



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 001 082 U2**

(12) **GEBRAUCHSMUSTERSCHRIFT**

(21) Anmeldenummer: 407/96

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **C12P 19/34**

(22) Anmeldetag: 9. 7.1996

(42) Beginn der Schutzdauer: 15. 9.1996

(45) Ausgabetag: 25.10.1996

(73) Gebrauchsmusterinhaber:

LABORDIAGNOSTIKA GESELLSCHAFT MBH  
A-1110 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR STABILISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN VOR DEREN ISOLIERUNG AUS BLUTPROBEN

(57) Es wird ein Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsäuren in einer Blutprobe und zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Blutprobe beschrieben, bei welchem das Blut unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumthiocyanat gemischt wird, sodaß die gesamten in der Blutprobe enthaltenen Nukleinsäuren während der Weiterverarbeitung vollständig erhalten bleiben.

AT 001 082 U2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von Nucleinsäuren vor deren Isolierung aus Blutproben

Virale Infektionen können einerseits auf dem klassischen Weg über den Nachweis von viralen Proteinen oder Antikörpern gegen die Viren und andererseits durch den Nachweis der den Viren entsprechenden Nucleinsäuren diagnostiziert werden.

Bei der zuletzt genannten Methode muß man zwischen DNA Viren und RNA Viren, zu denen unter Anderem HIV und das Hepatitis C Virus gehören, unterscheiden.

Insbesondere beim Nachweis von RNA Viren besteht auf Grund der geringen Stabilität der nachzuweisenden Nucleinsäuren die Gefahr, daß diese Nucleinsäuren enzymatisch abgebaut werden, wenn die Blutprobe nicht rasch in einem Labor weiterverarbeitet wird. Oft ist der Ort, an welchem dem Patienten Blut abgenommen wird nicht ident mit dem Ort, an dem das Blut analysiert wird. Bisher wurde daher aus dem Blut durch Zentrifugieren Serum prepariert und dieses Serum für Transport und Aufbewahrung eingefroren. Nach dem Auftauen wurden dann die Nucleinsäuren nach Standardprotokollen extrahiert, wobei die Viruspartikel aus dem Serum durch Zentrifugieren vor der Extraktion angereichert werden können. Die Nucleinsäuren werden dann z.B. mittels Polymerase-Ketten-Reaktion („PCR“) nachgewiesen.

Ein Nachteil dieses bekannten Verfahrens ist, daß bei der Serumgewinnung die Gefahr besteht, daß die Virus RNA abgebaut wird und somit nicht mehr nachgewiesen werden kann. Insbesondere eine quantitative Bestimmung, welche auch für die Diagnostik große Bedeutung hat, ist unmöglich. Weiters besteht keine Möglichkeit, in Blutzellen integrierte Viren nachzuweisen und/oder sonstige RNA Spezies aus Blutzellen zu isolieren (z.B. für die Tumor Früherkennung), da, wie oben beschrieben, nur das Serum zur Analyse verwendet wird. Ein weiterer Nachteil ist, daß die bekannten Standardprotokolle zur Isolierung von RNA viele Manipulationen erfordern, womit einerseits das Risiko für das Personal erhöht wird, andererseits die Gefahr einer Verschleppung von Probenmaterial zwischen den Proben steigt. Da die Nachweismethoden jedoch sehr sensitiv sind, können schon geringste verschleppte Volumina einer positiven Probe andere Proben falsch positiv werden lassen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Stabilisierung von Nucleinsäuren vor deren Isolierung aus Blutproben zu finden, bei dem die zuvor genannten Nachteile nicht auftreten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Blutprobe unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumsalz, z.B. Guanidiniumthiocyanat, vermischt wird und infolge die Nucleinsäuren aus Blutzellen sowie von in Blutzellen oder im Serum enthaltenen Viren nach an sich bekannten Verfahren isoliert werden.

Die Weiterverarbeitung kann z.B. mit folgenden Schritten erfolgen:

a) Isolierung von DNA:

- Mischen der Blut-Guanidiniumsalz-Lösung mit Äthanol
- Abtrennen des aus dem vorigen Schritt resultierenden, DNA haltigen Niederschlags durch Zentrifugieren
- Waschen des Niederschlags mit Äthanol und Auflösen des Niederschlags in wässriger Lösung

b) Isolierung von RNA:

- Mischen der Blut-Guanidiniumsalz-Lösung mit einem Gemisch aus Phenol und einer wässrigen Guanidiniumsalz-Lösung
- Zugabe von Chloroform
- Trennen in eine organische, proteinhaltige Phase und eine wässrige, RNA-hältige Phase durch Zentrifugieren
- Versetzen der wässrigen Phase mit Isopropanol
- Abtrennen des aus dem vorigen Schritt resultierenden, RNA haltigen Niederschlags durch Zentrifugieren
- Waschen des Niederschlags mit Äthanol und Auflösen des Niederschlags in wässriger Lösung

Erfindungsgemäß liegt das Guanidiniumsalz in Pulverform vor, wodurch im Vergleich mit einer Guanidiniumsalz-Lösung die höhere Stabilität des Guanidiniumsalzes genutzt wird. Vorzugsweise ist das Guanidiniumsalz bereits in dem an sich bekannten zur Blutabnahme bestimmten System, z. B. in einer Eprovette mit Unterdruck vorhanden und wird darin mit dem Blut vermischt, bzw. auch darin aufgelöst. Das erfindungsgemäße bevorzugte Mischungsverhältnis ist 4 Millimol Guanidiniumsalz pro Milliliter Blut. Das Guanidiniumsalz lysiert Blutzellen und Viruspartikel und denaturiert allgemein Proteine. Somit werden insbesondere auch spezielle Nukleinsäure abbauende Enzyme (RNasen und DNasen) deaktiviert. Je weniger Verfahrensschritte bzw. Pipettierschritte zur Isolierung der Nukleinsäuren notwendig sind, desto geringer ist das gesundheitliche Risiko für das Laborpersonal und desto geringer ist auch das Risiko einer Verschleppung von Probenmaterial. Ist das Guanidiniumsalz bereits im zur Blutabnahme bestimmten Gefäß enthalten (geschlossenes System), bedeutet dies einen Schritt weniger und somit erhöhte Sicherheit. Das erfindungsgemäße Verfahren ist gegenüber bisher bekannten Verfahren sicherer, schneller, einfacher und ermöglicht dabei sowohl die Isolierung von Nukleinsäuren der in Blutzellen enthaltenen Viren als auch von Nukleinsäuren von im Serum enthaltenen Viren, wobei die Stabilisierung aller Nukleinsäuren gewährleistet ist.

Um das erfindungsgemäße Verfahren noch deutlicher darzustellen, wird nachfolgend ein konkretes Ausführungsbeispiel beschrieben.

In ein evakuiertes Blutabnahme-Röhrchen mit 0.94 g Guanidiniumthiocyanat in Pulverform werden 2 ml Blut abgenommen. Alternativ dazu kann mit einer herkömmlichen Spritze Vollblut abgenommen und 2 ml davon in einen Behälter mit 0.94 g Guanidiniumthiocyanat transferiert werden. Durch Schütteln des geschlossenen Behälters löst sich das Guanidiniumthiocyanat im Blut auf. Das Guanidiniumthiocyanat bewirkt, daß Blutzellen und Viruspartikel lysiert werden und Proteine denaturiert werden. Somit werden auch Nucleasen deaktiviert. In diesem stabilisierten Zustand kann die Blut-Guanidiniumthiocyanat-Lösung

bei Raumtemperatur transportiert oder bis zu 24 Stunden gelagert werden. Zur längeren Lagerung ist eine Kühlung auf  $-20^{\circ}\text{C}$  notwendig.

Zur Isolierung der DNA werden  $500\ \mu\text{l}$  der Blut-Guanidiniumthiocyanat-Lösung mit  $500\ \mu\text{l}$  4 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung, gepuffert mit 0.1 M Tris/Cl, pH 8, gemischt. Durch Zugabe von  $500\ \mu\text{l}$  99%-igem Äthanol wird DNA präzipitiert und durch Zentrifugieren bei  $15.000\text{xg}$  für 5 min. pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Niederschlags mit 95%-igem Äthanol wird der DNA hältige Niederschlag in wässrigem Puffer oder in Wasser gelöst.

Zur Isolierung der RNA werden 3 ml eines Gemisches aus Phenol und einer wässrigen Guanidiniumthiocyanat-Lösung, im Verhältnis 3 Teile Phenol, gesättigt und gepuffert mit 0.1 M Tris/Cl, pH 8, und 1 Teil 4 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung in Aqua dest., der Blut-Guanidiniumthiocyanat-Lösung beigemischt.

Dann werden 1.2 ml von dem entstehenden Blut-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Gemisch mit  $120\ \mu\text{l}$  Chloroform und  $60\ \mu\text{l}$  Natriumacetat-Lösung gemischt. Beim anschließenden Zentrifugieren, 15 min. mit  $15.000\text{xg}$  bei  $4^{\circ}\text{C}$ , trennen sich die beiden entstandenen Phasen und man erhält eine organische, proteinhaltige Phase, dann eine Interphase, welche denaturierte Proteine und DNA enthält und oben eine wässrige, RNA-hältige Phase.

Von der oberen, wässrigen, RNA-hältigen Phase werden  $600\ \mu\text{l}$  abgenommen und mit  $600\ \mu\text{l}$  Isopropanol gemischt. Dann folgt eine Zentrifugation mit  $15.000\text{xg}$  für 15 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$ , wodurch die RNA präzipitiert wird.

Es folgt ein dreimaliges Waschen des Niederschlags, indem der Isopropanol-Überstand abgegossen wird und  $600\ \mu\text{l}$  70%iger Äthanol zum Niederschlag zugegeben wird. Durch Aufschütteln des Niederschlags und Zentrifugieren bei  $15.000\text{xg}$  für 5 min. wird dieser von Guanidiniumsalzen gewaschen. Abschließend wird der Äthanolüberstand vollständig entfernt und der RNA-hältige Niederschlag in einem wässrigen Puffer oder in Wasser gelöst.

Ansprüche

1. Verfahren zur Stabilisierung von Nucleinsäuren in einer Blutprobe, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprobe unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumsalz, z.B. Guanidiniumthiocyanat, vermischt wird und infolge die Nucleinsäuren aus Blutzellen sowie von in Blutzellen oder im Serum enthaltenen Viren nach an sich bekannten Verfahren isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1., dadurch gekennzeichnet, daß das Guanidiniumsalz in Form von Pulver vorliegt und durch Schütteln im Blut aufgelöst wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Guanidiniumsalz bereits in dem an sich bekannten, zur Blutabnahme bestimmten System, z.B. in einer Epruvette mit Unterdruck, vorliegt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß pro Milliliter Blut vorzugsweise 4 Millimol Guanidiniumsalz vorhanden sind.