



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **262 809 A1**

4(51) **B 01 D 15/08**
C 07 H 21/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP B 01 D / 305 899 1	(22)	11.08.87	(14)	14.12.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, Berlin, 1086, DD

(72) Gütter, Peter, Dipl.-Biochem.; Ewald, Rudolf, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Börner, Thomas, Prof. Dr.; Will, Kathrin; Knauff, Ursula; Bergmann, Steffi, DD

(54) **Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Nukleinsäuren**

(55) Doppelstrang-, Einzelstrang-Nukleinsäuren, Chromatographie, pflanzliche Zellwandstrukturen, polyvalente Kationen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Nukleinsäuren. Das Verfahren ermöglicht die Trennung der Doppelstrang-Nukleinsäuren von Einzelstrang-Nukleinsäuren durch Chromatographie mit polyvalenten Kationen an pflanzlichen Zellwandstrukturen.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine wäßrige, annähernd neutrale Probelösung, die Nukleinsäuren in der mit polyvalenten Kationen komplexierten Form enthält, mit bekannten Methoden der Chromatographie durch ein Festbett, in dem pflanzliche Zellwände im Gleichgewicht mit einer wäßrigen annähernd neutral reagierenden Lösung ohne polyvalente Kationen oder mit einer Konzentration an polyvalenten Kationen deutlich unterhalb der Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung mit Nukleinsäuren stehen, bewegt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Festbett aus vesikulären Füllkörpern, die aus Zellwandgerüsten pflanzlicher Gewebeteilchen bestehen, hergestellt wird, dieses Festbett mit einer annähernd neutralen wäßrigen Pufferlösung ohne polyvalente Kationen gesättigt wird, der Probelösung vor dem chromatographischen Lauf Magnesiumionen in einer Konzentration von 50 bis 100 mM zugesetzt werden und die Elution in Abhängigkeit vom gewünschten Trennergebnis mit einer magnesiumfreien oder magnesiumhaltigen annähernd neutralen Pufferlösung bzw. mit einem kontinuierlichen oder stufenartigen Gradienten abnehmender Magnesiumkonzentration bei annähernd neutralem pH-Wert durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor oder während der chromatographischen Trennung der Anteil der Einzelstrangstrukturen in den Nukleinsäuren mit bekannten Methoden verändert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist auf dem Gebiet der molekularbiologischen Methodik und in der Gentechnik anwendbar.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die chromatographische Fraktionierung von Nukleinsäuren hat sich zu einem wichtigen Gebiet der molekularbiologischen und gentechnischen Methodik entwickelt. Neben der Trennung der Moleküle nach ihrer Größe durch die Ausschlußchromatographie beruhen bekannte Methoden auf Ionenaustausch, Adsorption oder Affinitätsbindung an festen Trägern. Allerdings ist das Spektrum von bekannten Trägermaterialien, die selektiv und reversibel Nukleinsäuren und Nukleoproteine zu binden vermögen, sehr begrenzt. So können zwar Trägermaterialien mit Ionenaustauschigenschaften (in sphärischer oder flächiger Form) zur reversiblen Bindung eingesetzt werden, sie haben aber den Nachteil, daß die gegebenen Biomoleküle nur unter ganz spezifischen Bedingungen (z. B. hohe Ionenstärken) wieder vom Träger eluiert werden können, wobei aufgrund der Pufferbedingungen zusätzliche umfangreiche, zeit- und arbeitsaufwendige Entsalzungsschritte notwendig sind. Daneben kann es aufgrund der Vielzahl von notwendigen Folgeschritten zu einer drastischen Reduzierung der Ausbeute kommen. Oft werden außerdem komplizierte Sekundär- und Tertiärstrukturen und damit die biologische Aktivität von Nukleinsäuren beeinträchtigt. Trägermaterialien wie Nitrocellulose, die Nukleinsäuren und Nukleoproteine über adsorptive Kräfte binden, sind nur sehr begrenzt für die selektive und reversible Immobilisierung dieser Molekülklassen einsetzbar. Obwohl Nitrocellulose einerseits eine gewisse Selektivität bei der Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren aufweist, ist es andererseits nicht möglich, die gebundenen Fragmente unter schonenden Bedingungen wieder vom Träger zu entfernen. Außerdem bindet Nitrocellulose nur Nukleinsäuren mit relativ großem Molekulargewicht, (Probst et al. 1979, Biochim. et Biophys., Acta 561, 132-146).

Dagegen zeigen Trägermaterialien mit zur Affinitätsbindung befähigten, spezifischen Nukleinsäuresequenzen auf Cellulosebasis (z. B. Oligo-dT-Cellulose, Poly(U)-Sephacrose, Poly(U)-(Hybond mAP)-Papier sowie Cellulose mit spezifisch gebundenen Oligonucleotiden sehr gute selektive und reversible Bindungseigenschaften. Aufgrund der hohen Spezifität der Wasserstoffbrückenbindung können nur diejenigen Nukleinsäurefragmente an die o. g. Träger immobilisiert werden, die die entsprechenden komplementären Sequenzen enthalten. Nach der Immobilisierung werden in großem Überschuß vorhandene, nicht komplementäre Nukleinsäuren durch einfache Waschschrte entfernt und anschließend die reine Nukleinsäurefamilie durch einfache Temperaturerhöhung in wäßrigen Puffern unter sehr schonenden Bedingungen vom Träger eluiert. (Aviv et al., 1972, Proc. Akad. Sci. USA 69, 1468-1477).

Dieses auch als molekulare Hybridisation bekannte Prinzip wird vor allem bei der Isolierung von intakten Messenger-RNS (mRNS) aus komplexen RNS-Gemischen mittels Oligo-dT-Cellulose, Poly(U)-Papier bzw. -Sephacrose oft angewendet. (Bantle et al., 1976, Anal. Biochem. 72, 413-423). Durch die Möglichkeit, synthetisch hergestellte Oligonucleotide mit spezifischen Primärstrukturen an feste Trägermaterialien einfach zu binden, können beliebig komplementäre Nukleinsäurestrukturen selektiv und reversibel gebunden werden. Allerdings sind dazu jeweils die entsprechenden DNA-Fragmente chemisch zu synthetisieren. Die zuletzt dargestellten, bekannten Trägermaterialien zur Affinitätsbindung komplementärer Nukleinsäuren haben den Nachteil, daß sie aufgrund ihrer Struktur und des verwendeten Bindungsprinzips der molekularen Hybridisation nur für ganz spezielle Zwecke einsetzbar sind. Sie können nicht verwendet werden, um beliebige einzelsträngige Nukleinsäurefragmente selektiv und reversibel zu immobilisieren und damit von doppelsträngigen Nukleinsäuren abzutrennen. Trägermaterialien mit diesen Eigenschaften sind bisher nicht bekannt geworden. Auch die vielfach zur Präparation von Nukleinsäuren und DNA-bindenden Proteinen eingesetzten verschiedenen Hydroxylapatit-Trägermaterialien (Bernardi, 1971 Meth. Enzymol. 21, 95-139) verursachen durch die hydrodynamisch ungünstige Form der Hydroxylapatitkristalle Strangbrüche und damit eine teilweise Degradation der eingesetzten Nukleinsäuren.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines effektiven Verfahrens zur Fraktionierung von Nukleinsäuren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe besteht in der Entwicklung eines Verfahrens zur chromatographischen Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren, mit dessen Hilfe beliebige einzelsträngige Nukleinsäuren oder Einzelstrangfragmente selektiv und reversibel durch Adsorption von doppelsträngigen Nukleinsäuren abgetrennt werden können.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine wäßrige annähernd neutrale Probelösung, die Nukleinsäuren in der mit polyvalenten Kationen komplexierten Form enthält, mit bekannten Methoden der Chromatographie durch ein Festbett, in dem pflanzliche Zellwandstrukturen im Gleichgewicht mit einer wäßrigen, annähernd neutral reagierenden Lösung ohne polyvalente Kationen oder mit einer sehr geringen Konzentration an polyvalenten Kationen (unterhalb der Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung mit Nukleinsäuren) stehen, bewegt wird. Besonders vorteilhaft läßt sich das Verfahren mit bekannten vesikulären Füllkörpern für die Chromatographie, die aus den Zellwandgerüsten pflanzlicher Gewebeteilchen bestehen, durchführen, wobei das Festbett mit einer annähernd neutralen wäßrigen Pufferlösung ohne polyvalente Kationen gesättigt wird, bevor die Nukleinsäuren enthaltende Probe aufgetragen wird.

Eine günstige Variante des Verfahrens besteht darin, daß der Probelösung Magnesiumionen in einer Konzentration von 50 bis 100 mM zugesetzt werden. Wird die Probe anschließend mit magnesiumfreier, annähernd neutraler verdünnter Pufferlösung eluiert, verlassen die doppelsträngigen Nukleinsäuren das Festbett mit dem Totvolumen, während die Nukleinsäuren mit Einzelstrangabschnitt das Festbett erst nach den Magnesiumionen mit einem Peak bei über 100% des Festbettvolumens verlassen. Enthält das Elutionsmittel zunächst eine hohe Magnesiumkonzentration (über 20 mM), werden die Nukleinsäuren mit Einzelstrangabschnitt selektiv auf dem Festbett immobilisiert. Durch Gradienten abnehmender Magnesiumkonzentration können die Einzelstrang-Nukleinsäuren fraktioniert eluiert werden.

Eine noch weitergehendere Fraktionierung kann dadurch erreicht werden, daß vor oder während der chromatographischen Trennung der Anteil der Einzelstrangabschnitte in den Nukleinsäuren mit bekannten Methoden verändert wird. Die Veränderung des Anteils der Einzelstrangabschnitte kann durch Zusatz verschiedener Stoffe oder durch Einwirkung erhöhter Temperatur erfolgen. Die Magnesiumionen können zur Durchführung dieses Verfahrens auch durch andere polyvalente Kationen, die mit Nukleinsäuren Komplexe bilden, z. B. durch Mn^{2+} -Ionen oder Ca^{2+} -Ionen ersetzt werden, von denen je nach der Gleichgewichtskonstanten und in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedliche Konzentrationen in der Probelösung optimal sind.

Die vesikuläre Struktur der Füllkörper ist für die Adsorption der Einzelstrang-Nukleinsäuren nicht essentiell, so daß immobilisierte pflanzliche Zellwände generell eingesetzt werden können.

Ausführungsbeispiele

Zur Isolation der zellulären Nukleinsäuren von *Escherichia coli* wird eine Kultur in 200 ml Bakterienvollmedium angesetzt. Die Bakterienzellen werden bei einer optischen Dichte $OD_{660} = 2,0$ geerntet. Die Extraktion der zellulären Nukleinsäuren erfolgt nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly, (Birnboim H. C., Doly J., 1979, Nucleic Acids Res., 7, 1513). Die Veränderung dieser Methode besteht im Weglassen der alkalischen Denaturierung der Nukleinsäuren, der Lysis-Puffer besteht nur in einer 1%igen Lösung von Natriumdodecylsulfat. Die Denaturierung der Proteine nach der Zugabe von Natriumazetat wird durch ein zusätzliches Einfrieren auf $-20^{\circ}C$ unterstützt. Die nach dieser Methode gewonnene Nukleinsäurefraktion wird in 500 μ l eines TE-Puffers (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM EDTA) aufgenommen und bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

Für die chromatographische Auftrennung dieser gewonnenen Nukleinsäurefraktion wird eine Chromatographiesäule mit einem Packungsvolumen von etwa 1 ml genutzt. Die Säulenpackung besteht aus protoplastinhaltigen vesikulären Trägermaterialien (hergestellt aus Suspensionskulturen von *Chenopodium album* entsprechend DE 3347512), welche mit einem NT-Puffer (5 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) äquilibriert wird.

Zur chromatographischen Nutzung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Trägermaterial werden in den Experimenten folgende Bedingungen gewählt:

Trennung A:

100 μ l der wie oben gewonnenen Nukleinsäurefraktion werden auf die beschriebene Chromatographiesäule aufgetragen und im NT-Puffer chromatographiert. Die Fraktionen werden zu je 50 μ l gesammelt und mit Hilfe einer horizontalen Gelelektrophorese analysiert. Dazu wird ein 1%iges Agarosegel (BRL) in TAE-Puffer genutzt (Maniatis et al. 1981). Die Nukleinsäuren werden nach ihrer elektrophoretischen Trennung mit Hilfe einer Ethidiumbromidlösung (0,5 Mg/ml) im Agarosegel angefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Das Ergebnis zeigt, daß die im Gel höher liegenden DNA-Banden zusammen mit der im Gel sichtbaren, diffusen RNA-Fraktion beginnend mit dem Ausschlußvolumen (etwa 50% des Packungsvolumens) eluiert werden.

Trennung B:

Es werden die gleichen Versuchsbedingungen wie oben gewählt, jedoch wird die Chromatographiesäule mit einem NT-MgCl₂-Puffer (50 mM MgCl₂) äquilibriert und die Nukleinsäurefraktion wird im gleichen Puffer eluiert. Die Auftrennungsergebnisse der Nukleinsäuren entsprechen denen im Versuch A.

Trennung C:

Auf der mit NT-Puffer äquilibrierte Säule wird die gewonnene Nukleinsäurefraktion mit 100 mM MgCl₂ aufgetragen und mit NT-Puffer (ohne Magnesiumionen) eluiert. Das Auftrennungsergebnis bei diesem Versuch zeigt, daß die RNA-Fraktion im Verhältnis zur DNA später als in den vorangegangenen Versuchen eluiert wird (Peak bei über 100% des Packungsvolumens, nach dem Mg^{2+} -Ionen). Eine besonders saubere und scharfe Trennung zwischen den verzögerten RNA-Fraktionen und der zuerst eluierten

DNA ist bei Zusatz von Ethidiumbromid (0,55 ppm) zu allen verwendeten Lösungen festzustellen. Dieses Trennergebnis kann auch durch die Wahl der Temperatur oder anderer Zustandgrößen beeinflusst werden, wenn dadurch der Anteil von Einzelstrangschnitten verändert wird.

Trennung D:

Auf die mit NT-Puffer äquilibrierte Säule wird die gewonnene Nukleinsäurefraktion, mit 100 mM MgCl_2 , aufgetragen und mit NT- MgCl_2 -Puffer (20 mM MgCl_2) eluiert. Hierbei kann nur die DNA-Fraktion, im Elektropherogramm deutlich sichtbar eluiert werden.

Durch eine erneute Elution mit dem NT-Puffer kann auch die vormals an den Träger der Säule gebundene RNA-Fraktion eluiert werden und demzufolge im Elektropherogramm sichtbar gemacht werden. Analog wird mit grundsätzlich gleichem Ergebnis der Versuch durchgeführt, wenn die Mg^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} -, Fe^{3+} -, Co^{2+} -, Al^{3+} - und Zn^{2+} -Ionen ersetzt werden.

Trennung E:

Die analog Versuch D gebundene Nukleinsäurefraktion (RNA) wird durch stufenweise Erniedrigung der Mg^{2+} -Konzentration eluiert. Als Elutionspuffer werden nacheinander Lösungen mit der doppelten Menge des Ausschlußvolumens und mit ständig um die Hälfte verminderten MgCl_2 -Konzentration eingesetzt.

Analog zu den vorangegebenen Versuchen wurden die eluierten Fraktionen elektrophoretisch analysiert. Die Auswertung zeigt, daß verschiedene RNA-Größenklassen bei unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen eluiert werden können.