



PATENTSCHRIFT 148 955

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 148 955 (44) 17.06.81 3(51) C 07 H 21/00
C 12 P 19/34
(21) WP C 07 H / 218 847 (22) 04.02.80

-
- (71) Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR,
Berlin, DD
- (72) Hunger, Hans-Dieter, Dr., DD
- (73) siehe (72)
- (74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für
Molekularbiologie und Medizin, AG Patent- und Neuererwesen,
1115 Berlin, Lindenberger Weg 70
-

(54) Verfahren zur Kopplung von Nukleinsäuren an Trägermaterialien

(57) Die Erfindung betrifft ein chemisches Kopplungsverfahren von Nukleinsäuren an Trägermaterialien, das für Affinitätschromatografische Untersuchungen verwendet wird. Ziel ist die stabile Kopplung von Nukleinsäuren an einen Träger. Es wurde überraschend gefunden, daß nur im sauer gepufferten pH-Bereich (5 bis 6,5) eine unter Hybridisationsbedingungen stabile Kopplung der Nukleinsäuren an Cyanursäurechlorid aktivierte Trägermaterialien möglich ist. Das Kopplungsverfahren kann auch zum Transfer von in Trenngelen getrennten Nukleinsäuren auf aktiviertem Papier benutzt werden.



Erfinder: Dr. H.-D. Hunger

Verfahren zur Kopplung von Nukleinsäuren an Trägermaterialien

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kopplung von Nukleinsäuren an Trägermaterialien, das in der Biochemie für affinitätschromatografische Untersuchungen Anwendung findet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Kopplung von Nukleinsäuren nach bekannten chemischen Verfahren (H. Potuzak and P. D. G. Dean (1978) Febs-Lett. 88, 161 - 166; H. H. Weetall (Separation and Purification Methods, 2 (2), 199 - 229 (1973))) führt unter Hybridisationsbedingungen zu relativ instabilen Kopplungsprodukten. Sie sind deshalb für den Einsatz zur Affinitätschromatografie von Minorkomponenten eines Nukleinsäuregemisches bzw. für Transferversuche von Nukleinsäuren aus Trenngelen mittels aktivierten Papieren schlecht geeignet.

Ein weiteres bekanntes Verfahren mit Cyanurchlorid (S. Biagioni, R. Sisto, A. Ferraro, P. Caiafa, C. Turano Analytical Biochemistry 89, 616 - 619 (1978); N. L. Smith and H. M. Lenhoff Analytical Biochemistry 61, 392 - 415 (1974)) koppelt nur Doppelstrang DNS an kristalline Zellulose. Die Kopplungsbedingungen erlauben keine Stabilität der Kopplung unter Hybridisationsbedingungen.

Bekannte Kopplungsverfahren über Diazobenzylloxymethylgruppen (J. C. Alwine, D. Kemp, B. A. Parker, J. Keiser, J. Renart, G. R. Stark, G. M. Wahl Methods in Enzymology, noch im Druck) stellen eine chemisch relativ aufwendige Prozedur dar.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein chemisch einfaches Verfahren zur Kopplung von Nukleinsäuren an Trägermaterialien zu entwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein solches Verfahren zu schaffen, daß die Bindung der Nukleinsäuren an das Trägermaterial unter Hybridisations- und Elutionsbedingungen stabil ist.

Erfindungsgemäß wird das zur Kopplung von Nukleinsäuren verwendete Trägermaterial, vorzugsweise Zellulose oder Papier, das mit Cyanursäurechlorid aktiviert wurde, im schwach sauren gepufferten pH-Bereich, vorzugsweise 5 - 6,5, mit den Nukleinsäuren in Kontakt gebracht. (Die Aktivierung des Trägermaterials erfolgt in einem Gemisch von Dioxan/Xylol.)

Überraschend wurde gefunden, daß eine unter Hybridisationsbedingungen stabile Kopplung nur im schwach sauren gepufferten pH-Bereich, bevorzugt bei pH = 6,1 und im $\frac{1}{15}$ M Sörensen-Puffer erfolgt.

Eine Kopplung an aktiviertes Papier benutzt man zum Transfer von Nukleinsäuren bzw. ihrer Bruchstücke aus Trenngelen. Die Übertragung der Nukleinsäuren aus Trenngelen auf das Papier erfolgt nach der von Southern (6) beschriebenen Technik.

Die Erfindung hat den Vorteil, daß sie universell anwendbar ist. Es können DNS- und RNS-Bruchstücke der verschiedensten Größen (Einzelstrang und Doppelstrang) gekoppelt werden. Die Kopplung ist unter Hybridisations- und Elutionsbedingungen stabil.

Die Erfindung soll anschließend an einem Beispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

0,5 cm² Whatman 540-Papier werden 15 Minuten in 3 M NaOH geschüttelt. Das Papier wird in eine 5 % Cyanursäurechloridlösung in Dioxan/Xylol (1 : 1) gebracht und 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt.

Das Filterblättchen wird je 10 Minuten gewaschen (2 x Dioxan, 1 x Dioxan Eisessig/Wasser (2/1/1), 1 x Wasser).

Die Kopplung der Nukleinsäuren erfolgt bei Zimmertemperatur in einem 1/15 m Sörensen-Puffer pH 6,1, DNS-Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$.

Es werden bis zu 20 $\mu\text{g DNS/cm}^2$ Papier kovalent gebunden. Inaktivierung vorhandener Restgruppen erfolgt mittels 1 % Äthanolamin im Kopplungspuffer.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Kopplung von Nukleinsäuren an mit Cyanursäurechlorid aktivierte Trägermaterialien, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägermaterialien, vorzugsweise Zellulose oder Papier, im schwach sauren, gepufferten pH-Bereich, vorzugsweise 5 - 6,5, mit Nukleinsäuren in Kontakt gebracht werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung bei pH 6,1 in $\frac{1}{15}$ M Sörensen-Puffer durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung mittels Southern-Technik erfolgt.