

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 501 194 A1 2006-07-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer:

A 2201/2004

(51) Int. Cl.⁸: **C12Q 1/00** (2006.01)

(22) Anmeldetag:

30.12.2004

C12Q 1/68 (2006.01)

(43) Veröffentlicht am:

15.07.2006

(73) Patentanmelder:

SCHLEDERER THOMAS DR.
A-1220 WIEN (AT)

(72) Erfinder:

SCHLEDERER THOMAS DR.
WIEN (AT)

(54) VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON ZELLEN UND VIREN

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von mindestens einer Zelle, insbesondere von einer eukaryotischen und prokaryotischen Zelle, oder eines Virus aus einer Probe umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer Probe,
- Inkontaktbringen der Probe mit ferromagnetischen Partikel, und
- Abtrennen der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension.

AT 501 194 A1 2006-07-15

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von mindestens einer Zelle, insbesondere von einer eukaryotischen und prokaryotischen Zelle, oder eines Virus aus einer Probe umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer Probe,
- Inkontaktbringen der Probe mit ferromagnetischen Partikel,
- und
- Abtrennen der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Zellen und Viren.

Die Isolierung von Zellen und Viren unterschiedlichster Art (z.B. Erythrozyten, Mikroorganismen) erfolgt in der Praxis in einer Vielzahl von verschiedenen Methoden, wobei der Großteil dieser Methoden auf eine Trennung aufgrund der physikalischen oder biologischen Eigenschaften der zu isolierenden Zellen, Zellfragmenten (z.B. Mikroorganismen, Mikroorganismenfragmenten) oder Viren abzielt (z.B. Zentrifugation, Anreicherung von Mikroorganismen und Viren in Anreicherungsmedien bzw. Zellkulturen). Die Entwicklung von magnetischen, insbesondere von superparamagnetischen Partikeln, die zur Isolierung von Zellen und Viren jeglicher Art aus biologischen Proben herangezogen werden können, führte zu einer Vereinfachung der Isolierungsmethoden, da die magnetischen Eigenschaften dazu verwendet werden können, an diesen Partikeln gebundene Zellen aus einer Flüssigkeit bzw. Suspension zu isolieren. Die dabei verwendeten Partikel werden mit spezifischen Bindungspartnern, die an der Oberfläche von Zellen befindliche Strukturen zu binden vermögen, funktionalisiert, wodurch die magnetischen Partikel eine hohe Spezifität gegenüber den zu isolierenden Zellen aufweisen. Derartige Bindungspartner können beispielsweise Antikörper oder Lektine sein, die Oberflächenepitope bzw. Kohlenhydratstrukturen binden können. Durch die Entwicklung von superparamagnetischen Partikeln, die eine hohe magnetische Suszeptibilität aufweisen und rasch die magnetischen Eigenschaften verlieren, sobald ein angelegtes Magnetfeld entfernt wird, konnte schließlich der Sprung zur wirtschaftlichen Nutzung derartiger Methoden erfolgen, da derartige Partikel bei Anlegen eines Feldes selbst magnetische Eigenschaften erlangen, wodurch eine stärkere magnetische Wirkung zwischen den einzelnen Partikeln und dem Magneten erfolgen kann.

In der US 4 910 148 wird die Verwendung von magnetisierbaren Partikeln zur Isolierung von Zellen aus einer biologischen Probe offenbart. Dabei wird zunächst ein Probenbehälter mit einer biologischen Flüssigkeit mit suspendierten, magnetisierbaren, funktionalisierten Partikeln in Kontakt gebracht und für eine definierte Zeit inkubiert. Um nach der Inkubation die an den magnetisierbaren Partikeln gebundenen Zellen zu isolieren, wird ein Magnetfeld an den Behälter mittels einer magnetischen Vor-

richtung aufgebaut und der Überstand der biologischen Flüssigkeit entfernt. Anschließend können die an der Wand des Behältnisses befindlichen magnetisierbaren Partikel weiterverarbeitet werden. Die in dieser Patentschrift offenbarten Partikel umfassen ein magnetisierbares Material und weisen daher selbst keine magnetischen Eigenschaften auf.

In der US 6 020 210 wird die Isolierung von biologischen Zellorganellen und anderen biologischen Materialien aus einer biologischen Probe beschrieben. Dabei wird eine Probe, enthaltend superparamagnetische Partikel, an denen sich das zu isolierende Material befindet, über eine magnetisierbare Säulenmatrix geführt, an der nach dem Aufbau eines Magnetfeldes die superparamagnetischen Partikel immobilisiert werden. Nachdem die restliche nicht an den Partikeln gebundene Probenflüssigkeit aus der Säule entfernt wurde, können die Partikel von der Säulenmatrix nach der Entfernung des Magnetfeldes eluiert werden.

Es ist somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dessen Hilfe Zellen, beispielsweise eukaryotische Zellen, wie Pilze, insbesondere Hefen, tierische und pflanzliche Zellen, und prokaryotische Zellen, wie Bakterien oder sonstige Mikroorganismen, aus komplexen Proben isoliert und gegebenenfalls bestimmt bzw. charakterisiert werden können.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von mindestens einer Zelle, insbesondere von einer eukaryotischen und prokaryotischen Zelle, oder eines Virus aus einer Probe umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer Probe,
 - Inkontaktbringen der Probe mit ferromagnetischen Partikeln, und
 - Abtrennen der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension.
- Vorzugsweise wird (werden) die auf den ferromagnetischen Partikeln gebundene(n) Zelle(n) oder Virus(-en) durch
- Inkontaktbringen der Partikel mit Zell- oder Virus-spezifischen Primern,
 - Unterwerfen der Partikel einer Nukleinsäureamplifikationstechnik und
 - qualitativen und/oder quantitativen Detektieren mindestens eines Nukleinsäureamplifikationsprodukts die Anwesenheit von Zellen oder Viren in der Probe bestimmt.

Unter dem Begriff „Zelle“ gemäß der vorliegenden Erfindung werden u.a. Mikroorganismen, eukaryotische und prokaryotische Zellen, insbesondere pflanzliche und tierische Zellen, Bakterien, Pilze und dergleichen verstanden, wobei auch Zellfragmente, wie beispielsweise Zellwände, Zellwandbestandteile (Peptidoglykan, S-Schichten, Lipopolysaccharid usw.), Zellmembrane, Zellmembranbestandteile (Transmembranproteine usw.) mit umfasst sein sollen. Vorzugsweise werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren vollständige Zellen isoliert. Vorzugsweise werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren pathogene, insbesondere human- und tierpathogene, Mikroorganismen, isoliert.

„Viren“ umfassen alle bekannten Viren, für die es möglich ist, Bindungspartner (z.B. Antikörper) zur Verfügung zu stellen, wobei die Viren vorzugsweise an deren Oberfläche zugängliche Epitope oder sonstige Bindungspartner aufweisen. Das erfindungsgemäße Verfahren weist aber vor allem im Hinblick auf Zellen, insbesondere eukaryotische und prokaryotische Zellen, die herausragenden Vorteile gegenüber dem Stand der Technik auf.

Vorzugsweise werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eukaryotische Zellen isoliert, die in biologischen Flüssigkeiten (z.B. Blut) bzw. Geweben vorkommen. Derartige Zellen sind beispielsweise T-Zellen, B-Zellen, Krebszellen und dgl., wobei in einem derartigen Fall die biologische Probe von einem Säuger (Mensch oder Tier) bereitgestellt wird.

Die "ferromagnetische" Eigenschaft eines Partikels ist dadurch charakterisiert, dass die elementaren magnetischen Momente der Partikel eine parallele Ordnung aufweisen. Ferromagnetische Ordnung bei Raumtemperatur zeigen die Metalle Eisen, Nickel und Kobalt sowie diverse Legierungen davon. Hierbei ist es unerheblich, ob die Metalle kristallin oder amorph vorliegen. Die magnetische Ordnung wird bei hohen Temperaturen aufgebrochen, die Ferromagneten werden dann paramagnetisch. Die Temperatur, ab der die ferromagnetische Ordnung verschwindet, wird als Curie-Temperatur T_c bezeichnet. Bei tiefen Temperaturen beobachtet man ferromagnetische Ordnung auch bei Stoffen, die bei Raumtemperatur paramagnetisch oder superparamagnetisch sind, wie z.B. bei den Lanthanoiden Gadolinium und Dysprosium. Ferromagnetische Eigenschaften einer Substanz bzw. eines Partikels, die von Partikelgröße, Material und Temperatur abhängen, können beispielsweise durch die Aufnahme von Hysteresekurven bestimmt

werden (siehe beispielsweise Abstract-Book "Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers", May 20-22, 2004 Lyon, France). Dadurch wird es ermöglicht im gewünschten Temperaturbereich (z.B. zwischen 4 und 90°C) die Partikelgröße und das Material der zu verwendenden Partikel in einfacher Weise zu bestimmen, so dass diese auch tatsächlich ferromagnetische Eigenschaften aufweisen. Erfindungswesentlich ist dabei immer, dass bei der Durchführung des Verfahrens die Partikel ferromagnetisch sind, dass also z.B. Temperatur, Größe der Teilchen und Natur der Teilchen (beispielsweise die exakte Zusammensetzung der Partikel) immer so eingestellt werden, dass die Partikel im Rahmen der Bindung an den Magneten ferromagnetische Eigenschaften aufweisen. Diese Einstellung ist für den Fachmann ohne Weiteres auf Basis seines Fachwissens und der hier beschriebenen Offenbarung für den individuellen Verfahrensansatz möglich.

In Molday RS und MacKenzie D (J Immunol Methods (1982), 52:353-367) wird die Markierung und Isolierung von Zellen mit ferromagnetischen Eisen-Dextran-Partikeln, deren Kern eine Größe von 15 nm aufweist, beschrieben. In Molday RS und Molday LL (FEBS Lett (1984), 170:232-238) werden rote Blutkörperchen mittels Dextran-SPIO ("superparamagnetic iron oxide")-Partikel markiert und durch Anlegen eines Hochgradientenfeldes getrennt. Derartige Dextran-SPIO Partikel wurden nach der Methode von Molday (1982) von Dodd et al. (Biophys J (1999), 76:103-109) gereinigt und als superparamagnetisch beschrieben. Die in Molday (1982) beschriebenen Partikel mit einer Kerngröße von 15 nm können bei einer Temperatur >273 K nicht ferromagnetisch sein.

Die Probe, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bereitgestellt wird, kann entweder direkt im Verfahren eingesetzt werden oder einer entsprechenden Probenvorbereitung unterzogen werden. Diese Probenvorbereitung hängt dabei jeweils von der verwendeten Probe ab. So kann beispielsweise eine Nahrungsmittelprobe zunächst homogenisiert oder suspendiert werden oder aber auch eine Blutprobe kann entsprechend in Fraktionen geteilt werden. Entscheidend bei der Probenvorbereitung ist jedenfalls, dass die Aufbereitungsschritte keinen Einfluss auf das spätere Bindungsverhalten des zu isolierenden Materials mit gegebenenfalls funktionalisierten Partikeln haben.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass sich besonders

ferromagnetische Partikel zur Isolierung von Zellen oder Viren besonders gut eignen. Ferromagnetische Partikel wirken selbst magnetisch und weisen dadurch eine hohe Affinität gegenüber anderen magnetisch wirkenden Materialien auf. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass beispielsweise in der US 6 020 210 darauf hingewiesen wird, dass sich ferromagnetische Partikel mit einer dauerhaften Magnetisierung nicht zur Isolierung von Zellen aus biologischen Proben eignen, da Suspensionen mit ferromagnetischen Partikeln zur Aggregation tendieren, zeigt die überraschende Wirkung ferromagnetischer Partikel bei Zellisolierungen auf. Die ferromagnetischen Partikel können erfindungsgemäß zur Gänze oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, nur teilweise aus mindestens einem ferromagnetischen Material bestehen, vorausgesetzt, dass die ferromagnetischen Eigenschaften des gesamten Partikels erhalten bleiben. Deshalb können die Zell-Partikel-Komplexe mit einem Magneten aus Suspensionen in kürzester Zeit isoliert werden, wohingegen mit superparamagnetischen Partikeln eine Isolierung sich langwierig gestaltet. Bei viskosen Proben (z.B. Käseschmelzen) beispielsweise kann eine Zell-Isolierung mit superparamagnetischen Partikeln in kurzer Zeit nicht erfolgen, wobei viele dieser Partikel in der Probenmatrix selbst haften bleiben würden.

Nach dem Inkontaktbringen der Probe mit den ferromagnetischen Partikeln wird die daraus resultierende Suspension für mindestens 1 Minute, mindestens 5 Minuten, mindestens 10 Minuten, inkubiert, wobei die bevorzugte Inkubationstemperatur maximal 80°C, vorzugsweise maximal 60°C, noch mehr bevorzugt maximal 40°C, insbesondere maximal 30°C, beträgt. Höhere Inkubationstemperaturen können beispielsweise für bei Raumtemperatur zähflüssige Proben verwendet werden (z.B. Käseproben), wobei aber berücksichtigt werden muss, dass die höhere Temperatur die Bindung der Zellen an die Partikel nicht negativ beeinflusst oder sogar verhindert. Dennoch wird Raumtemperatur (16° bis 26° C) als Inkubationstemperatur bevorzugt. Die Inkubationszeit hängt vor allem von der Konzentration der zu isolierenden Zellen oder Viren in der Probe und von der Bindungsstärke zwischen diesen und den gegebenenfalls funktionalisierten Partikeln ab. Daher kann die Inkubationszeit je nach Proben und Partikeleigenschaften variieren. Nach Ablauf der Inkubation werden die Partikel aus der Probenpartikelsuspension abgetrennt und gege-

benenfalls einer weiteren Bearbeitung unterzogen. Die Abtrennung der Partikel kann dabei, entweder aufgrund der magnetischen Eigenschaften dieser Partikel oder durch herkömmliche Methoden, sofern dies die Probe erlaubt, z.B. durch Filtration, Dekantation oder Zentrifugation erfolgen. Erfolgt die Abtrennung der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension nicht aufgrund der magnetischen Eigenschaften, weist das erfindungsgemäße Verfahren dennoch viele Vorteile auf, denn eine weitere Verarbeitung der Zellen bzw. der Viren, die an den Partikeln gebunden sind, wird um ein vielfaches erleichtert. So können beispielsweise die abzentrifugierten Partikel vom Probenüberstand durch einfaches Abpipettieren abgetrennt werden und anschließend in einer Vorrichtung wie in der US 5,770,459 oder in der US 5,744,367 beschrieben weiter untersucht werden.

Nach der Isolierung der Zellen bzw. der Viren können diese direkt am Partikel oder nach der Abtrennung von diesem mittels einer Nukleinsäureamplifikation analysiert werden. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Zell-/Viren-Partikel-Suspensionen direkt einer Nukleinsäureamplifikation unterworfen werden können, ohne dass die Anwesenheit von ferromagnetischen Partikeln diese Reaktion in irgendeiner Weise beeinträchtigt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Probe eine Nahrungsmittelprobe, Fäcesprobe, Blutprobe, Serumprobe, Probe biologischen Ursprungs, Umweltprobe oder industrielles Zwischen- oder Endprodukt.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass sich das erfindungsgemäße Verfahren für jegliche Art von Proben eignet, wobei ferner festgestellt wurde, dass dieses Verfahren vor allem bei sehr zähflüssigen und inhomogenen Proben einsetzbar ist. Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Isolieren von Zellen oder Viren aus Fäcesproben oder aus Käseschmelzen bzw. Käsesuspensionen, Milch und dergleichen verwendet werden. Industrielle Prozesse, wie z.B. die Produktion von Lebensmitteln, erfordern unter Umständen eine regelmäßige Kontrolle der Zwischen- und Endprodukte auf mögliche Kontaminationen.

Selbstverständlich kann das erfindungsgemäße Verfahren auch dazu verwendet werden Zellen und Viren aus einer Probe zu isolieren, um beispielsweise die Zellzahl bzw. den Virustiter in der Probe zu reduzieren. Somit wird erfindungsgemäß unter "isolieren" nicht nur ein analytischer bzw. präparativer Verfahrens-

schritt definiert.

Vorzugsweise umfassen die Partikel ein ferromagnetisches Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Eisen, insbesondere Magnetit und Maghemit, Eisenlegierungen, Nickel, Nickellegierungen, Kobalt, Kobaltlegierungen und Kombinationen davon. Je nach Zusammensetzung des Materials (von z.B. $\text{Fe}_{75}\text{Co}_{25}$ über Fe, zu Fe_3O_4 erhöht sich die magnetophoretische Mobilität bei gegebenem Partikeldurchmesser. Um den ferromagnetischen Zustand bei angesprochenen Temperaturen zu erhalten, müssen entsprechende Partikeldurchmesser gewählt werden, weil selbst Co- oder CoFe-Nanokristalle hervorragende magnetische Momente aufweisen, jedoch wegen ihrer Kleinheit superparamagnetisch sind. Eine umfassende Darstellung der Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen findet sich im Abstract-Book "Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers" (May 20-22, 2004 Lyon, France), insbesondere die Abhängigkeit der ferromagnetischen Temperatur von der Partikelgröße, die Mobilität, abhängig von Größe und Material, und der hydrodynamische Durchmesser.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die ferromagnetischen Partikel mit Silizium oder Siliziumverbindungen, Gold, Glas, Polysacchariden, insbesondere Dextran, Kunststoff, Proteinen, Nukleinsäuren oder Kombinationen davon beschichtet. Weitere Materialien für die Beschichtung bzw. Beschichtungsverfahren können im Abstract-Book "Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers" (May 20-22, 2004 Lyon, France) gefunden werden.

Eine mögliche Funktionalisierung der ferromagnetischen Partikel setzt voraus, dass die Oberfläche dieser Partikel derivatisiert werden kann. Ferromagnetische Materialien können direkt derivatisiert bzw. funktionalisiert werden oder aber vorzugsweise mit einer entsprechenden Oberfläche versehen, die beispielsweise aus Silizium oder Siliziumverbindungen, Kunststoff, Gold, Glas oder Polysacchariden, wie Dextran, besteht. Dabei kann das ferromagnetische Material den Kern der Partikel bilden oder in eine Matrix bestehend aus den oben angeführten Beschichtungsmaterialien eingebettet werden, wobei bei einer derartigen Ausführungsform auch mehrere ferromagnetische „Kerne“ in ein Partikel eingebracht werden können. Um schließlich funktionelle Gruppen an die Oberfläche der ferromagnetischen Partikel effizient zu binden, werden daran Carboxy-, Amin-,

Tosyl-, Epoxy-, Hydroxy- und Hydrazidgruppen, Streptavidin und His-tag gebunden, wie diese bereits bei paramagnetischen und superparamagnetischen Partikeln erfolgt.

Vorzugsweise weisen die Partikel einen Durchmesser von 50 nm bis 20 μ m, vorzugsweise von 200 nm bis 5 μ m, insbesondere von 400 nm bis 2,5 μ m auf. Vorzugsweise wird eine Partikelgröße gewählt, welche vom verwendeten magnetischen Material abhängt, so dass die magnetophoretische Mobilität möglichst hoch ist, aber das magnetische Moment noch klein genug ist, die gebildeten Aggregate durch Bewegen der Suspension, z.B. durch Pipettieren, Drehen am Rotamix oder im Ultraschallbad zumindest teilweise aufzulösen.

In diesem Zusammenhang wird unter „Durchmesser“ die größte Entfernung zwischen den Schnittpunkten eines Körpers mit einer Geraden, die durch den Körpermittelpunkt (Körperzentrum) verläuft.

Vorzugsweise sind die ferromagnetischen Partikel funktionalisiert, insbesondere mit mindestens einem Zell- oder Virenspezifischen Bindungspartner.

Die auf den Partikeln vorgesehenen Bindungspartner weisen eine Spezifität gegenüber den zu isolierenden Zellen bzw. Viren auf. Dabei ist jedenfalls darauf zu achten, dass der Bindungspartner spezifisch jene Teile erkennt, die auch tatsächlich in der Probe zugänglich sind. Hierzu eignen sich beispielsweise an der Zelloberfläche befindliche Liganden bzw. Epitope (z.B. Kohlehydratstrukturen, Antigene).

Vorzugsweise ist der mindestens eine Bindungspartner ein Antikörper oder Antikörperfragment, Protein A, Protein G, ein Lektin, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder eine Kombination davon.

Dennoch ist es aber durchaus möglich Zellen, die selbst magnetische Eigenschaften aufweisen, aus einer Probe direkt mit ferromagnetischen Beads zu isolieren, ohne dass diese funktionalisiert werden müssen. Zu derartigen Zellen zählen Mikroorganismen wie z.B. *Magnetospirillum magneticum* oder *Aquaspirillum magnetotacticum*.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann die Abtrennung mittels einer magnetischen Vorrichtung erfolgen.

Die Abtrennung der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension kann entweder durch, wie bereits zuvor erwähnt, Me-

thoden wie Zentrifugation oder durch das Anbringen eines magnetischen Feldes mit Hilfe einer magnetischen Vorrichtung erfolgen. Dabei wird zu dem gewünschten Zeitpunkt ein Magnetfeld an den Behälter angelegt, wodurch die ferromagnetischen Partikel an der Wand des Gefäßes immobilisiert werden. Anschließend kann der Überstand in einfacher Weise entfernt werden.

Vorzugsweise ist die magnetische Vorrichtung als Magnet, insbesondere als Elektro- oder Permanentmagnet, ausgebildet.

Die Verwendung eines Elektromagneten zur Abtrennung der Partikel weist vor allem den Vorteil auf, dass die Stärke des Magnetfeldes durch das Anlegen eines Stromflusses beeinflusst werden kann. Dadurch wird es ermöglicht, den Elektromagneten dauerhaft an eine Vorrichtung (z.B. Behälter, Schlauch) anzubringen und das Magnetfeld je nach Bedarf zu steuern. Im Gegensatz dazu ist das Magnetfeld gänzlich unabhängig vom Vorhandensein eines Stromflusses, wodurch aber zur Variation der Magnetfeld-Stärke der Magnet selbst entfernt werden muss. Für Einzelproben können beispielsweise Elektromagneten, für Automaten mit hohem Probendurchsatz Permanentmagneten, Anwendung finden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch dazu verwendet werden, Zellen oder Viren zunächst aus einer Probe zu isolieren, um diese dann anschließend in einem Detektionsschritt zu detektieren und gegebenenfalls deren Konzentration in der Probe zu bestimmen. Auch hierbei wird zunächst die Probe mit funktionalisierten ferromagnetischen Partikeln in Kontakt gebracht. Dadurch wird es ermöglicht, dass die so isolierenden Zellen oder Viren an diese Partikel immobilisiert werden können. Im Anschluss an diesen Bindungsschritt werden die Partikel aus der Probepartikelsuspension abgetrennt, wobei eine Abtrennung durch Methoden wie Zentrifugation oder Filtration erfolgen kann oder aber durch das Anlegen eines magnetischen Feldes. Um schließlich die vorhandenen Zellen bzw. Viren qualitativ und quantitativ zu bestimmen, werden die Partikel, an denen sich die Zellen oder Viren bzw. Fragmente davon befinden, mit entsprechenden spezifischen Primern versetzt. Nach dem Durchführen einer Nukleinsäureamplifikation wird gegebenenfalls qualitativ und/oder quantitativ die Anwesenheit von Zellen oder Viren in der Probe durch die Detektion mindestens eines Amplifikationsprodukts bestimmt. Ein (oder mehrere) durch die Nukleinsäureamplifikationstechnik erzeugtes, für eine Zelle bzw. einen Virus spezifisches, Frag-

ment kann durch bekannte Verfahren, wie z.B. Southern-Blot, Gel-Elektrophorese (mit Silber- oder Coomassie-Färbung), Photometrie, bestimmt werden.

Die in diesem Verfahren zu verwendenden von Zell- oder Viren-spezifischen Primer können beispielsweise aus bereits bekannten Nukleinsäuredaten abgeleitet werden.

Vorzugsweise werden zwischen der Abtrennung der Partikel und dem Inkontaktbringen der Partikel mit Zell- oder Viren-spezifischen Primern die an den Partikeln gebundenen Zellen zumindest teilweise lysiert werden.

Durch das Lysieren der an den Partikeln gebundenen Zellen wird die in diesen Zellen vorhandene Nukleinsäuren (u.a. DNA, RNA, mRNA) den Primern zugänglich gemacht. Die Lyse der Zellen erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Methoden, insbesondere durch einen Hitzeschock (z.B. 95°C) oder durch chemische bzw. biochemische Reagenzien, wie z.B. Lysozym. Um mögliche Inhibitoren oder Enzyme, insbesondere Proteasen und Restriktionsenzyme, die die Nukleinsäureamplifikation stören könnten, zu entfernen, können die Partikel nach deren Abtrennung mit entsprechenden Lösungen (z.B. Guanidinthiocyanat umfassende Lösungen) behandelt werden.

Vorzugsweise ist die Nukleinsäureamplifikationstechnik eine Kettenreaktionstechnik (PCR-Technik), wobei diese ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Echtzeit PCR, insbesondere TaqMan PCR (mit Sybr Green markierte Primer/Sonden), verschachtelte PCR („nested PCR“), inverser PCR, Multiplex PCR, asymmetrische PCR, reverse Transkriptase PCR und Kombinationen davon, ist.

Im Prinzip können alle dem Fachmann bekannten Nukleinsäureamplifikationstechniken erfindungsgemäß verwendet werden. Sollte jedoch auch eine quantitative Aussage über Zellen bzw. Viren in den Proben getroffen werden, eignen sich besonders gut Echtzeit-PCR-Techniken (z.B. TaqMan-PCR). Bei derartigen Techniken, kann bereits im Zuge der PCR eine Aussage getroffen werden, ob und in welcher Konzentration ein spezifisches Fragment, welches durch die Anlagerung einer fluoreszierenden Sonde detektiert wird, in der Probe vorhanden ist.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können vorzugsweise pathogene Zellen, insbesondere pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Mykobakterien, und Viren in einer Probe bestimmt werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die

Verwendung von zumindest teilweise ferromagnetischen Partikeln, die gegebenenfalls funktionalisiert sind, zur Isolierung von Zellen oder Viren.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von ferromagnetischen Partikeln, die gegebenenfalls funktionalisiert sind, zur kombinierten Isolierung und Bestimmung von Zellen oder Viren.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kit zur kombinierten Isolierung und Bestimmung von Zellen oder Viren in einer Probe umfassend

- funktionalisierte oder funktionalisierbare ferromagnetische Partikel und
- Zell- oder Viren-spezifische Primer.

Ein erfindungsgemäßer Kit kann sowohl funktionalisierte als auch funktionalisierbare ferromagnetische Partikel umfassen. Durch das Bereitstellen von funktionalisierbaren ferromagnetischen Partikeln, kann der Benützer dieses Kits beliebige Bindungspartner auf die Partikel aufbringen. Beispielsweise weisen die zu funktionalisierenden Partikel Epoxy-Gruppen an der Oberfläche auf, die direkt mit Aminogruppen eines Antikörpers reagieren können, um diesen dadurch an den Partikel zu binden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolation und Detektion von Mycobacterium paratuberculosis, durch die Verwendung eines Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung.

Dabei werden zunächst funktionalisierte ferromagnetische Partikel, die mit M. paratuberculosis zu binden vermögen, mit einer Probe in Kontakt gebracht und isoliert. Der isolierte Zell-Partikel-Komplex wird anschließend direkt oder nach dem Lysieren der Zellen an den Partikeln mit spezifischen Primern versetzt (z.B. P.H. Vary, Journal of Clinical Microbiology (1990) 933-937). Vorzugsweise werden dabei folgenden Primer eingesetzt: forward Primer: MP139U24 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3'; reverse Primer: MP 221L22 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAAC-3', MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3'; Sonde für real time PCR: MP204L17: 5'-CGTCATTGTCCAGATCA-3', 5'-TCATTGTCCAGATCA-3'.

Die Erfindung wird ferner durch die folgenden Figuren und das folgende Beispiel exemplarisch beschrieben, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Figur 1 zeigt ein Agarose-Gel, auf dem 10µl PCR-Amplikon von

PCR's mit den aus Punkt 4 (Beispiel) resultierenden Partikeln (nur gelagert 040813-2, aktiviert 040813-1 und beschichtet 040811-1) durchgeführt wurden.

Figur 2 zeigt ein Agarose-Gel: 10µl des Amplikons werden am Gel analysiert, wobei eine spezifische Bande in beiden Ansätzen zu sehen ist: Spur 1 ist Isolierung wie unter Punkt 4, Spur 3 wie in Punkt 5 beschrieben; für Spur 2 und Spur 4 wurden die Partikel wie in Punkt 4 und 5 gewaschen, allerdings war die Ausgangsmilch 1:10 mit Cell-Lyse-Puffer verdünnt.

Figur 3 zeigt ein Amplifikations-Plot einer Echtzeit-PCR mit SybrGreen (Punkt 11, Beispiel).

Beispiel: Isolierung, Nachweis und Quantifizierung von *Mycobacterium paratuberculosis*

1. Allgemeine Reagenzien

TPBS: 8g NaCl (Sigma, #S9625), 1,15g Na₂HPO₄·x2H₂O (Merck, #106580), 0,2g KCl (Merck, #104936), 0,2g KH₂PO₄ (Merck, #104873), 100µl Tween20 (Merck, #822184) wurden in Wasser auf 1l aufgefüllt.

MES-Puffer: 9,76g MES (Sigma, #M3023) mit 10N NaOH auf pH=5,5 stellen und auf 1l auffüllen.

MOPS-Puffer: 5,23g MOPS (Sigma, #M1254) mit 10N NaOH auf pH=7,5 stellen und auf 1l auffüllen.

Denaturierungspuffer: 560mM NaOH in Wasser.

Hybridisierungspuffer: 0,1N NaH₂PO₄ x H₂O in Wasser.

CT-Waschpuffer: 20mM Tris, 150mM NaCl in Wasser pH=7,4.

Inhibitor-Removal-Puffer: 2,5M Guanidinthiocyanat, 10mM Tris, 1mM EDTA in Wasser, pH=7,0 mit Ethanol auf 70% Ethanol.

Cell-Lysis-Puffer: 8g NaCl , 1,15g Na₂HPO₄·x2H₂O , 0,2g KCl , 0,2g KH₂PO₄ , 100µl Tween20, 0,508g MgCl₂·x6H₂O, 0,788g TrisHCl, 0,605g TrisBase, 5ml Triton X-100, 54,75 Saccharose werden mit dH₂O auf 500ml aufgefüllt.

2. Ferromagnetische Partikel

SIMAG-MP/Carboxyl (Chemicell, Berlin), wässrige Dispersion von magnetischem Silikat, Kern ist Magnetit, Matrix ist nicht poröses Silikat, Größe 1µm, Oberfläche ~25m²/g, ~1,5 x 10⁸ Partikel/g, Dichte ~2,25g/cm³, Magnetisierung ist ferromagnetisch, Carboxyl ist funktionelle Gruppe mit 12 Atomen Spacer, Carboxylierungsgrad ist 350µmol COOH/g, Lagerpuffer ist ddH₂O.

2.1. Partikel-Lagerung

0,8 ml Ferromagnetische Partikel (ChemiCell, SIMAG-MP/TCL)

Suspension werden am Magneten (MagnetOn 4T, Aureon Biosystems, #M010104) abgeschieden, mit 4ml StabilZyme AP (Surmodics, SA01-100) gewaschen, in 20 ml StabilZyme aufgenommen (Endkonzentration von 10mg Partikel/mL) und im Kühlschrank gelagert.

2.2. Partikel-Aktivierung

0,8 ml Ferromagnetische Partikel (ChemiCell, SIMAG-MP/TCL) Suspension werden am Magneten (MagnetOn 4T, Aureon Biosystems, #M010104) abgeschieden, in 1ml MES resuspendiert, am Magneten der Überstand abgenommen und mit 25mg Carbodiimid (Sigma, #E7750) in 1ml MES-Puffer 15 Minuten am Rotamix (RM1 bei 15rpm) aktiviert. Die Partikel werden mit 1ml MOPS-Puffer gewaschen und mit 900µl MOPS-Puffer 2 Stunden am RM1 gedreht. Danach werden 4ml StabilZyme AP (Surmodics, SA01-100) zugesetzt und über Nacht am RM1 gedreht. Durch Abscheiden der Partikel am Magneten, Resuspendieren und erneutes Abscheiden werden die Partikel 2x mit 1ml TPBS und 1x mit 1ml StabilZyme gewaschen. Zuletzt werden die Partikel in 20 ml StabilZyme aufgenommen (Endkonzentration von 10mg Partikel/mL) und im Kühlschrank gelagert.

2.3. Antikörperbeschichtung

0,8 ml Ferromagnetische Partikel (ChemiCell, SIMAG-MP/TCL) Suspension werden am Magneten (MagnetOn 4T, Aureon Biosystems, #M010104) abgeschieden, in 1ml MES resuspendiert, am Magneten der Überstand abgenommen und mit 25mg Carbodiimid (Sigma, #E7750) in 1ml MES-Puffer 15 Minuten am Rotamix (RM1 bei 15rpm) aktiviert. Die Partikel werden mit 1ml MOPS-Puffer gewaschen und mit 900µl Antikörper in MOPS-Puffer (QED Bioscience, 18101-18104) 2 Stunden am RM1 gedreht. Danach werden 4ml StabilZyme AP (Surmodics, SA01-100) zugesetzt und über Nacht am RM1 gedreht. Durch Abscheiden der Partikel am Magneten, Resuspendieren und erneutes Abscheiden werden die Partikel 2x mit 1ml TPBS und 1x mit 1ml StabilZyme gewaschen. Zuletzt werden die Partikel in 20 ml StabilZyme aufgenommen (Endkonzentration von 10mg Partikel/mL) und im Kühlschrank gelagert.

3. Herstellung der Microplatten für Hybridisierungsassay

Streptavidin von Roche wird in Carbonat-Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 2µg/ml verdünnt und die Nöpfchen von Weißes MaxiSorp Microplatten (Nunc, Art-N°437-591) über Nacht bei 4°C mit 100µl beschichtet. Die Microplatten werden 4x mit TPBS gewaschen und 100µl der Probe Bio-TCATTGTCCAGATCA in TPBS (30pmol/mL) über Nacht bei 4°C gebunden. Nach 4x Waschen mit

TPBS werden die Platten getrocknet und eingeschweißt.

4. Isolierung von M. paratuberculosis aus Milch

1ml einer Suspension von M. paratuberculosis in Rohmilch (Andiatec, Stuttgart) wird mit 10µl einer Partikel-Suspension versetzt und 30 Minuten unter zeitweiligem Schütteln inkubiert. Danach werden die Partikel am Magneten abgeschieden und 4 Mal mit CT-Waschlösung durch jeweiliges Abscheiden am Magneten gewaschen. Der Partikel-Bakterien-Komplex steht nun für weitere Analysen zur Verfügung.

5. Isolierung von M. paratuberculosis DNA aus Milch mittels Inhibitor-Removal-Puffer

1ml einer Suspension von M. paratuberculosis in Rohmilch (Andiatec, Stuttgart) wird mit 10µl der Partikel-Suspension versetzt und 30 Minuten unter zeitweiligem Schütteln inkubiert. Danach werden die Partikel am Magneten abgeschieden und 2 Mal mit Inhibitor-Removal-Puffer, 1 Mal mit CT-Waschlösung/70% EtOH und 1 Mal mit CT-Waschlösung durch jeweiliges Abscheiden am Magneten gewaschen. Der Partikel-DNA-Komplex steht nun für weitere Analysen zur Verfügung.

6. Herstellung von M. paratuberculosis DNA aus Milch

1ml einer Suspension von M. paratuberculosis in Rohmilch (Andiatec, Stuttgart) wird mit 10µl der Partikel-Suspension versetzt und 30 Minuten unter zeitweiligem Schütteln inkubiert. Danach werden die Partikel am Magneten abgeschieden und 4 Mal mit CT-Waschlösung durch jeweiliges Abscheiden am Magneten gewaschen. Der Partikel-Bakterien-Komplex wird in 50µl dest. Wasser resuspendiert, 10 min. bei 95°C erhitzt, danach die Partikel am Magneten abgeschieden und der Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen.

7. Herstellung von hochreiner M. paratuberculosis DNA

1ml einer Suspension von M. paratuberculosis in Rohmilch (Andiatec, Stuttgart) wird mit 10µl der Partikel-Suspension versetzt und 30 Minuten unter zeitweiligem Schütteln inkubiert. Danach werden die Partikel am Magneten abgeschieden und 2 Mal mit Inhibitor-Removal-Puffer, 1 Mal mit CT-Waschlösung/70% EtOH und 1 Mal mit CT-Waschlösung durch jeweiliges Abscheiden am Magneten gewaschen. Der Partikel-DNA-Komplex wird in 50µl dest. Wasser resuspendiert, 10 min. bei 95°C erhitzt, danach die Partikel am Magneten abgeschieden und der Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen.

8. PCR mit Partikel

Die aus Punkt 4 resultierenden Partikel (nur gelagert 040813-2, aktiviert 040813-1 und beschichtet 040811-1) werden mit 50µl PCR Amplifizierungsmix (Andiatec, Stuttgart) versetzt und lt. Angaben des Herstellers amplifiziert. 10µl des Amplikons werden am Gel analysiert, wobei eine spezifische Bande in allen drei Ansätzen zu sehen war (Figur 1).

9. PCR mit Bakterien-Partikel-Komplex und Bakterien-DNA-Komplex

Die aus Punkt 4 bzw. Punkt 5 resultierenden Partikel wurden mit 50µl PCR Amplifizierungsmix (Andiatec, Stuttgart) versetzt und lt. Angaben des Herstellers amplifiziert. 10µl des Amplikons werden am Gel analysiert, wobei eine spezifische Bande in beiden Ansätzen zu sehen ist. Spur 1 ist Isolierung wie unter Punkt 4, Spur 3 wie in Punkt 5 beschrieben. Für Spur 2 und Spur 4 wurden die Partikel wie in Punkt 4 und 5 gewaschen allerdings war die Ausgangsmilch 1:10 mit Cell-Lyse-Puffer verdünnt (Figur 2).

10. Asymmetrische PCR mit DNA

Der Forward Primer wurde aus der Literatur direkt übernommen (P.H. Vary, Journal of Clinical Microbiology (1990) 933-937). Dieser Primer wird als MP139U24 (5'-CCGCTAATTGAGAGATG-CGATTGG-3') bezeichnet. Da jedoch das in diesem Dokument beschriebene Primer-Paar eine nicht ausreichende Spezifität aufwies (aufgrund von Clustal X (1.81) Multiple Sequence Alignment-Analysen), wurde der Reverse Primer an eine andere Stelle gesetzt. Dies hat den Vorteil, dass das Amplifizierungsprodukt sehr kurz wurde (104bp), bei 95°C nur eine Sekunde denaturiert werden musste und damit die normale wie Real-time PCR sehr schnell und effizient wurde. Zudem kann eine Zweistufen-PCR durchgeführt werden, weil die Primer eine hohe Schmelztemperatur aufwiesen.

Im Anschluss an den Reverse Primer wurde die Probe konzipiert, um den kooperativen Effekt an hybridisierter DNA zu nutzen, falls alle Basenpaare entsprechen. Diese Kumulierung der Unterschiede in den Sequenzen der Capture Probe plus dem sequenzspezifischen Primer sorgt für sehr gute Spezifität der PCR.

Es wurde festgestellt, dass die Reverse Primer MP 221L22 (5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAAC-3') und MP219L24 (5'-GTGCCACAACCACCT-CCGTAACCG-3') gemeinsam mit dem oben angeführten Forward Primer und den Sonden MP204L17 (5'-CGTCATTGTCCAGATCA) und 5'-TCATTGTC-

CAGATCA die besten Ergebnisse zeigten.

1µl einer Verdünnungsreihe der aus Punkt 6 isolierten DNA-Lösung wurde mit 4pmol/20µl mit dem Fluorescein gelabeltem Primer MP139U24: 5'-F-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3' und 2pmol/20µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix von BioRad am Biometra TGradient Zyklus in Gesamtvolumen von 20µl asymmetrisch amplifiziert.

PCR-Parameter:

Zyklus 1	Wiederholungen	1	3 min	95°C
Zyklus 2	Wiederholungen	50	1 sek	95°C
			30 sek	65°C
Zyklus 3	Wiederholungen	1	-	4°C

5µl der Amplikons wurden entweder 10 min mit 10µl Denaturierungspuffer inkubiert und mit 95µl Hybridisierungspuffer auf die Platte aufgetragen. Alternativ werden 5µl Amplikon mit 95µl TPBS auf die Microplatte aufgetragen. 15min bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubieren, 4x mit TPBS waschen, 100µl anti-Fluorescein-AP (Roche) 1:10.000 in StabilZyme bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubieren, 4x mit TPBS waschen, 100µl LumiPhos Plus (Lumigen) 15min bei Raumtemperatur inkubieren und am Luminometer (Mediators PhL) mit 1 sek Integrationszeit messen.

Signal (RLU)	Mit Denaturierung	Ohne Denaturierung
Negativ-Kontrolle	0,838	0,761
10 ⁻¹⁰ Verdünnung	1,002	0,935
10 ⁻⁹ Verdünnung	122,144	153,412
10 ⁻⁸ Verdünnung	152,140	174,279
10 ⁻⁷ Verdünnung	124,972	161,843

11. Echtzeit-PCR mit SybrGreen und DNA Lösung

1µl von Verdünnungen der aus Punkt 6 isolierten DNA-Lösung wurde mit 4pmol/20µl mit dem Primer MP139U24: 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3' und 4pmol/20µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix von Bio-

Rad am iZyklusr in 20µl Gesamtvolumen amplifiziert.

PCR-Parameter (Ergebnisse in Figur 3):

Zyklus 1	Wiederholungen	1	3 min	95°C	A3	Negativ-Kontrolle
Zyklus 2	Wiederholungen	50	1 sek	95°C	A4	Negativ-Kontrolle
			30 sek	67°C	A5	10 ⁻¹⁰ Verdünnung
Zyklus 3	Wiederholungen	1	-	25°C	A6	10 ⁻⁹ Verdünnung

12. Echtzeit-PCR mit Sybr Green mit und ohne Partikel

1µl der 10⁻⁷ Verdünnung aus Punkt 6 isolierten DNA-Lösung wurde mit 4pmol/20µl mit dem Primer MP139U24: 5'-CCGCTAATT-GAGAGATGCGATTGG-3' und 4pmol/20µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix und 100µg ferromagnetischen Partikel am iZyklusr mit 20µl Gesamtvolumen amplifiziert. Die Partikel wurden vorher mit Milch inkubiert und wie unter Punkt 4 und 5 angegeben gewaschen.

PCR-Parameter:

Zyklus 1	Wiederholungen	1	3 min	95°C
Zyklus 2	Wiederholungen	50	1 sek	95°C
			30 sek	65°C
Zyklus 3	Wiederholungen	1	Hold	4°C

Ergebnisse (Schwellenwertzyklus - „threshold cycle“):

	Ohne Partikel Zusatz	Mit Partikel Zusatz
Punkt 4	26,4	26,7
Punkt 5	25,7	26,1

13. Echtzeit-PCR mit SybrGreen und DNA Lösung

1µl eine Verdünnungsreihe der aus Punkt 6 isolierten DNA-Lösung wurde mit 4pmol/20µl MP139U24: 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3' und 4pmol/20µl mit dem Primer MP219L24: 5'-GTGCCACAACCACCTCCGTAACCG-3' in 1x SybrGreen Supermix von BioRad am iZyklusr mit 20µl Gesamtvolumen amplifiziert und real-time analysiert.

Um die Robustheit zu demonstrieren, wurde zudem zur Probe

Hering Sperma DNA zugesetzt.

PCR-Parameter:

Zyklus 1	Wiederholungen	1	3 min	95°C	
Zyklus 2	Wiederholungen	70	1 sek	95°C	
			30 sek	70°C	Verminderung der Temperatur bei jeder 7. Wiederholung innerhalb des Zyklus um 1°C
Zyklus 3	Wiederholungen	1	-	25°C	

Ergebnisse (Schwellenwertzyklus - „threshold cycle“):

	Ohne DNA Zusatz	Mit 200ng Hering Sperma DNA
10 ⁻¹⁰ Verdünnung	34,4	40,8
10 ⁻⁹ Verdünnung	31,9	35,8
10 ⁻⁸ Verdünnung	28,5	32,2
10 ⁻⁷ Verdünnung	25,5	29,2

Die Schmelzkurve ergab eine Schmelztemperatur von 79°C für das Produkt der Internen Kontrolle und 86°C für das Produkt der M. paratuberculosis PCR.

14. Vergleich der Geschwindigkeit des Fangens ferromagnetischer Partikel mit superparamagnetischen Partikeln

20µg von Alkalischer Phosphatase beschichteten Partikeln (Streptavidin-Partikel mit Überschuss biotin-AP inkubiert und gewaschen mit TPBS) wurden in 1 ml TPBS in 1,5ml Eppendorf Cups suspendiert und mit 2 Sekunden Inkubationszeit mit dem Aureon Separation Pen (M020101, Aureon, Wien) aus der Suspension gewonnen und danach in 1ml TPBS resuspendiert. 10µl der Ausgangssuspension sowie der isolierten Beads wurden in einer weißen Microplatte nach 15 Minuten Inkubationszeit mit 100µl LumiPhos Plus (Lumigen, USA) am mediators PhL mit 1 Sekunde Integrationszeit gemessen.

RLU	Rest-Suspension	Isolierte Partikel aus der Suspension	Prozent isoliert
Ferromagnetisch (SAB031104-1)	2,073	20,727	90,9
Aureon A-Beads (SAB030320-1)	4347	1730	28,5
Dynabeads (112.06)	4880	1402	22,3

15. Diskussion

Entgegen der Vorbehalte aus der Literatur wurden ferromagnetische Partikel für die Isolierung von Zellen verwendet und überraschender Weise wurde festgestellt, dass derartige Partikel sehr wohl für die Zellisolierung geeignet sind. Dies ist deshalb von großer Bedeutung, weil nur ferromagnetische Partikel in akzeptabler Zeit aus schwierigem Probenmaterial, wie Rohmilch, Kot oder Proben mit hohem Feststoffanteil, mit einem Magneten aus der Probensuspension an die Gefäßwand abgeschieden werden können.

Im Beispiel wurden ferromagnetische Partikel verwendet, die unspezifisch Bakterien binden können, sowie ferromagnetische Partikel, die mit einem Antikörper funktionalisiert sind. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Partikel-Zellkomplex direkt in der PCR verwendet werden kann. Um Substanzen, die die PCR negativ beeinflussen bzw. die Ergebnisse verfälschen könnten, zu entfernen, wurde ein Inhibitor-Entfernungs Puffer verwendet und gezeigt, dass die DNA in diesem Fall an den Partikeln gebunden bleibt und der DNA-Partikel-Komplex in der PCR verwendet werden kann.

Um die Auswertung der PCR zu vereinfachen, wurde gezeigt, dass das Produkt einer asymmetrischen PCR ohne Denaturierung hybridisiert werden kann.

Die Echtzeit-PCR ist heute für Quantifizierungen sehr wichtig, wobei gezeigt werden konnte, dass ferromagnetische Partikel in derartigen Anwendungen eingesetzt werden können.

Ferner konnte somit eine hochsensitive und hochspezifische PCR zum Nachweis von *M. paratuberculosis* DNA entwickelt und gezeigt werden, dass auch nach 80 Durchläufen keine Primerdimere auftreten. Die Spezifität wurde weiters mit denselben Primern in

027312

- 20 -

einer Touch-Down-PCR erhöht.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Isolierung von mindestens einer Zelle, insbesondere von einer eukaryotischen und prokaryotischen Zelle, oder eines Virus aus einer Probe umfassend die Schritte:
 - Bereitstellen einer Probe,
 - Inkontaktbringen der Probe mit ferromagnetischen Partikeln, und
 - Abtrennen der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die auf den ferromagnetischen Partikeln gebundene(n) Zelle(n) oder Virus(-en) durch
 - Inkontaktbringen der Partikel mit Zell- oder Virus-spezifischen Primern,
 - Unterwerfen der Partikel einer Nukleinsäureamplifikationstechnik und
 - qualitativen und/oder quantitativen Detektieren mindestens eines Nukleinsäureamplifikationsprodukts die Anwesenheit von Zellen oder Viren in der Probe bestimmt wird (werden).
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Nahrungsmittelprobe, Fäcesprobe, Blutprobe, Serumprobe, Probe biologischen Ursprungs, Umweltprobe oder industrielles Zwischen- oder Endprodukt ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel ein ferromagnetisches Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Eisen, insbesondere Magnetit und Maghemit, Eisenlegierungen, Nickel, Nickellegierungen, Kobalt, Kobaltlegierungen und Kombinationen davon, umfassen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die ferromagnetische Partikel mit Silizium oder Siliziumverbindungen, Gold, Glas, Polysacchariden, insbesondere Dextran, Kunststoff oder Kombinationen davon beschichtet sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel einen Durchmesser von 50nm bis 20µm, vorzugsweise von 200nm bis 5µm, insbesondere von 400nm bis

- 2,5µm, aufweisen.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die ferromagnetischen Partikel funktionalisiert sind.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die ferromagnetischen Partikel mit mindestens einem Zell- oder Virus-spezifischen Bindungspartner funktionalisiert sind.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Bindungspartner ein Antikörper oder Antikörperfragment, Protein A, Protein G, ein Lektin, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder eine Kombinationen davon ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung mittels einer magnetischen Vorrichtung erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die magnetische Vorrichtung als Magnet, insbesondere als Elektro- oder Permanentmagnet, ausgebildet ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Abtrennung der Partikel und dem Inkontaktbringen der Partikel mit Zell- oder Virus-spezifischen Primern die an den Partikeln gebundenen Zellen oder Viren zumindest teilweise lysiert werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäureamplifikationstechnik eine Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR-Technik) ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR-Technik), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Echtzeit PCR, insbesondere TaqMan PCR, verschachtelte PCR („nested PCR“), inverser PCR, Multiplex PCR, asymmetrische PCR, reverse Transkriptase PCR und Kombinationen davon, ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mykobakterien, Listerien, Salmonellen, Campylobacter, und Kombinationen davon, sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Viren, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Enteroviren, CMV, Hepatitis, HIV und Kombinationen davon, sind.
17. Verwendung von zumindest teilweise ferromagnetischen, gegebenenfalls funktionalisierten, Partikeln zur Isolierung von Zellen oder Viren.
18. Verwendung von zumindest teilweise ferromagnetischen, gegebenenfalls funktionalisierten, Partikeln zur kombinierten Isolierung und Bestimmung von Zellen oder Viren.
19. Kit zur kombinierten Isolierung und Bestimmung von Zellen oder Viren in einer Probe umfassend
- ferromagnetische, gegebenenfalls funktionalisierte oder funktionalisierbare, Partikel und
 - Zell- oder Virus-spezifische Primer.

027312

1/3

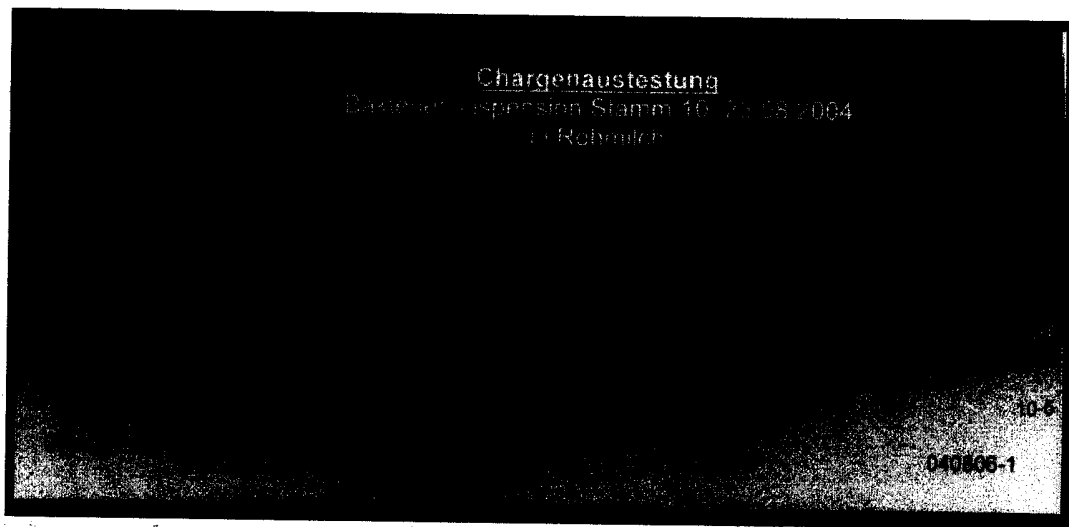


Fig. 1

027312

2/3

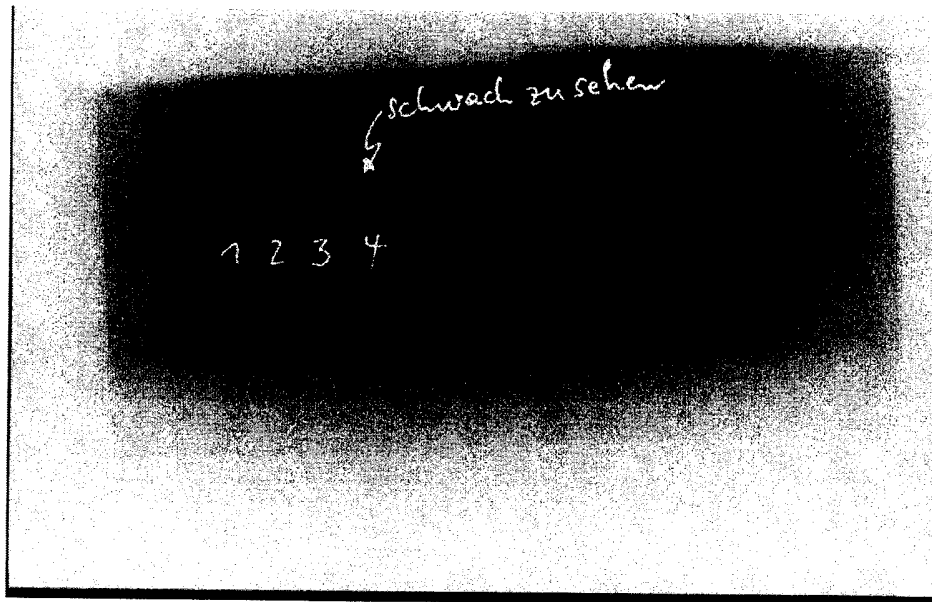


Fig. 2

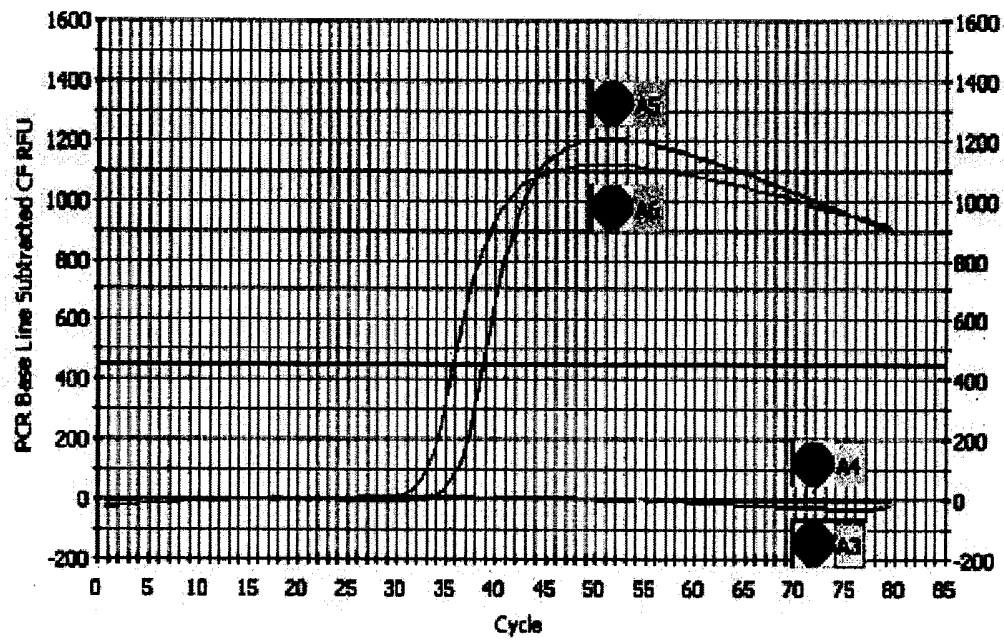


Fig. 3

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Isolierung von mindestens einer Zelle, insbesondere einer eukaryotischen oder prokaryotischen Zelle, oder eines Virus aus einer komplexen Probe, insbesondere einer Nahrungsmittelprobe, einer Fäcesprobe oder einer Umweltprobe, umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer Probe,
- Inkontaktbringen der Probe mit ferromagnetischen Partikeln, wobei die Zelle oder das Virus an die Partikel gebunden wird, und
- magnetisches Abtrennen der Partikel aus der Proben-Partikel-Suspension.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die auf den ferromagnetischen Partikeln gebundene(n) Zelle(n) oder Virus(-en) durch

- Inkontaktbringen der Partikel mit Zell- oder Virus-spezifischen Primern,
- Unterwerfen der Partikel einer Nukleinsäureamplifikationstechnik und
- qualitativen und/oder quantitativen Detektieren mindestens eines Nukleinsäureamplifikationsprodukts die Anwesenheit von Zellen oder Viren in der Probe bestimmt wird (werden).

3. Verfahren nach der Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel ein ferromagnetisches Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Eisen, insbesondere Magnetit und Maghemit, Eisenlegierungen, Nickel, Nickellegierungen, Kobalt, Kobaltlegierungen und Kombinationen davon, umfassen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die ferromagnetische Partikel mit Silizium oder Siliziumverbindungen, Gold, Glas, Polysacchariden, insbesondere Dextran, Kunststoff oder Kombinationen davon beschichtet sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel einen Durchmesser von 50nm bis 20µm, vorzugsweise von 200nm bis 5µm, insbesondere von 400nm bis 2,5µm, aufweisen.

NACHGEREICHT

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die ferromagnetischen Partikel funktionalisiert sind.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die ferromagnetischen Partikel mit mindestens einem Zell- oder Virus-spezifischen Bindungspartner funktionalisiert sind.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Bindungspartner ein Antikörper oder Antikörperfragment, Protein A, Protein G, ein Lektin, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder eine Kombination davon ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung mittels einer magnetischen Vorrichtung erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die magnetische Vorrichtung als Magnet, insbesondere als Elektro- oder Permanentmagnet, ausgebildet ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Abtrennung der Partikel und dem Inkontaktbringen der Partikel mit Zell- oder Virus-spezifischen Primern die an den Partikeln gebundenen Zellen oder Viren zumindest teilweise lysiert werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäureamplifikationstechnik eine Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR-Technik) ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasekettenreaktionstechnik (PCR-Technik), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Echtzeit PCR, insbesondere TaqMan PCR, verschachtelte PCR („nested PCR“), inverser PCR, Multiplex PCR, asymmetrische PCR, reverse Transkriptase PCR und Kombinationen davon, ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, dass die Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mykobakterien, Listerien, Salmonellen, Campylobacter, und Kombinationen davon, sind.

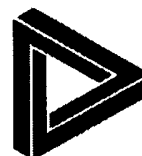
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Viren, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Enteroviren, CMV, Hepatitis, HIV und Kombinationen davon, sind.

16. Verwendung von zumindest teilweise ferromagnetischen, gegebenenfalls funktionalisierten, Partikeln zur Isolierung von Zellen oder Viren.

17. Verwendung von zumindest teilweise ferromagnetischen, gegebenenfalls funktionalisierten, Partikeln zur kombinierten Isolierung und Bestimmung von Zellen oder Viren.

18. Kit zur kombinierten Isolierung und Bestimmung von Zellen oder Viren in einer Probe gemäß einem Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, umfassend

- ferromagnetische, gegebenenfalls funktionalisierte oder funktionalisierbare, Partikel und
- Zell- oder Virus-spezifische Primer.



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : C12Q 1/00; C12Q 1/68		
Recherchierte Prüfsubstanz (Klassifikation): C12Q 1/00, 1/68		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, CAS		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 30. Dezember 2004 eingereichten Ansprüchen 1-19 erstellt.		
Kategorie ⁹	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	KHARE, S. et al. Rapid and sensitive detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. Journal of clinical microbiology, März 2004, Vol. 42, Nr. 3, Seiten 1075-1081 <i>das ganze Dokument</i>	1-19
	--	
X	GRANT, I.S. et al. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from milk by immunomagnetic separation. Applied and environmental microbiology, 1998, Vol. 64, Nr. 9, Seiten 3153-3158 <i>das ganze Dokument</i>	1-19
	--	
X	DJONNE, B. et al. Detection by immunomagnetic PCR of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk from dairy goats in Norway. Veterinary microbiology, 2003, Vol. 92, Nr. 1-2, Seiten 135-143 <i>Medline Zusammenfassung</i>	1-19
	--	
X	WO 2004/053154 A1 (TS-INGHUA UNIVERSITY) 24. Juni 2004 (24.06.2004) <i>Ansprüche</i>	1-19
	--	
Datum der Beendigung der Recherche: 4. November 2005		☒ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER
⁹ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO 2004/003231 A2 (PARTICLE SOLUTION AS) 8. Jänner 2004 (08.01.2004) <i>Ansprüche</i>	1-19
X	-- US 5283079 A (WANG et al.) 1. Februar 1994 (01.02.1994) <i>Zusammenfassung; Ansprüche</i>	1-19
X	-- US 2004/0023222 A1 (RUSSEL et al.) 5. Februar 2004 (05.02.2004) <i>Ansprüche</i> ----	1-19