



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **238 395 A1**4(51) **C 12 N 11/12**
C 07 K 17/12
C 07 H 21/00**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 277 532 6	(22)	19.06.85	(44)	20.08.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Behrendt, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Rosenthal, André, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur selektiven Fixierung von biologisch aktiven Stoffen

(57) Es wird ein Verfahren zur selektiven Fixierung von Einzelkomponenten aus Gemischen biologisch aktiver Stoffe an Trägermaterialien zur Verfügung gestellt, das darin besteht, daß die feste Phase mit der den biologisch aktiven Stoff oder das Stoffgemisch enthaltenden flüssigen Phase in Gegenwart eines flüssigen organischen Mediums in Kontakt gebracht wird oder daß nach Aufnahme des biologisch aktiven Stoffes oder des Stoffgemisches durch die feste Phase der Kontakt mit dem organischen Medium erfolgt. Das Verfahren kann vorteilhaft zur Trennung und Fixierung von Nukleinsäuren, Nukleotiden, Proteinen, Plasmiden, Genfragmenten usw. aus Gemischen an feste Träger angewendet werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur selektiven Fixierung von biologisch aktiven Stoffen aus flüssiger Phase unter Verwendung einer festen Phase, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase mit der den biologisch aktiven Stoff oder das Stoffgemisch enthaltenden flüssigen Phase in Gegenwart eines flüssigen organischen Mediums in Kontakt gebracht wird oder daß nach Aufnahme des biologisch aktiven Stoffes oder des Stoffgemisches durch die feste Phase der Kontakt mit dem organischen Medium erfolgt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase in Wasser oder organischen Lösungsmitteln unlösliche anorganische oder organische niedermolekulare oder makromolekulare Stoffe oder deren Gemische verwendet werden, die Gruppierungen enthalten, die mindestens eine kovalente Bindung zum biologisch aktiven Stoff ausbilden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase eine makromolekulare Masse mit chemisch aktiven Füllstoffen verwendet wird, die aus
 - einer makromolekularen Verbindung in einer Konzentration von 5–80 Vol.-%.
 - aus einer makromolekularen Verbindung mit 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazin-Gruppierungen in einer Konzentration von 1–80 Vol.-%.
 - aus 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazin in einer Konzentration von 0,5–50 Vol.-%.
 - aus Metallhalogeniden in einer Konzentration bis zu 20 Vol.-%.
 - gegebenenfalls aus puffernden Substanzen bis zu 5 Vol.-%,
 - gegebenenfalls aus einem flüssigen Dispersionsmittel und gegebenenfalls weiteren Zusatzmitteln besteht.
4. Verfahren nach Punkt 1–3, **gekennzeichnet dadurch**, daß als flüssiges organisches Medium ein oder mehrere mit Wasser mischbare Lösungsmittel verwendet werden, die bis zu 35 Vol.-% mit Wasser nicht mischbare Flüssigkeiten enthalten können.
5. Verfahren nach Punkt 1–5, **gekennzeichnet dadurch**, daß als flüssiges organisches Medium polare Lösungsmittel wie Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Ethanol verwendet werden.
6. Verfahren nach Punkt 1–5, **gekennzeichnet dadurch**, daß als flüssiges organisches Medium zyklische Ether wie Dioxan oder Tetrahydrofuran verwendet werden.
7. Verfahren nach Punkt 1–6, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Inkontaktbringen des organischen Mediums mit der festen Phase vor oder während eines Tüpfel- oder Blottingverfahrens erfolgt.
8. Verfahren nach Punkt 1–6, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Inkontaktbringen des organischen Mediums mit der festen Phase nach Tüpfel- oder Blottingverfahren erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Fixierung von biologisch aktiven Stoffen an Trägermaterialien. Das Verfahren kann für analytische und präparative Aufgaben in der Molekularbiologie, Biochemie und Medizin angewandt werden.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Die Bindung von biologisch aktiven Stoffen (z. B. Proteine, Nukleinsäuren) an die verschiedensten Träger ist bekannt, z. B. werden mit Trihalogen-Triazinen aktivierte Trägermaterialien und makromolekulare Massen mit chemisch aktiven Füllstoffen in EP 0134025 beschrieben. Dabei konnten bisher die einzelnen Komponenten von Gemischen der unterschiedlichsten biologisch aktiven Stoffe (besonders wichtig bei Zellaufschlüssen) nur statistisch gleichberechtigt an den Träger gebunden werden. Hierbei wurden die Träger in wässrigen Lösungen in Kontakt mit den biologisch aktiven Stoffen gebracht und ausschließlich in wässrigen Lösungen weiter verarbeitet.

Oligonukleotide konnten bisher nicht an Träger dieser Art gebunden werden.

Nitrocellulose bindet nur Nukleinsäurefragmente größer als 50 Nukleotide. Die Fixierung längerer Fragmente erfolgt hierbei durch mehrstündiges Backen bei 80°C.

Weiterhin ist bekannt, Oligonukleotide an Ionenaustauscher zu binden. Dabei kann keine Selektivität erreicht werden. (siehe z. B. A. Rosenthal, S. Schwertner, V. Hahn, H. D. Hunger, Solidphase Methods für Sequencing of Nucleic Acids I. Simultaneous Sequencing of different Oligonucleotids Using a New, Mechanically Stable Anion-Exchange Paper, Nucleic Acid Research, Vol. 13, No. 4, S. 1173–1184 (1985).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Analyseverfahren für biologisch aktive Stoffe zur Verfügung zu stellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, daß die selektive Fixierung von Einzelkomponenten aus Gemischen biologisch aktiver Stoffe an Trägermaterialien erlaubt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die feste Phase mit der den biologisch aktiven Stoff oder das Stoffgemisch enthaltenden flüssigen Phase in Gegenwart eines flüssigen organischen Mediums in Kontakt gebracht wird, oder daß nach Aufnahme des biologisch aktiven Stoffes oder des Stoffgemisches durch die feste Phase der Kontakt mit dem organischen Medium erfolgt.

Biologisch aktive Stoffe im Sinne der Erfindung sind z. B. Proteine, Nucleinsäuren, Oligonucleotide, Nucleotide, Aminosäuren, Peptide, Plasmide, Genfragmente usw. Bei der Fixierung der biologisch aktiven Stoffe an Trägersysteme wurde gefunden, daß in Gegenwart organischer Lösungsmittel die einzelnen Verbindungsklassen in diesen organischen Lösungsmitteln bei der nucleophilen Substitution ein unterschiedliches Verhalten aufweisen. Dadurch können aus Gemischen biologisch aktiver Stoffe Einzelkomponenten selektiv zur Reaktion gebracht werden. Überraschend wurde gefunden, daß auf diesem Wege Oligonucleotide und Nucleotide selektiv aus Gemischen abgetrennt und fixiert werden können.

Als feste Phase sind in Wasser oder organischen Lösungsmitteln unlösliche anorganische oder organische niedermolekulare oder makromolekulare Stoffe oder deren Gemische geeignet, wobei diese Stoffe zur Ausbildung mindestens einer kovalenten Bindung zum biologisch aktiven Stoff in der Lage sind. Besonders geeignet als feste Phase sind Trägermaterialien, die aus synthetischen und/oder natürlichen Polymeren hergestellt werden und die vor ihrer Verwendung chemisch aktiviert werden. Eine solche Aktivierung kann mit Säurehalogeniden, Bromcyan, Di- oder Polyaldehyden, Diepoxiden, Diisocyanaten, Diazverbindungen, Carbodiimiden usw. erfolgen.

Als besonders geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren sind makromolekulare Massen, die aus einer makromolekularen Verbindung in einer Konzentration von 5–80 Vol.-%, einer makromolekularen Verbindung mit 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazin-Gruppierungen in einer Konzentration von 1–80 Vol.-%, aus 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-Triazin in einer Konzentration von 0,5–50 Vol.-%, aus Metallhalogeniden in einer Konzentration bis zu 20 Vol.-%, ggf. puffernden Substanzen bis zu 5 Vol.-%, ggf. flüssigen Dispersionsmitteln und ggf. weiteren Zusatzstoffen bestehen. Ein Verfahren zur Herstellung solcher, für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeigneter fester Phasen, wird z. B. in der EP 134025 beschrieben (z. B. CCA-Papier). Die komplexe Zusammensetzung dieser Träger ist besonders für die selektive Fixierung einzelner Komponenten aus biologischen Stoffgemischen geeignet.

Als organische Lösungsmittel sind mit Wasser mischbare organische Stoffe geeignet. Diesen können bis zu 35 Vol.-% mit Wasser nichtmischbare organische Flüssigkeiten zugesetzt werden. Besonders geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren sind als flüssiges organisches Medium polare Lösungsmittel wie Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Ethanol, Propanol usw.

Bevorzugt werden als flüssige organische Medien zyklische Ether, z. B. Tetrahydrofuran und Dioxan.

Als Zeitpunkt für das Inkontaktbringen des organischen Mediums mit der festen Phase kommt prinzipiell jede Stufe einer Trennoperation mit biologisch aktiven Stoffen in Betracht. Besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren bei Tüpfel- und Blottingverfahren. Bei diesen Verfahren kann das organische Medium mit der festen Phase vor oder während der Durchführung angewendet werden. Bevorzugt ist die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nach einem Tüpfel- oder Blottingprozeß.

Vorteilhaft angewandt wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Fixierung von Ribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuren oder Proteinen aus einem komplexen Gemisch biologisch aktiver Substanzen an feste Trägermaterialien. Besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Fixierung von Nucleinsäurefragmenten an Trägermaterialien, z. B. im genomischen Blotting. Hervorzuheben ist, daß es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erstmals möglich wird, aus komplexen Gemischen heraus Oligonucleotide selektiv an eine feste Phase, insbesondere an Flächenträger zu fixieren.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Blotting von Oligonucleotiden

Ein nach Maxam und Gilbert-Technik ³²P markiertes, gespaltenes Oligonucleotid (14 Nucleotide: d ACCTACCF⁵UGGTGGT) wurde in einem 20%igen Polyacrylamidgel, 7 M Harnstoff aufgetrennt (Sequenzgel) und das Gel zunächst autoradiographiert. Danach wurde das Gel direkt auf der Glasplatte mit einem 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,5 + 1 % Essigsäure befeuchtet und ebenfalls befeuchtetes CCA-Papier (EPO 134025) auf das Trenngel aufgelegt. Darüber wurde eine Schicht dickeres Filterpapier (FN 18) und ein Stapel Zellstoff gelegt und unter Beschwerung die Oligonucleotide auf das CCA-Papier übertragen (3h, Raumtemperatur, Kontrolle mit Handcounter). Anschließend erfolgte die Fixierung der Oligonucleotide über Nacht in einem Dioxanbad (Raumtemperatur).

Nach der Fixierung wurde der Träger intensiv in einmal SSC 0,1 % SDS bei 65°C gewaschen. (1× SSC = 0,15 M NaCl 0,015 M Natriumcitrat).

Nach der Waschung sind in der Autoradiographie alle Banden sichtbar. Die Sequenz ist eindeutig lesbar. Durch das Verfahren konnten sämtliche Fragmente von 14 bis 1 Nucleotid fixiert werden.

Als Kontrolle mitgeführtes Filterpapier zeigt keinerlei Fixierung.

Beispiel 2

Das Verfahren wurde wie unter Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Anstelle Dioxan wurde Dimethylformamid eingesetzt. Die Sequenz ist auf CCA-Papier vollständig lesbar.

Beispiel 3

RNS-Tüpfeltest

Verschiedene Konzentrationen von tRNS (100,75,45,20,10,2 µg/µl) wurden jeweils mit ³²P markierter RNS (1 000 cpm/µl) versetzt und auf CCA-Papier aufgetüpfelt (jeweils 1 µl).

Danach wurden die einzelnen Papierstreifen in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur fixiert.

Ein nicht fixierter Streifen wurde als Kontrolle mitgeführt. Nach der Fixierung erfolgte eine Waschung der Streifen und eine Autoradiographie wie unter Beispiel 1 beschrieben. Als Lösungsmittel wurden verwendet: Ethanol, Formamid, Acetylaceton, Aceton, Adipinsäurediäthylether, Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Dioxan/Xylol, Dioxan, Xylol, Dibutylether, Essigsäureäthylester, Dimethylformamid, 10% Ethanolamin, Tetrahydrofuran.

Davon zeigen nur Dimethylformamid, Dioxan, Acetonitril und Ethanol für RNS an CCA-Papier fixierende Wirkung.

Essigsäurediäthylester, Tetrahydrofuran, Acetylaceton, Aceton verringern die RNS-Bindung unter den Normalwert.