

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Dezember 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/145708 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/10 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/056644

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Mai 2008 (29.05.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 025 276.7 31. Mai 2007 (31.05.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Qiagen Str. 1, 40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOLLÄNDER, Vera [DE/DE]; Pappelweg 44, 59423 Unna (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(54) Title: AROMATIC ALCOHOLS FOR THE TREATMENT OF A BIOLOGICAL SAMPLE

(54) Bezeichnung: AROMATISCHE ALKOHOLE ZUR BEHANDLUNG EINER BIOLOGISCHEN PROBE

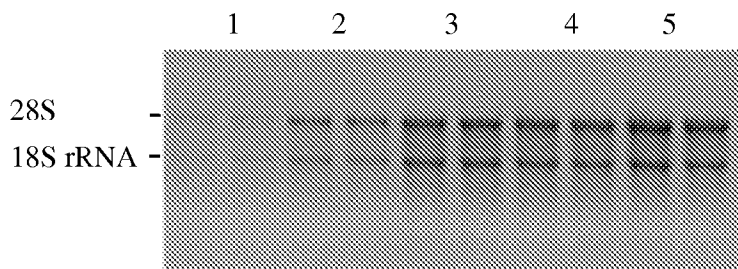


Fig. 4

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the treatment, particularly for the stabilization and/or conservation, of a biological sample, comprising the process steps: i) providing a biological sample, and ii) bringing the biological sample into contact with a composition of (a) 1 to 90 wt.-% of at least one aromatic alcohol, (b) 10 to 99 wt.-% of at least one solvent different from an aromatic alcohol, and (c) 0 to 89 wt.-% of at least one additive different from components (a) and (b), wherein the total amount of components (a) to (c) equals 100 wt.-%. The invention further relates to a method for the treatment, particularly for the stabilization and/or conservation, of a biological sample, to the treated biological

sample obtained by said method, to the use of an aromatic alcohol, to the use of a composition, and to a kit.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung und/oder Konservierung einer biologischen Probe, umfassend die Verfahrensschritte: i) Bereitstellen einer biologischen Probe, und ii) in Kontakt bringen der biologischen Probe mit einer Zusammensetzung (a) 1 bis 90 Gew.-% mindestens eines aromatischen Alkohols, (b) 10 bis 99 Gew.-% mindestens eines von einem aromatischen Alkohol verschiedenen Lösungsmittels, sowie (c) 0 bis 89 Gew.-% mindestens eines von den Komponenten (a) und (b) verschiedenen Zusatzstoffes, wobei die Gesamtmenge der Komponenten (a) bis (c) 100 Gew.-% beträgt. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung und/oder Konservierung einer biologischen Probe, die durch dieses Verfahren erhältliche behandelte biologische Probe, die Verwendung eines aromatischen Alkohols, die Verwendung einer Zusammensetzung sowie ein Kit.

WO 2008/145708 A2

AROMATISCHE ALKOHOLE
ZUR BEHANDLUNG EINER BIOLOGISCHEN PROBE

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung und/oder Konservierung einer biologischen Probe, die durch dieses Verfahren erhältliche behandelte biologische Probe, die Verwendung eines aromatischen Alkohols, die Verwendung einer Zusammensetzung sowie ein Kit.
- 10 Es ist seit langem bekannt, dass die genetische Herkunft und die funktionelle Aktivität einer Zelle durch Studien ihrer Nukleinsäuren bestimmt und untersucht werden kann. Die Analysen der Nukleinsäuren und der Proteine ermöglichen direkte Rückschlüsse auf die Ursache der Aktivitäten von Zellen. Sie sind somit indirekten, konventionellen Methoden, wie zum Beispiel dem Nachweis von
- 15 Stoffwechselprodukten, potentiell überlegen. Daher ist für die Zukunft mit einer starken Verbreitung von Nukleinsäure- und Proteinanalysen zu rechnen. So werden molekularbiologische Analysen bereits in vielen Bereichen eingesetzt, zum Beispiel in der medizinischen und klinischen Diagnostik, in der Pharmazie, bei der Entwicklung und Evaluierung von Arzneimitteln, in der Lebensmittelanalytik
- 20 sowie bei der Überwachung der Lebensmittelherstellung, in der Agrarwirtschaft bei der Züchtung von Nutzpflanzen und Nutztieren, in der Forensik, in der Umweltanalytik sowie in vielen anderen Forschungsgebieten.

Durch die Analyse der RNA, speziell der mRNA in Zellen, lassen sich die Aktivi-

25 täten von Genen direkt bestimmen. Die quantitative Analyse von Transkriptionsmustern (mRNA-Mustern) in Zellen durch moderne molekularbiologische Methoden, wie zum Beispiel Echtzeit-Reverse-Transkriptase-PCR („Real time RT PCR“) oder Genexpressions-Chip-Analysen ermöglichen zum Beispiel die Erkennung fehlerhaft exprimierter Gene, wodurch zum Beispiel Stoffwechselkrankhei-

ten, Infektionen oder die Entstehung von Krebs erkannt werden können. Die Analyse der DNA aus Zellen durch molekularbiologische Methoden wie zum Beispiel PCR, RFLP, AFLP oder durch Sequenzierung ermöglicht zum Beispiel den Nachweis genetischer Defekte oder die Bestimmung des HLA-Typs sowie anderer genetischer Marker. Die Analyse genomischer DNA und RNA wird auch zum direkten Nachweis von infektiösen Erregern, wie zum Beispiel Viren, Bakterien usw. eingesetzt.

Unbedingte Voraussetzung für die Analyse von Biomolekülen, insbesondere von Nucleinsäuren und Proteinen, in biologischen Proben ist jedoch die sofortige Stabilisierung der biologischen Probe, da sich gerade der Status (Genexpressionsprofil oder Proteinmuster) der für die molekularbiologische Untersuchung wichtigen Bestandteile der frischen Proben bereits direkt nach der Entnahme der Probe aus ihrer natürlichen Umgebung rapide verändern kann. Eine längere Lagerung der Proben in einem unbehandelten Zustand, z. B. bedingt durch einen ungewollt verzögerten Transport in ein Labor, kann eine molekularbiologische Analyse verfälschen oder diese gar gänzlich unmöglich machen. Auch weitere Biomoleküle, wie z. B. Metabolite, sowie die Morphologie einer Probe kann durch Lagerung in unbehandeltem Zustand nachteilig beeinflusst werden.

Gerade der Nucleinsäure-Status einer biologischen Probe verändert sich umso stärker, je mehr Zeit zwischen der Entnahme der Probe und ihrer Analyse verstreicht. Besonders schnell erfolgt hierbei der Abbau der Ribonucleinsäuren (RNA) durch allgegenwärtige RNasen. Ebenso kommt es neben dem Abbau von Nucleinsäuren auch zur Induktion von beispielsweise Stressgenen und damit zur Synthese neuer mRNA-Moleküle, die das Transkriptmuster der Probe ebenfalls stark verändern. Daher ist es erforderlich, zum Erhalt des zu untersuchenden Genexpressionsprofils eine sofortige Stabilisierung der Probe durchzuführen. Das Gleiche gilt, wenn eine tiefgefrorene biologische Probe zum Zwecke ihrer Unter-

suchung aufgetaut wird. Auch hier kommt es nach dem Auftauen zu einer raschen Veränderung des Nukleinsäure-Status, insbesondere durch Abbau von Biomolekülen.

- 5 Nicht nur für die Analyse von Nukleinsäuren sondern auch für detaillierte Untersuchungen des Proteoms einer biologischen Probe ist eine sofortige Stabilisierung der Probe notwendig, da auch das Proteinmuster unmittelbar nach Entnahme der Probe verändert wird. Dies erfolgt zum einen durch Degradation bzw. Neusynthese, zum anderen aber besonders rasch durch Veränderungen der Proteinmodifikationen, wie z. B. Phosphorylierung/ Dephosphorylierung.
- 10

Um insbesondere das Expressionsmuster in der biologischen Probe zum Zeitpunkt der Entnahme vollständig zu konservieren, muss die Stabilisierung möglichst sofort nach der Zugabe der Lösung einsetzen, ohne vorherige Vorbehandlungen der Probe. Für die Stabilisierung von Nukleinsäuren in kompakten Gewebeproben ergibt sich im Vergleich zu anderen biologischen Proben eine besondere Schwierigkeit. Gewebe sind, bezüglich ihrer Zusammensetzung, ihrer Inhaltsstoffe sowie dem Aufbau vielschichtig und heterogen. Für die Stabilisierung von Nukleinsäuren in kompakten Gewebeproben muss sich die Wirkung des stabilisierenden Reagenzes nicht nur an der Oberfläche der Zellen bzw. innerhalb einer Zellschicht entfalten, sondern auch tief innerhalb des vielschichtigen Probenmaterials wirken. Zudem müssen häufig innerhalb ein und derselben biologischen Probe sehr verschiedene Gewebe- und/oder Zelltypen adressiert werden können, die sich beispielsweise in der Zellstruktur, dem Membranaufbau, den Kompartimentierungen und den Biomolekülen, beispielsweise hinsichtlich der Proteine, der Kohlenhydrate und/oder dem Fettgehalt, unterscheiden.

15

20

25

Im Laufe der Jahre wurden eine Vielzahl von unterschiedlichsten Fixierungs- oder Stabilisierungsreagenzien bzw. Methoden zur Fixierung bzw. Stabilisierung ent-

wickelt, um einen großen Bereich an verschiedenartigen biologischen Proben zu stabilisieren bzw. fixieren.

5 So ist als eine Methode der Stabilisierung das Einfrieren biologischer Proben seit langem bekannt. Dabei wird die Probe direkt nach der Entnahme aus ihrer natürlichen Umgebung bei -80°C oder tiefer, z. B. in flüssigem Stickstoff, tiefgefroren. Die so behandelte Probe kann dann ohne Integritätsveränderungen bei etwa -70°C nahezu unbegrenzt gelagert werden.

10 Bei histologischen Analysen müssen Gewebestrukturen, sowie zelluläre und subzelluläre Strukturen in ihrem morphologischen Erscheinungsbild während der Lagerung erhalten bleiben. Bei Gewebeproben ist dabei die Fixierung mittels Formalin und gegebenenfalls das anschließende Einbetten der fixierten Proben in Paraffin seit langem bekannt.

15

Weitere bekannte Stabilisierungsverfahren umfassen den Einsatz bestimmter Stabilisierungsreagenzien. Diese Stabilisierungsreagenzien umfassen beispielsweise kationische Detergentien (US 5.010,184, US 5.300,545, WO-A-02/00599 und WO-A-02/00600) oder hochkonzentrierte Ammoniumsulfat-lösungen, wie in der
20 US 6,204,375 beschrieben.

Der Nachteil der aus dem Stand der Technik bekannten Stabilisierungsverfahren besteht jedoch darin, dass entweder die Stabilisierung von Biomolekülen wie etwa Nukleinsäuren in den biologischen Proben nur unbefriedigend und insbesondere
25 die Ausbeute an diesen Biomolekülen aus den herkömmlich stabilisierten Proben häufig nur gering ist und/oder dass die Morphologie der Proben nicht in ausreichendem Maße erhalten bleibt.

Im Falle der Stabilisierung durch Einfrieren kommt noch der Nachteil hinzu, dass dieses Stabilisierungsverfahren durchweg sehr aufwendige, logistische Voraussetzungen erfordert, da ein Auftauen der Proben während des Transports, der Lagerung oder während der unterschiedlichsten An- bzw. Verwendungsprozesse verhindert werden muss. Neben den zusätzlichen Kosten für spezielle Probenaufnahmegefäße sowie für die permanente Kühlung der Proben, ist zudem der Einsatz von flüssigem Stickstoff nicht nur sehr umständlich, sondern auch nur unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen durchführbar. Darüber hinaus gestaltet sich eine nachfolgende Analyse des gefrorenen Probenmaterials, insbesondere einzelner Bestandteile der Probe, zumeist sehr schwierig. Zur Verringerung der Nachteile beim Verarbeiten von gefrorenen Proben sind aus dem Stand der Technik sogenannte Transitionslösungen bekannt. Dabei wird zunächst das gefrorene Gewebe in eine auf -70°C bis -80°C vorgekühlte Lösungen überführt und anschließend darin für einige Stunden (mindestens 16 Std.) bei etwa -20°C gelagert wird. Nachfolgend kann dann die mit der Transitionslösung durchtränkte Probe nur für einen kurzen Zeitraum, beispielsweise maximal zum Zerteilen der Probe, auf Arbeitstemperaturen von -4°C bis zu Raumtemperatur erwärmt werden, ohne dass sich der Nukleinsäurestatus der Probe verändert. Derartige, beispielsweise aus der WO-A-2004/72270 bekannte Transitionslösungen bestehen vornehmlich aus einwertigen Alkoholen.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die sich aus dem Stand der Technik ergebenden Nachteile zu überwinden.

Insbesondere lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung und/oder Konservierung, einer biologischen Probe, vorzugsweise zur Stabilisierung einer biologischen Probe, anzugeben, mit dem Biomoleküle, wie Nukleinsäuren, Proteine und Metabolite, in der biologischen Probe besser stabilisiert werden können. Dabei sollte im

Vergleich zu den herkömmlichen Stabilisierungsverfahren die Menge an isolierbaren Biomolekülen erhöht und/oder die Qualität der Biomoleküle, welche im Falle von Nukleinsäuren beispielsweise durch Gel-Analyse oder durch die Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen einer bestimmten Nukleinsäuremenge bestimmt werden kann, verbessert werden. Auch die Morphologie der biologischen Probe sollte durch das Stabilisierungsverfahren gut erhalten bleiben

Darüber hinaus lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Stabilisierung einer biologischen Probe anzugeben, mit dem sowohl gefrorene als auch frische biologische Proben bei möglichst moderaten Temperaturbedingungen, beispielsweise auch bei Raumtemperatur, ohne Beeinträchtigung des Expressionsprofils oder des Proteoms der biologischen Probe stabilisiert werden können.

Weiterhin sollte das Verfahren zur Behandlung, vorzugsweise zur Stabilisierung einer biologischen Probe zu einer behandelten, vorzugsweise stabilisierten biologischen Probe führen, die nicht nur bei moderaten Temperaturen, beispielsweise bei Raumtemperatur, analysiert werden kann, sondern gegebenenfalls vor oder nach einer solchen Analyse für möglichst lange Zeit bei solchen moderaten Temperaturbedingungen gelagert werden kann.

Im Falle von Biomolekülen soll dabei unter dem Begriff „Stabilisierung“ vorzugsweise die Hemmung des Abbaus, der Modifikation, der Induktion oder der Änderung der Aktivität von Biomolekülen verstanden werden. Im Falle von historischen Analysen der biologischen Proben soll unter dem Begriff „Stabilisierung“ vorzugsweise das Verhindern einer wesentlichen Änderung der Morphologie der Proben verstanden werden.

Einen Beitrag zur Lösung der Eingangs genannten Aufgaben leistet ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung und/oder Konservierung, einer biologischen Probe, umfassend die Verfahrensschritte

- 5 i) Bereitstellen einer biologischen Probe, und
- ii) in Kontakt bringen der biologischen Probe mit einer Zusammensetzung, umfassend
- 10 (a) 1 bis 90 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 75 Gew.-% und besonders bevorzugt 1 bis 50 Gew.-% mindestens eines aromatischen Alkohols,
- (b) 10 bis 99 Gew.-%, vorzugsweise 20 bis 90 Gew.-% und besonders bevorzugt 30 bis 80 Gew.-% mindestens eines von einem aromatischen Alkohol verschiedenen Lösungsmittels, sowie
- 15 (c) 0 bis zu 89 Gew.-%, vorzugsweise 0,01 bis 60 Gew.-% und besonders bevorzugt 1 bis 40 Gew.-% mindestens eines von den Komponenten (a) und (b) verschiedenen Zusatzstoffes,

wobei die Gesamtmenge der Komponenten (a) bis (c) 100 Gew.-% beträgt.

20

Bei dem von einem aromatischen Alkohol verschiedenen Lösungsmittels kann es sich bevorzugt um ein organisches Lösungsmittel handeln.

Überraschend wurde festgestellt, dass sich durch das in Kontakt bringen einer biologischen Probe mit Zusammensetzungen, welche mindestens einen aromatischen Alkohol als Additiv umfassen, Biomoleküle, wie Nukleinsäuren, Proteine oder Metabolite, in der biologischen Probe besser stabilisieren lassen. Die Zusammensetzungen mit dem aromatischen Alkohol zeichnen sich im Vergleich zu den entsprechenden Zusammensetzungen ohne den aromatischen Alkohol durch

25

ein besseres Stabilisierungsvermögen von Biomolekülen in einer biologischen Probe, insbesondere durch ein verbessertes Stabilisierungsvermögen für Nucleinsäuren aus.

- 5 Bei der im Verfahrensschritt i) bereitgestellten biologischen Probe kann es sich um eine gefrorene oder um eine nicht gefrorene biologische Probe handeln, wobei als biologische Probe alle dem Fachmann bekannten biologischen Proben eingesetzt werden können. Bevorzugte biologische Proben sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend Biomoleküle, beispielsweise natürliche, vorzugsweise isolierte
- 10 lineare, verzweigte oder zirkuläre Nucleinsäuren wie RNA, insbesondere mRNA, siRNA, miRNA, snRNA, tRNA, hnRNA oder Ribozyme, DNA und dergleichen, synthetische oder modifizierte Nucleinsäuren, beispielsweise Oligonucleotide, insbesondere für die PCR verwendete Primer, Sonden oder Standards, mit Digo-
- 15 xigenin, Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nucleinsäuren oder sogenannte PNAs („peptide nucleic acids“), natürliche, vorzugsweise isolierte Proteine oder Oligopeptide, synthetische oder modifizierte Proteine oder Oligopeptide, beispielsweise mit Fluoreszenzmarkern oder Enzymen gekoppelte Antikörper, Hormone, Stoffwechselprodukte und Metaboliten, Wachstumsfaktoren, Lipide, Oligosaccharide, Polysaccharide, Proteoglykane, Körperflüssigkeiten wie Blut,
- 20 Sperma, Cerebrospinalflüssigkeit, Speichel, Sputum, Crusta Phlogistica oder Urin, Flüssigkeiten, welche beim Aufarbeiten von Blut erhalten werden, wie etwa Serum oder Plasma, Leukozyten-Fractionen oder „buffy coat“, Blutegelspeichel (Saliva), Fäkalien, Abstriche, Punktate, Schuppen, Haare, Hautfragmente, forensische Proben, Lebensmittel- oder Umweltpollen, die freie oder gebundene Biomoleküle, insbesondere freie oder gebundene Nucleinsäuren enthalten, Stoffwechselprodukte, ganze Organismen, vorzugsweise ganze nicht lebende Organismen,
- 25 Gewebe von Mehrzellern, vorzugsweise von Insekten und Säugetieren, insbesondere vom Menschen, beispielsweise in Form von Gewebeschnitten oder –fragmenten oder Organen, isolierte Zellen, beispielsweise in Form adhärenter oder

suspendierter Zellkulturen, Organellen, beispielsweise Chloroplasten oder Mitochondrien, Vesikel, Zellkerne oder Chromosomen, Pflanzen, Pflanzenteile, Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen, Bakterien, Viren, Viroide, Prionen, Hefen und Pilze.

5

Als eine nichtgefrorene biologische Probe wird im Verfahrensschritt i) des erfindungsgemäßen Verfahrens vorzugsweise eine frisch hergestellte biologische Probe eingesetzt, beispielsweise eine frische Gewebeprobe oder frisch isolierte Blutzellen aus einem lebendigen oder toten Organismus oder, im Falle synthetischer Biomoleküle als biologische Probe, frisch synthetisierte Nukleinsäuren oder Proteine. Unter einer „frischen“ biologischen Probe wird dabei erfindungsgemäß vorzugsweise eine Probe verstanden, die, bevor sie mit der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung im Verfahrensschritt ii) in Kontakt gebracht wird, vor nicht mehr als 96 Stunden, vorzugsweise vor nicht mehr als 48 Stunden, besonders bevorzugt vor nicht mehr als 24 Stunden, darüber hinaus bevorzugt vor nicht mehr als 10 Stunden, darüber hinaus noch mehr bevorzugt vor nicht mehr als 60 Minuten und am meisten bevorzugt vor nicht mehr als 10 Minuten entnommen oder, im Falle eines synthetischen Biomoleküls, synthetisiert worden ist. Die Bezeichnung „frische“ biologische Probe umfasst jedoch auch solche Proben, die innerhalb der vorstehend genannten Zeiträume entnommen worden sind, die jedoch vor dem in Kontakt bringen mit der Zusammensetzung noch vorbehandelt worden sind, beispielsweise mit herkömmlichen Fixativen, wie etwa Formalin, mit Farbstoffen, wie etwa Eosin, mit Antikörpern und dergleichen. Die Herstellung frischer Zell- oder Gewebeproben kann dabei durch alle dem Fachmann zu diesem Zweck bekannten Präparationsverfahren erfolgen, im Falle einer Gewebeprobe beispielsweise mittels eines Skalpells, etwa bei einer Operation oder einer Autopsie, im Falle einer Blutzellprobe durch Zentrifugation von frisch entnommenem Blut und dergleichen. Im Falle eines Einsatzes einer frischen biologischen

10
15
20
25

Probe dient die Zusammensetzung beinhaltend den aromatischen Alkohol als Additiv in erster Linie als Stabilisierungszusammensetzung.

Als eine gefrorene biologische Probe wird im Verfahrensschritt i) des erfindungsgemäßen Verfahrens vorzugsweise eine biologische Probe eingesetzt, die, nachdem sie beispielsweise auf die zuvor beschriebene Art und Weise isoliert worden ist, vor dem in Kontakt bringen mit der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung im Verfahrensschritt ii) zunächst auf Temperaturen von 0°C oder weniger, vorzugsweise auf Temperaturen von -20°C oder weniger und am meisten bevorzugt auf Temperaturen von -70°C oder weniger, etwa durch das in Kontakt bringen mit flüssigem Stickstoff, abgekühlt worden ist. Wird eine auf diese Weise eingefrorene biologische Probe im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt, so dient die Zusammensetzung beinhaltend den aromatischen Alkohol als Additiv in erster Linie als Transitionsreagenz bzw. als Transitionszusammensetzung.

15
Sofern es sich bei der biologischen Probe um eine Probe beinhaltend Zellen handelt, wie etwa einem Gewebe, so ist es besonders bevorzugt, dass diese biologische Probe im nicht-lysierten Zustand vorliegt. „Nicht-lysiert“ bedeutet dabei, dass die Zellen nicht durch mechanischen Stress, durch die Behandlung mittels Proteasen oder durch das in Kontakt bringen mit Reagenzien, welche zur Lyse von Zellen führen, beispielsweise durch das in Kontakt bringen mit Detergenzien, lysiert worden sind. Jede Vorbehandlung der Probe, wie z. B. eine Lyse, vor der Stabilisierung würde zu einem zeitlichen Verzug führen, während dessen das Biomolekülprofil der biologische Proben nicht konserviert ist und somit verändert werden kann.

Im Verfahrensschritt i) wird die biologische Probe mit der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung umfassend mindestens einen aromatischen Alkohol, min-

destens ein von diesem aromatischen Alkohol verschiedenes Lösungsmittel sowie gegebenenfalls einen oder mehrere Zusatzstoffe in Kontakt gebracht.

Bei dem aromatischen Alkohol (a) handelt es sich vorzugsweise um ein oder mehrere Phenolderivate. Zu dieser Gruppe zählen nach diesseitiger Definition insbesondere Phenol, Benzylalkohol (Phenylmethanol), 1,2-Dihydroxibenzol (Brenzcatechin), 1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin), 1,4-Dihydroxibenzol (Hydrochinon), 1,4-Naphthohydrochinon, 2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure), primärer Phenylethylalkohol, sekundärer Phenylethylalkohol, Phenylpropylalkohol, o-Tolylalkohol, p-Tolylalkohol, Cuminalkohol, 4-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxysulfonsäure, p-Nitrophenol, m-, o- oder p-Alkylphenol, vorzugsweise m-, o- oder p-Methylphenol (Kresol) oder m-, o- oder p-Ethylphenol, m-, o- oder p-Halogenphenol, vorzugsweise m-, o- oder p-Chlorphenol oder m-, o- oder p-Bromphenol, oder Mischungen aus mindestens zwei dieser Substanzen. Phenol ist unter all diesen am meisten bevorzugt.

Bei dem Lösungsmittel (b) kann es sich um jedes Lösungsmittel handeln, einschließlich Lösungsmitteln, welche üblicherweise zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung biologischer Proben eingesetzt werden können. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Lösungsmittel um ein Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe umfassend Wasser, einwertige, nichtaromatische Alkohole (Monoole), mehrwertige, nichtaromatische Alkohole, Aldehyde, Ketone, Dimethylsulfoxid, aromatische Kohlenwasserstoffe, halogenierte Kohlenwasserstoffe, Ether, Carbonsäuren, Carbonsäureamide, Nitrile, Nitroalkane, Ester oder Mischungen aus mindestens zwei dieser Lösungsmittel.

Unter diesen Lösungsmitteln besonders bevorzugt sind insbesondere Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe umfassend Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol, 1,2-Propandiol, 1,3-Propandiol, 1,2-Butandiol, 1,3-Butandiol, 1,4-

Butandiol, 1,5-Pentandiol, 2,4-Pentandiol, Ethylenglykol, Propylenglykol, Diethylenglykol, Dipropylenglykol, Triethylenglykol, Tripropylenglykol, 1,2,3-Propantriol, 1,2,6-Hexantriol, 3-Methyl-1,3,5-Pentan-triol, 1,2,4-Butantriol, Ethylenglykol, Propylenglykol, 1,2,3-Propantriol, 1,2,6-Hexantriol, 3-Methyl-1,3,5-Pentantriol, Acetonitril, Aceton, Anisol, Benzonitril, Benzylalkohol, 1-Methoxy-2-Propanol, Quinolin, Cyclohexanon, Diacetin, Dichloromethan, Chloroform, Diethylether, Dimethylether, Toluol, Dimethylketon, Diethylketon, Dimethyladipat, Dimethylcarbonat, Dimethylsulfid, Dioxan, Dimethylsulfoxid, Methylacetat, Ethylacetat, Benzoesäure, Methylbenzoat, Ethylbenzoat, Ethylbenzol, Formamid, Glycerintriacetat, Ethylacetoacetat, Methylacetoacetat, N,N-Diethylacetamid, N-Methyl-N-ethylacetamid, N,N-Dimethylacetamid, N,N-Dimethylformamid, N-Methyl-N-ethylformamid, N,N-Diethylformamid, N,N-Dimethylthioformamid, N,N-Diethylthioformamid, N-Methyl-N-ethylthioformamid, N,N-Dimethylacetamid, N-Methyl-N-Ethylacetamid, N,N-Diethylacetamid, Nitroethan, Nitromethyltoluol, Triethylphosphat oder Mischungen aus mindestens zwei dieser Lösungsmittel, wobei Dimethylsulfoxid, Methanol, Ethanol, Diethylenglykol, Aceton und N,N-Dimethylacetamid am meisten bevorzugt sind.

Bei dem Zusatzstoff (c), der gegebenenfalls in der Zusammensetzung enthalten sein kann, kann es sich um jeden Zusatzstoff handeln, der üblicherweise in Zusammensetzungen zur Behandlung, insbesondere zur Stabilisierung biologischer Proben enthalten ist. Bevorzugte Zusatzstoffe sind dabei ausgewählt aus der Gruppe umfassend Salze, wie beispielsweise Ammoniumsulfid, Ammoniumsulfat, Caesiumsulfat, Lithiumnitrat, Natriumacetat, Kaliumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid oder Calciumchlorid, osmotisch aktive Substanzen, wie etwa Mannitol, Detergentien, Inhibitoren, welche den Abbau von Nukleinsäuren oder Proteinen hemmen, wie beispielsweise der Protease-Inhibitor PMSF oder die kommerziell erhältlichen Produkte ANTI-RNase (Ambion, St. Austin, USA), RNasecure[®] (Ambion) oder DEPC, Alkylierungsmittel, Acetylierungsmittel, Halogenierungs-

mittel, Nukleotide, Nukleotid-analoga-Verbindungen, Aminosäuren, Aminosäure-analoga Verbindungen, Betain, Viskositätsregulierer, Farbstoffe, insbesondere Farbstoffe zum spezifischen Anfärben bestimmter Zellstrukturen, Pufferverbindungen, beispielsweise MES, HEPES, MOPS oder TRIS, Konservierungsmittel, 5 Komplexbildner, wie beispielsweise EDTA oder EGTA, Reduktionsmittel, wie beispielsweise 2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT), Pterin-Hydrogensulfid, Ascorbinsäure, NADPH, Tricarboxyethylphosphin (TCEP) und Hexamethylphosphorsäuretriamid (Me₂N)₃P, Oxidationsmittel wie 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB), Substanzen, welche die Permeabilität von Zellen 10 verbessern, beispielsweise DMSO oder DOPE, chaotrope Substanzen, wie beispielsweise Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidinium-Hydrochlorid, Fixative, wie beispielsweise Formaldehyd oder Glutardialdehyd, Essigsäure oder Trichlororessigsäure, Zucker, Trocknungsmittel wie etwa Silikagel sowie Mischungen aus mindestens zwei, mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf oder mindes- 15 tens sechs dieser Zusatzstoffe.

Sofern Wasser als Lösungsmittel in der Zusammensetzung enthalten ist, sollte die Wassermenge so gering gehalten werden, dass die Zusammensetzung bei einem in Kontakt bringen mit einer biologischen Probe, insbesondere mit einer Zelle bein- 20 haltenden biologischen Probe nicht lysierend wirkt. In diesem Zusammenhang ist es insbesondere bevorzugt, dass, wenn es sich bei dem aromatischen Alkohol um Phenol handelt, die Wassermenge in der Zusammensetzung weniger als 50 Gew.-%, besonders bevorzugt weniger als 40 Gew.-%, noch mehr bevorzugt weniger als 30 Gew.-%, noch mehr bevorzugt weniger als 20 Gew.-%, noch mehr bevorzugt 25 weniger als 10 Gew.-%, und am meisten bevorzugt weniger als 5 Gew.-% jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, beträgt.

Die Herstellung der Zusammensetzung aus dem Lösungsmittel, dem aromatischen Alkohol und gegebenenfalls dem Zusatzstoff erfolgt vorzugsweise durch einfa-

ches Vermischen der Komponenten. Sollte eine der Komponenten einen Schmelzpunkt oberhalb der Raumtemperatur haben, so kann es bevorzugt sein, diese Komponente bis zum Schmelzpunkt zu erhitzen und dann mit den übrigen Komponenten zu vermischen. Denkbar ist aber auch, dass, wenn eine der Komponenten bei der Herstellung der Zusammensetzung in fester und eine andere Komponente in flüssiger Form vorliegt, die feste Komponente in der flüssigen Komponente zu lösen. So kann beispielsweise ein fester Zusatzstoff in einer flüssigen Mischung aus Lösungsmittel und aromatischem Phenol oder festes Phenol in einem flüssigen Lösungsmittel gelöst werden.

10

Das in Kontakt bringen der Zusammensetzung mit der biologischen Probe im Verfahrensschritt ii) erfolgt im Falle einer flüssigen Zusammensetzung vorzugsweise dadurch, dass die biologische Probe in die Zusammensetzung eingetaucht wird, so dass die gesamte Probe von der Zusammensetzung durchtränkt werden kann. Wird als biologische Probe ein Fluid oder isolierte Zellen oder z. B. eine granuläre Probe eingesetzt, so erfolgt das in Kontakt bringen durch Vermischen der biologischen Probe mit der Zusammensetzung oder durch Suspendieren der biologischen Probe in der Zusammensetzung.

20 Es ist weiterhin erfindungsgemäß bevorzugt, dass das in Kontakt bringen der biologischen Probe mit Zusammensetzung bei einer Temperatur in einem Bereich von -80°C bis $+80^{\circ}\text{C}$, bevorzugt in einem Bereich von 0°C bis $+80^{\circ}\text{C}$, noch mehr bevorzugt in einem Bereich von 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8°C bis $+80^{\circ}\text{C}$ und darüber hinaus bevorzugt in einem Bereich von 18°C bis $+80^{\circ}\text{C}$ erfolgt, beispielsweise bei
25 einer Temperatur von mindestens -20°C , -19°C , -18°C , -17°C , -16°C , -15°C , -14°C , -13°C , -12°C , -11°C , -10°C , -9°C , -8°C , -7°C , -6°C , -5°C , -4°C , -3°C , -2°C , -1°C , 0°C , 1°C , 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C , 8°C , 9°C , 10°C , 11°C , 12°C , 13°C , 14°C , 15°C , 16°C , 17°C , 18°C , 19°C , 20°C , 21°C , 22°C , Raumtemperatur, 23°C , 24°C , 25°C , 26°C , 27°C , 28°C , 29°C , 30°C , 31°C , 32°C , 33°C , 34°C ,

35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C oder 60°C erfolgt.

- 5 Dabei bedeutet die Formulierung, dass das „in Kontakt bringen der biologischen Probe mit Zusammensetzung bei einer Temperatur in einem Bereich von -80°C bis +80°C“ oder bei einer der anderen, vorstehend genannten Temperaturen erfolgt, dass nach dem in Kontakt bringen der biologischen Probe mit der Zusammensetzung die Temperatur der auf diese Weise erhaltenen Mischung innerhalb
- 10 der vorstehend genannten Temperaturen liegt. So kann es beispielsweise sein, dass als biologisches Material eine auf Temperaturen von weniger als -20°C tiefgefrorene Probe, beispielsweise eine in flüssigem Stickstoff gelagerte Probe, eingesetzt wird, wobei in diesem Falle eine solche Menge an Zusammensetzung mit einer solchen Temperatur eingesetzt wird, dass nach dem in Kontakt bringen der
- 15 tiefgefrorenen biologischen Probe mit der Zusammensetzung die Temperatur der Mischung (und somit auch die Temperatur der biologische Probe) im vorstehend genannten Temperaturbereich liegt.

Weiterhin kann es gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auch bevorzugt sein, dass die biologische Probe nach dem in

20 Kontakt bringen mit der Zusammensetzung im Verfahrensschritt ii), vorzugsweise unter den vorstehend genannten Temperaturbedingungen, noch in einem sich an den Verfahrensschritt ii) anschließenden Verfahrensschritt iii) bei einer Temperatur in einem Bereich von -80°C bis +80°C, bevorzugt in einem Bereich von 0°C bis +80°C, noch mehr bevorzugt in einem Bereich von 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8°C bis

25 +80°C und darüber hinaus bevorzugt in einem Bereich von 18°C bis +80°C erfolgt, beispielsweise bei einer Temperatur von mindestens -20°C, -19°C, -18°C, -17°C, -16°C, -15°C, -14°C, -13°C, -12°C, -11°C, -10°C, -9°C, -8°C, -7°C, -6°C, -5°C, -4°C, -3°C, -2°C, -1°C, 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C,

10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, Raumtemperatur, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C oder 60°C gelagert wird, wobei diese Lagerung gegebenenfalls über einen Zeitraum von mindestens einem Tag, mindestens 2 Tagen, mindestens 3 Tagen, mindestens einer Woche, von mindestens zwei Wochen, von mindestens einem Monat, von mindestens drei Monaten, von mindestens sechs Monaten oder auch von mindestens 12 Monaten erfolgen kann.

10

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Lagerung einer behandelten biologischen Probe bei Kühlschranktemperaturen, bei Raumtemperatur oder bei noch höheren Temperaturen, ohne dass es zu einem erkennbaren Abbau von Biomolekülen wie Nukleinsäuren oder Proteinen in der biologische Probe kommt. Dieses stellt einen signifikanten Vorteil gegenüber herkömmlichen Stabilisierungsverfahren dar, da das Verfahren ohne den Einsatz von flüssigem Stickstoff oder von Tiefkühlvorrichtungen durchgeführt und die stabilisierte Probe auch ohne den Einsatz von flüssigem Stickstoff oder von Tiefkühlvorrichtungen gelagert werden kann. Insbesondere zum Zwecke einer längerfristigen Archivierung können die Proben natürlich, wie allgemein üblich, auch bei niedrigen Temperaturen, etwa bei -20°C oder -80°C, gelagert werden, wobei dieses jedoch nicht zwingend ist.

Nach der erfindungsgemäßen Behandlung und gegebenenfalls vor oder auch nach einem möglichen Lagerungsschritt iii) kann die behandelte biologische Probe auch in geeignete Einbettungsmittel eingebettet werden, beispielsweise in Paraffin oder dergleichen, um dann aus der biologischen Probe für histologische Untersuchungen geeignete Gewebeschnitte einfacher anfertigen zu können.

Weiterhin kann es gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt sein, dass sich an den Verfahrensschritt i) und ii) noch ein Verfahrensschritt

- 5 iv) Analyse von Biomolekülen in der oder aus der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe und/oder histologische Analyse der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe, besonders bevorzugt jedoch die Analyse von Biomolekülen in der oder aus der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe,

10

anschließt, wobei dieser Verfahrensschritt iv) gegebenenfalls auch vor oder nach einer Lagerung gemäß dem vorstehend beschriebenen Verfahrensschritt iii) durchgeführt werden kann.

- 15 Unter einer histologischen Untersuchung wird vorzugsweise jedes Untersuchungsverfahren verstanden, welches geeignet ist, den morphologischen Zustand eines Gewebes, eines Gewebeschnittes, einer Zelle oder von subzellulären Strukturen zu analysieren, beispielsweise mittels Mikroskopie und gegebenenfalls unter Einsatz von dem Fachmann bekannten Färbe- oder Markierungstechniken.

20

- Als Biomoleküle, die analysiert werden können, kommen alle dem Fachmann bekannten Biomoleküle in Betracht, insbesondere natürliche, modifizierte oder synthetische Nukleinsäuren, natürliche, modifizierte oder synthetische Proteine oder Oligopeptide, Hormone, Wachstumsfaktoren, Substrate des Stoffwechsels, Metabolite, Lipide, Oligosaccharide oder Proteoglykane. Als Nukleinsäuren kommen alle dem Fachmann bekannten Nukleinsäuren in Betracht, insbesondere Ribonukleinsäuren (RNA), beispielsweise mRNA, siRNA, miRNA, snRNA, t-RNA, hnRNA oder Ribozyme, oder Deoxyribonukleinsäuren (DNA). Grundsätzlich kann es sich um jeden Typ von Polynukleotid handeln, der ein N-Glykosid
- 25

oder C-Glykosid einer Purin- oder Pyrimidinbase darstellt. Die Nukleinsäure kann einzel-, doppel- oder mehrsträngig, linear, verzweigt oder zirkulär sein. Sie kann einem in einer Zelle vorkommenden Molekül entsprechen, wie etwa genomische DNA oder Boten-RNA (mRNA), oder *in vitro* erzeugt werden wie Komplementär-DNA (cDNA), Gegenstrang-RNA (aRNA), oder synthetische Nukleinsäuren. Die Nukleinsäure kann aus wenigen Untereinheiten, mindestens zwei Untereinheiten, bevorzugt acht oder mehr Untereinheiten bestehen, wie etwa Oligonukleotide, mehreren hundert Untereinheiten bis hin zu mehreren tausend Untereinheiten, wie etwa bestimmte Expressionsvektoren, oder bedeutend mehr Untereinheiten, wie genomische DNA. Bevorzugt enthält die Nukleinsäure die kodierende Information für ein Polypeptid in funktionellem Zusammenhang mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression des Polypeptids in der Zelle erlauben, in die die Nukleinsäure eingebracht wird oder natürlich vorliegt. So ist die Nukleinsäure in einer bevorzugten Ausführungsform ein Expressionsvektor. In einer anderen Ausführungsform ist sie eine pDNA (Plasmid-DNA), eine siRNA, eine siRNA-Duplizese oder eine siRNA-hetero-Duplizese, wobei unter dem Begriff „siRNA“ Ribonukleinsäuren mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden verstanden werden, die durch Spaltung einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) durch das Enzym „Dicer“ entstehen und in den Enzymkomplex „RISC“ (RNA-induced silencing complex) eingebaut werden.

Am meisten bevorzugt als Biomoleküle sind jedoch Proteine und Nukleinsäuren, wobei Nukleinsäuren besonders bevorzugt und RNAs am meisten bevorzugt sind.

Die Formulierung „Analyse von Biomolekülen in der oder aus der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe“ bedeutet dabei, dass die Analyse sowohl *in situ* als auch *ex situ*, also beispielsweise nach Isolierung der Biomoleküle aus der biologischen Probe erfolgen kann. Sollen Biomoleküle aus einer biologischen Probe zum Zwecke der Analyse isoliert werden, so kann es

- vorteilhaft sein, insbesondere im Falle von Zellen, Geweben oder anderen komplexen oder kompakten Proben die Proben zunächst zu homogenisieren, wobei dieses Homogenisieren auf mechanischem Weg, beispielsweise mittels Kanülen, Mörsern, Rotor-Stator-Homogenisatoren, einer Kugelmühle oder dergleichen, auf
- 5 chemischem Weg durch den Einsatz geeigneter Lysepuffer, welche üblicherweise Detergenzien und/oder chaotrope Substanzen beinhalten, auf enzymatischem Weg, beispielsweise unter Einsatz von Proteasen, oder durch eine Kombination dieser Maßnahmen, durchgeführt werden kann.
- 10 Zur histologischen Analyse oder zur Analyse von Biomolekülen in der oder aus der biologischen Probe können dabei alle dem Fachmann bekannten und geeignet erscheinenden Analyseverfahren eingesetzt werden, vorzugsweise Verfahren ausgewählt aus der Gruppe umfassend die Lichtmikroskopie, die Elektronenmikroskopie, die konfokale Laserscanningmikroskopie, die Laser-Micro-Dissection,
- 15 Scanningelektronenmikroskopie, das Western-Blotting, den Southern-Blotting, Northern-Blotting, den Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA), die Immunpräzipitation, die Affinitätschromatographie, die Mutationsanalyse, die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), insbesondere die zweidimensionale PAGE, die HPLC, die Polymerasekettenreaktion (PCR), die RFLP-Analyse (Restriction
- 20 Fragment Length Polymorphism-Analyse), die SAGE-Analyse (Serial Analysis of Gen Expression), die FPLC-Analyse (Fast Protein Liquid Chromatography), die Massenspektrometrie, beispielsweise die MALDI-TOFF-Massenspektrometrie oder die SELDI-Massenspektrometrie, die Microarray-Analyse, die LiquiChip-Analyse, die Analyse der Aktivität von Enzymen, HLA-Typing, Sequenzierung,
- 25 WGA („Whole Genome Amplification“), WTA („Whole Transkriptome Amplification“), RT-PCR, Real-Time-PCR bzw. –RT-PCR, RNase-Protection-Analyse oder Primer-Extension-Analyse.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst der Verfahrensschritt iv) eine Analyse von Nukleinsäuren in der oder aus der biologischen Probe und/oder eine Analyse von Proteinen in der oder aus der biologischen Probe.

5

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet auch die durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelte biologische Probe.

10 Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe leistet auch die Verwendung eines aromatischen Alkohols, vorzugsweise von Phenolderivaten, besonders bevorzugt von Phenol, in einer Zusammensetzung zur Behandlung einer gefrorenen oder nicht gefrorenen biologischen Probe gemäß dem eingangs beschriebenen Verfahren.

15 Auch die Verwendung eines aromatischen Alkohols, vorzugsweise von Phenolderivaten, besonders bevorzugt von Phenol, zur Behandlung einer biologischen Probe unter nicht-lysierenden Bedingungen leistet einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben, wobei als aromatische Alkohole und biologische Proben diejenigen aromatischen Alkohole bzw. biologische Proben bevorzugt sind,
20 die bereits eingangs im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren genannt worden sind.

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet auch die Verwendung einer Zusammensetzung umfassend

25

(a) 1 bis 90 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 75 Gew.-% und besonders bevorzugt 1 bis 50 Gew.-% mindestens eines aromatischen Alkohols,

- (b) 10 bis 99 Gew.-%, vorzugsweise 20 bis 90 Gew.-% und besonders bevorzugt 30 bis 80 Gew.-% mindestens eines von einem aromatischen Alkohol verschiedenen Lösungsmittels, sowie
 - (c) 0 bis zu 89 Gew.-%, vorzugsweise 0,01 bis 60 Gew.-% und besonders bevorzugt 0,1 bis 40 Gew.-% mindestens eines von den Komponenten (a) und
- 5 (b) verschiedenen Zusatzstoffes,

wobei die Gesamtmenge der Komponenten (a) bis (c) 100 Gew.-% beträgt,

- 10 zur Behandlung einer biologischen Probe, insbesondere zur Stabilisierung von Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen oder Metaboliten, besonders bevorzugt von Nukleinsäuren und Proteinen, am meisten bevorzugt von Nukleinsäuren und insbesondere bevorzugt von RNAs, wie etwa mRNAs, in einer oder aus einer biologischen Probe und/oder zur histologischen Analyse einer biologischen Probe,
- 15 wobei als Lösungsmittel, aromatische Alkohole und Zusatzstoffe diejenigen Verbindungen bevorzugt sind, die bereits eingangs im Zusammenhang mit dem erfindungsgenannten Verfahren als bevorzugte Ausführungsformen beschrieben wurden.

- 20 Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet auch ein Kit, umfassend

- (a) die vorstehend beschriebene Zusammensetzung, sowie optional
- 25 (b) Reagenzien zur Analyse von Biomolekülen in oder aus einer biologischen Probe und/oder zur Analyse der Morphologie einer biologischen Probe.

Bei den Reagenzien zur Analyse von Biomolekülen in oder aus einer biologischen Probe oder zur Analyse der Morphologie einer biologischen Probe kann es sich

grundsätzlich um alle dem Fachmann bekannten Reagenzien handeln, die zur oder bei der morphologischen Analyse einer biologischen Probe oder zur oder bei der Analyse von Biomolekülen in einer oder aus einer biologischen Probe verwendet werden können. Diese Reagenzien umfassen insbesondere Farbstoffe zum Färben von Zellen oder Zellbestandteilen, Antikörper, gegebenenfalls markiert mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen, eine Absorptionsmatrix, wie etwa DEAE-Zellulose oder eine Silica-Membran, Substrate für Enzyme, Agarose-Gele, Polyacrylamid-Gele, Lösungsmittel wie Ethanol, chaotrope Reagenzien oder Phenol, wässrige Pufferlösungen, RNase-freies Wasser, Lyse-Reagenzien, alkoholische Lösungen und dergleichen.

Weiterhin kann ein erfindungsgemäßes Kit als Komponente beispielsweise mindestens eine Vorrichtung (c), beispielsweise in Form eines verschließbaren Gefäßes, zur Sammlung oder Aufnahme einer festen oder flüssigen biologischen Probe enthalten. Dabei kann die Vorrichtung (c) gegebenenfalls vor Sammlung oder Aufnahme der biologischen Probe die Zusammensetzung enthalten. Bei der Vorrichtung kann es sich um jedes dem Fachmann bekannte Gefäß zur Sammlung oder Aufnahme einer festen oder flüssigen biologischen Probe handeln. Bevorzugte Gefäße sind beispielsweise Falcon-Tubes, Eppendorf-Gefäße, Greiner-Röhrchen, oder eines der in den Druckschriften US 6,602,718, US 2004/0043505 A1, US 2005/0160701 A1, US 2003/0086830 A1, US 2003/0087423 A1 oder WO 2005/014173 A1 beschriebenen Gefäße.

Ein erfindungsgemäßes Kit kann dabei

25

- (a) Eine Zusammensetzung wie oben beschrieben, sowie
- (c) eine Vorrichtung zur Sammlung oder Aufnahme einer festen oder flüssigen biologischen Probe, wobei die Vorrichtung gegebenenfalls vor Sammlung oder Aufnahme der biologischen Probe mindestens eine der unter (a) ge-

nannten Verbindungen oder eine Zusammensetzung beinhaltend mindestens eine unter (a) genannten Verbindungen enthalten kann.

Alternativ kann ein weiteres erfindungsgemäßes Kit die oben beschriebenen Komponenten (a), (b) und (c) enthalten.

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet auch ein Verfahren zur Behandlung einer Krankheit, umfassend die Verfahrensschritte:

- 10 (a) Diagnose der Krankheit durch ein Diagnoseverfahren, welches die Analyse einer biologischen Probe durch vorstehend beschriebene Verfahren umfassend die Verfahrensschritt i), ii) und iv) umfasst, sowie
- (b) therapeutische Behandlung der diagnostizierten Krankheit.

15

Die Erfindung wird nun anhand nichtlimitierender Figuren und Beispiele näher erläutert.

Es zeigt die Figur 1 den im Beispiel 3 erhaltenen Western-Blot.

20

Es zeigt die Figur 2 ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gel, in dem die Proben aus dem Beispiel 6 aufgetragen wurden.

Es zeigt die Figur 3 ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gel, in dem die Proben aus dem Beispiel 8 aufgetragen wurden.

25

Es zeigt die Figur 4 ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gel, in dem die Proben aus dem Beispiel 5 aufgetragen wurden.

BEISPIELE

1. Stabilisierung von RNA in biologischen Proben in Gegenwart von Phenol

- 5 Nierengewebe der Ratte wurde unverzüglich nach Organentnahme mit 500 µl 30 % Phenol in DMSO versetzt und bei verschiedenen Temperaturen gelagert (siehe Tabelle 1). Im Anschluss an die Lagerung wird die RNA aus den gelagerten Proben isoliert.
- 10 Zur RNA-Isolierung wird das Gewebe nach Lagerung aus den Lösungen entfernt und je 5 mg Gewebe 500 µl eines handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-Puffers, wie z. B. RLT-Puffer der Firma QIAGEN zugeben. Die Probe wird mit Hilfe einer Kugelmühle, wie z. B. TissueLyzer der Firma QIAGEN, über einen Zeitraum von 2 × 5 min bei 25 Hz mit einer 5 mm Stahlkugel homogenisiert, wo-
- 15 bei der Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer auf aus dem Stand der Technik bekannte Weise die Zellen lysiert und die freigesetzten Proteine denaturiert. Anschließend werden die Lysate bei 14000 UpM für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand werden 500 µl, die 5 mg Gewebe repräsentieren, abgenommen. Zu diesen Proben wird 1 Volumen (500 µl) 70 %-iges Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges
- 20 Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt. Das Lysat wird anschließend in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene 96 well-Platte, wie z. B. RNeasy96-plate der Firma QIAGEN, aufgetragen und durch Zentrifugation (4 min bei 6000 UpM) durch die Membran hindurchgeführt. Die RNA bleibt an der Membran gebunden und wird anschließend mit ei-
- 25 nem ersten handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer, beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN, gewaschen. Anschließend wird zur enzymatischen Entfernung etwaig gebundener gesamt-DNA DNAseI in einen geeigneten Puffer auf die Säule aufgeben und für 15 min bei Raumtemperatur zwecks Abbau der gebundenen DNA inkubiert. Im Anschluss wird

erneut mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer, beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN, und danach mit einem zweiten Tris-haltigen bzw. Tris- und alkoholhaltigen Waschpuffer, z. B. Puffer RPE der Firma QIAGEN, gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation (4 min bei 6000 UpM) durch die Membran hindurchgeführt. Die Waschung mit dem zweiten Tris-haltigen bzw. Tris- und alkoholhaltigen Waschpuffer wird wiederholt wobei gleichzeitig die Membran durch die Zentrifugation (10 min 6000 UpM) getrocknet wird. Zur Elution werden 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Nach einer Inkubation von 1 min bei einer Temperatur im Bereich von 10 - 30°C wird das Eluat durch Zentrifugation (1 min bei 10000 ×g) durch die Membran hindurchgeführt und der Elutionsschritt wird zum Zwecke einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird nach Verdünnung in Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Isolierungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Lagerung	260nm/280nm	RNA-Ausbeute [µg]
1d 37°C	2,14	19,7
7d RT	2,09	9,5
3d 4°C	2,05	4,2

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, wird durch eine erfindungsgemäße Zusammensetzung RNA in biologischen Proben stabilisiert.

2. Stabilisierung von DNA in biologischen Proben in Gegenwart von Phenol

Nierengewebe der Ratte wurde unverzüglich nach Organentnahme mit 500 µl 30 % Phenol in DMSO versetzt und bei verschiedenen Temperaturen gelagert (siehe Tabelle 2). Im Anschluss an die Lagerung wird die DNA aus den gelagerten Proben isoliert.

Zur DNA-Isolierung wird das Gewebe nach Lagerung aus den Lösungen entfernt und je 10 mg Gewebe in 180 µl des Puffers ALT des Herstellers QIAGEN zugeben. Die Probe wird mit Hilfe einer Kugelmühle, wie z. B. TissueLyzer der Firma QIAGEN, über einen Zeitraum von 30 s bei 25 Hz mit einer 5 mm Stahlkugel homogenisiert und anschließend für 15 s bei 14000 × g zentrifugiert. Nach Zugabe von 120 µl der Protease K-Lösung (Hersteller QIAGEN) werden die Ly-
sate für 2 Stunden bei 55°C unter schütteln inkubiert. Nach der Inkubation werden
4 µl RNase A (100 mg/ml) zugeben, gemischt und die Mischung für 2 min bei
Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird 300 µl eines handelsüblichen Guanidinium-Hydrochloridhaltigen Lysepuffers, wie der Puffer AL des Herstellers QIAGEN, zugegeben und die Proben mittels Vortexen durchmischt. Es erfolgt eine Inkubation bei 70°C für 10 min. Nach Mischung mit 300 µl 100 %
Ethanol werden die Proben auf eine Silicamembran enthaltende 96 well-Platte (DNeasy 96-plate der Firma QIAGEN) aufgetragen und das Lysat mittels Zentrifugaion für 10 min bei 6000 UpM durch die Membran geführt. Die DNA bleibt an der Membran gebunden und wird zunächst mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-Hydrochlorid-haltigen Waschpuffer, beispielsweise mit dem Puffer AW1 der Firma QIAGEN, und danach mit einem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer, z. B. Puffer AW2 der Firma QIAGEN, gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation (5 min bei 6000 UpM) durch die Membran hindurchgeführt. Im Anschluss wird die Platte für 10 min bei 70°C inkubiert. Die Elution der DNA erfolgt durch Auftrag von 200 µl des auf 70°C vor-

gewärmten Elutionspuffers AE (QIAGEN). Nach einminütiger Inkubation wird der Elutionspuffer durch Zentrifugation durch die Membran hindurchgeführt (5 min bei 6000 UpM) und die Elution wiederholt.

- 5 Die Menge an isolierter Gesamt-DNA wird nach Verdünnung in Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der so gewonnenen DNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Isolierungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

10

Tabelle 2

Lagerung	260nm/280nm	DNA-Ausbeute [µg]
1d 37°C	1,92	10,6
3d 25°C	2,01	25,0
7d 25°C	1,98	13,8
3d 4°C	1,97	11,1
7d 4°C	1,98	15,3

Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, können aus den erfindungsgemäß stabilisierten Proben, welche für mehrere Tage bei Temperaturen von bis zu 37°C gelagert wurden, auch noch ausreichende Mengen an DNA isoliert werden.

15

3. Stabilisierung von Proteinen in biologischen Proben in Gegenwart von Phenol

20 Lebergewebe der Ratte wurde unverzüglich nach Organentnahme mit je 1 ml 30% Phenol in DMSO (Probe1) oder PBS (als Negativkontrolle, Probe 2) versetzt und für 3 Tage bei 25°C im Inkubator gelagert. Im Anschluss an die Lagerung wird ein Proteinextrakt aus den gelagerten Proben hergestellt. Zur Positivkontrolle (Probe 3) wird Lebergewebe verwendet, welches nach Entnahme aus der Ratte

direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurde.

Zur Herstellung des Proteinextraktes wird das Gewebe nach Lagerung aus den
5 Lösungen entfernt und je 10 mg Gewebe 400 µl eines üblichen Extraktionspuffers, hier in einer Zusammensetzung von 8 M Harnstoff, 100 mM Natriumdi-
hydrogenphosphat und 10 mM Tris, pH 8,0, zugeben und die Probe mit Hilfe einer Kugelmühle, z. B. dem TissueLyzer der Firma QIAGEN, homogenisiert. Das
so entstandene Lysat wird für 15 s bei möglichst hoher Drehzahl (z. B. ca.
10 20000 × g) zentrifugiert um ungelöste Bestandteile zu pelletieren. Der proteinhaltige Überstand wird abgenommen und die Proteinkonzentration mittels eines
Bradford-Testes bestimmt. Je 1,5 µg Protein wird auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach üblichem Verfahren aufgetrennt und mittels einer Se-
midry-Blotting-Apperatur nach Angaben des Herstellers auf eine Nitrozellulose-
15 membran geblottet. Die Membran wird nach dem Stand der Technik mit Milchpulver abgesättigt und mit einem ERK2-spezifischen Antikörper, z. B. der Firma
QIAGEN, nach Angaben des Herstellers hybridisiert, und eine Immunodetektion durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Figur 1 gezeigt.

20 Der Nachweis eines spezifischen Proteins, hier einer Kinase, belegt, daß die Proteine durch die Phenolhaltige Lösung bei Raumtemperatur stabilisiert werden.

4. Histologische Analyse von stabilisierten Geweben

25 Leber und Nierengewebe der Ratte wurde unverzüglich nach Organentnahme mit je 1 ml 30 % Phenol gelöst in DMSO versetzt und für 1 Tag bei 25°C im Inkubator gelagert. Nach der Lagerung: werden die Gewebestücke aus den Lösungen entnommen, in Plastikkassetten überführt und nach üblichen Protokollen in einer aufsteigenden Ethanolreihe, sowie in Xylol inkubiert und in Paraffin eingebettet.

Mit Hilfe eines Microtoms werden Schnitten aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe erstellt und diese auf dem Objektträger nach üblichen Methoden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Die gefärbten Gewebeschnitte werden lichtmikroskopisch untersucht, wobei erkennbar wird, dass die Lösung den Erhalt
5 der Morphologie der Gewebe ermöglicht.

5. Transition gefrorener biologischer Proben in Gegenwart von Phenol

Lebergewebe aus Ratte, welches nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert wurde, wird für diesen Versuch verwendet. Für jedes
10 Transitionssexperiment werden 20 bis 50 mg Gewebe abgewogen und gefroren mit verschiedenen, nicht-gekühlten (Raumtemperatur) Behandlungszusammensetzungen (siehe Tabelle 3) versetzt und für 3 Tage bei 25°C gelagert. Im Anschluss an die Transition wird die RNA aus den gelagerten Proben isoliert.

15 Dazu wird das Gewebe nach Lagerung aus den Behandlungslösungen entfernt und zu je 10 mg Gewebe $350\ \mu\text{l}$ eines handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-Puffers, wie z. B. RLT-Puffer der Firma QIAGEN zugeben. Die Probe wird mit Hilfe einer Kugelmühle, wie z. B. MM300 der Firma QIAGEN, über einen Zeitraum von $2 \times 2\ \text{min}$ bei 20 Hz mit einer 5 mm Stahlkugel homogenisiert, wobei
20 der Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer auf aus dem Stand der Technik bekannte Weise die Zellen lysiert und die freigesetzten Proteine denaturiert. Anschließend werden die Lysate bei 14000 UpM für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand werden zwei Portionen von je $350\ \mu\text{l}$, die entsprechend 10 mg Gewebe repräsentieren,
25 abgenommen. Zu diesen Proben wird 1 Volumen ($350\ \mu\text{l}$) 70 %-iger Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt. Das Lysat wird anschließend in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene spin-Säule, wie z. B. RNeasy-Säulen der Firma QIAGEN, aufgetragen und durch Zentrifugation (1 min bei $10.000 \times g$)

durch die Membran hindurchgeführt. Die RNA bleibt an der Membran gebunden und wird anschließend mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer, beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN, und danach mit einem zweiten Tris-haltigen bzw. Tris- und alkoholhaltigen Waschpuffer, z. B. Puffer RPE der Firma QIAGEN, gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation (1 min bei 10.000 × g) durch die Membran hindurchgeführt. Die Waschung mit dem zweiten Tris-haltigen bzw. Tris- und alkoholhaltigen Waschpuffer wird mit einem geringeren Volumen wiederholt, wobei gleichzeitig die Membran durch die Zentrifugation (2 min bei 20.000 × g) getrocknet wird. Zur Elution werden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Nach einer Inkubation von 1 min. bei einer Temperatur im Bereich von 10 - 30°C wird das Eluat durch Zentrifugation (1 min bei 10.000 × g) durch die Membran hindurchgeführt und der Elutionsschritt wird zum Zwecke einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Im Anschluss werden die Menge und Qualität der RNA bestimmt, wie unter Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse sind ebenfalls der Tabelle 3 zu entnehmen. Die isolierte RNA wird auf einem 1,0%igen Formaldehydagarose-MOPS-Gel, das mit Ethidiumbromid angefärbt ist, analysiert. Das Ergebnis ist in Figur 4 gezeigt.

Tabelle 3

Bahn	Behandlungszusammensetzung	260nm/280nm	RNA-Ausbeute [µg]
1	100% DMSO	1,77	7,1
2	4,97 ml DMSO + 0,497 g Phenol	1,78	17,5
3	4,6 ml DMSO + 0,92 g Phenol	1,78	41,3
4	4,93 ml DMSO + 1,48 g Phenol	1,81	37,0
5	4,28 ml DMSO + 1,71 g Phenol	1,79	50,3

Der Tabelle 3 und der Figur 4 sind zu entnehmen, dass Phenol auch in Transiti-

onszusammensetzungen einen positiven Einfluss auf die Stabilisierung von Biomolekülen wie RNA in biologischen Proben hat.

5 6. Transition gefrorener biologischer Proben in Gegenwart von Phenol in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln

Leber- oder Nierengewebe der Ratte, welches nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert wurde, wird für diesen Versuch verwendet. Für jedes Transitionsexperiment werden 20 bis 50 mg Gewebe abgewogen und gefroren mit verschiedenen, nicht-gekühlten Behandlungszusammensetzungen versetzt (verwendete Lösungen siehe Tabelle 4) und für 3 Tage bei 25°C gelagert. Im Anschluss an Transition und Lagerung wird die RNA aus den gelagerten Proben isoliert, wie unter Beispiel 5 beschrieben. Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0%ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils $5\ \mu\text{l}$ des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in der Figur 2 gezeigt.

20 Tabelle 4

Probe	Behandlungszusammensetzung	Probe
1	5,06ml Methanol + 0,506 g Phenol	Leber
2	5,07ml Methanol+ 1,014 g Phenol	Leber
3	75 ml Methanol+ 25 g Phenol	Leber
4	4,77ml Aceton+ 0,477 g Phenol	Leber
5	5,10ml N,N-Dimethylacetamid+ 0,51 g Phenol	Leber
6	4,69ml N,N-Dimethylacetamid+ 0,937 g Phenol	Leber
7	5,25ml Diehtylenglycol+ 1,05 g Phenol	Leber
8	8,3g DMSO+ 0,415 g Phenol	Niere
9	37,5ml DMSO+ 12,5 g Phenol	Leber

Wie der Figur 2 zu entnehmen ist, weist Phenol in verschiedenen organischen

Lösungsmitteln auch in einer Transitionszusammensetzung einen positiven Einfluss auf die Stabilisierung von RNA auf.

7. Verbesserung der Stabilisierungseigenschaften von Phenol in Behandlungszusammensetzungen durch Zusatzstoffe

Lebergewebe der Ratte, welches nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert wurde, wird für diesen Versuch verwendet. Für jedes Transitionsexperiment werden 20 bis 50 mg Gewebe abgewogen und gefroren mit je 1 ml einer nicht-gekühlten Lösung aus 25% Phenol und 75% DMSO und verschiedenen Zusatzstoffen versetzt (verwendete Lösungen siehe Tabelle 5). Hierzu werden 950 μl der Phenol-DMSO-Lösung mit je 50 μl der jeweils 1 M Zusatzstoffe versetzt, so dass die Endkonzentration der Zusatzstoffe jeweils 50 mM beträgt. Im Falle von DTT als Zusatzstoff werden 944,5 μl der Phenol-DMSO-Lösung mit 55,5 μl einer 0,9 M DTT-Lösung gemischt, so dass auch hier die Zusatzstoff-Endkonzentration 50 mM beträgt. Zum Vergleich wird 1 ml der Phenol-DMSO-Lösung ohne Zusatzstoff-Zugabe verwendet. Die Proben werden für 3 Tage bei 25°C gelagert. Im Anschluss an die Transition und Lagerung wird die RNA aus den gelagerten Proben isoliert, wie unter Beispiel 5 beschrieben. Das Ergebnis ist ebenfalls der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5

Zusatzstoff	260nm/280nm	RNA-Ausbeute [μg]
	1,81	15,5
Morpholinoethansulfonsäure	1,75	23,2
MOPS	1,83	22,1
Betain	1,76	37,6
DTT	1,74	54,5

Auch der Tabelle 5 ist zu entnehmen, dass durch den Zusatz bestimmter Zusatzstoffe die stabilisierenden Eigenschaften von Phenol auch in Transitionszusammensetzungen weitere verbessert werden können.

5 8. Lagerung der Probe nach Transition außerhalb der Behandlungszusammensetzung

Lebergewebe der Ratte, welches nach Entnahme in flüssigem Stickstoff einfroren und bei -70°C gelagert, wird für diesen Versuch verwendet. Für jedes Transitionsexperiment werden 20 bis 50 mg Gewebe abgewogen und gefroren mit einer auf
10 im Kühlschrank auf 2°C bis 8°C vorgekühlten Lösung aus 30% Phenol, gelöst in DMSO, versetzt. Die Proben werden über Nacht bei 2° - 8°C im Kühlschrank gelagert.

15 Nach der Transition werden die Proben aus der Transitionszusammensetzung entnommen und trocken bei Raumtemperatur für 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 2h 30 min und 4h 30 min gelagert. Anschließend wird die RNA, wie unter Beispiel 1 beschrieben, isoliert.

20 Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert, wie unter Beispiel 6 beschrieben. Das Ergebnis ist in Figur 3 wiedergegeben.

Der Figur 3 kann entnommen werden, dass nach der erfindungsgemäßen Transition gefrorener biologischer Proben diese Proben auch für längere Zeiträume außerhalb der Behandlungszusammensetzung ohne Einbußen hinsichtlich der Menge und der Qualität der RNA in der biologischen Probe gelagert werden können.
25

9. Stabilisierung von RNA in biologischen Proben in Gegenwart von Phenol

Lebergewebe der Ratte wurde unverzüglich nach Organentnahme mit 1ml verschiedener Zusammensetzungen (siehe Tabelle 6) versetzt und 3 Tage im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert. Im Anschluss an die Lagerung wird die RNA aus den
5 gelagerten Proben isoliert wie in Beispiel 5 beschrieben. Das Ergebnis ist ebenfalls der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6:

Zusammensetzung	260nm/280nm	RNA-Ausbeute [µg]
5% Phenol in DMSO	1,94	35,5
10% Phenol in DMSO	1,98	48,9
30% Phenol in DMSO	2,0	44,3

10

Der Tabelle 6 kann entnommen werden, dass unterschiedliche Konzentrationen des aromatischen Alkohols zur Stabilisierung verwendet werden können.

Die vorstehend beschriebenen Beispiele zeigen, dass aromatische Alkohole wie
15 Phenol in unterschiedlichsten Zusammensetzungen einen positiven Einfluss auf die Stabilisierung von Biomolekülen, insbesondere von Nukleinsäuren oder Proteinen, sowohl bei der Behandlung frischer, nicht-geforener biologischer Proben als auch bei der Behandlung gefrorener biologischer Proben haben.

Ether, Carbonsäuren, Carbonsäureamide, Nitrile, Nitroalkane, Ester oder Mischungen aus mindestens zwei dieser Lösungsmittel.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Zusatzstoff (c) ausgewählt ist aus der Gruppe beinhalten Detergentien, Inhibitoren, welche den Abbau von Nukleinsäuren oder Proteinen hemmen, Viskositätsregulierer, Farbstoffe, Pufferverbindungen, Konservierungsstoffe, Komplexbildner, Reduktionsmittel, Substanzen, welche die Permeabilität von Zellen verbessern, chaotrope Substanzen, Zucker, Trocknungsmittel, Alkylierungsmittel, kreuzvernetzende Agentien, Salze, osmotisch aktive Substanzen, Fixative sowie Mischungen aus mindestens zwei dieser Zusatzstoffe.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei der Komponente (a) um ein Phenolderivat handelt, bevorzugt um Phenol.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Zusammensetzung weniger als 50 Gew.-% Wasser, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, als Zusatzstoff beinhaltet.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das in Kontakt bringen der biologischen Probe mit der Zusammensetzung bei einer Temperatur in einem Bereich von -80°C bis +80°C erfolgt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verfahren zusätzlich zu den Verfahrensschritten i und ii) optional noch den Verfahrensschritt

- iii) Lagerung der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe bei einer Temperatur in einem Bereich von -80°C bis $+80^{\circ}\text{C}$
- 5 und/oder den Verfahrensschritt
- iv) Analyse von Biomolekülen in der oder aus der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe und/oder histologische Analyse der mit der Zusammensetzung in Kontakt gebrachten biologischen Probe
- 10 umfasst.
9. Eine biologische Probe, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
- 15
10. Verwendung eines aromatischen Alkohols in einer Zusammensetzung zur Behandlung einer gefrorenen oder nicht gefrorenen biologischen Probe gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
- 20
11. Verwendung eines aromatischen Alkohols zur Behandlung einer gefrorenen oder nicht gefrorenen biologischen Probe unter nicht-lyisierenden Bedingungen.
- 25 12. Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend
- (a) 1 bis 90 Gew.-% mindestens eines aromatischen Alkohols,
- (b) 10 bis 99 Gew.-% mindestens eines von einem aromatischen Alkohol verschiedenen Lösungsmittels, sowie

- (c) 0 bis 89 Gew.-% mindestens eines von den Komponenten (a) und (b) verschiedenen Zusatzstoffes,

wobei die Gesamtmenge der Komponenten (a) bis (c) 100 Gew.-% beträgt,

5

zur Behandlung einer biologischen Probe.

13. Ein Kit, beinhaltend

- 10 (a) die Zusammensetzung, wie in einem der Ansprüche 1, 3, 4, 5 und 6, sowie optional

- (b) Reagenzien zur Analyse von Biomolekülen in oder aus einer biologischen Probe und/oder zur Analyse der Morphologie einer biologischen Probe,

15

- (c) mindestens eine ggf. verschließbare Vorrichtung zur Sammlung oder Aufnahme einer biologischen Probe, wobei gegebenenfalls die Zusammensetzung (a) zur Sammlung oder Aufnahme der biologischen Probe enthalten sein kann,

20

- (d) mindestens ein Reagenz zur Analyse von Biomolekülen in oder aus einer biologischen Probe und/oder zur Analyse der Morphologie einer biologischen Probe sowie.

25

1/4

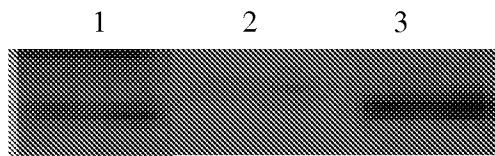


Fig. 1

2/4

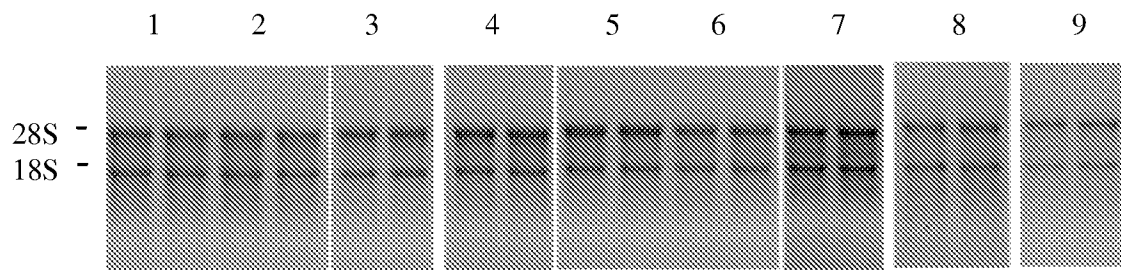


Fig. 2

3/4

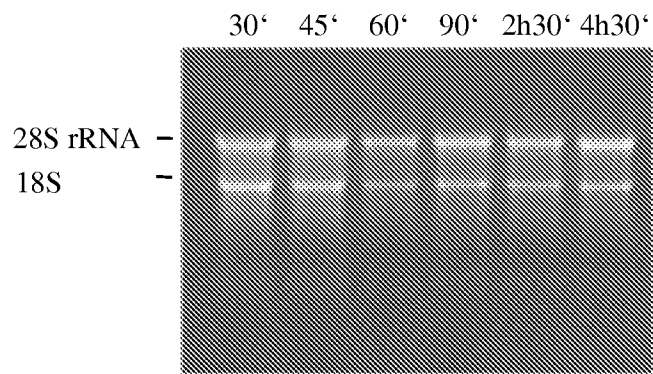


Fig. 3

4/4

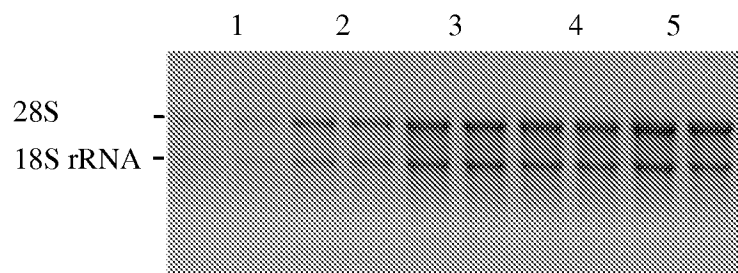


Fig. 4