



21 Aktenzeichen: 102 19 117.4-41
22 Anmeldetag: 29. 4. 2002
43 Offenlegungstag: -
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 30. 10. 2003

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
AdnaGen AG, 30853 Langenhagen, DE

74 Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80336
München

72 Erfinder:
Stefan, Monica, Dr., 30173 Hannover, DE; Krehan,
Alf-Andreas, Dr., 30853 Langenhagen, DE; Böcher,
Oliver, Dr., 30853 Langenhagen, DE; Waschütza,
Stefanie, Dr., 30169 Hannover, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
BIOSIS:AN:1987:48740, in Biochem. Biophys. Acta,
1986, 851 (3), S.395-406;

54 Verfahren zur Stabilisierung von RNS und Verwendungen von Stabilisierungspuffern

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur
Stabilisierung von Ribonukleinsäure und Verwendung
von Stabilisierungspuffern. Derartige Verfahren werden
bei der Aufreinigung von Ribonukleinsäuren benötigt.
Gemäß der vorliegenden Erfindung wird hierzu einer Ri-
bonukleinsäure enthaltenden Probe eine Stabilisierungs-
lösung zugesetzt, die Lithium-Dodecylsulfat enthält. Hier-
durch wird die Ribonukleinsäure über viele Stunden bis
Tage stabilisiert, obwohl in der jeweiligen Probe auch Ri-
bonukleinsäure spaltende Enzyme vorhanden sein kön-
nen.

- [0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Stabilisierung von Ribonukleinsäuren und Verwendungen von Stabilisierungspuffern. Derartige Verfahren werden bei der Aufreinigung von Ribonukleinsäuren (RNS) benötigt.
- [0002]** Ribonukleinsäuren besitzen einen hohen Informationsgehalt und sind häufiger Gegenstand der molekularbiologischen Diagnostik. Im Gegensatz zu DNS ist RNS sehr viel instabiler und demnach schwieriger zu handhaben (Pasloske, 2001: Methods in Molecular Biology, vol 160, 105–111).
- [0003]** Die RNA-Degradation durch ubiquitär vorkommende RNAsen vor, während und nach Isolierung von RNS stellt ein großes Problem dar, da die Integrität der RNS Voraussetzung für die molekularbiologische Diagnostik ist.
- [0004]** Studien haben gezeigt, daß die RNS aus humanem Vollblut innerhalb weniger Stunden nach der Blutentnahme signifikant degradiert wird (McFaul et al., 2000, J. Lab. Clin Med., 135 (3), 263–269), was die Möglichkeiten für den Probentransport sehr stark einengt. Die Degradation der RNA kann dadurch zu falsch negativen Ergebnissen führen, daß die durch Abbau verringerte Transkriptzahl in vitro mit der Transkriptzahl in vivo nicht korreliert.
- [0005]** Für die Integrität der RNS sind das Hemmen endogener RNAsen während der Zellyse und das Vermeiden von Kontaminationen mit exogenen RNAsen während der RNS-Isolierung unerlässlich.
- [0006]** Die Inhibierung von RNAsen kann durch Zugabe chemischer Agenzien oder einiger Enzyme erfolgen:
- Stark denaturierende Agenzien wie 8 M Harnstoff, 4 Mol/l Guanidiniumhydrochlorid, 4 Mol/l Guanidiniumisothiocyanat bewirken sowohl die Lyse der Zelle als auch die Inaktivierung von RNAsen.
 - Vanadyl-Ribonukleosid-Komplexe (VRC): binden ein breites Spektrum an RNAsen, inhibieren allerdings aber auch andere Enzyme (s. unten)
 - komplexierende Agenzien: z. B. Feststoffe wie Bentonit, Macaloid, die die RNAsen binden und dadurch von den sich in Lösung befindlichen RNAsen trennen.
 - Enzyme:
Proteinase K verdaut Zellproteine und ist in Gegenwart von Na-Dodecylsulfat (SDS) bei 65°C sehr aktiv (1); RNase-Inhibitor aus humanem Plazenta, Rnasin: sie schützen die RNA vor Degradation nur unter nicht denaturierenden Bedingungen (Murphy et al., 1995: BioTechniques, Vol. 18, No. 6, 1068–1073).
- [0007]** All diese Reagenzien haben starke Begrenzungen: geringes RNAsen-Wirkungsspektrum, Inhibierung zusätzlicher Enzyme, die für den anschließenden Nachweis von RNS essentiell sind (VRC's hemmen RNS-Polymerasen und in vitro Transkription/ Translation (Pasloske, 2001: Methods in Molecular Biology, vol. 160, 105–111), Nichtanwendbarkeit während der Zellyse (RNasin und andere enzymatische RNase-Inhibitoren sind nur unter nicht denaturierenden Bedingungen aktiv und eignen sich dadurch nicht für Inhibition während der ersten Schritte bei der RNA-Aufreinigung).
- [0008]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein verbessertes Stabilisierungsverfahren für Ribonukleinsäuren anzugeben.
- [0009]** Diese Aufgabe wird durch die Verwendung von Lithium-Dodecylsulfat nach Anspruch 1 sowie das Verfahren nach Anspruch 10 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildung der erfindungsgemäßen Verwendung sowie des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.
- [0010]** Grundlage der vorliegenden Erfindung ist die Erkenntnis, daß Lithium-Dodecylsulfat eine Stabilisierung von RNS in Lösung bewirkt. Es konnte überraschenderweise gezeigt werden, das RNS durch Zugabe von Lithium-Dodecylsulfat über viele Stunden bis Tage stabilisiert wird, obwohl in der jeweiligen Lösung RNAsen vorhanden waren. Dies spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn tierische Zellen beispielsweise durch Lyse oder osmotischen Schock aufgeschlossen werden und die RNS sowie RNAsen gemeinsam in der Lösung vorliegen.
- [0011]** Besonders vorteilhaft ist dabei eine Stabilisierungslösung mit einem Gehalt an Lithium-Dodecylsulfat von 0,1% (Gew/Vol) bis 5% (Gew/Vol).
- [0012]** Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Stabilisierungslösung ca. 1% (Gew/Vol) Lithium-Dodecylsulfat enthält.
- [0013]** Weiterhin wird die stabilisierende Wirkung unterstützt, wenn als Salz Lithiumchlorid (LiCl) der Stabilisierungslösung zugegeben wird, vorteilhafter Weise mit einer Konzentration zwischen 100 mMol/l und 2 Mol/l.
- [0014]** Eine weitere Stützung der Stabilisierungswirkung wird durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) bewirkt.
- [0015]** Im Folgendem wird ein Beispiel für die Durchführung einer erfindungsgemäßen RNS-Stabilisierung gegeben.
- [0016]** Fig. 1 zeigt die Ergebnisse einer Messung an frisch präparierter RNS sowie nach einer 3-stündigen, 24-stündigen bzw. 48-stündigen Inkubation in der erfindungsgemäßen Stabilisierungslösung. Dabei wurden jeweils insgesamt 4 Proben untersucht, die keine Tumorzellen, 10 Tumorzellen, 100 Tumorzellen bzw. 1000 Tumorzellen pro ml Blutprobe enthielten.
- [0017]** Dazu wurde eine definierte Anzahl an Tumorzellen (0/10/100/1000 Zellen) in jeweils 1 ml Blut einer gesunden Kontrollperson inokuliert, mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten Magnetpartikeln von den nicht bindenden Blutbestandteilen separiert und in jeweils 100 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5% (Vol/Vol) Triton X100) aufgenommen. Die separierten Zellen werden auf den Partikeln lysiert.
- [0018]** Nach Abtrennen der immunomagnetischen Partikel werden 100 µl des RNA-stabilisierenden Puffers enthaltend 150 mMol/l Tris-HCl pH 7.5
1,5 Mol/l LiCl
20 mMol/l EDTA pH 8.0
2% (Gew/Vol) Li-Dodecylsulfat
10 mMol/l Dithiothreitol
zugegeben. Diese Lösung wurde für verschiedene Zeiten (0, 3, 24 und 48 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine mRNS-Isolierung mit Hilfe von Oligo(dT)₂₅ gekoppelten Magnetpartikeln (Dynabeads der Firma Dynal). Die Aufarbeitung erfolgte gemäß dem Protokoll im Handbuch der Firma Dynal. Das Lysat wurde mit den

Magnetpartikeln (20 µl Oligo(dT)₂₅-Dynabeads pro Ansatz) für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Drehen auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgen jeweils 2 Waschschrte mit jeweils 100 µl Waschluffer A bzw. Waschluffer B.

A:

10 mMol/l Tris-HCl pH 7.5

0,15 Mol/l LiCl

1 mMol/l EDTA pH 8,0

0,1% (Gew/Vol) Li-Dodecylsulfat

B:

10 mMol/l Tris-HCl pH 7.5

0,15 Mol/l LiCl

1 mMol/l EDTA pH 8,0

[0019] Nach dem ersten Waschluff mit Waschluffer B wird die Reaktionslösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wird die an die Magnetpartikel gebundene mRNA mit 100 µl eiskalter 10 mMol/l Tris-HCl Lösung gewaschen und in 29,5 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 50°C unter leichtem Schütteln erfolgte eine herkömmliche cDNA-Synthese. Anschließend wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit tumorspezifischen Primern durchgeführt. Die Amplifikate wurden im Agilent Bioanalyzer 2100 aufgetrennt und visualisiert. Die Verfahrensschritte der Reversen Transkription und Amplifikation erfolgten unter den nachstehend beschriebenen Bedingungen:

Reverse Transkription

[0020] Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37°C für 1 Stunde mit nachfolgender Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 Minuten bei 93°C und Abkühlung auf Eis. (Sensiscript™ Reverse Transcriptase Kit; Qiagen, Hilden)

Tabelle 1

Komponenten der cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte in einem 40 µl-Reaktionsansatz		
Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RNA in Wasser	29,5 µl	
10 x RT-Puffer	4 µl	1 x
DNTP-Mix (je 5 mMol/l)	4 µl	jeweils 0.5 mMol/l
Rnase-Inhibitor	0,5 µl	0,5 U
Reverse Transkriptase	2 µl	4 U

Amplifikation

[0021] Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mit tumorspezifischen Primern durchgeführt.

Verwendete PCR-Primer

CK20 sense T60: ATC TCC AAG GCC TGA ATA AGG TCT

CK20 antisense T61: CCT CAG TTC CTT TTA ATT CTT CAG T

Komponenten der PCR-Reaktion

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
CDNA	8 µl	
10 x PCR-Puffer*	5 µl	1 x
DNTP-Mix	1 µl	jeweils 200 µMol
Primer	jeweils 50 µMol	
Taq-DNA Polymerase**	0.5 µl	2.5 U
H ₂ O	ad 50 µl	

(* enthält 15 mMol/l MgCl₂; ** HotStarTaq™ DNA Polymerase; Qiagen, Hilden)

Tabelle 3

PCR-Bedingungen

Vorabdenaturierung	95 °C 15 min
Zyklus (35 Zyklen)	
1. Denaturierung	94 °C 1 min
2. Annealing	58 °C 1 min
3. Extension	72 °C 1 min
Finale Extension	72 °C 10 min
	4 °C Pause

[0022] 1 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes wurde im Agilent Bioanalyzer 2100 auf einem DNA-Chip (500) aufgetrennt und das Trennergebnis elektronisch dokumentiert.

[0023] Fig. 1 zeigt nun in Spur 1 eine Leiter aus Markern für das Molekulargewicht. Die Spuren 2–5, 6–9, 10–13, 14–17 entsprechend den Proben, die 0, 3, 24, 48 Stunden vor der Isolierung der RNS in der Stabilisierungslösung inkubiert wurden. In jeder dieser Gruppen von Spuren zeigt jeweils eine Spur die Probe mit 0, 10, 100 bzw. 1000 Tumorzellen in der Ausgangsblutprobe, wie oberhalb der Figur beschriftet ist.

[0024] Es ist unmittelbar zu erkennen, daß der mit Pfeil bezeichnete Tumormarker deutlich und in nahezu unveränderter Intensität bei den 0, 3 bzw. 24 Stunden inkubierten Proben in jeder der Proben, die Tumorzellen enthielt, zu erkennen ist. Lediglich bei den 48 Stunden inkubierten Proben ist für die Probe mit 10 Tumorzellen in der Ausgangsblutprobe kein Tumormarker-Signal (Bande) zu erkennen. Offensichtlich hat hier ein geringer Abbau von RNS stattgefunden. Dennoch ist bei den Blutproben mit 100 bzw. 1000 Tumorzellen der Tumormarker noch deutlich nachzuweisen. Damit ist gezeigt, daß die Stabilisierungslösung bewirkt, daß über mindestens 1 Tag und bei entsprechender RNS-Konzentration 2 Tagen die RNS in der Stabilisierungslösung nicht bzw. extrem langsam abgebaut wird.

Patentansprüche

1. Verwendung von Lithium-Dodecylsulfat zur Stabilisierung von RNS in einer Lösung.
2. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Stabilisierung von RNS in einer biologischen Probe.
3. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Stabilisierung von RNS in einem Zellaufschluß.
4. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Stabilisierung von RNS in einem Zellaufschluß tierischer oder menschlicher Zellen.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Stabilisierung von RNS in einer Blutprobe.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche in einer Konzentration von 0,1% bis 5% (Gew/Vol) Li-Dodecylsulfat.
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche in einer Konzentration von 2% (Gew/Vol) Li-Dodecylsulfat.
8. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung weiterhin die folgenden Bestandteile

enthält:	
10–500 mMol/l Tris-HCl pH 6,5–8,5 und/oder	
100–3500 mMol/l LiCl und/oder	
1–100 mMol/l EDTA und/oder	
1–50 mMol/l Dithiothreitol.	5
9. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung weiterhin folgenden Bestandteile enthält:	
150 mMol/l Tris-HCl pH 7.5 und/oder	
1,5 mMol/l LiCl und/oder	
20 mMol/l EDTA und/oder	10
10 mMol/l Dithiothreitol.	
10. Verfahren zur Stabilisierung von RNS in einer Probe, in biologischen Proben, Proben enthaltend tierische und/oder menschliche Zellen und/oder in Blutproben, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einer Stabilisierungslösung versetzt wird, die Lithiumdodecylsulfat enthält.	
11. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einer Stabilisierungslösung versetzt wird, die 0,1% bis 5% (Gew/Vol) Lithium-Dodecylsulfat enthält.	15
12. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einer Stabilisierungslösung versetzt wird, die 2% (Gew/Vol) Lithium-Dodecylsulfat enthält.	
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einer Stabilisierungslösung versetzt wird, die	20
10–500 mMol/l Tris-HCl pH 6,5–8,5 und/oder	
100–3500 mMol/l LiCl und/oder	
1–100 mMol/l EDTA und/oder	
1–50 mMol/l Dithiothreitol enthält.	
14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einer Stabilisierungslösung versetzt wird, die	25
150 mMol/l Tris-HCl pH 7.5 und/oder	
1,5 mMol/l LiCl und/oder	
20 mMol/l EDTA und/oder	
10 mMol/l Dithiothreitol enthält.	30
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß anschließend die RNS aus der Probe isoliert, aufgereinigt oder angereichert wird.	
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Zugabe der Stabilisierungslösung die freie RNS an ein Substrat gebunden, dieses mindestens einmal gewaschen und anschließend die RNS von dem Substrat abgelöst wird.	35
17. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als Substrat magnetische Partikel verwendet werden.	
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die RNS mittels einer 10 mMol/l Tris-HCl-Lösung in H ₂ O, pH 7,5 von den magnetischen Partikeln abgelöst wird.	
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die RNS nach der Ablösung vom Substrat in einen RNase-freien Puffer aufgenommen wird.	40
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß RNS-haltige Komponenten aus der Probe abgetrennt werden, bevor die Stabilisierungslösung zu den abgetrennten Komponenten zugegeben wird.	
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen aus einer Blutprobe abgetrennt werden, bevor die Stabilisierungslösung zu den abgetrennten Zellen zugegeben wird.	45

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.