



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 116 795** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **A 61 K 35/66, C 07 H 21/04**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 96112929/14, 10.07.1996
(46) Дата публикации: 10.08.1998
(56) Ссылки: Sambrook J. et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", N.-J., 1989.

(71) Заявитель:
Евтушенко Владимир Иванович
(72) Изобретатель: Евтушенко Владимир Иванович
(73) Патентообладатель:
Евтушенко Владимир Иванович

(54) **НАБОР ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК**

(57) Реферат:
Изобретение относится к области медицины, точнее к набору для выделения ДНК, и может найти применение в диагностике наследственных, злокачественных и вирусных заболеваний, связанных с исследованием ДНК. Набор состоит из лизирующего буфера в виде 3-10 М раствора мочевины, связывающего буфера в виде 2,5 - 5,0 М хлористого натрия,

элюирующего буфера в виде раствора 10 мМ Трис-HCl и 1 мМ Трилона Б с pH 8, 80%-ного этилового спирта в качестве отмывочного буфера и в качестве сорбента - силикагель. Набор позволяет выделять ДНК из биологических объектов с высоким выходом и высокой степенью чистоты, позволяющей использовать его в медицинской практике для диагностических целей.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 116 795** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 35/66, C 07 H 21/04**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96112929/14, 10.07.1996

(46) Date of publication: 10.08.1998

(71) Applicant:

Evtushenko Vladimir Ivanovich

(72) Inventor:

Evtushenko Vladimir Ivanovich

(73) Proprietor:

Evtushenko Vladimir Ivanovich

(54) **SET FOR DNA ISOLATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, biochemistry.
SUBSTANCE: set has buffer as 3-10 M urea solution, binding buffer as 2.5-5.0 M sodium chloride solution, eluting buffer as 10 mM Tris-HCl solution and 1 mM Trilon B at pH 8, 80-% ethyl alcohol solution as washing out buffer and silica gel as a sorbent. The use

of this set ensures to isolate DNA from biological samples at high yield and purity degree that can be used in medicinal practice for diagnostic aims, in part, for diagnosis of hereditary, malignant and viral diseases. EFFECT: improved quality and enhanced effectiveness of the set proposed.

Изобретение относится к медицине, а именно к биохимическим исследованиям биологических объектов, и может найти применение в диагностике наследственных, злокачественных и вирусных заболеваний.

Существующие в настоящее время коммерческие наборы для выделения ДНК на основе обратимой сорбции молекул ДНК на мелкодисперсных частицах стекла в буферах содержат высокие концентрации йодистого натрия, перхлората натрия и солей гуанидина [1, 2].

На основе йодистого натрия выпускается набор "GENECLEAN" компании BIO 101, в состав которого входят следующие компоненты: 6 М раствор йодистого натрия; суспензия сорбента GLASSMILK и отмывочный буфер NEW, состоящий из хлористого натрия, Трис-HCl, Трилона Б, этилового спирта и воды [3]. Этот набор используется для выделения ДНК плазмид из бактерий и агарозных гелей. Качество выделяемой ДНК соответствует стандарту. Однако наличие в наборе йодистого натрия, способного необратимо связывать ДНК с сорбентом, приводит к ее потерям при выделении, а остаточная примесь йодистого натрия может ингибировать активность ферментов, используемых для последующей модификации ДНК.

Известен набор для выделения ДНК "Prep-A-Gene DNA Purification Kit" компании Bio-Rad [4], в состав которого входят следующие компоненты: 6 М раствор гуанидинхлорида, суспензия сорбента на основе мелкодисперсной диатомовой земли, отмывочный и элюирующий буферы. Этот набор используется для экстракции ДНК из плазмид, фагов и бактерий, а также геномной ДНК. Однако наличие в наборе гуанидинхлорида, остаточная примесь которого может ингибировать активность ферментов, используемых для последующей модификации ДНК, снижает ценность данного набора.

Известен также набор для выделения ДНК "GlassMAX DNA Isolation Matrix System" компании Life Technologies, в состав которого входят следующие компоненты: 6 М раствор йодистого натрия в качестве связывающего буфера, суспензия сорбента GlassMAX в растворе 6М перхлората натрия и отмывочный буфер [5]. Данный набор используется для выделения плазмидной ДНК и извлечения фрагментов ДНК из агарозных гелей, однако ценность набора снижается вследствие использования в нем йодистого натрия и перхлората натрия, остаточные примеси которых могут ингибировать активность ферментов-модификаторов ДНК.

Наиболее близким к предлагаемому является набор для выделения ДНК "S & S Elu-Quik" [6], взятый в качестве прототипа. Он состоит из лизирующего буфера в виде раствора гуанидинтиоцианата, связывающего буфера, состоящего из раствора перхлората натрия, сорбента в виде мелкодисперсного стекла и двух отмывочных буферов на основе этилового спирта. В качестве элюирующего буфера, не включаемого в набор, в прототипе предложено использовать буфер TE (раствор 10 мМ Трис-HCl и 1 мМ Трилона Б с pH 8).

Этот набор позволяет выделять ДНК из биологических объектов (плазмиды, бактерии,

растения и животные). Однако использование при выделении ДНК растворов гуанидинтиоцианата и перхлората натрия, остаточные примеси которых способны ингибировать активность ферментов при последующей модификации ДНК, снижает ценность данного набора.

Технический результат изобретения состоит в повышении чистоты выделяемой ДНК.

Этот результат достигается тем, что в известном наборе выделения ДНК, состоящем из лизирующего, связывающего, отмывочного буферов и сорбента, согласно изобретению в качестве лизирующего буфера он содержит 4-10 М раствор мочевины, в качестве связывающего 2,5-5,0 М раствор хлористого натрия, а в качестве сорбента - силикагель.

Использование в качестве лизирующего буфера 4-10 М раствора мочевины позволяет исключить гуанидинтиоцианат и тем самым предотвратить ингибирование активности ферментов, используемых для последующей модификации ДНК.

Использование 2,5-5,0 М раствора хлористого натрия в качестве связывающего буфера позволяет исключить из набора перхлорат натрия, который как и гуанидинтиоцианат является ингибитором активности ферментов.

Использование таким образом в наборе мочевины и хлористого натрия, обладающих мягким денатурирующим действием и легко отмываемых от сорбента, обеспечивает высокое качество получаемой ДНК и отсутствие остаточных примесей используемых буферов.

Поскольку выделяемая ДНК в последующем подвергается воздействию ферментов, использование мочевины и хлористого натрия, широко применяемых при выделении нативных белков, является физиологичным, не привнося в процесс выделения ДНК иных компонентов.

Использование силикагеля в качестве сорбента обеспечивает высокую чистоту выделяемой ДНК за счет того, что силикагель обладает высокой сорбционной емкостью в отношении ДНК, а его высокая пористость обеспечивает эффективность удаления остаточных примесей используемых буферов.

Примеры использования набора. Набор состоит из четырех буферов и сорбента. Пример 1. Состав, мл:

Лизирующий буфер (4 М раствор мочевины) - 1

Связывающий буфер (2,5 М раствор хлористого натрия) - 3

Сорбент (50%-ная суспензия силикагеля в растворе 2,5 М хлористого натрия) - 1

Отмывочный буфер (80%-ный раствор этилового спирта) - 15

Элюирующий буфер (раствор TE) - 1,2

Проиллюстрируем выделение ДНК плазмиды pUC18 из клеток бактерии E. coli с использованием данного набора. Бактериальные клетки из 5 мл ночной культуры осаждали центрифугированием. Разрушение клеток и денатурацию хромосомной ДНК осуществляли щелочным методом, с последующим удалением хромосомной ДНК бактерий и осаждением плазмиды изопропиловым спиртом согласно стандартному протоколу [7]. Осадок плазмиды

растворяли пипетированием в 20 мкл лизисного буфера, после этого добавляли 100 мкл связывающего буфера, смесь перемешивали и добавляли 30 мкл суспензии сорбента, вновь перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 0,5 мл отмывочного буфера, перемешивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант тщательно отбирали и отбрасывали, а к осадку добавляли 30 мкл элюирующего буфера, смесь пипетировали и помещали на 20 мин в водяную баню на +60 °С, далее центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. Отбирали содержащий плазмидную ДНК супернатант и измеряли концентрацию ДНК с помощью флуориметра, выход обычно составлял 5-10 мкг плазмидной ДНК из 1 мл ночной культуры, что соответствует максимальной величине. Степень очистки ДНК от примесей белков определяли спектрофотометрически по величине отношения A_{260}/A_{280} , которое было в пределах 1,8-2,0, что соответствует стандарту. Нативность ДНК и ее способность служить субстратом для ферментов модификации контролировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозе.

Пример 2. Состав, мл:

Лизирующий буфер (10 М раствор мочевины) - 1,5

Связывающий буфер (5 М раствор хлористого натрия) - 1,5

Сорбент (50%-ная суспензия силикагеля в растворе 2,5 М хлористого натрия) - 1,5

Отмывочный буфер (80%-ный раствор этилового спирта) - 15

Элюирующий буфер (раствор ТЕ) - 1,2

Проиллюстрируем выделение ДНК из биоптатов хориона плаценты с использованием данного набора. К кусочку биоптата (1-5 мг) добавляли 50 мкл лизирующего буфера и гомогенизировали ткань до растворения, затем добавляли 50 мкл связывающего буфера и 50 мкл суспензии сорбента. Смесь пипетировали до гомогенного стояния и оставляли 15 мин при комнатной температуре, после этого добавляли 0,5 мл отмывочного буфера, перемешивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. Далее как описано в примере 1.

Выделенная ДНК использовалась в институте акушерства и гинекологии им. Отто (С.-Петербург) для пренатальной диагностики вирусных инфекций и наследственных заболеваний, а также в институте трансплантологии и искусственных органов (Москва) для аллотипирования трансплантатов и показала пригодность набора для этих целей. Выход ДНК составлял 1,5-3,0 мг ДНК из 1 мг ткани, что соответствует максимальному. Степень очистки ДНК от примесей белков определяли спектрофотометрически по величине отношения A_{260}/A_{280} , которое было в пределах 1,8-2,0, что соответствует стандарту.

Пример 3. Состав, мл:

Лизирующий буфер (8 М раствор мочевины) - 1,5

Связывающий буфер (5 М раствор хлористого натрия) - 1,5

Сорбент (50%-ная суспензия силикагеля в растворе 2,5 М хлористого натрия) - 1,5

Отмывочный буфер (80%-ный раствор этилового спирта) - 15

Элюирующий буфер (раствор ТЕ) - 1,2

Проиллюстрируем выделение ДНК из лимфоцитов крови и клеточных культур с использованием данного набора. К осадку лимфоцитов, полученных из 0,1-0,5 мл крови или 0,5-2,0 млн. клеток, полученных из культуры, добавляли 40 мкл лизирующего буфера, пипетировали лизат до однородности, затем добавляли 40 мкл связывающего буфера и 40 мкл суспензии сорбента. Смесь пипетировали до гомогенного стояния и оставляли 15 мин при комнатной температуре, после этого добавляли 0,5 мл отмывочного буфера, перемешивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. Далее как описано в примере 1. Выход ДНК составлял 15-20 мг ДНК из 0,5 мл крови, что соответствует максимальному. Степень очистки ДНК от примесей белков определяли спектрофотометрически по величине отношения A_{260}/A_{280} , которое было в пределах 1,8-2,0, что соответствует стандарту.

Выделенная ДНК использовалась в НИИ особо чистых биопрепаратов (С.-Петербург) и в НИИ вирусологии им. Д.И. Иванецкого (Москва) для диагностики и мониторинга ВИЧ-инфекции и показала пригодность набора для этих целей.

Как видно из приведенных примеров, предлагаемый набор обеспечивает высокую степень чистоты ДНК, позволяющей использовать ее в медицинской практике для диагностических целей.

Предлагаемый набор по сравнению с известными, имеет ряд существенных преимуществ:

1. Обеспечивает получение высококачественных препаратов ДНК, исключающих ингибирование активности ферментов модификации, что может иметь место в прототипе;

2. Компоненты набора являются физиологичными, обладают мягким денатурирующим действием, легко отмываются от сорбента и тем самым обеспечивают высокое качество получаемой ДНК и отсутствие остаточных примесей используемых буферов, что не может обеспечить ни один из известных наборов;

3. Набор обеспечивает возможность осуществления одноступенчатой промывки сорбента, сокращая тем самым число стадий выделения ДНК. Это позволяет получать более высокополимерную ДНК, что обеспечивает высокое разрешение рестрикционных карт и радиоавтографов, используемых для диагностических целей;

4. Набор состоит из легко доступных, нетоксичных компонентов и является наиболее дешевым из известных наборов для этих целей.

Набор разработан автором в лаборатории генной инженерии Центрального научно-исследовательского института МЗМП, прошел лабораторные исследования в Петербургском государственном университете, НИИ особо чистых биопрепаратов (С. -Петербург) и клиническую апробацию в институте акушерства и гинекологии им. Отто (С. -Петербург), а также в институте трансплантологии и

искусственных органов (Москва), в НИИ вирусологии им. Д.И. Иванецкого (Москва) и готов к внедрению в широкую медицинскую практику.

Используемая литература.

1. Vogelstein B. , Gillespie D. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci., v.76, 615-619.
2. Thompson J. D. , Cuddy K.K., Hainess D.S., Gillespie D. 1990. Nucl. Acids Res., v. 18,1074.
3. The GENECLEAN Kit. 1989. BIO 101 Inc., Release 7.
4. Prep-A-Gene DNA Purification Kit. 1990. Bio-Rad Laboratories, Bulletin 1541.
5. Life Technologies. 1993-1994. Catalog and Reference Guide, p.11-47.

6. S&S Elu-Quik DNA Purification Kit. 1991. Schleicher & Schuell, Release 4.

7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Формула изобретения:

Набор для выделения ДНК, состоящий из лизирующего, связывающего, промывочного, элюирующего буферов и сорбента, отличающийся тем, что в качестве лизирующего буфера он содержит 3 - 10 М раствор мочевины, в качестве связывающего 2,5 - 5,0 М раствор хлористого натрия, а в качестве сорбента - силикагель.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60