlagte figur er for eksempel en gullkapsel dannet av en liten sirkulær cuvette lukket av et lokk som presser mot periferien av cuvetten.

15

Diameteren for gullkapselen er for eksempel i størrelsesorden 5 mm og tykkelsen 2 til 3 mm.

20 Den faste tetthet mellom cuvetten og lokket kan oppnås på en hvilken som helst egnet måte.

Gull er foretrukket på grunn av metallens formbarhet og oksidasjonsstabilitet og på grunn av de ikke-kontaminerende egenskaper vis-à-vis DNA. Som en variant kan en legering på basis av gull eller platina benyttes.

25

Atmosfæren under innkapsling er tørket for å unngå hydrolyse og oksidasjon av DNA etter innkapsling.

30 Mengden DNA som anbringes i kapselen, for eksempel et 30-talls mikrogram, er tilstrekkelig for å sikre et antall vesentlige distinkte uthentinger av DNA fra kapselen under oppbevaringen.

En slik kondisjonering kan være tilstrekkelig til å sikre langtidsoppbevaring av genetisk arvestoff i titalls for ikke å si hundretalls tusen år forutsatt at kapselen forblir hel.

35

Denne beskyttende kondisjonering av DNA er spesiell vis-à-vis:

- kjemiske eller enzymatiske hydrolysereaksjoner;

- kutting induisert av ultrafiolett stråling eller enhver annen ioniserende stråling som γ - eller røntgenstråler;
- oksidasjon på grunn av luftoksygenet.

5 Fortrinnsvis og for å forbedre preserveringen av det angjeldende DNA er kapselen 1, for eksempel en gullkapsel, i seg selv innelukket i en tett beholder 2 av et materiale som oppviser gode mekaniske egenskaper, for derved på god måte å beskytte kapselen 1 vis-
10 å-vis mekanisk påvirkninger og særlig vibrasjoner, støt eller oppskraping, eller enhver annen ytre påvirkning, for eksempel en temperaturøkning eller rent generelt for å beskytte kapselen mot omgivelsene uansett om disse er normale eller unormale.

Beholderen 2 kan være en liten boks i 2 deler 2a, 2b, forseglet eller festet til hverandre på en hvilken som helst annen måte for å sikre tetthet og integritet for enheten.

15 Beholderen 2 kan for eksempel være av et egnet materiale som keramer, kompositter, metaller eller polymerer.

Det omhyggelige preparerte DNA, før anbringelse i kapselen 1, kan bli underkastet en såkalt kjemisk innkapsling. For dette formål blir dette DNA omhyllt i en polymer eller
20 kopolymer som er inert vis-à-vis DNA, for å forsterke beskyttelsen med henblikk på endringsfaktorer idet DNA-molekylene oppbevares i porene i (ko) polymeren.

Omhyllingsmaterialet velges slik at det til slutt kan oppløses for å muliggjøre uthenting av DNA-molekylene.

25

Enhver (ko)polymer kan benyttes bortsett fra de som risikerer å reagere med DNA-molekylet, de som vanskeliggjør den endelige gjenoppløsning av det angjeldende DNA og de som for en slik gjenoppløsning nødvendiggjør et surt oppløsningsmiddel, det vil si med en pH-verdi \leq rundt 4.

30

Man kan gjennomføre en slik kjemisk innkapsling ved å anbringe det riktig preparerte DNA-materialet, for eksempel en DNA-klump oppnådd ved presipitering, i en akryl- eller polyakrylsyreoppløsning i metylalkohol. For eksempel bringer man 1 g akryl- eller polyakrylsyre i oppløsning i 50 cm³ metylalkohol. Alkoholene fordampes langsomt inntil
35 man oppnår en viskøs del. En mengde på rundt 1 mm³ DNA i suspensjon i en alkoholisk oppløsning anbringes i gelen.

Det hele tørkes ved 50°C for å oppnå en fast blokk inneholdende DNA og denne anbringes derefter i kapselen 1 i henhold til den ovenfor forklarte fremgangsmåte idet forskjellen er at det ikke lenger er nødvendig å arbeide i et tørkeskap men den nøytrale atmosfære opprettholdes.

5

Til slutt og på et hvilket som helst tidspunkt kan DNA, etter åpning av omhyllingene 1 og 2, hentes ut igjen ved nedsenking i 1 time i etylalkohol. Man oppnår på ny en molekylmengde identisk med den som ble oppnådd ved renseprosessen.

- 10 I henhold til et annet eksempel anvender man en annen (ko)polymer og fremstiller en oppløsning av 1 g metylmetakrylat eller -polymetakrylat i 50 cm³ diklormetan. Oppløsningsmidlet fordampes inntil det oppnås en viskøs gel. Mengden DNA er rundt 1 mm³ i suspensjon i en alkoholisk oppløsning og anbringes i gelen. Det hele tørkes ved 50°C inntil det oppnås en fast blokk inneholdende DNA og denne anbringes derefter i
- 15 kapselen 1 under de samme betingelser som beskrevet ovenfor.

Til slutt og på et hvilket som helst tidspunkt blir, etter åpning av omhyllingene 1 og 2, det opprinnelige DNA regenerert ved oppløsning av (ko)polymeren i diklormetan.

- 20 I henhold til en variant av disse kjemiske innkapslinger blir (ko)polymeren assosiert til molekyler av organiske og/eller uorganiske salter for bedre beskyttelse vis-à-vis ultrafiolett stråling og ioniserende stråling. Man kan særlig til (ko)polymeren tilsette tungmetallioner så sant det ikke er noen risiko for å skade det angjeldende DNA.
- 25 I henhold til et eksempel oppløses 1 g akrylamid eller polyakrylamid i 25 cm³ destillert vann. Til oppløsningen settes 50 mg kobberacetat og 50 mg sinkacetat. Vannet fordampes langsomt for å oppnå en viskøs gel. En mengde DNA på rundt 1 mm³ i suspensjon i en alkoholisk oppløsning anbringes i denne gel. Det hele tørkes ved 50°C under oppnåelse av en fast blokk inneholdende DNA og dette blir så bragt på plass i
- 30 kapselen 1 under de samme betingelser som beskrevet ovenfor.

- Man skal merke seg at den kjemiske innkapsling ved hjelp av en (ko)polymer oppviser fordelene av å realisere en polymerisering av individuelle kuler, noe som gjør den senere uthenting av DNA mere praktisk fordi det er tilstrekkelig å trekke ut én kule fra
- 35 kapselen uten å berører de andre.

Som brukbar polymer ifølge oppfinnelsen kan nevnes agarose.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for langtidsbevaring av DNA-molekyler, k a r a k -
5 t e r i s e r t v e d at den omfatter, etter ekstrahering og rensing av DNA
ved enhver egnet teknikk av konvensjonell eller ikke-konvensjonell type, å gjennomføre
en innkapsling, i en atmosfære bestående av en eller flere inerte gasser hvor
fuktighetsgraden er ≤ 1 ppm vann, av DNA-molekylet, som på forhånd er avfuktet, i en
tett, ikke-oksyderbar metallkapsel (1).

10

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
angjeldende DNA, før den fysiske innkapsling, underkastes en kjemisk innkapsling ved
omhylling i en egnet (ko)polymer.

15

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
den kjemiske innkapsling gjennomføres ved hjelp av et hybrid bestående av nevnte
(ko)polymer, organiske molekyler og/eller uorganiske salter, for forsterket beskyttelse
20 av DNA mot ultrafiolette eller ioniserende stråler.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at
hybridet består av en (ko)polymer og tungmetallioner.

25

5.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 2-4, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at (ko)polymeren og de eventuelle organiske eller
uorganiske additiver oppløses i et oppløsningsmiddel, som derefter fordampes inntil det
30 oppnås en viskøs gel, hvorefter en på forhånd bestemt mengde DNA i suspensjon i en
alkoholisk oppløsning anbringes i gelen og det hele tørkes ved en egnet temperatur
inntil det oppnås en fast blokk inneholdende DNA.

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at
den kjemiske innkapsling følges av en innkapsling i en tett, ikke-oksyderbar, metallisk
kapsel (1) under en atmosfære bestående av en eller flere inerte gasser.

7.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at kapselen (1) anbringes i en tett beholder (2) som er
motstandsdyktig mot støt og knusing.

5

8.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at DNA før innkapsling i metallkapselen (1)
anbringes på en glassplate.

10

9.

Konserveringsinnretning for langtidsbevaring av DNA-molekyler som er ekstrahert og
renset ved enhver egnet teknikk, konvensjonell eller på annen måte, egnet for
innkapsling av det tidligere avfuktede DNA molekyl eller egnet for innkapsling av
15 DNA som tidligere har vært utsatt for kjemisk innkapsling ved omhylling i en egnet
(ko)polymer, i en atmosfære bestående av en eller flere inerte gasser hvor
fuktighetsgraden er ≤ 1 ppm vann, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den består av en kapsel av formbart metall eller metallisk legering og som oppviser
oksidasjonsstabile og ikke-kontaminerende egenskaper ovenfor DNA, lukket på tett
20 måte ved hjelp av et lokk på en hvilken som helst egnet måte og særlig forsegling.

10.

Innretning ifølge krav 9, mere spesielt ment for fremgangsmåten ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er innelukket i en beholder (2) i
25 et materiale valgt blant gruppen keramikk, kompositter, metaller og polymerer.

11.

Innretning ifølge krav 9 eller 10, mere spesielt ment for anvendelse ved fremgangs-
måten ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den, i det
30 indre av metallkapselen (1), omfatter en glassplate (3) på hvilken det angjeldende DNA
er lagt.

12.

Innretning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at platen
35 (3) består av et natrium-kalsium glass.

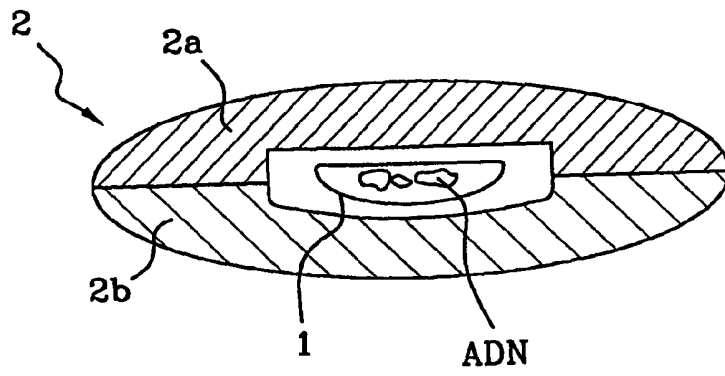


FIG.1

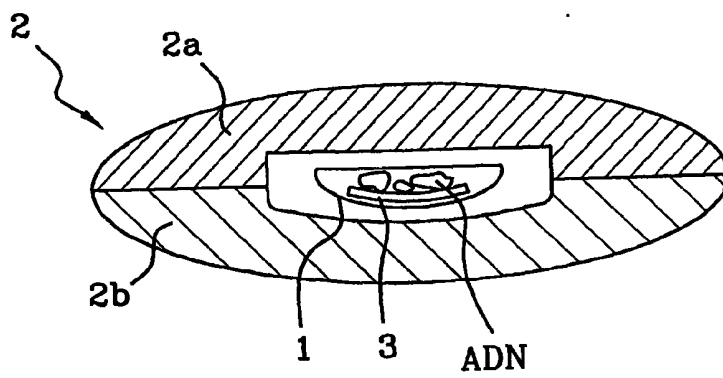


FIG.2