



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 063 001 A1** 2010.06.24

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 063 001.2**

(22) Anmeldetag: **23.12.2008**

(43) Offenlegungstag: **24.06.2010**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/10** (2006.01)

(71) Anmelder:

QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE

(74) Vertreter:

**König Szynka Tilmann von Renesse, 40549
Düsseldorf**

(72) Erfinder:

**Erbacher, Christoph, Dr., 42781 Haan, DE; Fabis,
Roland, Dr., 51375 Leverkusen, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

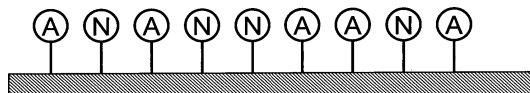
(54) Bezeichnung: **Nukleinsäureaufreinigungsverfahren**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren mit einer nukleinsäurebindenden Phase, die mit nukleinsäurebindenden Gruppen A mit einem pK von 8 bis 13 im Unterschuss ausgestattet ist und oder die Gruppen A und bindungshemmende Gruppen N, die bei der Bindung und vorzugsweise bei der Elution neutral geladen sind, aufweist, und das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:

(a) Bindung der Nukleinsäuren an die nukleinsäurebindende Phase bei einem pH-Wert, der unterhalb des pK-Wertes der nukleinsäurebindenden Gruppe A liegt (Bindungs-pH-Wert);

(b) Elution der Nukleinsäuren bei einem pH-Wert, der oberhalb des Bindungs-pH-Wertes liegt (Elutions-pH-Wert).

Darüber hinaus werden entsprechende Kits sowie nukleinsäurebindende Phasen, die zur Aufreinigung von Nukleinsäuren eingesetzt werden können, offenbart. Die erfindungsgemäße Technologie erlaubt die Aufreinigung der Nukleinsäuren und insbesondere die Elution unter Einsatz geringer Salzkonzentrationen, so dass die aufgereinigten Nukleinsäuren direkt weiterverarbeitet, bspw. in einer PCR eingesetzt werden können.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren sowie einen Kit zur Aufreinigung von Nukleinsäuren mit einem nukleinsäurebindenden Trägermaterial. Darüber hinaus werden geeignete Verfahren zur Herstellung entsprechender Trägermaterialien beschrieben.

[0002] Verschiedene Verfahren zur Aufreinigung und Isolierung von Nukleinsäuren sind im Stand der Technik bekannt. Diese beinhalten den Einsatz von Phenol-Chloroform, Aussalzverfahren, den Einsatz von Ionenaustauschern sowie Silikapartikel.

[0003] Ein bekanntes Verfahren zur Nukleinsäureaufreinigung ist das sog. „Charge-Switch Verfahren“. Danach wird eine nukleinsäurebindende Phase, die überwiegend schwach basische Polymere, wie poly Bis-Tris, poly Tris, Polyhistidin, polyhydroxylierte Amine, Chitosan oder Triethanolamin enthalten, bei einem ersten pH-Wert mit einer nukleinsäurehaltigen Probe in Kontakt gebracht, bei der die nukleinsäurebindende Phase eine positive Ladung aufweist. Dies begünstigt die Bindung der negativ geladenen Nukleinsäuren an die Phase. Zur Freisetzung/Elution der Nukleinsäuren wird gemäß dem Charge-Switch Prinzip ein zweiter pH-Wert eingestellt, der höher als der pKs-Wert der nukleinsäurebindende Phase ist, um die positive Ladung zu invertieren, bzw. zu neutralisieren. Die pH-Wert Einstellung über dem pKs-Wert der nukleinsäurebindenden Gruppen der festen Phase fördert die Ablösung der gebundenen Nukleinsäuren von der nukleinsäurebindenden Phase.

[0004] Im Stand der Technik sind sowohl lösliche Phasen (siehe bspw. EP 0 707 077) als auch feste Phasen (siehe bspw. WO 99/29703) bekannt. Zur Elution werden verschiedene Lösungen eingesetzt, so bspw. Lösungen, die einen sehr hohen pH-Wert aufweisen oder aber auch biologische Puffer, insbesondere Niedrigsalzpuffer wie bspw. Tris-Puffer.

[0005] Die aufgereinigten Nukleinsäuren werden üblicherweise weiterverarbeitet. Diese umfassen bspw. Amplifikationen, wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), enzymatische Reaktionen, wie Restriktion, Ligation, Phosphorylierung, Dephosphorylierung oder RNA-Transkription, Hybrid Capture Assays und Elektrophorese. Diese „downstream“ Reaktionen sind oftmals wenig tolerant gegenüber höheren Salzkonzentrationen, so dass vor der Verarbeitung der Nukleinsäuren oftmals ein Entsalzungsschritt erfolgen muss.

[0006] Für eine direkte Weiterverwendung der aufgereinigten Nukleinsäuren ohne zusätzliche Umpufferungs- oder Entsalzungsschritte, ist es daher wünschenswert, dass der Elutionspuffer nicht zu salzreich und ferner nicht zu basisch ist.

[0007] Bei den Anionenaustauschern steigt jedoch das Elutionsvermögen mit dem pH-Wert und der Salzkonzentration des Elutionspuffers an. Die chromatographischen Anforderungen stehen somit im direkten Widerspruch zu den Anforderungen bezüglich der DNA-Weiterverarbeitung. Der Stand der Technik versucht daher insbesondere die Elution der Nukleinsäuren durch Auswahl geeigneter nukleinsäurebindender Gruppen und pH-Bedingungen zu fördern.

[0008] Trotz der bekannten Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren besteht das Bedürfnis, die bestehenden Verfahren zu verbessern, insbesondere die Aufreinigung der Nukleinsäuren so durchzuführen, dass auch eine direkte Weiterverarbeitung der Probe möglich ist.

[0009] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren bereitzustellen, das die direkte Weiterverarbeitung der Probe ermöglicht. insbesondere soll ein Verfahren zur Verfügung gestellt werden, das die Elution bei niedrigen Salzkonzentrationen erlaubt.

[0010] Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe durch ein Verfahren zu Aufreinigung von Nukleinsäuren, bei dem eine spezielle nukleinsäurebindende Phase eingesetzt wird.

[0011] Die nukleinsäurebindende Phase weist gemäß einer ersten Ausführungsform nukleinsäurebindende Gruppen A, die einen pKs-Wert von 8 bis 13 aufweisen, sowie ferner bindungsabschwächende Gruppen N auf, die bei dem eingesetzten Bindungs-pH Wert neutral geladen sind.

[0012] Das Verfahren zur Aufreinigung mit dieser nukleinsäurebindenden Phase weist die folgenden Schritte auf:

- (a) Bindung der Nukleinsäuren an die nukleinsäurebindende Phase bei einem pH-Wert, der unterhalb des

pK-Wertes der nukleinsäurebindenden Gruppen A liegt (Bindungs-pH Wert);

(b) Elution der Nukleinsäuren bei einem pH-Wert, der oberhalb des Bindungs-pH Wertes liegt (Elutions-pH Wert).

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft die Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels einer nukleinsäurebindenden Phase, die neben nukleinsäurebindenden Gruppen A auch bindungsabschwächende Gruppen N aufweist. Die nukleinsäurebindenden Gruppen A weisen erfindungsgemäß einen pKs-Wert von 8 bis 13 auf. Die Bindung der Nukleinsäuren erfolgt bei einem pH-Wert unterhalb des pKs-Wertes wenigstens einer dieser Gruppen A. Die Gruppen A nehmen daher ein Proton auf und werden dadurch positiv geladen, was dazu führt, dass die nukleinsäurebindende Phase die negativ geladenen Nukleinsäuren binden kann. Die Elution erfolgt bei einem pH-Wert oberhalb des Bindungs pH-Wertes, wodurch die positive Ladung der nukleinsäurebindenden Phase geringer wird.

[0014] Die zusätzlich vorhandenen Gruppen N sind bei dem Bindungs-pH und vorzugsweise auch bei dem Elutions-pH Wert ladungsneutral. Die Gruppen N beeinflussen daher in mehrfacher Hinsicht die Bindungsstärke der Gruppen A: (1.) Sie unterbrechen die Anordnung der Gruppen A und beeinflussen damit durch die verringerte Dichte an A-Gruppen die Bindungsstärke den Nukleinsäuren an die nukleinsäurebindende Phase. (2.) Sie können als funktionelle Gruppen, die schwache (z. B. durch van der Waals-Wechselwirkungen) bis mittelstarke Interaktionen (z. B. durch Wasserstoffbrückenbindungen) eingehen können, die Bindungsstärke gezielt modulieren. (3.) Die Gruppen N können mit steigender Größe bzw. Anzahl eine sterische Abschirmung der nukleinsäurebindenden Gruppen A und damit eine Reduktion der Bindungsstärke bewirken. Die Gruppen N bewirken daher eine gleichmäßige, pH-Wert unabhängige Reduzierung der Nukleinsäure-Bindungsstärke. Die dadurch zu einem verringerten Maß gebundenen Nukleinsäuren können leichter von der nukleinsäurebindenden Phase gelöst werden. Die Gruppen N haben die Funktion, die Bindungsstärke bzw. Anzahl der Gruppen A gezielt und kontrolliert zu reduzieren und damit eine gewünschte Häufigkeit in der erfindungsgemäßen nukleinsäurebindenden Phase einzustellen. Je höher der Anteil der Gruppen N ist, desto geringer ist der Anteil an Gruppen A und desto geringer ist die Ladungsdichte und umso schwächer werden Nukleinsäuren an die nukleinsäurebindende Phase gebunden. Das Verhältnis von Gruppen A zu Gruppen N kann durch den Herstellungsprozess gezielt eingestellt werden, so dass man in der Lage ist, die gewünschte Nukleinsäurebindestärke vorab bei dem bzw. durch das Verfahren zur Herstellung der entsprechenden nukleinsäurebindenden Phase (durch z. B. Polymerisation, (Polty-)Kondensation und insbesondere durch die Beschichtung eines Trägermaterials) festzulegen.

[0015] Dies hat den erheblichen Vorteil, dass die Elution unter Bedingungen erfolgen kann, die die direkte Weiterverarbeitung der eluierten Nukleinsäuren im Anschluss an die Aufreinigung erlauben. Eine Vielzahl biotechnologischer Methoden, wie bspw. die Amplifikation von Nukleinsäuren (insbesondere mittels PCR), Sequenzierung, Reverse Transkription, Restriktionsanalysen u. a. (siehe oben), sind empfindlich gegenüber Verunreinigungen im Eluat, insbesondere gegenüber hohen Salzkonzentrationen. Das erfindungsgemäße Aufreinigungsverfahren erlaubt in vorteilhafter Weise die Elution bei geringen Salzkonzentrationen, bzw. geringer Ionenstärke, so dass die direkte Weiterverarbeitung in einer sich anschließenden biotechnologischen Methode, insbesondere einer PCR Reaktion ermöglicht wird.

[0016] Das Konzept der Abschwächung der Anbindung der Nukleinsäuren durch den Einsatz der Gruppen N führt zu überraschend guten Ergebnissen. Der Stand der Technik setzt für die Verfahrensoptimierung die optimale Bindung der Nukleinsäure voraus und widmet sich dann der Optimierung der Bindungs- und insbesondere Elutionsbedingungen. Eine Abschwächung der Bindungsstärke wurde hingegen in Bezug auf die zu erwartende Ausbeute als nachteilig angesehen, bspw. weil die Nukleinsäuren im Bindungsschritt nur unzureichend an die nukleinsäurebindende Phase binden oder beim Waschen eluiert werden könnten. Unter diesen Gesichtspunkten ist das erfindungsgemäße Konzept der erfolgreichen und schonenden Aufreinigung von Nukleinsäuren trotz Reduzierung der Bindungsstärke durch die Anwesenheit der Gruppen N als äußerst überraschend anzusehen.

[0017] Der Anteil der A Gruppen bezogen auf die N-Gruppen kann 1% bis 99%, 1 bis 50%, vorzugsweise 1% bis 25% betragen.

[0018] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die nukleinsäurebindende Phase modifiziert, um die Gruppen A und N einzuführen. Erfindungsgemäß gibt es hierzu verschiedene Ausführungsformen, die nachfolgend näher erläutert werden.

[0019] Gemäß einer Ausführungsform ist die nukleinsäurebindende Phase mit unterschiedlichen Liganden

(Liganden I und Liganden II) versehen, wobei die Liganden I wenigstens eine Gruppe A und die Liganden II wenigstens eine Gruppe N aufweisen. Diese Ausführungsform ist in **Fig. 1A** illustriert. Die Gruppen A und N liegen dann in direkter Nachbarschaft vor, wobei auch Polymercoatings ausgebildet werden können. Durch die Anwesenheit der N-Gruppen tragenden Liganden II nimmt die Anzahl der Gruppen A ab, wodurch die Festigkeit der Bindung der Nukleinsäuren reduziert wird. Dies insbesondere bei Einsatz eines Trägermaterials. Aufgrund der Gruppen N wird daher die Dichte der Gruppen A auf der Trägeroberfläche verringert, was eine Reduktion der Bindungsaffinität zu den Nukleinsäuren zur Folge hat. Als Resultat können die Nukleinsäuren leichter eluiert werden. Der Begriff „Ligand“ bzw. „Liganden“ bezeichnet insbesondere eine Oberflächenfunktionalisierung, durch die vorzugsweise ein Trägermaterial mit wenigstens einer Gruppe A und/oder einer Gruppe N modifiziert wird, um die erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Phase bereitzustellen. Die Liganden I und II liegen vorzugsweise an das Trägermaterial gebunden vor und können bspw. als Monomere, Dimere, Oligomere oder Polymere von reaktiven Einzelmolekülen vorliegen. In einer Variante werden die Gruppen A bzw. die Gruppen N als Bestandteil von mit dem Trägermaterial reagierenden Verbindungen direkt oder über einen Linker bzw. Spacer an ein Trägermaterial gebunden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird diese Modifikation dadurch erzielt, dass das Trägermaterial mit einer die unterschiedlichen Liganden I und II aufweisenden Mischung in Kontakt gebracht wird. Je höher der Anteil an Ligand II bezogen auf Ligand I ist, desto geringer ist die Bindungsstärke an die Nukleinsäure. Dieses Mengenverhältnis kann in einfacher Weise durch ein entsprechendes Mischungsverhältnis der Ligand I- und Ligand II-Edukte bei dem Beschichtungsverfahren gesteuert werden. Einzelheiten sind unten und im Zusammenhang mit der Synthese bzw. dem Verfahren zur Herstellung eines entsprechenden Trägermaterials erläutert. Die Liganden können auch ein Polymercoating ausbilden. Das Trägermaterial kann ferner mit Gruppen A und Initiator-molekülen T ausgestattet sein, wobei ein oder mehrere Gruppen N an die Initiator-moleküle gebunden sind. Diese Ausführungsform ist in **Fig. 1B** dargestellt. Die Gruppen N liegen dann bezüglich der Oberfläche des Trägermaterials „oberhalb“ der Gruppen A vor. Ferner besteht die Möglichkeit auch die Gruppen A über Initiator-moleküle anzubinden.

[0020] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das Trägermaterial mit nukleinsäurebindenden Liganden modifiziert, wobei innerhalb eines Liganden eine oder mehrere Gruppen A und eine oder mehrere Gruppen N vorkommen. Diese Ausführungsform ist in **Fig. 2** näher illustriert. Verschiedene Möglichkeiten existieren, um dieses Konzept zu realisieren.

[0021] Gemäß einer Variante ist das Trägermaterial mit Gruppen A (entweder direkt oder bspw. über ein Initiator-molekül T gebunden) ausgestattet, die ein oder mehrere Verbindungen, die eine Gruppe N enthalten, tragen (siehe auch **Fig. 2A**). Bei mehreren Gruppen N können diese auch als unverzweigte Kette oder als verzweigte Baumstruktur oder als entsprechende Mischung vorliegen. Es können hierbei bspw. 1 bis 100 Gruppen N, 1–20, bevorzugt 1–10 und besonders bevorzugt 1–5 Gruppen N pro Ligand vorkommen. Sofern gewünscht können auch noch weitere Gruppen A und N eingeführt werden. Durch diese Verknüpfungsstrategie resultiert eine relativ homogene Bindungsebene mit nahezu reinem A-Gruppen-Besatz und eine oder mehrere Ebenen, die sich nach außen hin anschließen und durch den N-Gruppen-Besatz die Bindungsstärke der Gruppen A verringern.

[0022] Gemäß einer weiteren Variante dieser Ausführungsform ist das Trägermaterial mit Gruppen A (entweder direkt oder bspw. über ein Initiator-molekül T gebunden) ausgestattet, die ein Gemisch aus N-Gruppen und A-Gruppen tragen (siehe auch **Fig. 2B**). Hierbei kann zunächst eine oder mehrere Gruppen A an das Trägermaterial gebunden werden. An diese A-haltigen Rumpfliganden werden dann Verbindungen angeknüpft, die wenigstens eine oder mehrere Gruppen N einführen. Durch Steuerung der Reaktionsbedingungen kann jeweils nur eine Gruppe A und N innerhalb des Liganden vorliegen; die Liganden können allerdings auch als Oligomere oder Polymere vorliegen. Bei den als Oligomere und Polymere ausgebildeten Liganden können die Gruppen N statistisch verteilt sein (siehe bspw. **Fig. 2B**, rechte Abbildung), eine alternierende Reihenfolge aufweisen (siehe bspw. **Fig. 2B**, linke Abbildung) oder aber auch als Blockcopolymer angeordnet sein. Auch sind Kombinationen möglich. Geeignete Verfahren zur Ausbildung der entsprechenden A und N-haltigen Funktionalisierungen/Liganden werden im Detail nachfolgend beschrieben.

[0023] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist das Trägermaterial mit Gruppen A und N modifiziert, wobei die Gruppen A sterisch durch Verbindungen abgeschirmt werden, die wenigstens eine, vorzugsweise mehrere Gruppen N aufweisen. Auch zu dieser Ausführungsform existieren verschiedene Varianten.

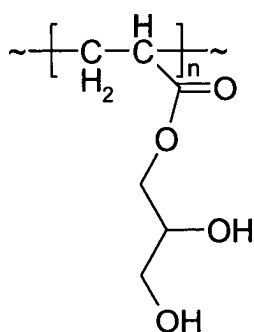
[0024] Gemäß einer Variante erfolgt die sterische Abschirmung bevorzugt durch Gruppen N aufweisende Oligomere oder Polymere. Diese können bspw. an die die Gruppe(n) A aufweisenden Liganden gebunden werden (siehe auch **Fig. 3B**). Sie können jedoch auch benachbart dazu angeordnet sein, sofern die sterische Abschirmung gewährleistet wird (siehe auch **Fig. 3A**). Die N-Gruppen- aufweisenden Oligomere/Polymere schir-

men die Gruppen A durch Bildung von mehr oder weniger geordneten Sekundärstrukturen (z. B. „Random coils“ oder Helices) wie eine Art Kappe gegen das Umgebungsmilieu ab und können dadurch die Bindung der Nukleinsäuren abschwächen. Die Oligomere/Polymere können auch aus den Gruppen N gebildet sein und ferner als Block-Copolymere eingeführt werden.

[0025] Zur Herstellung dieser Variante kann bspw. in einem ersten Schritt auf dem Trägermaterial Initiatorgruppen T bspw. durch Silanisierung aufgebracht werden. In einem zweiten Schritt können dann bspw. mittels ATRP (Atom transfer radical polymerization) Gruppen A haltige Monomere aufgepfropft werden. Nachdem dieses Monomer abreagiert hat, kann ein zweites Monomer das über Neutralgruppen N verfügt, eingebracht werden. Es entsteht dann ein Copolymer auf dem Träger bestehend aus einem ersten Homopolymer, das Anionenaustauschergruppen trägt, und einem zweiten Homopolymer, das mit dem ersten verknüpft ist und Neutralgruppen N trägt. Über die Menge an dem 2. Monomer, das die Gruppen N trägt, kann die Länge der entstehenden Polymerkette und damit die Stärke der sterischen Abschirmung gesteuert werden.

[0026] Das Ausmaß der sterischen Abschirmung kann daher durch die Kettenlänge und die Monomersubstitutionen gesteuert werden. Bevorzugte Kettenlängen für die N-Gruppen aufweisenden Oligomere/Polymere sind $n = 10-1000$, $n = 10$ bis 500, besonders bevorzugt $n = 10-100$. Zur Ausbildung der Gruppen N tragenden Oligomere/Polymere können die in dieser Anmeldung beschriebenen Monomere eingesetzt werden, die noch im Detail beschrieben werden. Besonders geeignet sind Polyacrylate.

[0027] Als bevorzugte Polymere werden Polyacrylate gemäß der folgenden Formel eingesetzt:



[0028] Ein besonders geeignetes Reagenz zur Erzielung der sterischen Abschirmung ist Glycidylmethacrylat, aus dem nach Hydrolyse neutrale Diolgruppen N entstehen. Hierfür kann bspw. durch Silanisierung ein Initiatormolekül T aufgebracht werden. Dann wird ein erstes Monomer, bspw. ein N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat bspw. mittels ATRP auf dem Träger polymerisiert. Diese Gruppen werden dann in einem zweiten Polymerisationsschritt sterisch abgeschirmt. Hierzu kann bspw. nachdem die Monomere abreagiert haben ein zweites Monomer eingeführt werden, bspw. Glycidylmethacrylat aus dem nach Hydrolyse neutrale Diolgruppen N entstehen. Der sterische Effekt verhindert den engen Kontakt der Nukleinsäure mit den A Gruppen, so dass diese nicht so stark gebunden und bei geringer Ionenstärke und damit niedrigen Salzkonzentration von der nukleinsäurebindenden Phase eluiert werden können.

[0029] Die sterische Abschirmung der Gruppen N kann auch durch „sperrige“ Substituenten erzielt werden, zu nennen sind bspw. verzweigte Alkylreste, wie Isopropyl, Diisopropyl, Tertiär-Butyl, aliphatische oder aromatische Ringe, entweder als Kohlenstoffringe oder als Heterozyklen. Diese sterisch hemmenden Gruppen N können auch in Form von Oligomeren/Polymere eingesetzt werden.

[0030] Die sterische Abschirmung kann daher insbesondere gesteuert werden über (i) den Anteil der zusätzlichen eingebrachten Gruppen N; (ii) den Aufbau der Verbindungen, die die Gruppe N tragen; (iii) die Auswahl bzw. Struktur der Gruppe N und (iv) die Kettenlänge der N-Gruppen aufweisenden Oligomere/Polymere.

[0031] Eine besonders gute sterische Abschirmung der Gruppe(n) A kann somit durch Gruppen N erfolgen, die im gleichen Liganden vorkommen oder benachbart dazu angeordnet sind. Auch ist eine Bindung an die Gruppe A möglich. Die sterische Abschirmung steigt mit der Größe der die Gruppe(n) N aufweisenden Verbindung und auch mit der Größe der Gruppe N, wobei sowohl eine Erhöhung der Kettenlänge, als auch eine stärkere Verzweigung der Kohlenstoffketten bzw. eine Erhöhung der Ringgröße bei zyklischen Gruppen die sterische Abschirmung erhöht.

[0032] In einer besonderen Ausführungsform ist das Trägermaterial mit einer Kombination sämtlicher oben beschriebener Verknüpfungsstrategien modifiziert. Beispiele sind in [Fig. 4](#) gezeigt. So kann das Trägermate-

rial in direkter Anknüpfung die Gruppen A, die sterisch abschirmenden Gruppen N und Initiator-moleküle T, wobei die Initiator-moleküle noch mit weiteren sterisch abschirmenden Gruppen N ausgestattet sind, aufweisen (siehe bspw. [Fig. 4A](#)). Diese Art der Verknüpfung kann bspw. mit den üblichen Gruppen N durchgeführt werden (siehe bspw. [Fig. 4B](#)). Weiterhin kann das Trägermaterial bspw. mit Gruppen A (direkt oder über ein Initiator-molekül T gebunden) ausgestattet sein und daran angeknüpft ein Gemisch aus N-Gruppen und A-Gruppen tragen, wobei die Gruppen N vollständig oder partiell als sterisch hemmende Gruppe vorliegen (siehe [Fig. 4D](#) und [4E](#)).

[0033] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Anmeldung wird das Verfahren mit einer ein Trägermaterial aufweisenden nukleinsäurebindenden Phase durchgeführt, die mit Gruppen A modifiziert ist, wobei nur ein Teil des Trägermaterials mit Gruppen A besetzt ist. Dies bedeutet, dass die übliche Ausstattung mit nukleinsäurebindenden Gruppen deutlich unterschritten wird. Da dadurch weniger nukleinsäurebindende Gruppen A pro Flächeneinheit des Trägermaterials und/oder pro Gramm an Trägermaterial vorkommen, wird die Bindungsstärke der Nukleinsäuren analog der bisherigen Verknüpfungsstrategien reduziert. [Fig. 5](#) zeigt eine Ausführungsform dieses Konzepts. Auch diese Ausführungsform ermöglicht daher die Elution der Nukleinsäuren unter Bedingungen, die die direkte Weiterverarbeitung der Nukleinsäuren erlauben, weil insbesondere niedrige Salzkonzentrationen eingesetzt werden können, um die Nukleinsäure von der nukleinsäurebindenden Phase zu eluieren.

[0034] Der erfindungsgemäße Unterschuss an A-Gruppen auf dem Trägermaterial kann dadurch erreicht werden, dass die Verbindung, die die Gruppe A einführt, im Verhältnis zum Trägermaterial im Unterschuss eingesetzt wird. Darüber hinaus ist denkbar, dass das Trägermaterial eine geringere Menge an potentiellen Bindungsstellen aufweist, an die die Gruppen A angebinden werden können. Eine weitere Ausführungsform beinhaltet die chemische oder physikalische Vorbehandlung des Trägermaterials, die eine Verringerung der Bindungsstellen oder eine reduzierte Reaktivität der Bindungsstellen bewirkt. Als alternative Strategie kann die Gruppe A – tragende Verbindung im Gemisch mit einer anderen Verbindung, die ebenfalls an das Trägermaterial bindet, aufgebracht werden. Durch die konkurrierende Anbindung sinkt der Anteil der A-Gruppen auf der Oberfläche des Trägermaterials.

[0035] Die auf einem Unterschuss an A-Gruppen beruhende Ausführungsform kann ferner mit einer oder mehreren der oben beschriebenen Ausführungsformen zur Modifikation des Trägermaterials mit Gruppen A und N kombiniert werden.

[0036] Die Ausstattung des Trägers mit Gruppen A im Unterschuss ist insbesondere bei Einsatz eines Silika-trägermaterials von Vorteil, da dieses Silanolgruppen aufweist. Vorzugsweise werden die Gruppen A mittels Silanen oder einem Silangemisch eingeführt. Für die vollständige Umhüllung des Trägers wird eine Mindestmenge an Silan benötigt. Diese Mindestmenge ist definiert durch die spezifische Oberfläche des Trägermaterials. Reicht die Menge an Silan(en) nicht aus, um die Oberfläche des Trägers zu belegen, kann die Ladungsdichte reduziert werden. Durch die Menge an aufzubringendem Silan kann daher die Menge an Gruppen A und dadurch die Bindungsstärke der nukleinsäurebindenden Phase eingestellt werden.

[0037] Gemäß einer Ausführungsform weist das Trägermaterial eine Silika-Oberfläche auf, die mit einem Gruppen A aufweisenden Silan beschichtet ist, wobei die Silanmenge 0,1 bis 50 µmol (micromol, hier auch als umol bezeichnet) vorzugsweise 0,1 bis 10 umol beträgt. Entscheidend ist, die Silanmenge so weit zu reduzieren, bis die Elution bei geringeren Ionenstärken bzw. niedrigeren (gewünschten) Salzkonzentrationen möglich ist. Dies kann bspw. experimentell getestet und mittels eines Chromatogramms überprüft werden. Die Silanmenge kann daher vorzugsweise je nach eingesetztem Trägermaterial optimiert werden, um die gewünschten Bindungs/Elutionseigenschaften zu erzielen.

[0038] Vorzugsweise ist die nukleinsäurebindende Phase eine feste Phase. Zur Herstellung können die Gruppen A, die bindungsabschwächenden Gruppen N und die Initiator-moleküle T sofern vorhanden bspw. an ein festes Trägermaterial gebunden werden. Einzelheiten sind nachfolgend noch im Detail beschrieben. Der Einsatz einer festen Phase erleichtert die Abtrennung der gebundenen Nukleinsäuren von der Probe. Gemäß einer Ausführungsform erfolgt daher nach der Bindung der Nukleinsäuren eine Abtrennung der festen Phase bzw. des nicht gebundenen Überstandes.

[0039] Als Träger für die nukleinsäurebindenden Gruppen kommen bspw. oxidische Materialien infrage. Es eignen sich hierbei insbesondere Oxide wie Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 , Ta_2O_5 , SiO_2 und Polykieselsäure, wobei SiO_2 oder Polykieselsäuren als Trägermaterial bevorzugt ist. Als Träger kommen auch organische Polymere wie Polystyrol und seine Derivate, Polyacrylate und -methacrylate, und ihre Derivate oder Polyurethane, Nylon, Polyethy-

len, Polypropylen, Polybutylen und Copolymere aus diesen Materialien infrage. Darüber hinaus können diese nukleinsäurebindenden Gruppen auch mit Polysacchariden, insbesondere Hydrogelen wie Agarose, Cellulose, Dextran, Sephadex, Sephacryl, Chitosan verknüpft sein. Des Weiteren können die nukleinsäurebindenden Gruppen auch an anorganische Träger wie bspw. Glas oder Metalloberflächen, wie z. B. Gold, angebunden werden. Magnetische Partikel sind besonders vorteilhaft in der Handhabung. Die nukleinsäurebindenden Gruppen A und/oder die Gruppen N können direkt oder aber über andere chemische Moleküle, bspw. Initiator-moleküle oder Linker an diese Träger gebunden sein. Sie können auch Teil eines größeren Moleküls sein. Sofern das Trägermaterial keine geeigneten funktionellen Gruppen als Bindungsstellen aufweist, können diese in an sich bekannter Weise eingeführt werden.

[0040] Weitere Ausführungsformen der Trägermaterialien umfassen nichtmagnetische und magnetische Partikel, Säulenmaterialien, Membranen, sowie Oberflächenbeschichtungen. Ferner seien funktionalisierte Träger wie Röhrchen, Membrane, Vliese, Papier, Reaktionsgefäße wie PCR-Gefäße, "Eppendorf-Tubes", Multiplates, Chips und Mikroarrays genannt.

[0041] Gemäß einer Ausführungsform liegt die nukleinsäurebindende Phase sowohl bei der Bindung als auch bei Elution positiv geladen vor.

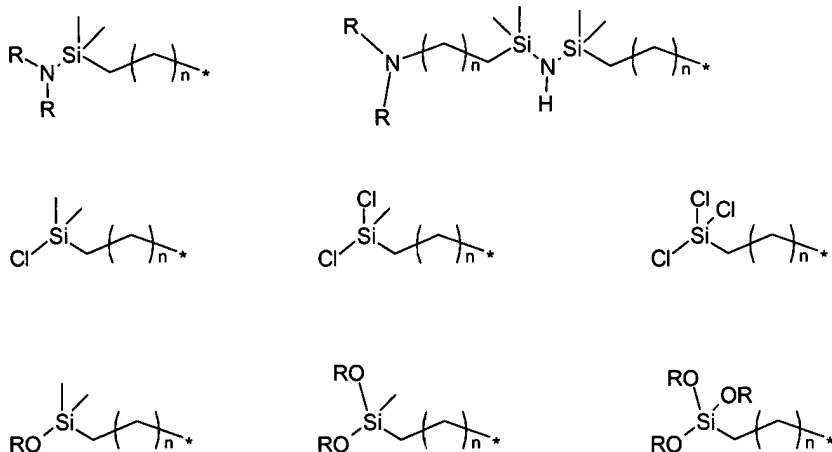
[0042] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine lösliche nukleinsäurebindende Phase, die Nukleinsäuren nach dem erfindungsgemäßen Prinzip reversibel bindet. Lösliche Polymere können bspw. alternierend oder statistisch Gruppen A und N aufweisen (siehe bspw. Fig. 2B). Auch können die Seitenketten der A Gruppen durch Gruppen N, insbesondere Alkylreste abgeschirmt sein, genannt seien bspw. Diisopropylreste am Stickstoff. Die im Zusammenhang mit dem Trägermaterial erfolgten Ausführungen gelten für die lösliche Nukleinsäurebindende Phase entsprechend.

[0043] Die nukleinsäurebindenden Gruppen A sind gemäß einer Ausführungsform Ionenaustauscher; vorzugsweise Anionenaustauscher. Bevorzugte Gruppen A, die sich für die Bindung von Nukleinsäuren bewährt haben, sind Aminogruppen, bevorzugt sind primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen. Diese können substituiert oder unsubstituiert sein. Darüber hinaus können auch ringförmige Amine, aromatische Amine oder aminofunktionalisierte Heterozyklen eingesetzt werden. Die Amine können Substituenten tragen, bspw. Alkyl, Alkenyl, Alkynyl- oder aromatische Substituenten, darüber hinaus können die Kohlenwasserstoffketten auch zu einem Ring geschlossen sein. Die Kohlenwasserstoffketten können auch Heteroatome, wie Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Silizium, oder Verzweigungen aufweisen. Wie ausgeführt weisen die Aminogruppen als Gruppen A pKs-Werte von 8 bis 13, vorzugsweise 9 bis 13, besonders bevorzugt von 10 bis 12 auf.

[0044] Die Gruppe A kann Bestandteil einer Verbindung sein, die durch Polymerisation oder Kondensation ein Oligomer oder Polymer ausbildet und damit insbesondere für die Ausbildung der Liganden geeignet ist. Beispiele für solche kettenbildenden Verbindungen sind aminogruppenhaltige Acrylate wie N-(3-Aminomethyl)methacrylamid, N-(3-Aminoethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Aminoisopropyl)methacrylamid, N,N-Dimethylacrylamid, N,N-Diethylacrylamid, N,N-Diisopropylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylacrylat, N,N-(Dimethylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat, N,N-(Diethylamino)ethylacrylamid, N,N-(Diethylamino)ethylacrylat, N,N-(Diethylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Diethylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Diethylamino)propylacrylamid, N,N-(Diethylamino)propylacrylat, N,N-(Diethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Diethylamino)propylmethacrylat, N,N-(Diisopropylamino)ethylacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)ethylacrylat, N,N-(Diisopropylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Diisopropylamino)propylacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)propylacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat, und 2-(Diisopropylamino)ethylmethacrylat.

[0045] Hiervon ist das N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat besonders bevorzugt.

[0046] Die Gruppe A kann in einem Silan, bevorzugt in einem Reaktivsilan vorliegen. Als Reaktivsilane werden Verbindungen bezeichnet, die hydrolytisch instabile Si-Bindungen aufweisen, bspw. Si-N oder Si-O Bindungen. Beispiele für Reaktivsilane, die wenigstens eine Gruppe A enthalten, sind:



wobei

n: 1 bis 5

R eine C1 bis C6, vorzugsweise eine C1 bis C3 Alkylgruppe ist; und

* Amino-, Aminomethyl-, Aminoethyl-, Aminopropyl-, Dimethylamino-, Diethylamino-, Diisopropylamino-, Dipropylamino-, Diethanolamino-, Dipropanolamino-, Diethylentriamin-, Triethylentetramin-, Tetraethylenpentaamin, Etheramin, Polyetheramin, 4-Diisobutylamino-1-butan, 6-Dipropylamino-1-hexan ist.

[0047] Entsprechende Reaktivsilane können zur Einführung der Gruppen A eingesetzt werden. Besonders bevorzugt sind Diethylaminopropyltrimethoxysilan, Dimethylaminopropyltrimethoxysilan und N,N-Diisopropylaminopropyltrimethoxysilan.

[0048] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Bindung der Nukleinsäuren bei einem pH-Wert von 2 bis 8, vorzugsweise 4 bis 7,5. Diese Angabe bezieht sich auf den pH-Wert während der Bindung und damit in der Probe. Das erfindungsgemäße Verfahren ist je nach Gestaltung der nukleinsäurebindenden Phase daher auch bei sehr schonenden Bedingungen durchführbar, und kann nahezu im neutralen Bereich durchgeführt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die protonierbaren Gruppen der nukleinsäurebindenden Phase einen pKs-Wert von 8 bis 13, vorzugsweise 9 bis 13 und besonders bevorzugt 10 bis 12 aufweisen, liegen diese selbst bei relativ neutralen pH-Werten ausreichend positiv geladen vor, um die effektive Anbindung der Nukleinsäuren zu erlauben. Daher kann die Bindung – sofern gewünscht – unter sehr schonenden Bedingungen erfolgen.

[0049] Der Bindung kann je nach Ausgangsmaterial wenigstens ein üblicher Lyseschritt vorgeschaltet sein, um die Nukleinsäuren freizusetzen.

[0050] Ein weiterer wesentlicher Schritt des vorliegenden Verfahrens ist die Elution der Nukleinsäuren. Wie dargelegt, erfolgt die Nukleinsäurefreisetzung bei einem pH-Wert, der oberhalb des Bindungs pH-Wertes liegt. Dies hat zur Folge, dass die Gruppen A bei der Elution weniger positiv geladen vorliegen, wodurch die Freisetzung der Nukleinsäuren begünstigt wird. Gegenüber herkömmlichen Anionenaustauschern bewirkt die Verringerung des Anteils der Gruppen A und/oder die Anwesenheit der bindungsabschwächenden Gruppen N eine verringerte Bindung der Nukleinsäuren an das Trägermaterial. Dies hat wie oben dargelegt zur Folge, dass die Elution auch bei niedrigen Salzkonzentrationen durchgeführt werden kann.

[0051] Der Elutions-pH Wert liegt vorzugsweise unterhalb des pK-Wertes der Gruppen A. Vorzugsweise erfolgt die Elution je nach eingesetzter nukleinsäurebindender Gruppe A bzw. nukleinsäurebindenden Phase bei einem pH-Wert von 8 bis 11, 8 bis 10, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 8,0 bis 9, besonders bevorzugt 8,5 bis 9. Grundsätzlich könnten jedoch auch höhere pH-Werte eingesetzt werden. Bei den bevorzugten niedrigen pH-Werten werden jedoch besonders vorteilhafte Ergebnisse erzielt, da die Nukleinsäuren dennoch bei geringen Salzkonzentrationen freigesetzt werden können und die Bedingungen zudem mild sind.

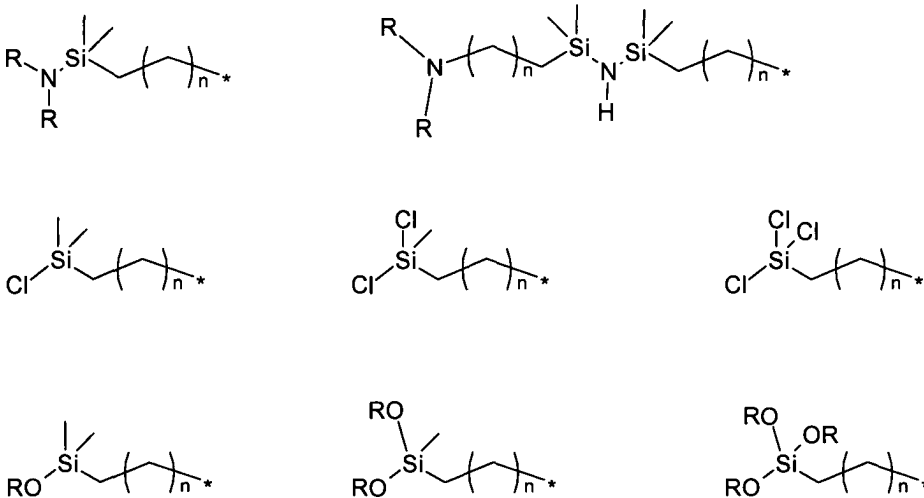
[0052] Um die direkte Weiterverarbeitung der isolierten Nukleinsäuren im Elutionspuffer zu ermöglichen, weist dieser wie ausgeführt vorzugsweise eine niedrige Salzkonzentration auf. Dies wird durch die erfindungsgemäße Ausgestaltung der Nukleinsäurebindenden Phase ermöglicht. Die Salzkonzentration liegt daher gemäß einer Ausführungsform bei 1 mM bis 1000 mM, besonders bevorzugt von 1 mM bis 200 mM, 1 mM bis 250 mM, oder 1 mM bis 100 mM. Geeignete Salze können Chloride der Alkali und Erdalkalimetalle oder Ammonium, andere Salze von Mineralsäuren, Acetate, Borste sowie Verbindungen wie Tris, Bis-Tris sowie orga-

nische Puffer, wie bspw. MIS, CHAPS, HEPES und ähnliche darstellen. Entsprechendes gilt für den Bindungspuffer. Geeignete Substanzen zur Elution sind darüber hinaus im Stand der Technik bekannt. Die Salzkonzentration ist im Bindungsschritt und im Elutionsschritt unverändert oder wird bei der Elution leicht angehoben. Vorzugsweise wird die Konzentration jedoch nicht derart erhöht, dass die nachfolgenden Reaktionen behindert werden. Weiterhin kann die Temperatur bei Bindung und Elution gleich sein oder bei der Elution angehoben werden.

[0053] Um die Aufreinigung zu begünstigen, wird nach der Bindung und vor der Elution der Nukleinsäuren vorzugsweise wenigstens ein Waschschrift durchgeführt. Zum Waschen sind wässrige Lösungen mit niedrigen Salzkonzentrationen und aber auch Wasser bevorzugt. Wenn Salze in den Waschpuffern enthalten sind, so bevorzugt in einer Konzentration von 1 mM bis 1000 mM, besonders bevorzugt von 1 mM bis 200 mM, 1 mM bis 250 mM, oder 1 mM bis 100 mM. Der Puffer kann organische Verbindungen wie Kohlenhydrate und bevorzugt organische Lösungsmittel wie bspw. Alkohole, Polyole, Polyethylenglykole, Ether, Polyether, Dimethylsulfoxid, Aceton oder Acetonitril. Die Waschpuffer sollten jedoch keine störende Mengen der entsprechenden organischen Bestandteile aufweisen, um die Downstream-Applikationen nicht zu behindern.

[0054] Als bindungsabschwächenden Gruppen N können ladungsneutrale Gruppen wie Hydroxylgruppen, Diolgruppen, Triolgruppen, Saccharide, Epoxidgruppen, C1-C6 Alkyl-, Alken-, oder Alkingruppen, Polyolgruppen, Ether, Polyether, Halogenide oder Imide dienen. Durch den Einsatz hydrophiler Gruppen N bleibt der Ionentauscher weiterhin gut mit wässrigen Puffern benetzbar. Die Gruppe N kann Bestandteil einer Verbindung sein, die durch Polymerisation oder Kondensation ein Oligomer oder Polymer bildet. Beispiele für Verbindungen durch die Gruppen N eingeführt werden können, sind Acrylate, wie Butylacrylat, Propylacrylat, Ethylacrylat, Methylacrylat, Glycidylmethacrylat, Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), Glycidoxypropylmethacrylat, Glycerolmonomethacrylat (Isomerengemisch), Glycolmonomethacrylat und N-Acryloxysuccinimid.

[0055] Die Gruppe N kann auch in einem Silan, bevorzugt in einem Reaktivsilan vorliegen. Beispiele für Reaktivsilane, die die Gruppe N enthalten sind:



wobei

$n = 1-5$

R eine C1 bis C6, vorzugsweise C1 bis C3 Alkylgruppe ist;

* Hydroxymethyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl-, Ethandiol-, Propandiol-, Propantriol-, Butantriol, 3-Glycidoxypropyl, Ethylglycidylether, Alkylrest, insbesondere ein C1 bis C4 Alkylrest, Halogenid oder Wasserstoff ist.

[0056] Gemäß einer Ausführungsform weist das Trägermaterial Initiatorgruppen T auf, die zumindest teilweise mit Verbindungen funktionalisiert sind, die Gruppen A und/oder N aufweisen. Geeignete Beispiele werden nachfolgend noch im Detail erläutert.

[0057] Die Erfindung betrifft ferner die Synthese bzw. ein Verfahren zur Herstellung eines entsprechenden nukleinsäurebindenden Trägermaterials. Hierzu existieren verschiedene Ausführungsformen:

Alternative (A): Bei diesem Verfahren wird das Trägermaterial mit einer Mischung aus wenigstens zwei unterschiedlichen Liganden I und II funktionalisiert, wobei die Liganden I wenigstens eine Gruppe A aufweisen und die Liganden II wenigstens eine Gruppe N aufweisen bzw. darstellen. Einzelheiten zu dieser Ausführungsform wurden bereits oben im Detail erläutert. Wir verweisen auf die obige Offenbarung.

Alternative (B): Bei diesem Verfahren wird in einem ersten Schritt das Trägermaterial mit einer Mischung aus Initiator-molekülen T und Liganden, die wenigstens eine Gruppe A aufweisen, funktionalisiert. Hierbei sind die eine Gruppe A tragenden Verbindungen so ausgewählt oder werden so modifiziert, dass keine weiteren Moleküle angebunden werden können. Im zweiten Schritt werden dann Verbindungen hinzugegeben, die wenigstens eine Gruppe N tragen und an die Initiator-moleküle T binden.

Alternative (C): Funktionalisierung des Trägermaterials mit nukleinsäurebindenden Liganden, wobei diese innerhalb eines Liganden eine oder mehrere Gruppen A und eine oder mehrere Gruppen N aufweisen. Einzelheiten sind oben im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erläutert. Vorzugsweise erfolgt in einem ersten Schritt die Anbindung von Initiator-molekülen T an das Trägermaterial. Diese dienen als Ausgangspunkt für das Wachstum einer Copolymerkette. Durch Zugabe von wenigstens eine Gruppe A und/oder oder wenigstens eine Gruppe N aufweisenden Verbindungen und Anbindung dieser an die Initiator-moleküle T. Die Polymerkette wird durch Zugabe weiterer wenigstens eine Gruppe A und/oder wenigstens eine Gruppe N aufweisenden Verbindungen verlängert.

[0058] Hierbei können die Polymerisationsschritte auch so gesteuert werden, dass die Gruppen A und N jeweils als Oligomere eingebaut werden, so dass Blockcopolymere entstehen. Ein Beispiel für eine kontrolliert ablaufende Polymerisationsreaktion, die erfindungsgemäß eingesetzt werden kann ist beispielsweise die sogenannte „Atom transfer radical polymerization“ (ATRP). Die ATRP zeichnet sich dadurch aus, dass die Konzentration freier Radikale durch Zusatz eines Übergangsmetallkomplexes und in Kombination mit einem Atomtransferprozesses mit einem Organohalogenid soweit erniedrigt wird, dass Kettenabbruchreaktionen, wie Disproportionierung oder Rekombination weitestgehend zurückgedrängt werden.

Alternative (D): Funktionalisierung des Trägermaterials mit Gruppen A und N, wobei die Gruppen A sterisch durch Verbindungen abgeschirmt werden, die wenigstens eine Gruppe N aufweisen. Gemäß einer Ausführungsform dieser Variante erfolgt in einem ersten Schritt die Funktionalisierung des Trägermaterials mit Initiatorgruppen T. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von wenigstens eine Gruppe A aufweisenden Verbindungen und Anbindung dieser an die Initiator-moleküle T. In einem weiteren Schritt erfolgt die Abschirmung der Gruppen A durch Anbindung mindestens einer Verbindung, die wenigstens eine Gruppe N aufweist. Vorzugsweise liegen die Gruppen N in Form von Oligomeren/ Polymeren vor (siehe oben), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur eine sterische Abschirmung der Gruppen A bewirken. Einzelheiten sind oben im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erläutert.

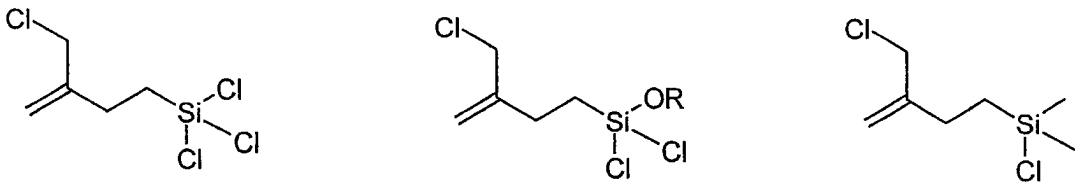
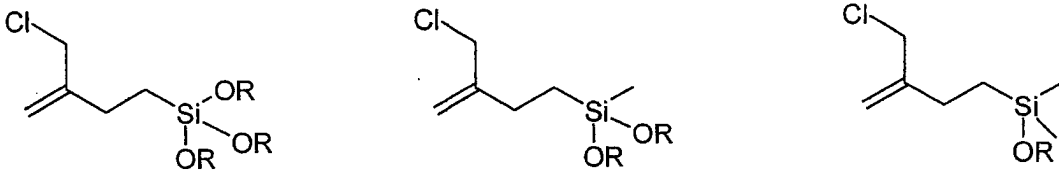
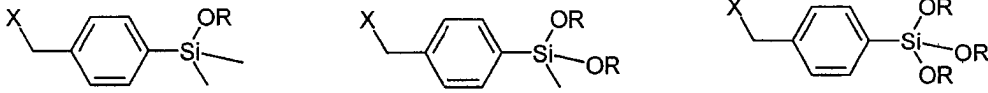
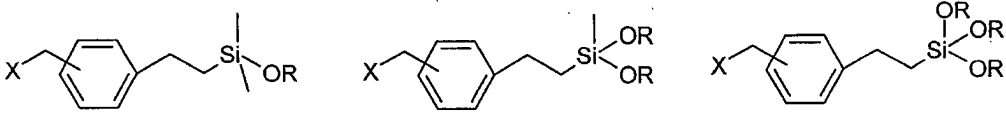
Alternative (E): Gemäß dieser Ausführungsform erfolgt die Funktionalisierung des Trägermaterials mit Gruppen A im Unterschuss. Diese Variante wurde bereits oben im Detail beschrieben. Wir verweisen auf die obige Offenbarung.

[0059] Die Alternativen A–E können auch in beliebiger Kombination eingesetzt werden. Einzelheiten zu den nukleinsäurebindenden Gruppen A, den Gruppen N sowie den Initiator-molekülen T sind im Detail oben beschrieben und gelten auch im Zusammenhang mit den hier aufgeführten Verfahren zur Trägermodifizierung und kennzeichnen die darin verwendeten Bestandteile. Wir verweisen auf die obige Offenbarung.

[0060] Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens zur Funktionalisierung des Trägermaterials mit den Gruppen A und N werden diese Gruppen über monofunktionale, bi- oder trifunktionale Reaktivsilane oder mittels eines Gemisch aus mindestens zwei unterschiedlich funktionalen Reaktivsilanen eingebracht. Als Reaktivsilane können beispielsweise Aminosilane, Disilazane, Chlorsilane oder Alkoxisilane verwendet werden. Der Anteil der A Gruppen bezogen auf die N-Gruppen beträgt 1% bis 99%, 1 bis 50%, vorzugsweise 1% bis 25%.

[0061] Tri- und bifunktionelle Reaktivsilane neigen dazu, durch Polykondensation vernetzte, dicke Schichten auf dem Träger zu bilden. Monofunktionelle Reaktivsilane reagieren dagegen bspw. mit den Silanolgruppen des Trägermaterials unter Bildung von Siloxan (Si-O-Si) Bindungen. Das führt dann zu eher monomolekularen Schichten auf dem Träger. Die Umsetzung des Trägermaterials mit Reaktivsilanen kann in der Gasphase oder in Suspension in einem Lösungsmittel durchgeführt werden, wobei bei Letzterem in Abhängigkeit von der Chemie des Reaktivsilans, organische und bevorzugt wässrige Lösungsmittel verwendet werden können.

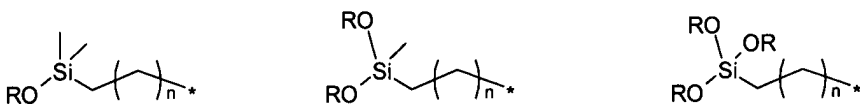
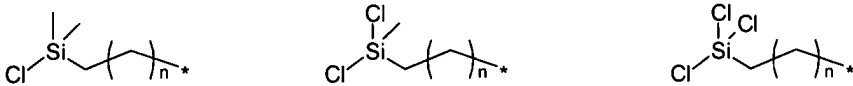
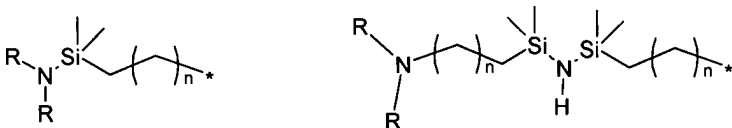
[0062] Geeignete und bevorzugte Trägermaterialien sind oben im Detail beschrieben. Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens, wird das Trägermaterial zunächst mit Initiator-molekülen T modifiziert und im nächsten Schritt werden die Gruppen A und/oder N in Form von Monomeren eingebracht. Die Initiator-moleküle T können als Anknüpfungsstelle für weitere Verbindungen dienen, die beispielsweise über (Poly-)Kondensation oder Polymerisation, insbesondere eine radikalische Polymerisation wie insbesondere ATRP (Atomtransfer-radikalpolymerisation) eingeführt werden. Beispiele für Initiator-moleküle T sind:



Wobei X = Halogen, insbesondere Cl, Br, I
und R = C1–C3 Alkyl ist.

[0063] Vorzugsweise wird 2-(Chloromethyl)allyltrimethoxysilan als Initiator-molekül eingesetzt.

[0064] Beispiele für Reaktivsilane, durch die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Gruppen A und/oder Gruppen N eingebracht werden können, sind nachfolgend aufgeführt:



wobei
n = 1–5

R eine C1 bis C6, vorzugsweise C1 bis C3 Alkylgruppe, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, i-Propyl ist;

* Amino-, Aminomethyl-, Aminoethyl-, Aminopropyl-, Dimethylamino-, Diethylamino-, Diisopropylamino-, Di-propylamino-, Diethanolamino-, Dipropanolamino-, Diethylentriamin-, Triethylentetramin-, Tetraethylenpenta-

min, Etheramin, Polyetheramin, 4-Diisobutylamino-1-butan, 6-Dipropylamino-1-hexan, Hydroxymethyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl-, Ethandiol-, Propandiol-, Propantriol-, Butantriol, 3-Glycidoxypropyl, Ethylglycidylether, Alkylrest, insbesondere ein C1 bis C4 Alkylrest, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, i-Propyl, Butyl, i-Butyl, Halogenid oder Wasserstoff ist.

[0065] Neben den bereits im Detail beschriebenen Verfahren der gemischten Silanisierung und der Silanisierung im Unterschuss, bestehen weitere Möglichkeiten, die Dichte an Gruppen A auf dem Trägermaterial definiert einzustellen. Wie ausgeführt kann man bspw. ein "grafting-from" Prozess am Trägermaterial durchführen. Dies gelingt beispielsweise durch die Methode der Atomtransferradikalpolymerisation (ATRP), die bereits oben beschrieben wurde. Bei dieser Methode werden zunächst durch Silanisierung Initiatorgruppen T, Gruppen N und/oder Gruppen A auf den Träger aufgebracht. Die Initiatorgruppen T sind bei diesem Prozess entscheidend, da von diesen Gruppen die Initiation des grafting-from Prozesses seinen Ausgang nimmt (Kettenstart).

[0066] Beispielsweise gelingt es durch halogenidhaltige Silane, mittels ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization), Homopolymere, Copolymere und Block-Copolymere aufwachsen zu lassen. ATRP ist eine besondere Form der Living/Controlled Free Radical Polymerization (LFRP), bei welcher die Konzentration freier Radikale durch Zusatz eines Übergangsmetallkomplexes und in Kombination mit einem Atomtransferprozesses mit einem Organohalogenid soweit erniedrigt wird, dass Kettenabbruchreaktionen, wie Disproportionierung oder Rekombination, weitestgehend zurück gedrängt werden. Dieses Verfahren ermöglicht durch Verwendung von Monomeren und Monomergemischen gezielt die Ladungsdichte der Trägeroberfläche einzustellen und damit die Bindestärke der Nukleinsäuren zu beeinflussen. Durch entsprechende Wahl der Monomere können gezielt die Gruppen A und/oder N aufgebracht werden.

[0067] Die entsprechend erzeugten nukleinsäurebindenden Trägermaterialien können insbesondere in dem erfindungsgemäßen Aufreinigungsverfahren zum Einsatz kommen.

[0068] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer erfindungsgemäßen nukleinsäurebindenden Phase zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung umfassen insbesondere DNA und RNA, insbesondere genomische DNA, Plasmid-DNA, sowie PCR Fragmente, cDNA, miRNA, siRNA, sowie Oligonukleotide und modifizierte Nukleinsäuren wie bspw. PMA oder LMA. Es können auch virale oder bakterielle RNA sowie DNA oder Nukleinsäuren aus menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Quellen aufgereinigt werden. Des Weiteren kommen für eine erfindungsgemäße Aufreinigung auch DNA/RNA Hybride in Frage sowie modifizierte Nukleinsäuren.

[0069] Ferner wird mit der Erfindung ein Kit zur Aufreinigung von Nukleinsäuren zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein erfindungsgemäßes nukleinsäurebindendes Trägermaterial aufweist, das nukleinsäurebindende Gruppen A mit wenigstens einer protonierbaren Gruppe aufweist, die einen pKs-Wert von 8 bis 13, vorzugsweise 9 bis 13, besonders bevorzugt 10 bis 12 aufweisen. Einzelheiten zu dem erfindungsgemäßen Trägermaterial und seiner Funktionalisierung sind oben im Detail ausgeführt; wir verweisen auf obige Ausführungen.

[0070] Das Kit kann ferner Bindungs-, Wasch- und/oder Elutionspuffer aufweisen, wie sie bspw. oben im Zusammenhang mit dem Aufreinigungsverfahren beschrieben wurden. Darüber hinaus kann es Lyse- und Neutralisierungspuffer aufweisen.

[0071] Gemäß einer Ausführungsform weist das Kit einen Bindungspuffer auf, der vorzugsweise wenigstens eines der nachfolgenden Merkmale aufweist:

- (a) einen pH-Wert von 1 bis 13; und/oder
- (b) eine Salzkonzentration von 1 mM bis 1000 mM, besonders bevorzugt von 1 mM bis 200 mM, 1 mM bis 250 mM, oder 1 mM bis 100 mM.

[0072] Die Vorteile der entsprechenden Merkmale wurden oben bereits im Zusammenhang mit dem Verfahren erläutert, wir verweisen auf die obige Offenbarung.

[0073] Gemäß einer Ausführungsform weist das Kit ferner einen Waschpuffer auf, der vorzugsweise wenigstens eines der nachfolgenden Merkmale aufweist:

- (a) einen pH-Wert von 2 bis 7, vorzugsweise 4 bis 7; und/oder
- (b) eine Salzkonzentration von 1 mM bis 1000 mM, besonders bevorzugt von 1 mM bis 800 mM, 1 mM bis 600 mM; und/oder
- (c) er ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasser, biologische Puffer, organische Puffer, insbe-

sondere Tris, Tris-Bis, MIS, MOPS, CHAPS und HEPES.

[0074] Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist das Kit ferner einen Elutionspuffer auf, der vorzugsweise wenigstens eines der nachfolgenden Merkmale aufweist:

(a) einen pH-Wert von 8 bis 10, bevorzugt 8 bis 9 und/oder

(b) eine Salzkonzentration von 1 mM bis 1000 mM, besonders bevorzugt von 1 mM bis 200 mM, 1 mM bis 250 mM, oder 1 mM bis 100 mM; und/oder

(c) er ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasser, biologische Puffer, organische Puffer, insbesondere Tris, Tris-Bis, MIS, MOPS, CHAPS und HEPES.

[0075] Einzelheiten zur nukleinsäurebindenden Phase sowie den Elutionsbedingungen sind im Detail oben beschrieben und gelten auch im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Kit und kennzeichnen die darin verwendeten Bestandteile/Puffer. Wir verweisen auf die obige Offenbarung.

[0076] Erfindungsgemäße Kits können insbesondere im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Anwendung kommen. Die vorliegenden Verfahren, Kits sowie nukleinsäurebindenden festen Phasen können insbesondere im Bereich der Molekularbiologie, der molekularen Diagnostik, in der Forensik, in der Lebensmittelanalytik sowie im Applied Testing eingesetzt werden. Die Anwendung des erfindungsgemäßen Kits erlaubt die unmittelbare Weiterverarbeitung der aufgereinigten Nukleinsäuren in „downstream“ Applikationen, insbesondere in einer PCR Reaktion.

[0077] Durch Wahl/Kombination der beschriebenen Parameter, insbesondere der die Elution fördernden bindungsabschwächenden Gruppen N, und der Reduzierung der nukleinsäurebindenden Gruppen kann der pH-Wert der nukleinsäurebindenden Phase in Bezug auf die Elutionsbedingungen optimal eingestellt werden. Entsprechend kann das Elutionsprofil der nukleinsäurebindenden Phase, insbesondere die Salzkonzentration und der Elutions pH-Wert gesteuert bzw. eingestellt werden.

[0078] Nukleinsäuren, die mit den erfindungsgemäßen Systemen aufgereinigt werden können, können in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Stuhl, Speichel, in biologischen Quellen wie Gewebe, Zellen, insbesondere Tierzellen, Humanzellen, Pflanzenzellen, Bakterienzellen und dergleichen, Organen wie Leber, Niere oder Lunge vorliegen, dazu kann die Nukleinsäure aus Trägermaterialien wie Swabs, PapSmears, sowie stabilisierende Medien wie PreServCyt oder Surepath, oder auch aus weiteren Flüssigkeiten, wie z. B. Säften, wässrigen Proben oder allgemein Lebensmitteln gewonnen werden. Darüber hinaus können die Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial, bakteriellen Lysaten, in Paraffin eingebettetem Gewebe, wässrige Lösungen oder Gelen gewonnen werden.

[0079] Die eluierten Nukleinsäuren können vorzugsweise direkt weiterverarbeitet werden, so bspw. im Rahmen einer PCR, RT-PCR, einem Restriktionsverdau oder einer Transkription zum Einsatz kommen. Eine weitere Aufreinigung ist nicht erforderlich, sofern die Elutionspuffer wie oben beschrieben ausgestaltet sind und vorzugsweise eine niedrige Salzkonzentration aufweisen.

FIGUREN

[0080] Die Figuren zeigen:

[0081] [Fig. 1](#). Schematische Übersicht über die Ausstattung des Trägermaterials mit den nukleinsäurebindenden Gruppen A und den bindungsschwächenden Gruppen N, wobei diese auf separaten Liganden vorkommen (siehe auch Anspruch 2(i)).

[0082] [Fig. 2](#). Schematische Übersicht über die Ausstattung des Trägermaterials mit den nukleinsäurebindenden Gruppen A und den bindungshemmenden Gruppen N, wobei diese gemischt innerhalb eines Liganden vorkommen (siehe auch Anspruch 2(ii)). (A) stellt ein Trägermaterial dar, das zuerst mit Gruppen A und dann mit Gruppen N ausgestattet worden ist; (B) stellt eine alternierende Abfolge von A und N innerhalb eines Liganden dar.

[0083] [Fig. 3](#). Schematische Übersicht über die Ausstattung des Trägermaterials mit den nukleinsäurebindenden Gruppen A und den sterisch abschirmenden Gruppen N, wobei diese gemäß den in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) dargestellten Schemata mit den nukleinsäurebindenden Gruppen A kombiniert werden können. Siehe Anspruch 2(iii).

[0084] [Fig. 4](#). Schematische Übersicht über die beispielhafte Ausstattung des Trägermaterials mit den nukleinsäurebindenden Gruppen A und den bindungshemmenden und/oder sterisch abschirmenden Gruppen N, wobei diese aus einer Kombination der in [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) dargestellten Schemata gebildet werden. Siehe Anspruch 2(iv).

[0085] [Fig. 5](#). Schematische Übersicht über die Ausstattung des Trägermaterials mit einem Unterschuss an nukleinsäurebindenden Gruppen A. Siehe Anspruch 3(iv).

[0086] [Fig. 6](#). Elutionsprofil gemäß Beispiel A 3a) bei verschiedenen pH-Werten.

[0087] [Fig. 7](#). Elutionsprofil gemäß Beispiel A 3b) bei verschiedenen pH-Werten.

[0088] Die vorliegende Erfindung soll nachfolgend anhand von einigen Beispielen erläutert werden. Diese sind nicht beschränkend, stellen jedoch bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar. Darüber hinaus werden sämtliche der hierin genannten Referenzen zum Gegenstand der Offenbarung gemacht.

BEISPIELE

[0089] Im Rahmen der Experimente wurde Plasmid-DNA als Modellsysteme für Nukleinsäuren verwendet.

A) Modifizierung eines Trägermaterials mit benachbarten Gruppen A und N

A.1) Silanisierung von Kieselgel mit 2-(Chloromethyl)allyltrimethoxysilan und DEAPS im molaren Verhältnis von 1:1 (AAK0,1-10)

Materialien

Trägermaterial: Silika/Kieselgel mit einer Porengröße von ca. 150 nm. Die spezifische Oberfläche beträgt ca. 25 m²/g.

Beschichtungsreagenzien: 2-(Chloromethyl)allyltrimethoxysilan, DEAPS; QSP1-Puffer (saure Acetatpuffer).

Herstellungsvorschrift

[0090] In einem Dreihalskolben wurden 70 ml Wasser, 2.5 ml QSP1-Puffer (QIAGEN), 322 µl 2-(Chloromethyl)allyltrimethoxysilan und 413 µl DEAPS mit resultierendem pH 5.3 vorgelegt und 18 g Kieselgel zugegeben. Die Mischung wurde unter Rühren innerhalb von 20 min auf 95°C erhitzt, für 4 Stunden bei dieser Temperatur weitergerührt und dann 1 h unter Rühren abgekühlt. Das Kieselgel wurde über eine P3 Fritte abgetrennt und nacheinander mit 32,3 g Tris/NaCl-Puffer, 2-mal mit 30 ml VE-Wasser, 2-mal mit 35 ml Methanol und abschließend mit 30 ml Methanol gewaschen. Das fertige Trägermaterial AAK01-10 wurde über Nacht bei 125°C getrocknet.

[0091] Zum Vergleich wurde das identische Trägermaterial ausschließlich mit der die Gruppe A tragenden Verbindung DEAPS modifiziert. In einem Dreihalskolben wurden 70 ml Wasser, 2.5 ml QSP1-Puffer, und 825 µl DEAPS mit resultierendem pH 5.5 vorgelegt und 18 g Kieselgel zugegeben. Die Mischung wurde unter Rühren innerhalb von 20 min auf 95°C erhitzt, für 4 Stunden bei dieser Temperatur weitergerührt und dann 1 h unter Rühren abgekühlt. Das Kieselgel wurde über eine P3 Fritte abgetrennt und nacheinander mit 32,3 g Tris/NaCl-Puffer, 2-mal mit 30 ml VE-Wasser, 2-mal mit 35 ml Methanol und abschließend mit 30 ml Methanol gewaschen. Das fertige Trägermaterial AAK01-30 wurde über Nacht bei 125°C getrocknet.

Aufreinigung von Plasmid DNA mit dem modifizierten Trägermaterial AAK01-10 unter Bestimmung des Elutionspunktes

[0092] Die Bindung wurde in einem Puffer 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 15% Ethanol durchgeführt. Zur Elution wurde innerhalb von 23 min ein Stufengradient von 0% zu 100% Puffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 15% Ethanol, 2M NaCl) gefahren und die Menge der eluierten DNA kontinuierlich mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Die NaCl-Konzentration, bei der erstmalig signifikante Mengen an DNA eluiert wurde, wurde als Elutionspunkt festgehalten. Dabei zeigte sich, dass die Einführung der Gruppen N den Elutionspunkt signifikant senken.

[0093] Das ausschließlich mit dem protonierbaren Gruppen A (DEAPS) beschichtete Trägermaterial (AAK01-30) zeigt bei einem pH-Wert von 7.0 den Elutionspunkt bei 1600 mM NaCl. Es werden also recht hohe

Salzkonzentrationen benötigt, um die Nukleinsäuren zu eluieren. Für das gemischt A/N-modifizierte Kieselgel AAK01-10 ergibt sich der Elutionspunkt bei ~700 mM NaCl. Die zur Elution notwendige Ionenstärke wurde somit um mehr als 50% reduziert.

A.2) Silanisierung des A/N-modifizierten Kieselgels mit Hydroxymethylacrylat (HEMA) (AAK01-11)

Materialien

Ausgangsmaterial: modifiziertes Kieselgel AAK01-10 (siehe Vorschrift A.1)

Beschichtungsreagenzien: Hydroxymethylacrylat (HEMA).

Herstellungsvorschrift

[0094] Mit Hilfe der durch Cu(I)-katalysierten Atomtransferradikalpolymerisation (ATRP) wird an das bereits gebundene Chlorsilan HEMA Oligomere aufgebaut.

[0095] Im Reaktionskolben werden 20 ml HEMA, die vorab über Al_2O_3 aktiviert wurden, mit 20 ml VE-Wasser 30 min mit Argon gespült, dann 68 mg CuCl_2 , 46 mg CuBr_2 und 313 mg Bispyridin hinzugegeben und nach Untermischen 10 g AAK01-20 hinzugefügt. Die Mischung wird für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und direkt danach über eine P3 Glasfilterfritte abgesaugt. Auf der Fritte wird das Material zunächst mehrfach mit 100 mM NaCl/100 mM EDTA-Puffer gewaschen, dann mit VE-Wasser, einmal mit 8 ml Methanol, und zweimal mit 7 ml Methanol gewaschen. Das fertige Trägermaterial AAK01-11 wurde für 14 Stunden bei 60°C getrocknet.

[0096] Zum Vergleich wurde das mit DEAPS modifizierte Trägermaterial AAK01-30 in gleicher Weise mit HEMA umgesetzt und aufgearbeitet. Das Endprodukt dieser Reaktion wurde als AAK01-31 bezeichnet. Da das DEAPS als funktionelle Gruppe nur ein tertiäres Amin, allerdings kein polymerisationsfähige Allylgruppe trägt, sollte keine HEMA-Ankopplung erfolgen.

Aufreinigung von Plasmid DNA mit dem modifizierten Trägermaterial AAK01-11 unter Bestimmung des Elutionspunktes

[0097] Die Versuche wurden wie unter A.1 beschrieben durchgeführt. Das ausschließlich mit dem protonierbaren Gruppen (DEAPS) beschichtete Trägermaterial AAK01-31 zeigt bei einem pH-Wert von 7.0 den Elutionspunkt bei 1500 mM NaCl. Es werden also recht hohe Salzkonzentrationen benötigt, um die Nukleinsäuren zu eluieren. Für das mit HEMA-modifizierte Kieselgel AK01-11 ergibt sich der Elutionspunkt bei ~400 mM NaCl. Die zur Elution notwendige Ionenstärke wurde somit um nahezu 75% reduziert.

A.3) Silanisierung von Silikabeads mit Silaren in verschiedenen molaren Verhältnissen.

a) FF-Silikabeads

[0098] Der nachfolgende Versuchsaufbau wurde gewählt. Als Trägermaterial wurden FF-Silikabeads eingesetzt.

	Silan pro g Träger- material [μmol]	Verhältnis der Silane zueinander				pH-Wert der Eluti- onspuf- fers	mittels Elutions- puffer* eluierte DNA pro 50 mg Beads [μg]	restliche gebun- dene DNA pro 50 mg Beads eluiert mit QN**-Puf- fer eluiert [μg]
		Silan A		Silan N				
		[mmol%]	[μmol]	[mmol%]	[μmol]			
HL09MB	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 7,50	4,7	35,6
HL09MB	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 7,75	20,3	29,0
HL09M1 3	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 8,00	37,3	17,3
HL09M1 3	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 8,25	48,1	11,0
HL09M1 3	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 8,50	52,5	7,2

*: Zusammensetzung Elutionspuffer: 20 mM Kaliumchlorid; 50 mM Tris in Wasser auf pH X eingestellt;

** : Zusammensetzung QN-Puffer: 1600 mM Natriumchlorid; 50 mM Tris 15% Ethanol in Wasser auf pH 7 eingestellt

[0099] Die Ergebnisse sind in [Fig. 6](#) gezeigt.

b) MagAttract Beads G (QIAGEN)

[0100] Der nachfolgende Versuchsaufbau wurde gewählt. Als Trägermaterial wurden die magnetischen Silikabeads MagAttract Beads G der Firma QIAGEN eingesetzt:

	Silan pro g Träger- material [μmol]	Verhältnis der Silane zueinander				pH-Wert der Eluti- onspuf- fers	mittels Elutions- puffer* eluierte DNA pro 50 mg Beads [μg]	restliche gebun- dene DNA pro 50 mg Beads eluiert mit QN**-Puf- fer eluiert [μg]
		Silan A		Silan N				
		[mmol%]	[μmol]	[mmol%]	[μmol]			
HLG09S T	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 7,50	4,3	69,5
HLG09S T	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 7,75	28,6	40,9
HLG09S T	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 8,00	50,6	15,5
HLG09S T	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 8,25	60,3	2,8
HLG09S T	182,8	25,00	45,700	75,00	137,100	pH 8,50	69,0	2,7

*: Zusammensetzung Elutionspuffer 20 mM Kaliumchlorid; 50 mM Tris in Wasser auf pH X eingestellt;

** : Zusammensetzung QN-Puffer: 1600 mM Natriumchlorid; 50 mM Tris 15% Ethanol in Wasser auf pH 7 eingestellt

[0101] Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) gezeigt.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- EP 0707077 [\[0004\]](#)
- WO 99/29703 [\[0004\]](#)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren mit einer nukleinsäurebindenden Phase durch Bindung und Elution, **dadurch gekennzeichnet**, dass die nukleinsäurebindende Phase aufweist:

- (i) nukleinsäurebindende Gruppen A, wobei diese einen pK-Wert von 8 bis 13 aufweisen;
- (ii) ladungsneutrale Gruppen N, wobei diese bei dem eingesetzten Bindungs-pH Wert neutral geladen sind; und das Verfahren wenigstens die nachfolgenden Schritte aufweist:
 - (a) Bindung der Nukleinsäuren an die nukleinsäurebindende Phase bei einem pH-Wert, der unterhalb des pK-Wertes der nukleinsäurebindenden Gruppen A liegt (Bindungs-pH Wert);
 - (b) Elution der Nukleinsäuren bei einem pH-Wert, der oberhalb des Bindungs-pH Wertes liegt (Elutions-pH Wert).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die nukleinsäurebindende Phase ein modifiziertes Trägermaterial ist, wobei die Modifikation ausgewählt ist aus der Gruppe:

- (i) Modifikation des Trägermaterials mit einer wenigstens die Liganden I und II aufweisenden Mischung, wobei die Liganden I wenigstens eine Gruppe A aufweisen und die Liganden II wenigstens eine Gruppe N aufweisen;
- (ii) Modifikation des Trägermaterials mit nukleinsäurebindenden Liganden, wobei diese innerhalb eines Liganden eine oder mehrere Gruppen A und eine oder mehrere Gruppen N aufweisen;
- (iii) Modifikation des Trägermaterials mit Gruppen A und N, wobei die Gruppen A sterisch durch Verbindungen abgeschirmt werden, die wenigstens eine Gruppe N aufweisen;
- (iv) Modifikation des Trägermaterials durch eine Kombination aus wenigstens zwei der Ausführungsformen (i) bis (iii).

3. Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren mit einem nukleinsäurebindenden Trägermaterial durch Bindung und Elution, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial mit nukleinsäurebindenden Gruppen A modifiziert ist, wobei nur ein Teil des Trägermaterials mit Gruppen A besetzt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial eines oder mehrere der nachfolgenden Merkmale aufweist:

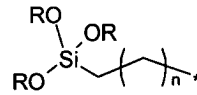
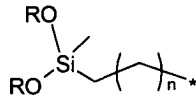
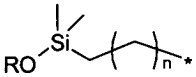
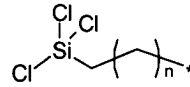
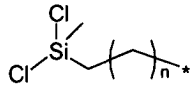
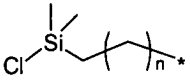
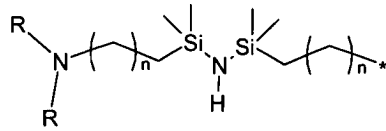
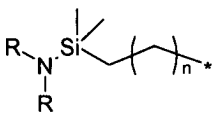
- (i) das Trägermaterial weist eine Silikaoberfläche auf, die mit einem Gruppen A aufweisenden Silan beschichtet ist, wobei die Silanmenge 0,1 bis 50 μmol , vorzugsweise 0,1 bis 10 μmol beträgt; und/oder
- (ii) es weist zusätzlich Gruppen N gemäß Anspruch 1 auf; und/oder
- (iii) es weist eine oder mehrere Modifikationen wie in Anspruch 2 definiert auf.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die nukleinsäurebindende Phase ein Trägermaterial aufweist, das eines oder mehrere der folgenden Merkmale erfüllt:

- (i) das Trägermaterial ist ein oxidisches Material; und/oder
- (ii) das Trägermaterial ist ausgewählt aus der Gruppe von Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 , Ta_2O_5 , SiO_2 und Polykieselsäure; und/oder
- (iii) das Trägermaterial ist SiO_2 oder Polykieselsäure; und/oder
- (iv) das Trägermaterial ist ein organisches Polymer, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe Polystyrol und seine Derivate, Polyacrylat und -methacrylat, und seine Derivate, Polyurethan, Nylon, Polyethylen, Polypropylen, Polybutylen und Copolymere aus diesen Materialien; und/oder
- (v) das Trägermaterial ist ein Polysaccharid, insbesondere ein Hydrogel wie Agarose, Cellulose, Dextran, Sephadex, Sephacryl oder Chitosan; und/oder
- (vi) das Trägermaterial ist Glas oder Metall; und/oder
- (vii) das Trägermaterial ist magnetisch.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die nukleinsäurebindende Phase Gruppen A aufweist, die eines oder mehrere der nachfolgenden Merkmale erfüllen:

- (i) die Gruppen A weisen einen pK-Wert von 9 bis 13, vorzugsweise 10 bis 12, besonders bevorzugt 10 bis 11 auf; und/oder
- (ii) die Gruppen A sind tertiäre, sekundäre oder primäre Aminogruppen; und/oder
- (iii) die Gruppen A sind Bestandteil von polymerisationsfähigen Monomeren; und/oder
- (iv) die Gruppen A sind an ein als Reaktivsilan vorab aufgebrachtes Initiator-molekül gebunden; und/oder
- (v) die Gruppen A wurden als Bestandteil von reaktiven Silangruppen eingeführt; und/oder
- (vi) die Gruppen A wurden als Bestandteil von Verbindungen eingeführt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:



Wobei

n: 1 bis 5

R eine C1 bis C6, vorzugsweise eine C1 bis C3 Alkylgruppe ist; und

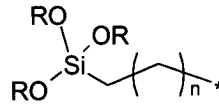
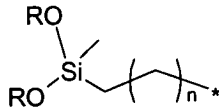
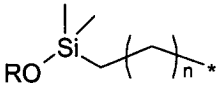
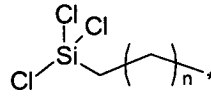
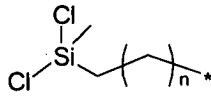
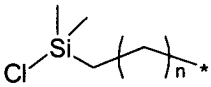
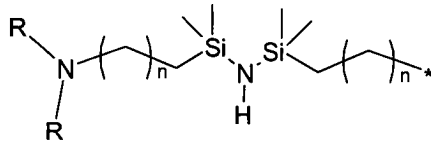
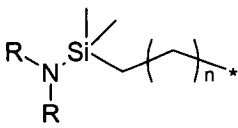
* Amino-, Aminomethyl-, Aminoethyl-, Aminopropyl-, Dimethylamino-, Diethylamino-, Diisopropylamino-, Di-propylamino-, Diethanolamino-, Dipropanolamino-, Diethylentriamin-, Triethylentetramin-, Tetraethylenpenta-min, Etheramin, Polyetheramin, 4-Diisobutylamino-1-butan, 6-Dipropylamino-1-hexan; und/oder (vii) die Gruppen A wurden als Bestandteil von Verbindungen eingeführt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Diethylaminopropyltrimethoxysilan, Dimethylamino-propyltrimethoxysilan und N,N-Diisopropylaminopropyltrimethoxysilan.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Bindungsschritt (a) und/oder der Elutionsschritt (b) unter Bedingungen erfolgt, die eines oder mehrere der nachfolgenden Merkmale erfüllen:

- (i) im Elutionsschritt (b) liegt der Elutions-pH Wert unterhalb des pK-Wertes der Gruppen A; und/oder
- (ii) die Salzkonzentration im Bindungs und/oder Elutionspuffer beträgt 1 mM bis 1000 mM, 1 mM bis 500 mM, 1 mM bis 250 mM oder 1 mM bis 100 mM; und/oder
- (iii) die Salzkonzentration ist im Bindungsschritt (a) und/oder im Elutionsschritt (b) unverändert oder wird bei der Elution angehoben; und/oder
- (iv) der pH-Wert im Bindungspuffer beträgt pH 2 bis pH 8, pH 2 bis pH 7,5, pH 4 bis pH 8 oder pH 4 bis pH 7,5 und/oder
- (v) der pH-Wert im Elutionspuffer beträgt pH 2 bis pH 10, pH 4 bis pH 10, pH 7 bis pH 10 oder pH 8 bis pH 9; und/oder
- (vi) die Temperatur ist im Bindungsschritt (a) und/oder im Elutionsschritt (b) unverändert oder wird bei der Elution angehoben; und/oder
- (vii) die Temperatur im Elutionsschritt beträgt 2°C bis 95°C oder 21°C bis 60°C

8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Gruppen N eines oder mehrere der nachfolgenden Merkmale erfüllen:

- (i) die Gruppen N sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hydroxylgruppen, Diolgruppen, Triolgruppen, Polyolgruppen, Saccharide, Epoxidgruppen, Halogenide, Alkylgruppen, vorzugsweise C1-C6 Alkylgruppen, Alken-, Alkylgruppen, Imidgruppen, Ethergruppen, oder Polyethergruppen und/oder
- (ii) die Gruppen N sind in den pH Bereichen $2 < \text{pH} < 12$ ladungsneutral; und/oder
- (iii) die Gruppen N sind beim eingesetzten Elutions-pH-Wert neutral geladen; und/oder
- (iv) die Gruppen N wurden als Bestandteil von polymerisationsfähigen Monomeren eingeführt; und/oder
- (v) die Gruppen N liegen an ein als Reaktivsilan vorab aufgebrachtes Initiatormolekül gebunden vor; und/oder
- (vi) die Gruppen N wurden als Bestandteil von reaktiven Silangruppen eingebracht; und/oder
- (vii) die Gruppen N wurden als Bestandteil von Verbindungen eingeführt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus



wobei

$n = 1-5$

R eine C1 bis C6, vorzugsweise C1 bis C3 Alkylgruppe, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, i-Propyl ist;

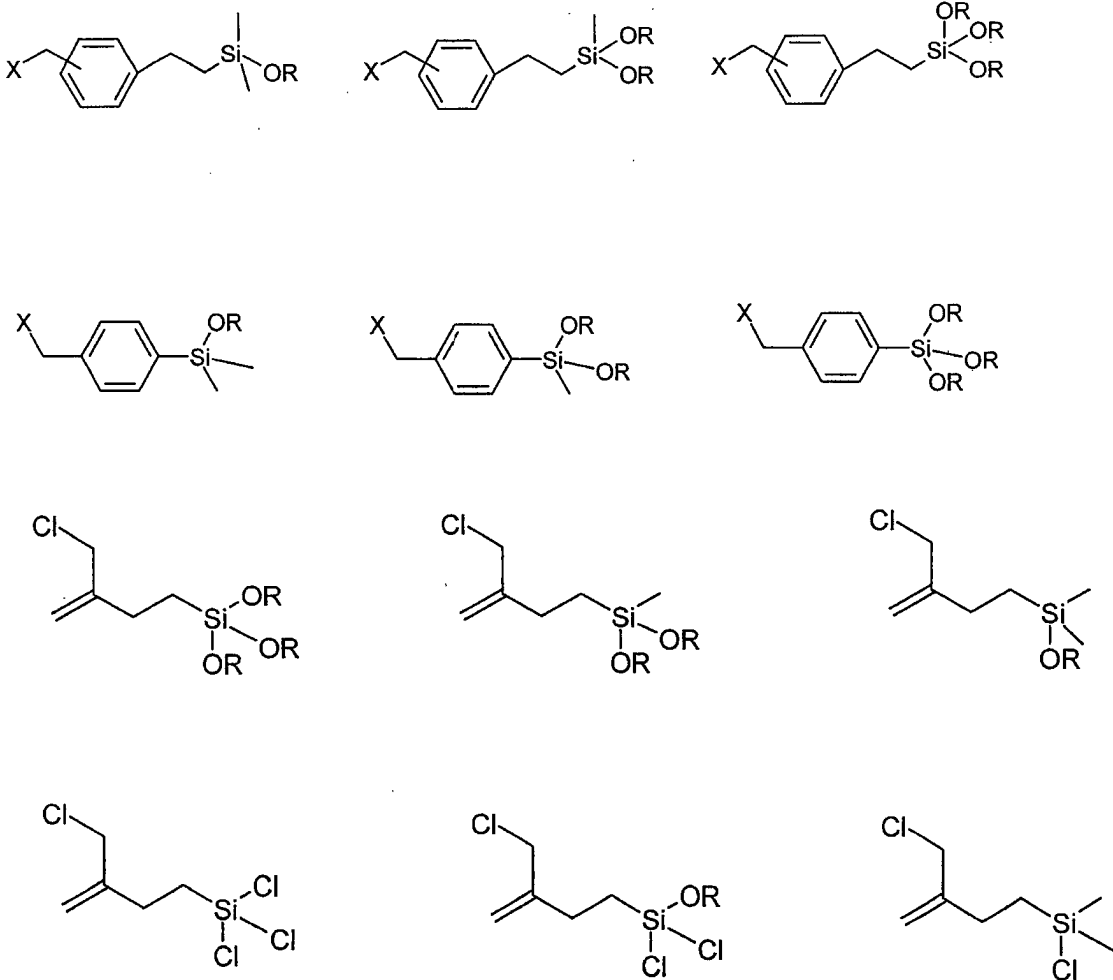
* Amino-, Aminomethyl-, Aminoethyl-, Aminopropyl-, Dimethylamino-, Diethylamino-, Diisopropylamino-, Di-propylamino-, Diethanolamino-, Dipropanolamino-, Diethylentriamin-, Triethylentetramin-, Tetraethylenpenta-min, Etheramin, Polyetheramin, 4-Diisobutylamino-l-butan, 6-Dipropylamino-l-hexan, Hydroxymethyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl-, Ethandiol-, Propandiol-, Propantriol-, Butantriol, 3-Glycidoxypropyl, Ethylglycidylether, Alkylrest, insbesondere ein C1 bis C4 Alkylrest, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, i-Propyl, Butyl, i-Butyl, Halogenid oder Wasserstoff ist.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass eines oder mehrere der folgenden Merkmale erfüllt wird:

- (i) das Trägermaterial wurde durch Silanisierung mit den Gruppen A und N versehen; und/oder
- (ii) die Gruppen A und/oder N und/oder T wurden über Reaktivsilane eingebracht; und/oder
- (iii) die Gruppen A und/oder N wurden durch monofunktionale, bi- oder trifunktionale Reaktivsilane oder einem Gemisch aus mindestens zwei unterschiedlich funktionalen Reaktivsilanen eingebracht; und/oder
- (iv) Die Gruppen A und/oder N wurden durch Reaktivsilane eingebracht, die ausgewählt sind aus der Gruppe von Aminosilane, Disilazanen, Chlorsilanen oder Alkoxisilanen; und/oder
- (v) Der Anteil der Gruppen A bezogen auf die Gruppen N beträgt 1% bis 99%, 1 bis 50%, vorzugsweise 1% bis 25%.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 9, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der nachfolgenden Merkmale:

- (i) das Trägermaterial wurde mit Initiatormolekülen T modifiziert, wobei im Anschluss die Gruppen A und/oder Gruppen N in Form von Monomeren eingebracht wurden; und/oder
- (ii) das Trägermaterial wurde mit Initiatormolekülen T modifiziert, wobei die Initiatormoleküle eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen:
 - (aa) die Initiatormoleküle sind reaktive Silane; und/oder
 - (bb) die Initiatormoleküle sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus



Wobei X-Halogen

und R ein Methyl-, Ethyl- Propyl- oder Iso-Propylrest ist

(iii) das Initiatormolekül ist 2-(Chloromethyl)allyltrimethoxysilan;

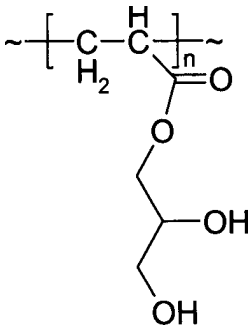
(iv) die Gruppen A wurden durch Monomere eingebracht, die ausgewählt sind aus der Gruppe N-(3-Aminomethyl)methacrylamid, N-(3-Aminoethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Aminoisopropyl)methacrylamid, N,N-Dimethylacrylamid, N,N-Diethylacrylamid, N,N-Diisopropylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylacrylat, N,N-(Dimethylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat, N,N-(Diethylamino)ethylacrylamid, N,N-(Diethylamino)ethylacrylat, N,N-(Diethylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Diethylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Diethylamino)propylacrylamid, N,N-(Diethylamino)propylacrylat, N,N-(Diethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Diethylamino)propylmethacrylat, N,N-(Diisopropylamino)ethylacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)ethylacrylat, N,N-(Diisopropylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Diisopropylamino)propylacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)propylacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat, 2-(Diisopropylamino)ethylmethacrylat und/oder

(v) die Gruppen N wurden durch Monomere eingebracht, die ausgewählt sind aus der Gruppe Butylacrylat, Propylacrylat, Ethylacrylat, Methylacrylat, Glycidylmethacrylat, Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), Glycidoxypropylmethacrylat, Glycerolmonomethacrylat (Isomerengemisch), Glycolmonomethacrylat, Glycidylacrylat, Hydroxyethylacrylat, Glycidoxypropylacrylat, Glycerolmonoacrylat (Isomerengemisch), Glycolmonoacrylat und N-Acryloxysuccinimid.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial Initiatorgruppen T aufweist, die zumindest teilweise mit Verbindungen funktionalisiert sind, die Gruppen A aufweisen, wobei die Gruppen A durch Gruppen N sterisch abgeschirmt sind, wobei die sterische Abschirmung durch eine oder mehrere der folgenden Modifikationen erzeugt wird:

(i) die Gruppen N liegen in Form von kettenförmigen verzweigten oder unverzweigten Oligomeren oder Polymeren vor, die die Gruppen A sterisch abschirmen; und/oder

- (ii) die Gruppen N liegen in Form von aus Monomeren gebildeten Oligomeren oder Polymeren vor, wobei diese eine Kettenlänge mit $n = 10-1000$, bevorzugt $n = 10-100$ aufweisen; und/oder
 (iii) Die Gruppen N liegen als Polyacrylat, vorzugsweise gemäß der folgenden Formel vor:



- (iv) die Gruppen N besitzen bzw. sind räumlich ausgedehnte Gruppen wie z. B. I-sopropyl, iso-Butyl, tert.-Butyl oder n-Hexylreste.

12. Verfahren zur Herstellung eines nukleinsäurebindenden Trägermaterials wie in einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 sowie 8 bis 11 definiert, wobei das Verfahren nach wenigstens einer der nachfolgenden Alternativen (A) bis (F) durchgeführt wird:

Alternative (A): Funktionalisierung des Trägermaterials mit einer wenigstens die Liganden I und II aufweisenden Mischung, wobei die Liganden I wenigstens eine Gruppe A aufweisen und die Liganden II wenigstens eine Gruppe N aufweisen; und/oder

Alternative (B): (a) Funktionalisierung des Trägermaterials mit einer Mischung aus Initiator-molekülen T und Liganden, die wenigstens eine Gruppe A aufweisen (b) Zugabe von wenigstens eine Gruppe N aufweisenden Verbindungen und Anbindung dieser an die Initiator-moleküle T; und/oder

Alternative (C): Funktionalisierung des Trägermaterials mit nukleinsäurebindenden Liganden, wobei diese innerhalb eines Liganden eine oder mehrere Gruppen A und eine oder mehrere Gruppen N aufweisen; und/oder

Alternative (D): Funktionalisierung des Trägermaterials mit Gruppen A und N, wobei die Gruppen A sterisch durch Verbindungen abgeschirmt werden, die wenigstens eine Gruppe N aufweisen; und/oder

Alternative (E): Funktionalisierung des Trägermaterials mit Gruppen A im Unterschuss; und/oder

Alternative (F): Funktionalisierung des Trägermaterials durch eine Kombination aus wenigstens zwei der Alternativen (A) bis (E).

13. Das Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es wenigstens eines der nachfolgenden Merkmale erfüllt:

(i) die Gruppen A sind tertiäre, sekundäre oder primäre Aminogruppen; und/oder

(ii) die Gruppen N sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hydroxylgruppen, Diolgruppen, Triolgruppen, Polyolgruppen, Saccharide, Epoxidgruppen, Halogenide, C1-C6 Alkylgruppen, Alken-, Alkylengruppen, Imidgruppen, Ethergruppen, oder Polyethergruppen und/oder

(iii) die Gruppen N sind beim Elutions pH-Wert und vorzugsweise in den spezifizierten pH Bereichen $2 < \text{pH} < 12$ ladungsneutral; und/oder

(iv) die Gruppen A und/oder N werden durch Monomere eingeführt; und/oder

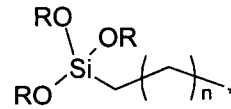
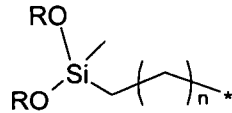
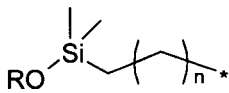
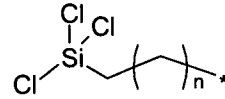
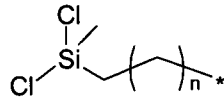
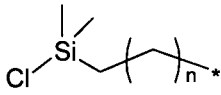
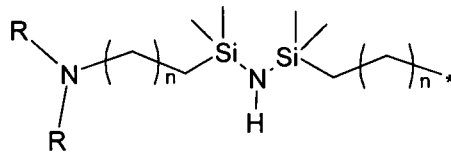
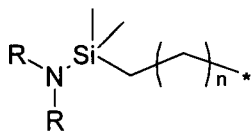
(v) die Gruppen A und/oder N werden durch Silanisierung eingeführt; und/oder

(vi) die Gruppen A und/oder N werden durch Reaktivsilane eingeführt; und/oder

(vii) zur Einführung der Gruppen A und/oder N werden monofunktionale oder bi- und/oder trifunktionale Reaktivsilane eingesetzt; und/oder

(viii) zur Einführung der Gruppen A und/oder N werden Reaktivsilane eingesetzt, die ausgewählt sind aus der Gruppe von Aminosilanen, Disilazanen, Chlorsilanen oder Alkoxisilanen; und/oder

(ix) die Gruppen A und/oder N werden durch Reaktivsilane eingeführt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:



wobei

$n = 1-5$

R eine C1 bis C6, vorzugsweise C1 bis C3 Alkylgruppe, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, i-Propyl ist;

* Amino-, Aminomethyl-, Aminoethyl-, Aminopropyl-, Dimethylamino-, Diethylamino-, Diisopropylamino-, Dipropylamino-, Diethanolamino-, Dipropanolamino-, Diethylentriamin-, Triethylentetramin-, Tetraethylenpentaamin-, Etheramin, Polyetheramin, 4-Diisobutylamino-l-butan, 6-Dipropylamino-l-hexan, Hydroxymethyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl-, Ethandiol-, Propandiol-, Propantriol-, Butantriol, 3-Glycidoxypropyl, Ethylglycidylether, Alkylrest, insbesondere ein C1 bis C4 Alkylrest, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, i-Propyl, Butyl, i-Butyl, Halogenid oder Wasserstoff ist.

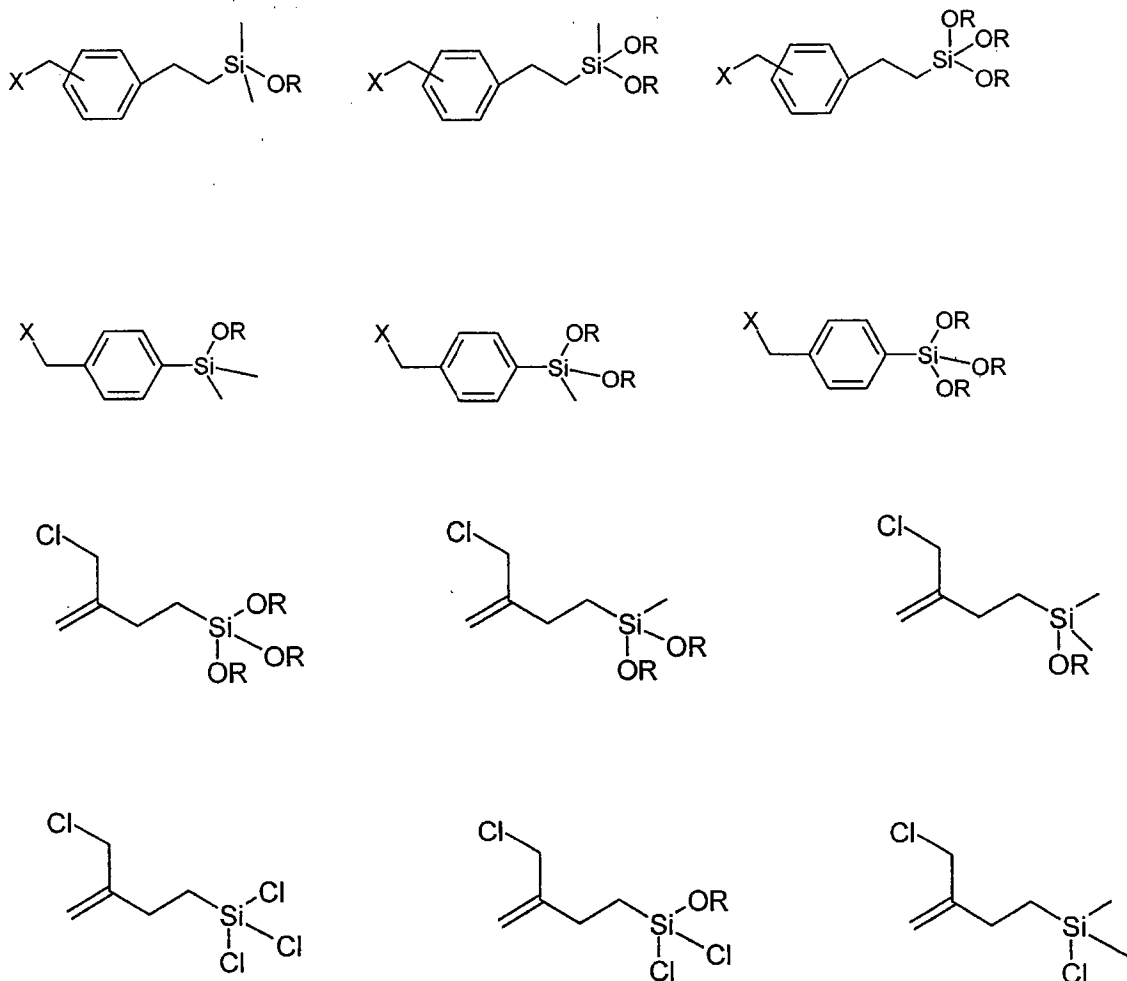
(x) die Gruppen A und N werden in einem Verhältnis eingeführt, so dass der Anteil der A Gruppen 1% bis 99%, 1 bis 50%, vorzugsweise 1% bis 25% beträgt; und/oder

(xi) das Trägermaterial wird mit Initiatormolekülen T modifiziert, die eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen:

(aa) die Initiatormoleküle werden durch Silanisierung aufgebracht; und/oder

(bb) die Initiatormoleküle sind Silane; und/oder

(cc) die Initiatormoleküle sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus



Wobei X-Halogen

Und R-Methyl, Ethyl, Propyl ist

(xii) als wird Initiatormolekül 2-(Chloromethyl)allyltrimethoxysilan verwendet; und/oder

(xiii) die Gruppen A werden durch Monomere eingebracht, die ausgewählt sind aus der Gruppe

2-(Diisopropylamino)ethylmethacrylat N-(3-Aminomethyl)methacrylamid, N-(3-Aminoethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Aminoisopropyl)methacrylamid N,N-Dimethylacrylamid, N,N-Diethylacrylamid, N,N-Diisopropylacrylamid N,N-(Dimethylamino)ethylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylacrylat, N,N-(Dimethylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat, N,N-(Diethylamino)ethylacrylamid, N,N-(Diethylamino)ethylacrylat, N,N-(Diethylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Diethylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Diethylamino)propylacrylamid, N,N-(Diethylamino)propylacrylat, N,N-(Diethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Diethylamino)propylmethacrylat, N,N-(Diisopropylamino)ethylacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)ethylacrylat, N,N-(Diisopropylamino)ethylmethacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)ethylmethacrylat, N,N-(Diisopropylamino)propylacrylamid, N,N-(Diisopropylamino)propylacrylat, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylamid, N,N-(Dimethylamino)propylmethacrylat, und/oder

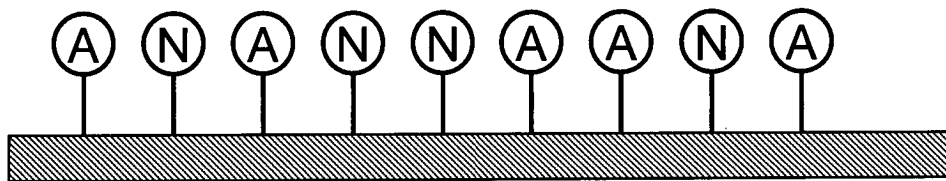
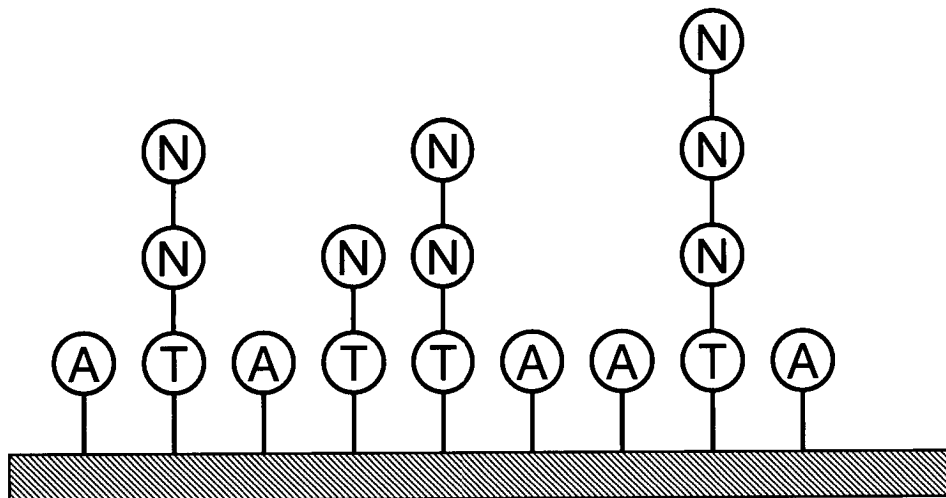
(xiv) die Gruppen N werden durch Monomere eingebracht, die ausgewählt sind aus der Gruppe Butylacrylat, Propylacrylat, Ethylacrylat, Methylacrylat, Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), Glycidylmethacrylat, Glycidoxypropylmethacrylat, Glycerolmonomethacrylat (Isomergemisch), N-Acryloxysuccinimid und Glycolmonomethacrylat.

14. Verwendung eines nukleinsäurebindenden Trägermaterials wie in einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 sowie 8 bis 11 definiert oder erhältlich nach einem der Ansprüche 12 oder 13, zur Aufreinigung von Nukleinsäuren.

15. Kit zur Aufreinigung von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Trägermaterial nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 sowie 8 bis 11 oder ein Trägermaterial erhältlich nach Anspruch 12

oder 13 aufweist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Figur 1**Trägermaterial nach Anspruch 2 (i)****A)****B)**
 Trägermaterial

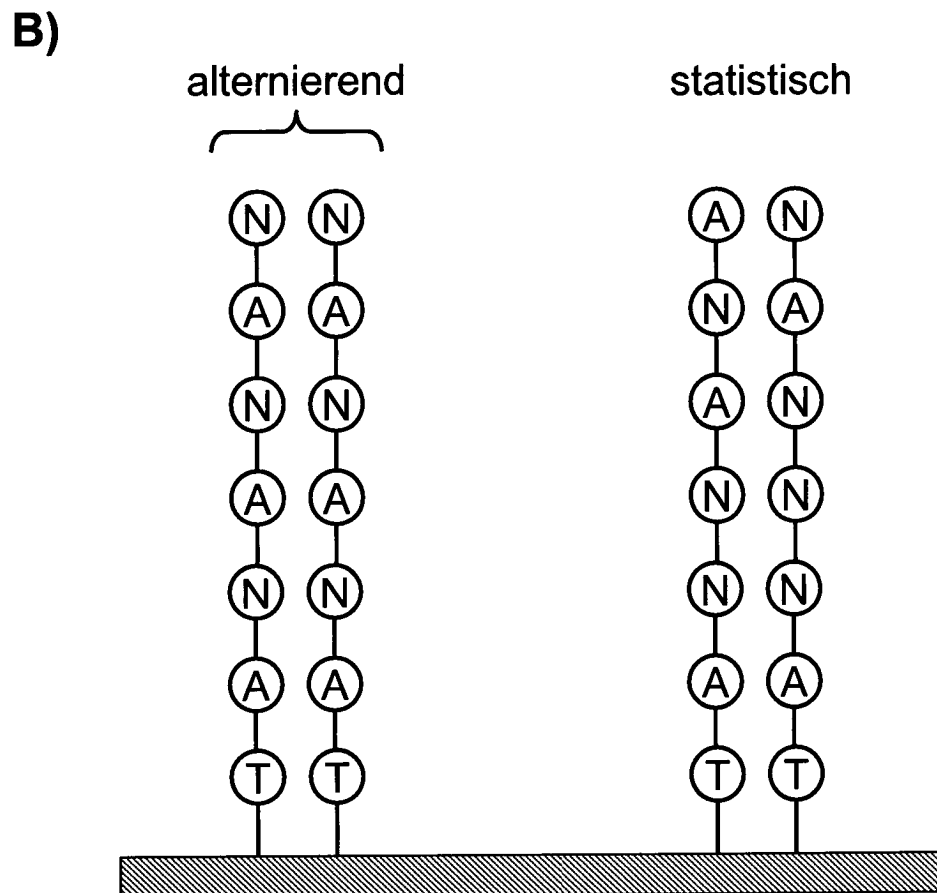
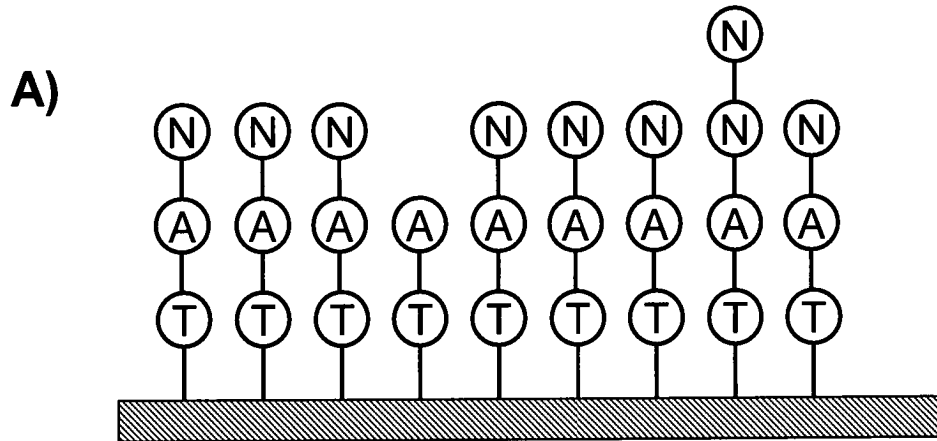
 Verbindung, die ein Gruppe A trägt

 Verbindung, die eine Gruppe N trägt

 Initiatormolekül T

Figur 2

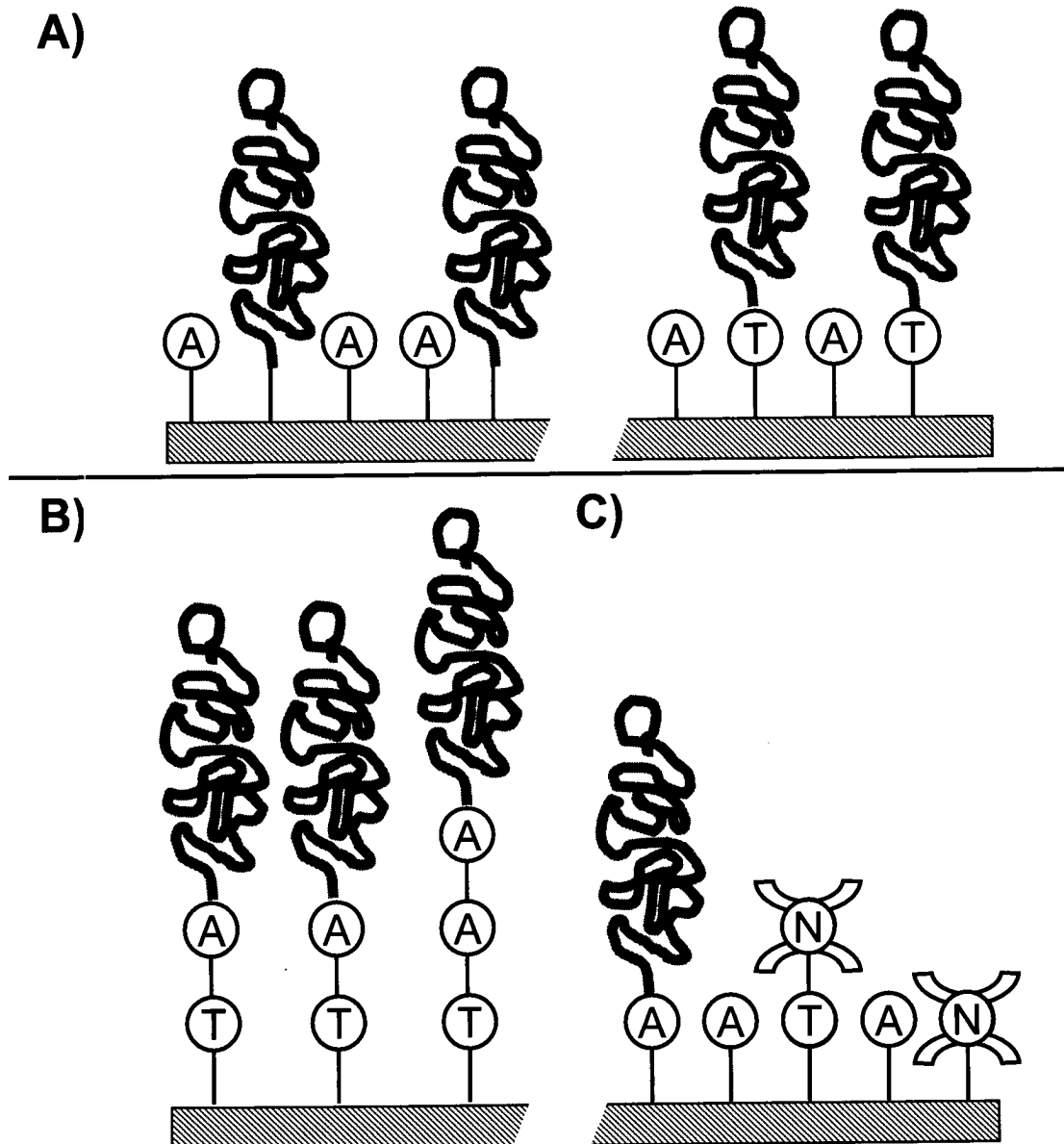
Trägermaterial nach Anspruch 2 (ii)



Legende wie Figur 1

Figur 3

Trägermaterial nach Anspruch 2 (iii)



Legende siehe Figur 1



= sterisch abschirmende Oligomere oder Polymere, die die Gruppe N tragen

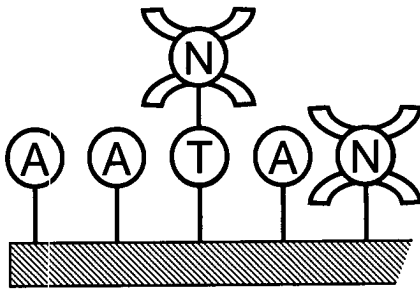


Verbindung, die eine sterisch abschirmende Gruppe N trägt

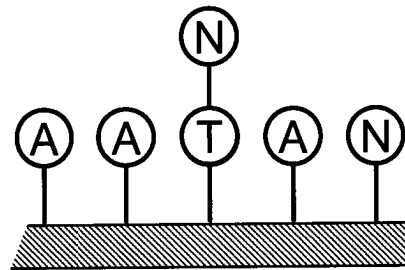
Figur 4

Trägermaterial nach Anspruch 2 (iv)

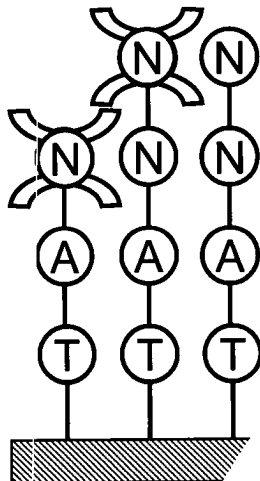
A)



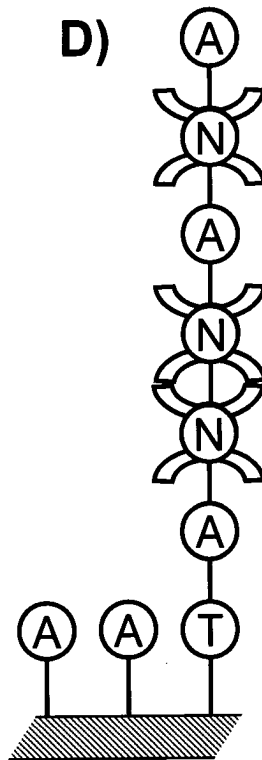
B)



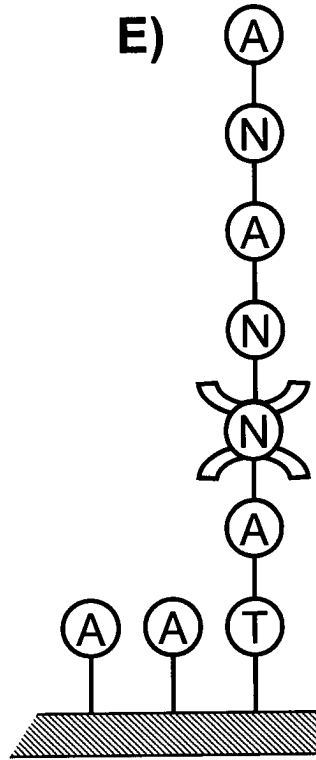
C)



D)



E)



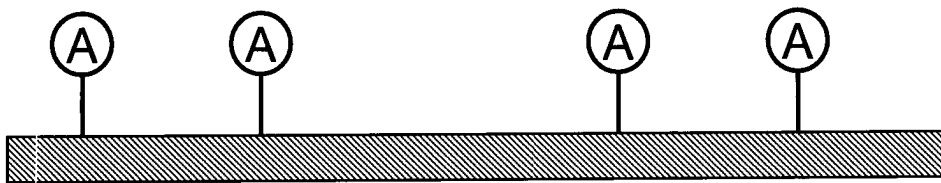
Legende siehe Figur 1



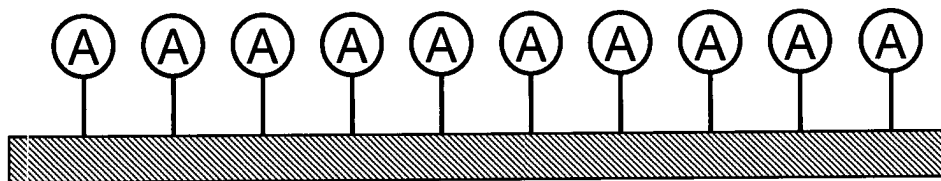
Verbindung, die eine sterisch abschirmende Gruppe N trägt

Figur 5

A) Trägermaterial nach Anspruch 3



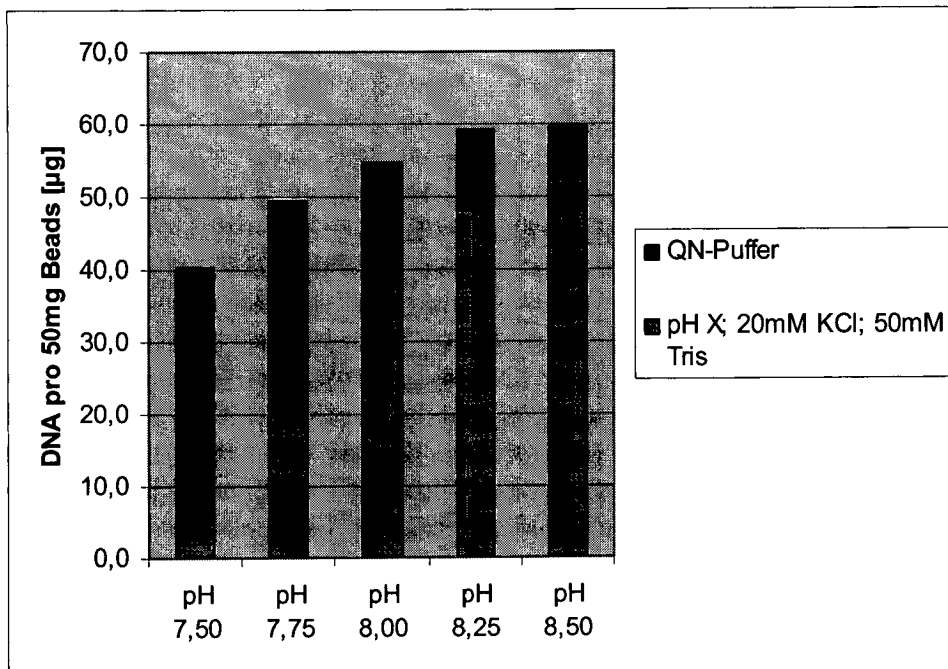
B) Herkömmliches Trägermaterial



 Trägermaterial

 Verbindung, die ein Gruppe A trägt

Figur 6



Figur 7

