



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 337 A1**

4(51) C 12 Q 1/68  
 G 01 N 27/26  
 C 07 H 21/04  
 C 08 B 15/00

**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) WP C 12 Q / 289 214 6 (22) 16.04.86 (44) 08.10.87

---

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

(72) Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Coutelle, Charles, Prof. Dr. sc. med.; Speer, Astrid, Dr. med.; Behrendt, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Flachmeier, Christina, DD

---

(54) **Verfahren zum Nachweis von genetischen Defekten**

---

(57) Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis von genetischen Defekten in genetischem Material mittels Übertragung aus einem Elektrophoresegel auf einen Träger zu entwickeln. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß nach Isolation der DNS, Gelelektrophorese und Denaturierung das Gel auf die Übertragung mit einem Puffer hoher Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 3 und 6, einer Konzentration von 1–9 Mol/l und Verwendung von Alkalimetall- bzw. Ammoniumacetat vorbereitet, als Flächenträger ein zur Ausbildung kovalenter Bindungen befähigter, chemisch reaktive Gruppen aufweisender Träger verwendet, die Übertragung durch ein Saugblottingverfahren mittels Druck, Unterdruck, Kapillarkräfte oder durch ein Elektroblottingverfahren erfolgt, der Flächenträger ohne weitere Behandlung getrocknet und noch vorhandene, chemisch reaktive Gruppen durch ein Blockierungsmittel bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9 blockiert werden. Anwendungsgebiet sind die medizinische Diagnostik und Molekularbiologie.

**Erfindungsanspruch:**

1. Verfahren zum Nachweis von genetischen Defekten durch Untersuchung genetischen Materials nach an sich bekannter Technik durch Isolation der Desoxyribonucleinsäure (DNS) aus Blut oder Fetalgewebe, Spaltung der DNS, Gelelektrophorese, Denaturierung, Übertragung auf einen Flächenträger, Blockierung, Hybridisation und Nachweis, **gekennzeichnet dadurch**, daß
  - a) das Gel auf die Übertragung mit einem Puffer hoher Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 3 und 6, einer Konzentration von 1–9 Mol/l und Verwendung von Alkalimetall- bzw. Ammoniumacetat vorbereitet wird,
  - b) als Flächenträger ein zur Ausbildung kovalenter Bindungen befähigter, chemisch reaktive Gruppen aufweisender Träger verwendet wird,
  - c) die Übertragung durch ein Saugblottingverfahren mittels Druck, Unterdruck, Kapillarkräfte oder durch ein Elektroblothingverfahren erfolgt, wobei
    - aa) bei den Saugblottingverfahren in einem Medium hoher Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 3 und 6, einer Konzentration von 1–9 Mol/l und Verwendung von Alkalimetall- bzw. Ammoniumacetat und
    - bb) bei den Elektroblothingverfahren in einem Medium niedriger Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 5 und 8, einer Konzentration von 0,001 bis 0,5 Mol/l und gegebenenfalls unter Beteiligung organischer Puffersubstanzen gearbeitet wird,
  - d) der Flächenträger ohne weitere Behandlung getrocknet wird und
  - e) noch vorhandene, chemisch reaktive Gruppen durch ein Blockierungsmittel bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9 blockiert werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Flächenträger mit chemisch reaktiven Gruppen solche verwendet werden, die durch 2,4,6-Trihalogen-s-triazine, Bromcyan, Epoxide oder Diazotierungen aktiviert wurden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Flächenträger mit chemisch reaktiven Gruppen makromolekulare Massen mit chemisch aktiven Füllstoffen aus
  - einer makromolekularen Verbindung in einer Konzentration von 5–80 Vol.-%,
  - einer makromolekularen Verbindung mit 4,6-Dihalogen-s-triazin-Gruppierungen in einer Konzentration von 1–80 Vol.-%,
  - 2,4,6-Trihalogen-s-triazin in einer Konzentration von 0,5–50 Vol.-%,
  - Metallhalogeniden in einer Konzentration bis zu 20 Vol.-%,
  - gegebenenfalls puffernden Substanzen bis zu 5 Vol.-% und
  - gegebenenfalls flüssigem Dispersionsmittelverwendet wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Flächenträger mit chemisch reaktiven Gruppen ein im wesentlichen aus Cellulose bestehendes Papier, das durch 0,01 bis 0,5 Mol 2,4,6-Trihalogen-s-triazin je Anhydroglucoseeinheit der Cellulose substituiert ist, verwendet wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Vorbereitung der Übertragung und die Übertragung nach einem Saugblottingverfahren in einem Puffer aus Kaliumacetat bei einem pH-Wert von 3 bis 6 und bei einer Konzentration von 1 bis 9 Mol/l erfolgen.
6. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Trocknung des Flächenträgers nach der Übertragung bei Zimmertemperatur an der Luft innerhalb von 10 Minuten bis 10 Stunden erfolgt.
7. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Blockierung mit einem Reagens durchgeführt wird, das mit den verbliebenen reaktionsfähigen Gruppen des Flächenträgers eine chemische Reaktion eingeht.
8. Verfahren nach Punkt 1 und 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Blockierung in einem Reagens aus Ethanolamin, Ethanolaminhydrochlorid und Wasser einer Konzentration zwischen 1 und 20 Gew.-%, bezogen auf Ethanolamin bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9 durchgeführt wird.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis von genetischen Defekten in menschlicher, genomischer DNS. Anwendungsgebiete sind die medizinische Diagnostik und Molekularbiologie.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Diagnose von Erbkrankheiten ist an die Identifizierung bestimmter, die spezielle Krankheit hervorrufender oder eng mit ihnen gekoppelter Abschnitte des menschlichen Gens gebunden. Der Nachweis dieser Abschnitte erfolgt mit radioaktiv oder mit anderen Methoden markierten Sonden, die spezifisch nur mit diesem Abschnitt des Gens hybridisieren und so durch ihre Markierung eine Identifizierung zulassen. Die Gewinnung der Genabschnitte erfolgt aus menschlichem Gewebe, in der Regel Blut oder Fetalgewebe, aus dem die DNS nach bekannten Verfahren isoliert wird. Nach der Isolierung der DNS wird sie mit speziellen Restriktionsenzymen gespalten. Nach der Spaltung werden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Molmasse aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese beginnt der eigentliche Nachweis der Genfragmente, und je nach der Durchführung des Nachweisverfahrens kann eine Empfindlichkeit bis zu 1 pg des betreffenden DNS-Fragments erreicht werden. Nach den bisher üblichen Verfahren wird diese Empfindlichkeit jedoch nur in Ausnahmefällen erreicht, so daß bei den z. Zt. verwendeten Standardverfahren auf Basis Nitrocellulose und Nylonmembranen die Empfindlichkeitsgrenze bei etwa 1 pg spezifischer DNS liegt. Es werden verschiedene Verfahren zur Analyse und insbesondere zum Nachweis mit gesteigerter Empfindlichkeit vorgeschlagen. Im EP 124 124 wird z. B. ein Färbeverfahren durch simultane Fällung von DNS oder RNS und Farbstoff vorgeschlagen. Dadurch werden die Empfindlichkeit, Genauigkeit, Zuordenbarkeit und Geschwindigkeit der Analyse nach den bekannten Techniken erhöht. In EP 154 505 wird ein Verfahren zur Diagnose von Gendefekten beschrieben. Es besteht in einer Anordnung zum Nachweis der An- oder Abwesenheit einer vorherbestimmten genetischen Sequenz in einem DNS-Strang. Auf die doppelsträngige DNS wirkt eine Restriktionsendonuclease ein, deren spezifische Wirksamkeit von der Anwesenheit einer bestimmten Basensequenz abhängig ist. Diese Basensequenz soll durch das Schneiden der DNS nachgewiesen werden. Die Hybridisation mit entsprechenden Sonden erfolgt an beiden Enden der Schnittstelle. Durch Trennung von flüssiger und fester Phase und Messung der Stärke der Markierung in jeder Phase wird auf die An- oder Abwesenheit der speziellen Basensequenz geschlossen.

In der Regel ist es notwendig, zum Nachweis der genetischen DNS-Sequenzen eine Reihe von Verfahrensschritten zu durchlaufen. Entscheidende, die Empfindlichkeit und Genauigkeit des Nachweises beeinflussende Schritte sind die Denaturierung der DNS, die Blotting- oder Übertragungstechnik auf einen festen Träger, die Bindekapazität und Stabilität der Bindung an diesen Träger und schließlich die Behandlung des Trägers. Je geringer die Verluste vom Träger bei den nachfolgenden Schritten und je vollständiger die Hybridisierung der DNS-Fragmente gelingen, desto empfindlicher und sicherer ist die Methodik zur Feststellung des genetischen Defekts in einer Probe.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, den Nachweis von Veränderungen im genetischen Material empfindlicher, schneller und damit sicherer zu gestalten.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von genetischen Defekten in genetischem Material mittels Übertragung aus einem Elektrophoresegel auf einen Träger zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß nach Isolation der Desoxyribonucleinsäure (DNS), Gelelektrophorese und Denaturierung das Gel auf die Übertragung mit einem Puffer hoher Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 3 und 6, einer Konzentration von 1–9 Mol/l und Verwendung von Alkalimetall- bzw. Ammoniumacetat vorbereitet, als Flächenträger ein zur Ausbildung kovalenter Bindungen befähigter, chemisch reaktive Gruppen aufweisender Träger verwendet, die Übertragung durch ein Saugblottingverfahren mittels Druck, Unterdruck, Kapillarkräfte oder durch ein Elektroblothingverfahren erfolgt, wobei

- a) bei den Saugblottingverfahren in einem Medium hoher Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 3 und 6, einer Konzentration von 1–9 Mol/l und Verwendung von Alkalimetall- bzw. Ammoniumacetat und
- b) bei den Elektroblothingverfahren in einem Medium niedriger Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 5 und 8, einer Konzentration von 0,001 bis 0,5 Mol/l und gegebenenfalls unter Beteiligung organischer Puffersubstanzen

gearbeitet, der Flächenträger ohne weitere Behandlung getrocknet und noch vorhandene, chemische reaktive Gruppen durch ein Blockierungsmittel bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9 blockiert werden.

Das Verfahren zum Nachweis von genetischen Defekten wird in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Aus tierischem oder menschlichem Blut wird nach üblichen Verfahren durch Fällung und Extraktion die DNS isoliert.
2. Die DNS wird mit den spezifischen Restriktionsenzymen gespalten, was zu DNS-Fragmenten führt, die den Gendefekt nachweisen oder mit seinem Genort gekoppelt sind.
3. Nach der Spaltung wird die DNS in üblicher Art und Weise durch Gelelektrophorese in Agarosegelen über Nacht nach der Länge der Fragmente aufgetrennt.
4. Nach der Gelelektrophorese wird die DNS im Gel in basischem Medium denaturiert und unter diesen Bedingungen gegebenenfalls in große Fragmente gespalten, die im Durchschnitt  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{5}$  der ursprünglichen Molmasse der Fragmente aufweisen. Bemerkenswert ist, daß im Anschluß hieran kein separater Schritt zur Depurination, d. h. die Spaltung der DNS in Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 100 Basenpaaren, durchgeführt wird, um, wie nach anderen bekannten Verfahren üblich, einen schnellen und möglichst vollständigen Transfer zu erzielen.
5. Nach der Erfindung erfolgt die Vorbereitung des Gels auf die Übertragung der DNS-Fragmente auf den Flächenträger durch Neutralisation in einem Puffer hoher Ionenstärke und mit einem pH-Wert zwischen 3 und 6 aus einem Alkalimetall- oder Ammoniumacetat, vorzugsweise Kaliumacetat, mit einer Konzentration zwischen 1 und 9 Mol/l, d. h. bis zur maximal möglichen Konzentration des Salzes in Wasser (gesättigte Lösung).

6. Verwendung eines zur Ausbildung kovalenter Bindungen befähigten, chemisch reaktive Gruppen aufweisenden Flächenträgers, z. B. eines Flächenträgers, der durch 2,4,6-Trihalogen-s-triazine, Bromcyan, Epoxide oder Diazotierungen aktiviert wurde, insbesondere von makromolekularen Massen mit chemisch aktiven Füllstoffen, die aus
  - einer makromolekularen Verbindung in einer Konzentration von 5–80 Vol.-%,
  - einer makromolekularen Verbindung mit 4,6-Dihalogen-s-triazin-Gruppierungen in einer Konzentration von 1–80 Vol.-%,
  - 2,4,6-Trihalogen-s-triazin in einer Konzentration von 0,5–50 Vol.-%,
  - Metallhalogeniden in einer Konzentration bis zu 20 Vol.-%,
  - gegebenenfalls puffernde Substanzen bis zu 5 Vol.-% und
  - gegebenenfalls flüssigem Dispersionsmittel
 bestehen und nach DD-WP 220 316 und DD-WP 217 809 hergestellt wurden.
7. Übertragung der DNS entweder durch Saugblottingverfahren, wie Druckblotting, Vakuumbotting oder Kapillarblotting, oder durch ein Elektroblothingverfahren, wobei
  - bei den Saugblottingverfahren in einem Medium hoher Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 3 und 6, einer Konzentration von 1–9 Mol/l und Verwendung von Alkalimetall- bzw. Ammoniumacetat, vorzugsweise Kaliumacetat, und
  - bei den Elektroblothingverfahren in einem Medium niedriger Ionenstärke bei einem pH-Wert zwischen 5 und 8, einer Konzentration von 0,001 bis 0,5 Mol/l und in Anwesenheit von 0 bis 0,1 Mol/l organischer Puffersubstanzen, z. B. Triethanolamin, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Triethylamin, Methyl-diethanolamin usw. gearbeitet wird.
8. Nach der Übertragung (Blotting) wird der Träger erfindungsgemäß ohne vorheriges Waschen getrocknet, vorzugsweise an der Luft bei Raumtemperatur innerhalb von etwa 10 Minuten bis zu 10 Stunden.
9. An den Trocknungsschritt schließt sich erfindungsgemäß ein Blockierungsschritt an, um noch vorhandene Bindungskapazität, z. B. reaktionsfähige Halogenatome des 2,4,6-Trihalogen-s-triazins, umzusetzen. Diese Blockierung erfolgt mit einem Reagens, das mit den verbliebenen reaktionsfähigen Gruppen des Flächenträgers eine chemische Reaktion eingeht. Ein solches Reagens läßt sich z. B. aus einer 1- bis 20%igen wäßrigen Lösung von Ethanolamin und Ethanolaminhydrochlorid, deren pH-Wert durch Salzsäure auf 6 und 9 eingestellt wurde, herstellen.
10. Nach der Blockierung wird die Hybridisation vorbereitet durch einen Waschschrift mit einer Vorhybridisationslösung, der
  - a) bei Raumtemperatur mit 50% Formamid, 3 × SSC, Denhardts Lösung, 0,1% SDS und beschallter und denaturierter DNS oder
  - b) im SSC-System bei Temperaturen von 20°C bis 40°C durchgeführt wird.
11. Die Vorhybridisation wird etwa 4 Stunden entweder
  - a) in der Lösung 10 a) bei 40°C oder
  - b) in der Lösung 10 b) bei 55–65°C durchgeführt.
12. Die Hybridisation erfolgt über Nacht in einer der Lösungen 10 a) oder 10 b), der jedoch eine Sonde mit einer spezifischen Radioaktivität von etwa 10<sup>6</sup> cpm/mg oder eine auf anderem Wege markierte Sonde zugesetzt wird.
13. Nach der Hybridisierung wird mit 2 × SSC, 0,1% SDS eine Stunde bei 40°C gewaschen.
14. Anschließend wird autoradiographiert durch Exposition über Nacht bei –70°C oder fluorographiert bzw. nach anderer Methode nachgewiesen.

Als Flächenträger kommen neben den bevorzugten makromolekularen Massen nach DD-WP 217 809 auch solche in Frage, die z. B. durch Cyanurchlorid und anschließende Wasserwäsche hergestellt werden oder natürliche und/oder synthetische Polymere, die durch Cyanurchlorid substituiert sind. Bevorzugt werden dann cellulosehaltige Materialien, die 0,01 bis 0,5 Mol 2,4,6-Trihalogen-s-triazin je Anhydroglucoseeinheit gebunden enthalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich durch mehrere Vorteile gegenüber den bisherigen Techniken aus. Der wesentliche Vorteil ist die kurze Expositionszeit über Nacht (gegebenenfalls schon in 5 Stunden) und das Erreichen einer hohen Empfindlichkeit, die durch die höhere Bindungskapazität der Flächenträger mit kovalent bindenden Gruppen etwa eine Zehnerpotenz über der bekannten Verfahren liegt. Weiterhin wird die Genauigkeit und damit die methodische Sicherheit in der DNS-Analyse dadurch erhöht, daß die Depurination nicht mehr notwendig ist, d. h. die DNS, die ursprünglich zwischen 50 und 1 Kilobasen lang war, nicht in kleine und kleinste Fragmente von 100 bis 10 Basenpaaren gespalten wird. Durch die Anwendung eines speziellen Trägers, der eine kovalente Bindung ermöglicht und außerdem durch seine Beschaffenheit ein bestimmtes Mikromilieu schafft und darauf abgestimmte, neuartige Reaktionsbedingungen beim Übertragen der DNS vom Gel auf den Träger einschließlich des Trocknungs- und Blockierungsschrittes unter milden Bedingungen wird

1. die DNS nicht beeinflusst und ihre Verteilung nach der Größe und Morphologie nicht verändert und
2. eine große Schärfe der Banden und damit eine wesentlich gesteigerte Empfindlichkeit auf den Autoradiogrammen erzielt.

Die erfindungsgemäß erzielten Fortschritte im Nachweis bestimmter DNS-Fragmente stellen somit eine neue Qualität dar, die in einer schnelleren und sichereren Diagnose von genetischem Material resultiert, was insbesondere bei pränataler Diagnose von großer Bedeutung ist.

#### Ausführungsbeispiel

Es wird in den in der Beschreibung angegebenen Schritten vorgegangen und für diese Schritte die genauen Bedingungen für den Nachweis eines mit dem Genort für die Duchennésche Muskeldystrophie gekoppelten DNS-Fragmentmusters gegeben.

1. Blut und Citratlösung werden mit dem gleichen Volumen Plasmaersatz (Gelafusa) versetzt, 30–45 Minuten sedimentieren lassen, der Überstand abgehoben, mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung versetzt, zentrifugiert, der Überstand abgegossen, mit dem gleichen Volumen Kochsalzlösung versetzt und der Vorgang wiederholt, die so erhaltenen Erythrozyten mit Chloroform und Octanol 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert, die Lösung abgehoben, mit Chloroform extrahiert, der Chloroformextrakt abgehoben, die DNS aus der Lösung mit iso-Propanol gefällt und mit dem Glasstab aufgenommen und schließlich in 1 × SSC-Puffer gelöst und mit Alkohol reprecipitiert und erneut in 0,1 × SSC aufgenommen.

2. Spaltung mit PstI in Fragmente von etwa 30 bis 5 kb
  3. Gelelektrophorese in 0,6% Agarose-Gel, mit TE-Puffer, pH-Wert = 7,7 bei 20V und Zimmertemperatur über Nacht
  4. Denaturierung in 0,5m NaOH/1,5m NaCl-Lösung
  5. Vorbereitung auf das Blotting, indem das Gel in einen Puffer gelegt wird (ausreichend Flüssigkeit), der aus 3m Kaliumacetat bestand und durch Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wurde
  6. Träger nach DD-WP 220316 durch Umsetzung von Cellulosepapier mit Natronlauge und Aktivierung mit Cyanurchlorid in organischen Lösungsmitteln ( $9\mu\text{Mol}$  Cyanurchlorid/cm<sup>2</sup>;  $40\mu\text{Mol}$  NaCl/cm<sup>2</sup>)
  7. Übertragung (Blotting) mittels Southern-Transfer über Nacht in Puffer aus 3m Kaliumacetat, der durch Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt wurde (Zimmertemperatur)
  8. Trocknen 1 Stunde bei Zimmertemperatur an der Luft
  9. Blockierung mit 10% Ethanolamin in Wasser; die Lösung wurde mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt (1 Stunde bei Zimmertemperatur)
  10. Waschen mit Vorhybridisationslösung :  $3 \times \text{SSC}$  und Denhardt's Lösung, dazu beschaltete und denaturierte DNS ( $2 \times 10$  Minuten, Zimmertemperatur)
  11. Vorhybridisation in der gleichen Lösung 4 Stunden bei 60–65°C
  12. Hybridisation über Nacht mit einer X-chromosomalen molekularen Sonde (754) mit einer spezifischen Aktivität von  $3 \times 10^8$  cpm/mg in Formamidlösung (50% Formamid,  $3 \times \text{SSC}$ , Denhardt's Lösung, 0,1% SDS) bei 40°C
  13. Waschen mit  $2 \times \text{SSC}$ , 0,1% SDS eine Stunde bei 40°C
  14. Autoradiographie bei -70°C über Nacht und Entwicklung
- Empfindlichkeit: 0,1 pg.
-