



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 15 148 T2** 2006.02.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 204 741 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 15 148.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/22827**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 955 744.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/014590**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.08.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.03.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/10** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
377986 20.08.1999 US

(73) Patentinhaber:
Promega Corp., Madison, Wis., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**TEREBA, M., Allan, Fitchburg, US; BITNER, M.,
Rex, Cedarburg, US; KOLLER, C., Susan, Verona,
US; SMITH, E., Craig, Oregon, US; KEPHART, D.,
Daniel, Cottage Grove, US; EKENBERG, J.,
Steven, Mount Horeb, US**

(54) Bezeichnung: **SIMULTANE ISOLIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON DNA**

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Isolation einer definierten Menge eines DNA-Zielmaterials von anderen Substanzen in einem Medium, um eine geeignete Menge isoliertes DNA-Zielmaterial für weitere Verarbeitungen oder Analyse bereitzustellen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Isolation einer definierten Menge DNA-Zielmaterial unter Verwendung eines silicahältigen festen Trägers, der zur reversiblen Bindung einer definierbaren Menge des DNA-Zielmaterials, wie beispielsweise magnetisch ansprechenden Teilchen, die Silica oder ein Silicaderivat umfassen, fähig ist.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Viele Analyseverfahren, welche die Untersuchung von DNA-Zielmaterial in einem bestimmten Medium umfassen, funktionieren nur gut, wenn das DNA-Zielmaterial von anderem Material in dem Medium isoliert und nach der Isolation davon quantifiziert wird. Die Isolation von DNA-Zielmaterial von anderen Komponenten in einer forensischen Probe (z.B. Körperflüssigkeiten von einem Tatort, Blut oder Bukkalzellen von Verdächtigen usw.) ist entscheidend, um sicherzustellen, dass die anderen Komponenten in der Probe die Analyse des DNA-Zielmaterials nicht beeinträchtigen. Unglücklicherweise sind forensische Proben häufig so klein oder so abgebaut, dass die Quantifizierung von daraus isoliertem DNA-Zielmaterial zeitaufwendig und schwierig sein kann. Außerdem führt der Unterschied der Menge an Leukozyten, die in einem gegebenen Volumen Blut vorhanden sind, zu einer weiteren Erhöhung des Mengenunterschieds der isolierten DNA.

[0003] Mit der Einführung von DNA-Typisierung als Hilfsmittel für Vaterschaftstests und zur Identifizierung von biologischen Proben von Tatorten entstand auch die Notwendigkeit, verlässliche Verfahren zur Isolation und Quantifizierung von geringen Mengen genomischer DNA zu entwickeln. In den Vereinigten Staaten resultiert die Notwendigkeit, solche Systeme zu entwickeln, aus der Erstellung einer Datenbank von Analyseergebnissen an Loci menschlicher genomischer DNA mit dreizehn kurzen tandemartigen Wiederholungen ("short tandem repeat"; "STR-Loci") durch das Federal Bureau of Investigation. Diese Ergebnisse werden in eine zentralisierte Datenbank aufgenommen, die als Combined DNA Index System ("CODIS") bezeichnet wird. STS-Analysesysteme basieren auf der Verwendung von Amplifikationsreaktionen, die eine Analyse sehr geringer Mengen DNA, sogar geringerer Mengen als ein Nanogramm, ermöglichen. Eine Amplifikation funktioniert jedoch nur gut, wenn die Menge der zu amplifizierenden DNA in einem definierten Bereich liegt und im Wesentlichen von Verunreinigungen isoliert ist, welche die Amplifikationsreaktion hemmen oder stören können. Bevor STR-Loci also amplifiziert und analysiert werden können, muss die Ziel-DNA gereinigt und quantifiziert werden, um das Risiko von Amplifikationsartefakten zu verringern. Die Quantifizierung ist auch bei anderen Anwendungen wichtig, wie beispielsweise bei DNA-Sequenzierung.

[0004] Derzeit verwendete Verfahren zur Isolation und Quantifizierung von genomischer DNA, die zur Typisierung von genetischer Übereinstimmung verwendet wird, sind zeitaufwendig und zu komplex, um automatisiert werden zu können. Beispielsweise wird das folgende Verfahren typischerweise verwendet, um genomische DNA zur Amplifikation und Analyse von STR-Loci, wie beispielsweise die CODIS-Loci, zu isolieren und zu quantifizieren. Zuerst werden unter Verwendung verschiedener Vorrichtungen und Volumina Blut- oder Bukkalabstriche von Personen entnommen. Dann werden diese Proben verarbeitet, um DNA unterschiedlicher Reinheit und Integrität zu isolieren. Danach wird die DNA für Downstream-Processing quantifiziert, sodass die geeignete Menge verwendet werden kann, um Artefakte zu vermeiden. Darauf wird die DNA unter Verwendung von Reaktionen amplifiziert, die Primer nutzen, die für jeden der zu analysierenden STR-Loci spezifisch sind. Und schließlich werden die Amplifikationsprodukte auf einem Gel- oder Kapillarelektrophoresesystem zur Genotyp-Identifizierung analysiert. Für ein im Handel erhältliches System zur Verwendung bei der Coamplifikation und Analyse aller dreizehn CODIS-Loci siehe die Systeme GenePrint® PowerPlex™ 1.1 und GenePrint® PowerPlex™ 2.1 (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

[0005] Weiße Blutkörperchen sind die primäre DNA-Quelle im Blut. Der Gehalt an weißen Blutkörperchen in Blut variiert jedoch beträchtlich, sowohl zwischen einzelnen Personen als auch, basierend auf dem Gesundheitszustand der Person zum Zeitpunkt der Probenentnahme, zwischen unterschiedlichen Proben von einer Person. Ähnliche Schwankungen treten bei Bukkalabstrichproben auf, die mithilfe verschiedener Tupfer entnommen wurden und vor der Verarbeitung bei unterschiedlichen Lagerbedingungen gelagert wurden.

[0006] Sowohl innerhalb als auch außerhalb des Kontexts der Amplifikation von genomischer DNA für DNA-Typisierungsanalysen, wie er oben erläutert wurde, führt bei einer Amplifikation durch die Polymerase-

kettenreaktion (PCR) eine zu kleine Matrize zu geringer Bandenintensität oder zu keiner Bandenamplifikation. Eine zu große DNA-Matrize führt häufig zu Überamplifikation. Die Überamplifikation wird durch eine zu große Anzahl an Artefaktpeaks und "Stutter"-Banden, die als kleinerer Peak direkt unter einem Hauptallelpeak definiert sind, erkannt. Außerdem kann hohe Hintergrundaktivität und "Pull-up", d.h. eine Unfähigkeit, die Banden mit unterschiedlicher Farbe in einem Multiplex zu trennen, vorhanden sein. Eine Reamplifikation einer geringeren Menge DNA kann erforderlich sein, wenn zu viele Artefakte vorhanden sind. Stutter-Banden sind besonders ausgeprägt, wenn zu viel DNA vorhanden ist und zur Abtrennung von PCR-Amplifikationsprodukten Kapillarelektrophorese verwendet wird. Wie beim Sequenzieren kann auch die Bildung von Amplifikationsprodukten voller Länge gehemmt werden, wenn zu viel Matrizen-DNA vorhanden ist. Mit anderen Worten kann bei einer PCR-Amplifikation zu viel Matrizen-DNA zur Gegenwart von teilweise amplifizierten Fragmenten und geringen Mengen komplett amplifizierter Produkte führen.

[0007] Genauer gesagt wird, wenn PCR oder andere Amplifikationsverfahren zu Amplifikation von DNA zu forensischen Zwecken verwendet werden, bei der Amplifikation von zu viel DNA in einer einzelnen Reaktion die Probe überamplifiziert, und die Signalstärke der erwarteten Banden neigt dazu, außerhalb des gewünschten Bereichs des Detektors zu fallen. Traditionellerweise werden diese Schwierigkeiten durch die Quantifizierung von DNA nach seiner Reinigung minimiert, was jedoch zusätzliche Schritte, Zeit und Kosten erfordert. Bei der Bestimmung von genetischer Identität führt die Gegenwart von mehr DNA als für das Analysesystem empfohlen ist häufig zu nicht interpretierbaren Ergebnissen; dies kann zur Vergeudung begrenzter Proben führen, vor allem im Bereich von forensischen Analysen.

[0008] Eine weitere DNA-Anwendung, die eine genaue Quantifizierung der Nucleinsäure erfordert, ist die Sequenzierung. Die Sequenzierung von DNA wird am besten an Proben von Ziel-DNA durchgeführt, die von anderem Material in einem Medium, welche die Sequenzierungsreaktion stören können, isoliert wurden. Außerdem müssen Proben von Ziel-DNA vor der Initiierung einer Sequenzierungsreaktion quantifiziert werden. Im Bereich der DNA-Sequenzierung muss beispielsweise die Menge der DNA-Matrize bei der Sequenzierungsreaktion innerhalb eines relativ kleinen Bereichs liegen. Wenn etwa Plasmid-DNA verwendet wird, sind bei einer automatisierten Sequenzierung unter Verwendung von BigDye™ Chemistry (Perkin Elmer Biosystems) 150 – 300 ng DNA empfohlen. Wenn unter Verwendung desselben Sequenzierungssystems PCR-Produkte als Sequenzierungsmatrizen verwendet werden, sind 40 – 80 ng DNA empfohlen. Zu viele Matrizen können zu kurzer Sequenzleselänge, schlechter Auflösung oder höheren Fehlerraten führen. Bei zu wenigen Matrizen ist die Signalstärke zu schwach, um eine optimale Sequenzablesung durchzuführen.

[0009] Plasmid-DNA ist typischerweise eine Quelle für DNA für Sequenzierungsreaktionen. Der Plasmid-DNA-Gehalt innerhalb einer Population von Bakterienkulturen variiert aufgrund von Faktoren, wie beispielsweise unterschiedlicher Plasmidkopienzahlen in den einzelnen Zellen, der Verwendung von unterschiedlichen Medien und der Konzentration der Zellmasse, beträchtlich.

[0010] Derzeit werden verschiedene Verfahren verwendet, um ein DNA-Zielmaterial in einer Probe zu quantifizieren. Ein solches Verfahren ist spektralphotometrische Bestimmung. Bei diesem Verfahren wird das Absorptionsvermögen einer Probe mit unbekannter Konzentration bei der Wellenlänge abgelesen, die dem maximalen Absorptionsvermögen des DNA-Zielmaterials entspricht. Das Absorptionsvermögen bei 260 Nanometer (nm) (" A_{260} ") wird beispielsweise verwendet, um die Konzentration von DNA in einer Lösung zu bestimmen, während das Absorptionsvermögen bei 280 nm (" A_{280} ") verwendet wird, um die Konzentration eines Proteins in einer Lösung zu bestimmen. Die Absorptionsablesung bei 260 nm von 1 entspricht etwa 50 Mikrogramm (50 µg) pro Milliliter (µg/ml) für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA und RNA und etwa 20 µg/ml für einzelsträngige Oligonucleotide. Das Verhältnis zwischen den Ablesungen bei 260 nm und 280 nm (" $A_{260}:A_{280}$ ") stellt eine Schätzung des Grades bereit, in dem eine gegebene Zielnucleinsäure von Proteinen und anderen Materialien isoliert wurde, die bei 280 nm absorbieren. Reine Nucleinsäurepräparate weisen $A_{260}:A_{280}$ -Werte von zumindest etwa 1,8 auf. Eine Einschränkung des spektralphotometrischen Verfahrens besteht darin, dass es nicht empfindlich genug ist, um zur Detektion und Quantifizierung von geringen Mengen Nucleinsäure verwendet zu werden. Wenn die Nucleinsäurekonzentration in einer Probe weniger als etwa 500 Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) beträgt oder wenn die Probe mit anderen Substanzen verunreinigt ist, die entweder Ultraviolettstrahlung absorbieren oder quenchen, führt das zu ungenauen Ergebnissen.

[0011] Ein weiteres Verfahren zur Quantifizierung von DNA nach dem Isolieren besteht in der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen, wie beispielsweise Ethidiumbromid, SyberGreen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) oder PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Farbstoffe werden oft verwendet, wenn nicht genug DNA vorhanden ist, um genaue spektralphotometrische Messungen durchzuführen. Die Fluoreszenzmenge von Ethidiumbromid ist, wenn sie unter einer Ultraviolett- (UV-) Lichtquelle visualisiert wird,

proportional zur gesamten DNA-Masse. Daher können eine Standardkurve bekannter Mengen DNA und einer bekannten Menge einer Probe mit unbekannter Konzentration in einem Agarosegel laufen gelassen und das Gel dann mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht betrachtet werden. Diese Gelart wird Ausbeutebestimmungsgel ("yield gel") genannt. Die DNA-Menge in der Probe kann geschätzt werden, indem die Fluoreszenz der Probe mit der Fluoreszenz der Standards verglichen wird. Auf ähnliche Weise kann dieses Verfahren in einer Lösung mit DNA-Interkalationsfarbstoffen durchgeführt werden. Mit PicoGreen können so niedrige DNA-Werte wie beispielsweise etwa 25 pg/ml detektiert werden. Eine Einschränkung des Yield-Gel-Verfahrens oder der Verwendung von Farbstoffen zur Quantifizierung von DNA in einer Lösung besteht darin, dass eine visuelle, spektralphotometrische oder fluorimetrische Approximation der Ausbeute durch Vergleich mit einer anderen DNA-Probe erforderlich ist. Die Variabilität der unter Verwendung dieses Verfahrens erhaltenen Ergebnisse ist hoch, und außerdem ist es anfällig für Fehler aufgrund verunreinigender Substanzen in der DNA-Probe.

[0012] Im Handel sind zumindest zwei Sets zur Quantifizierung geringer Mengen menschlicher genomischer DNA nach einer Isolierung erhältlich. Das sind ACES™ 2.0 Human DNA Quantitation Probe Plus System von Life Technologies, Inc., (Gaithersburg, MD, USA) und Quantiblot® Human DNA Quantitation Kit von PE Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Diese Sets werden typischerweise in Laboratorien verwendet, die Tests zu genetischer Übereinstimmung mit menschlicher DNA durchführen. Das Quantiblot®-System basiert auf der Hybridisierung einer primatenspezifischen biotinylierten Oligonucleotidsonde für isolierte DNA-Proben. Die Detektion kann entweder kolorimetrisch oder chemilumineszent erfolgen; beide Detektionsverfahren sind zur Quantifizierung von 0,15 bis 10 ng menschlicher DNA fähig. Der Test dauert jedoch bis zu zwei Stunden. Außerdem erfordert das chemilumineszente Verfahren einen Röntgenfilm und Verarbeitungsmöglichkeiten und kann nur für DNA von Primaten verwendet werden. Das ACES™-System ist darin ähnlich, dass es eine Bindung der DNA-Probe an eine Membran und eine Hybridisierung an eine humanspezifische DNA-Sonde sowie Visualisierung durch Lumineszenz erfordert. Dieses System kann 0,04 bis 40 ng menschliche DNA quantifizieren. Beide System weisen dieselbe Einschränkung in Bezug auf interkalierende Farbstoffe auf; sie erfordern nämlich eine visuelle Approximation der Ausbeute durch Vergleich mit einer anderen DNA-Probe.

[0013] Auf dem Gebiet der Erfindung besteht Bedarf an Verfahren, die zur Entfernung einer definierten Menge DNA-Zielmaterial aus einer Probe fähig sind, die zu viel DNA-Zielmaterial enthält. Diese definierten DNA-Mengen können dann in Verfahren verwendet werden, bei denen sich überschüssige DNA nachteilig auf den Erhalt von interpretierbaren Ergebnissen auswirkt. Solche Verfahren umfassen PCR-Amplifikation, STR-Analyse, DNA-Sequenzierung und Bestimmung der genetischen Übereinstimmung, sind jedoch nicht auf diese eingeschränkt.

[0014] Darüber hinaus können existierende Quantifizierungssysteme nicht leicht automatisiert werden und sind häufig empfindlich gegenüber Verunreinigungen, die im DNA-Präparat verbleiben. Aufgrund der großen Anzahl an Proben, die analysiert und in die Datenbank aufgenommen werden soll, ist ein Hochdurchsatzverfahren wünschenswert, das herkömmliche Schritte auf STR-Basis verbindet, ohne jedoch Vorteile eines niedrigen Durchsatzes zu verlieren. Ein System zur Isolation von DNA aus Proben, das die DNA bei Reinigungsverfahren quantifiziert, würde einen Verfahrensschritt eliminieren und einen bedeutenden Fortschritt auf dem Gebiet der Erfindung darstellen. Auch ein Verfahren, das weniger empfindlich gegenüber Artefakten ist als herkömmliche Quantifizierungsverfahren, wäre wünschenswert.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Adsorption von DNA-Zielmaterial aus einem Medium an eine feste Phase unter definierten Bedingungen und die Übertragung definierter Mengen des biologischen Materials in eine zweite Lösung. Ziel-DNA, die gemäß vorliegender Erfindung in die zweite Lösung übertragen wird, kann als Matrize zur Sequenzierung oder als Matrize für Amplifikationsreaktionen ohne einen separaten Quantifizierungsschritt verwendet werden. Da bei diesem Verfahren keine separate Quantifizierung von isoliertem Zielmaterial mehr erforderlich ist, bevor es einer Downstream-Processing oder einer Analyse unterzogen wird, spart das Verfahren Zeit und bietet sich für eine Automatisierung an.

[0016] Das vorliegende System umfasst die Isolation von DNA-Zielmaterial von anderen Zellkomponenten unter Verwendung von Abtrennung auf Magneteilchenbasis. Dieser Ansatz bietet Flexibilität bei der Verarbeitung, da magnetische Abtrennung entweder manuell mit geringem Durchsatz oder automatisch mit hohem Durchsatz durchgeführt werden kann.

[0017] Kurz gesagt umfasst die vorliegende Erfindung in einem Aspekt ein Verfahren zur Isolation einer defi-

nierten Menge DNA-Zielmaterial von anderen Zellkomponenten in einem Medium durch (a) Bereitstellung eines Mediums, welches das DNA-Zielmaterial umfasst; (b) Bereitstellung einer diskreten Menge von magnetischen Silicateilchen, die zur reversiblen Bindung einer definierbaren Menge DNA-Zielmaterial fähig sind, wobei die Menge an DNA-Zielmaterial, die in Schritt (a) bereitgestellt wird, die Bindungskapazität der magnetischen Silicateilchen übersteigt; (c) Bildung eines Komplexes aus den magnetischen Silicateilchen und dem DNA-Zielmaterial durch Kombination der magnetischen Silicateilchen und des Mediums; (d) Entfernung des Komplexes mit dem DNA-Zielmaterial aus dem Medium durch Anlegen eines externen Magnetfeldes; und (e) Trennung des DNA-Zielmaterials vom Komplex durch Eluieren des DNA-Zielmaterials, wodurch eine definierte Menge des DNA-Zielmaterials erhalten wird. Vorzugsweise übersteigt die Menge an DNA-Zielmaterial, die in Schritt (a) bereitgestellt wird, die reversible Bindungskapazität der Teilchen. Je nach weiterer Anwendung und bereitgestellter Menge der magnetischen Silicateilchen kann der Elutionsschritt überflüssig sein.

[0018] Das obige Verfahren kann auch unter Verwendung von anderen silicahältigen festen Trägern als magnetischen Silicateilchen durchgeführt werden. Wenn andere silicahältige feste Träger verwendet werden, kann der Komplex, der das DNA-Zielmaterial enthält, mithilfe verschiedener Verfahren, wie beispielsweise Zentrifugation oder Filtration, aus dem Medium entfernt werden.

[0019] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung umfasst die folgenden Schritte. Eine Probe eines bestimmten Mediumtyps, der Zellkomponenten und DNA-Zielmaterial enthält, wird in Gegenwart von chaotropem Salz mit Magneteilchen vermischt, worin die Magneteilchen eine bekannte oder definierbare Kapazität für die Adsorption des DNA-Zielmaterials aus dem Mediumtyp aufweist und wobei die Menge des Zielmaterials, das in Schritt (a) bereitgestellt wird, die Bindungskapazität der magnetischen Silicateilchen übersteigt. Wenn der Probenotyp Zellen sind, werden die Zellen lysiert, um das DNA-Zielmaterial in die Lösung freizusetzen, wodurch es einen Komplex mit den Teilchen bildet. Nachdem andere Zellkomponenten gewaschen wurden, kann das DNA-Zielmaterial in einem diskreten Volumen eluiert werden, was in einer Lösung mit einer definierten DNA-Zielmaterialkonzentration resultiert. Das vorliegende Verfahren ist zur Verwendung bei der Isolation von DNA-Zielmaterial aus verschiedenen Probenotypen geeignet, wie beispielsweise aus Vollblut, weiße Blutkörperchen, Spermazellen, Bukkalzellen oder Bakterienzellen, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein. Die Menge an DNA, die in der Probe vorhanden ist, übersteigt die Bindungskapazität der Teilchen. Solche Proben können in verschiedenen Formen vorliegen, beispielsweise in flüssiger Form, gefriergetrocknet, auf Material vom Tatort getrocknet oder auf einem festen Träger (z.B. Wangenzellen auf einem Tupfer oder Blutzellen auf einem Papierfilter) fixiert, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein. Zusätzliche Schritte können angewendet werden, falls nötig, um die Zellen von einem festen Träger zu entfernen. Das gereinigte DNA-Zielmaterial kann in der Elutionslösung gelagert werden oder an die Magneteilchen gebunden gelassen werden. So können mehrere Proben des DNA-Zielmaterials erhalten und bei Bedarf verwendet werden.

[0020] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolation einer definierten Menge DNA-Zielmaterial von anderen Zellkomponenten in einem Medium unter Verwendung einer bevorzugten Form von magnetischen Silicateilchen, d.h. mit Siliciumdioxid beschichteten Magneteilchen, bereit, worin die bevorzugten Teilchen zur reversiblen Bindung einer definierbaren Menge des DNA-Zielmaterials pro Milligramm Teilchen fähig sind. Dieser Aspekt der Erfindung umfasst die folgenden Schritte. Ein Gemisch wird hergestellt, welches das Zellkomponenten und das DNA-Zielmaterial enthaltende Medium, die mit Siliciumdioxid beschichteten Magneteilchen und ein chaotropes Salz umfasst. Die Menge an Ziel-DNA, die in dem Medium vorhanden ist, übersteigt die Bindungskapazität der Silica-Magneteilchen. Die Salzkonzentration reicht aus, damit das DNA-Zielmaterial an den Teilchen haftet. Das Gemisch wird inkubiert oder vermischt gelassen, bis DNA an den mit Siliciumdioxid beschichteten Magneteilchen im Gemisch haftet. Dann werden die mit Siliciumdioxid beschichteten Magneteilchen unter Verwendung von Magnetkraft aus dem Gemisch entfernt. Eine definierte Menge des DNA-Zielmaterials wird aus den mit Siliciumdioxid beschichteten Magneteilchen eluiert, indem die Teilchen mit einer Elutionslösung kontaktiert werden.

[0021] Ein weiterer Aspekt der Offenbarung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Kalibrationsmodells zur Quantifizierung eines DNA-Zielmaterials in einem Probenotyp von Interesse, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: (a) Bereitstellung eines ersten Mediums, worin das erste Medium eine diskrete Menge eines Probenotyps von Interesse enthält; (b) Bereitstellung eines zweiten Mediums, worin das zweite Medium eine andere diskrete Menge eines Probenotyps von Interesse umfasst; (c) Vermischung einer ersten diskreten Menge magnetischer Silicateilchen mit dem ersten Medium, worin die magnetischen Silicateilchen zur reversiblen Bindung einer definierten Menge des DNA-Zielmaterials fähig sind, wodurch ein erster Komplex aus den magnetischen Silicateilchen und dem DNA-Zielmaterial aus dem ersten Medium gebildet wird; (d) Vermischung einer zweiten diskreten Menge magnetischer Silicateilchen mit dem zweiten Medium, worin die magnetischen Silicateilchen

zur reversiblen Bindung einer definierten Menge DNA-Zielmaterial fähig sind, wodurch ein zweiter Komplex aus den magnetischen Silicateilchen und dem DNA-Zielmaterial aus dem zweiten Medium gebildet wird; (e) Entfernung des ersten Komplexes aus dem ersten Medium und des zweiten Komplexes aus dem zweiten Medium durch Anlegen eines externen Magnetfeldes; (f) separate Elution des DNA-Zielmaterials aus dem ersten Komplex und dem zweiten Komplex, wodurch ein erster Eluent aus isoliertem DNA-Zielmaterial aus dem ersten Komplex und ein zweiter Eluent aus isoliertem DNA-Zielmaterial aus dem zweiten Komplex gebildet wird; (g) Bestimmung der Menge an DNA-Zielmaterial im ersten Eluenten und im zweiten Eluenten. Vorzugsweise ist die erste diskrete Menge an Teilchen, die in Schritt (c) bereitgestellt wird, gleich der zweiten diskreten Menge an Teilchen, die in Schritt (d) bereitgestellt wird.

[0022] Ein Kalibrationsverfahren, das in Beispiel 3 veranschaulicht ist, umfasst die Bestimmung der Teilchenmenge, die zur Reinigung von Ziel-DNA von der kleinsten Probengröße notwendig ist (die geringste Menge DNA verfügbar), sodass das DNA-Zielmaterial im Überschuss vorhanden ist und auch die resultierende gereinigte Ziel-DNA im gewünschten Zielbereich vorliegt. Nach der Bestimmung der gewünschten Teilchenmenge von der kleinsten Probengröße ist es wichtig, sicherzustellen, dass die Reinigung von den größeren Probengrößen ebenfalls gereinigte Ziel-DNA ergibt, die im gewünschten Konzentrations- oder Ausbeutenbereich liegt. Dieses Verfahren bestimmt allgemein die größte Menge DNA, die auf zuverlässige Weise vom gewünschten Bereich von Probengrößen erhalten werden kann, worin die Menge an Ziel-DNA, die von den einzelnen Proben erhalten wird, innerhalb des gewünschten Mengenbereichs an Ziel-DNA liegt.

[0023] Ein weiteres Kalibrationsverfahren, das in Beispiel 8 veranschaulicht ist, basiert auf der Verwendung von Probengrößen, die bekannterweise einen großen Überschuss an DNA-Zielmaterial enthalten, sodass der Teilchenbereich, der bei der Reinigung verwendet wird, als Faktor bekannt ist, der die erhaltene Menge an DNA-Zielmaterial einschränkt. Bei Verwendung dieses Verfahrens wird ein Zusammenhang zwischen der größten und kleinsten Menge Ziel-DNA hergestellt, welche die gewünschte Nützlichkeit für die Anwendung (in Beispiel 8 ist diese Anwendung eine DNA-Sequenzierung) und die bei der Reinigung verwendete Teilchenmenge, die in der Reinigung von Ziel-DNA-Mengen innerhalb des für die Anwendung gewünschten Bereichs resultiert, bereitstellt. Wenn das Zielmaterial DNA ist, wird die Menge an Zielmaterial, die in den einzelnen Eluenten vorhanden ist, die wie oben beschrieben zur Erarbeitung des Kalibrationsmodells produziert werden, vorzugsweise durch eine DNAQuant- oder PicoGreen-Analyse bestimmt.

[0024] Diese Erfindung, die durch die Ansprüche 1 – 19 definiert ist, ist für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Zwei dieser Bereiche umfassen DNA-Sequenzierung, insbesondere automatisierte DNA-Sequenzierung, und genetische Analysen, die Nucleinsäureamplifikationsreaktionen umfassen, wie beispielsweise die Polymerasekettenreaktion (PCR). Bei jeder dieser Anwendungen muss die Menge des DNA-Zielmaterials in einem streng definierten Bereich gehalten werden. Genetische Analysen können beispielsweise genetische Identifikation, die in der Gerichtsmedizin oder für Vaterschaftsbestimmungen verwendet wird, und genetische Analysen, die in klinischen Laboratorien verwendet werden, umfassen. In solchen Fällen ist es hilfreich, bei jeder Amplifikationsreaktion etwa die gleiche Menge DNA-Zielmaterial zu verwenden. Übereinstimmende Mengen führen zu gleichmäßiger Bandenintensität bei Gelanalysen und begrenzten Artefakten. Die Erfindung kann auch zusammen mit anderen Amplifikationssystemen verwendet werden, wie beispielsweise transkriptionsvermittelte Amplifikation.

[0025] Die vorliegenden Verfahren sind leicht automatisierbar, da sie bei bevorzugter Umsetzung die gleichzeitige Isolation und Quantifizierung von DNA-Zielmaterial von mehreren Proben ermöglichen. Beispielsweise könnte das vorliegende Verfahren verwendet werden, um eine definierte Menge genomischer Ziel-DNA von Blut oder anderen Gewebeproben von mehreren Personen einer Population zu isolieren. Loci von Interesse, wie beispielsweise STR-Loci, der isolierten und quantifizierten genomischen DNA könnten dann amplifiziert und unter Verwendung verschiedener bekannter genetischer Analyseverfahren analysiert werden. Siehe beispielsweise die GenePrint®-STR-Analysesysteme von Promega Corporation. Wenn sie, wie eben erwähnt, zur Isolation, Quantifizierung und Coamplifikation von mehreren STR-Loci, wie beispielsweise die CODIS-Loci, in Mehrfachreaktionen verwendet werden (z.B. unter Verwendung des GenePrint® PowerPlex System von Promega), könnte die Informationsmenge in Datenbanken von solchen DNA-Typisierungsergebnissen rasch ausgebaut werden. Je mehr Daten in solchen Datenbanken enthalten sind, desto nützlicher sind die Datenbanken zur Identifizierung von Personen, insbesondere bei forensischen Anwendungen.

[0026] Das unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung isolierte DNA-Zielmaterial ist ausreichend frei von verunreinigendem Material, um unter Verwendung von herkömmlichen molekularbiologischen Verfahren weiter verarbeitet oder analysiert zu werden. Anwendungen der vorliegenden Verfahren zur Isolation und Quantifizierung verschiedener DNA-Zielmaterialien aus verschiedenen Medien werden durch die

nachstehende detaillierte Erläuterung der Erfindung klar.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0027] [Fig. 1](#) zeigt ein Foto von genomischen DNA-Proben, die durch Gelelektrophorese fraktioniert und mit Ethidiumbromid gefärbt wurden, worin die Proben von genomischer DNA aus verschiedenen diskreten Mengen menschlichen Vollbluts isoliert wurden, wobei nichtporöse magnetische MagneSil™-Silicateilchen verwendet wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben ist.

[0028] [Fig. 2](#) ist eine Kopie eines Laserausdrucks, der durch Fluoreszenzdetektion von amplifizierten STR-Loci von menschlicher genomischer DNA und von DNA, die nach einer Fraktionierung durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus K562-Gewebekulturzellen isoliert wurde, erhalten wurde, nachdem die STR-Loci in Gegenwart verschiedener Mengen von magnetischem MagneSil™-Silica amplifiziert wurden, wie in Beispiel 7 beschrieben ist.

[0029] [Fig. 3](#) zeigt ein Foto von genomischen DNA-Proben, die durch Gelelektrophorese fraktioniert und mit Ethidiumbromid gefärbt wurden, worin die Proben von genomischer DNA unter Verwendung von porösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen aus menschlichem Vollblut isoliert wurden, wie in Beispiel 10 beschrieben ist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0030] Nachstehend wird die vorliegende Erfindung im Detail erläutert, wobei teilweise auf die folgenden Begriffsdefinitionen Bezug genommen wird:

[0031] Der Begriff "definierte Menge" bedeutet hierin, dass die Menge innerhalb eines relativ eng definierten Bereichs liegt. Wenn der Bereich nicht bekannt ist, kann der Bereich (d.h. eine definierbare Menge) für einen spezifischen Probentyp und Teilchentyp wie nachstehend in der detaillierten Beschreibung erläutert bestimmt werden. Die Schwankung der Ergebnisbereiche resultiert zum Teil aus Einschränkungen der Quantifizierungsverfahren, die zur Erarbeitung des Kalibrationsmodells verwendet werden.

[0032] "Probentyp" bezieht sich auf die Form und Quelle der Probe, die das DNA-Zielmaterial enthält. Die Probentypen umfassen flüssiges Blut, getrocknetes Blut auf einem festen Träger, wie beispielsweise Papier oder einem Tupfer, Bukkalzellen, Speichel usw., sind jedoch nicht auf diese eingeschränkt.

[0033] Der Begriff "DNA-Zielmaterial" bezieht sich auf DNA, einschließlich Plasmid-DNA, genomischer DNA, chromosomaler DNA, DNA-Fragmente, die durch Restriktionsenzymverdau produziert wurden, amplifizierter DNA, die durch eine Amplifikationsreaktion, wie z.B. die Polymerasekettenreaktion (PCR), produziert wurde, und einzelsträngiger DNA, nicht jedoch auf diese eingeschränkt.

[0034] Der Begriff "Kalibrationsmodell" bezieht sich auf eine Reihe von Daten, die für bestimmte Reaktionsbedingungen, Probentypen und Teilchentypen spezifisch sind und die Teilchen- und Probenmenge in Beziehung zu einer definierten Menge DNA-Zielmaterial setzen, die durch die Reinigung erhalten wurde.

[0035] Der Begriff "silicahaltiger fester Träger" bezieht sich auf einen festen Träger (wie beispielsweise Silicapapier oder eine Silicamembran), der Silica oder ein Silicaderivat umfasst und zur reversiblen Bindung einer definierten Menge DNA-Zielmaterial fähig ist. Das Silica kann auf den festen Träger aufgetragen oder in diesen inkorporiert sein. Magnetische Silicateilchen sind ein insbesondere bevorzugter silicahaltiger fester Träger. Obwohl sich die detaillierte Beschreibung auf die Verwendung der äußerst bevorzugten magnetischen Silicateilchen bezieht, umfasst die Erfindung auch ein Verfahren, bei dem andere silicahaltige feste Träger verwendet werden.

[0036] Die Begriffe "isolieren" und "isoliert aus" bedeuten, dass bestimmte Verunreinigungen aus dem Zielmaterial entfernt werden.

[0037] Der Begriff "Magnetteilchen" bezieht sich hierin auf Materialien, die kein Magnetfeld aufweisen, aber einen magnetischen Dipol bilden, wenn sie einem Magnetfeld ausgesetzt werden, d.h. Materialien, die in Gegenwart eines Magnetfeldes magnetisiert werden können, von sich aus in Abwesenheit solch eines Feldes aber nicht magnetisch sind. Der Begriff "magnetisch" umfasst in diesem Zusammenhang Materialien, die paramagnetisch oder superparamagnetisch sind. Außerdem umfasst der Begriff "magnetisch" hierin auch vorü-

bergehend magnetische Materialien, wie beispielsweise ferromagnetische oder ferrimagnetische Materialien mit niedrigen Curie-Temperaturen, solange solche vorübergehend magnetischen Materialien in dem Temperaturbereich paramagnetisch sind, in dem magnetische Silicateilchen, die solche Materialien enthalten, gemäß der vorliegenden Verfahren zur Isolation von biologischen Materialien eingesetzt werden.

[0038] Magneteilchen werden schon seit Jahren verwendet, um Polypeptidmoleküle, wie beispielsweise Proteine oder Antikörper, zu isolieren und zu reinigen. In den letzten Jahren wurden jedoch Magneteilchen und Verfahren zur Verwendung von Magneteilchen zur Isolation von Nucleinsäurematerialien entwickelt. In der Literatur sind mehrere Arten von Magneteilchen beschrieben, die zur Verwendung bei der Isolation von Nucleinsäure entwickelt wurden, und viele dieser Teilchentypen sind im Handel erhältlich. Ein solcher Teilchentyp sind magnetisch ansprechende Glaskügelchen, vorzugsweise mit kontrollierter Porengröße. Siehe beispielsweise Magnetic Porous Glass (MPG) Particles von CPG, Inc. (Lincoln Park, New Jersey, USA); oder poröse magnetische Glasteilchen der US-Patente Nr. 4.395.271, 4.233.169 oder 4.297.337. Nucleinsäurematerial neigt jedoch dazu, so fest an Glas zu binden, dass es schwer abzutrennen ist, sobald es daran gebunden wurde. Daher ist die Elutionseffizienz von magnetischen Glasteilchen im Vergleich zur Elutionseffizienz von Teilchen, die geringere Menge eines Nucleinsäure-Bindungsmaterials, wie z.B. Silica, enthalten, meist gering. Ein zweiter Typ von magnetisch ansprechenden Teilchen, die zur Verwendung bei der direkten Bindung und Isolation von Nucleinsäuren entworfen wurden, sind mit Glas beschichtete Teilchen aus Agarose, in das kleinere ferromagnetische Teilchen eingebettet wurden. Siehe beispielsweise das US-Patent 5.395.498.

[0039] Der Begriff "magnetische Silicateilchen" bezieht sich auf magnetische Teilchen, die aus Silica in Form von Kieselgel, Siliciumdioxid, festem Silica, wie z.B. Glas oder Diatomeenerde, oder einem Gemisch aus zwei oder mehreren der oben genannten bestehen. Der Begriff "Kieselgel" bezieht sich hierin auf Kieselgel mit chromatographischer Güte, eine Substanz, die im Handel von verschiedenen Anbietern erhältlich ist. Kieselgel wird meist durch Ansäuerung einer Lösung, die Silicat, z.B. Natriumsilicat, enthält, auf einen pH von weniger als 10 oder 11 erhalten, wonach die angesäuerte Lösung gelieren gelassen wird. Siehe beispielsweise die in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Bd. 6, 773-775, 4. Ausg., Mary Howe-Grant, Hrsg., John Wiley & Sons (1993), beschriebene Silicaherstellung. Der Begriff "magnetische Silicateilchen" bezieht sich hierin vorzugsweise auf Teilchen mit den oben beschriebenen Eigenschaften, welche die Fähigkeit aufweisen, eine definierbare Menge DNA-Zielmaterial pro Milligramm magnetische Silicateilchen zu binden. Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten magnetischen Silicateilchen umfassen vorzugsweise außerdem ferromagnetisches Material, das in eine Kieselgelmatrix inkorporiert ist.

[0040] Die Verfahren dieser Erfindung zur Isolation und Quantifizierung von DNA-Zielmaterial können unter Verwendung von beliebigem silicabeschichtetem, festem Material durchgeführt werden, das zur reversiblen Bindung einer definierbaren Menge des DNA-Zielmaterials fähig ist. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung werden jedoch vorzugsweise unter Verwendung der mit Siliciumdioxid beschichteten magnetischen Silicateilchen ("SOCM-Teilchen") durchgeführt, die in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 98/31840 offenbart sind. Die vorliegende Erfindung wird vorzugsweise unter Verwendung von magnetischen Silicateilchen mit den folgenden physikalischen Merkmalen umgesetzt.

[0041] Die in den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendeten magnetischen Silicateilchen können verschiedene Größen aufweisen. Der verwendete Teilchentyp wird kalibriert, um seine DNA-Bindungskapazität für einen Probenotyp zu bestimmen. Kleinere magnetische Silicateilchen stellen mehr Oberfläche (eine pro-Gewichtseinheit-Basis) zur Adsorption bereit, aber kleinere Teilchen können im Vergleich zu größeren Teilchen nur eine begrenzte Menge magnetisches Material aufnehmen. Die mittlere Teilchengröße der porösen magnetischen Silicateilchen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, beträgt vorzugsweise etwa 1 bis 25 µm, noch bevorzugter etwa 3 bis 15 µm. Die Teilchengrößenverteilung kann ebenfalls variieren. Bevorzugt ist jedoch eine relativ schmale Teilchengrößenverteilung. Die Teilchengrößenverteilung sieht vorzugsweise so aus, dass etwa 80 Gew.-% der Teilchen innerhalb eines Bereichs von 10 µm um die mittlere Teilchengröße liegen, noch bevorzugter innerhalb eines Bereichs von 8 µm, insbesondere innerhalb eines Bereichs von 6 µm.

[0042] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Magneteilchen können porös oder nichtporös sein. Wenn die Magneteilchen porös sind, weisen die Poren vorzugsweise einen geregelten Größenbereich auf, der ausreichend groß ist, damit das Nucleinsäurezielmaterial in das Innere der Festphaseteilchen eintreten kann und an funktionelle Gruppen oder Silica auf der Innenfläche der Poren binden kann. Wenn die Magneteilchen poröse magnetische Silicateilchen sind, beträgt das gesamte Porenvolumen jedes magnetischen Silicateilchens, gemessen durch ein Stickstoff-BET-Verfahren, vorzugsweise zumindest etwa 0,2 ml/g der Teilchenmasse. Das gesamte Porenvolumen von porösen magnetischen Silicateilchen, die insbesondere zur Verwen-

ung als Komponenten der pH-abhängigen Ionenaustauschmatrix gemäß vorliegender Erfindung geeignet sind, beträgt vorzugsweise zumindest etwa 50 % des Porenvolumens von Poren mit einem Durchmesser von 600 Å oder mehr, gemessen durch Stickstoff-BET. Insbesondere bevorzugte poröse magnetische Silicateilchen weisen die folgenden Merkmale auf: einen mittleren Teilchendurchmesser von etwa 5,0 bis 8,5 µm, eine BET-Oberfläche von etwa 18 bis 55 µm/gm und einen Säureauslaugungswiderstand von weniger als etwa 7 ppm Fe₂O₃. Solche Teilchen sind von Promega Corporation als poröse MagneSil™-Teilchen erhältlich.

[0043] Der Begriff "nichtporös" bezieht sich hierin auf magnetische Silicateilchen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, die, wenn sie überhaupt Poren aufweisen, viel kleinere Poren haben als die vorstehend beschriebenen porösen magnetischen Silicateilchen. Genauer gesagt sind die Poren von nichtporösen Magneteilchen zu klein, um das DNA-Zielmaterial aufzunehmen. Nichtporöse Teilchen weisen außerdem weniger Oberfläche und geringere Kapazität bei der Adsorption von gegebenem DNA-Zielmaterial auf als poröse Teilchen mit dem gleichen Durchmesser. Dieser Unterschied führt dazu, dass poröse Teilchen eine größere Kapazität bei der Bindung und Freisetzung einer größeren Menge DNA-Zielmaterial aufweisen als nichtporöse Teilchen, wenn das gleiche Grammgewicht an Teilchen verwendet wird, um DNA-Zielmaterial aus dem gleichen Medium zu isolieren. DNA-Zielmaterial, das unter Verwendung von nichtporösen Teilchen isoliert wurde, weist jedoch meist weniger Verunreinigungen auf. Insbesondere bevorzugte nichtporöse magnetische Silicateilchen weisen die folgenden Merkmale auf: einen mittleren Teilchendurchmesser von etwa 14,5 µm, eine BET-Oberfläche von etwa 3 µm/gm und einen Säureauslaugungswiderstand von weniger als etwa 2 ppm Fe₂O₃. Solche Teilchen sind von Promega Corporation als nichtporöse MagneSil™-Teilchen erhältlich.

[0044] Zumindest zwei im Handel erhältliche magnetische Silicateilchen sind in der vorliegenden Erfindung insbesondere bevorzugt: die magnetischen Teilchen BioMag® von PerSeptive Biosystems und die porösen und nichtporösen magnetischen Silicateilchen MagneSil™ von Promega Corporation.

[0045] "Komplex" bezieht sich auf magnetische Silicateilchen oder andere silicahältigen festen Träger mit daran haftendem DNA-Zielmaterial. Zumindest ein Teil des DNA-Zielmaterial kann unter geeigneten Bedingungen von den magnetischen Silicateilchen freigesetzt werden (d.h. reversible Bindung). Der genaue Prozentsatz von freigesetztem DNA-Zielmaterial ist nicht wichtig, solange er unter gegebenen Bedingungen relativ konstant ist.

[0046] Der Begriff "chaotropes Salz" bezieht sich hierin auf Salze von bestimmten Ionen, die, wenn sie in einer wässrigen Lösung in ausreichend hoher Konzentration vorhanden sind, dazu führen, dass sich darin vorhandene Proteine auffalten und Nucleinsäuren ihre sekundäre Struktur verlieren. Es wird angenommen, dass chaotrope Ionen diese Wirkung aufweisen, weil sie Wasserstoffbrückenbindungsnetze aufbrechen, die in flüssigem Wasser vorhanden sind, und so denaturierte Proteine und Nucleinsäure erzeugen, die thermodynamisch stabiler sind als ihre korrekt gefalteten oder strukturierten Gegenstücke. Chaotrope Ionen umfassen Guanidinium, Iodid, Perchlorat und Trichloracetat. Chaotrope Salze umfassen Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat (das manchmal als Guanidinisothiocyanat bezeichnet wird), Natriumiodid, Natriumperchlorat und Natriumtrichloracetat.

[0047] Das Verfahren zur gleichzeitigen Isolation und Quantifizierung von DNA-Zielmaterial kann wie folgt durchgeführt werden. Der erste Schritt besteht darin, ein Kalibrationsmodell zur Verwendung bei der Bestimmung der Menge an DNA-Zielmaterial zu erstellen, die bei einem bestimmten Probenotyp unter Verwendung einer diskreten Teilchenmenge zu erwarten ist. Jede vorgegebene Gruppe von Magneteilchen mit gemeinsamen physikalischen Merkmalen weist unter den gleichen Bedingungen eine definierte Kapazität zur Adsorption von DNA-Zielmaterial pro Milligramm Teilchen auf. Genauer gesagt wird für eine vorgegebenen Gruppe an Reaktionsbedingungen (einschließlich der Menge an magnetischen Silicateilchen) die gleiche Menge DNA-Zielmaterial von einem spezifischen Probenotyp erhalten, wenn die DNA die Bindungskapazität der verwendeten Teilchenmenge übersteigt. Somit muss der Schritt der Erstellung eines Kalibrationsmodells für eine vorgegebenen Gruppe von Reaktionsbedingungen pro Probenotyp und Teilchentyp nur einmal durchgeführt werden.

[0048] Nachdem das Kalibrationsmodell erstellt wurde, wird das DNA-Zielmaterial vom gleichen Medientyp unter den gleichen Lösungsbedingungen und unter Verwendung des gleichen Teilchentyps isoliert, die zur Erstellung des Kalibrationsmodells verwendet wurden.

[0049] Wenn das zu isolierende DNA-Zielmaterial in Zellen vorhanden ist, werden die Zellen vorzugsweise in Gegenwart eines Lysepuffers aufgeschlossen, der das DNA-Zielmaterial in den Lysepuffer abgibt. Wenn das DNA-Zielmaterial ein Nucleinsäurezielmaterial ist, das in Zellen enthalten ist, werden die Zellen vorzugsweise in einer Lyselösung lysiert, die Proteine und andere Materialien in Lösung von der Nucleinsäure trennt, wäh-

rend sie die Adsorption der Nucleinsäure an magnetische Silicateilchen fördert, wenn sie damit kombiniert wird. Die Teilchen mit dem daran haftenden Zielmaterial können unter Verwendung eines Magnetfeldes von anderem Zellmaterial getrennt werden, und die Teilchen können gewaschen werden. Das Nucleinsäurezielmaterial kann dann in ein diskretes Volumen von Wasser oder einer anderen Elutionslösung eluiert werden, um eine definierte Menge DNA-Zielmaterial zu erhalten.

[0050] Um ein repräsentatives Kalibrationsmodell zu erhalten, sollte die tatsächliche Probenanalyse unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, die zur Entwicklung des Kalibrationsmodells verwendet wurden. Diese Bedingungen betreffen Folgendes: den Probentyp, die Teilchentyp, die Lösungsbedingungen bei Kombination mit den Magneteilchen, das Waschverfahren, einschließlich der Zusammensetzung der Waschlösung, die Zusammensetzung aller Elutionslösungen und die Temperatur, bei der die einzelnen Verfahrensschritte durchgeführt werden. Die Reaktionsbedingungen können anhand von Versuchen optimiert werden. Zum Zweck des vorliegenden Verfahrens ist jedoch die Übereinstimmung der Reaktionsbedingungen wichtiger als eine Optimierung.

[0051] Das Kalibrationsmodell kann wie folgt erstellt werden. Ein Lysepuffer kann zu Lyseprobenzellen zugesetzt werden und das DNA-Zielmaterial freisetzen, sodass dieses frei ist, um mit dem magnetischen Silicateilchen einen Komplex zu bilden. Zu verschiedenen bekannten oder gemessenen Mengen eines Probentyps, der analysiert werden soll, wird eine diskrete (bekannte und vorzugsweise konstante) Menge magnetische Silicateilchen zugesetzt. Der Lysepuffer kann vor, während oder nach dem Zusetzen der magnetischen Teilchen zur Probe zugesetzt werden. Bei flüssigem Vollblut wird der Lysepuffer vor oder zusammen mit den silicabeschichteten magnetischen Teilchen zur Probe zugesetzt. Vorzugsweise wird der Lysepuffer zusammen mit den silicabeschichteten magnetischen Teilchen zur Probe zugesetzt. Die magnetischen Silicateilchen werden unter Bedingungen mit den lysierten Zellen kombiniert, bei denen ein Komplex aus den Teilchen und dem DNA-Zielmaterial gebildet wird.

[0052] Der Komplex aus dem DNA-Zielmaterial und den magnetischen Silicateilchen wird in Gegenwart eines Magnetfeldes von der Lysatlösung abgetrennt, wonach die Lysatlösung entfernt und verworfen wird. Der verbleibende Komplex wird vorzugsweise zumindest einmal gewaschen, um weitere Verunreinigungen zu entfernen. Nach den letzten Waschschrift, sofern Waschschrift durchgeführt werden, wird das DNA-Zielmaterial vom Komplex eluiert, indem ein bekanntes Volumen einer Elutionslösung zum Komplex zugesetzt wird und die Teilchen in einem Magnetfeld von der Elutionslösung abgetrennt werden. Vorzugsweise ist die Elutionslösung Wasser. Ein bekanntes Volumen der Lösung, die das eluierte DNA-Zielmaterial enthält, kann dann weiter analysiert, beispielsweise durch bekannte Verfahren amplifiziert, auf einem Gel elektrophoresiert oder quantifiziert, werden. Basierend auf den Quantifizierungsergebnissen kann die Gesamtmenge an isoliertem DNA-Zielmaterial in der eluierten Lösung bestimmt werden. Diese Daten stellen Informationen über die Menge an DNA-Zielmaterial bereit, die reversibel an die Teilchen gebunden ist, und zwar für verschiedene Probenmengen von einem bestimmten Probentyp.

[0053] Wenn eine weitere Menge einer gegebenen Probe eines Mediums zu einer diskreten Menge von Teilchen zugesetzt wird, nimmt die Menge an daraus isoliertem DNA-Zielmaterial so lange zu, bis die Teilchen einen Sättigungspunkt erreichen. Beim Erreichen des Sättigungspunkts nimmt die erhaltene Menge an DNA-Zielmaterial nicht bedeutend zu, wenn eine weitere Probe bereitgestellt wird. Wenn das DNA-Zielmaterial die Bindungskapazität der Teilchen übersteigt, werden überschüssige Mengen der Probe und überschüssiges DNA-Zielmaterial einfach gewaschen. Vorzugsweise übersteigt das DNA-Zielmaterial die Bindungskapazität der Teilchen. Somit wird unter den gleichen Bedingungen, sofern die DNA die Bindungskapazität der Teilchen übersteigt, die gleiche Menge an Teilchen isoliert und etwa die gleiche Menge DNA von einem Probentyp freigesetzt, egal wie groß die Probe ist.

[0054] Bei niedrigen Probenkonzentrationen ist es hilfreich, sehr kleine, kontrollierte Mengen von Teilchen zusetzen, sodass die DNA-Konzentration die Bindungskapazität leicht übersteigt. Die Bindungskapazität verschiedener Teilchen variiert, muss aber nur einmal für einen bestimmten Teilchentyp, einen bestimmten Probentyp und bestimmte Reaktionsbedingungen bestimmt werden (beispielsweise durch einen Test, der in Beispiel 7 beschrieben ist). Aufgrund der Kontrolle der Menge an DNA, die aus einer bestimmten Probe isoliert wird, können Überamplifikationssignale vermieden werden.

[0055] Beispiel 1 beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung eines Kalibrationsmodells. Beispiel 1 zeigt den Sättigungspunkt oder die Kapazität von nichtporösen magnetischen Silicateilchen (in Mengen von entweder 500 µm oder 700 µg) auf, DNA von flüssigem menschlichem Blut reversibel zu binden. Beispiel 1 zeigt, dass eine 4fache Zunahme an Blut in einer geringeren Zunahme an isolierter DNA resultierte als das 4fache. Wie

Beispiel 1 zeigt auch Beispiel 3, wie ein Kalibrationsmodell mit viel größeren Probengrößen (200 µl bis 1 ml Vollblut) erhalten wird. In Beispiel 3 übersteigt DNA die reversible Bindungskapazität der Teilchen bei weitem. Somit wurde der Sättigungspunkt erreicht, und die Ausbeute ist über einen großen Bereich von Probenvolumina relativ gleichmäßig, wenn Volumina über dem Sättigungspunkt verwendet werden. Diese DNA-Proben sind stark genug konzentriert, um durch Spektralphotometrie quantifiziert zu werden. Die $A_{260}:A_{280}$ -Daten weisen auf eine hohe Probenreinheit bei Verwendung des Verfahrens der Erfindung hin. Kalibrationsmodelle wie die von Beispiel 1 und 3 zeigen, dass für einen gegebenen Probentyp ein relativ enger Bereich von DNA-Zielmaterial isoliert und quantifiziert werden kann, indem die Verfahrensbedingungen konstant gehalten und die Menge der Probe und Teilchen kontrolliert variiert werden.

[0056] Zum Zwecke von genomischen Typisierungsanalysen, wie beispielsweise STR, ist die genaue Menge an isoliertem DNA-Zielmaterial nicht entscheidend, solange die Menge innerhalb eines Bereichs liegt, der für die Analyse geeignet ist. Dieser Bereich hängt vom verwendeten System ab. Eine Amplifikation unter Verwendung des Systems GenePrint® PowerPlex™ 1.1 von Promega sollte beispielsweise unter Verwendung von etwa 0,5 bis 5 ng DNA pro Test (vorzugsweise etwa 1 ng DNA) durchgeführt werden, um eine Überamplifikation zu vermeiden und Proben zu erhalten, die leicht genotypisiert werden können. Daher kann durch einen Vergleich des Kalibrationsmodells mit dem üblichen Bereich für das verwendete System die Menge der Probe und Teilchen bestimmt werden, die zur Isolation einer verwendbaren Menge DNA-Zielmaterial notwendig ist, bevor das DNA-Zielmaterial aus der Probe von Interesse isoliert wird.

[0057] Gemäß den Anleitungen und der Arbeitsvorschrift des Herstellers des Systems, in das die Probe zur Analyse gegeben wird, kann der gewünschte Probenbereich bestimmt werden. Daher kann, um eine gewünschte Menge an DNA-Zielmaterial zu erhalten, ein Kalibrationsmodell verwendet werden, um geeignete Parameter, wie beispielsweise die Teilchenmenge, Probenmenge und ein geeignetes Volumen oder eine geeignete Fraktion des gesamten isolierten DNA-Zielmaterials zu bestimmen.

[0058] Das unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung isolierte und quantifizierte DNA-Zielmaterial kann von eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen in einer Kultur oder von Zellen stammen, die von Geweben, vielzelligen Organismen, einschließlich Tieren und Pflanzen; Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut, Lymphe, Urin, Fäces oder Samen; Embryos oder Föten; Nahrungsmitteln; Kosmetika; oder anderen Zellenquellen entnommen oder erhalten wurden. Bestimmte DNA-Spezies werden gemäß dem vorliegenden Verfahren aus der DNA von Organellen, Viren, Phagen, Plasmiden, Viroiden oder dergleichen isoliert, die Zellen infizieren. Zellen werden lysiert, und das Lysat wird üblicherweise auf verschiedene Arten verarbeitet, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung geläufig sind, um eine wässrige Lösung von DNA zu erhalten, an der die Trenn- oder Isolationsverfahren der Erfindung angewandt werden. Die DNA in solch einer Lösung tritt typischerweise zusammen mit anderen Komponenten auf, wie beispielsweise Proteinen, RNAs oder anderen Komponententypen.

[0059] Das DNA-Zielmaterial kann von einer Probe auf einem festen Träger, wie beispielsweise Filterpapier, kommen. DNA-Zielmaterial kann vom festen Träger entfernt werden, indem zumindest ein Teil der Probe auf dem festen Träger in eine Lösung gegeben wird, die ein chaotropes Salz enthält (siehe Beispiele 4 – 5). Damit das Abnehmen des DNA-Zielmaterials vom festen Träger einfacher ist, liegt die Temperatur der Lösung vorzugsweise im Bereich von etwa 60 °C bis 100 °C, insbesondere im Bereich von etwa 90 °C bis 100 °C. Vorzugsweise umfasst die chaotrope Salzlösung auch einen pH-Puffer.

[0060] Ungeachtet der Art der Quelle solchen Materials wird das DNA-Zielmaterial, das gemäß den vorliegenden Verfahren isoliert werden soll, in einem Medium bereitgestellt, welches das DNA-Zielmaterial und andere Spezies umfasst. Das DNA-Zielmaterial muss im Medium in einer Form vorliegen, in der es an den magnetischen Silicateilchen haften kann. Wenn das DNA-Zielmaterial in einer Zelle enthalten ist, können die Zellwände oder die Zellmembran eine Adhäsion des Materials an die Teilchen verhindern. Auch wenn solche Zellen lysiert oder ausreichend aufgeschlossen werden, sodass darin enthaltenes DNA-Zielmaterial in die umliegende Lösung freigesetzt wird, könnten Zellbruchstücke in der Lösung die Adhäsion des Zielmaterials an die magnetischen Teilchen stören. Daher wird in Fällen, in denen das mithilfe der vorliegenden Verfahren zu isolierende Zielmaterial in einer Zelle enthalten ist, die Zelle vorzugsweise zuerst durch Lyse oder Aufschließung der Zelle verarbeitet, um ein Lysat herzustellen, und noch bevorzugter außerdem einer Reinigung des Lysats von Zellbruchstücken unterzogen (beispielsweise durch Zentrifugation oder Vakuumfiltration), welche die Adhäsion des Zielmaterials an magnetische Silicateilchen, falls solche im Medium vorhanden sind, stören kann.

[0061] Ein beliebiges der bekannten Verfahren zur Lyse oder Aufschließung von Zellen zur Freisetzung von darin enthaltenen DNA-Materialien ist zur Verwendung bei der Herstellung eines Mediums aus Zellen für die

vorliegende Erfindung geeignet. Das Verfahren, das zur Freisetzung des DNA-Materials von einer Zelle gewählt wird, hängt von der Art der Zelle ab, die das Material enthält. Damit beispielsweise eine Zelle mit einer relativ harten Zellwand, wie beispielsweise eine Pilzzelle oder eine Pflanzenzelle, das darin enthaltene Nucleinsäurematerial freisetzt, kann eventuell der Einsatz von rauen Behandlungen erforderlich sein, wie beispielsweise von potenten Proteasen und mechanischem Scheren mit einem Homogenisator oder von einer Aufschließung mit Schallwellen unter Verwendung eines Beschallers. Im Gegensatz dazu kann DNA-Material von Zellen mit Lipiddoppelschichtmembranen, wie beispielsweise E.-coli-Bakterien oder tierischen Blutzellen, leicht freigesetzt werden, indem solche Zellen einfach in einer wässrigen Lösung suspendiert werden und ein Detergens zur Lösung zugesetzt wird.

[0062] Sobald das DNA-Material von Zellen freigesetzt ist, die wie oben beschrieben lysiert oder aufgeschlossen wurden, können Zellbruchstücke, die wahrscheinlich die Adhäsion des DNA-Materials an magnetischen Silicateilchen stören, unter Verwendung verschiedener bekannter Verfahren oder einer Kombination von Verfahren entfernt werden. Die Lösung von lysierten oder aufgeschlossenen Zellen wird vorzugsweise zentrifugiert, um partikuläre Zellbruchstücke zu entfernen. Gegebenenfalls kann dann der Überstand weiter verarbeitet werden, indem zum Überstand eine zweite Lösung zugesetzt wird, der zur Bildung eines Niederschlags von weiterem Material führt, wonach der Niederschlag durch Zentrifugation aus der resultierenden Lösung entfernt wird.

[0063] Wenn das DNA-Material von Interesse Plasmid-DNA ist, das anfänglich in einer E.-coli-Bakterienzelle enthalten ist, wird das DNA-Material vorzugsweise durch den Zusatz einer alkalischen Lösung, wie beispielsweise einer Natriumhydroxidlösung, aus der Bakterienzelle freigesetzt, um ein Lysat zu bilden. Eine neutralisierende Lösung, wie beispielsweise ein saurer Puffer, wird vorzugsweise zum resultierenden Überstand zugesetzt, um einen Niederschlag aus weiterem, möglicherweise störendem Material zu bilden. Der so gebildete Niederschlag wird vorzugsweise durch Zentrifugation oder Filtration entfernt. Der verbleibende Überstand aus gereinigtem Lysat ist das Medium, welches das DNA-Material von Interesse enthält.

[0064] Das im ersten Schritt des Verfahrens der vorliegenden Erfindung bereitgestellte Medium muss kein Nucleinsäurematerial enthalten, das direkt von Zellen freigesetzt wurde. Das Nucleinsäurematerial kann das Produkt einer Amplifikationsreaktion sein, wie beispielsweise amplifizierte DNA, die unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt wurde. Das Nucleinsäurematerial kann auch in Form von DNA-Fragmenten vorliegen, die durch Verdau von DNA mit einem Restriktionsenzym hergestellt wurden. Außerdem kann das Medium in Form eines Gemischs aus geschmolzenem oder enzymatisch verdautem Elektrophoresegel und Nucleinsäurematerial vorliegen. Nach der Befreiung eines biologischen Ziels von umliegenden Zellkomponenten ist das DNA-Zielmaterial frei, um an magnetischen Silicateilchen zu haften.

[0065] Ein Komplex aus den magnetischen Silicateilchen und dem DNA-Zielmaterial wird gebildet, indem die Teilchen unter Bedingungen, die auf die Förderung der Bildung des Komplexes ausgerichtet sind, dem das DNA-Zielmaterial enthaltenden Medium ausgesetzt werden. Der Komplex wird vorzugsweise in einem Gemisch aus den magnetischen Silicateilchen, dem Medium und einem chaotropen Salz gebildet.

[0066] Die Konzentration der chaotropen Ionen im Gemisch, das bei dieser Durchführung des vorliegenden Verfahrens hergestellt wird, liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,1 M und 7,0 M, noch bevorzugter zwischen etwa 0,8 M und 4,5 M. Die Konzentration der chaotropen Ionen im Gemisch muss ausreichend sein, damit das DNA-Zielmaterial an den magnetischen Silicateilchen im Gemisch haftet, darf aber nicht so hoch sein, dass das Zielmaterial irreversibel denaturiert, abgebaut oder aus dem Gemisch ausgefällt wird. Große Moleküle von doppelsträngiger DNA, wie beispielsweise chromosomaler DNA, weisen stabile chaotrope Salzkonzentrationen zwischen 0,5 und 2 molar auf, werden aber bekannterweise bei chaotropen Salzkonzentrationen über etwa 2 molar aus einer Lösung ausgefällt. Siehe beispielsweise das US-Patent Nr. 5.346.994 an Piotr Chomczynski, Spalte 2, Zeile 56–63 des Originals. Im Gegensatz dazu bleiben kleinere DNA-Moleküle, wie beispielsweise Plasmid-DNA, Restriktions- oder PCR-Fragmente von chromosomaler DNA oder einzelsträngige DNA, bei chaotropen Salzkonzentrationen zwischen 2 und 5 molar undegradiert und gelöst.

[0067] Egal welches chaotrope Salz für die Erfindung verwendet wird, die Konzentration des Salzes sollte in jeder Lösung, in der das Salz gemäß vorliegender Erfindung eingesetzt wird, und unter allen Bedingungen, denen die Lösung bei der Durchführung der Erfindung ausgesetzt wird, unter der Löslichkeit des Salzes in der Lösung bleiben.

[0068] In einer Ausführungsform der vorliegenden Verfahren wird das Gemisch aus Medium und Probe so lange inkubiert, bis zumindest ein Teil des DNA-Zielmaterials an den magnetischen Silicateilchen haftet, um

einen Komplex zu bilden. Dieser Inkubationsschritt wird bei einer Temperatur von zumindest 0 °C, vorzugsweise zumindest 4 °C, noch bevorzugter zumindest 20 °C, durchgeführt, wobei die Inkubationstemperatur 67 °C nicht übersteigt. Der Inkubationsschritt muss bei einer Temperatur unter der Temperatur durchgeführt werden, bei der die magnetischen Silicateilchen beginnen, ihre Fähigkeit zu reversiblen Bindung des Nucleinsäurematerials zu verlieren. Insbesondere wird der Inkubationsschritt bei etwa Raumtemperatur (d.h. etwa 25 °C) durchgeführt.

[0069] Wenn das DNA-Zielmaterial in einer Zelle enthalten ist, ist es wünschenswert, dass die Zellen in einer Lyselösung lysiert werden, die das chaotrope Salz enthält, sodass die Zellyse und die Komplexbildung mit derselben Lösung erreicht werden können.

[0070] Zusätzlich zum chaotropen Salz kann die Lyselösung dipolare oder nichtionische Detergenzien enthalten, wie beispielsweise CHAPS [3-[3-Cholamidopropyldimethylammonio]-1-propansulfonat] oder Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Vorzugsweise umfasst die Lyselösung einen pH-Puffer, um den pH bei etwa 7,0 zu stabilisieren und die DNA strukturell intakt zu halten. Die Lyselösung kann außerdem einen zweiwertigen Kationenchelatorbildner, wie beispielsweise EDTA, enthalten. Diese Lyselösung ist auch zur Abtrennung von DNA-Zielmaterial von einem festen Träger geeignet.

[0071] Nach der Bildung eines Komplexes, wird der Komplex unter Verwendung eines Magnetfeldes aus dem Gemisch entfernt. Neben dem Magnetfeld können auch andere Formen externer Kraft eingesetzt werden, um das DNA-Zielmaterial nach dem anfänglichen Entfernungsschritt gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung zu isolieren. Weitere geeignete Formen externer Kraft umfassen Schwerkraftfiltration, Vakuumfiltration und Zentrifugation, sind jedoch nicht auf diese eingeschränkt.

[0072] Das externe Magnetfeld, das zur Entfernung des Komplexes aus dem Medium verwendet wird, wird geeigneterweise im Medium erzeugt, wobei eine Reihe von bekannten Mitteln verwendet werden können. Beispielsweise kann ein Magnet an der Außenfläche eines Behälters platziert werden, der die Teilchen enthaltende Lösung enthält, wodurch die Teilchen durch die Lösung wandern und sich neben dem Magneten an der Innenfläche des Behälters sammeln. Der Magnet kann dann auf der Außenfläche des Behälters in Position gehalten werden, sodass die Teilchen durch das durch den Magneten erzeugte Magnetfeld im Behälter gehalten werden, während die Lösung aus dem Behälter dekantiert und verworfen wird. Eine zweite Lösung kann dann in den Behälter gegeben werden, wonach der Magnet entfernt wird, damit die Teilchen in die zweite Lösung wandern. Alternativ dazu könnte eine magnetisierbare Sonde in die Lösung gegeben und die Sonde magnetisiert werden, sodass sich die Teilchen auf dem in die Lösung eingetauchten Ende der Sonde ablagern. Die Sonde könnte dann aus der Lösung entfernt werden, wobei sie immer noch magnetisiert ist, und in eine zweite Lösung eingetaucht werden, wonach das Magnetfeld unterbrochen wird, sodass die Teilchen in die zweite Lösung wandern können. Jede beliebige Magnetkraftquelle, die stark genug ist, um die magnetischen Silicateilchen von einer Lösung abzutrennen, wäre zur Verwendung bei den Nucleinsäureisolationsverfahren der vorliegenden Erfindung geeignet. Magnetische Trennvorrichtungen sind im Handel erhältlich. Siehe beispielsweise MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand oder PolyAtract® Series 9600™ Multi-Magnet, beide von Promega Corporation; MagneTight Separation Stand (Novagen, Madison, WI, USA); oder Dynal Magnetic Particle Concentrator (Dynal, Oslo, Norwegen). Die Magnetkraft wird vorzugsweise in Form eines magnetischen Trennstativs bereitgestellt, wie beispielsweise die MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands (Katalognummer Z5331 bis 3 oder Z5341 bis 3) von Promega Corporation.

[0073] Die vorliegende Erfindung stellt bequeme und effiziente Mittel zur Isolation von DNA-Zielmaterial von Interesse aus verschiedenen Probenotypen bereit. Ein bevorzugter Aspekt des oben schon kurz beschriebenen Verfahrens, bei dem Magnetkraft zur Entfernung der Teilchen aus dem Medium verwendet wird, bringt bedeutende Vorteile gegenüber herkömmlichen Isolationsverfahren mit sich, bei denen DNA-Zielmaterial reversibel an andere Silicamaterialien gebunden wird. Genauer gesagt ersetzt der magnetische Abtrennungsschritt des Verfahrens Vakuumfiltrations- oder Zentrifugationsschritte, die bei herkömmlichen Silicabindungs- und Elutionsisolationsverfahren erforderlich sind. Daher eignet er sich besonders gut für eine Automatisierung.

[0074] In einem bevorzugten Aspekt der Verfahren der vorliegenden Erfindung wird der aus dem Medium entfernte Komplex zumindest einmal gewaschen, indem er mit einer Waschlösung gespült wird. Das Waschen entfernt weitere Verunreinigungen, wozu alle anderen Stoffe gehören als das DNA-Zielmaterial von Interesse. Die in diesem bevorzugten zusätzlichen Schritt des Verfahrens verwendete Waschlösung umfasst vorzugsweise eine Lösung, die zur Entfernung von Verunreinigungen von den magnetischen Silicateilchen fähig ist. Die Waschlösung umfasst vorzugsweise ein Salz und ein Lösungsmittel, vorzugsweise einen Alkohol. Der Alkohol erleichtert die Abdampfung der Waschlösung. Die Konzentration des Alkohols in dieser letzteren bevorzugten

Form der Waschlösung beträgt vorzugsweise zumindest 30 Vol.-%, noch bevorzugter zumindest 40 Vol.-%, insbesondere zumindest 50 Vol.-%. Der so verwendete Alkohol ist vorzugsweise Ethanol oder Isopropanol oder ein Gemisch daraus, noch bevorzugter Ethanol. Das Salz liegt vorzugsweise in Form eines Puffers vor, insbesondere in Form eines Acetatpuffers. Die Konzentration des Salzes in der Waschlösung ist hoch genug, um sicherzustellen, dass das Nucleinsäurematerial während dem/der Waschschr(it)te nicht aus den magnetischen Silicateilchen eluiert wird.

[0075] Der Komplex wird vorzugsweise nach der Abtrennung vom Medium gewaschen, indem der Komplex in der Waschlösung resuspendiert wird. Vorzugsweise wird der Komplex nach dem ersten Waschschr(it)t aus der Waschlösung entfernt und zumindest noch einmal gewaschen, noch bevorzugter zumindest noch dreimal gewaschen, wobei bei jedem Waschschr(it)t eine frische Waschlösung verwendet wird.

[0076] Eine definierbare Menge DNA-Zielmaterial ist im Komplex vorhanden. In manchen Analyse- oder molekularbiologischen Verarbeitungsverfahren wird das Verfahren durch kleine Mengen magnetische Teilchen nicht verunreinigt oder nennenswert gestört. Somit kann der Komplex bei geeigneten Verfahren direkt verarbeitet werden, ohne dass vorher das DNA-Zielmaterial von den magnetischen Silicateilchen abgetrennt wird.

[0077] Vorzugsweise wird das DNA-Zielmaterial jedoch aus den magnetischen Silicateilchen eluiert, bevor es weiter verarbeitet wird. Das kann erreicht werden, indem der Komplex einer Elutionslösung ausgesetzt wird. Die Elutionswirksamkeit (oder der Prozentsatz an gebundenem DNA-Zielmaterial, der von den Teilchen abgetrennt werden soll) ist nicht wichtig, solange unter Verwendung von gegebenen Reaktionsbedingungen, Teilchentyp und Probenotyp ein relativ gleichmäßiger Prozentsatz eluiert wird. Solange eine definierte Menge DNA-Zielmaterial gleichmäßig an die Teilchen adsorbieren kann und herausgelöst werden kann, kann eine Quantifizierung durchgeführt werden.

[0078] Die Elutionslösung ist vorzugsweise eine wässrige Lösung mit geringer Ionenstärke, noch bevorzugter Wasser oder eine Puffer mit geringer Ionenstärke mit einem pH, bei dem das Nucleinsäurematerial stabil und im Wesentlichen intakt ist. Jede wässrige Lösung mit der gleichen Ionenstärke wie ein TE-Puffer oder einer niedrigeren (d.h. 10 mM Tris-HCl, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,0) ist zur Verwendung in den Elutionsschritten der vorliegenden Verfahren geeignet, aber die Elutionslösung wird vorzugsweise auf einen pH zwischen etwa 6,5 und 8,5, noch bevorzugter auf einen pH zwischen etwa 7,0 und 8,0, gepuffert. TE-Puffer und destilliertes oder entionisiertes Wasser sind insbesondere bevorzugte Elutionslösungen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Die geringe Ionenstärke der bevorzugten Formen der oben beschriebenen Elutionslösung stellt sicher, dass das Nucleinsäurematerial von den Teilchen freigesetzt wird. Andere Elutionslösungen, die zur Verwendung in den Verfahren dieser Erfindung geeignet sind, können von Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung leicht bestimmt werden. Das im Elutionsschr(it)t des Verfahrens aus dem Komplex eluierte DNA-Zielmaterial wird vorzugsweise von den magnetischen Silicateilchen abgetrennt.

[0079] Das unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung eluierte DNA-Zielmaterial ist ohne weitere Isolation für Analysen oder weitere Verarbeitungen durch molekularbiologische Verfahren geeignet. Eluierte DNA kann beispielsweise durch Sequenzierung, Restriktionsanalyse oder Nucleinsäuresondenhybridisierung analysiert werden. Somit können die Verfahren der Erfindung als Teil von Verfahren verwendet werden, die basierend auf DNA-Analyse unter anderem zur Diagnose von Krankheiten; Identifikation von Pathogenen; Analyse von Nahrungsmitteln, Kosmetika, Blut oder Blutprodukten oder anderen durch Pathogene verunreinigten Produkten; für forensische Tests; für Vaterschaftstests und zur Bestimmung des Geschlechts von Föten oder Embryos eingesetzt werden. Vorzugsweise wird eluierte genomische DNA in einem DNA-Typisierungsverfahren analysiert. Beispielsweise kann DNA, sobald sie gereinigt ist, in herkömmlichen Amplifikations- und DNA-Typisierungssystemen verwendet werden. Die Systeme PowerPlex™ 1.1 und PowerPlex™ 2.1 (Promega) ermöglichen die Amplifikation von 13 CODIS-Kernloci sowie des Geschlechtsbestimmungslocus, Amelogenin, und des Low-Stutter-Pentanucleotid-Repeat-Locus Penta E in einem Amplifikationssystem mit zwei Röhrchen. Diese beiden Systeme haben drei Loci gemeinsam, um ein Verwechseln der Proben zu verhindern.

[0080] Die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung bereitgestellte eluierte DNA kann auf verschiedene Weisen weiterverarbeitet werden, beispielsweise durch Sequenzierung, Transkription oder Enzymreaktionen. Restriktionsfragmente von der eluierten DNA können in Vektoren ligiert und in für Klonierung oder Expression geeignete Wirte transformiert werden. Segmente der eluierten DNA können durch verschiedene auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren amplifiziert werden, um Zielnucleinsäuresgmente zu amplifizieren. Wenn eluierte DNA ein Plasmid oder eine andere Art einer autonom replizierenden DNA ist, kann sie in einen geeigneten Wirt transformiert werden, um Gene auf der DNA zu klonieren oder zu exprimieren, die dazu fähig sind, im transformierten Wirt exprimiert zu werden.

[0081] Die Komponenten, die zur Durchführung des Verfahrens der Erfindung notwendig sind, können in einem Set zur Isolation einer bekannten Menge DNA-Zielmaterial aus einem Medium enthalten sein. Solch ein Set sollte zumindest Folgendes enthalten: eine diskrete Menge mit Siliciumdioxid beschichtete Magnetteilchen, die in einer wässrigen Lösung in einem ersten Behälter suspendiert sind, worin die Teilchen eine definierbare Menge DNA-Zielmaterial aus dem Medium für einen Probentyp reversibel binden können. Vorzugsweise umfasst das Set auch ein chaotropes Salz. Die Teilchen können in einer Lösung mit dem chaotropen Salz suspendiert sein. Außerdem umfasst das Set vorzugsweise auch eine Waschlösung.

[0082] Für flüssiges Blut und Blutflecken (etwa 5 µl bis 10 ml Blut) kann ein geeignetes Set folgende Bestandteile enthalten: einen Lysepuffer, einen Waschpuffer, magnetische Silicateilchen und gegebenenfalls eine Elutionslösung und/oder ein Magnetstativ. Vorzugsweise verdoppelt sich die Lyselösung als Waschlösung. Ein Hochdurchsatzsystem könnte die oben genannten Bestandteile und eine 96-Well-Platte umfassen.

[0083] Ein geeignetes Set zur Plasmidreinigung kann Folgendes umfassen: eine Zellresuspensionslösung, eine Lyselösung, eine Neutralisierungslösung, magnetische Silicateilchen, eine Waschlösung und eine Elutionslösung.

[0084] In den folgenden nichteinschränkenden Beispiele sind verschiedene Ausführungsformen der Erfindung erläutert. In den Beispielen und auch sonst in der Beschreibung und in den Ansprüchen sind Volumina, pH und Konzentrationen, sofern nicht anders spezifiziert, bei Raumtemperatur angegeben. Nur die bevorzugtesten Formen von magnetischen Silicateilchen wurden in den nachstehenden Beispielen verwendet, d.h. poröse und nichtporöse MagneSil™-Teilchen. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung können jedoch unter Bezugnahme auf die Lehren der vorliegenden Offenbarung auch andere Formen von magnetischen Silicateilchen wählen und verwenden als die porösen und nichtporösen MagneSil™-Teilchen, deren Verwendung in den Aspekten der Verfahren der Erfindung veranschaulicht ist, die in den nachstehenden Beispielen erläutert sind.

BEISPIELE

[0085] Die nachstehenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung verschiedener Aspekte der Erfindung.

Beispiel 1: DNA-Isolation aus Blut unter Verwendung von nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen

[0086] In diesem Beispiel wurden verschiedene Mengen nichtporöser magnetischer MagneSil™-Silicateilchen (Promega Corp.) verwendet, um DNA aus menschlichen Blutproben verschiedener Größen zu isolieren. Blut wurde in einem mit EDTA überzogenen Vacutainer-Röhrchen gesammelt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert (weniger als zwei Wochen). Verschiedene Mengen flüssiges Blut, zwischen 6 µl und 25 µl, wie in Tabelle 1 angeführt ist, wurden in 1,5 ml fassende konische Röhrchen gegeben. Dann wurden 100 µl einer Lösung zugesetzt, die 93 µl Lysepuffer (4,5 M Guanidinthiocyanat, 1 % Triton X-100, 1 % CHAPS [3-[Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propansulfonat], 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,3, eingestellt auf einen pH von 6,8 – 7,0) enthielt, und entweder 5 µl oder 7 µl Wasser mit 100 µg/µl nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen wurden zugesetzt. Die Lösungen wurden kurz verwirbelt. Dann wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubiert, kurz verwirbelt und auf ein Magnetstativ (Promega) gegeben, um die Teilchen von der Lösung abzutrennen. Die Lösung wurde vorsichtig entfernt, und 100 µl Waschpuffer (100 mM NaCl, 25 % Ethanol, 25 % Isopropylalkohol) wurden zugesetzt. Die Röhrchen wurden dann vom Magnetstativ genommen, kurz verwirbelt und wieder auf das Magnetstativ gegeben. Die Waschlösung wurde entfernt, und das Waschen wurde weitere zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Waschvorgänge durchgeführt wurden. Nach Entfernen der letzten Waschlösung wurden die Teilchen bei Raumtemperatur 5 Minuten lang trocknen gelassen. Dann wurden die Röhrchen vom Magnetstativ genommen, und 100 µl Wasser wurden zugesetzt, wonach die Röhrchen kurz verwirbelt wurden. Danach wurden die Röhrchen fünf Minuten lang 60 °C ausgesetzt, kurz verwirbelt und dann auf ein Magnetstativ gegeben. Die DNA-Lösung wurde entfernt und in einem 0,5 ml fassenden konischen Röhrchen gelagert.

[0087] Tabelle 1 zeigt die Gesamtmenge DNA, die unter Verwendung von entweder 500 oder 700 µg nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen aus zwischen 6 und 25 µl flüssigem Blut erhalten wurden. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung von PicoGreen-DNA-Farbstoff bestimmt, der gemäß den Empfehlungen des Herstellers (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt wurde. Beide Mengen an magnetischen MagneSil™-Silicateilchen, die verwendet wurden, wiesen in etwa Sättigungskinetik auf. Die Menge von 500 µg näherte sich der Sättigung an, und die Menge von 700 µg lag leicht unter der Sättigung. Die Variation der isolierten DNA-Mengen war bedeutend geringer als die Variation der Volumenbereiche von Blut, ins-

besondere zwischen Volumina von 10 und 25 µl Blut.

Tabelle 1

Blutvolumen (µl)	DNA eluiert (ng)	
	500 µg Teilchen	700 µg Teilchen
6	68	78
6	60	69
8	74	66
8	79	91
10	85	106
10	84	106
15	87	121
15	79	119
20	124	123
20	96	118
25	96	146
25	110	170

Beispiel 2: Analyse von isolierter DNA

[0088] In diesem Beispiel wurde die in Beispiel 1 erhaltene DNA verwendet, um die Identität des Allels zu analysieren, das an Loci mit 8 kurzen tandemartigen Wiederholungen (STR-Loci) vorhanden ist. Einen Mikroliter umfassende Proben der wie in Beispiel 1 beschrieben unter Verwendung von 700 µg nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen (Promega) aus den Blutproben gereinigten DNAs wurden unter Verwendung des Systems GenePrint® PowerPlex™ 1.1 von Promega (Promega Nr. DC6091) gemäß den Anleitungen des Herstellers amplifiziert. Für dieses System ist empfohlen, dass zwischen 0,5 und 5 ng DNA pro Test verwendet werden, wobei die bevorzugteste Menge 1 ng DNA beträgt.

[0089] Ein Mikroliter des Amplifikationsprodukts wurde auf denaturierendes Polyacrylamidgel geladen und wie im technischen Handbuch zum System GenePrint® PowerPlex™ 1.1 beschreiben Elektrophorese unterzogen. Das Gel wurde unter Verwendung eines Fluoreszenz-Scanners FMBIO® II (Hitachi, South San Francisco, CA, USA) gescannt. Für alle gefundenen Allele wurden Peakhöhen bestimmt und normalisiert. Die Datenpunkte stellen das Mittel der 15 Allele für jede Probe dar, wobei die Höhen der kombinierten Allele, die aus der DNA gebildet wurden, die aus 10 µl umfassenden Blutproben gewonnen wurde, gleich eins gesetzt wurden. Diese Datenpunkte und die Standardabweichung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Peakhöhen der 10 bis 25 µl Blut umfassenden Proben variierten nur um das etwa 2fache und waren fast identisch. Die Daten zeigten, dass alle Proben leicht genotypisiert werden konnten.

Tabelle 2

Lsg.	Aus der Blutmenge erhaltene DNA	Mittlere normalisierte Peakhöhe	Standardabweichung
1	6 µl	0,52	0,15
2	8 µl	0,70	0,12
3	10 µl	1,0	0,11
4	15 µl	1,04	0,23
5	20 µl	1,01	0,26
6	25 µl	1,17	0,21

Beispiel 3: Nichtporöse magnetische Silicateilchen und Guanidinthiocyanat

[0090] In diesem Beispiel wurde genomische DNA aus menschlichem Vollblut gereinigt. Das Blut war am Tag vorher in einen mit EDTA überzogenen Vacutainer gegeben und bei 4 °C gelagert worden. Alle Reinigungen wurden dreifach durchgeführt, und alle Schritte und Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und -druck durchgeführt. Eine magnetische Reinigung eines Blutlysats und eine Reinigung

von genomischer DNA wurden unter Verwendung von Lösungen aus dem Set Wizard™ Genomic DNA Purification von Promega (A1620) und nichtporösen Magneteilchen mit Guanidinthiocyanat durchgeführt.

[0091] 1 ml, 800 µl, 600 µl, 400 µl und 200 µl Blut wurden in separate 15 ml fassende Röhrchen gegeben, die 3,0 ml der Lösung Wizard Genomic Cell Lysis enthielten, damit vermischt und 10 Minuten lang inkubiert. Dann wurden die Röhrchen 10 Minuten lang bei 800 × g zentrifugiert. Die Lösung wurde entfernt, wodurch die weißen Blutkörperchen als Pellet am Röhrchenboden verblieben.

[0092] Das Pellet aus weißen Blutkörperchen wurde verwirbelt, und 1,0 ml Nuclei-Lysis-Lösung wurden zugesetzt. Dann wurde das Röhrchen verwirbelt und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 330 µl der Lösung Wizard™ Genomic Protein Precipitation zugesetzt, und die Röhrchen wurden verwirbelt und bei 800 × g 10 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurden die Lösungen aus den Röhrchen genommen und in saubere Röhrchen transferiert, die 100 µl (100 mg/ml) nichtporöse magnetische MagneSil™-Silicateilchen enthielten, und die Lösungen wurden verwirbelt.

[0093] Zwei Milliliter 5 M Guanidinthiocyanat (GTC) wurden zugesetzt, und das Röhrchen wurde verwirbelt und dann 2 Minuten lang inkubiert. Dann wurde das Röhrchen 5 Minuten lang auf ein Magnetstativ gegeben. Die Lösung, die von den Teilchen abgetrennt worden war, wurde entfernt und verworfen. Fünf ml SV Total RNA Column Wash (Promega, Z3100) wurden zugesetzt, und das Röhrchen wurde 5 Sekunden lang verwirbelt und dann wieder 2 Minuten lang auf ein Magnetstativ gegeben. Danach wurde die Lösung, die von den Teilchen getrennt worden war, entfernt und verworfen. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Unter Verwendung von 5,0 ml 80%igem Ethanol wurde in letzter Waschschrift durchgeführt. Dann wurde das Röhrchen 5 Sekunden lang verwirbelt und 2 Minuten lang auf ein Magnetstativ gegeben. Die Lösung, die von den Teilchen getrennt worden war, wurde entfernt und verworfen. Das Waschen mit 80%igem Ethanol wurde zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Waschvorgänge durchgeführt wurden. Dann wurden die Röhrchen 60 Minuten lang auf dem Magnetstativ luftgetrocknet. Nach dem Abnehmen vom Magnetstativ wurde DNA auf den Teilchen 5 Minuten lang in 400 µl Wizard™ Genomic Renaturation Solution eluiert. Dann wurde das Röhrchen erneut 5 Minuten lang auf ein Magnetstativ gegeben, und die DNA enthaltende Lösung wurde in ein sauberes Röhrchen gegeben.

[0094] Die DNA-Reinigungsergebnisse wurden durch eine spektraiphotometrische Analyse (DNA 1:2 in einem Probenpuffer verdünnt) durch eine PicoGreen-Analyse gemäß den Anleitungen des Herstellers (Molecular Probes) und durch eine DNAQuant-Analyse gemäß den Anleitungen des Herstellers (Promega Corp.) erhalten und sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Ergebnisse sind auch in [Fig. 1](#) zu sehen. Die Spuren 1 – 5 entsprechen 100, 80, 60, 40 bzw. 20 ng genomischem DNA-Standard Nr. 6304A von Promega. Spur 6 und darüber waren mit 10 µl einer Probe beladen.

Tabelle 3

Blut (µl)	A260	A280	A260:A280	Ausbeute, µg	PicoGreen (µg)	DNAQuant (µg)	Spur auf Gel
200	0,0643	0,0287	2,2371	2,57	1,3	1,9	20
200	0,0646	0,0285	2,2632	2,58	1,3	1,8	19
200	0,0620	0,0273	2,2702	2,48	1,1	1,8	18
400	0,0898	0,0423	2,1213	3,59	2,0	2,6	17
400	0,0875	0,0415	2,1088	3,50	1,9	2,6	16
400	0,0889	0,0418	2,1242	3,55	1,8	2,6	15
600	0,0769	0,0355	2,1653	3,07	1,6	1,8	14
600	0,0752	0,0335	2,2423	3,00	1,5	1,9	13
600	0,0748	0,0337	2,2175	2,99	1,5	2,2	12
800	0,0950	0,0447	2,1255	3,80	1,6	2,2	11
800	0,0823	0,0373	2,2047	3,29	1,9	2,4	10
800	0,0868	0,0403	2,1536	3,47	2,0	2,6	9
1,0 ml	0,0739	0,0330	2,2353	2,95	1,9	2,3	8
1,0 ml	0,0686	0,0304	2,2557	2,74	1,5	2,0	7
1,0 ml	0,0747	0,0338	2,2047	2,98	1,7	2,4	6

[0095] Die mittlere Ausbeute gemäß der spektralphotometrischen Analyse betrug 3,11 µg. Der niedrigste Wert war 2,48 oder 79,8 % des Mittelwerts. Der höchste Wert war 3,8 oder 122,3 % des Mittelwerts. Bei der

PicoGreen-Analyse, die auch in [Fig. 1](#) zu sehen ist, war die mittlere Ausbeute 1,6 µg. Der niedrigste Wert war 1,1 oder 33 % des Mittelwerts, während der höchste Wert 2,0 oder 20 % des Mittelwerts war. Somit lagen alle Proben innerhalb von 33 % des Mittelwerts. Beim DNAQuant-Assay war der niedrigste Wert 1,8, während der höchste Wert 2,6 war. Die A260:A280-Werte sind höher als der gewünschte Bereich von 1,7 – 1,9 und könnten die Gegenwart von restlichen Verunreinigungen widerspiegeln.

Beispiel 4: DNA-Isolation aus S&S-903-Papier mit Blutflecken

[0096] In diesem Beispiel wurde gezeigt, dass das folgende Verfahren unter Verwendung eines Lysepuffers, wie in Beispiel 1 beschrieben ist, DNA von Blut freisetzt, das auf S&S-903-Papier (Schleicher & Schuell) getrocknet war. Nichtporöse magnetische Silicateilchen wurden dann verwendet, um die freigesetzte DNA zu reinigen. Menschliche Blutflecken auf S&S-903-Papier mit einer Größe von 14 mm² bis 100 mm² und 5 µl bis 50 µl Blut wurden ausgeschnitten und auf den Boden von 1,5 ml fassenden konischen Röhrchen gegeben. Dann wurden 100 µl Lysepuffer wie in Beispiel 1 beschrieben zu den Röhrchen zugesetzt, die 50 mm² oder weniger S&S-903-Papier enthielten, und 200 µl Lysepuffer wurde zu den 100 mm² S&S-903-Papier zugesetzt. Dann wurden die Röhrchen 30 Minuten lang 95 °C ausgesetzt. Danach wurden die Röhrchen von der Wärmequelle entfernt; und das Papier wurde mithilfe einer sterilen Pipettenspitze entnommen. Überschüssige Flüssigkeit wurde vom Papier entfernt, indem das Papier mithilfe der Pipettenspitze gegen die Seite des Röhrchens gedrückt wurde. Dann wurden 7 µl Wasser, das 700 µg nichtporöse magnetische MagneSil™-Silicateilchen enthielt, zugesetzt, und das Röhrchen wurde vorsichtig verwirbelt. Der Rest des DNA-Reinigungsverfahrens wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

[0097] Ein Mikroliter der DNA, die von den einzelnen Blutflecken erhalten wurde, wurde wie in Beispiel 2 beschrieben mit dem System GenePrint® PowerPlex™ 1.1 amplifiziert. Ein Mikroliter des Amplifikationsprodukts wurde auf ein denaturierendes Gel geladen und wie im technischen Handbuch des Systems GenePrint® PowerPlex™ 1.1 beschrieben Elektrophorese unterzogen. Das Gel wurde unter Verwendung eines Fluoreszenz-Scanners FMBIO® II (Hitachi, South San Francisco, CA, USA) gescannt. Für alle gefundenen Allele wurden die Peakhöhen bestimmt und normalisiert. Die in Tabelle 4 angeführten Datenpunkte stellen das Mittel der 15 Allele für jede Probe und ihre Standardabweichungen dar, wobei die Höhen der kombinierten Allele, die aus der DNA gebildet wurden, die aus 10 µl umfassenden Blutproben gewonnen wurde, gleich eins gesetzt wurden. Die mittleren normalisierten Peakhöhen der einzelnen Proben lagen alle innerhalb von 5 %, was darauf hinweist, dass die Amplifikationen gleichförmig waren, egal ob die DNA aus dem 5-, 10-, 25- oder 50-µl-Blut isoliert wurde.

Tabelle 4

Lsg.	Aus der Blutmenge erhaltene DNA	Mittlere normalisierte Peakhöhe	Standardabweichung
1	5 µl	1,05	0,07
2	10 µl	1,0	0
3	25 µl	1,05	0,14
4	50 µl	0,95	0,12

[0098] In der nachstehenden Tabelle 5 ist die Standardabweichung zwischen Peakhöhen einzelner Proben angeführt. Die Abweichung lag immer zwischen 16 und 20 %, was darauf hinweist, dass kleine und große Allele gleichförmig amplifiziert wurden, egal wie groß die Probe war.

Tabelle 5

Lsg.	Aus der Blutmenge erhaltene DNA	Standard- abweichung
1	5 µl	0,16
2	10 µl	0,16
3	25 µl	0,21
4	50 µl	0,17

Beispiel 5: DNA-Isolation aus FTA™-Papier mit Blutflecken

[0099] In diesem Beispiel wird gezeigt, dass DNA, die an FTA™-Papier (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) gebunden ist, unter Verwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Lysepuffers vom Papier freigesetzt wurde. Die freigesetzte DNA wurde dann mit nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen gereinigt und für eine STR-Analyse verwendet.

[0100] Die angegebene Größe des FTA™-Papiers (113 mm², 57 mm² und 28 mm²) mit menschlichen Blutflecken wurde wie in Beispiel 2 beschrieben in 100 µl Lysepuffer 30 Minuten lang auf 95 °C erhitzt. Das Papier und die Lösung wurden in einen Zentrifugen-Korb ohne Filter gegeben (Millipore, Bedford, MA, USA) und in einer Mikrozentrifuge 2 Minuten lang bei 14.000 U/min zentrifugiert. Dann wurden 700 µg nichtporöse magnetische MagneSil™-Silicateilchen in 7 µl Wasser zum Röhrchen zugesetzt, kurz verwirbelt und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Röhrchen wurde kurz verwirbelt und dann auf ein Magnetstativ (Promega Corp.) gegeben, wo die Teilchen von der Lösung abgetrennt wurden, wonach die Lösung entfernt wurde. Die Teilchen wurden dreimal mit 100 µl Waschpuffer gewaschen (in Beispiel 1 beschrieben). Dann wurden die Teilchen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach wurden 100 µl Wasser zum Röhrchen mit den Teilchen zugesetzt, und das Röhrchen wurde 5 Minuten lang bei 60 °C inkubiert. Das Röhrchen wurde kurz verwirbelt und dann bei Raumtemperatur auf ein Magnetstativ gegeben, und die DNA-Lösung wurde entfernt und bei 4 °C gelagert. Ein Mikroliter jeder Lösung wurde unter Verwendung von GenePrint® PowerPlex™ 1.1 amplifiziert, das amplifizierte Produkt wurde auf einem denaturierenden Gel laufen gelassen, und das Gel wurde wie in Beispiel 2 beschrieben auf einem Fluoreszenz-Scanner FMBIO® II analysiert. Peakhöhen wurden normalisiert und in Tabelle 6 zusammengefasst. In diesem Beispiel zeigen die Daten, dass von unterschiedlichen Mengen FTA™-Papier mit Blutflecken etwa gleiche Menge DNA gereinigt wurden, wenn die Menge der nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen in der oben genannten Arbeitsvorschrift konstant gehalten wurde.

Tabelle 6

Locus	Allel	Normalisierte Peakhöhen		
		113 mm ²	57 mm ²	28 mm ²
CSF1PO	12	0,80	1,07	1,00
CSF1PO	10	0,99	1,28	1,00
TPOX	10	0,55	1,09	1,00
TPOX	8	0,62	0,92	1,00
TH01	9	0,64	1,35	1,00
TH01	6	0,58	1,26	1,00
vWA	17	0,61	1,05	1,00
vWA	16	0,72	1,11	1,00
D16S539	14	0,66	1,19	1,00
D16S539	11	0,75	1,42	1,00
D7S820	13	0,54	1,15	1,00
D7S820	12	0,42	1,11	1,00
D13S317	12	1,45	1,78	1,00
D13S317	8	1,17	1,86	1,00
D5S818	12	1,06	1,51	1,00

Beispiel 6: Altersschwankung von Blut bei gereinigter DNA

[0101] In diesem Beispiel wird die Qualität von durch das Verfahren der Erfindung isolierter DNA verglichen, wenn das Blut zwischen 0 und 131 Tagen gelagert wurde. Wie Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, nimmt die Qualität von DNA, wenn das Blut gelagert wird, im Laufe der Zeit in unterschiedlichem Ausmaß ab. Menschliches Blut wurde in mit EDTA überzogene Vacutainer-Röhrchen gesammelt und bei 4 °C gelagert. 0, 22, 29 und 131 Tage nach der Blutabnahme wurde die DNA von 10 µl Blut durch das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren unter Verwendung von nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen gereinigt. Ein Mikroliter der einzelnen gereinigten DNA-Lösungen wurde amplifiziert (jede Probe wurde dreimal analysiert), wobei das System GenePrint® PowerPlex™ 1.1 wie in Beispiel 2 beschrieben verwendet wurde. Die

amplifizierte DNA wurde auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel laufen gelassen, und Peakhöhen wurden mithilfe eines FMBIO®-Scanners bestimmt und wie in Beispiel 2 beschrieben auf die Werte von Tag 0 normalisiert. In der nachstehenden Tabelle 7 sind die erhaltenen normalisierten Peakhöhen und die Standardabweichung zusammengefasst.

Tabelle 7

Tage nach Blutabnahme	Normalisierte mittlere Peakhöhe	Standardabweichung
0	1,00	0
22	0,97	0,1
29	0,98	0,08
131	0,98	0,24

[0102] Die normalisierte mittlere Peakhöhe wies bei allen Proben minimale Schwankungen auf, was darauf hinweist, dass aus Blut, das bis zu vier Monaten gelagert wurde, DNA erhalten wurde, die für dieses quantitative Reinigungsverfahren geeignet ist. Die Probe von Tag 131 weist im Wesentlichen die gleichen mittleren Peakhöhen auf, aber die kleinen Allele sind etwas höher als der Mittelwert, und die großen Allele liegen etwas unter dem Mittelwert. Dies wird durch die größere Standardabweichung bei Verwendung von Proben aufgezeigt, die 131 Tage nach der Blutabnahme erhalten und gelagert wurden. Aber alle Proben konnten leicht genotypisiert werden, und die Peakhöhen lagen innerhalb von annehmbaren Bereichen.

[0103] Interessanterweise zeigt Beispiel 6, dass die Größe der DNA keine bedeutende Auswirkung auf die Bindungs- und Elutionsmengen hatte. Somit können verlässliche Ergebnisse erhalten werden, ohne dass das anfängliche Kalibrationsmodell basierend auf dem Alter der Probe eingestellt werden muss, wonach die Qualität älterer Proben häufig abnimmt und diese somit geringere DNA-Größen bereitstellen.

Beispiel 7: Verwendung von direkt in einer STR-Analyse durch magnetische MagneSil™-Silicateilchen isolierter genomischer DNA

[0104] Dieses Beispiel wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob DNA aus den magnetischen MagneSil™-Silicateilchen eluiert werden muss, um für eine STR-Analyse verwendet werden zu können.

[0105] Sechs 685-ng-Aliquoten menschlicher genomischer DNA K562 (Promega Corp.) wurde in 50 µl GTC-Lysepuffer (6 M Guanidinthiocyanat, 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 6,0, 1 % CHAPS, 1 % Triton X-100) in 1,5 ml fassenden konischen Röhrchen gegeben. In einem Parallelversuch wurden 50-µl-Aliquoten menschliches Vollblut mit 100 µl GTC-Lysepuffer in 1,5 ml fassende konische Röhrchen gegeben. Zu jeder Reihe wurden abnehmende Mengen magnetische Silicateilchen zugesetzt (2,5, 0,5, 0,1, 0,02, 0,004, 0,0008 µg). Die Proben wurden wie folgt verarbeitet. In ein 1,5 ml fassendes konisches Röhrchen wurden 400 µl GTC-Lysepuffer, 50 µl poröse magnetische MagneSil™-Silicateilchen (100 mg/ml) und 200 µl Vollblut gegeben. Das Röhrchen wurde etwa 15 Sekunden lang verwirbelt. Dann wurde das Röhrchen 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und nach 5 Minuten kurz verwirbelt. Die Teilchen wurden gefangen, indem das Röhrchen auf ein Magnetstativ gegeben wurde. Der Überstand, der von den Teilchen abgetrennt wurde, wurde entfernt, und 650 µl Waschpuffer (25 % Isopropanol, 25 % Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0) wurden zugesetzt und das Röhrchen kurz verwirbelt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Waschschritte durchgeführt wurden. Dann wurde die letzte Waschlösung entfernt, und die Teilchen wurden in 20 µl Waschpuffer resuspendiert. Ein Mikroliter jeder Isolation wurde entnommen und auf den Boden eines Amplifikationsröhrchens gegeben und 10 Minuten lang luftgetrocknet. Diese Proben wurden dann für eine STR-Analyse verwendet und mit einer STR-Analyse von 1 ng K562 in einer STR-Analyse unter Verwendung eines Systems GenePrint® PowerPlex™ 1.1 verglichen, die wie in Beispiel 2 beschrieben gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt wurde. Das resultierende Gel ist in [Fig. 2](#) zu sehen. Die Spuren "L" entsprechen der Allelleiter.

Tabelle 8

Probe	Teilchenmenge in STR-Reaktion (µg)	Spur auf Gel
K562-DNA (1 ng)	0 (positive Kontrolle)	1
K562-DNA	2,5	2
K562-DNA	0,5	3
K562-DNA	0,1	4
K562-DNA	0,02	5
K562-DNA	0,004	6
K562-DNA	0,0008	7
Blut	2,5	8
Blut	0,5	9
Blut	0,1	10
Blut	0,2	11
Blut	0,004	12
Blut	0,0008	13

[0106] Ein Vergleich zwischen den mit abnehmenden Mengen magnetischer MagneSil™-Silicateilchen isolierten Proben und der 1 ng umfassenden Probe K561-DNA zeigen, dass extrem kleine Mengen genomischer DNA isoliert wurden; dass die an die Teilchen gebundene DNA direkt in STR-Reaktionen verwendet werden konnte; und dass die Teilchenmenge, die zum Fangen von DNA erforderlich ist, die etwa 1 ng K562-DNA entspricht, bestimmt durch die Intensität von Banden im oben beschriebenen STR-Assay, für K562-DNA etwa 0,1 µg und für Vollblut etwa 0,5 µg beträgt.

Beispiel 8: Sequenzierung von durch Fangen auf porösen und nichtporösen magnetischen Silicateilchen isolierter DNA

[0107] Dieses Beispiel zeigt, dass durch eine Einschränkung der Menge an porösen und nichtporösen silica-beschichteten magnetischen Teilchen, die zu einem hergestellten bakteriellen Lysat zugesetzt wird, das mehr DNA enthält als die maximale DNA-Bindungskapazität der Teilchen beträgt, verlässlich eine DNA-Menge isoliert werden konnte, die zur Verwendung bei einer automatisierten Sequenzierung geeignet war. Dieses Verfahren hob die Notwendigkeit auf, die Konzentration und Qualität von DNA durch spektralphotometrische Analysen oder andere quantitative Analysen zu bestimmen, die durch die Gegenwart von Verunreinigungen in der DNA-Zubereitung beeinflusst werden können.

[0108] DH5α-Bakterienzellen (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA), die mit pGEM3Zf(+)-Plasmid (Promega Corp., Madison, WI, USA) transformiert waren, wurden über Nacht gezüchtet, wobei 1 ml pro Well eines Beckman 2 ml BioBlock (140504) enthalten war. Die Zelldichte betrug bei 600 nm etwa 2 – 3 OD. Die theoretische Menge an vorhandenem Plasmid könnte von 300 – 700 Kopien/Zelle betragen und zu einer Ausbeute von 1,8 – 4,1 Kultur führen (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, NY, USA (1989)). Die Zellen wurden im BioBlock durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.000 × g pelletisiert. Das Medium wurde dekantiert, und die Platte wurde vorsichtig auf einem Papierhandtuch abtupft, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.

[0109] Dann wurden 75 µl Cell Resuspension Buffer (Promega, A711T) zum Zellpellet zugesetzt, und das Pellet wurde durch auf- und abpipettieren resuspendiert. 75 µl Cell Lysis Buffer (Promega, A712T) wurden zugesetzt, und die Lösung wurde durch viermaliges auf- und abpipettieren vermischt. 100 µl Wizard™ Plus SV Neutralization Solution (Promega, A713T) wurden zugesetzt, und die Lösung wurde durch 4-maliges auf- und abpipettieren vermischt.

[0110] Die Röhrchen im BioBlock wurden bei 2.000 × g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Lysat wurde aus den einzelnen Röhrchen entfernt und in den geeigneten Well einer 96-Well-Platte gegeben.

[0111] Vor der Verwendung wurden die silica-beschichteten magnetischen MagneSil™-Silicateilchen (porös und nichtporös) durch Schütteln resuspendiert. Dann wurden, wie in der folgenden Tabelle 9 zusammengefasst, unterschiedliche Mengen der verschiedenen Arten verdünnter Teilchen zu einzelnen Wells zugesetzt, vorsichtig vermischt und bei Raumtemperatur 10 Minuten lang inkubiert. Die Platte wurde auf einem Magneten

platziert, und die Lösung wurde klären gelassen (etwa 10 Sekunden). Dann wurde das Lysat aus den einzelnen Wells entfernt und verworfen, wobei darauf geachtet wurde, so wenige Teilchen wie möglich zu entfernen. Die Platte wurde vom Magneten genommen, und 40 µl 80%iges Ethanol wurden zu jedem Well zugesetzt.

[0112] Die Teilchen wurden durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Platte wurde erneut auf einem Magnet platziert, und das geklärte Lysat wurde entfernt. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Nachdem die zweite Waschlösung entfernt worden war, wurde die Platte 10 Minuten auf dem Magnet stehen gelassen. Wenn nach dieser Zeit Flüssigkeit auf den Boden der Wells gelaufen war, wurde diese mit einer Pipette entfernt. Dann wurden 10 µl nanoreines Wasser zu jedem Well zugesetzt und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Platte wurde auf einem Magnet platziert, um eine Klärung durchzuführen, und der Überstand wurde auf eine saubere Platte übertragen.

[0113] Dann wurden alle Proben ohne weitere Verarbeitung sequenziert, wobei die nachstehend aufgelisteten plasmidspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Promega Corp., Madison, WI, USA) zusammen mit Big-Dye™ Chemistry gemäß den Anleitungen des Herstellers (ABI) auf einer ABI-377-Maschine verwendet wurden. Alle Proben konnten auf bis 800 Basen sequenziert werden, obwohl die Signalintensität und -genauigkeit variierte. Die Genauigkeit ist in Tabelle 9 angeführt, und die Signalintensität ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Vorwärts 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3' [Seq.-ID Nr. 1]

Rückwärts 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3' [Seq.-ID Nr. 2]

Tabelle 9

Teilchenmenge (ng) in Probenzubereitung	Genauigkeit (%)			
	500 Basen	600 Basen	700 Basen	800 Basen
1000 (porös)	100	100	100	98
500 "	100	100	99	97
250 "	100	100	99	98
125 "	100	99	97	99
63 "	100	100	98	96
1000 (nichtporös)	100	100	99	97
500 "	100	100	98	95
250 "	99	99	96	93
125 "	75	0	0	0
63 "	97	94	90	0

Tabelle 10

Probe	Teilchenmenge (ng) in Probenzubereitung	Relative Signalstärke
1	1000 (porös)	100
2	500 "	53
3	250 "	43
4	125 "	65
5	63 "	27
6	1000 (nichtporös)	39
7	500 "	36
8	250 "	18
9	125 "	8
10	63 "	15

[0114] Die Ergebnisse zeigen, dass unter Verwendung verschiedener Teilchenmengen ein Kalibrationsmodell bestimmt werden muss, wenn ein neuer Plasmidtyp, Teilchentyp oder Probenotyp zum ersten Mal verwendet wird. Wie die Ergebnisse in Tabelle 9 belegen, weisen die nichtporösen Teilchen eine geringere Bindungs-

kapazität auf als die gleiche Menge poröser Teilchen. So wird sichergestellt, dass nach dem gleichzeitigen Isolations-/Quantifizierungsschritt angemessene Mengen DNA für die DNA-Sequenzierungsreaktion vorhanden sind. In allen nachfolgenden Reaktionen unter Verwendung dieses Plasmidtyps wäre keine Kalibration mehr notwendig, da bekannt wäre, welche Teilchenmenge durch die definierte Menge an Teilchen unter den verwendeten Bedingungen gereinigt werden kann.

Beispiel 9: Vergleich zwischen einer Blutprobe auf gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendetem FTA®-Papier und FTA®-Papier, das mit einem Zelllysepuffer und einer Arbeitsvorschrift zum Trennen mit magnetischen Silicateilchen verwendet wurde

[0115] FTA®-Papier (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) ist gut dazu geeignet, Blutflecken zu lagern. Bei der Analyse von DNA auf FTA®-Papier treten jedoch einige technische Schwierigkeiten auf. Aufgrund der hohen Bindungskapazität des FTA®-Papiers und der schwierigen Trennung von DNA vom Filter durch herkömmliche Verfahren müssen sehr kleine Stücke des Papiers verwendet werden, um einen großen Überschuss an DNA in Amplifikationsreaktionen zu vermeiden. Außerdem gilt die Kapazität des FTA®-Papiers für ein gegebenes Flüssigkeitsvolumen. Somit führen Blut oder hohe weiße Blutkörperchencounts oder Proben, die mit einem überschüssigen Volumen Blut beladen werden, zu unbeständigen Ergebnissen. Das Reinigungsverfahren, das vom Hersteller empfohlen wird, erfordert fünf Waschschrte, die 20 bis 30 Minuten dauern, plus weitere 20 Minuten zum Trocknen bei 60 °C, bevor der Filter direkt in einer Amplifikationsreaktion verwendet werden kann. Dieses Verfahren muss jedes Mal wiederholt werden, wenn die DNA amplifiziert wird.

[0116] In diesem Beispiel werden DNA-Isolation von FTA®-Papier unter Verwendung der Arbeitsvorschrift des Herstellers des Papiers und DNA-Isolation von FTA®-Papier unter Verwendung von nichtporösen magnetischen MagneSil™-Silicateilchen verglichen. Ein 113 mm² großer menschlicher Blutfleck auf FTA®-Papier, der 100 µl Blut entspricht, wurde gemäß der Arbeitsvorschrift des Herstellers gereinigt. Ein 1 Millimeter großer Teil wurde herausgestanzt, und dieser Teil wurde halbiert (entspricht 0,5 mm² oder 0,4 µl Blut). Dann wurde der Teil unter Verwendung des Systems GenePrint® PowerPlex™ 1.1 gemäß der Arbeitsvorschrift des Herstellers (Promega Corp., Nr. DC6090) amplifiziert und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel wie in Beispiel 2 beschrieben laufen gelassen.

[0117] Alternativ dazu wurde ein 57 mm² großer FTA®-Blutfleck 30 Minuten lang in 200 µl Lysepuffer auf 95 °C erhitzt, wonach die Lösung und das Papier in einen Zentrifugier-Korb gegeben und 2 Minuten lang zentrifugiert wurden, um die Lösung vom Papier zu trennen. Dann wurden 7 µl Wasser, das 700 µl nichtporöse magnetische MagneSil™-Silicateilchen enthielt, zugesetzt, und die Lösung wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Teilchen vom Überstand abgetrennt, indem das Röhrchen auf ein Magnetstativ gegeben wurde. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Die Teilchen wurden dreimal wie in Beispiel 1 mit einem Waschpuffer gewaschen und dann 5 Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden 100 µl Wasser zugesetzt, und die Probe wurden 5 Minuten lang bei 60 °C inkubiert. Die Teilchen wurden auf einem Magnetstativ abgetrennt, und die Lösung, welche die DNA enthielt, wurde entnommen und in ein sauberes Röhrchen übertragen. Ein Mikroliter (entspricht etwa 0,6 mm² FTA®-Teil oder etwa 0,5 µl Blut) wurde unter Verwendung des Systems GenePrint® PowerPlex™ 1.1 amplifiziert und wie in Beispiel 2 beschrieben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel laufen gelassen.

[0118] Die Scans der Amplifikationsprodukte auf dem Acrylamidgel wurden analysiert, und die Peakhöhen wurden jeweils durch die mittlere Peakhöhe dividiert, um normalisierte Werte zu erhalten. Der Durchschnitt der Peakhöhen der beiden Allele an jedem Locus wurde berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Diese Ergebnisse zeigen, dass FTA®-Proben, die gemäß der Arbeitsvorschrift des Herstellers verwendet wurden, in der STR-Amplifikationsreaktion ungleichmäßige Ergebnisse lieferten. Die großen Allele waren unteramplifiziert, und die kleineren Allele waren überamplifiziert. Die Abtrennung der DNA vom FTA®-Filterpapier unter Verwendung der magnetischen Silicateilchen wie oben beschrieben ergab die korrekte Menge DNA zur Verwendung in den STR-Amplifikationsreaktionen, wobei keine präferentielle Amplifikation von Allelen mit unterschiedlichen Größen beobachtet wurde.

Tabelle 11

Locus	Normalisierte Peakhöhen	
	FTA-Reinigung	magnetische Silicareinigung
CSF1PO	0,59	0,90
TPOX	0,95	1,11
TH01	1,01	1,10
vWA	1,45	0,89

Beispiel 10: Poröse magnetische Silicateilchen und Vollblut: Einschränkung des Teilchenvolumens bei steigender Probengröße

[0119] In diesem Beispiel wurde eine konstante Menge (7 µl) poröser magnetischer Silicateilchen in einer Konzentration von 100 mg/ml in der nachstehend genannten Arbeitsvorschrift verwendet, um DNA von dreifachen 100, 200 und 300 µl umfassenden Proben menschlichen Vollbluts zu isolieren. Die eluierte DNA wurde durch UV-Spektralphotometrie, Agarosegelelektrophorese und einen PicoGreen-Assay (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) gemessen.

[0120] Sieben Mikroliter gut durchmischte poröse magnetische Silicateilchen (100 mg/ml) wurden in neun 2 ml fassende konische Röhrrchen mit Schraubdeckel pipettiert. Dann wurden dreifache Proben von 100 µl, 200 µl und 300 µl menschlichem Blut zu den drei Röhrrchen zugesetzt. Die Röhrrchen wurden 20 Sekunden lang verwirbelt und dann 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sie während dieser Zeit einmal verwirbelt wurden. Die Proben wurden erneut vermischt und auf ein Magnetstativ gegeben. Die Magnetteilchen wurden 5 Minuten lang bei Raumtemperatur vom Überstand abtrennen gelassen. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Dann wurden 400 µl einer Salzwashlösung zugesetzt, und der Inhalt der Röhrrchen wurde durch Wirbeln vermischt. Der Überstand wurde von den Teilchen abgetrennt, indem das Röhrrchen auf ein Magnetstativ gegeben wurde, und dann entfernt und verworfen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Waschvorgänge durchgeführt wurden.

[0121] Dann wurden 400 µl Alkoholwaschlösung zugesetzt, und der Inhalt des Röhrrchens wurde durch Wirbeln vermischt. Das Röhrrchen wurde auf das Magnetstativ gegeben, und der Überstand wurde entfernt und verworfen. Der Alkoholwaschvorgang wurde zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Waschvorgänge durchgeführt wurden. Nachdem der letzte Überstand entfernt worden war, wurde das Röhrrchen offen gelassen, um den Inhalt 10 Minuten lang bei Raumtemperatur luftzutrocknen. Dann wurden die Teilchen mit 50 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,3) kombiniert. Das Röhrrchen wurde durchgemischt und über Nacht bei 5 °C stehen gelassen. Die Teilchen wurden auf einem Magnetstativ vom Überstand abgetrennt, und der Überstand, der die eluierte DNA enthielt, wurde in ein sauberes Röhrrchen übergeführt. Die Teilchen wurden erneut mit 50 µl TE kombiniert, vermischt und 10 Minuten lang 65 °C ausgesetzt. Dann wurden die Teilchen auf einem Magnetstativ vom Überstand abgetrennt, und der Überstand wurde für ein kombiniertes DNA-Eluent-Volumen von 100 µl gepoolt.

[0122] Die DNA-Konzentration in der Lösung wurde dann mithilfe eines UV-Spektralphotometers gemessen, indem 70 µl der Lösung mit 280 µl TE kombiniert wurden, und das Absorptionsvermögen bei 260 nm und 280 nm wurde mithilfe eines UV-Spektralphotometers gemessen, wo TE als Blindprobe verwendet worden war. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12

Probe	Blut	OD260:280	Konzentration µg/ml	Ausbeute in µg	Spur auf Gel
1	100 µl	1,55	0,020	2,0	6
2	"	1,54	0,033	3,3	7
3	"	1,65	0,030	3,0	8
4	200 µl	1,63	0,037	3,7	9
5	"	1,50	0,028	2,8	10
6	"	1,49	0,038	3,8	11
7	300 µl	1,53	0,032	3,2	12

8	"	1,57	0,031	3,1	13
9	"	1,58	0,040	4,0	14

[0123] Dann wurden 10 µl jeder Probe zusammen mit genomischen DNA-Standards G304A (Spuren 2 – 4 in Mengen von 200, 100 bzw. 50 ng) und Lamda-HindIII-Markern G171A (Spur 1) auf einem 1%igen Agarosegel laufen gelassen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, und die Probenspuren wurden visuell unter UV-Licht mit Standards verglichen. Das resultierende Gel ist in [Fig. 3](#) zu sehen. Probe 1 schien 150 ng Gesamtausbeute zu enthalten, Probe 6 schien 800 ng Gesamtausbeute zu enthalten und die restlichen Proben etwa 250 ng Gesamtausbeute. Das zeigte, dass die UV-Spektralphotometriedaten fälschlicherweise um einen Faktor von etwa vier bis zehn erhöht waren. Der Grund dafür kann der Restalkohol oder Proteinverunreinigung sein, was durch die niedrigen OD260:280-Verhältnisse angezeigt werden könnte.

[0124] Ein PicoGreen-Assay wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 15 zusammengefasst. Gemäß den Gelfoto- und PicoGreen-Daten wiesen die Proben Gesamtausbeuten von etwa 250 ng bis 959 ng auf. Probe 6 scheint eine Ausnahme darzustellen, wahrscheinlich aufgrund einer ungleichmäßigen Rehydratisierung der DNA in dieser Probe.

Tabelle 13

Proben 10 µl	roh	korr.	Konz.	Ausbeute (ng)
Nr. 1	94	57	1,25	250,8
Nr. 2	120	83	1,83	365,2
Nr. 3	107	70	1,54	308
Nr. 4	153	116	2,55	510,4
Nr. 5	117	80	1,76	352
Nr. 6	255	218	4,80	(959,2)
Nr. 7	117	80	1,76	352
Nr. 8	100	63	1,39	277,2
Nr. 9	126	89	1,96	391,6

[0125] Unter Verwendung der PicoGreen-Quantifizierungsdaten wurde eine mittlere Ausbeute von 418 ng erhalten. Der niedrigste Wert war 250,8 ng oder 60 % des Mittelwerts. Der höchste Wert war 959 ng (Nr. 6 – wahrscheinlich Ausnahme) oder 299 % des Mittelwerts. Wenn dieser Wert bei der Berechnung des Mittelwerts außer Acht gelassen wird, beträgt der Mittelwert 350 ng, der niedrigste Wert 250 ng oder 71 % des Mittelwerts und der höchste Wert 510 ng oder 145 % des Mittelwerts.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolation einer definierten Menge DNA-Zielmaterial von anderen Zellkomponenten in einem Medium durch

- (a) Bereitstellung eines Mediums, welches das DNA-Zielmaterial und andere Zellkomponenten umfasst;
- (b) Bereitstellung einer diskreten Menge eines silicahältigen festen Trägers, der zur reversiblen Bindung einer definierbaren Menge DNA-Zielmaterial fähig ist, wobei die Menge an DNA-Zielmaterial, die in Schritt (a) bereitgestellt wird, die Bindungskapazität des silicahältigen festen Trägers übersteigt;
- (c) Bildung eines Komplexes aus dem silicahältigen festen Träger und dem DNA-Zielmaterial durch Kombination des silicahältigen festen Trägers und des Mediums;
- (d) Entfernung des Komplexes mit dem DNA-Zielmaterial aus dem Medium; und
- (e) Trennung des DNA-Zielmaterials von Schritt (c) vom Komplex, wodurch eine definierte Menge des DNA-Zielmaterials erhalten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin der silicahältige feste Träger aus magnetischen Silicateilchen besteht und der Schritt des Entfernens des Komplexes mit dem DNA-Zielmaterial aus dem Medium durch Anlegen eines externen Magnetfeldes durchgeführt wird.

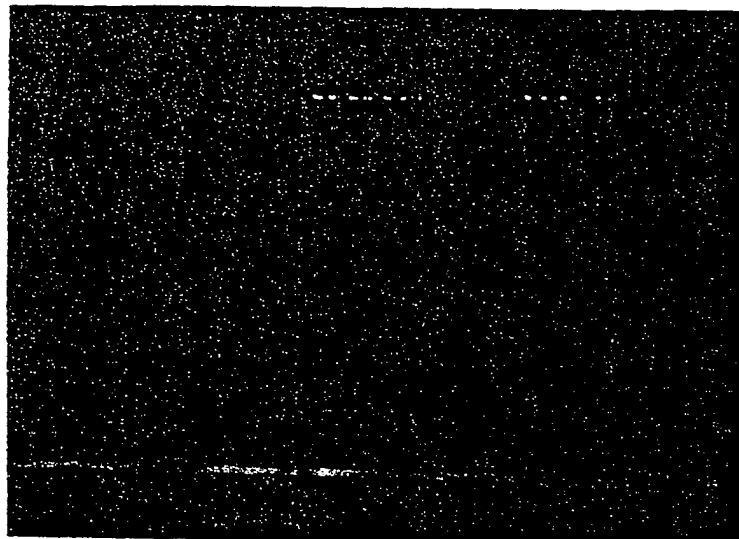
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin die magnetischen Silicateilchen mit silikatischem Oxid beschichtete Magneteilchen sind.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, worin die magnetischen Silicateilchen porös sind.

5. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, worin die magnetischen Silicateilchen nicht porös sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, worin das Medium ein chaotropes Salz umfasst.
7. Verfahren nach Anspruch 6, worin das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, worin die Konzentration des chaotropen Salzes in dem in Schritt (c) hergestellten Gemisch zwischen 0,1 und 7 M liegt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, worin das in Schritt (a) bereitgestellte DNA-Zielmaterial das Produkt einer Polymerasekettenreaktion ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, worin das DNA-Zielmaterial genomische DNA ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, worin das DNA-Zielmaterial Plasmid-DNA ist.
12. Verfahren nach Anspruch 10, das außerdem eine Analyse der eluierten genomischen DNA in einem DNA-Typisierungsverfahren umfasst.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 12, worin das Medium ein fester Träger ist, der das DNA-Zielmaterial enthält, und worin das DNA-Zielmaterial vor Schritt (c) vom festen Träger isoliert wird, indem der feste Träger mit einem ein chaotropes Salz umfassenden Gemisch kombiniert wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, worin der feste Träger ein Papier ist.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, worin das Gemisch auf eine Temperatur von etwa 60 °C bis etwa 100 °C erhitzt wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 15, das außerdem das Sequenzieren zumindest eines Teils des eluierten DNA-Zielmaterials umfasst.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 16, das außerdem einen Schritt des Waschens des Komplexes nach der Entfernung aus dem Medium und vor der Elution des DNA-Zielmaterials aus dem Komplex umfasst.
18. Verfahren nach Anspruch 17, worin der Komplex unter Verwendung einer einen Alkohol und ein Salz umfassenden Waschlösung gewaschen wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 18, worin das in Schritt (e) eluierte DNA-Zielmaterial mit Wasser eluiert wird.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



FIGUR 1

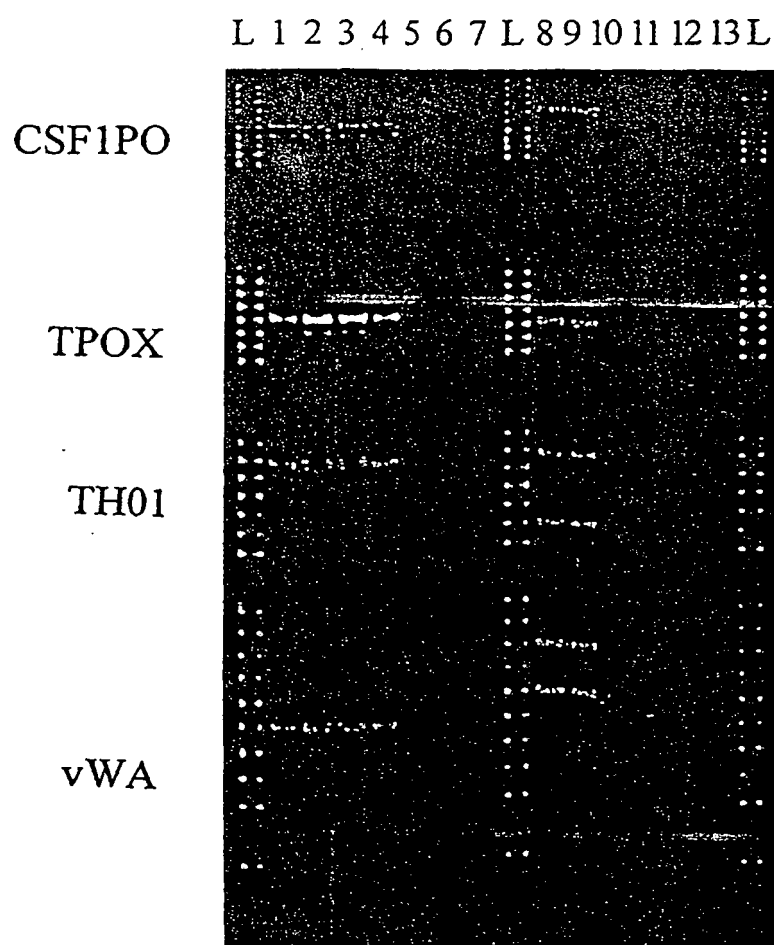
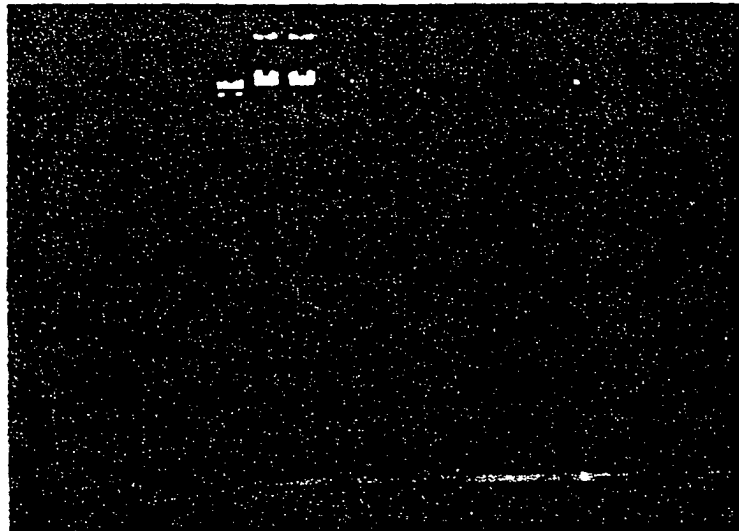


FIGURE 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



FIGUR 3