



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 30 974 T2** 2006.02.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 918 877 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 30 974.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/13440**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 935 224.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/004730**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **05.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **29.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.02.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12P 19/38** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12N 1/06** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 1/06** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**681922**      **29.07.1996**      **US**

(73) Patentinhaber:

**Promega Corp., Madison, Wis., US**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL, SE**

(72) Erfinder:

**SHULTZ, John, Verona, US; SMITH, E., Craig, Oregon, US; STORTS, R., Douglas, Verona, Wisconsin 53593, US; BRISCO, Paula, Oregon, US; TOWNE, Frederiksen, Judy, Oregon, US; SELMAN, Susanne, Madison, US; GROSCH, Josephine, Mazomanie, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN UNTER ANWENDUNG VON ALKALINER PHOSPHATASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Behandlung von Nucleinsäurelösungen, umfassend Lösungen, die in Verfahren des Isolierens von Nucleinsäurematerial aus biologischen Proben erzeugt werden, sodass das darin enthaltene oder daraus isolierte Nucleinsäurematerial für verschiedene Zwecke eingesetzt werden kann. Einsatzgebiete der Lösung der verschiedenen Arten von Nucleinsäurematerialien, die gemäß den Verfahren dieser Erfindung isoliert oder behandelt wurden, umfassen enzymatische Restriktionsverdauung eines Desoxyribonucleinsäure-(DNA-)Materials von Interesse, um Gene zu klonieren, kartieren oder bearbeiten, DNA-Sequenzieren, um die Gegenwart eines Gens oder einer Mutation in einem DNA-Fragment zu identifizieren, Hybridisierungstests von Ribonucleinsäure (RNA) oder von DNA zur Diagnose genetisch übertragbarer Krankheiten, zur Amplifikation von Nucleinsäuren durch Polymerasekettenreaktion (PCR) oder andere Zielamplifikationsverfahren zur Identifikation von Personen für gerichtsmedizinische Zwecke oder zum Nachweisen von Vaterschaften, oder zur Einführung von DNA in Säugetierzellen (Transfektion) zur Gentherapie oder zur Erforschung von Genexpression. Besonders betrifft ein Aspekt der vorliegenden Erfindung rasche und wirksame Verfahren, in denen sichergestellt wird, dass Nucleinsäurematerialien, die aus einer biologischen Probe isoliert wurden, während des Isolationsverfahrens nicht abgebaut oder mit schädlichen Proteinen wie Nucleasen kontaminiert werden. Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft rasche und wirksame Verfahren zur Behandlung einer Lösung eines Nucleinsäurematerials, um darin enthaltene Nucleasen zu inaktivieren, worin jegliche aktive Nucleasen in der Lösung in der Lage sind, das Material abzubauen.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Zahlreiche diagnostische Verfahren, Forschungs- und Entwicklungsverfahren erfordern die Isolation und Detektion spezifischer Nucleinsäure-(DNA- oder RNA-) Sequenzen, die in einer biologischen Probe vorhanden sind. Beispielsweise werden Nucleinsäure-Detektionsverfahren eingesetzt, um Bakterien, Viren oder andere Mikroorganismen zu identifizieren, deren Gegenwart die Ursache einer Infektionskrankheit bezeichnen kann. Die Nucleinsäuren der Zellen komplexerer Organismen, wie beispielsweise die DNA von menschlichen Leukozyten, werden immer häufiger isoliert und getestet, um die Gegenwart einer Mutation nachzuweisen, die mit Krebs oder einer genetischen Krankheit in Verbindung steht. Aus Proben von biologischen Geweben isolierte Nucleinsäuren wie Blut, die direkt von einem Menschen oder am Tatort abgenommen werden, werden auch eingesetzt, um die Identität des Menschen, von dem die Probe abstammt, beispielsweise für gerichtsmedizinische Zwecke oder zum Nachweis einer Vaterschaft, zu identifizieren. Nucleinsäuren werden auch aus biologischem Gewebe isoliert, um Forschungs- und Entwicklungsverfahren wie Klonieren und Nucleinsäure-Analyseverfahren durchzuführen, die Fachleuten bekannt sind.

**[0003]** Bevor Nucleinsäurematerial für jegliche der zuvor genannten Zwecke isoliert werden kann, ist es notwendig, die spezifische Nucleinsäure von Interesse in einer Probe biologischen Materials verfügbar zu machen. Häufig ist die Nucleinsäure innerhalb einer Bakterienzelle, einer Pilzzelle, eines Virusteilchens oder der Zelle eines komplexeren Organismus wie menschlichen Leukozyten oder einer Pflanzenzelle enthalten.

**[0004]** Solche Zellen oder Teilchen können chemisch oder enzymatisch behandelt werden, um die Wände solcher Organismen aufzulösen oder zu denaturieren, was dazu führt, dass die Nucleinsäuren freigesetzt werden. Dieses Auflösungsverfahren wird üblicherweise als „Lyse“ bezeichnet. Die resultierende Lösung, die solches lysierte Material enthält, wird als ein „Lysat“ bezeichnet.

**[0005]** Bedauerlicherweise führt solche Freisetzung zum Abbau von Nucleinsäuren, und zwar durch endogene Nucleasen, die in der Probe vorhanden sind und in solch großen Mengen gegenwärtig sein können, dass Zerstörung der Nucleinsäuren sofort mit der Freisetzung von Nucleinsäuren einsetzt. Jegliche Nucleasen, die am Ende jeglichen darauf folgenden Reinigungsverfahrens verbleiben, können weiterhin verbleibende, intakte Nucleinsäuren abbauen, bis nichts Nützliches von der anfänglichen Sequenz all dieser Nucleinsäuremoleküle mehr vorhanden ist. Nucleasen sind in den meisten biologischen Proben im Übermaß vorhanden und sind gegenüber Behandlungen, die bekannt sind, um andere Enzyme zu inaktivieren, oft extrem resistent. Desoxyribonucleasen (DNasen) wie Endonuclease I werden auf natürliche Weise in großen Mengen durch zahlreiche der gängigsten Stämme von Bakterienzellen produziert, die heutzutage zum Klonieren, Transformieren und Testen von DNA eingesetzt werden. Siehe beispielsweise die Erläuterung und Liste von end-A+-Stämmen von *Escherichia coli* (E. coli) von Schoenfeld et al. in *Promega Notes* 53, 13–21 (1995). Ribonucleasen (RNasen) sind in den meisten, wenn nicht in allen biologischen Proben im Übermaß vorhanden.

**[0006]** Andere Proteine, die in dem Lyseverfahren biologischen Materials freigesetzt werden, können zu zahlreichen anderen Problemen führen. Endotoxine, ein Typ von Lipopolysaccharid-modifiziertem Protein, das von zahlreichen Arten biologischen Materials freigesetzt wird, sind für tierische Gewebekulturzellen toxisch und können Zielzellen töten, bevor eine Nucleinsäure enthaltende Sequenz von Interesse zu diesen Zellen transformiert werden kann. So können Endotoxine eine Nucleinsäurelösung, die damit kontaminiert ist, für die Transfektion von Gewebekulturzellen nutzlos machen, da die Zellen am Leben gehalten werden müssen, um von Nutzen zu sein. Darüber hinaus können Endotoxine auch Komplikationen bei Gentherapien verursachen, einschließlich der möglichen Einführung von Nucleinsäuren in lebende Tiere.

**[0007]** Um mit dem Problem von Nucleasen und anderen unerwünschten Produkten, die durch Lyse freigesetzt werden, umzugehen, ist es auf dem Gebiet der Erfindung üblich, zahlreiche Mittel einzusetzen, um Nucleinsäuren, die von einer biologischen Probe stammen, zu reinigen. Beispielsweise wurden anionische Detergenzien und chaotrope Mittel, wie Guanidinthiocyanat, gleichzeitig eingesetzt, um Nucleaseaktivitäten zu inaktivieren oder zu hemmen und um Nucleinsäuren aus Zellen und subzellulären Strukturen freizusetzen. Leider sind zahlreiche dieser Mittel auch potente Inhibitoren für die Enzyme, die in zahlreichen Standardverfahren, wie Restriktionsverdauungs-, Transformations-, Amplifikations-, Targeting- und Hybridisierungsverfahren, eingesetzt werden. Aufgrund all der zuvor genannten Faktoren wurde es üblich, zusätzliche Isolations Schritte einzusetzen, um diese Mittel zu entfernen, um zweckdienliche, im Wesentlichen intakte Nucleinsäuren zu erhalten.

**[0008]** Ein übliches Verfahren, das eingesetzt wird, um Nucleinsäuren aus einem Lysat zu isolieren, ist, die Nucleinsäuren mittels eines niedermolekularen Alkohols aus der Lösung auszufällen. Da andere Makromoleküle unter diesen Bedingungen auch ausgefällt werden und eine klebrige, schwer zu bearbeitende Masse bilden, die die Nucleinsäuren einschließt, war es häufig notwendig, vor der Ethanolzufällung auf die Extraktion der Probe mittels gefährlicher organischer Lösungsmittelgemische zurückzugreifen, die Phenol und/oder Chloroform enthielten. In manchen Fällen, wenn anionische Detergenzien eingesetzt werden, werden Proteasen eingesetzt, die in Gegenwart dieser Detergenzien aktiv sind, wie Proteinase K zum Beispiel, um Proteinkomponenten der Probe teilweise abzubauen oder um Komponenten abzubauen, die durch die Lösungsbehandlung nicht extrahiert werden können.

**[0009]** Es wird sicherlich erkannt werden, dass dieses zuvor genannte Isolationsverfahren mühsam, gefährlich, arbeitsintensiv und langsam ist. Wird bei der Durchführung dieses Verfahrens nicht höchste Vorsicht walten gelassen, kann Restkontamination mit Nucleasen auftreten, und die Probennucleinsäuren werden abgebaut oder gehen verloren. Diagnostische Tests, die mit solchen Proben durchgeführt werden, können aufgrund solchen Abbaus falsche negative Resultate ergeben. Falsche negative Ergebnisse können auch aufgrund chemischer Interferenzen erhalten werden, beispielsweise durch restliche anionische Detergenzien, chaotrope Salze oder Ethanol, das in der Probe verbleibt und Zielamplifikationsverfahren hemmt. Wurden anionische Detergenzien und Proteasen eingesetzt, kann verbleibende proteolytische Aktivität die Enzyme, die in Zielamplifikations- und/oder Hybridisierungsdetektions-Reaktionen eingesetzt werden, auch abbauen und so falsche negative Ergebnisse liefern. So sind solche Verfahren zur Routinebearbeitung von biologischen Proben, die in klinischen und gerichtsmedizinischen Laboratorien in beliebigen Mengen erhalten werden, nicht gut geeignet.

**[0010]** Auch weniger mühsame Verfahren zum Isolieren von Nucleinsäuren sind bekannt. Ein solches Verfahren, das üblicherweise eingesetzt wird, um RNA zu isolieren und zu reinigen, setzt magnetische Teilchen wie paramagnetische Teilchen ein, um spezifische Nucleinsäure-Spezies aus einer Lysatlösung zu isolieren, die Guanidinthiocyanat und ein anionisches Detergens enthält. Siehe beispielsweise PolyATtract®-mRNA-Isolation-Systems, wie sie im Katalog der Promega Corporation, S. 158–160 (1996), beschrieben werden; oder siehe PCT-Veröffentlichung Nr. WO 96/09.308. Eine andere Art an Nucleinsäureisolationsverfahren setzt Silica ein, um Plasmid-DNA aus einer Bakterienlysat-Lösung zu isolieren, die ein Guanidinsalz und eine Base enthält. Boom et al., J. Clinical Microbiol. 28(3), 495–503 (1990). Mehrere Harze auf Silicabasis sind für den Einsatz in solchen Verfahren im Handel erhältlich. Ein spezialisiertes, auf Silica basierendes Harz, wie eines der Wizard™-DNA-Purification-System-Harze (im Handel bei Promega Corporation, Madison, WI, USA, erhältlich) wird beispielsweise dem Lysat zugesetzt und wird an die Nucleinsäure von Interesse wie Plasmid-DNA binden gelassen. Das Harz wird anschließend auf eine Säule aufgetragen, mehrere Male unter Verwendung von Vakuum oder Zentrifugalkraft gewaschen, und die an das Harz gebundene Nucleinsäure wird dann aus der Säule mittels eines Elutionspuffers oder Wasser eluiert.

**[0011]** Obwohl paramagnetische Teilchen und Harzverfahren wie jene eben zuvor erwähnte sehr rasche und selektive Verfahren zum Isolieren von Nucleinsäuren sind, garantieren sie weder die Inaktivierung von Nucleasen noch anderen schädlichen Proteinen an keinem Punkt des Verfahrens. In der Tat können Nucleasen so-

gar in die Endlösung isolierter Nucleinsäuren, die in solchen Verfahren produziert wird, übertragen werden. Die Übertragung von Nucleasen kann zu schwerwiegender Degradation von Nucleinsäuren führen, die zumindest mittels des zweiten, Harzbasierten Reinigungsverfahrens isoliert werden, vor allem in Fällen, in denen die anfängliche DNA aus einem A<sup>+</sup>-Bakterienstamm isoliert wird. Siehe z. B. Schoenfeld et al., s. o.

**[0012]** Wie zuvor angemerkt wurden Proteasen verwendet, um Proteine in Nucleinsäure-Isolationsverfahren enzymatisch abzubauen. Bis heute waren jedoch alle Proteasen, die eingesetzt wurden, um Nucleinsäuren zu isolieren, in den alkalischen pH-Bereichen, die in den meisten alkalischen Lysaten vorherrschen, inaktiv. Proteinase K ist beispielsweise bei einem pH von 9 oder darüber relativ inaktiv und bei jedem pH über 10,5 völlig inaktiv, was dem pH-Bereich eines typischen alkalischen Lysats entspricht. Andererseits weist Proteinase K optimale Aktivität in dem annähernd neutralen pH-Bereich (pH 7–8) auf, der im Allgemeinen bei Restriktionsverdauung oder Amplifikationsreaktionen eingesetzt wird, wobei restliche Proteasenaktivität in einem Nucleinsäurepräparat Enzyme, die der DNA zugesetzt wurden, abbauen kann.

**[0013]** Saure Proteasen, eine andere Art an Proteasen, deren Einsatz in Nucleinsäureisolation bekannt ist, schaffen zahlreiche andere Probleme. Das US-Patent Nr. 5.386.024, ausgegeben an Kacian et al. am 31. Januar 1995 (das „'024-Patent“), beschreibt beispielsweise ein Verfahren zum „Einsatz einer sauren Protease, um (eine) erwünschte Nucleinsäure(n), die in einer biologischen Probe vorhanden ist/sind, verfügbar zu machen“. ('024-Patent, Anspruch 1.) Das Verfahren des '024-Patents besteht darin, den pH einer biologischen Probe „auf einen niedrigeren pH als jenen zu reduzieren, bei dem die in der Probe vorhandenen endogenen Nucleasen aktiv sind, eine Protease zuzusetzen, die bei diesem niedrigen pH aktiv ist, die jegliche Nuclease abbaut, die durch Aussetzen gegenüber diesem niedrigen pH nicht irreversibel inaktiviert wurden, und anschließend die Protease durch Anheben des pH zu inaktivieren“ ('024-Patent, Spalte 3, Zeilen 5–11 des engl. Orig.). Die Nucleinsäurekomponenten biologischer Proben, die mit sauren Proteasen gemäß dem Verfahren des '024-Patents behandelt wurden, sind ohne weitere Isolationsschritte zum direkten Einsatz in verschiedenen Detektionsverfahren verfügbar. ('024-Patent, Spalte 6, Zeilen 39–41 des engl. Orig.). Dennoch merkt Kacian auch an, dass der niedrige pH, der in ihrem Verfahren mit sauren Proteasen eingesetzt wird, zu Purinbasenverlust und Kettenbruch in DNA führen kann ('024-Patent, Spalte 6, Zeilen 4–6 des engl. Orig.). Obwohl dieses letzte Verfahren also zur RNA-Isolation gut geeignet ist, ist sein Einsatz zur Isolation intakter DNA doch eingeschränkt.

**[0014]** Alkalische Proteasen (d. h. Proteasen, die bei einem pH von zumindest 10 aktiv sind) wurden zahlreiche Jahre in der Reinigungsmittelindustrie eingesetzt, um die Waschkraft von Waschmittel- oder anderen handelsmäßigen Reinigungsmittelzusammensetzungen zu verbessern. Siehe beispielsweise Von der Osten et al., J. Biotechnol. 28, 55–68 (1993); und Aehle et al., J. Biotechnol. 28, 31–40 (1993). Alkalische Proteasen, die von *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) und *Bacillus alcalophilus* (*B. alcalophilus*) gereinigt sind, werden weitläufig in Reinigungsmittelformulierungen eingesetzt und sind aufgrund ihrer im Vergleich mit Proteasen anderer Organismen geringen Toxizität, ihrer Aktivität bei basischen pH-Werten und ihrer Kompatibilität mit Reinigungsmitteln besonders bevorzugt. Solche Proteasen werden billig und in großen Mengen zum Einsatz in der Reinigungsmittelindustrie produziert. Ein Beispiel für die zahlreichen patentierten Verfahren zur Herstellung und Reinigung von alkalischen Proteasen aus diesen zwei Organismen gibt das US-Patent Nr. 5.439.817, ausgegeben an Shetty et al. am 8. August 1995.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung befasst sich mit dem Problem des Abbaus von Nucleinsäuren nach Freisetzung der Nucleinsäure- und Proteinkomponenten aus biologischen Materialien im Laufe der Lyse in Gegenwart eines basischen pH. Die vorliegende Erfindung befasst sich auch mit dem Problem von Proteinübertragung, besonders der Übertragung von Endotoxinen und Nucleasen in zahlreichen unterschiedlichen Nucleinsäure-Isolationsverfahren. Die vorliegende Erfindung setzt auf praktische Weise eine alkalische Protease ein, um Nucleasen in biologischen Proben zu inaktivieren und abzubauen, während die Nucleinsäuren in der Probe für weitere Isolation unter Einsatz jedes beliebigen Verfahrens, das aus verschiedenen bekannten Verfahren zur Nucleinsäureisolation ausgewählt wird, verfügbar gemacht werden. Der Zusatz von alkalischer Protease zu biologischen Proben gemäß dem Verfahren dieser Erfindung macht die Nucleinsäuren in der Probe ausreichend frei von hemmenden oder abbauenden Enzymen, sodass sie direkt zur Restriktionsverdauung, DNA-Sequenzierung, zum Klonieren und für Detektionstests wie Hybridisierungstests oder Zielamplifikationsverfahren eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung stellt ein rasches, einfaches und relativ ungefährliches Verfahren zum Entfernen von schädlichen Proteinen aus einer Lösung dar, das sicherstellt, dass intakte und einsetzfähige Nucleinsäuren erhalten werden, sofern weitere Nucleinsäureisolation erwünscht ist. Das Verfahren dieser Erfindung bietet auch ein rasches und wirksames Mittel zum Verdauen von Proteinen wie Nucleasen, die Nucleinsäuren hemmen oder beschädigen können, was eine Einschränkung oder sogar vollständige Zerstörung der Nützlichkeit der so isolierten Nucleinsäuren bedeuten könnte.

**[0016]** Die vorliegende Erfindung befasst sich auch mit dem Bedarf an Verfahren zur Behandlung von Nucleinsäurelösungen, die Nucleasen enthalten, welche in der Lage sind, die Nucleinsäuren abzubauen. Diese Ausführungsform des Verfahrens dieser Erfindung bietet ein rasches und wirksames Mittel zum Inaktivieren der Nucleasekomponenten solcher Lösungen, wodurch die darin enthaltenen Nucleinsäuren vor Abbau oder Zerstörung durch die Nucleasen geschützt sind.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0017]** Nun wurde herausgefunden, dass alkalische Protease eingesetzt werden kann, um die Qualität von Nucleinsäuren, die aus biologischem Material isoliert wurden, durch die Verdauung schädlicher Proteine wie Nucleasen im alkalischen pH-Bereich, der typischerweise bei alkalischen Lyseverfahrensschritten bekannter Nucleinsäure-Isolationsverfahren eingesetzt wird, zu verbessern. Es wurde auch herausgefunden, dass alkalische Protease auch eingesetzt werden kann, um eine Nucleinsäurelösung so zu behandeln, dass die Nucleinsäuren vor Abbau oder Zerstörung durch in der Lösung vorhandene Nucleasen geschützt sind. Auch wurden Sets für den Einsatz beim Isolieren von Nucleinsäurematerial entwickelt, und zwar unter Verwendung von alkalischer Protease. Die grundlegenden Eigenschaften dieser zentralen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden nachstehend zusammengefasst.

**[0018]** Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung einer Nucleinsäurelösung mit einer alkalischen Protease, worin die Lösung ein Nucleinsäurematerial und Proteine enthält und das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) Einstellen des pH der Nucleinsäurelösung auf einen pH von zumindest 10, um eine alkalische Nucleinsäurelösung zu bilden;
- (b) Inkubieren der alkalischen Nucleinsäurelösung in Gegenwart der alkalischen Protease, bis die Proteine im Wesentlichen inaktiviert sind; und
- (c) Senken des pH der Lösung auf einen ausreichend niedrigen Wert, um die Proteasenaktivität zu verringern.

**[0019]** Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Isolieren von Nucleinsäurematerial aus einer biologischen Probe, die Proteinmaterial und Nucleinsäurematerial enthält, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) Suspendieren der biologischen Probe in einer Lösung;
- (b) Einstellen des pH der Lösung auf einen pH von zumindest 10 durch Zusetzen einer alkalischen Lyselösung, um eine alkalische Lysatlösung zu bilden;
- (c) Inkubieren der alkalischen Lysatlösung in Gegenwart einer alkalischen Protease, bis Proteine, die zum Abbau des Nucleinsäurematerials fähig sind, im Wesentlichen inaktiviert sind; und
- (d) Senken des pH der alkalischen Lysatlösung auf einen ausreichend niedrigen Wert, um die Proteasenaktivität zu verringern.

**[0020]** Wiederum eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Set zum Isolieren eines Nucleinsäurematerials, wobei das Set Folgendes in getrennten Behältern umfasst:

- (a) eine Aliquote einer alkalischen Protease, worin die alkalische Protease zur Inaktivierung von Proteinen fähig ist, die zum Abbau des Nucleinsäurematerials bei einem pH von zumindest 10 fähig sind; und
- (b) eine Harzmatrix, die zur reversiblen Bindung des Nucleinsäurematerials fähig ist.

**[0021]** Die Bezeichnung „Inkubieren“, wie sie hierin verwendet wird, ist in einem weiten Sinn zu verstehen und beschreibt das Halten einer Lösung über eine ausreichende Zeitspanne hinweg bei einer Temperatur, die entweder unter, bei oder über Raumtemperatur liegt, bei der ein bestimmtes Enzym von Interesse ein bestimmtes Substrat in der Lösung aktiv verdaut. Spezifischer werden die Verfahren dieser Erfindung bei einer Temperatur durchgeführt, bei der die alkalische Protease Proteine in der Lösung verdaut.

**[0022]** Außer explizit anders ausgeführt, wird die Bezeichnung „Harzmatrix“ hierin verwendet, um in weiterem Sinne feste Harzteilechen zu beschreiben, die in der Lage sind, die Nucleinsäure von Interesse reversibel zu binden, wobei die Harzteilechen in Form einer Teilchenaufschlammung in einer Lösung, in Form von in einer Säule gepackten Teilchen oder in Form von Teilchen, die in ein Filter oder eine Membran gebettet sind, vorliegen.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG(EN)

**[0023]** [Fig. 1](#) ist eine Darstellung eines elektronischen Scans eines Agarose-Elektrophorese-Gels, das frak-

tionierte Proben von Plasmid pGEM®-3Zf(+)DNA enthält, die aus E.-coli-LE392-Bakterien (end-A+) unter Verwendung von abnehmenden Mengen alkalischer Protease (Proben A1-, A2-, B1-, B2-, C1-, C2-, D1-, D2-) isoliert und anschließend über Nacht bei 37°C in Kernpuffer inkubiert wurden, der ein Magnesiumsalz enthält, um restliche Nucleasen nachzuweisen (Proben A1+, A2+, B1+, B2+, C1+, C2+, D1+, D2+).

**[0024]** [Fig. 2](#) ist eine Darstellung eines elektronischen Scans eines Agarose-Elektrophorese-Gels, das fraktionierte Proben von Plasmid pGEM®-3Zf(+)DNA enthält, die aus E.-coli-Y1090-Bakterien (end-A+) unter Verwendung derselben Konzentrationen alkalischer Protease und derselben Testbedingungen, wie sie für [Fig. 1](#) beschrieben wurden, isoliert wurden.

**[0025]** [Fig. 3](#) ist eine graphische Darstellung von Absorptionswerten, die im Laufe der Testzeit in einem Proteaseaktivitätstest von Plasmid-DNA-Proben unter Einsatz des Verfahrens dieser Erfindung, nach dem Erhitzen der Proben für 0, 3, 5, 7 oder 9 Minuten auf 67°C, gemessen wurden.

**[0026]** [Fig. 4](#) ist eine graphische Darstellung von Absorptionswerten, die im Laufe der Testzeit in einem Proteaseaktivitätstest von Proben verdünnter Stammlösung alkalischer Protease nach dem Erhitzen für 0, 3, 5, 7 oder 9 Minuten auf 67°C gemessen wurden.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0027]** Die vorliegende Erfindung ist in einem Aspekt ein Verfahren zum Isolieren von Nucleinsäurematerial aus einer biologischen Probe unter Einsatz einer alkalischen Protease, worin die biologische Probe Proteinmaterial und Nucleinsäurematerial umfasst, wie in der allgemeinen Beschreibung der Erfindung zuvor bereits beschrieben wurde. In einem anderen Aspekt ist die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung einer Nucleinsäurelösung mit einer alkalischen Protease, wobei die Lösung ein Nucleinsäurematerial und Nucleasen umfasst, wie bereits in der allgemeinen Beschreibung der Erfindung zuvor beschrieben wurde.

**[0028]** Vorzugsweise wird eine alkalische Protease zum Einsatz in einem oder in beiden Verfahren dieser Erfindung ausgewählt, die die Verdauung von Makromolekülen (z. B. Proteinen) in der Probe katalysiert, die den beabsichtigten Einsatz der Probe beeinträchtigen oder Nucleinsäuren, die aus der Probe isoliert wurden, abbauen können. Auch wird bevorzugt, alkalische Proteasen auszuwählen, die das Verfügbarmachen der erwünschten Nucleinsäuren durch Hilfe in der Lyse oder Abbau von Zellwänden von Mikroorganismen, Viruspartikeln, Ribosomen und/oder anderen Strukturen, die die erwünschten Nucleinsäuren in der Probe enthalten, unterstützen. Die Solubilisierung dieser Strukturen und das Freisetzen der Nucleinsäuren erfolgt vorzugsweise durch Einbinden eines Detergens in die alkalische Lyselösung oder alkalische Nucleinsäurelösung, um Substratproteine in der Lösung zu denaturieren, wodurch deren Empfänglichkeit für Proteaseverdauung gesteigert wird. Die alkalische Protease und das Detergens stellen in dem am meisten bevorzugten Aspekt der alkalischen Lyselösung, die in den vorliegenden Verfahren eingesetzt wird, gemeinsam sicher, dass Strukturen, die das Nucleinsäurematerial enthalten, solubilisiert werden. Die alkalische Protease in der Lysatlösung stellt auch sicher, dass zumindest manche der Proteine, die durch die Solubilisierung freigesetzt werden, besonders Nucleasen, die die Nucleinsäure von Interesse abbauen können, enzymatisch inaktiviert werden.

**[0029]** Die alkalische Protease, die für den Einsatz im Verfahren dieser Erfindung ausgewählt wird, muss beim Verdauen von Proteinen bei einem pH von zumindest 10 aktiv sein. Die ausgewählte alkalische Protease muss auch beim Verdauen und Inaktivieren von Nucleasen aktiv sein. Die ausgewählte alkalische Protease verdaut vorzugsweise auch andere unerwünschte Proteine neben den Nucleasen, wie beispielsweise Endotoxine, und noch bevorzugter verdaut sie sogar andere unerwünschte Komponenten.

**[0030]** Die bevorzugte alkalische Protease, die in beiden Verfahren der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird, wird aus einem der Bacillus-Bakterienstämme isoliert, die dafür bekannt sind, eine bei einem pH von 9 oder darüber aktive alkalische Protease zu produzieren, vorzugsweise eine alkalische Protease, die von *B. licheniformis* oder *B. alcalophilus* gereinigt ist, doch am meisten bevorzugt eine alkalische Protease, die aus *B. licheniformis* erhalten wird. Die bevorzugte alkalische Protease ist von mehreren verschiedenen Handelsquellen erhältlich, wobei eine bevorzugte Quelle Valley Research, Inc., in South Bend, Indiana, ist. Diese Protease ist aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit beim Verdauen von Proteinen bei einem pH, der typischerweise zur Lyse biologischer Proben in alkalischen Lyseverfahren nach dem Stand der Technik eingesetzt wird (d. h. bei einem pH von 10 oder darüber), besonders bevorzugt. *B. licheniformis* sind auch deswegen bevorzugt, da sie im Handel leicht erhältlich sind und da sie im Vergleich mit anderen organischen Lösungsmitteln (wie Phenol) oder anderen Proteasen (wie Proteinase K), die beide weitläufig eingesetzt werden, um schädliche Proteine während oder unmittelbar nach der Lyse zu inaktivieren, nur geringe Toxizität aufweisen. Siehe z. B. das US-Patent

Nr. 4.843.155, ausgegeben an Chomczynski am 27. Juni 1989.

**[0031]** Schritt (a) des Verfahrens zum Isolieren von Nucleinsäuren dieser Erfindung und der erste Schritt in einem bevorzugten Aspekt des Verfahrens zur Behandlung einer Nucleinsäurelösung dieser Erfindung umfasst das Suspendieren einer biologischen Probe in einer Lösung. Vorzugsweise wird eine wie nachstehend noch genauer beschriebene Suspensionslösung eingesetzt. Die eingesetzte biologische Probe kann jede beliebige von zahlreichen unterschiedlichen Arten oder Gemischen biologischen Materials sein, umfassend Bakterienzellen, Viruspartikel, pflanzliches oder tierisches Gewebe.

**[0032]** Die Auswahl des Verfahrens zum Suspendieren einer bestimmten biologischen Probe in Lösung hängt von der Beschaffenheit der Probe ab. Ein Pellet aus Bakterienzellen oder aus Tierblut beispielsweise kann im Allgemeinen durch Zusatz einer Lösung und vorsichtigem Vermischen mit einer Pipette oder durch Umdrehen suspendiert werden. Zahlreiche Formen von Pflanzen-, Tier- oder Pilzgeweben erfordern jedoch intensivere Behandlung, bevor sie suspendiert werden, wie beispielsweise Einfrieren und Pulverisieren oder Homogenisieren mit einem Mixer oder einer anderen mechanischen Mischvorrichtung.

**[0033]** Der Einsatz einer Suspensionslösung wird, wie zuvor erwähnt, bevorzugt. Eine Suspensionslösung dieser Erfindung ist vorzugsweise eine wässrige Lösung, und noch bevorzugter eine wässrige Lösung, die einen Puffer umfasst, und sogar noch bevorzugter eine wässrige Lösung, die weiters einen Tris-HCl-Puffer umfasst, und besonders bevorzugt, die weiters einen Tris-HCl-Puffer mit pH 7,5 umfasst. Eine Suspensionslösung dieser Erfindung umfasst vorzugsweise auch einen Chelatbildner, z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Ist das zu isolierende Nucleinsäurematerial ein DNA-Material, so umfasst die Suspensionslösung vorzugsweise zusätzlich ein RNase-Enzym, das bei dem pH der Suspensionslösung aktiv ist, und noch bevorzugter eines, das das betreffende DNA-Material weder abbaut noch hemmt. Ein besonders bevorzugtes RNase-Enzym ist RNase A.

**[0034]** In einem anderen Schritt eines bevorzugten Aspekts des Verfahrens dieser Erfindung wird der pH der Suspensionslösung durch Zusatz einer alkalischen Lyselösung auf einen alkalischen pH eingestellt. Die alkalische Lyselösung umfasst eine Base, vorzugsweise eine Base, die stark genug ist, um den pH der Lösung auf ein Niveau zu heben, auf dem die alkalische Protease hochaktiv ist, die jedoch nicht so stark ist, dass sie das zu isolierende Nucleinsäurematerial zerstört. Die bevorzugte Base ist eine wässrige Lösung von Natriumhydroxid. Die alkalische Lyselösung umfasst vorzugsweise weiters ein Detergens, vorzugsweise ein anionisches Detergens, und noch bevorzugter Natrium-N-Laurylsulfat (SDS). Die Detergenskomponente der Lyselösung zerstört die Lipidkomponenten biologischer Materialien wie die Zellwände von Pflanzen- oder Pilzzellen oder die Membranen von Bakterien oder Tierzellen, wodurch sie jegliches Material wie Proteine oder Protein-Nucleinsäure-Komplexe, die innerhalb dieser Zellwände oder Membranen enthalten sind, zur Verdauung durch eine alkalische Protease verfügbar macht. Im Fall von robusteren Zellwänden wie die Wände zahlreicher Pflanzen- oder Pilzzellen wird hierin erwogen, dass eine Base und/oder ein Detergens alleine oder zusammen die Zellwände nicht ausreichend aufbrechen können, um das Nucleinsäurematerial freizusetzen. In solchen Fällen kann die Vorverdauung der Zellen mit z. B. einem anionischen Detergens und Proteinase K vor dem Zusatz der alkalischen Lyselösung notwendig sein, um angemessene Lyse sicherzustellen.

**[0035]** In einer anderen Ausführungsform des Verfahrens dieser Erfindung wird der pH der Nucleinsäurelösung vorzugsweise vor der Behandlung mit alkalischer Protease unter Einsatz einer alkalischen Lyselösung derselben Zusammensetzung wie zuvor beschrieben eingestellt.

**[0036]** Die alkalische Protease muss in Lösungen für Proteine vorhanden sein, die im Inkubationsschritt des Verfahrens verdaut werden sollen. Die alkalische Protease kann jedoch der Lösung bei einem beliebigen früheren Verfahrensschritt zugesetzt werden, da sich nicht hochaktiv wird, bevor der pH auf 10 oder darüber angehoben wird. Die alkalische Protease wird der Lösung vorzugsweise zugesetzt, nachdem der pH angehoben wurde, besonders in Fällen, in denen das Verfahren eingesetzt wird, um ein DNA-Material zu isolieren, und in denen eine RNase in der Lösung suspendierten biologischen Materials vorhanden ist oder ihr zugesetzt wird. Die Menge erforderlicher alkalischer Protease, um abbauende Proteine im Lysat, z. B. Nucleasen, im Wesentlichen zu inaktivieren, kann unter Einsatz eines einfachen Schutztests wie dem in Beispiel 6 beschriebenen Test bestimmt werden.

**[0037]** Der Inkubationsschritt der Behandlungs- oder Isolationsverfahren dieser Erfindung wird vorzugsweise durch Inkubieren der alkalischen Nucleinsäure- oder der alkalischen Lysatlösung bei einer Temperatur zwischen 0°C und 67°C durchgeführt, bis Proteine, die in der Lage sind, das Nucleinsäurematerial abzubauen, im Wesentlichen inaktiviert sind. Das Zeitausmaß, das erforderlich ist, um wesentliche Inaktivierung solcher Pro-

teine sicherzustellen, variiert je nach der ausgewählten Inkubationstemperatur. Niedrigere Temperaturen verlangsamen enzymatische Aktivität, während höhere Temperaturen dazu neigen, diese Aktivität bis zu dem Punkt zu steigern, an dem die Inkubationstemperatur so hoch ist, dass zumindest ein gewisser Teil der Enzyme inaktiviert ist. Die Inkubationstemperatur liegt vorzugsweise unter zumindest 45°C, noch bevorzugter unter zumindest 37°C und am meisten bevorzugt bei etwa Raumtemperatur (25°C).

**[0038]** Die alkalische Nucleinsäure- oder Lysatlösung wird in Gegenwart der alkalischen Protease bei einer ausreichend hohen Temperatur inkubiert, dass die Protease beim Verdauen des Proteinmaterials aus der Probe aktiv ist, jedoch nicht bei solch einer hohen Temperatur, die das Nucleinsäurematerial beeinträchtigen könnte. Es wird angenommen, dass unterschiedliche alkalische Proteasespezies bei unterschiedlichen Temperaturen aktiv sind. Die im Verfahren dieser Erfindung eingesetzte, am meisten bevorzugte alkalische Protease ist bei Raumtemperatur aktiv, und der Inkubationsschritt wird am meisten bevorzugt bei etwa dieser Raumtemperatur zumindest etwa eine Minute lang, und am meisten bevorzugt zumindest etwa fünf Minuten lang, durchgeführt.

**[0039]** Die Verfahren dieser Erfindung können eingesetzt werden, um jegliches Nucleinsäurematerial zu isolieren. Am meisten bevorzugt wird es jedoch eingesetzt, um DNA zu isolieren. RNA neigt dazu, sich in Lösungen, die über eine beliebige Zeitspanne hinweg auf einem hohen pH gehalten werden, zu zersetzen. Wird daher RNA gemäß den Verfahren dieser Erfindung isoliert, so muss dies bei einem ausreichend niedrigen pH erfolgen, sodass RNA nicht abgebaut wird, jedoch bei einem ausreichend hohen pH, sodass die alkalische Protease aktiv ist. DNA kann sehr hohe pH-Werte überleben, ohne beeinträchtigt zu werden. Wird sie jedoch über lange Zeit hinweg auf einem hohen pH-Wert gehalten, so neigt auch DNA dazu, zu denaturieren und beschädigt zu werden. Folglich sollte bei der praktischen Durchführung des Verfahrens dieser Erfindung die Lyselösung nicht länger auf einem pH gehalten werden, bei dem die alkalische Protease aktiv ist (auf dem „hohen pH“) als notwendig ist, um zu ermöglichen, dass die alkalische Protease alle oder im Wesentlichen alle der in der Lösung vorhandenen Nucleasen verdaut. Die Lyselösung wird vorzugsweise nicht länger als 30 Minuten auf einem hohen pH gehalten, noch bevorzugter nicht länger als 15 Minuten, sogar noch bevorzugter nicht länger als 10 Minuten, und am meisten bevorzugt nicht länger als 5 Minuten.

**[0040]** In einem weiteren Schritt der Verfahren dieser Erfindung wird der pH der alkalischen Nucleinsäure- oder Lysatlösung nach Inkubieren mit alkalischer Protease auf einen pH abgesenkt, der ausreichend ist, um die Protease weniger aktiv zu machen. Im Allgemeinen wird angenommen, dass eine in der Lösung vorhandene Protease durch Reduzieren des pH der Lösung um zumindest 1 pH-Einheit weniger aktiv gemacht wird. In einer bevorzugten Ausführung wird die alkalische Protease (im Gegensatz zur lediglichen Reduktion der Aktivität) inaktiv gemacht, vorzugsweise durch Herabsetzen des pH auf unter pH 8, noch bevorzugter durch Herabsetzen des pH des Gemisches auf zumindest einen so niedrigen pH wie neutralen pH, und am meisten bevorzugt durch Herabsetzen des pH auf einen pH, der neutral oder etwa neutral ist. Bei manchen alkalischen Proteasen ist das Herabsetzen des pH auf den bevorzugten pH-Bereich ausreichend, um weitere proteolytische Verdauung im Gemisch völlig zu stoppen, und es kann das Enzym sogar irreversibel denaturieren und inaktivieren. Bei anderen alkalischen Proteasen kann es erforderlich sein, auf ein Erhitzen der Probe zurückzugreifen, um völlige Inaktivierung der Protease zu erreichen. Die am meisten bevorzugte alkalische Protease, eine alkalische Protease, die von *B. licheniformis* isoliert wurde, kann durch Erhitzen einer die Protease enthaltenden Lösung auf 67°C für nur 5 Minuten völlig inaktiviert werden. In der Zeit, in der die Proteinkomponenten des Lysats mit der alkalischen Protease verdaut und der pH herabgesetzt wird, überleben die Nucleinsäuren ohne Beeinträchtigung ein Heizverfahren bei diesem niedrigeren pH.

**[0041]** Wurde die alkalische Proteaseaktivität erst einmal reduziert oder inaktiv gemacht, können die verbleibenden Nucleinsäuren in Lösung direkt in verschiedenen Anwendungen eingesetzt werden oder aus anderen Materialien im Gemisch durch Durchführen eines zusätzlichen Isolationschritts, der Fachleuten bekannt ist, isoliert werden.

**[0042]** Wird der pH der alkalischen Lysatlösung auf etwa einen neutralen pH herabgesetzt, bildet sich üblicherweise ein Niederschlag. Ist die lysierte biologische Probe zelluläres Material wie z. B. Bakterienzellen, so setzt sich der in diesem Verfahrensschritt gebildete Niederschlag erstrangig aus Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und genomischer DNA zusammen. Wird es nicht entfernt, so kann dieser Niederschlag das Nucleinsäurematerial in manchen Anwendungen in darauf folgenden Verfahren beeinträchtigen. Folglich wird in einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens dieser Erfindung jeglicher Niederschlag, der im Laufe des Aktivitätsreduktions-/Inaktivierungsschritts der alkalischen Protease gebildet wird, entfernt, damit ein geklärtes Lysat gebildet wird. Der Niederschlag kann durch Filtrieren oder Zentrifugieren entfernt werden, wird jedoch am meisten bevorzugt durch Zentrifugieren entfernt. Wird der Niederschlag in einen Zentrifugenbehälter gegeben

und Zentrifugalkraft ausgesetzt, bildet er ein Pellet am Boden und den Wänden des Behälters, sodass das geklärte Lysat durch Dekantieren oder Pipettieren entfernt werden kann. Das Nucleinsäurematerial im geklärten Lysat kann dann direkt eingesetzt werden oder kann unter Verwendung jeder beliebigen Anzahl an bekannten Isolationsverfahren weiter isoliert werden.

**[0043]** In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung wird Nucleinsäurematerial im geklärten Lysat (siehe oben) aus anderen biologischen Materialien in der Lösung unter Einsatz weiterer Isolationsverfahren isoliert. Obgleich drei solche Verfahren, die zum Einsatz in dieser Erfindung geeignet sind, nachstehend beschrieben, so beschränkt sich die vorliegende Erfindung selbstverständlich nicht auf diese Verfahren.

**[0044]** Ein erstes geeignetes, zusätzliches Isolationsverfahren umfasst das Ausfällen der Nucleinsäuren mit Alkoholen. Alkohol wird dem geklärten Lysat zugesetzt und führt zur Ausfällung der Nucleinsäuren. Die Nucleinsäure wird dann durch Zentrifugieren gesammelt, und der Überstand wird entfernt. Der DNA-Niederschlag wird dann in einem geeigneten wässrigen Puffer neuerlich gelöst. H. C. Birnboim, *Methods in Enzymology*, Band 100, 243–255 (1983); H. C. Birnboim und J. Doly, *Nucleic Acids Res.*, Band 7, 1.515–1.523 (1979).

**[0045]** Ein zweites, zusätzliches Isolationsverfahren, das zum Einsatz im Verfahren dieser Erfindung geeignet ist, verwendet magnetische Teilchen, um das Nucleinsäurematerial von Interesse zu isolieren. In diesem Verfahren wird das Nucleinsäurematerial reversibel an ein magnetisches Teilchen gebunden, und Magnetkraft wird eingesetzt, um die gebundene Nucleinsäure von anderen biologischen Materialien in der Lösung zu trennen. Das Nucleinsäurematerial wird dann vom Teilchen in eine zweite Lösung freigesetzt. Das magnetische Teilchen ist vorzugsweise ein paramagnetisches Teilchen, und noch bevorzugter ein paramagnetisches Teilchen, das für den Einsatz zum Isolieren von Nucleinsäuren bereits getestet wurde. Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, die im Handel bei Promega Corporation, Madison, Wisconsin, erhältlich sind, sind besonders bevorzugte paramagnetische Teilchen. Ein bevorzugtes Verfahren zusätzlich isolierender Nucleinsäuren unter Einsatz von magnetischen Teilchen wird in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 96/09.308 beschrieben.

**[0046]** Ein drittes und am meisten bevorzugtes Isolationsverfahren setzt eine Harzmatrix ein, um das Nucleinsäurematerial reversibel zu binden. Das geklärte Lysat wird einer geeigneten Harzmatrix in Gegenwart einer ausreichenden Menge eines chaotropen Mittels zugesetzt, um die Nucleinsäure dazu zu bringen, sich an die Harzkomponente der Matrix zu binden. An das Harz gebunden, wird der Nucleinsäure/Harz-Komplex vorzugsweise zumindest einmal gewaschen, und dies unter Einsatz einer äußeren Kraft wie Zentrifugalkraft oder eines Vakuums, um die Waschlösung zu entfernen. Das Nucleinsäurematerial wird dann aus der Harzmatrix unter Einsatz eines Elutionspuffers oder von Wasser freigesetzt.

**[0047]** Das zum Einsatz in dem zuvor beschriebenen Verfahren bevorzugte Harz sind auf Silica basierende Teilchen. Geeignetes Silica-Harzmaterial zur reversiblen Bindung von Nucleinsäuren umfasst Glaspulver und Diatomeenerde. Siehe z. B. das US-Patent Nr. 5.075.430, ausgegeben an Little am 24. Dezember 1991; oder das US-Patent Nr. 5.155.018, ausgegeben an Gillespie et al. am 13. Oktober 1992. Das in bevorzugten Isolationsverfahren dieser Erfindung eingesetzte Harz besteht aus festen Teilchen von Silicamaterial in einer Matrix. Jede beliebige Anzahl an verschiedenen Harzmatrixformaten kann für den Einsatz in Nucleinsäure-Isolationsverfahren dieser Erfindung erwägt werden, umfassend Silica-basierte Harzteilechen in Form einer Flüssigkeits-/Teilchen-Aufschlammung, in Form einer gepackten Säule oder in Form eines Filters oder einer Membran. Eine bevorzugte Harzmatrix ist eine, die aus den Harzaufschlammungen oder gepackten Säulen besteht, die im Handel bei Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA, für den Einsatz mit ihren Wizard™-DNA-Purification-Systemen erhältlich sind. Eine noch bevorzugtere Harzmatrix ist eine, die aus den eingebetteten Filtermaterialien besteht, die im Handel bei Ansys Corporation, Irvine, Kalifornien, erhältlich sind. Besonders bevorzugt ist das SPEC™-Silica-Scheibenmaterial, erhältlich bei Ansys. Andere bevorzugte, im Handel erhältliche Harzmatrizes werden von Qiagen Corporation mit deren eigenen DNA-Reinigungssystemen vertrieben. Geeignete Silica-basierte Harzzusammensetzungen für den Einsatz im vorliegenden Verfahren werden auch in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 95/06.652 beschrieben.

**[0048]** Fachleute, die Experten auf dem Gebiet der Nucleinsäurenreinigung sind, werden erkennen, dass die Verfahren dieser Erfindung auch eingesetzt werden könnten, um die Qualität jedes beliebigen Nucleinsäurematerials, umfassend RNA, die aus einer Vielzahl biologischer Proben isoliert wird, zu verbessern. Eines der Standardverfahren zur RNA-Extraktion umfasst den Aufschluss von Gewebe in Gegenwart einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen wie Guanidinthiocyanat, gefolgt von organischer Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol und Chloroform. Bei dieser Extraktion teilt sich die RNA in die wässrige Phase auf, und Kontaminanten wie DNA und denaturierte und inaktivierte Proteine teilen sich in die organische Phase bzw. Interphasenschichten auf. Eine einzelne Extraktion entfernt oder inaktiviert jedoch nicht alle der kontaminierenden

Nucleasen wirksam und erfordert daher mehrfache Extraktionen. Jede Extraktion führt jedoch zu einer reduzierten Gewinnung an RNA aus der Probe. Das Entfernen von Nucleasen, die RNA aus der Probe abbauen, muss quantitativ sein. Diese Enzyme sind dafür bekannt, sehr stabil zu sein, und können während langer Lagerungszeiten der RNA wieder zu ihrer aktiven Form renaturieren. Dies kann zu einem langsamen Abbau der RNA während der Lagerung der Probe führen. Weiters sollte in Betracht gezogen werden, dass unterschiedliches Ausgangsmaterial auch unterschiedliche Mengen an Ribonucleaseaktivität enthält, was es schwierig macht, das Extraktionsverfahren für alle Ausgangsmaterialien zu standardisieren.

**[0049]** Unter den geeigneten Bedingungen kann RNA reversibel gebunden und aus einem Silicateilchen eluiert werden. Es wird in Betracht gezogen, dass die wässrige Phase aus einer organischen Extraktion mit einer alkalischen Protease behandelt werden könnte, worauf ein Reinigungsverfahren unter Einsatz eines Silicateilchens erfolgt.

**[0050]** Die vorliegende Erfindung wird weiters durch die folgenden Beispiele illustriert. Diese Beispiele sollen die Erfindung illustrieren, sind jedoch nicht als Einschränkung oder Begrenzung des Schutzzumfangs dieser Erfindung zu sehen.

### BEISPIELE

**[0051]** Die nachstehenden neun Beispiele veranschaulichen entweder eine der bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens zum Isolieren von DNA dieser Erfindung, oder sie analysieren die isolierten Produkte einer oder mehrerer Ausführungsformen der bevorzugten Verfahrensform, die nachstehend dargestellt wird. Sofern nicht anders angegeben, verwendeten alle Verfahren, die zum Isolieren von Plasmid-DNA in den nachstehenden Beispielen eingesetzt wurden, eine Harzmatrix aus Silicateilchen, die in eine Membran eingebettet waren, insbesondere ein Paar an SPEC™-Silicafilterscheiben, die am Boden einer Zentrifugationssäule angeordnet wurden, die ausreichend klein war, um in ein 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen zu passen. Diese spezifische Anordnung von Silicafilterscheiben und einer Zentrifugationssäule wird hierin nachstehend als ein „Zentrifugationskorb“ oder als ein „Korb“ bezeichnet.

**[0052]** Die ersten vier nachstehenden Beispiele veranschaulichen die Wirkung des Isolierens eines spezifischen Nucleinsäurematerials, Plasmid-DNA, aus zwei unterschiedlichen end-A<sup>+</sup>-Stämmen von E.coli-Bakterien, LE392 und Y1090, unter Einsatz unterschiedlicher Mengen an alkalischer Protease. Alle Beispiele setzten zuvor beschriebene Zentrifugationskörbe ein, um das Nucleinsäurematerial von Interesse nach einem anfänglichen alkalischen Lyseschritt, der mit oder ohne alkalische Protease erfolgt, zusätzlich zu isolieren. Außer wenn es nachstehend angegeben wird, waren alle in diesen ersten vier Beispielen eingesetzten Lösungen Komponenten der Wizard™-Plus-DNA-Purification-Systems-Sets, die bei Promega Corporation erhältlich sind. Es wurde beobachtet, dass die Menge an isolierter geschützter Plasmid-DNA aus den ersten Beispielen mit der Menge an alkalischer Protease, die eingesetzt wurde, um Nucleasen im alkalischen Lyseschritt des hierin eingesetzten, spezifischen Isolationsverfahrens zu verdauen, anstieg.

**[0053]** Alkalischer-Protease-Rest wurde in Beispiel 5 in Proben von Plasmid-DNA analysiert, die unter Einsatz überschüssiger Mengen an alkalischer Protease im alkalischen Lyseschritt isoliert wurde. Die Mengen an restlicher Protease war im Vergleich zur zugesetzten Menge äußerst gering, wobei nur etwa 1/10.000 der zugesetzten Menge in die Endlösung isolierter Plasmid-DNA übertragen wurde.

**[0054]** Beispiel 6 beschreibt die Aktivitätstests der alkalischen Protease, die im nächsten Beispiel eingesetzt wurden. Im nächsten Beispiel, Beispiel 7, wurden verdünnte alkalische-Protease-Lösungen, entweder Lösungen verdünnter Stammlösungen von Proteasen oder Lösungen von Protease-kontaminierten Lösungen von isolierter Plasmid-DNA, getestet, um herauszufinden, ob die Proteasen in den Lösungen durch Erhitzen auf 67°C inaktiviert werden konnten. Das Erhitzen auf diese Temperatur für nur fünf Minuten zeigte, dass die alkalischen Proteasen in beiden Lösungstypen, den verdünnten Stammlösungen oder den kontaminierten Plasmid-DNA-Lösungen, inaktiviert wurden.

**[0055]** Die letzten zwei DNA-Isolations- und -Analysebeispiele beschreiben Tests zur Identität und funktionellen Reinheit von Plasmid-DNA, die unter Einsatz von alkalischer Protease gemäß dem Verfahren aus den Beispielen 1 und 2 isoliert wurde. Im ersten der letzten beiden Beispiele, Beispiel 8, wurden Proben isolierter Plasmid-DNA unter Einsatz von automatisierten Fluoreszenz-Sequenzieren sequenziert, ein Sequenzier-Verfahren, das für seine Empfindlichkeit auf Kontaminanten in einer Probe bekannt ist. Dieser Test zeigte, dass die Sequenz der isolierten Plasmid-DNA der Sequenz der Plasmid-DNA entspricht, die eingesetzt wurde, um die Bakterienzellen zu transformieren, aus denen die DNA isoliert wurde, wodurch die Identität der isolierten DNA

bestätigt wurde. Die hohe Qualität der resultierenden Sequenzierungsdaten bewiesen weiters die funktionelle Reinheit der isolierten DNA.

**[0056]** Das letzte Beispiel, Beispiel 9, zeigte, dass isolierte Plasmid-DNA, die ein Gen von Interesse enthält, in Gewebekulturzellen transfiziert und dass das Gen darin erfolgreich exprimiert werden kann. In diesem Beispiel wurde ein Plasmid, das ein Luciferase-Gen enthielt, in zwei unterschiedliche Gewebekulturzelllinien transfiziert, wobei eine aus menschlichem Karzinomgewebe und die andere aus einem Hamsterovarium gewonnen wurde. Nur Zellen, die mit Plasmid transfiziert waren, konnten Luciferase produzieren, da Luciferase kein Protein ist, das von einer der getesteten Zelllinien natürlich produziert wird. Luciferase ist das Enzym, das bekanntlicherweise der Hauptgrund dafür ist, dass Schwänze von Glühwürmchen glühen. Das Luciferase-Gen ist ein beliebtes Reportergen, da seine Expression in den meisten Organismen leicht mittels eines Luminometers detektiert und quantifiziert werden kann. Luciferase-Genexpression wurde in beiden Sets von Gewebekulturzellen, die mit isolierter Plasmid-DNA transfiziert waren, nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die gemäß dem Verfahren dieser Erfindung isolierte DNA ausreichend intakt und frei von Kontaminanten ist, um Gewebekulturzellen erfolgreich zu transfizieren.

**[0057]** Beispiel 10 veranschaulicht eine Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung, in der das Verfahren eingesetzt wird, um eine Nucleinsäurelösung zu behandeln, die ein Nucleinsäurematerial und Proteine enthält.

**[0058]** Beispiel 11 beschreibt den Einsatz des Verfahrens dieser Erfindung, um eine wässrige Lösung von RNA, die aus einem biologischen Material extrahiert wurde, zu produzieren und zu behandeln.

**[0059]** Beispiel 12 veranschaulicht den Einsatz einer Silica-Harzmatrix, um RNA aus der wässrigen Lösung von RNA, die in Beispiel 11 produziert und behandelt wurde, zu isolieren.

**[0060]** Detaillierte Beschreibungen all dieser Beispiele werden nachstehend bereitgestellt.

#### BEISPIEL 1 – HERSTELLUNG EINES GEKLÄRTEN LYSATS

**[0061]** Das bestimmte Plasmid dieses Beispiels, Plasmid pGEM® 3Zf(+), wurde aus end-A<sup>+</sup>-Stämmen von E.-coli-Bakterien isoliert. Zwei solcher Stämme, Y1090 und LE392, wurden mit diesem Plasmid transformiert und getrennt voneinander in einer Übernacht-Kultur von 2 × YT + 1% Glucose + Ampicillin heranwachsen gelassen, einem reichen kompletten Medium, das die Produktion von Endonuclease im Vergleich mit Standardmedien, wie Luria-Kulturlösung (Luria Broth, LB) oder einem Minimalmedium, erhöht. Die Bakterienzellen wurden dann durch Zentrifugieren geerntet, in Suspensionslösung bei einem Verhältnis von 0,25 ml Suspensionslösung zu einem Äquivalent von 10 ml Kultur resuspendiert, und je 250 µl wurden in jede einzelne von mehreren Zentrifugalröhrchen aliquotiert.

**[0062]** Die resuspendierten Zellen bildeten eine gleichförmige, trübe Lösung in jedem Röhrchen. Die Zusammensetzung der Suspensionslösung war: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; und 100 µg/ml RNase A. Die Anzahl der Aliquoten von resuspendierten Zellen variierte je nach Anzahl der in den nachstehenden Beispielen durchzuführenden Tests.

**[0063]** 250 µl einer alkalischen Zelllyselösung wurde den suspendierten Zellen zugesetzt und mit den Zellen durch Umdrehen vermischt, wodurch die Lösung innerhalb von 1–5 Minuten klar wurde (was die Bildung eines Lysats anzeigt). Die Zusammensetzung der zugesetzten Lyselösung war 0,2 M NaOH und 1% SDS. Das resultierende Lysat wies einen pH von etwa 10 auf.

**[0064]** 10 µl einer alkalischen Proteaselösung oder 10 µl alkalischer-Protease-Verdünnungspuffer wurden jeder der Lysatproben zugesetzt. Die Zusammensetzung des Verdünnungspuffers war 25% 1,2-Propandiol, 3,2% Natriumborat bei einem pH von 6,3. Verschiedene Konzentrationen an alkalischer Protease wurden an dieser Stelle des Verfahrens für die zugesetzte alkalische Proteaselösung eingesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen sind in den nachstehenden folgenden Beispielen angegeben. Die Proteaselösungen wurden durch Verdünnen einer Stammlösung einer alkalischen Protease hergestellt, die aus *B. licheniformis* im oben genannten Verdünnungspuffer isoliert wurden. Die in diesem und in den folgenden Beispielen eingesetzte alkalische Protease wurde bei Valley Research, South Bend, Indiana, USA (Produkt-Nr. APL660), erworben. Wurden die 10 µl alkalische Protease oder Verdünnungspuffer einmal zugesetzt, wurde das Lysat durch Umdrehen vermischt, und das resultierende Gemisch wurde 5 Minuten lang bei etwa Raumtemperatur inkubiert.

**[0065]** Der pH des Gemischs wurde durch Zusatz von 350 µl einer sauren neutralisierenden Lösung in jedes Röhrchen mit dem Gemisch und durch Vermischen durch Umdrehen gesenkt. Ein Niederschlag wurde gebildet, der das Gemisch trüb erscheinen ließ. Die Zusammensetzung der sauren neutralisierenden Lösung war: 4 M Guanidin-Hydrochlorid; 0,759 M Kaliumacetat; 1,62 M Eisessig bei einem pH von 4,2. Das trübe Lysatgemisch wurde in einer Mikrozentrifuge 10 Minuten lang bei Raumtemperatur bei  $14.000 \times g$  zentrifugiert, wodurch ein geklärtes Lysat mit einem Niederschlag-Pellet am Boden und den Wänden des Röhrchens gebildet wurde.

#### BEISPIEL 2 – ISOLIEREN VON PLASMID-DNA AUS EINEM GEKLÄRTEN LYSAT

**[0066]** Ein Zentrifugationskorb wurde in ein 2-ml-Sammelröhrchen für jede zu testende Probe gegeben. Das geklärte Lysat wurde mittels einer Pipette in den Zentrifugationskorb übertragen. Der Korb wurde anschließend bei  $14.000 \times g$  in einer Mikrozentrifuge 1 Minute lang bei Raumtemperatur zentrifugiert, was das geklärte Lysat dazu brachte, durch die mit Silica imprägnierte Membrankomponente des Zentrifugationskorbs durchzudringen. Der Korb wurde dann entfernt, die in dem Sammelröhrchen gesammelte Lösung verworfen und der Korb in dasselbe Sammelröhrchen wieder eingeführt.

**[0067]** Die Inhalte der Körbe wurden zweimal mit einer Waschlösung gewaschen, wobei die Waschlösung aus 0,01 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5) und 80% Ethanol bestand. Im ersten Waschschrift wurden dem Korb 750 µl Waschlösung zugesetzt, und die Korb/Röhrchen-Kombination wurde bei  $14.000 \times g$  in einer Mikrozentrifuge 1 Minute lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die in dem Sammelröhrchen gesammelte Lösung wurde wie zuvor verworfen. Im zweiten Waschschrift wurde unter Einsatz von 250 µl der Waschlösung dasselbe Verfahren wiederholt.

**[0068]** Der Korb wurde dann in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen transfiziert, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, dass keine Waschlösung mit dem Korb übertragen wurde. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Harz im Korb durch Zusatz von 100 µl Nuclease-freiem Wasser und einminütiges Zentrifugieren der Probe bei  $14.000 \times g$  in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur eluiert. Die Korbordnung wurde dann aus dem Röhrchen entfernt und verworfen. Das Röhrchen mit isolierter Plasmid-DNA wurde abgeschlossen und bei  $+4^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen, bis sie in den in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Tests eingesetzt wurden.

#### BEISPIEL 3 – TESTEN VON ALKALISCHEN-PROTEASE-KONZENTRATIONEN, DIE PLASMID-DNA SCHÜTZEN

**[0069]** In diesem Beispiel wurden verschiedene Mengen an alkalischer Protease im alkalischen Lyseschrift des Verfahrens zur Produktion geklärten Lysats aus Beispiel 1 eingesetzt. Das Isolationsverfahren aus Beispiel 2 wurde dann eingesetzt, um Plasmid-DNA aus dem geklärten Lysat zu isolieren. Die resultierenden Lösungen von isoliertem Nucleinsäurematerial wurden getestet, um Folgendes zu bestimmen: (1) ob die Plasmid-DNA in der Lösung signifikant genickt oder abgebaut war, und (2) ob die Lösung Nucleasen enthielt, die die Plasmid-DNA nach Übernacht-Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  in  $1 \times$  -Kernpuffer nicken oder abbauen würden.

**[0070]** Die Kernpufferlösung, die in diesem Beispiel eingesetzt wurde, hatte zum Zweck, Enzymaktivität, umfassend die Aktivität von Nucleasen wie z. B. Endonuclease I, zu erleichtern. Die Zusammensetzung des eingesetzten  $1 \times$  -Kernpuffers war wie folgt: 25 mM Tris-Acetat mit pH 7,8 (bei  $25^{\circ}\text{C}$ ), 100 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT. Der  $10 \times$  -Kern, der zur Erzeugung dieser  $1 \times$  -Lösung eingesetzt wurde, wurde bei Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA, erworben.

**[0071]** Gel-Elektrophorese wurde eingesetzt, um zu bestimmen, ob die Plasmid-DNA aus den beiden zuvor beschriebenen Tests abgebaut oder genickt war. Nachstehend wird eine detaillierte Beschreibung der in diesem Beispiel durchgeführten Tests gegeben.

**[0072]** Plasmid pGEM<sup>®</sup> 3Zf(+) wurde aus dem E.-coli-Stamm LE392 (end-A+) in zweifacher Ausführung für Präparate isoliert, die 10 µl Proteaselösungen einsetzten, die Folgendes enthielten: 3,7 mg Protease/ml (Proben A1 und A2); 470 µg Protease/ml (Proben B1 und B2); 58,5 µg Protease/ml (Proben C1 und C2); und 0 µg Protease/ml (d. h. Verdünnungspufferkontrolle) (Proben D1 und D2). Die DNA wurde gemäß dem in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Verfahren isoliert.

**[0073]** Detektion von Endonucleaseaktivität in den End-DNA-Präparaten wurde durch Aliquotieren von 15 µl DNA in jeden der zwei getrennten Container, um sie als Duplikatproben einzusetzen, und durch Zusetzen von

2 µl von 10 × Kernpuffer zu einer der Duplikatproben durchgeführt. Die Proben wurden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert, wonach sie auf einem 1%igen Agarosegel in Tris-Acetat-EDTA-(TAE-)Elektrophoresepuffer, der 0,5 mM Iodpropylthiazol-Orange (IPTO), einen fluoreszierenden, Nucleinsäure färbenden Farbstoff, enthielt, fraktioniert wurden. Nach dem Fraktionieren wurde das Gel dann mittels eines Fluorimager (Molecular Dynamics) gescannt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. [Fig. 1](#) ist eine Kopie des vom Scan dieses Gels produzierten Bilds.

**[0074]** Die Gegenwart von intakter Plasmid-DNA auf einem Elektrophoresegel wird durch eine Bande super-spiralisierter DNA angezeigt, die schneller wandert als die Dimer-, genickte Monomer- oder genickte Dimerbanden, die häufig in Plasmid-DNA-Präparaten zu finden sind. Zusätzliche Banden können manchmal auch in Plasmid-DNA-Präparaten gefunden werden, die langsamer wandern als jegliche beliebige Dimer- oder Monomerbande, die Multimeren und genickten Multimeren entsprechen. Das Gelbild aus [Fig. 1](#) ist so angeordnet, dass die am schnellsten wandernden Banden näher am unteren Rand der Seite liegen als die langsamer wandernden Banden. Der Abbau von Plasmid-DNA in allen der zuvor beschriebenen Formen wird in solch einem Gelbild durch das völlige Verschwinden von oder den Rückgang der Intensität in einer oder mehreren dieser Banden im Vergleich mit einer Probe einer intakten DNA und/oder durch das Auftreten von Schmierbanden unter den Hauptbanden, die die Gegenwart von abgebauter Plasmid-DNA mit niedrigerem Molekulargewicht anzeigen, aufgezeigt.

**[0075]** [Fig. 1](#) zeigt die Ergebnisse der Duplikattests, die an den Proben von wie zuvor beschrieben isolierter Plasmid-DNA (Proben A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 und D2) durchgeführt wurden. Im Spezifischen ist [Fig. 1](#) eine Kopie des Bildes, das durch Scannen des Elektrophoresegels produziert wurde, das eingesetzt wurde, um die Duplikatproben (A1, A2 usw.) zu fraktionieren, in denen kein Kernpuffer zugesetzt wurde (angegeben durch ein „-“-Symbol nach der Probennummer), und dies neben einer Probe, die mit Kernpuffer inkubiert wurde (angegeben durch ein „+“-Symbol nach der Probennummer).

**[0076]** Bei Untersuchung von [Fig. 1](#) zeigt sich, dass intakte Plasmid-DNA aus jeder der bearbeiteten Kultur-Aliquoten gewonnen wurden (d. h. die Proben, die mit einem „-“-Symbol in der Fig. bezeichnet sind). [Fig. 1](#) zeigt auch, dass die Plasmid-DNA in den Duplikatproben, die in Gegenwart von Kernpuffer, der nicht mit Protease behandelt wurde (Proben D1+ und D2+), inkubiert wurden, völlig abgebaut wurde. Inkubierte Proben, die während der Isolation mit der größten Menge an Protease behandelt wurden (Proben A1+ und A2+), zeigten keine Spur von Abbau, wobei jene, die mit einer mittleren Menge an Protease behandelt wurden (Proben B1+ und B2+), ein signifikantes Ausmaß an Abbau aufweisen und jene, die mit der geringsten Menge an Protease behandelt wurden (Proben C1+ und C2+), völlig abgebaut wurden.

**[0077]** Dieses Beispiel zeigt, dass alkalische Protease eingesetzt werden kann, um den Abbau isolierter Plasmid-DNA zu unterbinden, sofern sie dem alkalischen Lysat während des Isolierens der DNA zugesetzt wird. Es zeigt weiters, dass die Menge an zugesetzter Protease empirisch für jede Protease unter Einsatz eines Schutztestverfahrens, wie es zuvor beschrieben wurde, bestimmt werden muss. Wurde solch eine Bestimmung erst einmal durchgeführt und sind die Konzentrationen an Protease, die die DNA schützen, bestimmt, ist es nicht mehr notwendig, das Experiment zu wiederholen, solange die Aktivität der Protease und das Reinigungsverfahren unverändert bleiben. Dieses Beispiel zeigt, dass optimaler Schutz von Plasmid-DNA unter Einsatz des zuvor beschriebenen Isolationsverfahrens erhalten werden kann, sofern zumindest etwa 10 µl einer Lösung von zumindest etwa 3,7 mg/ml alkalischer Protease im alkalischen Lyseschnitt zugesetzt wird.

#### BEISPIEL 4 – ALKALISCHE PROTEASESCHUTZTESTS AN UNTERSCHIEDLICHEN E.-coli-STÄMMEN

**[0078]** Plasmid pGEM® 3Zf(+) wurde von einem unterschiedlichen end-A+-Stamm von E. coli, Y1090, unter Einsatz desselben Verfahrens und derselben alkalischen Proteasekonzentrationen wie in Beispiel 3 isoliert und auf Endonuclease-Kontamination wie oben getestet.

**[0079]** Die Ergebnisse dieses Tests sind aus [Fig. 2](#) deutlich ersichtlich, die ein Elektrophoresegel zeigt, das wie in Beispiel 3 hergestellt, laufen gelassen und gescannt wurde. Die Proben wurden mit derselben „+/-“-Nomenklatur versehen, die wie in [Fig. 1](#) Inkubation mit oder ohne Kernpuffer oder Inkubation mit Wasser bezeichnet. Auch ein Proben-Nummerierungssystem, das dem aus [Fig. 1](#) ähnlich ist, wurde eingesetzt, wobei Proben E1 und E2 den Zusatz von 10 µl alkalischer Proteaselösung angeben, die 3,7 mg Protease/ml enthielten, Proben F1 und F2 den Einsatz einer Protease-Lösung mit 470 µg Protease/ml angeben, Proben G1 und G2 den Einsatz einer Protease-Lösung mit 58,5 µg Protease/ml angeben und Proben H1 und H2 keinen Zusatz alkalischer Protease (d. h. 0 µg Protease/ml) angeben.

**[0080]** Wie in Beispiel 3 wurde intakte Plasmid-DNA aus jeder getesteten Probe gereinigt. Auch wie in Beispiel 3 wurde die Plasmid-DNA in den Proben, die mit Kernpuffer inkubiert wurden, in den Wasserkontrollen, wo keine alkalische Protease zugesetzt wurde (H1+ und H2+), und in den Proben mit der geringsten zugesetzten Menge an Protease (G1+ und G2+) völlig abgebaut. Die Plasmid-DNA wurde in den Proben mit einer mittleren Menge an zugesetzter Protease (F1+ und F2+) etwas geschützt. Kein Abbau wurde in den Proben mit der größten Menge an zugesetzter Protease (E1+ und E2+) beobachtet.

**[0081]** Daraus kann man in diesem Beispiel schließen, dass eine Proteaselösung, die zumindest etwa 3,7 mg Protease/ml enthält, eingesetzt werden kann, um gemäß dem Verfahren aus den Beispielen 1 und 2 isolierte Plasmid-DNA vor Abbau durch Nucleasen zu schützen, besonders wenn die DNA aus einem Bakterien-end-A+-Stamm isoliert wird.

#### BEISPIEL 5 – TEST DER ALKALISCHEN-PROTEASE-ÜBERTRAGUNG IN DNA-PRÄPARATEN

**[0082]** In diesem Beispiel wurde Plasmid-DNA aus einem end-A+-Stamm von E. coli unter Einsatz konzentrierter Lösungen alkalischer Protease im Verfahren von Beispiel 1 isoliert, um ein geklärtes Lysat herzustellen, und im Verfahren von Beispiel 2, um die Plasmid-DNA aus dem Lysat zu isolieren. Ein Überschuss an alkalischer Protease wurde im Isolationsverfahren der zwei vorangehenden Beispiele eingesetzt, um zu bestimmen, ob die unter solchen Bedingungen isolierte Plasmidlösung aktive alkalische Protease enthält.

**[0083]** Plasmid pGEM® 3Zf(+) wurde vom E.-coli-Stamm LE392 (end-A+) in fünffacher Ausführung für Präparate isoliert, die 10 µl Proteaselösungen einsetzten, die 15 mg Protease/ml, 10 mg Protease oder 7,5 mg Protease/ml enthielten. Ein viertes Dreifachset an Proben wurde ohne Zusatz von alkalischer Protease als Kontrolle eingebunden. Die DNA wurde unter Einsatz des oben in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Verfahrens isoliert.

**[0084]** Die Menge an alkalischer Protease in der End-DNA-Lösung wurde durch Zusatz jeweils der Hälfte der isolierten DNA-Lösung zu einem Reaktionsgemisch, das ein kolorimetrisches Substrat für alkalische Protease enthielt, und durch Bestimmen der Absorption der Lösung bei 410 nm im Laufe der Zeit bestimmt. Die Steigerungsrate der Absorption bei 410 nm wurde dann mit einer Kalibrationskurve verglichen, die durch Messen der Absorption von alkalischen Proteaselösungen bekannter Zusammensetzung, die Mengen an alkalischer Protease im Bereich von 0 bis 25 ng Protease pro Test enthielten, konstruiert wurde. Die Steigerungsrate der Absorption in den Kalibrationslösungen erwies sich im Verhältnis zur Steigerung des Ausmaßes der Proteasekonzentration linear. Daher wurde die Menge der Protease in den Proben von isolierten DNA-Präparaten von der Geschwindigkeit der Farbbildung, die für diese Proben bestimmt wurde, extrapoliert. Die nachstehende Tabelle 1 gibt die Proteasekonzentrationen, die in den Präparaten gefunden wurde, und das Verhältnis der gefundenen Protease zur während der DNA-Isolation zugesetzten Protease an.

TABELLE 1

<u>Konzentration der</u> <u>Proteaselösungen</u>	<u>gesamte zugesetzte</u> <u>Protease</u>	<u>durchschnittliche</u> <u>verbleibende</u> <u>Protease</u>	<u>Verhältnis von</u> <u>verbleibender zu</u> <u>zugesetzter Protease</u>
0 mg/ml	0 ng	0 ng	N / A
7,5 mg/ml	75.000 ng	2,0 ng	0,0000266
10 mg/ml	100.000 ng	4,13 ng	0,0000413
15 mg/ml	150.000 ng	7,75 ng	0,0000516

**[0085]** Es wurde erkannt, dass nur eine sehr geringe Menge der überschüssigen Mengen zugesetzter Protease, d. h. weniger als etwa 0,01%, in die Lösungen von isolierter Plasmid-DNA, die in diesem Beispiel produziert wurden, übertragen wurde.

#### BEISPIEL 6 – VERFAHREN ZUM TESTEN DER AKTIVITÄT ALKALISCHER PROTEASE

**[0086]** Dieses Beispiel beschreibt das Verfahren, das eingesetzt wurde, um die Aktivität alkalischer Protease

in den hierin dargebrachten Beispielen zu testen. Die in den Beispielen eingesetzte alkalische Protease, eine von *B. licheniformis* isolierte Protease, spaltet Proteine an hydrophoben Resten, wobei sie solche Reste beträchtlich schneller spaltet als Proteinmoleküle an hydrophilen oder geladenen Resten. Dieser Test profitiert von der Spezifität des Enzyms und einem im Handel erhältlichen Substrat für solche Proteasen, um die Menge der Protease in Lösung zu bestimmen.

**[0087]** Zweck dieses Tests ist es, zur Messung der Aktivität von alkalischer Protease oder stark verdünnter Lösungen der Protease eingesetzt zu werden. Er erfordert den Einsatz eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts und benötigt für seine Durchführung 1–3 Stunden. Der Test ist sehr empfindlich und kann so geringe Mengen wie 1 ng alkalische Protease/ml Lösung messen.

### 1. Materialien

- 0,5 M Tris-HCl, pH von 9,0, bei Raumtemperatur
- 20 mg/ml Ala-Ala-Phe-p-nitroanilid, Sigma Produkt A-9148 oder ein Äquivalent, das in Dimethylformamid gelöst ist
- 50 mM Natriumphosphat, pH 5,0
- Mikrotiterplatten mit klarem flachem Boden
- Mikrotiterplatten-Lesegerät, das in der Lage ist, Absorption im Bereich von 380–410 nm Wellenlänge zu lesen

### 2. Verfahren

- a. Ein Testlösungsgemisch wird hergestellt. Ein ml der Lösung wird durch Zusatz von 10 µl der Dimethylformamid-Lösung zu 990 µl des 0,5-M-Tris-HCl-Puffers erzeugt. 200 µl der Testlösung werden in jeden Well platziert, um beobachtet zu werden. Das Reagens wird bei allen Proben, Standards und Blindproben benötigt.
- b. Protease-Standards werden hergestellt. Die Menge der Übertragung alkalischer Protease ist üblicherweise sehr gering, sodass die Standards üblicherweise im Bereich von etwa 0 bis etwa 10 ng/Well liegen. Die Standards können durch Verdünnen einer Stammlösung alkalischer Protease in 50 mM Natriumphosphat, pH 5,0, hergestellt werden.
- c. Die Proben von DNA-Präparaten und Standards werden in die Wells gegeben, und die Platte wird mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts bei 410 nm gelesen.

**[0088]** Es ist nicht entscheidend, dass alle Tests zur gleichen Zeit begonnen werden. Das wirksamste Verfahren zur Durchführung des Tests reiht alle Tests nebeneinander auf und liest die Platte sehr knapp nach dem letzten Zugeben ab. Die Werte der ersten Lesung sind als Werte für den Nullpunkt zu verwenden, und die Platte ist 30–120 Minuten später noch einmal abzulesen, wodurch die Absorptionsdifferenz in den Wells bestimmt wird.

### BEISPIEL 7 – INAKTIVIERUNG DES ALKALISCHEN-PROTEASE-RESTS IN DEN DNA-PRÄPARATEN

**[0089]** Es kann manche Anwendung geben, in denen sogar sehr geringe Mengen an alkalischer Protease in den End-DNA-Präparaten, wie z. B. die zuvor in Beispiel 5 beobachteten Mengen, den Einsatz der isolierten DNA beeinträchtigen würde. Für solche Anwendungen würde es nützlich sein, ein einfaches und rasches Verfahren zur Verfügung zu haben, um die Proteaseaktivität im Präparat völlig auszuschalten. Dieses Beispiel zeigt die Wirksamkeit eines solchen Verfahrens zum Inaktivieren verbleibender alkalischer Protease, d. h. durch Erhitzen der Probe.

**[0090]** Um die Mindestzeit zu bestimmen, die erforderlich ist, um alkalische Protease, die in eine isolierte Plasmid-DNA-Lösung übertragen wurde, zu inaktivieren, wurden mehrere der Proben alkalischer Protease, die isolierte Plasmid-DNA-Lösungen aus Beispiel 5 (s. o.) enthielten, für weitere Tests gesammelt. Die einzelne Probe aus gesammeltem Material wurde gut vermischt und in fünf neue Proben für weitere Tests aufgeteilt, wie nachstehend noch beschrieben wird. Ein zweites Set an fünf Kontrollproben wurde ähnlich durch Sammeln und Trennen der verdünnten Stammlösungen, die in Beispiel 5 eingesetzt wurden, gewonnen. Die fünf Test- und fünf Kontrollproben wurden verschiedene Zeitspannen lang auf 67°C erhitzt, wobei eine eines jeden Sets der Proben 0, 3, 5, 7 und 9 Minuten lang erhitzt wurde. Nach dem Erhitzen wurde jede Probe auf alkalische-Protease-Aktivität, wie zuvor in Beispiel 5 oben beschrieben wurde, getestet.

**[0091]** [Fig. 3](#) zeigt die relative Aktivität alkalischer Protease, die in jeder der vier Testproben verblieb, die

durch Sammeln und anschließendes Erhitzen der Aliquoten der isolierten DNA-Proben aus obigem Beispiel 5 erzeugt wurden. [Fig. 4](#) zeigt die relative Aktivität alkalischer Protease, die in den Kontrollproben verblieb, die durch Erhitzen einer Lösung alkalischer Protease, die in Beispiel 5 eingesetzt wurde, erzeugt wurden. Beide Fig. zeigen, dass die Aktivität alkalischer Protease nach nur drei Minuten Erhitzen auf 67°C um zumindest 50% ihres ursprünglichen Werts reduziert war, unabhängig davon, ob die Protease in einer isolierten DNA-Probe oder in einer verdünnten Stammlösung von Protease vorhanden war. Beide Fig. zeigen auch, dass die alkalische-Protease-Aktivität in den hierin getesteten Proben nach 5 Minuten Erhitzen auf 67°C im Wesentlichen nicht mehr nachzuweisen war. Die zwei Fig. ([Fig. 3](#) und [Fig. 4](#)) sind einander sehr ähnlich, was darauf hinweist, dass keines der in der Lösung isolierter DNA vorhandenen Materialien, die in den Proteasekontrollen nicht vorhanden sind, eine nennenswerte Auswirkung auf die Stabilität oder Instabilität der alkalischen Protease in dieser Lösung hatten.

**[0092]** Dieses Beispiel zeigt, dass im Wesentlichen die gesamte proteolytische Aktivität in einer Probe isolierter Nucleinsäure durch Erhitzen der Lösung für 5 Minuten oder länger auf 67°C ausgeschaltet werden kann. So kann, wenn für den Benutzer auch geringe Mengen an verbleibender Protease von Bedeutung sind, die verbleibende Proteaseaktivität in der Probe durch solche Wärmeinaktivierung entfernt werden.

#### BEISPIEL 8 – FLUORESZENZ-SEQUENZIEREN ISOLIERTER PLASMID-DNA

**[0093]** Dieses Beispiel beschreibt Ergebnisse, die durch den Einsatz von Fluoreszenz-Sequenzieren von Plasmid-DNA, die gemäß der Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung, die in den obigen Beispielen 1 und 2 beschrieben wird, isoliert wurde. Der Test untersucht die Sequenz der isolierten Plasmid-DNA, um sicherzustellen, dass die Sequenz während des Isolationsverfahrens nicht verändert oder abgebaut wurde. Fluoreszenz-Sequenzieren ist tendenziell gegenüber Kontaminanten in Lösung auch empfindlicher. Manche Kontaminanten können beispielsweise das Fluoreszenz-Signal eines oder mehrerer Farbstoffe, die zum Fluoreszenz-Sequenzieren eingesetzt werden, auslöschen, während andere Kontaminanten wie Nucleasen Matrizenstämmen oder kopierte Stämme von Nucleinsäuren verkürzen oder abbauen können, was zu starken Hintergrundsignalen und/oder ungenauen Ergebnissen führt.

**[0094]** In diesem Beispiel wurde Plasmid pGEM®-3Zf(+)-DNA aus 1,5-ml-Kulturen vom E.-coli-Stamm DH5α (ein end-A1-Stamm) in sechsfacher Ausführung für Präparate isoliert, die 10 µl einer Lösung alkalischer Protease einsetzte, die 15 mg/ml der in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Protease enthielt. Die Plasmid-DNA wurde mit Wasser eluiert. Aliquoten, die 1 µg gereinigter Plasmid-DNA enthielten, wurden durch Vakuum getrocknet und in 6 µl Wasser resuspendiert.

**[0095]** Sequenzierungsreaktionen wurden mit einem „Perkin Elmer/Applied Biosystems ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ mit AmpliTaq®-DNA-Polymerase, FS, wie im Herstellerprotokoll beschrieben wird (P/N 402113 Revision B, August 1995), durchgeführt. Dieses Set umfasst Ready Reaction Premixes (rasch reagierende Vorgemische), die Fluoreszenz-markierte Sequenzierungs-Primer, Nucleotide, Puffer und Sequenzierungs-Enzyme enthalten. Kurz zusammengefasst wurde 1 µl der Plasmidpräparate mit 4 µl des „A Ready Reaction Premix“ kombiniert. Eine zweite 1-µl-Aliquote wurde mit 4 µl des „C Ready Reaction Premix“ kombiniert.

**[0096]** Eine dritte 2-µl-Aliquote wurde mit 8 µl des „G Ready Reaction Premix“ kombiniert. Eine vierte 2-µl-Aliquote wurde mit 8 µl des „T Ready Reaction Premix“ kombiniert.

**[0097]** Die Proben wurden in einem Temperaturwechsler Perkin Elmer Model 9600 gemäß den Empfehlungen aus dem Herstellerprotokoll inkubiert (Perkin Elmer Protocol, Teil Nr. 402113, Revision B, August 1995). Das Wechselprofil setzte sich zusammen aus 96°C 10 Sekunden lang, dann 55°C 5 Sekunden lang, gefolgt von 70°C 60 Sekunden lang. Dieses Temperaturwechselprofil wurde 15 Zyklen lang wiederholt. Die Proben wurden dann 10 Sekunden lang 96°C und dann 60 Sekunden lang 70°C ausgesetzt. Dieses Temperaturwechselprofil wurde 15 Zyklen lang wiederholt. Die Proben wurden dann bei 4°C inkubiert, bis sie zur Konzentration fertig waren.

**[0098]** Die zyklisch durchgeführten A-, C-, G- und T-Reaktionen von jeder Probe wurden gesammelt und wie im zuvor zitierten Herstellerprotokoll beschrieben ausgefällt. Die Proben wurden einmal mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen und wie empfohlen kurz getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 6 µl Probe-Lade-puffer (5 Teile entionisiertes Formamid/1 Teil 25 mM EDTA, pH 8,0, mit 50 mg/ml Dextranblau) resuspendiert. Eine 1,5-µl-Aliquote jeder Probe wurde auf einem 4%igen Harnstoff/Polyacrylamid-Gel laufen gelassen, und Fluoreszenz-Signaldaten wurden während dieses Laufs mittels eines Fluoreszenz-DNA-Sequenzierers „Per-

kin Elmer/Applied Biosystems Model 377" gesammelt, wobei die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt wurden. Die Datensammlung erfolgte drei Stunden lang, wonach die Daten mit der veröffentlichten Sequenz von pGEM®-3Zf(+) verglichen wurden.

**[0099]** Alle sechs Proben brachten Sequenzdaten hervor, die bei über 500 Basen zu über 99% exakt waren, ohne dass jeglicher Versuch zur Aufhebung von Zweideutigkeiten unternommen wurde. Die resultierenden Sequenzdaten zeigten auch weder nachweisbaren Hintergrund noch fehlerhafte Banden auf, was darauf hinweist, dass die isolierten Proben von Plasmid-DNA nicht durch Nucleasen oder durch andere ähnliche zerstörende Kontaminanten kontaminiert waren, die die Qualität der Sequenzdaten negativ beeinflussen würden. Die nachstehende Tabelle 2 fasst die Genauigkeit der Ergebnisse der Fluoreszenz-Sequenzierung zusammen, die aus allen sechs Proben erhalten wurden, die wie zuvor beschrieben isoliert und analysiert wurden.

TABELLE 2

<u>Probe</u>	<u>Benennungsfehler und N</u> <u>für über 500 Basen</u>	<u>Genauigkeit</u> <u>in %</u>
1	4	99,2
2	1	99,8
3	3	99,4
4	2	99,6
5	1	99,8
6	3	99,4

**[0100]** Die mittlere Spalte aus obiger Tabelle 2 ist eine Liste der Häufigkeit, mit der der automatisierte Sequenzierer einen von zwei Fehlern machte. Der erste Fehler, der in der obigen Tabelle als „Benennungsfehler“ bezeichnet wird, tritt auf, wenn die Fluoreszenz-Sequenzierungsvorrichtung die Identität einer Base an einer bestimmten Position als das eine liest, wobei die tatsächliche Base, die man auf Grundlage der bekannten Plasmidsequenz an dieser Position zu finden erwartet, eine andere ist. Der andere dieser zwei Fehler tritt auf, wenn die Fluoreszenz-Sequenzierungsvorrichtung nicht in der Lage ist, die Identität einer Base an einer bestimmten Stelle zu bestimmen, wobei hierbei die Vorrichtung die Base als unbekannt liest und an diesem Punkt ein „N“ anstelle einer Base einfügt.

#### BEISPIEL 9 – EINSATZ VON ISOLIERTER PLASMID-DNA BEI TRANSFEKTION

**[0101]** Dieses Beispiel zeigt, dass das Verfahren dieser Erfindung eingesetzt werden kann, um DNA mit Transfektionsqualität zu produzieren. In diesem Beispiel wurde pGL3-Kontrollplasmid-DNA, die bei Promega Corporation im Handel erhältlich ist, von E.-coli-DHS- $\alpha$ -Bakterienzellen (einem endA1-Stamm) isoliert und eingesetzt, um zwei verschiedene Arten von Säugetierzellkulturen, Chinahamster-Eierstockzellen (CHO-Zellen) und eine Kultur menschlicher Zervikal-Krebszellen (HeLa-Zellen), zu transfizieren. Zwei unterschiedliche Varianten des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wurden eingesetzt, um Plasmid-DNA zu isolieren, wobei sich beide von den in den obigen Beispielen 1 und 2 verwendeten geringfügig unterscheiden. Wie das Verfahren der obigen Beispiele 1 und 2 setzt das vorliegende Beispiel eine Behandlung mittels alkalischer Protease und eine Harzmatrix aus Silicateilchen, die an eine Membrankomponente einer Zentrifugationskorbanordnung gebunden sind, ein, um Plasmid-DNA zu isolieren. Die hierin eingesetzten, spezifischen Isolationsverfahren werden im nachstehenden ersten Abschnitt erläutert.

**[0102]** Nur hoch gereinigte DNA kann Gewebekulturzellen wirksam transfizieren, sodass die Zellen Proteine produzieren, die durch die Gene der DNA kodiert werden, die zum Transfizieren der Zellen eingesetzt wurde. Insbesondere zwei Faktoren können die Fähigkeit einer Lösung der Ziel-DNA beeinflussen, die Gewebekulturzellen zu transfizieren. Der erste ist die Reinheit der Lösung. Kontaminanten in der Lösung können Zelltod herbeiführen oder die Aufnahme von Ziel-DNA durch die Zellen unterbinden. Der zweite Faktor ist der Abbau der Ziel-DNA, wie beispielsweise der Abbau durch Nuclease. Um sicherzustellen, dass eine DNA-Lösung ausreichende Reinheit aufweist und ausreichend intakt ist, um für Transfektionen eingesetzt werden zu können, wird

üblicherweise ein langes, gefährliches und mühsames Zweifach-Cäsiumchlorid-(2 × CsCl-)Gradienten-Zentrifugationsisoliationsverfahren eingesetzt (siehe z. B. Current Protocols in Molecular Biology 9.1.1). Das herkömmliche 2 × -CsCl-Gradientenverfahren benötigt über 48 Stunden, um vollständig durchgeführt zu werden, und setzt toxische Chemikalien, wie z. B. ein potentes Mutagen, Ethidiumbromid, ein. Im Gegensatz dazu benötigt das in diesem Beispiel eingesetzte Verfahren weniger als zwei Stunden und setzt relativ ungefährliche Chemikalien ein.

#### A. Herstellung von Plasmid-DNA-Proben

**[0103]** Vier Proben von pGL3-Plasmid-DNA wurden von E.-coli-DH5- $\alpha$ -transformierten Zellen für den Einsatz im Transfektionsverfahren, das nachstehend erläutert wird, hergestellt. Die ersten drei Proben wurden unter Einsatz des nachstehend beschriebenen alkalischen-Proteaseverfahrens hergestellt, wonach entweder Konzentration durch Ausfällung mit Alkohol (Probe 1) oder weitere Isolation und Konzentration (Proben 2 und 3) folgten. Die vierte Probe (Probe 4) wurde unter Einsatz des herkömmlichen 2 × -CsCl-Gradienten-Zentrifugationsverfahrens, das zuvor beschrieben wurde, produziert.

**[0104]** Das allgemeine Isolationsverfahren, das eingesetzt wurde, um die Plasmidlösung der Proben 1–3 zu produzieren, verlief wie folgt:

1. Eine Kultur von (E. coli) DH5  $\alpha$ , transformiert mit pGL3-Plasmid-DNA, wurde durch Züchten eines Kulturinokulums in LB-Medium über Nacht hergestellt.
2. Das Äquivalent von 3 ml der Übernacht-Kultur wurde zentrifugiert, und die Zellpellets wurden in 200  $\mu$ l Resuspensionslösung, derselben Resuspensionslösung wie zuvor in Beispiel 1, resuspendiert.
3. Die Zellen wurden durch Zusetzen von 200  $\mu$ l Lysetösung in jedes Röhrchen resuspendierter Zellen und Vermischen der resultierenden Lysatlösung durch Umdrehen lysiert.
4. 10  $\mu$ l einer 65-mg/ml-Lösung alkalischer Protease wurden jedem Röhrchen mit Lysatlösung zugesetzt, durch Umkehren vermischt und bei Raumtemperatur fünf Minuten lang inkubiert.
5. Der pH jeder Lösung wurde durch Zusetzen von 200  $\mu$ l neutralisierender Lösung zum Protease/Lysat-Gemisch gesenkt. Die Zusammensetzung der neutralisierenden Lösung war dieselbe wie zuvor in Beispiel 1. In der Lösung bildete sich ein Niederschlag, sobald der Acetatpuffer zugesetzt wurde.
6. Der Niederschlag wurde durch zehnmütiges Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur aus der Lösung gelöst.
7. Eine Zentrifugationskorbanordnung wurde durch Platzieren des Korbs in ein 2-ml-Mikrozentrifugensammelröhrchen und durch Zusetzen von 400  $\mu$ l von 7 M Guanidinhydrochlorid in den Korb hergestellt.
8. Die geklärte Lösung aus Schritt 6 wurde aus jedem Röhrchen mittels einer Pipette entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Niederschlag in den jeweiligen Röhrchen nicht beeinträchtigt wurde. Etwa 600  $\mu$ l von jeder dieser Lösungen wurden in die wie in Schritt 7 hergestellte Korbanordnung übertragen.
9. Die Zentrifugationskorbanordnung, die wie zuvor beschrieben beladen wurde, wurde dann in einer Mikrozentrifuge eine Minute lang bei Raumtemperatur zentrifugieren gelassen. Der Korb wurde dann aus dem Sammelröhrchen entfernt, die gesammelte Lösung verworfen und der Zentrifugationskorb in dasselbe Sammelröhrchen zurückgegeben.
10. 750  $\mu$ l Waschlösung (siehe Beispiel 1 für die Zusammensetzung dieser Lösung) wurden jedem Zentrifugationskorb nach Schritt 9 zugesetzt, und jede Zentrifugationskorb/Röhrchenanordnung wurde in einer Mikrozentrifuge eine Minute lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Zentrifugationskorb wurde dann aus dem Sammelröhrchen entfernt, und die darin gesammelte Lösung wurde auf dieselbe Weise wie zuvor verworfen. Der Zentrifugationskorb wurde dann wieder in dasselbe Sammelröhrchen eingeführt.
11. Der Zentrifugationskorb wurde mit 250  $\mu$ l Waschlösung unter Einsatz desselben Waschverfahrens, das in Schritt 10 eingesetzt wurde, gewaschen. Nach diesem Schritt wurde jedoch der Zentrifugationskorb in ein neues 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, wobei darauf geachtet wurde, dass keinerlei Waschlösung mit dem Korb übertragen wurde.
12. Die an die Silica-Membran Komponente des Zentrifugationskorbes gebundene DNA wurde durch Zusatz von 100  $\mu$ l Nuclease-freiem Wasser zum Korb und durch einmütiges Zentrifugieren der Zentrifugationskorb/Röhrchen-Anordnung in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur eluiert. Der Zentrifugationskorb wurde dann aus dem Sammelröhrchen entfernt und verworfen.
13. Die Eluenten aus allen Röhrchen hierin bearbeiteter, geernteter Zellen wurden kombiniert, und drei Aliquoten von 400  $\mu$ l eluierter DNA wurden zur Herstellung der Proben 1, 2 und 3, wie nachstehend beschrieben, bereitgestellt.

**[0105]** Probe 1 wurde durch Konzentrieren der DNA in einer der 400- $\mu$ l-Aliquoten eluierter DNA hergestellt. Die DNA in der Aliquote wurde durch Zusetzen von 100  $\mu$ l von 5 M Natriumchlorid und 350  $\mu$ l Isopropanol (100%) zur Eluentenaliquote aus der Lösung ausgefällt. Die resultierende Lösung wurde 20 Minuten lang bei

Raumtemperatur in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die ausgefällte DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 1 ml kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet, bevor es in 45 µl TE-Puffer gelöst wurde. (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0.)

**[0106]** Die Proben 2 und 3 wurden wie folgt hergestellt.

- a. 300 µl eines 2 : 1-Gemischs von 7 M Guanidinhydrochlorid und 3 M Kaliumacetat wurden zu 100-µl-Aliquoten des Eluenten aus obigem Schritt 13 zugesetzt. Die resultierende Lösung wurde einem neuen Zentrifugationskorb zugesetzt, und der Zentrifugationskorb wurde in einem neuen 2-ml-Sammelröhrchen angeordnet.
- b. Der beladene Zentrifugationskorb wurde bearbeitet, gewaschen, und die daran gebundene DNA wurde eluiert, gesammelt und in 400-µl-Proben durch Wiederholen der obigen Schritte 9 bis 13 aliquotiert.
- c. Die DNA in jeden 400 µl des Eluenten wurden durch Ausfällen mit Isopropanol konzentriert, wobei dasselbe Verfahren verwendet wurde, das zum Konzentrieren der DNA in obiger Probe 1 eingesetzt worden war.

**[0107]** Die Proben 2 und 3 wurden beide wie zuvor beschrieben hergestellt, wobei jedoch jede getrennt voneinander hergestellt wurde. Beide Proben wurden eingesetzt, um jede der zwei Arten an Gewebekulturzellen, die in diesem Beispiel getestet wurden, zu transfizieren.

**[0108]** Probe 4, wurde auch von (E.-coli-)DH5- $\alpha$ -Zellen, transformiert mit pGL3-Plasmid-DNA, hergestellt. Das zuvor beschriebene, herkömmliche 2  $\times$  -CsCl-Gradienten-Zentrifugationsverfahren wurde jedoch anstelle all der einzelnen Aspekte des Isolationsverfahrens der vorliegenden Erfindung eingesetzt.

#### B. Transfektion – Calciumphosphatverfahren

**[0109]** Die in diesem Beispiel eingesetzten Säugetier-Zelllinien stammen aus Chinahamster-Eierstockzellen (CHO) und menschlichen Zellen (HeLa). Die CHO-Zellen wurden in F-12 Ham-Medium plus 10% fötales Rinderserum – 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und die HeLa-Zellen in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) plus 10% fötales Rinderserum – 10% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden in 24-Well-Schalen in geeignetem Medium ausplattiert, und das folgende Verfahren wurde zum Einsatz gebracht:

1. Die Zellen wurden etwa 24 Stunden vor Beginn der Transfektion in 24-Well-Schalen gegeben, wobei etwa 50.000 Zellen pro Well platziert wurden.
2. Am Tag der Transfektion wurde das Medium aus jedem Well entfernt und durch frisches Nährmedium (+Serum) innerhalb von einer bis drei Stunden vor Einsetzen der Transfektion ersetzt.
3. Ein Gemisch aus jeder der vier DNA-Proben (Proben 1–4) wurde wie folgt hergestellt. Eine ausreichende Menge an Gemisch von jeder DNA-Probe wurde hergestellt, um sechs Zellkultur-Wells wie folgt zu transfizieren. 6 µl (etwa 6 µg) DNA, 23,8 µl Calciumchlorid und 160 µl steriles Wasser wurden in einem sterilen Polystyrol-Röhrchen kombiniert. Das zuvor hergestellte DNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch wurde zu 190,2 µl von Hank's Buffered Saline (HBS) zugetropft, während die HBS vorsichtig gewirbelt wurde.
4. Das HBS/DNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 54,6 µl des Gemischs zu jedem Well von Zellen zugesetzt wurden. Das Gemisch wurde dem Serum-hältigen Medium direkt zugesetzt.
5. Die Platten behandelte Zellen wurden dann in den Inkubator zurückgegeben. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit frischem Serum ernährt, wobei dieselbe Serumzusammensetzung wie in obigem Schritt 2 eingesetzt wurde.
6. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durch Entfernen des Nährmediums und Zusetzen von 100 µl Zellkultur-Lysereagens pro Well geerntet.

#### C. Test der Transfektionswirksamkeit

**[0110]** Zellen, die wie zuvor beschrieben transfiziert und geerntet wurden, wurden getestet, um zu sehen, ob das Reportergen, in diesem Fall das Luciferase-Gen von pGL3-Plasmid-DNA, in den Zellen exprimiert wurde. Ein Standard-Luciferase-Test, das „Luciferase Assay System“, das im Handel bei Promega Corporation erhältlich ist, wurde eingesetzt, um Luciferase-Expression in den Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren.

**[0111]** Die zuvor in Schritt 6 geernteten Zellen wurden weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf Luciferase-Expression getestet wurden. Eine Aliquote von jedem Zellen-Well wurde dann in einen anderen Well einer Mikrotiterplatten-Schale platziert. Die Menge an Lumineszenz, die von jedem Well ausströmte, wurde mittels eines Luminometers nachgewiesen und quantifiziert.

**[0112]** Die zwei nachstehenden Tabellen fassen die Ergebnisse zusammen, die für die vier Aliquoten für jede der beiden Arten an Zellkulturen, die mit jeder der vier Proben von wie zuvor beschrieben hergestellter pGL3-DNA transfiziert waren, erhalten wurden. Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der HeLa-Transfektionen und Tabelle 4 die Ergebnisse der CHO-Transfektionen zusammen.

TABELLE 3

HeLa	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Nachgewiesene Lumineszenz (in Turner-Lichteinheiten)	92,32	176,5	235,6	450,3
	180,9	186,7	303,4	392,9
	162,6	165,5	269,2	376,91
	185,2	164,3	281,8	396,6
Mittelwert	155	173	273	404
Standardabw.	43	111	28	32

TABELLE 4

CHO	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Nachgewiesene Lumineszenz (in Turner-Lichteinheiten)	3.214	14.050	7.537	7.972
	4.743	8.827	10.982	9.129
	4.004	9.398	10.974	16.416
	8.006	5.631	5.277	6.428
Mittelwert	4.992	9.477	8.693	9.986
Standardabw.	2.104	3.470	2.796	4.427

**[0113]** Die obigen Ergebnisse zeigen, dass das Verfahren dieser Erfindung eingesetzt werden kann, um DNA mit Transfektionsqualität zu produzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere wenn Proben 1–3 eingesetzt wurden, um Zellen der zwei verschiedenen Arten an Säugetierzellkulturen zu transfizieren, die resultierenden Zellen das Luciferase-Reportergen exprimierten, wie dies Zellen taten, die mit Probe-4-DNA transfiziert wurden, bei der das herkömmliche 2 × -CsCl-Gradienten-Zentrifugationsverfahren eingesetzt wurde. Das heißt, dass DNA, die durch das herkömmliche 2 × -CsCl-Verfahren isoliert wurde, in die Zellen mit ähnlicher Wirksamkeit transfiziert wurde wie DNA, die mittels der spezifischen Variante des alkalischen-Protease-Isolationsverfahrens, das in diesem Beispiel zuvor beschrieben wurde, isoliert wurde.

#### BEISPIEL 10 – BEHANDLUNG EINER NUCLEINSÄURELÖSUNG

**[0114]** Eine Nucleinsäurelösung wird mit einer alkalischen Protease behandelt, um jegliche Proteine in der Lösung, die in der Lage sind, das Nucleinsäurematerial abzubauen oder den Einsatz des Nucleinsäurematerials für Transfektion oder andere nützliche Anwendungen, die zuvor offenbart wurden, zu beeinträchtigen, im Wesentlichen zu inaktivieren. Die in diesem Beispiel behandelte Nucleinsäurelösung ist entweder eine Lösung aus durch jedes beliebige bekannte Verfahren isoliertem Nucleinsäurematerial, worin die resultierende Lösung solche schädlichen Proteine enthält oder angenommen wird, dass sie diese enthält, oder eine Nucleinsäurelösung, die durch Suspendieren und Lysieren eines biologischen Materials unter Einsatz eines der hierin beschriebenen Suspensions- und Lyseverfahren produziert wurde.

**[0115]** Die Nucleinsäurelösung wird durch Einstellen des pH der Lösung auf einen basischen pH behandelt, und daraufhin wird die Lösung in Gegenwart von alkalischer Protease inkubiert, bis schädliche Proteine in der Lösung im Wesentlichen inaktiviert sind, wonach der pH der Lösung auf einen pH gesenkt wird, bei dem die alkalische Protease weniger aktiv ist, z. B. durch Senken des Lösungs-pH auf zumindest einen neutralen pH.

**[0116]** Wesentliche Inaktivierung von Proteinen, die in der Lage sind, das Nucleinsäurematerial abzubauen, wird wie folgt bestimmt. Erstens werden zwei Aliquoten von Nucleinsäurelösungen wie zuvor beschrieben hergestellt, die eine mit einer 1 × Kernpufferlösung, die Magnesium enthält, und die andere ohne Kernpuffer. Die Proben werden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zusammensetzung des Kernpuffers ist dieselbe wie zuvor in Beispiel 3 beschrieben wurde. Zweitens werden die inkubierten Proben auf einem 1%-Agarosegel in Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer, der 0,5 mM Iodpropylthiazol-Orange enthält, fraktioniert. Drittens wird das Gel fraktionierter Proben mittels eines Fluoreszenz-Scanners wie eines Fluorimager (Molecular Dynamics) gescannt, um das fraktionierte Nucleinsäurematerial im Gel sichtbar zu machen. Das durch Fraktionieren der Probe, die Kernpuffer enthält, produzierte Bandenmuster wird mit der Probe ohne Kernpuffer verglichen. Proteine, die in der Lage sind, das Nucleinsäurematerial in der Lösung abzubauen, werden im Wesentlichen inaktiviert, sofern das von der Kernpuffer enthaltenden Probe produzierte Bandenmuster im Wesentlichen identisch mit dem von der Probe ohne Kernpuffer produzierten Muster ist. Zwei Bandenmuster sind im Wesentlichen miteinander identisch, wenn die Anzahl und annähernde Position der Banden im Gel dieselben sind, wenn die relative Intensität aller Banden jedes Musters dieselbe ist und wenn das Bandenmuster weder Schmierungen noch Unschärfe umfasst, was geringeren Molekulargewichten entsprechen würde, die im anderen Muster nicht vorhanden sind.

**[0117]** Wesentliche Inaktivierung von Proteinen, die in der Lage sind, den Einsatz des Nucleinsäurematerials in der Nucleinsäurelösung zu beeinträchtigen, wird mittels eines funktionellen Tests an der Lösung nach der Behandlung mit alkalischer Protease wie zuvor beschrieben bestimmt. Die Art des eingesetzten funktionellen Tests hängt von der Art des Nucleinsäurematerials in der Lösung und von der bestimmten Anwendung von Interesse ab. Ist das Material Plasmid-DNA und ist die Anwendung von Interesse die Transfektion von Säugertierzellen, so wird die behandelte Lösung durch Einsatz einer Probe der Lösung zur Transfektion von Säugertierzellen getestet, wie dies zuvor in Beispiel 9 getan wurde. Ist das Material mRNA und die Anwendung von Interesse die Herstellung einer cDNA-Bibliothek, um ein bestimmtes Gen zu klonieren, so wird die behandelte Lösung dem Verfahren unterzogen, das eingesetzt wird, um die resultierende cDNA umzukehren, zu transkribieren und zu klonieren. Ist das Material menschliche genomische DNA und die Anwendung ein Test zur Identität des Menschen, so wird eine Probe der behandelten Lösung als ein Substrat im Identitätstest von Interesse (z. B. unter Einsatz einer Standard-Polymerasekettenreaktion oder eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Tests) eingesetzt.

**[0118]** Die folgenden Beispiele sind Bezugsbeispiele, die nicht im Schutzzumfang der Ansprüche dieser Erfindung eingeschlossen sind.

#### BEISPIEL 11 – BEHANDLUNG EINER LÖSUNG VON AUS BIOLOGISCHEM MATERIAL EXTRAHIERTER DNA

**[0119]** RNA wird mittels des folgenden Verfahrens aus einer biologischen Probe wie Säugetiergewebe isoliert: Die biologische Probe wird in Gegenwart einer hohen Konzentration eines chaotropen Salzes wie Guanidinthiocyanat homogenisiert. Ein saures gepuffertes Gemisch aus Phenol und Chloroform wird dann dem resultierenden Lysat zugesetzt und in einer organischen Extraktion eingesetzt. Wenn die Lysatlösung organischer Extraktion unterzogen wird, trennt sich jegliche RNA in der Lösung in die wässrige Phase auf, und Kontaminanten wie DNA und denaturierte und inaktivierte Proteine trennen sich in die organische Phase bzw. in die Zwischenphasenschichten auf (Gold Spring Harbor, Hrsg.) Ein einzelner organischer Extraktionsschritt entfernt oder inaktiviert jedoch nicht alle kontaminierenden Nucleasen in der Lösung wirksam, die in der Lage sind, RNA in RNase-reichen Geweben wie Pankreas abzubauen. Um zahlreiche zusätzliche Extraktionsschritte zu vermeiden, um restliche Nucleasen und andere schädliche Proteine, die in der Lösung zurückbleiben, zu entfernen oder zu inaktivieren, wird die wässrige Phase von einem organischen Extraktionsschritt, vorzugsweise von dem ersten organischen Extraktionsschritt, in Betracht gezogen, um mit alkalischer Protease wie folgt behandelt zu werden: Der pH des wässrigen Extrakts wird auf einen basischen pH, im Bereich zwischen 7 und 9 eingestellt, also auf einen ausreichend hohen pH, dass die alkalische Protease aktiviert werden kann, jedoch nicht auf einen zu hohen pH, sodass die RNA nicht hydrolysiert wird. Eine alkalische Protease enthaltende Lösung wird zugesetzt, und die resultierende alkalische Extraktlösung wird dann bei Raumtemperatur zumindest 5 Minuten lang inkubiert. Die Länge der Inkubationszeit und die eingesetzte Konzentration an alkalischer Protease sind ausreichend, um wesentliche Inaktivierung verbleibender Ribonuclease in der Lösung sicherzustellen. Wesentliche Inaktivierung von Ribonuclease wird entweder durch reverse Transkription und cDNA-Produktion, PCR des RNA-Beispiels oder Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Formaldehyd, wie in Maniatis/Gambrook, Current Protocols in Molecular Biology, beschrieben, bestimmt.

## BEISPIEL 12-ISOLATION VON RNA AUS EINEM PROTEASE-BEHANDELTEM EXTRAKT

**[0120]** RNA wird aus dem mit alkalischer Protease behandeltem wässrigen Extrakt aus Beispiel 11 unter Einsatz einer Silica-Harzmatrix wie folgt isoliert. Die behandelte wässrige Extraktlösung enthält eine hohe Konzentration an chaotropem Salz. Diese Lösung wird mit Nuclease-freiem Wasser auf einen chaotropen Salzkonzentrations-Bereich verdünnt, von dem bekannt ist, dass er das Binden von RNA an eine Matrix aus Silicateilchen fördert. Die verdünnte Lösung wird dann in Kontakt mit einer Silica-Harzmatrix unter Bedingungen angeordnet, die darauf abzielen, die RNA an die Matrix binden zu lassen. Die Matrix wird dann zumindest einmal mit einer Waschlösung gewaschen, die zumindest 50% Alkohol und eine wässrige Lösung mit mittlerer Ionenstärke umfasst, wie eine Waschlösung, die aus 0,01 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5) und 80% Ethanol besteht. Die RNA wird aus der Matrix unter Einsatz von Nuclease-freiem Wasser oder einem wässrigen Puffer von geringer ionischer Stärke, wie TE-Puffer, eluiert (siehe obiges Beispiel 9 für die Zusammensetzung des TE-Puffers). Eine Lösung alkalischer Protease wird dann der RNA zugesetzt und inkubiert, um die Protease jegliche in der RNA-Lösung vorhandene Ribonuclease verdauen zu lassen. Die Menge an erforderlicher Protease kann wie in Beispiel 11 bestimmt werden.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Behandlung einer Nucleinsäurelösung mit einer alkalischen Protease, worin die Nucleinsäurelösung ein Nucleinsäurematerial und Proteine enthält und das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) Einstellen des pH der Nucleinsäurelösung auf einen pH von zumindest 10, um eine alkalische Nucleinsäurelösung zu bilden;
- (b) Inkubieren der alkalischen Nucleinsäurelösung in Gegenwart der alkalischen Protease, bis die Proteine im Wesentlichen inaktiviert sind; und
- (c) Senken des pH der Lösung auf einen ausreichend niedrigen Wert, um die Proteasenaktivität zu verringern.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Proteine, die im Inkubationsschritt (b) des Verfahrens im Wesentlichen inaktiviert werden, zum Abbau des Nucleinsäurematerials fähig sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die Senkung des pH der Lösung in Schritt (c) zur Bildung eines Niederschlags führt, der abzentrifugiert wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Nucleinsäurematerial DNA ist und die Proteine, die in Schritt (b) des Verfahrens inaktiviert werden, Nucleasen umfassen, die zum Abbau von DNA fähig sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin die alkalische Nucleinsäurelösung, die in Schritt (a) des Verfahrens gebildet wird, eine alkalische Lysatlösung ist und die alkalische Protease der Lösung vor der Inkubation zugesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, das außerdem die Bildung der alkalischen Lysatlösung durch Folgendes umfasst:

- Suspendieren einer biologischen Probe in einer Lösung, wobei die biologische Probe das Nucleinsäurematerial und die Proteine umfasst; und
- Einstellen des pH der Lösung der suspendierten Probe auf einen pH von zumindest 10 durch Zusetzen einer alkalischen Lyselösung, wobei die alkalische Lyselösung eine Base und ein anionisches Detergens umfasst.

7. Verfahren zum Isolieren von Nucleinsäurematerial aus einer biologischen Probe, die Proteinmaterial und Nucleinsäurematerial enthält, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) Suspendieren der biologischen Probe in einer Lösung;
- (b) Einstellen des pH der Lösung auf einen pH von zumindest 10 durch Zusetzen einer alkalischen Lyselösung, um eine alkalische Lysatlösung zu bilden;
- (c) Inkubieren der alkalischen Lysatlösung in Gegenwart einer alkalischen Protease, bis Proteine, die zum Abbau des Nucleinsäurematerials fähig sind, im Wesentlichen inaktiviert sind;
- (d) Senken des pH der alkalischen Lysatlösung auf einen ausreichend niedrigen Wert, um die Proteasenaktivität zu verringern.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin die Lösung, die zum Suspendieren der biologischen Probe verwendet wird, Wasser, einen Puffer und einen Chelatbildner umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, worin die isolierte Nucleinsäure ein DNA-Material ist, wo-

bei das Verfahren außerdem den Schritt des Inkubierens der Probe in Gegenwart eines Ribonucleasenzym umfasst, bis jegliche RNA in der Probe im Wesentlichen abgebaut ist.

10. Verfahren nach Anspruch 7, 8 oder 9, worin die isolierte Nucleinsäure ein DNA-Material ist und die in Schritt (b) der Suspensionslösung zugesetzte alkalische Lysatlösung Natriumhydroxid und ein anionisches Detergens umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, worin der pH der alkalischen Lysatlösung in Schritt (d) durch Zusetzen einer sauren Lösung gesenkt wird, die einen Acetatpuffer mit einem pH zwischen 3,5 und 4,5 umfasst.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, worin das Senken des pH der alkalischen Lysatlösung in Schritt (d) zur Bildung einer trüben Lysatlösung führt und das außerdem den Schritt des Klärens des trüben Lysats umfasst, um eine geklärte Lysatlösung zu bilden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin die geklärte Lysatlösung durch Zentrifugieren der trüben Lysatlösung gebildet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, das außerdem das Isolieren des Nucleinsäurematerials von anderen Materialien in der geklärten Lysatlösung durch Alkoholfällung umfasst.

15. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, das außerdem das Isolieren des Nucleinsäurematerials von anderen Materialien in der geklärten Lysatlösung mithilfe paramagnetischer Teilchen umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, das außerdem das Isolieren des Nucleinsäurematerials von anderen Materialien in der geklärten Lysatlösung mithilfe einer Silicateilchen umfassenden Harzmatrix umfasst.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin das Nucleinsäurematerial DNA ist, worin das Harz Silica umfasst, worin ein Chaotrop verwendet wird, um die DNA reversibel an das Harz zu binden, worin das Harz mit einer Waschlösung gespült wird, um anderes Material aus dem Gemisch zu entfernen, und worin nach dem Spülen ein Elutionspuffer oder Wasser verwendet wird, um die DNA vom Harz freizusetzen.

18. Verfahren nach Anspruch 7, das nach dem Senken des pH des Gemischs in Schritt (d) außerdem den Schritt des Wärmeinaktivierens der alkalischen Protease umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 7, worin das Nucleinsäurematerial DNA-Material ist, worin in (a) die Lösung eine wässrige Lösung ist, die Ribonuclease und Puffer umfasst, worin in (b) die alkalische Lysatlösung ein anionisches Detergens und eine Base umfasst, worin in (d) der pH des Gemischs durch Zusetzen einer sauren Lösung gesenkt wird, wobei das Zusetzen der sauren Lösung zur Bildung eines trüben Lysats führt, und das außerdem  
(e) das Klären des trüben Lysats durch Zentrifugieren und  
(f) das Isolieren des DNA-Materials von anderem Material im geklärten Lysat umfasst.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die Lösung, die zum Suspendieren der biologischen Probe verwendet wird, außerdem einen Puffer und einen Chelatbildner umfasst.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin die saure Lösung, die zum Senken des pH des Gemischs verwendet wird, einen Acetatpuffer mit einem pH zwischen 3,5 und 4,5 umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 19, 20 oder 21, worin das DNA-Material unter Verwendung einer Silicateilchen umfassenden Harzmatrix vom geklärten Lysat isoliert wird, worin die Harzmatrix zur reversiblen Bindung des Nucleinsäurematerials fähig ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Verfahren außerdem die folgenden Schritte umfasst:  
(h) Zusetzen des geklärten Lysats und eines Chaotrops zur Harzmatrix, um das DNA-Material an die Harzmatrix zu binden;  
(i) zumindest einmaliges Spülen der Harzmatrix mit einer Waschlösung;  
(j) Verwenden eines Elutionspuffers oder von Wasser, um das DNA-Material von der Harzmatrix freizusetzen.

24. Verfahren nach Anspruch 19, das nach dem Senken des pH des Gemischs in Schritt (e) außerdem den

Schritt des Wärmeinaktivierens der alkalischen Protease umfasst.

25. Set zum Isolieren eines Nucleinsäurematerials, wobei das Set Folgendes in getrennten Behältern umfasst:

- (a) eine Aliquote einer alkalischen Protease, worin die alkalische Protease zur Inaktivierung von Proteinen fähig ist, die zum Abbau des Nucleinsäurematerials bei einem pH von zumindest 10 fähig sind; und
- (b) Harzmatrix, die zur reversiblen Bindung des Nucleinsäurematerials fähig ist.

26. Set nach Anspruch 25, worin das Nucleinsäurematerial DNA-Material ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

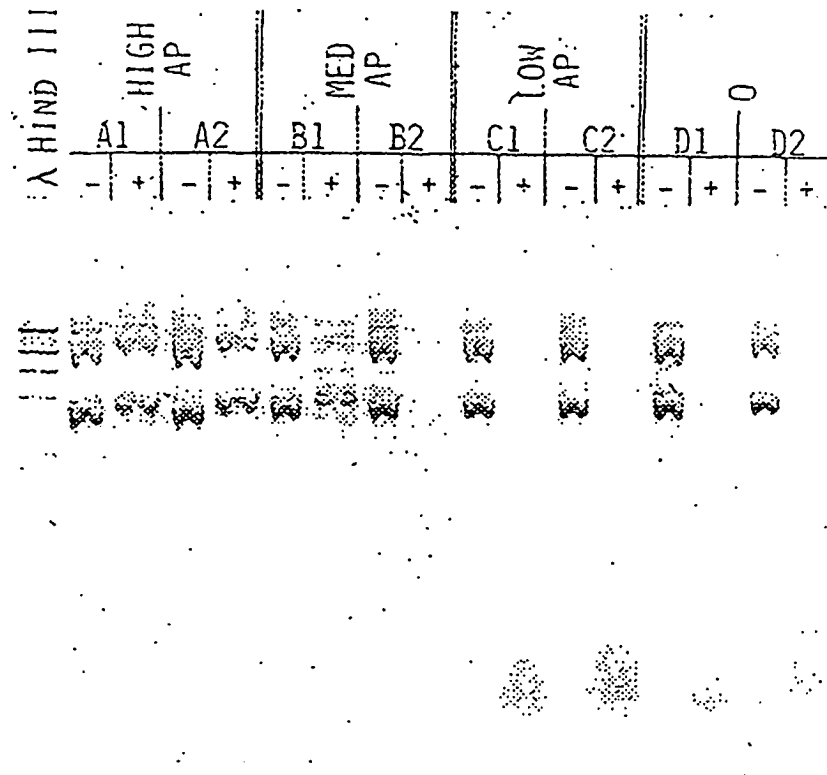


FIG. 1

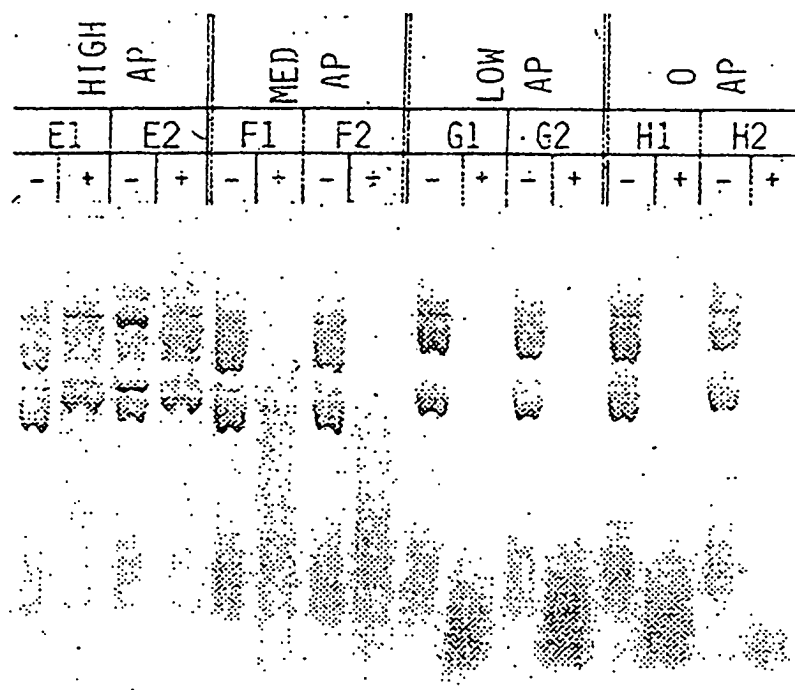


FIG. 2

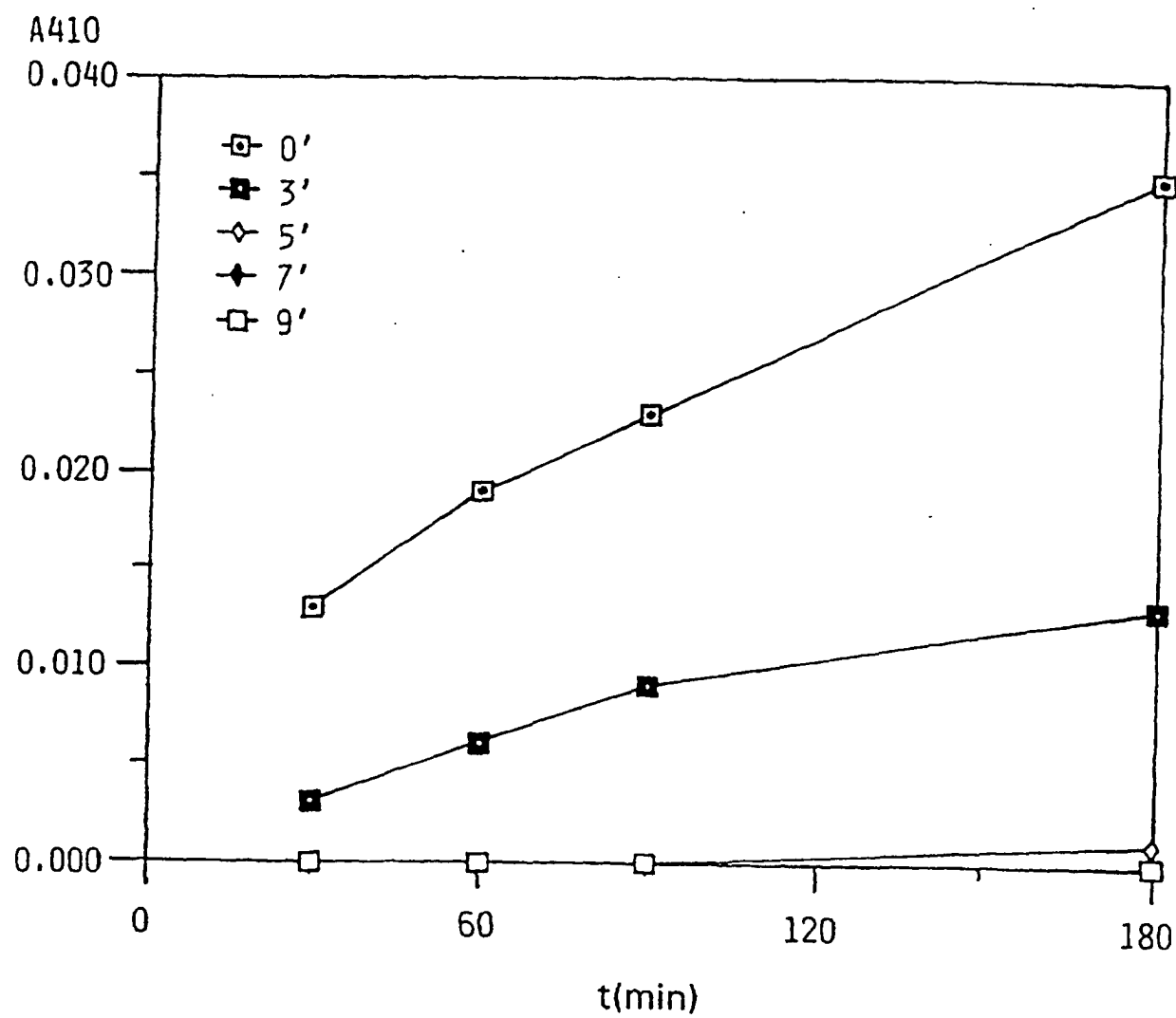


FIG. 3

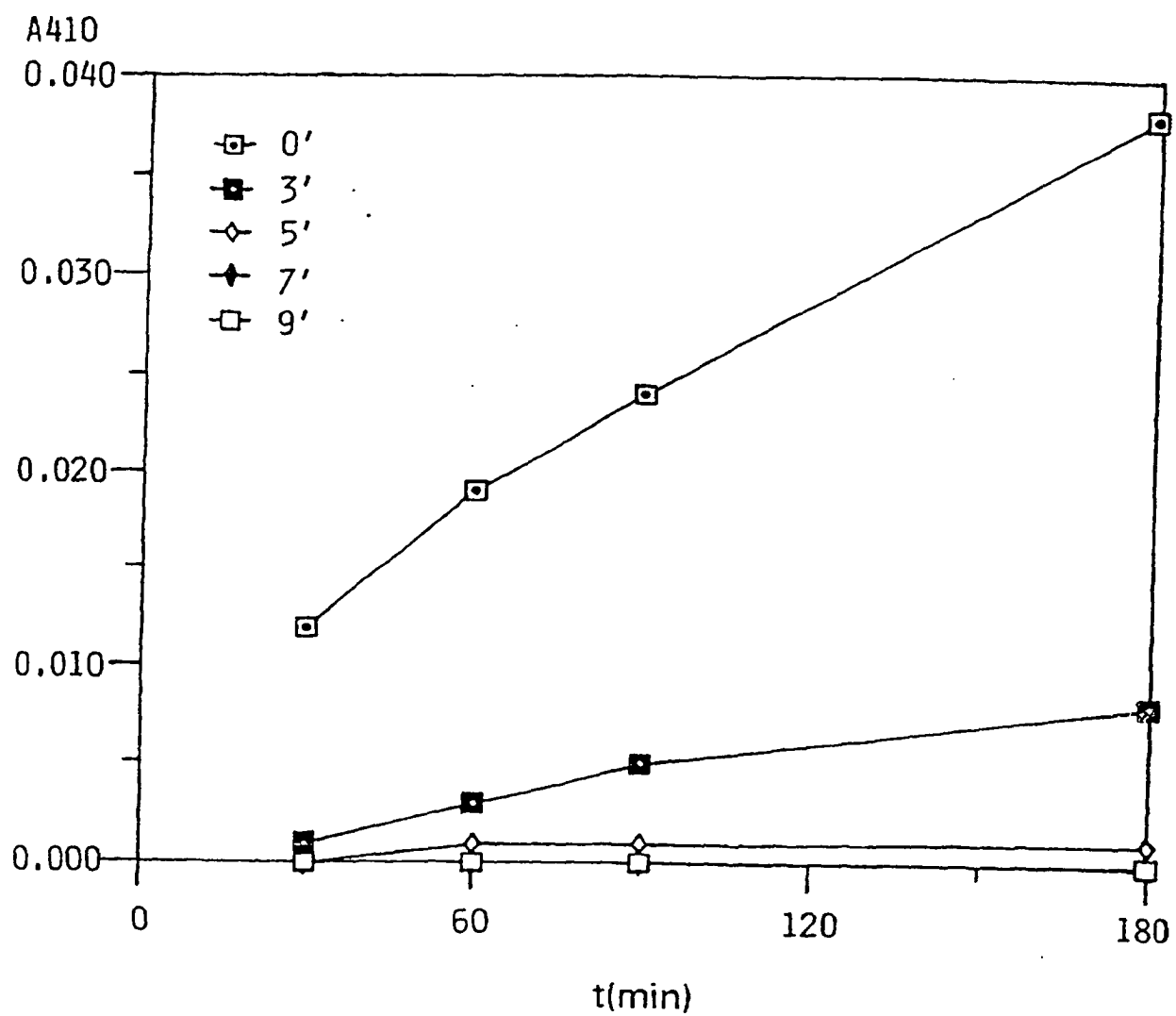


FIG. 4