



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 047 790 A1** 2010.04.15

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 047 790.7**

(22) Anmeldetag: **17.09.2008**

(43) Offenlegungstag: **15.04.2010**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(71) Anmelder:
QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE

(74) Vertreter:
**Michalski Hüttermann & Partner Patentanwälte,
40221 Düsseldorf**

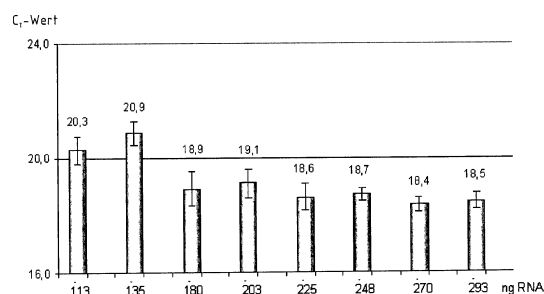
(72) Erfinder:
**Erbacher, Christoph, Dr., 42781 Haan, DE;
Grünefeld, Peter, Dr., 40723 Hilden, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe, aufweisend die folgenden Schritte:

- Bereitstellung eines Reaktionsgefäßes mit einer Gefäßoberfläche, die mindestens abschnittsweise - bevorzugt an der Innenseite des Gefäßes - dergestalt funktionalisiert ist, dass die Biomoleküle unter Hochsalzbedingungen reversibel binden kann,
- Durchführen mindestens eines Probenaufbereitungsschritts,
- Bindung von Biomolekülen aus der aufbereiteten Probe an die Gefäßoberfläche ("Binde- bzw. Normierungsschritt") unter Hochsalzbedingungen,
- ggf. Waschen ("Waschschritt") und
- Durchführung mindestens einer Folgereaktion (Fig. 6b).



Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Verwendung sowie eine Vorrichtung zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe. Das Verfahren, die Verwendung sowie die Vorrichtung sind beispielsweise für Anwendungszwecke in der Biochemie, Molekularbiologie, Molekulargenetik, Mikrobiologie, Molekularen Diagnostik und/oder Molekularen Forensik geeignet.

TECHNISCHER HINTERGRUND

[0002] Die Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe spielt eine große Rolle bei der Analyse von Proben, beispielsweise in der Molekularen Diagnostik, bei Genexpressionsanalysen, in der wirkstoffbezogenen Transkriptlevelanalyse, der Molekularen Forensik, der Sequenzierung oder der Genotypisierung.

[0003] Grund für eine Normierung ist, dass in einigen Fällen die nachzuweisenden Biomoleküle – insbesondere Nukleinsäuren und/oder Proteine – in der Probe in unterschiedlich hohen Mengen vorkommen können. Ebenso kann es sein, dass vorbereitende Probenbehandlungsschritte – z. B. eine Lyse, ein Zellaufschluß, ein Isolierungsschritt oder eine Reverse Transkription – die betreffenden Biomoleküle mit unterschiedlich hoher Effizienz bereitstellen.

[0004] In beiden Fällen bedeutet dies, dass der aufgrund der vorherigen Unwägbarkeitsfaktoren unbekannt Anteil an Biomolekülen in der Probe die Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit der weiteren Aufarbeitungs- und Analyseschritte erschwert bzw. weitere Schritte zur Quantifizierung notwendig macht.

[0005] Dies ist insbesondere bei der Aufarbeitung nukleinsäurehaltiger Proben von Bedeutung, die anschließend mit bekannten Verfahren (Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Reverse Transkription, ImmunoPCR) nachgewiesen werden sollen. Hier ist es von Bedeutung, die Verfahrensparameter – also insbesondere den Gehalt an Biomolekülen in der Probe abzustimmen, um auf eine gewünschte Zykluszahl zu kommen.

[0006] Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) hat sich in den letzten Jahrzehnten als System für die in-vitro-Amplifizierung von DNA etabliert. Durch die Weiterentwicklung der Technik, weg von der reinen Vervielfältigung hin zur qualitativen Analyse und der „Real-time“-PCR zur Quantifizierung, ist die PCR gleichzeitig ein weit verbreitetes Analyse- und Assaywerkzeug geworden. Eine Standardanwendung ist heute der Nachweis von sogenannter messenger RNA (mRNA), den RNA-Transkripten bestimmter Genabschnitte. Hierbei wird die Gesamtheit der vorhanden mRNA in einer Probe mit Hilfe eines Primers (häufig Poly-dT) und eines Enzyms (reverse transkriptase) wieder in DNA (cDNA) umgeschrieben und die so gebildete cDNA in einem PCR-Assay detektiert. Hierbei besteht die Möglichkeit die Assays in einem ein- oder zweistufigen Protokoll durchzuführen. Im einstufigen Protokoll werden sowohl die reverse Transkription (RT) als auch der PCR-Assay selber in dem PCR-Gerät durchgeführt, im zweistufigen Protokoll wird die reverse Transkription separat durchgeführt und ein Aliquot der Reaktion zu einem PCR-Mastermix gegeben. Jedoch kann bei unterschiedlichen Proben der mRNA-Level sehr unterschiedlich sein, ebenfalls ist die Effizienz der RT Schwankungen unterworfen. Dies führt zu teilweise sehr unterschiedlichen Mengen cDNA, die in die PCR-Reaktion eingebracht werden.

[0007] Im Stand der Technik wird in der Regel der RNA-Gehalt einer Probe vor Beginn der Reversen Transkription bestimmt, beispielsweise mit Hilfe von OD- oder Fluoreszenz-Messungen. Eine Quantifizierung auf cDNA Niveau wird in aller Regel nicht durchgeführt, da vorhandene Nukleotide, ribosomale RNA u. a. Bestandteile nach erfolgter Reverser Transkription eine Quantifizierung der cDNA komplizieren.

[0008] Ein solcher Quantifizierungsansatz kann insbesondere in sogenannten Two-Step-Verfahren zur Anwendung kommen, bei welchen die Probenaufbereitung (z. B. durch Lyse, Zellaufschluß, Isolierungsschritt oder Reverse Transkription) und die Probenweiterbehandlung (z. B. durch PCR) in getrennten Schritten und/oder verschiedenen Gefäßen erfolgt, so dass zwischen beiden Schritten ein Pipettierschritt erfolgen kann. Ebenso eignet sich ein solcher Schritt für solche Verfahren, bei denen eine ggf. bereits aufbereitete Probe direkt einem PCR-Verfahren unterzogen wird.

[0009] Im Fall der zweistufigen PCR aus dem Stand der Technik wird die reverse Transkription in einem separaten Gefäß durchgeführt und anschließend zu einem PCR-Mastermix hinzu pipettiert. An dieser Stelle könnte die cDNA-Menge nach der reversen Transkription noch ein Mal spektroskopisch quantifiziert werden. Hierauf wird auf Grund des zusätzlichen Aufwandes aber meist verzichtet und lediglich ein Aliquot der RT-Re-

aktion in der qPCR eingesetzt. Um eine zu starke Verdünnung des PCR-Mastermixes zu verhindern, sollen lediglich max 10% der Mastermixmenge als Aliquot hinzu gefügt werden. Dies bedeutet, dass in einer 25 µl PCR mit 2.5 µl lediglich etwas mehr als 10% des Produktes der reversen Transkription in einer PCR Reaktion genutzt werden kann, bzw. wieder auf größere Volumina ausgewichen werden muss. Der weitere Pipettierschritt führt zugleich zu einer weiteren Ungenauigkeit, wie er mit jeder manuellen Handhabung verbunden ist. Ebenso ist eine zusätzliche Gefahr der Kreuzkontamination gegeben.

[0010] Bei dem vorliegenden Verfahren ist kein zusätzliches Volumen im PCR Reaktionsansatz zu berücksichtigen, da die cDNA an eine definierte Fläche im Reaktionsgefäß reversibel gebunden wird.

[0011] Für Verfahren, bei denen die Probenaufbereitung (z. B. durch Lyse und/oder Reverse Transkription) und die Probenweiterbehandlung (z. B. durch PCR) in ein- und demselben Gefäß erfolgen und das Gefäß nach Möglichkeit geschlossen bleiben soll (sogenannte One-Step-Verfahren), ist der vorherige Ansatz nicht praktikierbar.

[0012] Bei One-Step-Verfahren aus dem Stand der Technik wird eine ggf. spektroskopisch quantifizierte Menge an Biomolekülen (beispielsweise mRNA) eingesetzt. Sowohl die Reverse Transkription als auch das PCR-Verfahren selbst werden in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt. Da letzteres während des Verfahrens nach Möglichkeit nicht geöffnet wird, wird also der komplette Ansatz der Reversen Transkription in die PCR-Reaktion überführt. Bei den verwendeten Proben kann aber der Biomolekül-Gehalt (beispielsweise an mRNA) sehr unterschiedlich sein, und die Effizienz des Probenaufbereitungsschritts (beispielsweise der Reversen Transkription) ist zudem Schwankungen unterworfen, was zu teilweise sehr unterschiedlichen Produktmengen nach Beendigung des Probenaufbereitungsschritts führt (beispielsweise cDNA) die dann in die Folge-reaktion (beispielsweise PCR) eingebracht werden, und somit zu nicht reproduzierbaren Reaktionsergebnissen führt. Durch das zusätzliche Reaktionsansatz-Volumen von üblicherweise 20 µl kann ferner nicht in einem für eine PCR üblichen Volumen von 25 µl gearbeitet werden. In der Regel werden einstufige RT-PCRs in einem 50 µl- bzw. 100 µl Maßstab durchgeführt.

[0013] In dem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird z. B. eine absolute Menge Nukleinsäure durch eine erfindungsgemäß erzeugte Bindefläche in einer Vorrichtung normiert, anstatt sie mit OD Messungen bzw. Fluoreszenzmessungen zu quantifizieren. Im Gegensatz dazu stellt der sogenannte „Housekeeper-Ansatz“ eine interne oder endogene Referenz dar, mit dem auch über den Zustand des biologischen Systems eine Aussage getroffen werden kann. Die Qualität des Assays kann mit dem Housekeeper-Gen beurteilt werden, denn es existieren für bestimmte Housekeeper-Gene im Zusammenhang mit bestimmten Zelltypen Richtwerte über deren Expressionslevel.

[0014] Es muß jedoch festgestellt werden, dass bei diesem Ansatz die Genauigkeit der Normierung aufgrund etwaiger Unwägbarkeiten stark begrenzt ist. So gibt es ein ideales Housekeeper-Gen nicht, d. h. es ist in jedem Fall eine art-, typ-, stadiums- und/oder zustandsspezifische Varianz der Genexpression zu beobachten, die auch durch Verwendung mehrere Housekeeper-Gene nicht komplett ausgeschaltet werden kann.

[0015] Ferner ist aus der US 20070231892 ein Verfahren für die Amplifikation von Nukleinsäuren bekannt, wobei ein Lysat einer biologischen Probe in einem Gefäß mit einer sogenannten „Charge Switch“ Oberfläche kontaktiert wird, um die im Lysat enthaltenen Nukleinsäuren zu binden. Anschließend wird das ungebundenen Lysat entfernt, und die gebundenen Nukleinsäuren werden amplifiziert. Bei dem besagten „Charge Switch“-Material tritt bei Änderung des pH-Werts eine Änderung der Oberflächenladung auf. Diese Eigenschaft von schwachen Ionentauschern tritt beispielsweise bei einem pH-Wert unterhalb des pKs-Wertes der Oberflächengruppen auf, so dass diese eine positive Oberflächenladung aufweisen. Negativ geladene Biomoleküle, insbesondere Nukleinsäuren können dann gebunden werden. Bei einem pH-Wert oberhalb des pKs-Wertes der Oberflächengruppen erfolgt hingegen einer Änderung der Ladung vom positiven ins neutrale oder negative, so dass negativ geladene Biomoleküle, insbesondere Nukleinsäuren, wieder freigesetzt werden können. Mithilfe geeigneter Puffer mit verschiedenen pH-Werten, die im übrigen niedrige Salzkonzentrationen aufweisen („Niedrigsalz-Puffer“), kann also der Bindungs- und Freisetzungsprozess über den pH-Wert gesteuert werden.

[0016] Das besagte „Charge Switch“-Material weist insbesondere Anionentauschereigenschaften auf. Nachteilig ist bei diesem Ansatz, dass sich geeignete Materialien nicht dauerhaft z. B. kovalent, auf der Oberfläche von Mikroreaktionsgefäßen, beispielsweise aus Polypropylen, befestigen lassen. Die Materialien werden in der Regel durch einfaches Aufschichten auf den Oberflächen immobilisiert. Allerdings ist eine dauernde Haftung an den Oberflächen nicht gewährleistet, was die Reproduzierbarkeit dieser Verfahren in Frage stellt und über-

dies eine mehrmalige Verwendung der entsprechend beschichteten Gefäße unmöglich macht.

[0017] Ferner ist die Isolation von RNA aus biologischen Proben unter den genannten Bedingungen mit „Charge Switch“-Materialien und generell mit Anionentauschern aufgrund der allgegenwärtigen RNAsen problematisch. Diese bleiben bei den herrschenden Niedrigsalzbedingungen intakt, so dass RNA innerhalb weniger Sekunden stark abgebaut wird und eine Nachweis erschwert oder gar unmöglich wird.

DEFINITIONEN

[0018] Unter dem Term „Nukleinsäure“ im Sinne der vorliegenden Erfindung wird insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – natürliche, vorzugsweise lineare, verzweigte oder zirkuläre Nukleinsäuren wie RNA, insbesondere mRNA, einzelsträngige und doppelsträngige virale RNA, siRNA, miRNA, snRNA, tRNA, hnRNA oder Ribozyme, genomische, bakterielle oder virale DNA (einzelsträngig und doppelsträngig), chromosomale und episomale DNA, frei zirkulierende Nukleinsäure und dergleichen, synthetische oder modifizierte Nukleinsäuren, beispielsweise Plasmide oder Oligonukleotide, insbesondere für die PCR verwendete Primer, Sonden oder Standards, mit Digoxigenin, Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleinsäuren oder sogenannte PNAs („peptide nucleic acids“) verstanden.

[0019] Unter dem Term „Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe“ wird ein Schritt verstanden, bei welchem sichergestellt wird, dass der Gehalt an Biomolekülen in der Probe ein vorgegebenes (erfindungsgemäß durch die Größe und die Bindungseigenschaften mindestens eines Teils der Gefäßoberfläche, bevorzugt an der Innenseite des Gefäßes) Maß nicht überschreitet. Dabei handelt es sich um ein Verfahren der Quantifizierung des Gehalts an Biomolekülen auf einen vorgegebenen Wert. Dies schließt ein, dass über dieses Maß hinausgehende Biomoleküle anschließend verworfen werden; weiterhin schließt dies mit ein, dass, wenn die Probe weniger Biomoleküle enthält als das wie oben beschriebene vorgegebene Maß, die Normierung nicht erfolgreich ist.

[0020] Unter dem Term „Immobilisierung“ im Sinne der vorliegenden Erfindung wird insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – eine reversible Immobilisierung an eine geeignete feste Phase verstanden.

[0021] Unter dem Term „Membranen“ werden insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – feste Phasen, die in der Lage sind Biomoleküle reversibel zu binden, verstanden.

[0022] Unter dem Term „Hochsalzpuffer“ wird insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – ein Puffer aufweisend eine hohe Salzkonzentration (bevorzugt chaotrope Substanzen), bevorzugt ≥ 100 mM, bevorzugter ≥ 500 mM und noch bevorzugter ≥ 1 M, verstanden.

[0023] Unter dem Term „Hochsalzbedingungen“ wird im Folgenden ein Milieu verstanden, das einen Hochsalzpuffer verwendet, bevorzugt einen Hochsalzpuffer enthaltend chaotrope Salze. Durch Hochsalz, bevorzugt aufweisend chaotrope Salze, wird die Löslichkeit von Nukleinsäuren in Wasser herabgesetzt. Grund ist das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken und damit verbunden eine Verringerung der Stabilisierung von Sekundär- und Tertiär-Strukturen der Nukleinsäuren in Wasser. Wird nun eine polare Oberfläche als Wasserstoffbrückendonator angeboten, binden die Nukleinsäuren an dieser Oberfläche, da sie dort eine bessere Stabilisierung erfahren als in Wasser. Wird die Salzkonzentration verringert, wird Wasser wieder ein besserer Wasserstoffbrückendonator als die polare Oberfläche, und die Nukleinsäuren lassen sich wieder von der Oberfläche ablösen.

[0024] Unter dem Term „chaotrope Substanzen“ bzw. „chaotrope Salze“ werden insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – Substanzen, die die Sekundär-, Tertiär- und/oder Quartärstruktur von Proteinen und/oder Nukleinsäuren ändern und zumindest die Primärstruktur intakt lassen, die Löslichkeit polarer Substanzen in Wasser verringern und/oder hydrophobe Wechselwirkungen verstärken, verstanden. Bevorzugte chaotrope Substanzen sind Guanidinhydrochlorid, Guanidinium(iso)thiocyanat, Natriumiodid, Natriumperchlorat, Kaliumiodid, Natrium(iso)thiocyanat und/oder Harnstoff.

[0025] Unter dem Term „Silanolgruppen“ wird insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – Siliziumoxid (amorph, kristallin) oder Polykieselsäure mit der Zusammensetzung $(\text{SiO}_{2x}(\text{OH})_a(\text{OEt})_b)$, verstanden, wobei der stöchiometrische Faktor a dabei eine Funktion von x und β ist (d. h.: $a = 4(1 - x) - \beta$). Siliziumdioxid bzw. Polykieselsäure kann eine oder mehrere der folgenden Bestandteile enthalten bzw. komplett auch durch folgende Oxide ersetzt sein:

- B_2O_3 (0–30%),
- Al_2O_3 (0–100%),

- TiO₂ (0–100%),
- ZrO₂ (0–100%),

[0026] Des Weiteren kann das Material oberflächenfunktionalisiert sein. Beispielsweise können die Silanolgruppen durch Silanisierung mit Silanen behandelt worden sein. Dabei kann die Oberfläche hydrophobisiert werden oder es können anionische – und/oder kationische Gruppen und/oder Chelatoren aufgebracht werden. Beispielsweise kann eine Nitrilotriessigsäure (NTA) als Chelatorgruppe aufgebracht werden. Dies ermöglicht eine Adaption der Adsorberfläche an die zu bindenden Biomoleküle.

[0027] Eine weitere Möglichkeit besteht darin, halogenhaltige Atom Transfer Radikal Initiatoren auf die Silanolgruppen mit Hilfe eines Silanisierungsprozesses aufzubringen, so dass man Polymerketten durch einen "grafting from"-Prozess an den Silanolgruppen erzeugen kann. Dieses auch Pfropf-Copolymerisation genannte Verfahren erfordert Polymerisationsprozesse, bei denen die Tendenz zu Kettenabbruch, Disproportionierung oder Rekombination eine geringe Häufigkeit aufweist. Um eine Pfropf-Copolymerisation durchzuführen, müssen Initiatoren auf die Silanolgruppen aufgebracht werden. Dies kann geschehen, indem die PECVD-Silikatschicht mit halogenhaltigen Silanen behandelt wird. Alternativ werden die Initiatore direkt im PECVD Prozess eingebracht. Dabei werden dem Prozessgas (Precursor im PECVD Prozess) flüchtige, halogenhaltige Verbindungen zugefügt.

[0028] Führt man an einer solchen halogenidhaltigen Oberfläche eine ATRP durch, können Polymere (Homopolymere, Co-Polymere, block Co-Polymere) die kovalent an der Oberfläche gebunden sind in situ erzeugt werden. Geeignete Monomere sind radikalisch polymerisierbare Verbindungen wie z. B. Acrylate, Metacrylate, Styrol und Styrolerivate.

[0029] Die Atom Transfer Radikal Polymerisation (ATRP) ist eine Form der lebenden, radikalischen Polymerisation. Die Radikale werden über ein Cu-I/CuII Redoxgleichgewicht aus einem Organohalogenid durch eine Atomtransferprozess gebildet. Das Redoxgleichgewicht sorgt dabei für eine starke Herabsetzung der Konzentration an freien Radikalen. Kettenabbruchreaktionen durch Disproportionierung oder Rekombination sind daher stark zurückgedrängt.

[0030] Unter dem Begriff „Amplifikationsreaktion“ wird ein Verfahren verstanden, das es ermöglicht, die Konzentration eines oder mehrerer Analyte – bevorzugt Nukleinsäuren – mindestens zu verdoppeln.

[0031] Man unterscheidet hier zwischen isothermalen und thermocyclischen Amplifikationsreaktionen. Bei ersteren bleibt die Temperatur während des gesamten Verfahren stets gleich, während bei letzterer thermische Zyklen durchlaufen werden, mit deren Hilfe die Reaktion und die Amplifikation gesteuert wird.

[0032] Bevorzugte isothermale Amplifikationsreaktionen sind z. B.

- Loop mediated isothermal amplification (LAMP),
- Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA),
- Rolling Circle Chain Reaction (RCCR), oder Rolling Circle Amplification (RCA), und/oder
- Transcription mediated amplification (TMA)

[0033] Bevorzugte thermocyclische Amplifikationsreaktionen sind z. B.

- Ligase-Kettenreaktion (LCR), und/oder
- Polymerase Kettenreaktion (PCR)

[0034] Unter dem Term „Polymerase Kettenreaktion“ (PCR) wird ein Verfahren zur in vitro-Vervielfältigung von Nukleinsäuren verstanden, wie es z. B. in Bartlett & Stirling (2003) beschrieben ist.

[0035] Unter dem Term „Ligase-Kettenreaktion“ (LCR) wird ein Nachweisverfahren für geringste Mengen von Nukleinsäuren verstanden, das ähnlich wie die Polymerase-Kettenreaktion funktioniert, nur unter Verwendung eines anderen Enzyms (anstatt der Polymerase eine Ligase). Zwei Proben pro DNA-Strang werden zu einer Probe ligiert. Die entstehenden, oft nur 30–50 bp langen Amplifikate eines Zyklus dienen in den folgenden Zyklen selbst wieder als Ansatzpunkt für die supplementierten Primer.

[0036] Unter dem Term „Loop-mediated Isothermal Amplification“ (LAMP) wird eine Methode zur isothermalen Nukleinsäureamplifikation verstanden, bei welcher 6 verschiedene Primer eingesetzt werden, die bestimmte Regionen auf der Target-Sequenz erkennen und daran binden. LAMP nutzt eine DNA-Polymerase mit Strand-displacement Aktivität und läuft bei einer konstanten Temperatur von etwa 65°C ab. Amplifikation und

Detektion der Target-Sequenz findet in einem einzigen Schritt statt.

[0037] Unter dem Term „Nucleic Acid Sequence Based Amplification“ (NASBA), wird ein Verfahren zur Amplifikation von RNA verstanden (Compton 1991). Dabei wird eine RNA-Matrix zu einem Reaktionsgemisch gegeben, und ein erster Primer bindet an die komplementäre Sequenz im Bereich des 3'-Endes der Matrix. Anschließend wird mit einer Reversen Transkriptase der zur Matrix komplementäre DNA-Strang polymerisiert. Mit Hilfe von RNase H wird dann die RNA-Matrix verdaut (RNase H verdaut nur RNA in RNA-DNA Hybriden, nicht single-stranded RNA). Anschließend wird ein zweiter Primer an das 5' Ende des DNA-Stranges gebunden. Dieser wird von der T7 RNA Polymerase als Startpunkt für die Synthese eines zum DNA-Strang komplementären RNA-Moleküls verwendet, welches dann wieder als Ausgangsmatrix verwendet werden kann. NASBA wird bei einer konstanten Temperatur von normalerweise 41°C. durchgeführt und liefert unter bestimmten Umständen schnellere und bessere Resultate als PCR.

[0038] Unter dem Term „Transcription Mediated Amplification“ (TMA) wird ein von der US-Firma Gen-Probe entwickeltes isothermales Amplifikationsverfahren verstanden, das der NASBA ähnlich ist und bei dem ebenfalls RNA Polymerase und Reverse Transkriptase verwendet werden (Hill, 2001)

[0039] Der Term „Rolling Circle Chain Reaction“ (RCCR) oder „Rolling circle Amplification“ (RCA) betrifft ein Amplifikationsverfahren, das die allgemeine Nukleinsäure-Replikation nach dem rolling-circle-Prinzip imitiert und unter anderem in der US 5854033 beschrieben ist.

[0040] Unter dem Term „Immuno-PCR (IPCR)“ wird insbesondere ein Verfahren zum Nachweis von Targetmolekülen verstanden, bei welchem chimäre Konjugate aus targetspezifischen Antikörpern und Nukleinsäuremolekülen verwendet werden.

[0041] Naturgemäß handelt es sich bei besagten Targetmolekülen vor allem um Proteine und/oder Oligopeptide, da sich gegen diese Molekülspezies am einfachsten hochspezifische Antikörper herstellen lassen. Es kann sich jedoch bei besagten Targetmolekülen auch um andere Biomolekülspezies handeln, wie z. B. Oligo- und Polysaccharide, oder Lipide, solange sich gegen diese Biomolekülspezies hochspezifische Antikörper herstellen lassen, so dass diese mithilfe der Immuno-PCR nachweisen lassen.

[0042] Die Nukleinsäuremoleküle dienen dabei als Marker bzw. Sonden, die zur Signalerzeugung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Die enorme Effizienz der Nukleinsäureamplifikation und die hohe Spezifität der Bindung kann zu einer 100- bis 10.000-fachen Sensitivitätssteigerung verglichen mit Standard-Verfahren zum Nachweis von Targetmolekülen (z. B. ELISA-Verfahren) führen. Die IPCR wurde 1992 entwickelt (Sano et al. (1992)).

[0043] Unter dem Term „Reverse Transkription“ wird ein Verfahren zum Umschreiben von mRNA in DNA (die sogenannte „cDNA“) verstanden, bei welchem in der Regel eine Reverse Transkriptase (auch RNA-abhängige DNA-Polymerase) zum Einsatz kommt. Diese synthetisiert zunächst von einer einzelsträngigen RNA einen RNA-DNA-Hybridstrang mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität. Für den folgenden Abbau des RNA-Anteils ist ein eigener Abschnitt des Proteins zuständig, der RNase-H-Anteil. Es folgt die Vervollständigung des einzelsträngigen DNA-Stranges zum doppelsträngigen durch DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität. Die auf diese Weise generierte cDNA kann dann mittels PCR amplifiziert und nachgewiesen werden.

[0044] Wie andere DNA-Polymerasen benötigt auch eine Reverse Transkriptase Primer zur Initiation der DNA-Synthese. Oftmals wird hier ein so genannter Oligo-d(T)-Primer verwendet, also mehrere Thymin-Basen, welche komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind.

[0045] Die Kombination aus Reverser Transkription und anschließender PCR (auch als RT-PCR bezeichnet) wird häufig verwendet, um den Gehalt einer oder mehrerer mRNAs, in einer Probe nachzuweisen, beispielsweise in der Genexpressionsanalyse, bei der Erstellung von Genexpressionsprofilen und dergleichen. Bei der sogenannten „Two-Step RT-PCR“ werden dabei unter anderem unterschiedliche Primer für die Reverse Transkription und die anschließende PCR verwendet, während bei der „One-Step RT-PCR“ statt dessen bereits in der Reversen Transkription die genspezifischen Primer verwendet werden können, die auch für die anschließende PCR verwendet werden, und beide Reaktionen werden hintereinander im selben Gefäß ausgeführt. Dabei macht man sich zunutze, dass die verwendete Reverse Transkriptase (in der Regel viralen Ursprungs) bei einer niedrigeren Temperatur denaturiert als die verwendete DNA-Polymerase (z. B. Taq-Polymerase), die bekanntermaßen erst bei verhältnismäßig hohen Temperaturen denaturiert, und führt entsprechend die Reverse Transkription bei einer niedrigeren Temperatur durch als die anschließende PCR. Bevorzugt verwendet man

dabei eine sogenannte Hot-Start-DNA-Polymerase, die thermoreversibel gehemmt ist. Beim Umschalten vom niedrigeren Temperaturniveau der Reversen Transkription auf das höhere Temperaturniveau der PCR wird dabei einerseits die Reverse Transkriptase denaturiert, andererseits wird die DNA-Polymerase durch Aufhebung der thermoreversiblen Hemmung aktiviert. Besagte thermoreversible Hemmung kann z. B. durch einen im aktiven Zentrum der DNA-Polymerase bindenden Antikörper verwirklicht sein, ebenso aber auch z. B. durch reversible kovalente oder nicht-kovalente chemische Modifikation der Polymerase, beispielsweise mit Aldehyden (siehe z. B. US 6183998 der Anmelderin der vorliegenden Erfindung). Für eine Übersicht siehe auch Birch et al. (1996).

[0046] Unter dem Term „Real-Time-PCR“ auch quantitative PCR oder qPCR (nicht zu verwechseln mit revers transkribierter PCR) wird ein Verfahren verstanden, das auf dem Prinzip der bekannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der amplifizierten DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung (z. B. kompetitive PCR), meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente, vornehmen.

[0047] Für die Detektion kommen Farbstoffe wie z. B. Ethidiumbromid, SYBR Green I sowie FRET-Sonden oder sogenannte Double-Dye-Oligos (auch als TaqMan-Sonden bezeichnet) in Frage.

[0048] Der Begriff „C_T-Wert“ (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“) bezeichnet den PCR-Zyklus beschreibt, an dem erstmals ein Amplifikat nachweisbar ist; hierbei wird in der Regel die Fluoreszenz gemessen und der Zyklus angegeben, bei welcher letztere erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

[0049] In der Anfangsphase einer PCR-Reaktion ist die Menge an Template (d. h. an zu amplifizierender DNA) noch begrenzt, während in der Schlußphase der Amplifikation die Menge der Produkte derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, Produktfragmente zunehmend miteinander hybridisieren und die Edukte langsam verbraucht werden. Nur in der dazwischenliegenden Phase besteht ein exponentieller Zusammenhang zwischen Anzahl der Amplifikationszyklen und Amplifikatmenge („exponentielle Phase“). Für die Bestimmung des Zeitpunkts, an welchem die exponentielle Phase beginnt, macht man sich den erwähnten C_T-Wert zunutze.

[0050] Ein niedriger C_T-Wert gibt überdies an, dass bereits eine geringe PCR-Zyklenzahl für einen erstmaligen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über das Grundrauschen ausreichend ist (also relativ viel Template vorhanden war), während ein hoher C_T-Wert dementsprechend angibt, dass hierfür viele PCR-Zyklen benötigt werden (also relativ wenig Template vorhanden war).

[0051] Unter dem Term „ELISA“ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wird ein immunologisches Nachweisverfahren verstanden, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert.

[0052] Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das sog. Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

[0053] Unter dem Begriff „Hybrid Capture Assay“ (HCA) wird im Folgenden ein Verfahren verstanden, bei dem RNA:DNA-Hybride durch Inkubation der gesuchten Ziel-DNA mit einer RNA-Probe gebildet werden. Die Hybride werden an eine Oberfläche gebunden und dann mit einem enzymgelabelten Antikörper inkubiert. „Hybrid Capture Assay“ werden insbesondere in den HPV-Assays der Firma Digene verwendet.

[0054] Unter dem Begriff „Nested PCR“ wird im Folgenden ein Verfahren verstanden, bei dem ein bereits ver-

vielfältiges DNA-Fragment ein weiteres Mal amplifiziert wird; dieser Vorgang erfolgt mit einem zweiten Primerpaar, das innerhalb des in der ersten Reaktion verwendeten Primerpaars angeordnet ist.

AUFGABE DER VORLIEGENDEN ERFINDUNG

[0055] Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die beschriebenen, sich aus dem Stand der Technik ergebenden Nachteile zumindest weitgehend zu überwinden und insbesondere für eine weite Spanne von Anwendungen ein Verfahren, eine Verwendung und/oder eine Vorrichtung zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe zu schaffen.

[0056] Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein besser geeignetes Verfahren, eine Verwendung und/oder eine Vorrichtung zur Normierung von Biomolekülen in einer Probe zu schaffen, dass sich für die Verwendung mit den oben erwähnten One-Step- und Two-Step Verfahren eignet.

[0057] Weitere Aufgabe ist es, für eine weite Spanne von Anwendungen ein Verfahren, eine Verwendung und eine Vorrichtung zur Normierung des Gehalts an einer Nukleinsäure in einer Probe zu schaffen.

[0058] Weitere Aufgabe ist es, für eine weite Spanne von Anwendungen ein Verfahren, eine Verwendung und eine Vorrichtung zur Normierung des Gehalts an einer cDNA, hergestellt mittels einer Reversen Transkription aus RNA, bevorzugt mRNA zu schaffen.

[0059] Weitere Aufgabe ist es, für eine weite Spanne von Anwendungen ein Verfahren, eine Verwendung und eine Vorrichtung zur Normierung des Gehalts an einer Nukleinsäure, insbesondere RNA in einer Probe zu schaffen.

[0060] Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren, eine Verwendung und/oder eine Vorrichtung zur Normierung von Biomolekülen in einer Probe zu schaffen, dass sich durch eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit auszeichnet.

[0061] Weitere Aufgabe ist es, für ein Verfahren, eine Verwendung und eine Vorrichtung zur Normierung des Gehalts an einer Nukleinsäure in einer Probe zu schaffen, die bzw. das eine mehrmalige Verwendung der Reaktionsgefäße ermöglicht.

[0062] Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren gemäß dem unabhängigen Verfahrensanspruch der vorliegenden Erfindung gelöst. Demgemäß wird ein Verfahren zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe, aufweisend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines Reaktionsgefäßes mit einer Gefäßoberfläche, die mindestens abschnittsweise – bevorzugt an der Innenseite des Gefäßes – dergestalt funktionalisiert ist, dass sie Biomoleküle unter Hochsalzbedingungen reversibel binden kann,
- b) Durchführen mindestens eines Probenaufbereitungsschritts,
- c) Bindung von Biomolekülen aus der aufbereiteten Probe an die Gefäßoberfläche („Binde- bzw. Normierungsschritt“) unter Hochsalzbedingungen,
- d) ggf. Waschen („Waschschritt“), und
- e) Durchführung mindestens einer Folgereaktion.

[0063] Im Gegensatz zu aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren fungiert hier erstmalig die Oberfläche des Reaktionsgefäßes als Adsorptionsfläche für die reversible Bindung einer definierten Menge an Biomolekülen unter Hochsalzbedingungen, und damit als Mittel zur Normierung des Biomolekülgehalts in der Probe. Sie ist daher dergestalt funktionalisiert, dass sie Biomoleküle unter Hochsalzbedingungen reversibel binden kann. Die Art der Funktionalisierung richtet sich dabei insbesondere auch nach der Art der zu bindenden Biomoleküle. Hierauf wird weiter unten noch eingegangen. Die Menge an Biomolekülen die auf der Fläche gebunden werden können, wird durch die Größe der Fläche, die durch die Probe kontaktierte Fläche, die Art der chemischen Funktionalisierung dieser Fläche, die Inkubationszeit der Biomoleküle mit der Fläche und die Stringenz des dabei verwendeten Bindepuffers eingestellt.

[0064] Die genannten Hochsalzbedingungen (siehe obige Definition) tragen überdies dazu bei, dass etwaige RNAsen deaktiviert werden. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass – anders als unter den bei Charge Switch“-Materialien und generell Anionentauschern herrschenden Niedrigsalzbedingungen – in einer Probe enthaltene RNA möglichst vollständig und intakt isoliert und dem Nachweis zugeführt werden kann.

[0065] Im Stand der Technik ist bei den sogenannten „Two-Step-Verfahren“, wie bereits oben erläutert wurde, mindestens ein zusätzlicher Pipettierschritt zur Überführung der isolierten Biomoleküle in ein neues Reaktionsgefäß erforderlich, bevor ggf. eine Folgereaktion durchgeführt wird. Dieser Schritt wird auch zum Anlass genommen, eine Normierung auf cDNA Level durchzuführen. Hierbei werden Schwankungen des zellulären Inputs, der RNA Qualität und Quantität, der RT Effizienz ausgeglichen, sodass die Ergebnisse miteinander vergleich- und interpretierbar werden.

[0066] Bei dem One-Step RT-PCR Verfahren würde man mit der hier vorgestellten Verfahren auf das RNA Inputlevel normieren, da die cDNA in situ synthetisiert wird und direkt mit der Polymerase weiter umgesetzt wird. Hierbei können Schwankungen des zellulären Inputs, der RNA Qualität und Quantität ausgeglichen werden.

[0067] Die mit diesen Schritten verbundenen Nachteile, die bereits oben beschrieben sind, entfallen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die Biomoleküle binden reversibel an die Oberfläche des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes, bis es zu einer Absättigung der erfindungsgemäßen Oberfläche und auf diese Weise zu einer Normierung der Biomolekül-Menge kommt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist aus diesem Grund kein gesonderter Quantifizierungsschritt der isolierten Biomolekül-Menge erforderlich. Außerdem kann eine Folgereaktion direkt in dem erfindungsgemäßen Reaktionsgefäß ohne zusätzliche Pipettierschritte durchgeführt werden.

[0068] Die Normalisierung hat des Weiteren den Vorteil die gemessenen Expressionsdaten bezüglich Differenzen im zellulären Input, der RNA Qualität/Quantität und Effizienz der Reversen Transkription verschiedener Proben (letzteres Prinzip nur bei Two-Step RT PCR wirksam) zu korrigieren.

[0069] Bevorzugt ist vorgesehen, dass die erwähnte Folgereaktion in demselben Gefäß durchgeführt wird wie der Probenaufbereitungsschritt. Dies ist aber nicht unbedingt erforderlich. Es kann z. B. vorgesehen sein, dass nach dem Binde- bzw. Normierungsschritt ein oder mehrere Aliquots aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein oder mehrere neue Reaktionsgefäße überführt werden, um die mindestens eine Folgereaktion in dem bzw. den weiteren Reaktionsgefäßen durchzuführen.

[0070] Besonders bevorzugt ist dabei vorgesehen, dass es sich bei besagten Biomolekülen um Nucleinsäuren handelt.

[0071] Nucleinsäuren sind insbesondere mit herkömmlichen Amplifikationsverfahren, wie z. B. PCR, nachweisbar.

[0072] Es kann sich bei besagten Biomolekülen aber auch generell um Mitglieder jeglicher Biomolekülspezies handeln, die mit Antikörpern nachweisbar sind. Hier ist insbesondere an Proteine gedacht, die sich mit Oligonukleotid-markierten Antikörpern („Immuno-PCR“) oder mit ELISA nachweisen lassen (siehe unten).

[0073] Ferner ist bevorzugt vorgesehen, dass besagter mindestens eine Probenaufbereitungsschritt ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend

- Zellyse,
- Zellaufschluß,
- Isolierung von Biomolekülen,
- Aufreinigung von Biomolekülen,
- Reverse Transkription (RT) von RNA in DNA, und/oder
- Enzymatische Reaktionen und/oder Probenbehandlungen.

[0074] Bei besagten enzymatischen Reaktionen und/oder Probenbehandlungen kann es sich bevorzugt um Verdau einer Probe mit RNAsen, DNAsen und/oder Proteasen handeln.

[0075] Ferner ist bevorzugt vorgesehen, dass besagte mindestens eine Folgereaktion ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend

- Amplifikationsreaktionen
- Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA), und/oder
- Hybrid Capture Assay.

[0076] Besonders bevorzugt ist dabei vorgesehen, dass es sich bei der besagten Amplifikationsreaktion um eine Reaktion ausgewählt aus der Gruppe

- Polymerase-Kettenreaktion (PCR),
- Nested PCR
- Reverse Transkription (RT),
- Immuno-PCR

[0077] Generell kann hier jedoch auch jede andere mögliche Nachweisreaktion für mindestens eine der genannten Biomolekülspezies vorgesehen sein.

[0078] Ein besonders geeignetes Beispiel für das erfindungsgemäße Verfahren besteht aus einem Verfahren aufweisend eine Reverse Transkription von mRNA in cDNA (Probenaufbereitungsschritt), die Normierung der gebildeten cDNA durch Binden an die Gefäßoberfläche (Binde- bzw. Normierungsschritt), und die anschließende nachweisende Amplifikation der cDNA durch Real-Time-PCR (Folgereaktion). Dieses Verfahren wird in Tabelle 1 als „Workflow 1“ bezeichnet.

[0079] In einem solchen Verfahren wird die Reverse Transkription direkt in einem erfindungsgemäßen Reaktionsgefäß durchgeführt und die generierte cDNA nach einer Inkubation reversibel an die erfindungsgemäße Oberfläche gebunden. Die Oberfläche wird auf diese Weise abgesättigt, und so können definierte Mengen an cDNA gebunden werden. Überschüssige cDNA wird während des anschließenden Waschschriffs entfernt. Nach besagtem Waschriffte kann die cDNA in demselben Reaktionsgefäß der Real-Time-PCR unterzogen werden.

[0080] Vorteil dieses erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber Verfahren aus dem Stand der Technik ist, dass nach der Reversen Transkription weder eine Quantifizierung der resultierenden cDNA-Menge, noch ein zusätzlicher Pipettierschritt in ein neues Reaktionsgefäß erforderlich ist. Es kommt somit zu einer Vereinfachung bzw. Verkürzung des Protokolls und folglich zu einer erheblichen Verringerung des Arbeitsaufwandes und/oder der Arbeitskosten, sowie zu einer Reduktion der Gefahr von Kreuzkontaminationen und/oder Ungenauigkeiten verursacht durch den zusätzlichen Pipettierschritt.

[0081] Vorteil dieses erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber Verfahren aus dem Stand der Technik ist weiterhin, dass hierbei trotz eines Verzichts auf eine Quantifizierung der resultierenden cDNA-Menge eine, unabhängig von der ursprünglich eingesetzten RNA-Menge, normierte Menge an cDNA für die PCR verwendet wird. Ebenso kann hierbei in einem für eine PCR üblichen Volumen von 25 µl gearbeitet werden, was zu einer erheblichen Kostensenkung führt.

[0082] Die Reverse Transkription als auch die anschließende PCR werden wie beschrieben bevorzugt in demselben Gefäß durchgeführt. Es kann aber auch vorgesehen sein, dass nach dem Binde- bzw. Normierungsschritt ein oder mehrere Aliquots aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein oder mehrere neue Reaktionsgefäße überführt werden, um die PCR in dem bzw. den weiteren Reaktionsgefäßen durchzuführen.

[0083] Ein weiteres geeignetes Beispiel für das erfindungsgemäße Verfahren besteht aus einem Verfahren aufweisend den Probenaufschluß und die anschließende Gewinnung von mRNA, beispielsweise mit dem QIAGEN-Produkt RNeasy, oder alternativ mit der Isolation von mRNA, beispielsweise mit den QIAGEN-Produkten Oligotex und/oder TurboCapture, (Probenaufbereitungsschritt), die Normierung der freigesetzten bzw. Isolierten mRNA durch Binden an die Gefäßoberfläche (Binde- bzw. Normierungsschritt), und die anschließende Reverse Transkription der mRNA in cDNA (Folgereaktion). An die Reverse Transkription kann sich ggf. ein weiterer Binde- bzw. Normierungsschritt und eine weitere Folgereaktion anschließen, beispielsweise eine Real-Time-PCR der erzeugten cDNA (siehe Tabelle 1, Workflow 6).

[0084] Alternativ kann als Folgereaktion eine einfache Hybridisierungsreaktion vorgesehen sein; in diesem Fall ist der weitere Binde- bzw. Normierungsschritt verzichtbar (siehe Tabelle 1, Workflow 2).

[0085] Weitere Beispiele für Workflows gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren gehen aus Tabelle 1 hervor. Dabei handelt es sich bei den Workflows 1–5 um One-Step-Verfahren, da im Laufe des Verfahrens das Reaktionsgefäß nicht geöffnet werden muß, um neue Reagenzien hinzuzugeben. Workflow 6 zeigt ein Two-Step-Verfahren, da hier auf mRNA-Level und cDNA-Level normiert wird, d. h. zwischen den beiden Reaktionen das Gefäß geöffnet wird, um den zweiten Binde- bzw. Normierungsschritt einzuleiten.

Schritt	Workflow 1	Workflow 2	Workflow 3	Workflow 4	Workflow 5	Workflow 6
Probenaufbereitungs-schritt	Reverse Transkription (mRNA → cDNA)	Probenaufschluß und Gewinnung von mRNA	Probenaufschluß und Gewinnung von mRNA	Probenaufschluß und Gewinnung von DNA	Probenaufschluß und Gewinnung von Biomolekülen, z.B. Target-Proteine	Probenaufschluß und Gewinnung von mRNA
Binde- bzw. Normierungsschritt 1	Normierung der generierten cDNA	Normierung der gewonnenen mRNA	Normierung der gewonnenen mRNA	Normierung der gewonnenen DNA	Normierung der gewonnenen Biomoleküle	Normierung der gewonnenen mRNA
Folgereaktion 1	PCR	Hybridisierung mit gelabelten Sonden und Nachweis	Reverse Transkription (mRNA → cDNA)	PCR	Bindung von oligogelabelten Antikörpern	Reverse Transkription (mRNA → cDNA)
Binde- bzw. Normierungsschritt 2	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	Normierung der generierten cDNA
Folgereaktion 2	n/n	n/n	PCR	n/n	ImmunoPCR	PCR
Normierung erfolgt auf	cDNA-Level	mRNA-Level	mRNA-Level	DNA-Level	Biomolekül-Level z.B. Target-Proteine	mRNA-Level und cDNA-Level

Tabelle 1

[0086] Sowohl die Reverse Transkription als auch die ggf. anschließende zweite Folgereaktion (insbesondere die PCR) können dabei in demselben Gefäß durchgeführt werden wie der Probenaufbereitungsschritt. Es kann aber auch vorgesehen sein, dass nach dem ersten oder ggf. dem zweiten Binde- bzw. Normierungsschritt ein oder mehrere Aliquots aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein oder mehrere neue Reaktionsgefäße überführt werden, um die mindestens eine Folgereaktion in dem bzw. den weiteren Reaktionsgefäßen durchzuführen.

[0087] Bei besagtem Normierungsschritt könnten beispielsweise – je nach der Größe der modifizierten Oberfläche und den eingestellten Bindungsbedingungen – 10 bis 50 ng Biomoleküle (bevorzugt RNA und/oder DNA) aus der Probe isoliert werden.

[0088] Erfindungsgemäß ist weiterhin bevorzugt vorgesehen, dass
 a) beim Binde- bzw. Normierungsschritt ein Bindepuffer verwendet wird und/oder
 b) beim Waschschrift ein Waschpuffer verwendet wird.

[0089] Weiterhin ist bevorzugt vorgesehen, dass die mindestens abschnittsweise funktionalisierte Gefäßoberfläche
 a) Silanolgruppen,
 b) ungesättigte organische Säuren,
 c) Carboxylgruppen, Sulfonatgruppen und andere polare Gruppen, und/oder
 d) Metall – und Halbmetalloxide mit Hydroxylgruppen

aufweist.

[0090] Die besagten Gruppen können im Gegensatz zu den eingangs erwähnten „Charge Switch-Materialien“ durchweg mit geeigneten Verfahren (siehe unten) dauerhaft (d. h. in der Regel kovalent) an die Oberfläche von Mikroreaktionsgefäßen und PCR-Gefäßen gebunden werden.

[0091] Die Bindung von Nukleinsäuren an Silika-Matrices ist unter dem Begriff „Boom-Prinzip“ bekannt und z. B. in der EP 819696 beschrieben (siehe auch Vogelstein & Gillespie (1979), sowie Boom et al. (1990).

[0092] Zur selektiven Bindung von Nukleinsäuren aus einer Probe wird letztere in einem Puffer, der eine chaotrope Substanz wie zum Beispiel Guanidiniumthiocyanat enthält, inkubiert. Dabei werden ggf die Zellen ly-siert, die enthaltenen Proteine denaturiert und die Nukleinsäuren – falls noch nicht frei vorliegend – freigesetzt, und es kommt aufgrund der Präsenz der chaotropen Substanz zu einer Auflösung der Hydrathüllen um die Nukleinsäuren. Die Bindung der Nukleinsäuren an die Silikaoberfläche geschieht über Wasserstoffbrücken zwischen den Silanolgruppen (SiOx- oder SiOH-Gruppen) der Silika-Matrix und der negativen Ionenladungen des Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren. Die übrigen Bestandteile der Probe können anschließend durch Waschen entfernt werden. Die DNA bzw. RNA wird schließlich unter den Bedingungen der PCR wieder freigesetzt.

[0093] Die Bindung der Nukleinsäuren an eine Anionenaustauscher-Oberfläche beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der negativen Ionenladung des Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren und der positiven Oberflächenladung der erfindungsgemäßen Anionenaustauscher-Oberfläche. Quartäre Ammoniumgruppen gehören zur Sparte der stark basischen Anionenaustauscher, da ihre Ladung unabhängig vom pH-Wert des Bindepuffers ist. Primäre, sekundäre sowie tertiäre Amine werden als schwach basische Anionenaustauscher bezeichnet. Bei höheren pH-Werten liegen diese in deprotonierter Form vor, was zum Verlust der Austauschfunktion führt. Das Austauschvermögen schwach basischer Anionenaustauscher ist somit sehr stark vom pH-Wert des verwendeten Bindepuffers abhängig.

[0094] Ähnliche Phänomene wie für Silanolgruppen, insbesondere SiO₂ beobachtet man auch für Metall – und Halbmetalloxide, die über Hydroxylgruppen an der Oberfläche verfügen, insbesondere Titan-, Aluminium- und Zirkonoxide, wie TiO₂, Al₂O₃ und ZrO₂. Auch an diese Gruppen binden Nukleinsäuren in Anwesenheit chaotroper Salze, und entsprechend beschichtete oder funktionalisierte Oberflächen können unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls verwendet werden, um Nukleinsäuren zu binden.

[0095] Die genannten ungesättigten organischen Säuren müssen polymerisierbar sein, also mindestens eine ungesättigte C=C Bindung enthalten („Vinyloge Gruppen“), wie z. B. Maleinsäure. Außerdem könne sie nicht in reiner Form verwendet werden, da sie sonst z. B. nicht auf Polypropylen haften. Sie werden daher in Verbindung mit Vinylsilan beispielsweise durch PECVD-Verfahren auf die Oberflächen aufgebracht.

[0096] Dabei stellen die auf diese Weise gebundenen ungesättigten organischen Säuren Carboxylgruppen (-COO⁻ oder -COOH-Gruppen) zur Verfügung, die in der Lage sind, unter Hochsalzbedingungen Nukleinsäuren reversibel zu binden. Dabei sind die ungesättigten organischen Säuren nur das Mittel zum Zweck, Carboxylgruppen in ein PECVD-beschichtetes Polymer einzuführen, um eine polare Oberfläche mit einer Wasserstoffbrückendonorfunktionalität zu erzeugen.

[0097] Durch Hochsalz wird die Löslichkeit von Nukleinsäuren in Wasser herabgesetzt. Grund ist das Aufbre-

chen von Wasserstoffbrücken und damit verbunden eine Verringerung der Stabilisierung von Sekundär- und Tertiär-Strukturen der Nukleinsäuren in Wasser. Wird nun eine polare Oberfläche als Wasserstoffbrückendonator angeboten, binden die Nukleinsäuren an dieser Oberfläche, da sie dort eine bessere Stabilisierung erfahren als in Wasser. Wird die Salzkonzentration verringert, wird Wasser wieder ein besserer Wasserstoffbrückendonator als die polare Oberfläche, und die Nukleinsäuren lassen sich wieder von der Oberfläche ablösen.

[0098] Ferner ist erfindungsgemäß ein Reaktionsgefäß zur Durchführung eines wie oben beschriebenen Verfahrens vorgesehen, das eine Gefäßoberfläche aufweist, die mindestens abschnittsweise – bevorzugt an der Innenseite des Gefäßes – dergestalt funktionalisiert ist, dass sie Biomoleküle unter den genannten Verfahrensbedingungen reversibel binden kann.

[0099] Der erfindungsgemäß funktionalisierte Bereich der Reaktionsgefäße nimmt dabei bevorzugt eine Fläche von einschließlich $0,01 \text{ mm}^2$ – einschließlich 10 cm^2 pro Reaktionsgefäß ein, besonders bevorzugt eine Fläche von einschließlich $0,01 \text{ mm}^2$ – einschließlich 1 cm^2 , ganz besonders bevorzugt eine Fläche von einschließlich $0,01 \text{ mm}^2$ – einschließlich 500 mm^2 und noch bevorzugter eine Fläche von besonders bevorzugt $0,01 \text{ mm}^2$ – besonders bevorzugt 100 mm^2 ein. Dies bedeutet z. B., dass eine 96-well PCR Platte, ein PCR 8-ter Strip oder eine Multititerplatte die besagte beschichtete Fläche multipliziert mit der Anzahl ihrer Wells aufweist.

[0100] Durch gezielte Einstellung der Beschaffenheit (insbesondere Art und Dichte der funktionellen Gruppen) und der Dimensionierung der funktionalisierten Fläche kann die Bindungskapazität des betreffenden Reaktionsgefäßes für die betreffenden Biomoleküle genau eingestellt werden. Neben der Fläche kann auch über die Kontaktzeit und die Stringenz des Bindepuffers die Menge an Biomolekülen, die gebunden werden, beeinflusst werden. Das Ziel ist jedoch, die Normierung durch eine komplette Absättigung der zur Verfügung gestellten Fläche im Reaktionsgefäß mit Biomolekülen zu erreichen.

[0101] Bevorzugt ist dabei vorgesehen, dass die Bindungskapazität pro Reaktionsgefäß im Bereich zwischen einschließlich 1 ng und einschließlich $40 \mu\text{g}$, besonders bevorzugt zwischen einschließlich 1 ng und einschließlich $4 \mu\text{g}$, noch bevorzugter zwischen einschließlich 1 ng und einschließlich $2 \mu\text{g}$, ganz besonders bevorzugt zwischen einschließlich 1 ng und einschließlich 500 ng liegt.

[0102] Setzt man beispielsweise eine Bindungskapazität von 50 ng pro Reaktionsgefäß voraus, so bedeutet dies, dass für den Fall, dass die betreffende Probe, die zuvor z. B. einer Lyse, einem Zellaufschluß, einem Isolierungsschritt oder einer Reversen Transkription unterzogen wurde, mehr als 50 ng der betreffenden Biomolekülspezies aufweist, der überschüssige Anteil an Biomolekülen nicht gebunden und beim anschließenden Waschschritt entfernt wird. Es geht also u. U. die Information über den quantitativen Anteil des bzw. der betreffenden Biomoleküls verloren. Der Verlust der absoluten quantitativen Information ist jedoch für einen Großteil der möglichen Anwendungsszenarien verschmerzbar.

[0103] Umgekehrt würde dies bedeuten, dass, wenn die Probe weniger als 50 ng der betreffenden Biomolekülspezies aufweist, die Bindungskapazität nicht voll ausgeschöpft wird und folglich keine Normierung durchführbar ist.

[0104] Dies bedeutet, dass man in der Praxis dazu neigen wird, die Bindungskapazität so einzustellen (siehe oben), dass man sich tendenziell eher unterhalb bzw. an der unteren Grenze der erwarteten Menge an Biomolekülen in der Probe bewegen wird.

[0105] Bevorzugt ist dabei vorgesehen, dass die mindestens abschnittsweise funktionalisierte Gefäßoberfläche

- a) Silanolgruppen,
- b) ungesättigte organische Säuren,
- c) Carboxylgruppen, Sulfonatgruppen und andere polare Gruppen, und/oder
- d) Metall – und Halbmetalloxide mit Hydroxylgruppen

aufweist.

[0106] Dabei ist bevorzugt vorgesehen, dass die oben genannten funktionellen Gruppen

- a) durch Plasmabeschichtung auf das Material des Reaktionsgefäßes aufgebracht sind,
- b) durch nasschemische Verfahren auf das Material des Reaktionsgefäßes aufgebracht sind, und/oder
- c) durch die Eigenschaften des Materials des Reaktionsgefäßes selbst bedingt sind.

[0107] Die Aufbringung der erfindungsgemäßen Silanolgruppen durch Plasmabeschichtung auf das Material des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes erfolgt bevorzugt im Atmosphärendruckplasma, wie z. B. beschrieben in der DE 102006036536 B3 und DE 000010322696 B3 des Fraunhofer-Instituts für Schicht- und Oberflächentechnik IST, auf deren Inhalt hier vollumfänglich verwiesen wird.

[0108] Dieses Verfahren wird auch als „Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition“ (PECVD) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Sonderform der chemischen Gasphasenabscheidung (CVD), bei der die Abscheidung von dünnen Schichten auf einer Oberfläche mittels Plasma unterstützter chemischer Reaktionen bewerkstelligt wird. Dazu wird in einer Reaktionskammer zwischen dem zu beschichtenden Substrat und einer Gegenelektrode ein starkes elektrisches Wechselfeld angelegt, durch das ein Plasma gezündet wird. Das Plasma bewirkt ein Aufbrechen der Bindungen eines gasförmigen Abscheidungsmediums, auch Reaktionsgas genannt, und zersetzt dieses in einzelne Radikale, die in der Gasphase weiterreagieren. Die Gasphasenreaktionprodukte scheiden sich auf dem Substrat in Form dünner Schichten ab (Schichtdicken zwischen 50 und 300 nm. Auf Grund des Plasmas kann beim PECVD-Verfahren, das auch oft Koronaentladung genannt wird, eine höhere Abscheiderate bei einer gleichzeitig geringeren Abscheidetemperatur als mit dem CVD-Verfahren erreicht werden

[0109] Grundsätzlich ist es Voraussetzung für die Abscheidung eines bestimmten Materials, dass dieses in einem gasförmigen Aggregatzustand verfügbar gemacht werden kann; häufig geschieht dies mithilfe eines sogenannten Precursors, also einer Verbindung, die bei einer bestimmten Temperatur einen gewissen Dampfdruck besitzen muß, und die das abzuscheidende Material in chemisch gebundener Form enthält. Auf diese Weise befinden sich die zu verwendenden Abscheidungsmedien bereits in der Gasphase und können so leicht aus dem außerhalb der Reaktionskammer liegenden Gasversorgungssystem in die Reaktionskammer eingeleitet und dem Plasma zugeführt werden. So verwendet man für als Precursor für die Herstellung einer kohlenstoffhaltigen Beschichtung, wie z. B. DLC („Diamond like carbon“), die kohlenstoffhaltigen Gase Acetylen (C_2H_2) oder Methan. Für die Herstellung einer Silikabeschichtung kommt z. B. Tetramethylsilan (TMS), Tetraethoxysilan (TEOS) oder Tetramethoxysilan (TMOS) in Frage. Weitere geeignete Precursor existieren beispielsweise für die Abscheidung von TiO_2 , Al_2O_3 und ZrO_2 .

[0110] Der Precursor wird dabei in die Entladungszone des Plasmas eingespeist, wo das Gas in Ionen aufgespalten und selbige beschleunigt werden. Häufig wird gleichzeitig Sauerstoff eingespeist, um einen etwaigen organischen Anteil im Precursor zu verbrennen, beispielsweise bei der Herstellung einer Silikabeschichtung mit Tetramethylsilan (nicht jedoch beispielsweise bei der Herstellung einer kohlenstoffhaltigen Beschichtung mit Acetylen).

[0111] Die Gasionen prallen dann mit hoher Geschwindigkeit auf die Oberfläche des zu beschichteten Werkstücks auf, wo sie reduziert werden und die betreffende Beschichtung aufbauen. Häufig werden dabei kovalente Bindungen zwischen dem Material der Oberfläche und den Beschichtungsmaterialien aufgebaut, die eine dauerhafte Bindung der Beschichtung an das Material gewährleisten.

[0112] So entstehen im Plasma an einer Polypropylen-Oberfläche durch homolytische Spaltung von C-C und C-H Bindungen Radikale am Polypropylen (PP). Diese können beispielsweise mit dem Sauerstoff, Silicium oder Kohlenstoff des Beschichtungsmaterials kovalente Bindungen eingehen.

[0113] Dabei entsteht die kovalente Anbindung des Beschichtungsmaterials an die Polypropylen-Oberfläche. Im Fall von SiO_2 -Beschichtungen mit TEOS als Precursor erfolgt die kovalente Anbindung an PP über Si-O-C- und Si-C-Bindungen. Im Fall von organischen Monomeren als Precursoren erfolgt die kovalente Anbindung an PP beispielsweise über C-C- und C-O-C-Bindungen.

[0114] Auch bei Nichtausbildung von kovalenten Bindungen werden auf diese Weise jedoch überaus dauerhafte Beschichtungen erzielt.

[0115] Das PECVD-Verfahren ermöglicht es überdies auch, organische Polymere in der Gasphase im Plasma zu erzeugen und auf dem Träger abzuscheiden. Hier können Monomere wie z. B. Maleinsäureanhydrid, Acrylate, Vinylsilane u. a. polymerisierbare Precursoren (Monomere) eingesetzt werden. Dabei wird ebenfalls auf den Sauerstoff im Trägergas verzichtet, um die organischen Bestandteile nicht zu oxidieren.

[0116] Es sind mit diesem Verfahren aber auch Silanolgruppenhaltige Schichten abscheidbar, die direkt zu Anionentauscherschichten führen. Der Precursor Aminopropyltrimethoxysilan ermöglicht z. B. eine direkte Herstellung von Silanolgruppen und Anionentauscherguppen in einer PECVD-Schicht.

- [0117]** Durch die Wahl geeigneter Precursoren können auch Carboxylgruppenhaltige Silikaschichten erzeugt werden.
- [0118]** Mit den Precursoren Vinyltrimethoxysilan und Maleinsäureanhydrid ist es ebenfalls möglich, auf Polypropylen entsprechende Carboxylgruppenhaltige Schichten zu generieren.
- [0119]** Metall- und Halbmetalloxide lassen sich ebenfalls über das PECVD-Verfahren aus den entsprechenden Precursoren (Metall bzw. -Halbmetall-Alkoxiden) in der Gasphase unter Zugabe von Sauerstoff herstellen und beispielsweise auf Polypropylen abscheiden.
- [0120]** Neben den Metall bzw. -Halbmetall-Alkoxiden können auch Gasphasenpolymere aus z. B. Acrylaten u. a. ungesättigten Verbindungen mittels PECVD in situ hergestellt und beschichtet werden. Durch geschickte Wahl der Monomere (z. B. HEMA, Acrylsäure, Maleinsäureanhydrid, usw.) und Vinylsilan sind auch gemischte Co-Polymere eines organischen Monomers wie Maleinsäureanhydrid und eines Silanes (Vinylsilan) auf Polypropylen abscheidbar. In diesem Fall erzeugt man ein Polymer, das sowohl über Carboxylgruppen als auch über Silanolgruppen verfingert.
- [0121]** Besonders Hydroxylgruppen (geminal, vicinal), Diolgruppen, Carboxylgruppen, Aminogruppen und Silanolgruppen sind geeignete chemische Funktionen um Oberflächenmaterialien mit Wasserstoffbrückendonorigenschaften auf Polypropylen herzustellen.
- [0122]** Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden auch in situ Co-Polymere von Maleinsäureanhydrid und Vinylsilan hergestellt. Vorteilhaft ist, dass dieses Precursorgemisch einen ausreichenden Dampfdruck besitzt, mittels PECVD in der Gasphase polymerisierbar ist und auf Polypropylen also dem Material des Reaktionsgefäßes gut haftende Schichten bildet.
- [0123]** Zur Abscheidung von Sulfonatgruppen mittels PECVD kann als Precursor z. B. Styrolsulfonsäure verwendet werden.
- [0124]** Im Gegensatz zu den oben bereits erwähnten CVD-Verfahren bleibt bei PECVD-Verfahren die Temperatur etwa bei Raumtemperatur. PECVD-Verfahren eignen sich daher auch für die Beschichtung von Kunststoffen, wie z. B. Polypropylen und Polyethylen, die häufig für die erfindungsgemäßen Reaktionsgefäße verwendet werden
- [0125]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung zeigen überdies, dass mit Hilfe einer geeigneten Beschichtungsvorrichtung die inneren Oberflächen von Mikroreaktionsgefäßen, insbesondere PCR-Reaktionsgefäßen („8-ter Strips“, 96-Well Platten, Multititerplatten), Einweg-Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen, mit Tetraethoxysilan und carboxylhaltigen Copolymeren aus Vinylsilan und Maleinsäureanhydrid als Precursoren beschichtet werden kann. Eine entsprechende Vorrichtung ist in [Fig. 7](#) gezeigt.
- [0126]** Die gezeigte Vorrichtung lässt sich im Übrigen in paralleler Anordnung einsetzen, so dass mehrere Reaktionsgefäße gleichzeitig beschichtet werden können.
- [0127]** Bevorzugte nasschemische Verfahren zur Aufbringung von Silanolgruppen auf das Material sind z. B. Sol-Gel-Prozesse. Dabei werden die Precursor zusammen mit einer definierten Menge an Wasser und eventuellen Katalysatoren in einem Lösungsmittel, beispielsweise Wasser, gelöst. Vorzugsweise wird Tetraethoxysilan (TEOS) als Siliciumdioxid-Precursor verwendet.
- [0128]** Insbesondere kann aber auch vorgesehen sein, dass die erfindungsgemäßen Silanolgruppen durch die Eigenschaften des Materials des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes selbst bedingt sind; beispielsweise dann, wenn es sich bei dem Material um Glas handelt.
- [0129]** Erfindungsgemäß ist ferner bevorzugt vorgesehen, dass es sich bei dem Reaktionsgefäß um ein Gefäß aus der Gruppe enthaltend
- a) PCR Gefäße, PCR 8ter Strips oder PCR 96-well Platten,
 - b) eine Kapillare oder einen mikrofluidischen Kanal,
 - c) ein Einweg-Reaktionsgefäß,
 - d) eine Pipettenspitze und/oder
 - e) eine Multititerplatte

handelt.

[0130] Bei den erwähnten Mikroreaktionsgefäße kann es sich beispielsweise um umgangssprachlich auch als PCR-Reaktionsgefäße (ABI, Thermo etc.) bezeichnete, ggf. verschließbare Gefäße mit einem Volumen von 0,1–2 ml handeln. Diese sind in der Regel aus Polypropylen, Polyethylen, COC, PET oder Polycarbonat gefertigt.

[0131] Ähnliches gilt im übrigen für die erwähnten Pipettenspitzen, die in der Regel als Einmalartikel in Verbindung mit automatischen Pipetten (umgangssprachlich oft auch als „Eppendorf-Pipetten“ bezeichnet) Verwendung finden.

[0132] Bei einer Mikrotiterplatte handelt es sich um eine Einheit aufweisend eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen („Wells“) im Sinne der Erfindung. Solche Mikrotiterplatten weisen in der Regel zwischen einschließlich 6 und einschließlich 1536 Wells auf. Typische Mikrotiterplatten-Formate sind in Tabelle 2 gezeigt.

Gefäßtyp	Anzahl der Reaktionsgefäße (Wells) pro Platte	Format	Typisches maximales Füllvolumen pro Well
Mikrotiterplatte	6	2 × 3	2–5 ml
	12	3 × 4	2–4 ml
	24	4 × 6	0,5–3 ml
	96	8 × 12	0,3–2 ml
	384	16 × 24	0,03–0,1 ml
	1536	32 × 48	0,01 ml
PCR Soft Strip („8-ter“)	8	1 × 8	0,2 ml
PCR 96-well Platte	96	8 × 12	0,2 ml

Tabelle 2

[0133] Ferner ist ein Kit zur Durchführung eines wie oben beschriebenen Verfahrens vorgesehen, wobei besagtes Kit mindestens aufweist

- a) einen Bindepuffer,
- b) einen Waschpuffer,
- c) ggf. Reagenzien zur Durchführung eines Probenaufbereitungsschritts, bevorzugt einer Reversen Transkription (RT)
- d) ggf. Reagenzien zur Durchführung einer Folgereaktion, bevorzugt einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- e) sowie ggf. mindestens ein Reaktionsgefäß gemäß obiger Beschreibung.

[0134] Weiterhin ist bevorzugt vorgesehen, dass der Waschpuffer Wasser, TRIS, einen Komplexbildner, ein Polyol, ein Detergenz, ein Polymer, Copolymer und/oder Terpolymer enthält.

[0135] Ferner ist bevorzugt vorgesehen, dass der Bindepuffer chaotrope Substanzen aufweist. Hierbei handelt es sich besonders bevorzugt um mindestens eine Substanz ausgewählt aus der Gruppe enthaltend

- Guanidiniumhydrochlorid,
- Guanidinium(iso)thiocyanat,
- Natriumiodid,
- Kaliumiodid,
- Natrium(iso)thiocyanat und/oder
- Harnstoff,

oder einer Mischung derselben.

[0136] Der Bindepuffer zur Bindung der cDNA an eine Anionenaustauscher-Oberfläche ist bevorzugt ein Niedrigsalzpuffer. Dabei wird bevorzugt ein pH Wert unterhalb des pKs-Wertes der Oberfläche bzw. der Oberflächengruppen eingestellt, sodass im Bindeschritt die Anionenaustauscher positive Oberflächenladungen aufweisen und so die negativ geladenen Nukleinsäuren binden können.

[0137] Vorgesehen ist ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes und/oder eines erfindungsgemäßen Kits zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe.

[0138] Bevorzugt handelt es sich dabei um cDNA, die mittels einer Reversen Transkription (RT) aus RNA, bevorzugt mRNA, in dem erfindungsgemäßen Reaktionsgefäß hergestellt wurde, wobei die cDNA anschließend einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterzogen wird.

DISCLAIMER

[0139] Die vorgenannten sowie die beanspruchten und in den Ausführungsbeispielen beschriebenen erfindungsgemäß zu verwendenden Komponenten unterliegen in ihrer Größe, Formgestaltung, Materialauswahl und technischen Konzeption keinen besonderen Ausnahmebedingungen, so dass die in dem Anwendungsgebiet bekannten Auswahlkriterien uneingeschränkt Anwendung finden können. Ferner haben die nachfolgenden Beispiele keinerlei beschränkende Wirkung auf den Schutzbereich dieser Anmeldung; letzterer wird ausschließlich durch die Ansprüche definiert.

ZEICHNUNGEN UND BEISPIELE

[0140] Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile des Gegenstandes der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen sowie aus der nachfolgenden Beschreibung der zugehörigen Figuren und Beispiele, in denen – beispielhaft – mehrere Ausführungsbeispiele sowie Einsatzmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung dargestellt sind.

[0141] [Fig. 1](#) zeigt ein Diagramm zur Überprüfung der C_T -Werte von PAXGene-RNA aus humanem Vollblut bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes,

[0142] [Fig. 2](#) zeigt ein Diagramm zur Überprüfung der C_T -Werte von PAXGene-RNA aus humanem Vollblut bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes bzw. Vergleichsbeispiele,

[0143] [Fig. 3](#) zeigt ein Diagramm zur Überprüfung der C_T -Werte von QIAamp-RNA aus humanem Vollblut bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes bzw. Vergleichsbeispiele,

[0144] [Fig. 4](#) zeigt ein Diagramm zur Überprüfung der C_T -Werte von QIAamp-RNA aus Jurkatzellen bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes bzw. Vergleichsbeispiele,

[0145] [Fig. 5](#) zeigt ein Diagramm zur Überprüfung der C_T -Werte von QIAamp-RNA aus Jurkatzellen bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes und unterschiedlichen Inkubationszeiten,

[0146] [Fig. 6](#) zeigt das generelle Schema eines erfindungsgemäßen Workflows, und

[0147] [Fig. 7](#) zeigt eine Vorrichtung **70** zur Aufbringung einer erfindungsgemäß funktionalisierten Oberfläche auf die Innenseite eines Reaktionsgefäßes.

[0148] Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert, soll aber nicht darauf beschränkt sein.

Beispiel 1

[0149] Es wurde wie folgt vorgegangen:

Die verwendeten erfindungsgemäßen Oberflächen-modifizierten Reaktionsgefäße (PCR-Gefäß, 0,2 ml, dünnwandig, PCR soft strips, Biozym) wurden mit Tetraethoxysilan (TEOS) im Atmosphärendruckplasma beschichtet.

[0150] In den durchgeführten Versuchen wurde sowohl PAXGene- und QIAamp-RNA aus humanem Vollblut als auch QIAamp-RNA aus Jurkatzellen eingesetzt. Die Reverse Transkription wurde sowohl mit Hilfe des QIAGEN-QuantiTect- als auch des Omniscript-Kits mit einem Poly-dT-Primer durchgeführt.

[0151] Als Bindepuffer wurde 6 M GuHCl, 0.1 M Kaliumhydrogenphthalat pH 2.5 und als Waschpuffer 2% Nidid[®] P40 und 0.1 mg/mL Poly(methyl vinyl ether-altmaleinsäure) in TE-Puffer verwendet. Die PCR wurde mit einem ABI TaqMan[®] β Actin Probe Kit in einem ABI 7700 durchgeführt.

[0152] Das Versuchsprotokoll ist in Tabelle 3 gezeigt:

No:	Verfahrensschritt
1.	Durchführung der Reversen Transkription nach Herstellerprotokoll in einem Silika-beschichteten erfindungsgemäßen PCR-Gefäß
2.	Zugabe von 50 µl Bindepuffer/Gefäß
3.	Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur,
4.	vollständiges Absaugen der Flüssigkeit,
5.	Zugabe von 120 µl Waschpuffer/Gefäß,
6.	vollständiges Absaugen der Flüssigkeit,
7.	Zugabe von 25 µl PCR-Mastermix und Durchführung der PCR.

Tabelle 3

[0153] Die in der Reversen Transkription verwendete RNA wurde vorab mit einem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 quantifiziert.

[0154] Als Kontrollen wurden jeweils Aliquots der RT-Ansätze in unbeschichteten PCR-Gefäßen untersucht, die Aliquots der RT-Reaktionen wurden dafür direkt zu dem PCR-Mastermix pipettiert.

[0155] In den PCR-Experimenten wurde jeweils eine Achtfachbestimmung durchgeführt, d. h. die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus acht Einzelwerten und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Beispiel 2

[0156] [Fig. 1](#) zeigt die Ergebnisse eines TaqMan[®]-Laufs auf die cDNA aus einer QuantiTect cDNA Synthese von PAXGene-RNA aus humanem Vollblut. Hierbei wurde die Menge der eingesetzten RNA in einem kleinen Bereich variiert (113–293 ng).

[0157] Als Ergebnis ist festzustellen, dass überraschenderweise bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes nach dem Übergang von 135 auf 180 ng eingesetzter RNA ein relativ einheitliches C_T -Niveau zwischen 18,4 und 19,1 und somit eine Normierung der C_T -Werte erreicht wurde.

Beispiel 3

[0158] In [Fig. 2](#) sind ebenfalls die Ergebnisse eines TaqMan[®]-Laufs auf die cDNA aus einer QuantiTect cDNA Synthese von PAXGene-RNA aus humanem Vollblut gezeigt. Die RNA Menge wurde hierbei zwischen 150 und 450 ng variiert (Spalten 1–5), zusätzlich wurde jeweils ein Aliquot der Reversen Transkription in unbeschichteten Gefäßen mit PCR-Mastermix einpipettiert (Spalten 6–10). Für diese Aliquots ist die darin enthaltene Startmenge RNA angegeben. Im Vergleich zum ersten Beispiel wurde die Menge eingesetzter RNA über einen größeren Bereich variiert.

[0159] Als Ergebnis ist festzustellen, dass bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes bei einem Einsatz von 150 bis 450 ng RNA ebenfalls ein relativ einheitliches C_T -Niveau zwischen 17,9 und 18,9 und somit eine Normierung der C_T -Werte erreicht wurde. Die Kontrollversuche in unbeschichteten Reaktionsgefäßen haben gezeigt, dass – wie erwartet – je mehr RNA als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription eingesetzt wurde, desto mehr nahmen die entsprechenden C_T -Werte ab.

Beispiel 4

[0160] [Fig. 3](#) zeigt die Ergebnisse eines TaqMan[®]-Laufs auf die cDNA aus einer Omniscript cDNA Synthese von QIAamp-RNA aus humanem Vollblut. Hierbei wurde die RNA-Menge zwischen 100 und 1100 ng RNA variiert, es wurden ebenfalls Kontrollversuche in unbeschichteten Gefäßen durchgeführt.

[0161] Als Ergebnis ist festzustellen, dass bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes bei einem Einsatz von 100 bis 1100 ng RNA ein relativ einheitliches C_T -Niveau um 17,2 eintrat und somit ebenfalls

eine Normierung der C_T -Werte erreicht wurde. Die Kontrollversuche in unbehandelten Reaktionsgefäßen haben gezeigt, dass – wie erwartet – je mehr RNA als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription eingesetzt wurde, desto mehr verringerten sich die entsprechenden C_T -Werte.

Beispiel 5

[0162] [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse eines TaqMan®-Laufs auf die cDNA aus einer Omniscript cDNA Synthese von Jurkat-RNA. Hierbei wurde die RNA-Menge zwischen 100 und 1100 ng RNA variiert, es wurden erneut Kontrollversuche in unbeschichteten Gefäßen durchgeführt.

[0163] Als Ergebnis ist ebenfalls festzustellen, dass bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes bei einem Einsatz von 100 bis 1100 ng RNA eine Normierung der C_T -Werte erfolgte. Die Kontrollversuche in unbehandelten Reaktionsgefäßen haben wiederum gezeigt, dass je mehr RNA als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription eingesetzt wurde, desto mehr verringerten sich die entsprechenden C_T -Werte.

Beispiel 6

[0164] [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse eines TaqMan®-Laufs auf die cDNA aus einer Omniscript cDNA Synthese von Jurkat-RNA. Hierbei wurde die RNA-Menge zwischen 100 und 800 ng RNA variiert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt, nämlich für 100–400 ng RNA 240 min, für 500–800 ng RNA 20 min.

[0165] Als Ergebnis ist festzustellen, dass überraschenderweise durch eine Verlängerung der Inkubationszeiten von 20 auf 240 min bereits der C_T -Wert der geringsten RNA-Menge (100 ng) auf das Niveau der Sättigung der größeren RNA-Mengen (500 bis 800 ng) mit 20-minütiger Inkubationszeit gebracht werden konnte. Ebenso ist aus diesem Beispiel zu ersehen, dass bei mittleren eingesetzten RNA-Mengen von 300 bis 400 ng und langen Inkubationszeiten von 240 min eine Sättigung auf ein relativ niedriges C_T -Niveau von 15,9 zu erzielen war.

[0166] [Fig. 6a](#) zeigt das generelle Schema eines erfindungsgemäßen Workflows, mit dem Probenaufbereitungsschritt **2**, dem Binde- bzw. Normierungsschritt **3**, dem Waschschrift **4** und der Folgereaktion **6**. An besagte Folgereaktion kann sich ggf. ein zweiter Binde- bzw. Normierungsschritt und eine zweite Folgereaktion anschließen (siehe Tabelle 1).

[0167] In [Fig. 6b](#) ist gezeigt, das besagter Workflow auch in einem PCR-Strip durchgeführt werden kann.

[0168] [Fig. 7](#) zeigt eine Vorrichtung **70** zur Aufbringung einer erfindungsgemäß funktionalisierten Oberfläche auf die Innenseite eines Reaktionsgefäßes.

[0169] Besagte Vorrichtung weist eine Kammer **71** auf, in welcher eine flächige Elektrode **72** angeordnet ist. Weiterhin weist die Kammer eine Gaseinleitungseinrichtung für ein Precursorgas **73** sowie eine Beschichtungselektrode **74** auf. Bei dem Precursorgas handelt es sich beispielsweise um Tetraethoxysilan (TEOS). Die Gaseinleitungseinrichtung **73** und die Beschichtungselektrode **74** sind in der Vorrichtung gemäß [Fig. 7](#) zu einer kombinierten Einrichtung zusammengefasst, die in ihrer Form an den Innenraum eines zu beschichtenden Reaktionsgefäßes **75** (hier ein umgangssprachlich als „Eppendorf-Gefäß“ bezeichnetes PCR-Mikroreaktionsgefäß aus Polypropylen mit einem Volumen von 0,2 ml) angepaßt ist.

[0170] Zwischen flächiger Elektrode **72** und der Beschichtungselektrode **74** wird mit Hilfe eines Frequenzgenerators **76** nun eine hochfrequente Wechselspannung angelegt (beispielsweise 13.56 MHz), und es entzündet sich ein Plasma im Inneren des Reaktionsgefäßes. Das Plasma bewirkt ein Aufbrechen der Bindungen des Precursor-Gases, und zersetzt dieses in einzelne Radikale, die sich auf dem Substrat niederschlagen und dort die chemische Abscheidereaktion von Silikamolekülen bewirken.

[0171] Die so hergestellte funktionalisierte Oberfläche bewirkt bei der Verwendung des erfindungsgemäß funktionalisierten Reaktionsgefäßes die Bindung der Biomoleküle an die Innenseite des Reaktionsgefäßes (beispielsweise die Bindung von Nukleinsäuren an Silanolgruppen der funktionalisierten Oberfläche in Anwesenheit chaotroper Salze).

[0172] Die gezeigte Vorrichtung eignet sich im Übrigen auch für die zeitgleiche Beschichtung mehrere Reaktionsgefäße, so z. B. mehrerer „Eppendorf-Gefäße“ oder auch z. B. einer Multititer-Platte mit mehreren Wells.

[0173] Die Größe der beschichteten Fläche der Reaktionsgefäße ist im wesentlichen abhängig von der Größe

der Elektrode und kann in einem 0,2 ml PCR-Gefäß zwischen 10 mm² und 300 mm² betragen.

Beispiel 7

[0174] PCR-Gefäße aus Polypropylen mit 0,2 ml Volumen wurden mit Tetraethoxysilan im PECVD-Verfahren unter Atmosphärendruck beschichtet. Dabei wurden Bindekapazitäten für Nukleinsäuren von bis zu 500 ng erzeugt.

[0175] Die bei der Beschichtung erzeugte Fläche wird u. a. durch Größe und Positionierung der Elektroden (Kathode, Anode) zueinander beim PECVD-Verfahren definiert. Sie betrug hier etwa 150 mm².

LITERATURLISTE:

- Bartlett & Stirling (2003), *Methods Mol Biol.* 226: 3–6
- Sano et al. (1992), *Science* 258, 120–122
- Birch et al. (1996), *Nature* 381, 445
- Vogelstein & Gillespie (1979), *PNAS* 76: 615–619
- Boom et al (1990), *J Clin Microbiol.* 1990 Mar; 28(3): 495–503
- Compton (1991), *Nature* 350, 91
- Hill (2001), *Expert Reviews of Molecular Diagnostics* 1, 445

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

- US 20070231892 [0015]
- US 5854033 [0039]
- US 6183998 [0045]
- EP 819696 [0091]
- DE 102006036536 B3 [0107]
- DE 000010322696 B3 [0107]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Bartlett & Stirling (2003) [0034]
- Compton 1991) [0037]
- Hill, 2001 [0038]
- Sano et al. (1992) [0042]
- Birch et al. (1996) [0045]
- Vogelstein & Gillespie (1979) [0091]
- Boom et al. (1990) [0091]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe, aufweisend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines Reaktionsgefäßes mit einer Gefäßoberfläche, die mindestens abschnittsweise – bevorzugt an der Innenseite des Gefäßes – dergestalt funktionalisiert ist, dass sie Biomoleküle unter Hochsalzbedingungen reversibel binden kann,
- b) Durchführen mindestens eines Probenaufbereitungsschritts,
- c) Bindung von Biomolekülen aus der aufbereiteten Probe an die Gefäßoberfläche („Binde- bzw. Normierungsschritt“) unter Hochsalzbedingungen,
- d) ggf. Waschen („Waschschritt“), und
- e) Durchführung mindestens einer Folgereaktion.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Biomolekülen um Nukleinsäuren handelt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass besagter mindestens eine Probenaufbereitungsschritt ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend

- Zellyse,
- Zellaufschluß,
- Isolierung von Biomolekülen,
- Aufreinigung von Biomolekülen,
- Reverse Transkription von RNA in DNA, und/oder
- Enzymatische Reaktionen und/oder Probenbehandlungen.

4. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass besagte mindestens eine Folgereaktion ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend

- Amplifikationsreaktionen,
- Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA), und/oder
- Hybrid Capture Assay.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der besagten Amplifikationsreaktion um eine Reaktion ausgewählt ist aus der Gruppe

- Polymerase-Kettenreaktion (PCR),
 - Reverse Transkription (RT),
 - Loop mediated isothermal amplification (LAMP),
 - Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA),
 - Rolling Circle Chain Reaction (RCCR), oder Rolling Circle Amplification (RCA),
 - Transcription mediated amplification (TMA)
 - Ligase-Kettenreaktion (LCR)
 - Nested PCR, und/oder
 - Immuno-PCR
- handelt.

6. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) beim Binde- bzw. Normierungsschritt ein Bindepuffer verwendet wird und/oder
- b) beim Waschschritt ein Waschpuffer verwendet wird.

7. Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens abschnittsweise funktionalisierte Gefäßoberfläche

- a) Silanolgruppen,
- b) ungesättigte organische Säuren,
- c) Carboxylgruppen, Sulfonatgruppen und andere polare Gruppen, und/oder
- d) Metall – und Halbmetalloxide mit Hydroxylgruppen aufweist.

8. Reaktionsgefäß zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsgefäß eine Gefäßoberfläche aufweist, die mindestens abschnittsweise – bevorzugt an der Innenseite des Gefäßes – dergestalt funktionalisiert ist, dass sie Biomoleküle unter den genannten Verfahrensbedingungen reversibel binden kann.

9. Reaktionsgefäß gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens abschnittsweise funktionalisierte Gefäßoberfläche

- a) Silanolgruppen,
 - b) ungesättigte organische Säuren,
 - c) Carboxylgruppen, Sulfonatgruppen und andere polare Gruppen, und/oder
 - d) Metall – und Halbmetalloxide mit Hydroxylgruppen
- aufweist.

10. Reaktionsgefäß gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die in Anspruch 9 genannten funktionellen Gruppen

- a) durch Plasmabeschichtung auf das Material des Reaktionsgefäßes aufgebracht sind,
- b) durch nasschemische Verfahren auf das Material des Reaktionsgefäßes aufgebracht sind, und/oder
- c) durch die Eigenschaften des Materials des Reaktionsgefäßes selbst bedingt sind.

11. Kit zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der vorherigen Ansprüche aufweisend mindestens

- a) einen Bindepuffer,
- b) einen Waschpuffer,
- c) ggf. Reagenzien zur Durchführung eines Probenaufbereitungsschritts, bevorzugt einer Reversen Transkription (RT)
- d) ggf. Reagenzien zur Durchführung einer Folgereaktion, bevorzugt einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- e) sowie ggf. mindestens ein Reaktionsgefäß gemäß einem der Ansprüche 8–10.

12. Kit bzw. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Waschpuffer Wasser, TRIS, einen Komplexbildner, ein Polyol, ein Detergenz, ein Polymer, Copolymer und/oder Terpolymer enthält.

13. Kit bzw. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Bindepuffer chaotrope Substanzen aufweist.

14. Kit bzw. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der chaotropen Substanz um mindestens eine Substanz handelt, die ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend

- Guanidinhydrochlorid,
 - Guanidinium(iso)thiocyanat,
 - Natriumiodid,
 - Kaliumiodid,
 - Natrium(iso)thiocyanat und/oder
 - Harnstoff,
- oder einer Mischung derselben.

15. Verwendung eines Reaktionsgefäßes und/oder eines Kits gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Normierung des Gehalts von Biomolekülen in einer Probe.

16. Verwendung eines Reaktionsgefäßes und/oder eines Kits gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Normierung des Gehalts an cDNA, die mittels einer Reversen Transkription (RT) aus RNA, bevorzugt mRNA, in dem besagten Reaktionsgefäß hergestellt wurde, wobei die cDNA anschließend einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterzogen wird.

17. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen, bevorzugt Nukleinsäuren, besonders bevorzugt RNA, aufweisend Verfahrensschritte gemäß einem der vorherigen Ansprüche.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

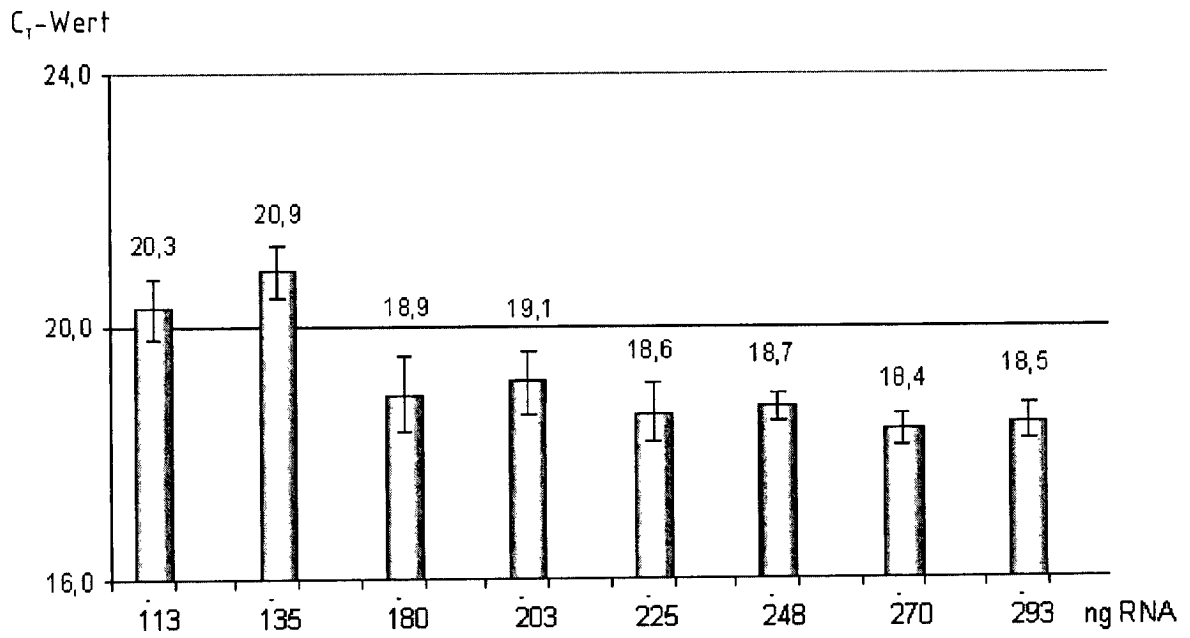


Fig. 1

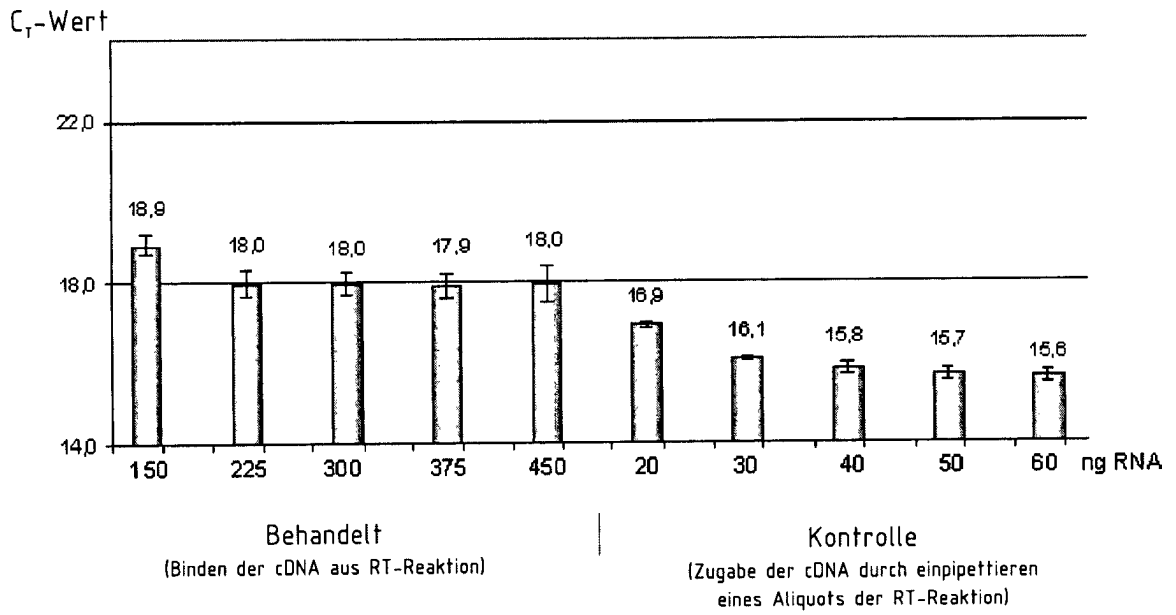


Fig. 2

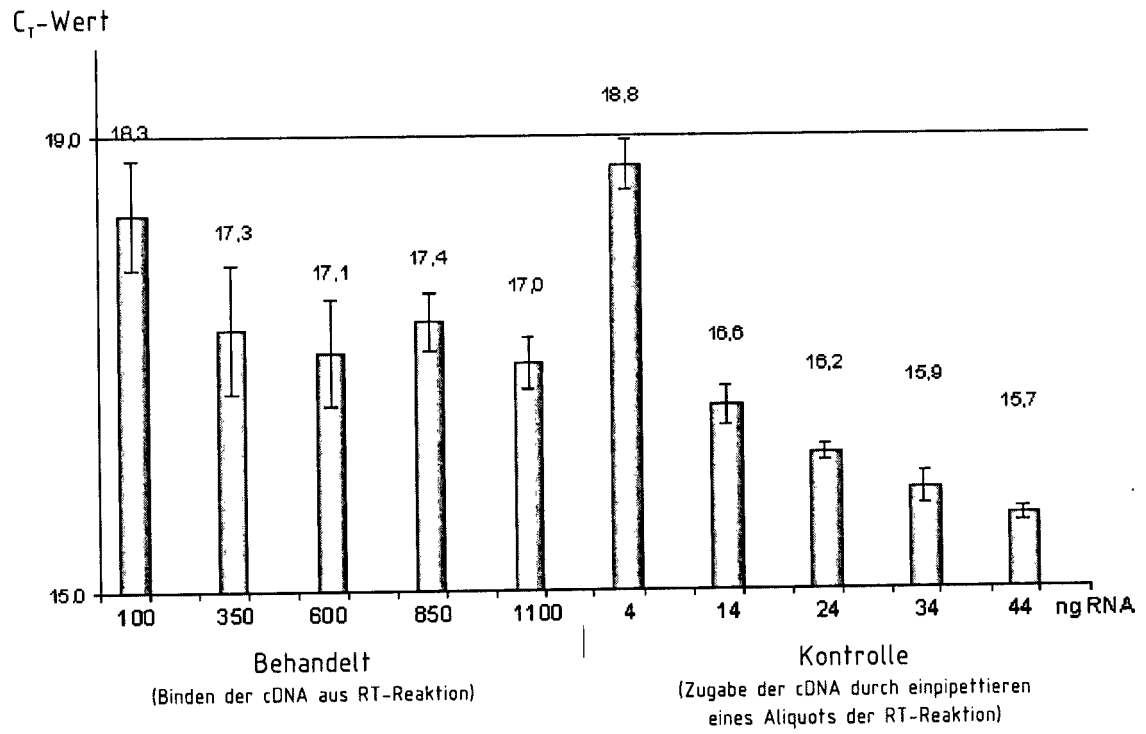


Fig. 3

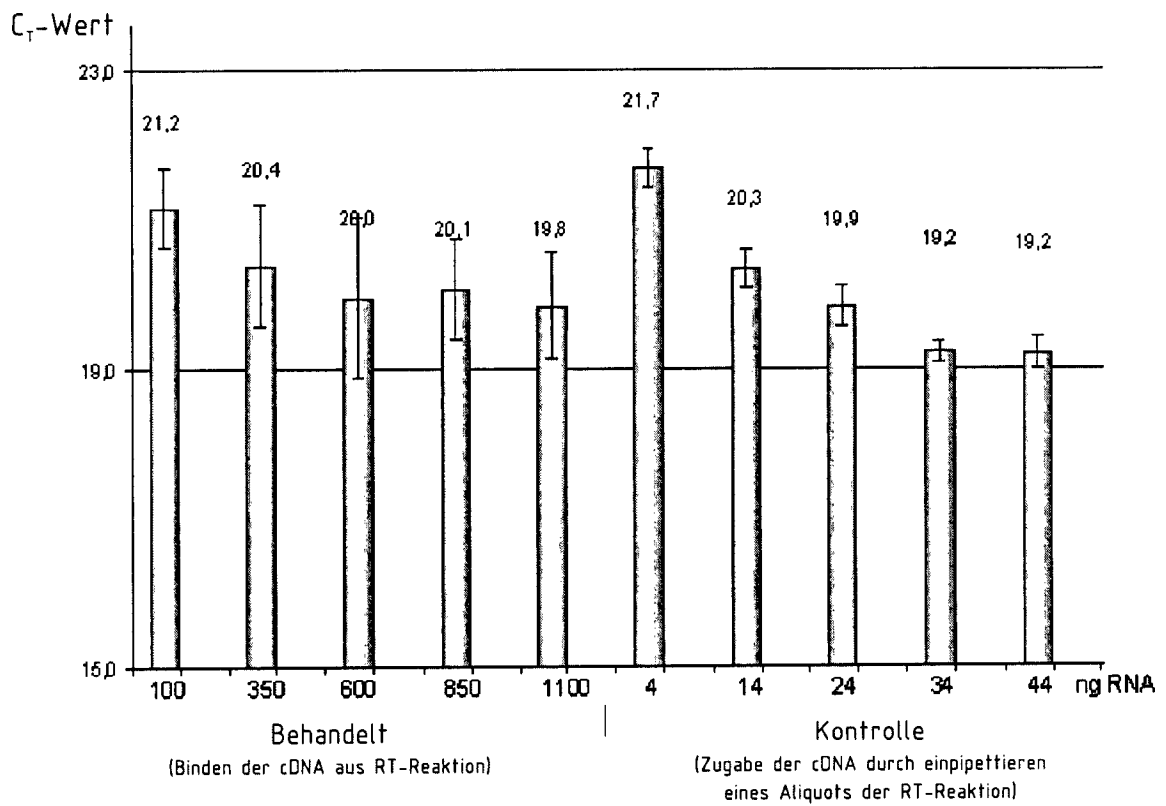


Fig. 4

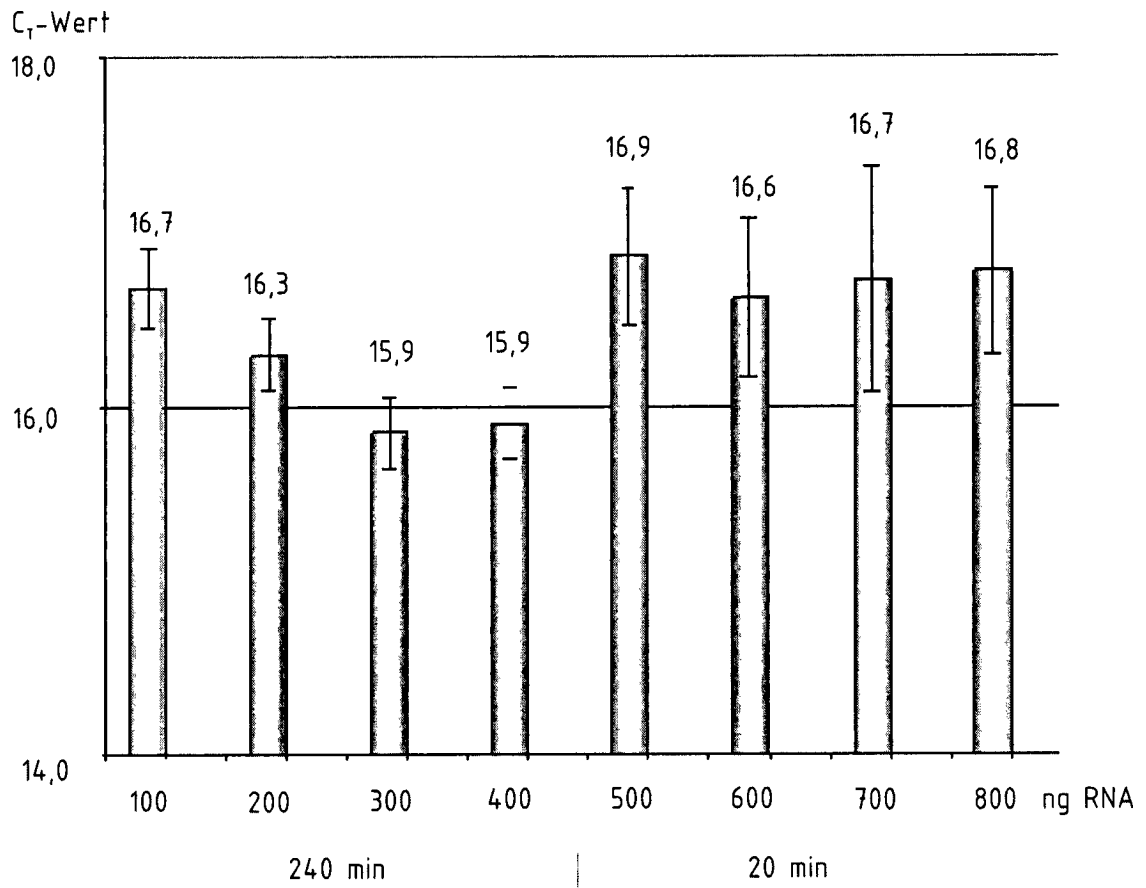


Fig. 5

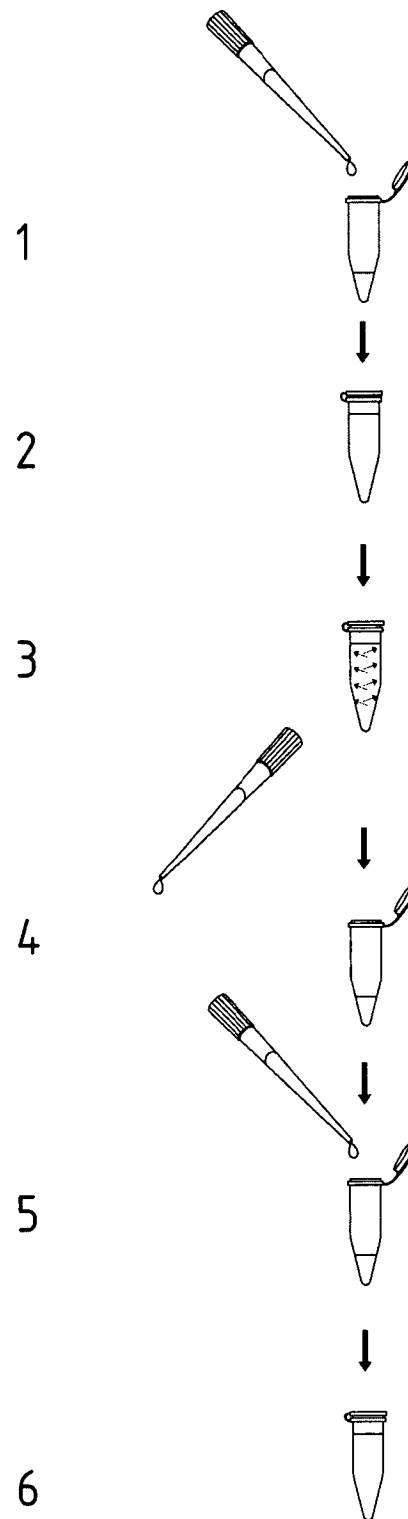


Fig. 6a

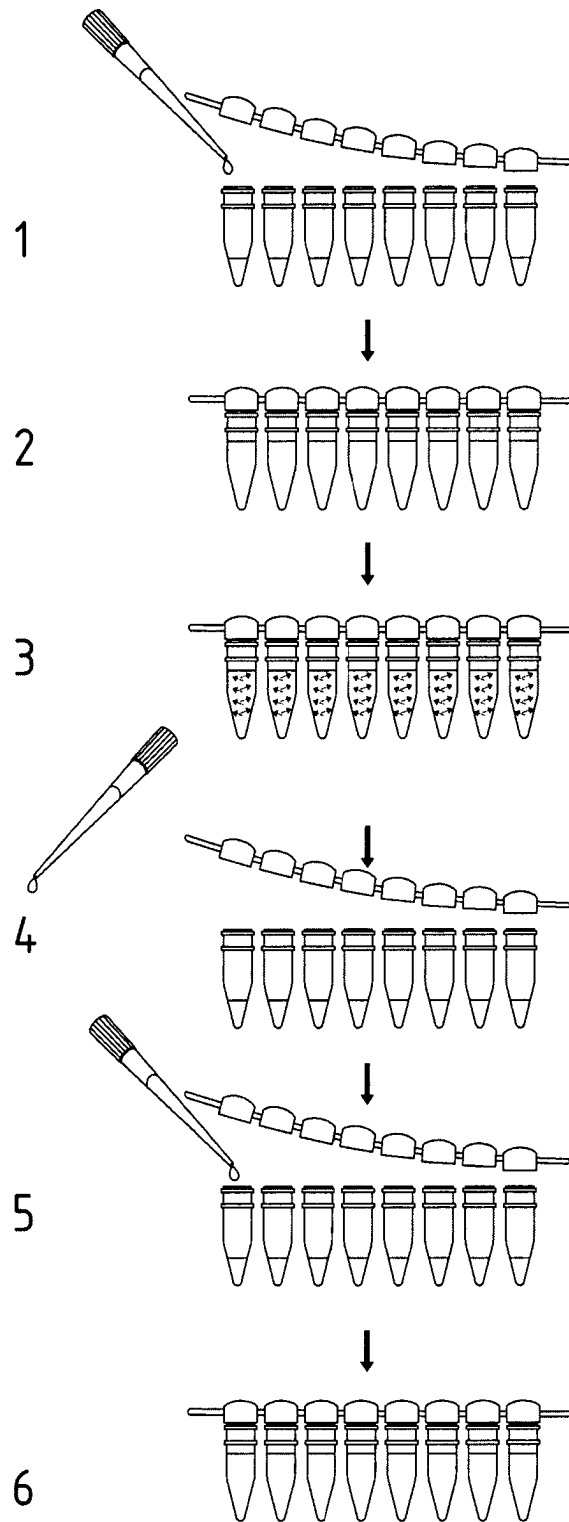


Fig. 6b

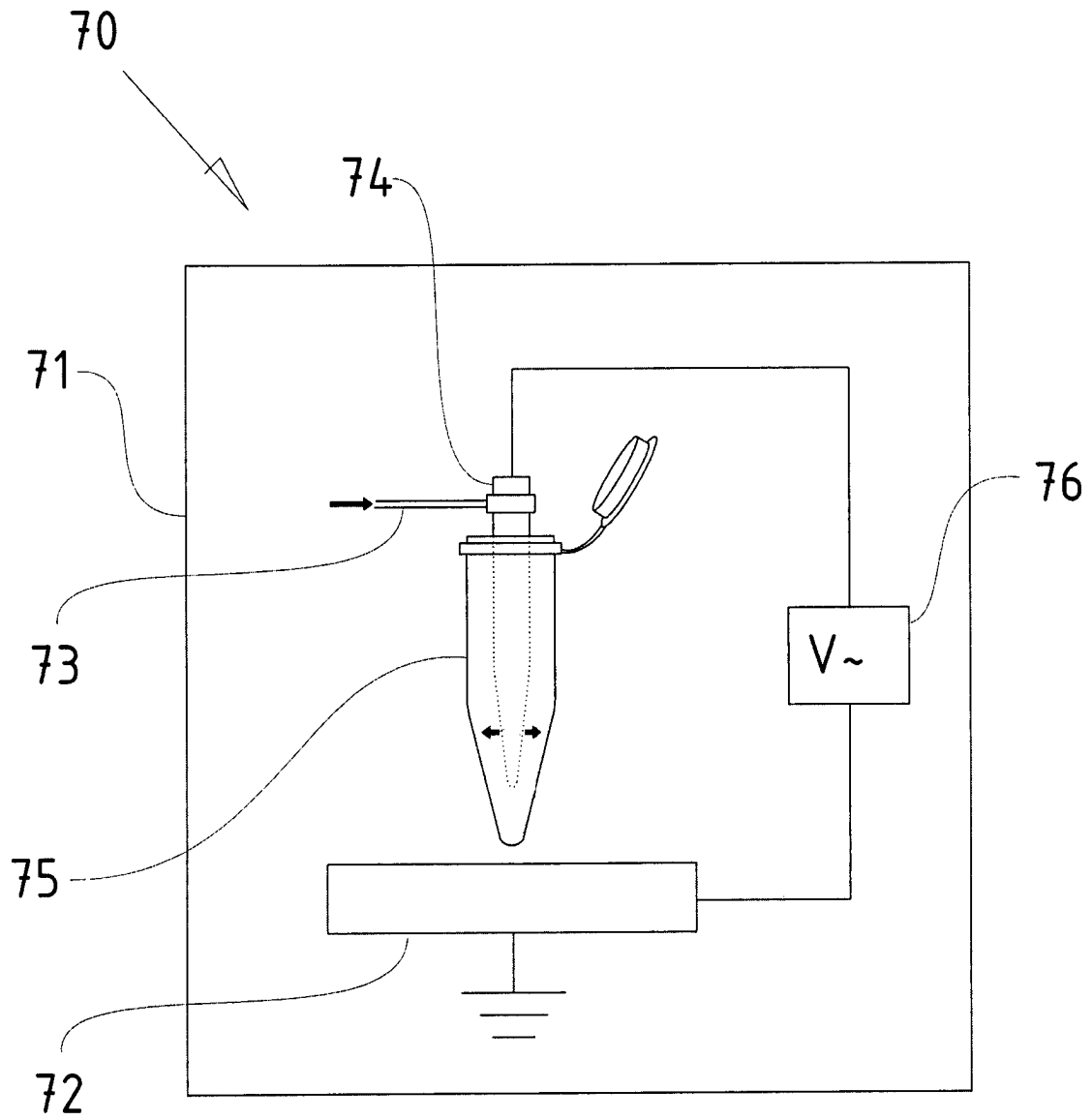


Fig. 7