



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 16 642 T2 2008.01.31**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 394 173 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 16 642.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 019 321.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **27.08.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.03.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **03.10.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C07H 21/00 (2006.01)**
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

02019097 29.08.2002 EP

02028114 18.12.2002 EP

(73) Patentinhaber:

**Epigenomics AG, 10178 Berlin, DE; Roche
Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR**

(72) Erfinder:

**Markert-Hahn, Christine Dr., 82377 Penzberg, DE;
Block, Dirk Dr., 83673 Bichl, DE**

(54) Bezeichnung: **Verbessertes Verfahren zur Bisulfit-Behandlung**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zum Durchführen einer Bisulfitreaktion gerichtet, um Methylierungspositionen in einer Nucleinsäure, d. h. methylierte und nicht methylierte Cytosine, zu bestimmen, wobei die Nucleinsäure während des Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion an eine feste Phase gebunden ist. Bei der festen Phase handelt es sich vorzugsweise um ein Material, das Glas oder Siliciumdioxid, stärker bevorzugt ein Glasvlies, eine Glasmembran oder ein magnetisches Glasteilchen umfasst. Ferner wird die Verwendung einer festen Phase zum Binden einer Nucleinsäure während des Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion offenbart und ein Kit, der ein Bisulfitreagens und eine feste Phase enthält.

[0002] Gene machen nur einen kleinen Anteil des gesamten Säugergenoms aus und die genaue Kontrolle ihrer Expression in Anwesenheit eines überwältigenden Hintergrundes nicht kodierender Desoxyribonucleinsäure (DNA) stellt ein wesentliches Problem für ihre Regulierung dar. Nicht kodierende DNA, die Introns, repetitive Elemente und potenziell aktive transponierbare Elemente enthält, erfordert wirksame Mechanismen, um sie auf lange Zeit stillzulegen. Säuger scheinen die Möglichkeiten, die sich durch eine Cytosin-Methylierung bieten, ausgenutzt zu haben, um einen vererbaren Mechanismus zum Ändern von DNA-Protein-Wechselwirkungen bereitzustellen, um ein derartiges Stilllegen zu unterstützen. Die DNA-Methylierung ist für die Entwicklung von Säugern unentbehrlich und spielt eine potenzielle Rolle während des Alterns und bei Krebs. Die Beteiligung von Methylierung an der Regulation von Genexpression und als epigenetische Modifikation, die geprägte Gene markiert, ist gut etabliert. Bei Säugern findet Methylierung nur an Cytosinresten statt und genauer gesagt nur an Cytosinresten, die neben einem Guanosinrest liegen, d. h. an der Sequenz CG. Der Nachweis und die Kartierung von DNA-Methylierungsstellen sind unentbehrliche Schritte zu einem Verständnis der molekularen Signale, die anzeigen, ob eine gegebene Sequenz methyliert wird.

[0003] Dies wird derzeit durch das sogenannte Bisulfitverfahren erreicht, das von Frommer, M., et al., Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992) 1827-31, für den Nachweis von 5-Methylcytosinen beschrieben worden ist. Das Bisulfitverfahren zum Kartieren von 5-Methylcytosin verwendet den Effekt, dass Natriumhydrogensulfit mit Cytosin reagiert, aber nicht oder nur schwach mit 5-Methylcytosin. Cytosin reagiert mit Bisulfit zu einem sulfonierten Cytosin-Reaktionszwischenprodukt, das zu Desaminierung neigt, was zu einem sulfonierten Uracil führt, das unter alkalischen Bedingungen zu Uracil desulfoniert werden kann. Es ist allgemein bekannt, dass Uracil, anders als das Edukt Cytosin, das Basenpaarungsverhalten von Thymin aufweist, während 5-Methylcytosin das Basenpaarungsverhalten von Cytosin aufweist. Dies ermöglicht die Unterscheidung von methylierten oder nicht methylierten Cytosinen durch z. B. genomische Bisulfitsequenzierung (Grigg, G., und Clark, S., Biossays 16 (1994) 431-6; Grigg, G. W., DNA Seq 6 (1996) 189-98) oder durch methylierungsspezifische PCR (MSP), die in US 5.786.146 offenbart wird.

[0004] Es gibt unterschiedliche Dokumente, die sich mit spezifischen Aspekten der Bisulfitreaktion befassen. Benyajati, C., et al., Nucleic Acids Res 8 (1980) 5649-67, führen allgemeine Untersuchungen zur Bisulfitmodifikation von 5-Methyldeoxycytosin und Desoxycytosin durch, Olek, A., et al., Nucleic Acids Res 24 (1996) 5064-6 offenbaren ein Verfahren zur Bisulfit-Basensequenzierung, wobei die Bisulfitbehandlung und die anschließenden PCR-Schritte an Material durchgeführt werden, das in Agarosekugeln eingebettet ist. In dem Bisulfitverfahren, das durch Clark, S. J., et al., Nucleic Acids Res 22 (1994) 2990-7, offenbart wird, wird die Probe nach der Desaminierung entsalzt.

[0005] Raizis, A. M., et al., Anal Biochem 226 (1995) 161-6 offenbaren ein Bisulfitverfahren zur Kartierung von 5-Methylcytosin, das einen Abbau der Matrize minimiert. Sie untersuchen den Einfluss von pH-Wert, Temperatur und Reaktionszeit. Ähnliche Untersuchungen sind durch Grunau, C., et al., Nucleic Acids Res 29 (2001) E65-5 oder Warnecke, P. M., et al., Methods 27 (2002) 101-7 durchgeführt worden. Unterschiedliche zusätzliche Bestandteile in dem Bisulfitgemisch werden durch WO 01/98528 oder durch Paulin, R., et al., Nucleic Acids Res 26 (1998) 5009-10 offenbart. Ein zusätzlicher Bisulfitschritt nach Bisulfitbehandlung und PCR wird in WO 02/31186 offenbart. Komiyama, M., und Oshima, S., Tetrahedron Letters 35 (1994) 8185-8188 untersuchen die Katalyse einer Bisulfit-induzierten Desaminierung von Cytosin in Oligodesoxyribonucleotiden.

[0006] Kits zum Durchführen von Bisulfitbehandlungen sind im Handel von Intergen erhältlich, vertrieben von der Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA, z. B. der CpGenome™ DNA-Modifikations-Kit. Hayatsu et al., Chem. Pharm. Bull. 45(8), S. 1363-1368, 1997, offenbaren ein Verfahren zum Umwandeln einer Cytosinbase in einer DNA durch Bisulfitbehandlung in eine Uracilbase. Die DNA wird an Chitosan gebunden.

[0007] Eine Variation des Bisulfit-Genomsequenzierungsverfahrens wird von Feil, R., et al., Nucleic Acids Res

22 (1994) 695-6 offenbart, wobei die genomische DNA nach der Desaminierung an Glaskugeln gebunden und gewaschen wird. Nach der Flution wird die Nucleinsäure desulfoniert. Es ist bekannt, dass Nucleinsäuren durch die Verwendung ihres Bindungsverhaltens an Glasoberflächen, z. B. Adsorption an Kieselgel oder Diatomeenerden, Adsorption an magnetische Glasteilchen (MGPs) oder Organosilanteilchen unter chaotropen Bedingungen, isoliert werden können. Eine Extraktion unter Verwendung von festen Phasen enthält normalerweise die Schritte, die Lösung mit den Nucleinsäuren unter Bedingungen zu der festen Phase zu geben, die ein Binden der Substanz von Interesse an die feste Phase erlauben, Entfernen des Restes der Lösung von den an die feste Phase gebundenen Nucleinsäuren und anschließende Freisetzung der Nucleinsäuren von der festen Phase in ein flüssiges Eluat (manchmal Flution genannt). Das Ergebnis des derartigen Vorgangs ist normalerweise eine Lösung, welche die Substanz von Interesse in aufgelöstem Zustand enthält.

[0008] Alle Verfahren zur Bisulfitbehandlung auf dem Stand der Technik weisen Nachteile auf. Deshalb war das durch die vorliegende Erfindung zu lösende Problem, ein Verfahren bereitzustellen, das die Nachteile der Verfahren des Stands der Technik überwindet.

[0009] Das vorstehend diskutierte Problem wird durch Bereitstellen eines Verfahrens zur Umwandlung einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure durch Bisulfitbehandlung in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, gelöst, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion" oder "Bisulfitbehandlung"), wobei die Nucleinsäure während der Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritte der Bisulfitreaktion an eine feste Phase gebunden ist, wobei die feste Phase aus Glas oder Siliciumdioxid, einem Glas oder Siliciumdioxid umfassenden Material, einem Ionenaustauscher oder Hydroxylapatit, vorzugsweise einem Glasvlies, einer Glasmembran oder einem magnetischen Glasteilchen ausgewählt ist. Ferner offenbart die vorliegende Erfindung Verwendungen einer festen Phase bei dem Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritt der Bisulfitreaktion und Kits für das Durchführen einer Bisulfitreaktion, die eine feste Phase und Reagenzien enthalten.

[0010] Die Verwendung einer festen Phase während des Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion, vorzugsweise im Desulfonierungsschritt, hat den Vorteil, dass die Handhabung einfacher und/oder leicht einer Automatisierung zugänglich ist. Zum Beispiel sind keine zeitaufwändigen DNA-Präzipitationsschritte nötig, wenn Glasvliese für die Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritte verwendet werden; eine Trennung zwischen gebunden und frei kann leicht durch Zentrifugation erreicht werden, das Totvolumen von Glasvlies ist vernachlässigbar und deshalb sind Waschschriffe sehr wirksam. Dies ist ein Vorteil, wenn die Bisulfit-behandelte DNA für eine PCR verwendet wird, wo potenzielle Hemmstoffe die Empfindlichkeit wesentlich reduzieren können. Das erfindungsgemäße Verfahren kann leicht von Hand durchgeführt werden und ist deshalb für kleinere Laboratorien gut geeignet, wo Routineanalysegeräte nicht zur Verfügung stehen. Für größere Laboratorien mit höherem Probendurchsatz ist die Verwendung einer festen Phase, die durch Routineanalysegeräte gehandhabt werden kann, insbesondere magnetischer Glasteilchen, vorteilhaft. Bei einer Routine-Bisulfitreaktion werden denaturierende Bedingungen gewählt, da Bisulfit nur mit Pyrimidinen reagieren kann, die nicht an Basenpaarung beteiligt sind. Deshalb ist es überraschend, dass die Bisulfitreaktion durch das erfindungsgemäße Verfahren auf befriedigende Weise erfolgreich verwendet werden kann, da die Nucleinsäure durch verschiedene Wechselwirkungen, die den Erfolg der Bisulfitreaktion möglicherweise beeinflussen, an die Oberfläche einer festen Phase gebunden ist.

[0011] Gemäß der Erfindung soll der Begriff "Bisulfitreaktion", "Bisulfitbehandlung" oder "Bisulfitverfahren" eine Reaktion zur Umwandlung einer Cytosinbase, insbesondere von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, oder -basen, vorzugsweise in Anwesenheit von Bisulfitionen, bedeuten, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden. Diese Reaktion zum Nachweis methylierter Cytosine wird von Frommer et al., vorstehend, und Grigg und Clark, vorstehend, ausführlich beschrieben. Die Bisulfitreaktion enthält einen Desaminierungsschritt und einen Desulfonierungsschritt, die getrennt oder gleichzeitig ausgeführt werden können (siehe [Abb. 1](#), Grigg und Clark, vorstehend). Die Feststellung, dass 5-Methylcytosinbasen nicht wesentlich umgewandelt werden, soll nur die Tatsache berücksichtigen, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein kleiner Prozentsatz von 5-Methylcytosinbasen in Uracil umgewandelt wird, obwohl beabsichtigt ist, nur und ausschließlich die (nicht methylierten) Cytosinbasen umzuwandeln (Frommer et al., vorstehend).

[0012] Das erfindungsgemäße Verfahren kann in mehreren Anordnungen von Bisulfitreaktions- und Immobilisierungsschritten durchgeführt werden. In einer ersten Ausführungsform wird der Desaminierungs- und Desulfonierungsschritt durchgeführt, während die Nucleinsäure an die feste Phase gebunden ist. Deshalb wird in einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ein Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, offen-

bart ("Bisulfitreaktion"), wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden, umfassend die Schritte

- a) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase,
- b) Inkubieren der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfiten, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
- c) gegebenenfalls Waschen der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- d) Inkubieren der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird,
- e) gegebenenfalls Waschen der desaminierten und desulfonierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und
- f) gegebenenfalls Eluieren der desaminierten und desulfonierten Nucleinsäure von der festen Phase.

[0013] In einer zweiten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird der Desulfonierungsschritt durchgeführt, während die Nucleinsäure an die feste Phase gebunden ist. Deshalb wird in einer anderen bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ein Verfahren zum Umwandeln einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, offenbart ("Bisulfitreaktion"), wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden, umfassend die Schritte

- a) Inkubieren der Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfiten, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
- b) Binden der desaminierten Nucleinsäure an eine feste Phase,
- c) gegebenenfalls Waschen der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- d) Inkubieren der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird,
- e) gegebenenfalls Waschen der desaminierten und desulfonierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und
- f) gegebenenfalls Eluieren der desaminierten und desulfonierten Nucleinsäure von der festen Phase.

[0014] In einer dritten Ausführungsform wird der Desaminierungsschritt durchgeführt, während die Nucleinsäure an die feste Phase gebunden ist. Deshalb wird in einer anderen bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ein Verfahren zum Umwandeln einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, offenbart, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion"), umfassend die Schritte

- a) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase,
- b) Inkubieren der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfiten, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
- c) gegebenenfalls Waschen der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- d) Eluieren der desaminierten Nucleinsäure von der festen Phase,
- e) Inkubieren der desaminierten Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird.

[0015] Der Fachmann weiß, wie die Bisulfitreaktion durchgeführt wird, z. B. indem er sich auf Frommer et al., vorstehend, oder Grigg und Clark, vorstehend, bezieht, die die Hauptparameter der Bisulfitreaktion offenbaren. Von Grunau et al., vorstehend, her ist dem Fachmann bekannt, welche Variationen des Bisulfitverfahrens möglich sind. Der Einfluss von Inkubationszeit und Temperatur auf die Desaminierungseffizienz und auf Parameter, welche den DNA-Abbau beeinflussen, wird offenbart. Zusammengefasst werden beim Desaminierungsschritt ein Bisulfiten enthaltender Puffer, gegebenenfalls chaotrope Mittel und gegebenenfalls weitere Reagenzien, wie ein Alkohol oder Stabilisatoren wie Hydrochinon, eingesetzt und der pH-Wert liegt im sauren Bereich. Die Bisulfitkonzentration liegt zwischen 0,1 und 6 M Bisulfit, vorzugsweise 1 M bis 5,5 M, die Konzentration des chaotropen Mittels liegt zwischen 1 und 8 M, wobei Guanidiniumsalze vorzugsweise eingesetzt werden, der pH-Wert liegt im sauren Bereich, vorzugsweise zwischen 4,5 und 6,5, die Temperatur liegt zwischen 0°C und 90°C, vorzugsweise zwischen Raumtemperatur (25°C) und 90°C, und die Reaktionszeit liegt zwischen 30 min und 24 Stunden oder 48 Stunden oder sogar länger, aber vorzugsweise zwischen 1 Stunde und 24 Stunden. Der Desulfonierungsschritt wird durch Zugeben einer alkalischen Lösung oder eines alkalischen Puffers wie z. B. einer Lösung, die nur ein Hydroxid, z. B. Natriumhydroxid, oder eine Lösung, die Ethanol, Natriumchlorid und Natriumhydroxid (z. B. 38% EtOH, 100 mM NaCl, 200 mM NaOH) enthält und Inkubieren bei Raumtemperatur oder erhöhten Temperaturen über einige min, vorzugsweise 5 min bis 60 min hinweg, durchgeführt.

[0016] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform handelt es sich bei der Nucleinsäure um Desoxyribonucleinsäure (DNA), insbesondere um genomische DNA oder Nucleinsäure, d. h. um die DNA oder Nucleinsäure, die im Genom des Organismus gefunden wird und als zum Überleben nötige Information an Nachkommen weitergegeben wird. Der Ausdruck wird verwendet, um zwischen anderen Arten von DNA, wie sie zum

Beispiel in Plasmiden gefunden wird, zu unterscheiden. Die Quelle der Nucleinsäure kann eukaryotisch oder prokaryotisch sein, vorzugsweise von Vertebraten, besonders von Säugern, am meisten bevorzugt von Tieren oder Menschen.

[0017] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die Nucleinsäure an die feste Phase, die unmodifiziert ist, gebunden, d. h. die Nucleinsäure ist direkt gebunden, ohne eine Verbindung, die das Binden an die feste Phase vermittelt. Die Nucleinsäure bindet an die unmodifizierte Oberfläche der festen Phase, wobei Binden an die Oberfläche auch berücksichtigen soll, dass die feste Phase Poren enthalten kann und dass die Nucleinsäure an Oberflächen in Poren der festen Phase gebunden sein kann. In der Erfindung handelt es sich bei der festen Phase um einen Ionenaustauscher (im Handel z. B. von Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland, erhältlich), der fähig ist, eine Nucleinsäure unter spezifischen Bedingungen zu binden, Hydroxylapatit (im Handel von Sigma, Taufkirchen, Deutschland, erhältlich), Glas oder Siliciumdioxid oder Glas oder Siliciumdioxid umfassende Materialien, vorzugsweise mit einer unmodifizierten Oberfläche. In einer anderen Ausführungsform kann die feste Phase modifiziert sein, d. h. die feste Phase bindet die Nucleinsäure indirekt, mit einer Verbindung, die das Binden an die feste Phase vermittelt, z. B. durch sequenzspezifisches Binden der Nucleinsäure an Oligonucleotide, die an der Oberfläche befestigt sind, oder Streptavidin (an der Oberfläche der festen Phase befestigt), das an Biotin-markierte DNA bindet. Geeignete Teilchen dafür sind im Handel von DYNAL, Oslo, Norwegen, erhältlich und werden z. B. in WO 90/06045 beschrieben.

[0018] Der Begriff "unmodifiziert" soll bedeuten, dass es keine weitere chemische Modifikation gibt, d. h. keine anderen chemischen Gruppen sind kovalent oder nicht kovalent befestigt. Der Begriff "unmodifizierte Oberfläche", "unmodifizierte Siliciumdioxidoberfläche" oder "unmodifizierte Glasoberfläche" soll bedeuten, dass keine anderen chemischen Gruppen kovalent oder nicht kovalent befestigt sind, die als Zwischensubstanz für eine Nucleinsäurebindung dienen und wo die Nucleinsäuren an die Zwischensubstanz und nicht an die Siliciumdioxidoberfläche selbst binden. Deshalb binden die Nucleinsäuren vorzugsweise durch Wasserstoffbindung und andere atomare Kräfte direkt an die "unmodifizierte Oberfläche". Ein Beispiel für eine modifizierte Oberfläche sind Siliciumdioxidoberflächen, an denen Oligonucleotide befestigt sind, die Nucleinsäuremoleküle auf sequenzspezifische Weise binden. Ein anderes Beispiel für modifizierte Siliciumdioxidoberflächen sind Siliciumdioxidoberflächen, die mit Streptavidin überzogen sind, das an biotinylierte DNA-Moleküle bindet.

[0019] In einer besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform handelt es sich bei der festen Phase um ein Glas oder Siliciumdioxid umfassendes Material, vorzugsweise mit einer unmodifizierten Oberfläche (aus Glas oder Siliciumdioxid), z. B. Glasfasern oder Diatomeenerde, Glaskugeln oder -teilchen, Glasmembranen oder magnetische Glasteilchen, oder andere Substanzen, die mit einer unmodifizierten Glasoberfläche überzogen sind. Besonders bevorzugt werden Glasvliese oder Glasmembranen oder magnetische Glasteilchen. Derartige feste Phasen werden z. B. in EP 0 389 063 oder US 5.234.809 offenbart.

[0020] Die Bedingungen für das Binden von DNA oder Nucleinsäuren an Glas- oder Siliciumdioxidoberflächen sind dem Fachmann im Prinzip bekannt. Diese Vorgänge werden ausführlich durch verschiedene Dokumente beschrieben. In Vogelstein, B., und Gillespie, D., Proc Natl Acad Sci USA 76 (1979) 615-9, wird zum Beispiel ein Verfahren zum Binden von Nucleinsäuren aus Agarosegelen an gemahlene Flintglas in Anwesenheit von Natriumiodid vorgeschlagen. Die Reinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien auf Glasstaub in Anwesenheit von Natriumperchlorat wird in Marko, M. A., et al., Anal Biochem 121 (1982) 382-7, beschrieben. In DE-A 37 34 442 wird die Isolierung von einzelsträngiger DNA des Phagen M13 auf Glasfaserfiltern durch Präzipitieren von Phagenteilchen unter Verwendung von Essigsäure und Lyse der Phagenteilchen mit Perchlorat beschrieben. Die an die Glasfaserfilter gebundenen Nucleinsäuren werden gewaschen und dann mit einem Methanol enthaltenden Tris/EDTA-Puffer eluiert. Ein ähnliches Verfahren zum Reinigen von DNA aus Lambda-Phagen wird in Jakobi, R., et al., Anal Biochem 175 (1988) 196-201, beschrieben. Das Verfahren bringt das selektive Binden von Nucleinsäuren an Glasoberflächen in chaotropen Salzlösungen und Trennen der Nucleinsäuren von Verunreinigungen wie zum Beispiel Agarose, Proteinen oder Zellresten mit sich. Um die Glasteilchen von den Verunreinigungen zu trennen, können die Teilchen entweder zentrifugiert werden, oder Flüssigkeiten werden durch Glasfaserfilter gezogen. Dies ist jedoch ein limitierender Schritt, der die Verwendung des Verfahrens zum Verarbeiten großer Probenmengen verhindert. In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform werden magnetische Glasteilchen verwendet, um die Nucleinsäuren nach einer Präzipitation durch Zugabe von Salz und Ethanol, wie z. B. in Alderton, R. P., et al., Anal Biochem 201 (1992) 166-9 und WO 91/12079 (PCT GB 91/00212) beschrieben, zu binden.

[0021] In einer sehr bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform handelt es sich bei der festen Phase um ein magnetisches Glasteilchen, vorzugsweise mit einer unmodifizierten Glasoberfläche. Bei den magnetischen Glasteilchen handelt es sich um eine feste Dispersion von kleinen magnetischen Kernen in Glas, d. h.

es handelt sich um Glaströpfchen, in denen sehr kleine magnetische Gegenstände dispergiert sind. Diejenigen Gegenstände, die man als magnetisch bezeichnet, werden zu einem Magneten, d. h. zum Beispiel ferri- oder ferromagnetischen oder superparamagnetischen Materialien, gezogen. Paramagnetische Substanzen sind nicht nützlich, da sie nur sehr schwach zu einem Magneten gezogen werden, was für ein erfindungsgemäßes Verfahren nicht ausreicht. Bevorzugt werden ferri- oder ferromagnetische Materialien, insbesondere wenn sie noch nicht vormagnetisiert worden sind. Vormagnetisierung soll in diesem Zusammenhang das In-Kontakt-Bringen mit einem Magneten bedeuten, was die Remanenz erhöht. Bevorzugte magnetische Materialien sind Eisen oder Eisenoxid, wie zum Beispiel Magnetit (Fe_3O_4) oder Fe_2O_3 , vorzugsweise $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Im Prinzip könnten Bariumferrit, Nickel, Kobalt, Al-Ni-Fe-Co-Legierungen oder andere ferri- oder ferromagnetische Materialien verwendet werden. Besonders bevorzugt gemäß der vorliegenden Erfindung sind die in WO 96/41811, WO 00/32762 und WO 01/37291 beschriebenen magnetischen Glasteilchen.

[0022] In einer sehr bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform haben die magnetischen Glasteilchen eine geringe Eisenauslaugung, da es sich bei Eisen um einen Hemmstoff der anschließenden Amplifikationsreaktion handelt, d. h. Eisen ist ein enzymatischer Hemmstoff. Deshalb ist dies ein wichtiges Merkmal der magnetischen Glasteilchen. Vorzugsweise liegt die Eisenauslaugung in Wasser oder 1 M HCl (20 min lang) unterhalb von 40 ppm, stärker bevorzugt unterhalb von 20 ppm, am stärksten bevorzugt unterhalb von 10 ppm. In der am stärksten bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform handelt es sich bei den magnetischen Glasteilchen um diejenigen, die in der internationalen Anmeldung WO 01/37291 beschrieben werden, die im MagNA Pure LC DNA-Isolierungskit I (Roche, Mannheim, Deutschland) auch öffentlich erhältlich sind. Diese Teilchen sedimentieren langsam und können deshalb zweckmäßigerweise in einem erfindungsgemäßen automatisierten Verfahren verwendet werden. Die Herstellung davon wird nachstehend zusammengefasst.

[0023] Die magnetischen Glasteilchen sind im Wesentlichen kugelförmig und haben einen kleinen Durchmesser und enthalten mindestens einen magnetischen Gegenstand mit einem Durchmesser zwischen 5 und 500 nm. Dies hat überraschende Konsequenzen für die Sedimentationskinetik, die durch die Halbwertszeit $t_{1/2}$ quantifiziert wird, bei der es sich um die Zeitspanne handelt, bis 50% der Teilchen aus einem bestimmten Volumenelement sedimentiert sind. Die Halbwertszeit für die Sedimentation einer Suspension von 3 mg/ml Gewicht pro Volumen der erfindungsgemäßen MGPs mit einer unmodifizierten Oberfläche in Isopropanol beträgt mehr als 3 min, vorzugsweise 4 min, stärker bevorzugt 6 min. Die am stärksten bevorzugten Werte für die Halbwertszeit betragen jedoch mehr als 10 min oder sogar mehr als 20 min. Bei den magnetischen Gegenständen der am stärksten bevorzugten MGPs kann es sich z. B. um ein magnetisches Pigment handeln. Die Größe der magnetischen Gegenstände liegt im Nano-Bereich, d. h. zwischen 5 und 500 nm, vorzugsweise zwischen 10 und 200 nm, am stärksten bevorzugt zwischen 15 und 50 nm. Geeignete magnetische Pigmente werden von der Firma CERAC hergestellt, die einen mittleren Durchmesser von 23 nm aufweisen und aus $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ bestehen (BET-Oberfläche 50 m^2/g , CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178 USA; Artikelnr. I-2012). Die am stärksten bevorzugten erfindungsgemäßen magnetischen Glasteilchen werden ferner durch die Tatsache gekennzeichnet, dass die MGPs einen Teilchendurchmesser zwischen 0,5 μm und 5 μm , vorzugsweise zwischen 1 μm und 2 μm , wie durch Hochoptischen-Scanning-Elektronenmikroskopie bestimmt wird, aufweisen, während die magnetischen Gegenstände, wie vorstehend beschrieben, einen Durchmesser zwischen 5 und 500 nm, vorzugsweise zwischen 10 und 200 nm, am stärksten bevorzugt im Bereich von 15 bis 50 nm aufweisen. Daher sind die MGPs ferner durch ein Durchmesser Verhältnis von magnetischem Pigmentkern zu magnetischem Glasteilchen von weniger als 1 bis 10 gekennzeichnet, wie durch Hochoptischen-Scanning-Elektronenmikroskopie bestimmt wird. Die am stärksten bevorzugten MGPs sind mikroporös, haben aber eine hoch strukturierte und deshalb relativ große Oberfläche von mehr als 6 m^2/g . Vorzugsweise weisen die magnetischen Glasteilchen eine Oberfläche im Bereich von 5 bis 100 m^2/g , vorzugsweise 5 bis 90 m^2/g , stärker bevorzugt im Bereich von 10 bis 50 m^2/g , am stärksten bevorzugt im Bereich von 15 bis 30 m^2/g auf. Dies kann durch das Braunauer-Emett-Teller-Verfahren unter Verwendung eines automatisierten, im Handel erhältlichen Gerätes bestimmt werden. Für eine Diskussion dieses Verfahrens, das geläufig das BET-Verfahren genannt wird, siehe Braunauer, in "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943), Princeton University Press.

[0024] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten magnetischen Glasteilchen können in unterschiedlichen Formulierungen, im Wesentlichen wie in WO 01/37291 beschrieben, bereitgestellt werden. Es ist möglich, sie in Form einer Tablette, als Pulver oder vorzugsweise als Suspension bereitzustellen. In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform enthalten diese Suspensionen zwischen 5 und 60 mg/ml magnetische Glasteilchen (MGPs). In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Siliciumdioxid enthaltende Material in wässrigen gepufferten Lösungen suspendiert, die gegebenenfalls ein chaotropes Mittel in einer Konzentration zwischen 2 und 8 mol/l und vorzugsweise zwischen 4 und 6 mol/l enthalten können. Chaotrope Salze sind Natriumiodid, Natriumperchlorat, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidi-

niumhydrochlorid. Ein erfindungsgemäßes chaotropes Mittel ist jeder chemische Stoff, der die geordnete Struktur von flüssigem Wasser stört und den Effekt hat, dass DNA oder RNA an die erfindungsgemäßen MGPs bindet, falls dieses Mittel in der DNA oder RNA enthaltenden Lösung vorliegt. Andere dem Fachmann bekannte Verbindungen sind auch möglich.

[0025] In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform werden die magnetischen Glasteilchen durch das in WO 01/37291, WO 00/37291 und insbesondere WO 96/41811 beschriebene Sol-Gel-Verfahren hergestellt, wobei das Sol-Gel-Verfahren die Schritte umfasst:

- magnetische Gegenstände in einem Sol zu suspendieren,
- das Sol zu hydrolysieren, um die magnetischen Gegenstände mit einem Gel zu überziehen,
- die mit einem Gel überzogenen magnetischen Gegenstände in einem Sprühtrockner mit zwei Düsen zu trocknen und
- das sprühgetrocknete Pulver zu sintern, um aus dem Gel, das die magnetischen Gegenstände überzieht, ein Glas zu bilden.

[0026] Bevorzugte erfindungsgemäße MGPs sind magnetische Glasteilchen, die gemäß Beispiel 8 von WO 00/32762 hergestellt werden, die Microna Matte Schwarz als magnetisches Pigment enthalten. Die am stärksten bevorzugten erfindungsgemäßen MGPs werden gemäß der internationalen Anmeldung WO 01/37291 hergestellt, die auch in dem MagNA Pure LC DNA-Isolierungskit I (Roche, Mannheim, Deutschland) bereitgestellt werden. Sie werden auch durch das Sol-Gel-Verfahren, wie in der internationalen Anmeldung WO 01/37291 beschrieben, unter Verwendung magnetischer Gegenstände oder Pigmente mit einem Durchmesser von etwa 23 nm hergestellt (hergestellt von CERAC, bestehend aus $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178 USA; Artikelnr. I-2012). Nachdem die magnetischen Gegenstände mit einem Gel überzogen worden sind, wird durch Versprühen der Aufschlämmung durch eine Düse für zwei Flüssigkeiten ein Pulver erzeugt. Geeignete Sprühtrocknungssysteme werden von Nubilosa Molekularzerstäubung, Ladisch GmbH & Co. KG, Konstanz, Deutschland, z. B. der "Labor-Zerstäubungstrockner (Typ LTK)" oder von Büchi AG, Uster, Schweiz, z. B. der Mini-Sprühtrockner (Typ B-191) hergestellt. Da die Durchmesserhältnisse von magnetischen Kernen zu der Glashülle weniger als 1 zu 10, vorzugsweise zwischen 1 : 10 und 1 : 1000, betragen, bestimmen nicht die Geometrie und die Anzahl der eingebauten magnetischen Kerne oder ihrer inerten Träger Form und Größe der Teilchen, sondern die Herstellungsbedingungen, insbesondere die Bedingungen während der Sprühtrocknung. Mit anderen Worten, die Wahl von Druck, Eintrittstemperatur, Austrittstemperatur und Durchflussgeschwindigkeit während des Sprühtrocknungsverfahrens sind die Freiheitsgrade, welche die Größenverteilung, die Form der Glastropfen bestimmen und dadurch die MGPs modifizieren. Deshalb werden die Düsen des Sprühtrocknungssystems erwärmt. Die Eintrittstemperatur liegt zwischen 120°C und 500°C, vorzugsweise zwischen 170°C und 230°C oder 150°C und 230°C, am stärksten bevorzugt zwischen 150°C und 200°C oder 190°C und 210°C oder bei 200°C oder etwas weniger. Die Austrittstemperatur hängt vom Siedepunkt des Sols und dadurch vom Lösungsmittel ab und kann oberhalb von, gleich oder etwas unter, d. h. weniger als 10°C, des Siedepunkts des Lösungsmittels liegen. Wenn Ethanol als Lösungsmittel verwendet wird, liegt sie zwischen 50°C und 300°C, vorzugsweise 70°C und 150°C, am stärksten bevorzugt zwischen 80°C und 110°C. Die optimale Temperatur liegt zwischen 90°C und 100°C. Der Düsendruck beträgt mehr als 3 bar, vorzugsweise wird er auf 4 bis 6 bar reguliert. Dem Fachmann wird die Tatsache selbstverständlich sein, dass die genauen Parameter von dem verwendeten Sprühtrocknungssystem abhängen. Er kann die Lehren der vorliegenden Erfindung jedoch auf jedes andere Sprühtrocknungssystem übertragen und die Parameter herausfinden, indem er die Offenbarungen dieser Erfindung berücksichtigt. Formeln, wie sie in Masters: "Spray Drying Handbook" (1991), John Wiley & Sons, New York, beschrieben sind, können ihn anleiten, damit er herausfindet, welche Parameter für eine andere Einstellung gewählt werden müssen. Vorzugsweise befragt er die Handbücher seines Sprühtrocknungssystems oder er kontaktiert den technischen Service des Herstellers des Sprühtrocknungssystems. Um die Ausbeute zu optimieren, sollte die Verdichtungs- oder Sintertemperatur so hoch wie möglich liegen, d. h. wenig unterhalb des Schmelzbereiches. Die genauen Temperaturen hängen von der Glaszusammensetzung ab, können aber zwischen 400°C und 1200°C liegen. Im Falle der in WO 01/37291 beschriebenen EJ-Glaszusammensetzung liegt die Sintertemperatur zwischen 720°C und 770°C, vorzugsweise um 750°C. Es liegt in der Fähigkeit des Fachmanns, unter Berücksichtigung der Lehren der vorliegenden Erfindung die Temperaturen für jede Glaszusammensetzung herauszufinden. Danach wird das Pulver 1 Stunde lang auf 200°C erwärmt, gegebenenfalls auf Raumtemperatur abgekühlt und in einer Stickstoffatmosphäre bei einer Erwärmungsgeschwindigkeit von 1 K/min auf 750°C (Verdichtungs- oder Sintertemperatur) erwärmt und wird 1 Stunde lang bei dieser Temperatur gehalten. Dann wird der Ofen auf 150°C abgekühlt und wieder eine Stunde lang in Luft auf 200°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Pulver auf ein Sieb (50 μm) übertragen und 30 min lang gesiebt. Die gesiebte Probe wird in eine Flasche gefüllt und bei 200°C 4 h lang sterilisiert und dann auf 80°C abgekühlt. Dann werden die Glasgefäße aus dem Ofen genommen, mit steriler Folie überzogen und geschlossen.

[0027] Das experimentelle Verfahren zum Binden der Nucleinsäure an unmodifizierte Glas- oder Siliciumdioxidoberflächen (vorzugsweise von den magnetischen Glasteilchen) kann folgendermaßen ausführlich beschrieben werden. Es wird vorzugsweise in Anwesenheit chaotroper Salze bei einer Konzentration zwischen 1 und 8 mol/l, und vorzugsweise zwischen 2 und 6 mol/l durchgeführt. Bei chaotropen Salzen kann es sich um Natriumiodid, Natriumperchlorat, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid handeln. Ein erfindungsgemäßes chaotropes Mittel ist jeder chemische Stoff, der die geordnete Struktur von flüssigem Wasser stört und den Effekt hat, dass DNA (oder RNA) an die magnetischen Glasteilchen bindet, falls dieses Mittel in der DNA (oder RNA) enthaltenden Lösung vorliegt. Andere dem Fachmann bekannte biologische Substanzen können auch vorliegen. Noch andere Substanzen sind auch möglich. Um das Gemisch von Nucleinsäuren und gegebenenfalls anderen biologischen Verbindungen zu binden, werden die Glaskugeln mit einer unmodifizierten Glasoberfläche zu dem Gemisch gegeben und über einen Zeitraum hinweg inkubiert, der ausreicht, damit Bindung stattfindet. Fachleuten ist die Dauer des Inkubationsschrittes normalerweise geläufig. Dieser Schritt kann durch Bestimmen der Menge immobilisierter Nucleinsäuren auf der Oberfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten optimiert werden. Inkubationszeiten zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten können für Nucleinsäuren geeignet sein. Dann werden die Reagenzien zum Durchführen der unterschiedlichen Schritte der Bisulfitreaktion zugegeben (oder sie können sogar vorher vorgelegen haben). Nach Inkubation oder Waschen können die Nucleinsäuren von der Flüssigkeit getrennt werden. Dies kann im Allgemeinen durch Schwerkraft oder im günstigen Falle von Nucleinsäuren, die an magnetische Glasteilchen gebunden sind, durch Trennen der an die magnetischen Glasteilchen gebundenen Nucleinsäuren durch Anwenden eines Magnetfeldes erreicht werden. Zum Beispiel können die magnetischen Teilchen an die Wand des Gefäßes gezogen werden, in dem die Inkubation durchgeführt wurde. Die Flüssigkeit, welche die biologischen Verbindungen oder Reaktionsbestandteile enthält, die nicht an die magnetischen Teilchen gebunden waren, kann dann entfernt werden. Die verwendete Vorgehensweise für das Entfernen hängt von der Art des Gefäßes ab, in dem die Inkubation durchgeführt wurde. Geeignete Schritte schließen ein Entfernen der Flüssigkeit mittels Pipettieren oder Absaugen ein. Das Material mit der gebundenen Nucleinsäure kann dann mindestens einmal gewaschen werden, vorzugsweise mit einem Gemisch von 70 Volumenanteilen Ethanol mit 30 Volumenanteilen Wasser ("70% Ethanol") oder in einer sauren Waschlösung, wie in WO 99/40098 beschrieben. Es wird eine Waschlösung verwendet, welche nicht verursacht, dass die Nucleinsäuren und die Zielnucleinsäure von der Materialoberfläche freigesetzt werden, sondern welche die unerwünschten Verunreinigungen so sorgfältig wie möglich wegwäscht. Dieser Waschschrift findet vorzugsweise durch Inkubieren des Glases oder Siliciumdioxids mit der gebundenen Nucleinsäure statt. Das Material wird während dieses Schrittes vorzugsweise resuspendiert. Die verunreinigte Waschlösung wird vorzugsweise genau wie im vorstehend beschriebenen Bindungsschritt entfernt. Nach dem letzten Waschschrift kann das Material kurz in einem Vakuum getrocknet werden, oder man kann die Flüssigkeit verdampfen lassen. Ein Vorbehandlungsschritt unter Verwendung von Aceton kann auch durchgeführt werden.

[0028] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Nucleinsäure unter Verwendung von den erfindungsgemäßen festen Phasen und von dem Fachmann bekannten Verfahren aus einer biologischen Probe erhalten. Die biologische Probe umfasst Zellen von multizellulären Organismen wie z. B. menschliche und tierische Zellen, wie z. B. Leukozyten, und immunologisch aktive chemische Verbindungen mit niedrigem und hohem Molekulargewicht, wie z. B. Haptene, Antigen, Antikörper und Nucleinsäuren, Blutplasma, Hirnflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Biopsieproben, Knochenmark, Mundspülungen, Blutserum, Gewebe, Urin oder Gemische davon. In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform handelt es sich bei der biologischen Probe um eine Flüssigkeit aus dem menschlichen oder tierischen Körper. Vorzugsweise handelt es sich bei der biologischen Flüssigkeit um Blut, Blutplasma, Blutserum oder Urin. Das Blutplasma ist vorzugsweise EDTA-, Heparin- oder Citrat-behandeltes Blutplasma. Die biologische Probe, welche die Nucleinsäuren umfasst, wird lysiert, um ein Gemisch biologischer Verbindungen, umfassend Nucleinsäuren und andere Bestandteile, zu erzeugen. Verfahren zum Lysieren biologischer Proben sind dem Fachmann bekannt und können chemischer, enzymatischer oder physikalischer Art sein. Eine Kombination dieser Verfahren ist ebenfalls anwendbar. Zum Beispiel kann eine Lyse unter Verwendung von Ultraschall, Hochdruck, Scherkräften, Alkali, Detergenzien oder chaotropen Kochsalzlösungen oder Proteasen oder Lipasen durchgeführt werden. Damit bei dem Lyseverfahren Nucleinsäuren erhalten werden, wird speziell auf Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, und Ausubel et al.: *Current Protocols in Molecular Biology 1987*, J. Wiley und Sons, NY, verwiesen. Dann werden die Nucleinsäuren aus dem Lysegemisch unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren und festen Phasen isoliert und können dann den erfindungsgemäßen Verfahren, d. h. der erfindungsgemäßen Bisulfitbehandlung, unterworfen werden. Chaotrope Mittel werden auch verwendet, um Zellen zu lysieren, um ein Gemisch aus Nucleinsäuren und anderen biologischen Substanzen herzustellen (siehe z. B. Sambrook et al. (1989) oder EP 0 389 063). Danach wird das Glas oder Siliciumdioxid umfassende Material zugegeben und eine Reinigungswirkung ergibt sich aus dem Verhalten von DNA oder RNA, Material mit einer Glasoberfläche unter diesen Bedingungen, d.

h. in Anwesenheit bestimmter Konzentrationen eines chaotropen Mittels, höheren Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln oder unter sauren Bedingungen, zu binden. Deshalb zieht die vorliegende Erfindung auch die Kombination von Lyseschritten und der Bisulfitreaktion in Betracht, d. h. die Nucleinsäure, die aus dem Gemisch aus Nucleinsäuren und anderen biologischen Substanzen isoliert wurde, wird direkt der Bisulfitbehandlung unterworfen, wobei die Nucleinsäure während des Desaminierungs- und/oder des Desulfonierungsschrittes an eine feste Phase gebunden ist. Ausführlicher gesagt, ein Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, wird bereitgestellt, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion" oder "Bisulfitbehandlung"), wobei die Nucleinsäure aus einem Gemisch, umfassend eine Nucleinsäure und andere biologische Verbindungen, isoliert wird, indem sie an eine feste Phase, vorzugsweise ein Glas oder Siliciumdioxid umfassendes Material, gebunden wird und während des Desaminierungs- und/oder des Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion an die feste Phase gebunden bleibt. Noch ausführlicher gesagt, ein Verfahren wird bereitgestellt, wobei die Nucleinsäure aus einem Gemisch einer Nucleinsäure und anderen biologischen Verbindungen isoliert und während des Desaminierungs- und des Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion an eine feste Phase gebunden wird, d. h. es wird ein Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, bereitgestellt, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion" oder "Bisulfitbehandlung"), umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Gemisches einer Nucleinsäure und anderer biologischer Verbindungen,
- (b) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase, gegebenenfalls Entfernen der anderen biologischen Verbindungen und gegebenenfalls Waschen der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- (c) Inkubieren der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfitionen, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
- (d) gegebenenfalls Waschen der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- (e) Inkubieren der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird,
- (f) gegebenenfalls Waschen der desaminierten und desulfonierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und
- (g) gegebenenfalls Eluieren der desaminierten und desulfonierten Nucleinsäure von der festen Phase.

[0029] In einer anderen Ausführungsform wird ein Verfahren bereitgestellt, bei dem die Nucleinsäure aus einem Gemisch einer Nucleinsäure und anderer biologischer Verbindungen isoliert wird und während des Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion an eine feste Phase gebunden wird, d. h. es wird ein Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, bereitgestellt, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion" oder "Bisulfitbehandlung"), umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Gemisches einer Nucleinsäure und anderer biologischer Verbindungen,
- (b) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase, gegebenenfalls Entfernen der anderen biologischen Verbindungen, gegebenenfalls Waschen der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und Eluieren der Nucleinsäure von der festen Phase,
- (c) Inkubieren der eluierten Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfitionen, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
- (d) Binden der desaminierten Nucleinsäure an eine feste Phase,
- (e) gegebenenfalls Waschen der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- (f) Inkubieren der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird,
- (g) gegebenenfalls Waschen der desaminierten und desulfonierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und
- (h) gegebenenfalls Eluieren der desaminierten und desulfonierten Nucleinsäure von der festen Phase.

[0030] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein Verfahren bereitgestellt, wobei die Nucleinsäure aus einem Gemisch einer Nucleinsäure und anderer biologischer Verbindungen isoliert und während des Desaminierungsschrittes der Bisulfitreaktion an eine feste Phase gebunden wird, d. h. es wird ein Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase, vorzugsweise von Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, bereitgestellt, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion" oder "Bisulfitbehandlung"), umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Gemisches einer Nucleinsäure und anderer biologischer Verbindungen,
- (b) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase, gegebenenfalls Entfernen der anderen biologischen Verbindungen, gegebenenfalls Waschen der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- (c) Inkubieren der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfitionen, wobei die

Nucleinsäure desaminiert wird,

(d) gegebenenfalls Waschen der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,

(e) Eluieren der desaminierten Nucleinsäure von der festen Phase,

(f) Inkubieren der desaminierten Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird.

[0031] Das bevorzugte erfindungsgemäße Verfahren umfasst ferner den Schritt, die gebundene Nucleinsäure von der festen Phase zu eluieren. Dann kann die Nucleinsäure z. B. amplifiziert werden. Damit Flution stattfindet, wird das Glas oder Siliciumdioxid umfassende Material (mit der unmodifizierten Siliciumdioxidoberfläche) in einer Lösung mit keinem oder nur einer geringen Menge von chaotropem Mittel und/oder organischem Lösungsmittel resuspendiert. Alternativ dazu kann die Suspension mit einer Lösung mit keinem oder nur einer geringen Menge von chaotropem Mittel und/oder organischem Lösungsmittel verdünnt werden. Puffer dieser Art sind von DE 3724442 und Jakobi et al., vorstehend, bekannt. Bei Elutionspuffern mit einem geringen Salzgehalt handelt es sich insbesondere um Puffer mit einem Gehalt von weniger als 0,2 mol/l. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der Puffer die Substanz Tris zum Zweck des Pufferns, insbesondere eine Tris-gepufferte Lösung mit einem pH-Wert um 7 oder über 7. In einer anderen speziellen Ausführungsform handelt es sich bei dem Elutionspuffer um entmineralisiertes Wasser. Die Lösung, welche die Nucleinsäure enthält, ist nun bereit, in der Amplifikationsreaktion verwendet zu werden, nachdem die feste Phase entfernt worden ist. Deshalb wird die Nucleinsäure in ein neues Reaktionsröhrchen übertragen, das alle zur Amplifikation nötigen Reagenzien enthält. Gegebenenfalls wird eine Lösung, die alle zur Amplifikation nötigen Reagenzien enthält, zu der Suspension der festen Phase und der freigesetzten Nucleinsäuren zugegeben. In einer anderen Ausführungsform wird eine Lösung, die alle zur Amplifikation nötigen Reagenzien enthält, ohne Elutionsschritt zu der Suspension der festen Phase und der gebundenen Nucleinsäure gegeben, wodurch eine Amplifikation der Nucleinsäure auf der festen Phase durchgeführt wird.

[0032] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden für Wasch- und Bindschritte vorzugsweise Flüssigkeiten verwendet, die für Verfahren in der Molekularbiologie geeignet sind, insbesondere Reinigungsverfahren für Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA), die das Binden dieser Substanzen an eine feste Phase, insbesondere Siliciumdioxid- oder Glasoberflächen, ganz besonders magnetische Glasteilchen, unter bestimmten Bedingungen nutzen. Bevorzugte Flüssigkeiten umfassen Alkohole und/oder Ketone oder jedes Gemisch davon mit Wasser. Alkohole sollen erfindungsgemäß vorzugsweise primäre, sekundäre oder tertiäre Alkohole der allgemeinen Formel R-OH einschließen, wobei R für die allgemeine Formel $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ mit $n \geq 0$ steht. Andere Alkohole können jedoch auch verwendet werden, wenn sie für Molekularbiologiezwecke geeignet sind, wie z. B. Glycerin. Besonders geeignet sind die Alkohole Isopropanol, Ethanol oder Gemische davon mit Wasser, vorzugsweise ein Gemisch von 80 Volumenanteilen Isopropanol mit 20 Volumenanteilen Wasser. In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform umfasst die Flüssigkeit Ketone, wie z. B. Aceton. Ferner werden geeignete wässrige, gepufferte Lösungen verwendet. Puffersysteme, die für Molekularbiologiezwecke geeignet sind, können z. B. in Sambrook, J., et al., in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Hrsg. J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, gefunden werden. Bevorzugte Pufferstoffe sind Trishydroxymethylamin (TRIS), Phosphat, N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), Salze davon oder andere geeignete Substanzen. Zusätzlich können Substanzen vorliegen, welche die Ionenstärke der Lösung modifizieren, wie z. B. NaCl, KCl oder CaCl_2 , oder bei denen es sich um Metallkationen komplexierende Mittel handelt, wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder die Salze davon.

[0033] In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Nucleinsäure mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert (PCR; EP 0 201 184, EP-A-0 200 362, US 4.683.202). Bei dem Amplifikationsverfahren kann es sich auch um die Ligase-Kettenreaktion (LCR, Wu, D. Y., und Wallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9 und Barany, F., Proc Natl Acad Sci USA 88 (1991) 189-93); Polymerase-Ligase-Kettenreaktion (Barany, F., PCR Methods Appl 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (PCT Patentveröffentlichung Nr. WO 90/01069); Reparatur-Kettenreaktion (Europäische Patentveröffentlichung Nr. EP 439.182 A2), 3SR (Kwoh, D. Y., et al., Proc Natl Acad Sci USA 86 (1989) 1173-7; Guatelli, J. C., et al., Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 1874-8; PCT Patentveröffentlichung Nr. WO 92/0880A) und NASBA (US-Pat. Nr. US 5.130.238) handeln. Ferner gibt es Strangverdrängungs-Amplifikation (SDA), Transkriptions-vermittelte Amplifikation (TMA) und Q β -Amplifikation (für einen Übersichtsartikel siehe z. B. Whelen, A. C., und Persing, D. H. Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73; Abramson, R. D., und Myers, T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-7). Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Amplifikationsverfahren sind das in US 5.786.146 offenbarte methylierungsspezifische PCR-Verfahren (MSP), das Bisulfidbehandlung und allelspezifische PCR kombiniert (siehe z. B. US 5.137.806, US 5.595.890, US 5.639.611).

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform kann das Verfahren ferner den Schritt umfassen, die amplifizierte Nucleinsäure nachzuweisen. Die amplifizierte Nucleinsäure kann durch denn Fachmann bekannte analytische Standardverfahren bestimmt oder nachgewiesen werden, die z. B. in Sambrook, et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor University Press (1989), Lottspeich und Zorbas, in *"Bioanalytik"* (1998), Hrsg. L. a. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Deutschland, oder in Ausubel, F., et al., in *"Current protocols in molecular biology"* (1994), Hrsg. F. Ausubel, R. Brent und K. R.E., Wiley & Sons Verlag, New York, beschrieben werden. Es kann auch weitere Reinigungsschritte geben, bevor die Zielnucleinsäure nachgewiesen wird, z. B. einen Präzipitationsschritt. Die Nachweisverfahren können Binden oder Interkalieren von spezifischen Farbstoffen wie Ethidiumbromid, das in die doppelsträngige DNA interkaliert und danach deren Fluoreszenz ändert, einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt. Die gereinigten Nucleinsäuren können gegebenenfalls nach einem Restriktionsverdau auch durch elektrophoretische Verfahren getrennt und danach sichtbar gemacht werden. Es gibt auch auf Sonden beruhende Assays, welche die Oligonucleotidhybridisierung an spezifische Sequenzen und den anschließenden Nachweis des Hybrids ausnutzen. Es ist auch möglich, die Zielnucleinsäure nach weiteren, dem Fachmann bekannten Schritten zu sequenzieren. Andere Verfahren tragen eine Vielfalt von Nucleinsäuresequenzen auf einen Siliconchip auf, an den spezifische Sonden gebunden werden und ein Signal ergeben, wenn komplementäre Sequenzen binden.

[0035] In einer besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Nucleinsäure durch Messen der Intensität von Fluoreszenzlicht während der Amplifikation nachgewiesen. Dieses Verfahren bringt das Überwachen der Echtzeitfluoreszenz mit sich. Ein besonders bevorzugtes Verfahren, das gleichzeitige Amplifikation und Nachweis durch Messen der Intensität von Fluoreszenzlicht ausnutzt, ist das in WO 92/02638 und den entsprechenden US-Patenten US 5.210.015, US 5.804.375, US 5.487.972 offenbarte TaqMan[®]-Verfahren. Dieses Verfahren nutzt die Exonuclease-Aktivität einer Polymerase aus, um ein Signal zu erzeugen. Ausführlich gesagt, die Nucleinsäure wird durch ein Verfahren nachgewiesen, das ein In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Oligonucleotid umfasst, das eine Sequenz enthält, die zu einem Bereich der Zielnucleinsäure komplementär ist, und einem markierten Oligonucleotid, das eine Sequenz enthält, die zu einem zweiten Bereich des gleichen Zielnucleinsäurestrangs komplementär ist, aber die durch das erste Oligonucleotid definierte Nucleinsäuresequenz nicht einschließt, um ein Gemisch von Duplexen während der Hybridisierungsbedingungen zu erzeugen, wobei die Duplexe die Zielnucleinsäure, angelagert an das erste Oligonucleotid und an das markierte Oligonucleotid umfassen, so dass das 3'-Ende des ersten Oligonucleotids neben dem 5'-Ende des markierten Oligonucleotids liegt. Dann wird dieses Gemisch mit einer matrixenabhängigen Nucleinsäurepolymerase behandelt, die eine 5'-3'-Nucleaseaktivität unter (Bedingungen aufweist, die ausreichen, um der 5'-3'-Nucleaseaktivität der Polymerase zu gestatten, das angelagerte, markierte Oligonucleotid zu spalten und markierte Fragmente freizusetzen. Das durch die Hydrolyse des markierten Oligonucleotids erzeugte Signal wird nachgewiesen und/oder gemessen. Die TaqMan[®]-Technologie eliminiert den Bedarf, einen an eine feste Phase gebundenen Reaktionskomplex zu bilden und nachweisbar zu machen. In allgemeineren Worten, die Amplifikations- und/oder Nachweisreaktion des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein Assay mit einer homogenen Lösungsphase. Weitere bevorzugte Verfahren sind die im LightCycler[®]-Gerät verwendeten Formate (siehe z. B. US 6.174.670). Besonders bevorzugt wird die Verwendung von Bisulfitbehandlung, Amplifikation mit oder ohne methylierungsspezifischen Primern in Anwesenheit einer methylierungsspezifischen Sonde und Echtzeit-Fluoreszenznachweis, wie in US 6.331.393 beschrieben.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren automatisiert, d. h. das Verfahren führt ein automatisierbares Verfahren aus, wie z. B. in WO 99/113781 beschrieben. Automatisierbares Verfahren bedeutet, dass die Schritte des Verfahrens dafür geeignet sind, mit einem Apparat oder einer Maschine ausgeführt zu werden, die fähig sind, mit wenig oder keiner externen Kontrolle oder Einfluss durch einen Menschen zu funktionieren. Automatisiertes Verfahren bedeutet, dass die Schritte des automatisierbaren Verfahrens mit einem Apparat oder einer Maschine ausgeführt werden, die fähig sind, mit wenig oder keiner externen Kontrolle oder Einfluss durch einen Menschen zu funktionieren. Nur die Vorbereitungsschritte für das Verfahren müssen vielleicht von Hand gemacht werden, z. B. müssen die Vorratsbehälter aufgefüllt und eingesetzt werden, die Wahl der Proben muss durch einen Menschen gemacht werden und weitere dem Fachmann bekannte Schritte, z. B. die Betätigung des kontrollierenden Computers. Der Apparat oder die Maschine kann z. B. automatisch Flüssigkeiten zugeben, die Proben mischen oder Inkubationsschritte bei spezifischen Temperaturen ausführen. Typischerweise handelt es sich bei einer derartigen Maschine oder einem derartigen Apparat um einen Roboter, der durch einen Computer kontrolliert wird, der ein Programm ausführt, in dem die einzelnen Schritte und Befehle spezifiziert sind. In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform liegt das Verfahren in einem Format mit hohem Durchsatz vor, d. h. das automatisierte Verfahren wird in einem Format mit hohem Durchsatz ausgeführt, was bedeutet, dass die Verfahren und die verwendete Maschine oder der verwendete Apparat für einen hohen Durchsatz von Proben in kurzer Zeit optimiert sind.

[0037] Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren in der Diagnostik verwendet, für eine diagnostische Analyse oder für die Bioanalytik, oder zum Durchmustern von Gewebe oder Flüssigkeiten vom menschlichen oder sogar tierischen Körper auf die Anwesenheit bestimmter Methylierungsmuster hin. Ferner wird das erfindungsgemäße Verfahren verwendet, um die Geschwindigkeit, Genauigkeit oder Empfindlichkeit des Nachweises von Methylierungsstellen in Nucleinsäuren zu erhöhen.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf die Verwendung einer festen Phase beim Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritt einer Reaktion gerichtet, wobei eine Cytosinbase, vorzugsweise Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in Anwesenheit von Bisulfitionen in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, umgewandelt wird, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden ("Bisulfitreaktion"). In einer bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf die Verwendung einer festen Phase beim Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritt einer Reaktion gerichtet, wobei eine Cytosinbase, vorzugsweise Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in Anwesenheit von Bisulfitionen in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, umgewandelt wird, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden. Ganz besonders bedeutet dies, dass die feste Phase verwendet wird, um die Nucleinsäure während des Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion zu binden, d. h. die Nucleinsäure ist während des Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschrittes der Bisulfitreaktion an die feste Phase gebunden. Vorzugsweise handelt es sich bei der festen Phase um ein Glas oder Siliciumdioxid umfassendes Material. Stärker bevorzugt handelt es sich bei der festen Phase um ein Glasvlies oder eine Glasmembran. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der festen Phase um ein magnetisches Glasteilchen.

[0039] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf einen Kit zum Durchführen einer Bisulfitreaktion gerichtet, der eine Bisulfitionen umfassende Lösung und eine feste Phase enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der festen Phase um ein Siliciumdioxid oder Glas umfassendes Material. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der festen Phase um ein Glasvlies oder eine Glasmembran. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der festen Phase um ein magnetisches Glasteilchen. In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein Kit aus Teilen bereitgestellt, der einen Vorratsbehälter umfasst, der die erfindungsgemäßen magnetischen Glasteilchen oder eine Suspension davon enthält. Derartige, auf dem Fachgebiet bekannte Kits umfassen ferner Kunststoffutensilien, die während des Bisulfitverfahrens verwendet werden können, wie z. B. Mikrotiterplatten im Format von 96 oder 384 Vertiefungen oder Reaktionsröhrchen, die z. B. von Eppendorf, Hamburg, Deutschland, hergestellt werden. Der Kit kann ferner eine Waschlösung umfassen, die für den Waschschrift der festen Phase, besonders das Glasvlies oder die Membran oder die magnetischen Glasteilchen geeignet ist. Oft wird die Waschlösung als Stammlösung bereitgestellt, die vor der Verwendung verdünnt werden muss. Der Kit kann ferner ein Elutionsmittel umfassen, d. h. eine Lösung oder einen Puffer (z. B. TE, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder reines Wasser, um die an die feste Phase gebundene DNA oder RNA zu eluieren. Ferner können zusätzliche Reagenzien vorliegen, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignete Puffer enthalten. Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Kit für eine Reaktion verwendet, wobei eine Cytosinbase, vorzugsweise Cytosinbasen, in einer Nucleinsäure in Anwesenheit von Bisulfitionen in eine Uracilbase, vorzugsweise in Uracilbasen, umgewandelt wird, wobei 5-Methylcytosinbasen vorzugsweise nicht wesentlich umgewandelt werden.

1.1 Beispiele

1. Beispiel 1: Etablierung einer für Bisulfit-behandelte DNA spezifischen LC-PCR

1.1 Allgemeines

[0040] Die Tatsache, dass die Bisulfitreaktion funktioniert hat und nicht methylierte Cytosine in Uracil umgewandelt hat, kann durch eine Polymerasekettenreaktion demonstriert werden, wobei Primer verwendet werden, die für einen Bereich der Nucleinsäuresequenz spezifisch sind, in der nicht methylierte Cytosine in Uracile umgewandelt worden sind, d. h. die Base Adenin im Primer liegt gegenüber von dem Uracil, bei dem es sich um das Bisulfitreaktionsprodukt von nicht methylierten Cytosinen handelt. Im Falle von unvollständiger Umwandlung könnte der Primer an diesen Bereich nicht hybridisieren, da es Cytosine geben würde, die nicht zu den Adeninbasen im Primer passen. Dies würde den Effekt haben, dass man kein PCR-Produkt erhalten würde.

[0041] Ein verbessertes Verfahren zum Durchführen von schnellen Polymerasekettenreaktionen wird z. B. in US 6.174.670 offenbart und wird in dem LightCycler[®]-Gerät (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Bei

diesem Verfahren können zwei markierte Proben in einer vom Amplifikat abhängigen Weise in unmittelbare Nähe kommen, so dass die beiden Markierungen einen Fluoreszenzenergietransfer (FRET) durchführen können. Die Menge des Amplifikats korreliert dabei mit der Intensität des emittierten Lichts einer bestimmten Wellenlänge. Dieses spezifische PCR-Verfahren kann deshalb verwendet werden, um zu analysieren, ob eine vollständige Umwandlung nicht methylierter Cytosine erhalten worden ist, z. B. durch Analysieren der Promotorregion des Gens für Glutathion-S-Transferase π (siehe z. B. SEQ ID NO: 1 für die Sequenz dieses Gens und des Promotors in voller Länge, US 5.552.277, Genbank-Zugangscod M24485 und Morrow et al. (1989) Gene 75, 3-11) unter Verwendung geeigneter Sonden und Primer. Der Fachmann weiß jedoch, dass andere Verfahren für diese Auswertung ebenfalls verwendet werden können. Fluoreszenzmessungen werden durch Teilen durch eine anfängliche Fluoreszenzmessung, d. h. die Hintergrundfluoreszenz, normalisiert, die während eines Zyklus früh in der Reaktion erhalten wird, während die Fluoreszenzmessungen der Zyklen relativ konstant zu sein scheinen. Die für die anfängliche Fluoreszenzmessung gewählte Zykluszahl ist für alle verglichenen Reaktionen die gleiche, so dass alle Messungen Erhöhungen relativ zu dem selben Reaktionszyklus darstellen. In den frühen Zyklen einer Polymerasekettenreaktionsamplifikation kann die Anzahl der Zielmoleküle durch die geometrische Gleichung $N_i = N_0 \times (1 + E)^i$ beschrieben werden, wobei N_0 = die Zahl der Zielmoleküle am Anfang der Reaktion, N_i = die Anzahl der Zielmoleküle am Ende des i-ten Zyklus, E = die Effizienz der Amplifikation ($0 \leq E \leq 1$). Während dieser geometrischen Wachstumsphase der Amplifikation ist die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, um einen bestimmten Schwellenwert (C_T -Wert oder Crossing Point) umgekehrt proportional zum Logarithmus von $(1 + E)$. Somit stellt der C_T -Wert ein Maß für die Reaktionseffizienz bereit, das Vergleiche zwischen Reaktionen ermöglicht. Eine Abnahme des C_T -Wertes, was bedeutet, dass die Reaktion den Schwellenwert in weniger Zyklen erreicht hat, zeigt eine Zunahme der Reaktionseffizienz an. Da die Zunahme des Amplifikationsprodukts durch Messen der Zunahme der Reaktionsfluoreszenz überwacht wird, wird der C_T -Wert hierin als die Anzahl der Amplifikationszyklen definiert, die ausgeführt wurden, bis die Fluoreszenz einen willkürlichen Fluoreszenzspiegel (AFL) überstieg. Der AFL wurde in der Nähe des Ausgangsfluoreszenzspiegels gewählt, aber oberhalb des Bereiches von zufälligen Fluktuationen in der gemessenen Fluoreszenz, so dass die Reaktionskinetiken während der geometrischen Wachstumsphase der Amplifikation gemessen wurden. Eine Anhäufung von amplifiziertem Produkt in späteren Zyklen hemmt die Reaktion und führt schließlich zu einem Reaktionsplateau. Ein AFL von 1,5 wurde für alle Reaktionen gewählt. Weil eine PCR-Amplifikation aus diskreten Zyklen besteht und die Fluoreszenzmessungen einmal pro Zyklus ausgeführt werden, nimmt die gemessene Fluoreszenz typischerweise in einem einzelnen Zyklus von unterhalb des AFL auf oberhalb des AFL zu. Um die Genauigkeit der Messungen zu verbessern, wurde eine „genaue“ Anzahl von Zyklen zum Erreichen der AFL-Schwelle, hierin als C_T -Wert oder Crossing Point bezeichnet, durch Interpolieren von Fluoreszenzmessungen zwischen Zyklen berechnet.

1.2 Allgemeine Methodik

[0042] Das folgende Experiment demonstriert, dass die beschriebene PCR auf dem LightCycler[®]-Gerät als ein Auswertungswerkzeug für Bisulfit-behandelte DNA verwendet werden kann. Es zeigt, dass die bestimmte Primer/Sonden-Kombination positive Ergebnisse nur mit DNA nach einer Bisulfitbehandlung ergibt. Bisulfit-behandelte DNA (in diesem Fall wurde Bisulfit-DNA nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Protokoll behandelt) und unbehandelte DNA wurden parallel unter Verwendung der gleichen Matrizenkonzentrationen (20 ng und 1 ng pro PCR) amplifiziert.

1.3 PCR-Analyse auf dem LightCycler[®]-Gerät

1.3.1 Zusammensetzung der Stammischung:

[0043] LC FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x, 2 mM MgCl₂, vorwärts gerichteter Primer 0,5 μ M, rückwärts gerichteter Primer 0,5 μ M, Donorsonde 250 nM, Akzeptorsonde 250 nM, Matrize 10 μ l, gesamtes PCR-Volumen 20 μ l.

1.3.2 PCR-Bedingungen

Denaturierung 10 min/95°C
 55 Zyklen
 95°C/10 s
 65°C/10 s – Signalerfassung
 72°C/10 s Rampenzeit 20°C/s

[0044]

1.4 Ergebnis

MDNA/PCR	Bisulfitbehandlung	C _T -Wert oder Crossing Point
20 ng	Ja	30,55
		29,72
		29,95
		30,06
1 ng	Ja	34,7
		35,8
		34,07
		33,86
20 ng	Nein	Keine Wachstumskurve
		Keine Wachstumskurve
		Keine Wachstumskurve
		Keine Wachstumskurve
1 ng	Nein	Keine Wachstumskurve
		Keine Wachstumskurve
		Keine Wachstumskurve
		Keine Wachstumskurve

[0045] Das Ergebnis zeigt Crossing Points nur für Bisulfit-behandelte DNA. Deshalb ist diese PCR beim Auswerten von Bisulfitverfahren geeignet. Für Fachleute ist es offensichtlich, dass jede PCR als Auswertungswerkzeug verwendet werden kann, wenn garantiert ist, dass die Primer/Sonden-Kombination nicht mit DNA vor einer Bisulfitbehandlung reagiert.

2. Beispiel 2: Bisulfitreaktion unter Verwendung magnetischer Glasteilchen (MGPs)

2.1.1 Denaturierung von DNA:

[0046] 100 µl Verdünnung methylierter DNA (Intergen, vertrieben durch Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Kat. S 7821) (30 ng und 6 ng/Assay, zugegeben zu 1000 ng hDNA-Hintergrund Roche Kat. 1691112; 10 Wiederholungen pro Konzentration) und 12 µl 2 M NaOH werden gemischt und 15 min lang bei 37°C inkubiert.

2.1.2 Desaminierung von DNA

[0047] 112 µl der denaturierten DNA werden mit 200 µl Bisulfitreagens (2,5 M Natriumdisulfit, 125 mM Hydrochinon, pH 5,0) gemischt und 16 h lang bei 50°C inkubiert.

2.2 Verarbeiten unter Verwendung von MGPs

[0048] 312 µl der desaminierten DNA werden mit 600 µl Bindepuffer (MagNAPure DNA-Isolierungskit I, Roche Kat. Nr. 3 003 990) und 75 µl einer Lösung magnetischer Glasteilchen (MagNAPure DNA-Isolierungskit I) gemischt und 15 min lang bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Mischen inkubiert. Danach werden die magnetischen Glasteilchen dreimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Die Trennung von gebunden/frei wird in einem magnetischen Trenngerät durchgeführt (Roche Kat. 1641794). Danach findet Desulfonierung durch Zugabe von 250 µl 90% EtOH/20 mM NaOH zu der an die MGPs gebundenen DNA statt; das Gemisch wird unter Mischen 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die MGPs zweimal mit 90% Ethanol gewaschen. Um Ethanolreste loszuwerden, wurden die MGPs in einem Thermomischgerät bei offenem Deckel 15 min lang bei 60°C erwärmt. Danach wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris/0,1 mM EDTA, pH 7,5 eluiert (15 min/60°C). 10 µl der eluierten DNA wird für die anschließende PCR-Analyse verwendet.

2.3 Bisulfitbehandlung unter Verwendung des Intergen-Kits

[0049] 30 ng und 6 ng methylierte DNA (Intergen, vertrieben durch Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Kat. S7821) wurden nach dem in der Verpackungsbeilage des Intergen CpGenome DNA Modifikationskit (Intergen, vertrieben durch Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Kat. S7820) beschriebenen Verfahren behandelt (10 Wiederholungen pro Konzentration). 10 µl der eluierten DNA wird für die anschließende PCR-Analyse verwendet.

2.4 Nachweis der Bisulfit-behandelten DNA unter Verwendung einer spezifischen PCR auf dem LightCycler®-Gerät (Hyprobe-Format)

2.4.1 Zusammensetzung der Stammmischung

[0050] LightCycler® FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239272), 2 mM MgCl₂, vorwärts gerichteter Primer 0,5 µM, rückwärts gerichteter Primer 0,5 µM, Donorsonde 250 nM, Akzeptorsonde 250 nM, Matrize 10 µl, gesamtes PCR-Volumen 20 µl.

2.4.2 PCR-Bedingungen

Denaturierung 10 min/95°C
55 Zyklen
95°C/10 s
65°C/10 s – Signalerfassung
72°C/10 s Rampenzeit 20°C/s

[0051] Proben der MGP-Bisulfitbehandlung und Intergen-Bisulfitbehandlung wurden parallel im gleichen Lauf auf dem LightCycler®-Gerät laufen gelassen.

2.4.3 Ergebnisse:

Wiederholungen	Methylierte DNA pro		verwendetes Bisulfitverfahren	
	Bisulfit	PCR	Intergen	MCP-Verfahren
C _T -Werte oder Crossing Points				
1	30 ng	6 ng	29,90	30,46
2			30,07	29,86
3			30,07	30,44
4			30,14	30,35
5			30,22	30,24
6			30,26	30,46
7			30,31	30,50
8			30,19	30,54
9			30,03	30,17
10			29,85	30,69
1	6 ng	1,2 ng	32,49	32,14
2			32,67	32,60
3			32,29	32,83
4			32,87	32,53
5			32,15	32,90
6			32,23	32,77
7			32,59	32,73
8			32,91	33,09
9			32,46	32,88
10			33,17	32,83

[0052] Die C_T-Werte oder Crossing Points, die während der Echtzeit-PCR berechnet werden, sind für die beiden verwendeten Bisulfitverfahren fast identisch, d. h. dass die Leistung der Verfahren gleich ist.

3 Beispiel 3: Automatisierte Bisulfitreaktion unter Verwendung von MGPs

3.1 Leistung der Bisulfitreaktion:

3.1.1 Denaturierung von DNA.

[0053] 20 µl Verdünnung methylierter DNA (Intergen, vertrieben durch Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Kat. 57821) (50 ng/Assay), 4 µl einer Poly-(dA)-Lösung (Konzentration 250 ng/µl) und 2,6 µl 2 M NaOH werden gemischt und 10 min lang bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Desaminierung von DNA

[0054] 26 µl der denaturierten DNA werden mit 220 µl Bisulfitreagens (2,5 M Natriumbisulfit, 125 mM Hydrochinon, pH 5,0) gemischt und 4 h lang bei 50°C inkubiert.

3.1.3 Automatisiertes Verarbeiten unter Verwendung des MagnaPure LC- Gerätes

[0055] 250 µl der desaminierten DNA werden mit 600 µl Bindepuffer (MagNAPure DNA-Isolierungskit I, Roche, Mannheim, Deutschland) und 75 µl Lösung magnetischer Glasteilchen (MagNAPure DNA-Isolierungskit I, Roche, Mannheim, Deutschland) gemischt und unter ständigem Mischen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die magnetischen Glasteilchen dreimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen.

[0056] Danach findet die Desulfonierung durch Zugabe von 250 µl 90% EtOH/20 mM NaOH zu der an die MGPs gebundenen DNA statt; das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Mischen 10 min lang inkubiert. Danach werden die MGPs zweimal mit 90% Ethanol gewaschen und werden mit 50 µl 10 mM Tris/0,1 mM EDTA, pH 7,5 (7 min, 80°C) eluiert.

3.1.4 Nachweis der Bisulfit-behandelten DNA unter Verwendung einer spezifischen PCR auf dem LightCycler®-Gerät (Hyprobe-Format)

3.1.4.1 Zusammensetzung der Stammischung:

[0057] LightCycler® FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x, 2 mM MgCl₂, vorwärts gerichteter Primer 0,5 µM, rückwärts gerichteter Primer 0,5 µM, Donorsonde 250 nM, Akzeptorsonde 250 nM, Matrize 5 µl, gesamtes PCR-Volumen 20 µl.

3.1.4.2 PCR-Bedingungen:

Denaturierung 10 min/95°C 55 Zyklen

95°C/10 s

65°C/10 s – Signalerfassung

72°C/10 s Rampenzeit 20°C/s

[0058]

3.1.4.3 Ergebnisse

Matrize	ng DNA	ng DNA	
	pro Bisulfit-Assay	pro PCR	Crossing Point
durchgängig methylierte DNA	100	10	33,97
			36,66
durchgängig methylierte DNA	50	5	35,66
			35,82
			37,67
			38,37
durchgängig methylierte DNA	10	1	37,82
			39,89
			38,76
			39,85

[0059] Das Ergebnis zeigt Crossing Points für jede verwendete Konzentration. Dies bedeutet, dass die automatisierte Bisulfitbehandlung erfolgreich war.

4. Beispiel 4: Leistung von Bisulfitreaktionen unter Verwendung von Glasvlies

4.1 Denaturierung von DNA

[0060] 100 µl Verdünnung methylierter DNA (Intergen, vertrieben durch Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Kat. S7821) (30 ng und 6 ng/Assay, 10 Wiederholungen pro Konzentration) werden mit 12 µl 2 M NaOH gemischt und 15 min lang bei 37°C inkubiert.

4.2 Desaminierung von DNA:

[0061] 112 µl denaturierte DNA werden mit 200 µl Bisulfitreagens (2,5 M Natriumbisulfit, 125 mM Hydrochinon, pH 5,0) unter ständigem Mischen 16 h lang bei 50°C inkubiert.

4.3 Verarbeiten von desaminiertem DNA mit dem High Pure PCR Matrizenherstellungs-Kit (Roche Kat. 1 796 828)

- 312 µl desaminierte DNA werden mit 200 µl Bindepuffer aus dem Kit und 100 µl Isopropanol gemischt und auf die Säule mit dem Glasvlies pipettiert. Die Säule wird dann in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert (1 min bei 8000 U/min).
- Danach werden die Säulen dreimal mit je 500 µl 80% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 sec bei 8000 U/min)
- Zur Desulfonierung werden 250 µl Reagens (38% Ethanol/100 mM NaCl/200 mM NaOH) zu den Säulen gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert man 1 min bei 800 U/min.
- Danach werden die Säulen zweimal mit je 500 µl 80% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 sec bei 12000 U/min)
- Schließlich wird die gebundene DNA durch Zugabe von 50 µl vorgewärmtem (70°C) Elutionspuffer (10 mM Tris/0,1 mM EDTA pH 7,5) und 1 min langer Zentrifugation bei 800 U/min eluiert.

4.4 Nachweis der Bisulfit-behandelten DNA unter Verwendung einer spezifischen PCR auf dem LightCycler®-Gerät (Hyprobe-Format)

4.4.1 Zusammensetzung der Stammischung:

[0062] LightCycler® FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239272), 2 mM MgCl₂, vorwärts gerichteter Primer 0,5 µM, rückwärts gerichteter Primer 0,5 µM, Donorsonde 250 nM, Akzeptorsonde 250 nM, Matrize 10 µl, gesamtes PCR-Volumen 20 µl.

4.4.2 PCR-Bedingungen

Denaturierung 10 min/95°C 55 Zyklen

95°C/10 s

65°C/10 s – Signalerfassung

72°C/10 s Rampenzeit 20°C/s

[0063]

4.4.3 Ergebnisse:

Methylierte DNA pro		C _T -Werte oder Crossing Points	Methylierte DNA pro		C _T -Werte oder Crossing Points
Bisulfit-Assay	PCR		Bisulfit-Assay	PCR	
30 ng	6 ng	32,27	6 ng	1,2 ng	34,28
		32,01			35,70
		31,89			35,52
		33,23			36,23
		32,18			35,05
		32,63			35,60
		32,65			34,75
		32,26			34,86
		32,00			34,80
		31,84			34,93

[0064] Das Ergebnis zeigt Crossing Points für jede verwendete Konzentration. Dies bedeutet, dass die Bisulfitbehandlung unter Verwendung von Glasvlies erfolgreich war.

5. Beispiel 5: Leistung einer Bisulfitreaktionen auf einer festen Phase aus Glasvlies

5.1 Binden von DNA an Glasvlies

[0065] 100 µl DNA (die ein Gemisch von 1 µg hDNA (Roche) und 100 ng methylierter DNA (Intergen, vertrieben durch Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Kat.

[0066] S7821 enthalten) werden mit 200 µl Bindepuffer (High Pure PCR Matrizenherstellungs-Kit, Roche Kat. 1796828) und 100 µl Isopropanol gemischt. Das Gemisch wird auf die Säule aus dem Kit pipettiert. Die Säule wird dann in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (1 min bei 8000 U/min) zentrifugiert. Das Vlies wird zweimal mit Waschpuffer aus dem Kit gewaschen (500 µl pro Waschschrift).

5.2 Denaturierung von DNA, die an Glasvlies gebunden ist

[0067] Denaturierung findet durch Pipettieren von 200 µl 38% EtOH/100 mM NaOH/200 mM NaCl auf das Glasvlies und 10 min langes Inkubieren von beidem bei Raumtemperatur statt.

[0068] Danach wird das Vlies einmal mit 500 µl Waschpuffer von dem Kit gewaschen.

5.3 Desaminierung von DNA, die an Glasvlies gebunden ist:

[0069] 200 µl Desaminierungslösung (6,25 M Harnstoff/2 M Natriumbisulfit/pH 5,0) werden auf das Vlies mit der DNA pipettiert, gefolgt von einer 16 h langen Inkubation bei 50°C in einem Wasserbad.

[0070] Danach wird das Desaminierungsreagens entfernt und das Vlies wird zweimal mit je 500 µl Waschpuffer aus dem Kit gewaschen.

5.4 Desulfonierung von desaminierter DNA, die an Glasvlies gebunden ist

[0071] Zur Desulfonierung werden 250 µl Reagens (90% Ethanol/20 mM NaOH) zu den Säulen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur werden die Säulen 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Danach werden die Säulen zweimal mit je 500 µl 80% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 sec bei 12000 U/min).

5.5 Elution von DNA

[0072] Schließlich wird die gebundene DNA durch Zugabe von 50 µl vorgewärmtem (70°C) Elutionspuffer (10 mM Tris/0,1 mM EDTA, pH 7,5) und 1 min langer Zentrifugation bei 8000 U/min eluiert.

5.6 Nachweis der Bisulfit-behandelten DNA unter Verwendung einer spezifischen PCR auf dem LightCycler®-Gerät (Hyprobe-Format)

5.6.1 Zusammensetzung der Stammmischung:

[0073] LightCycler® FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239272), 2 mM MgCl₂, vorwärts gerichteter Primer 0,5 µM, rückwärts gerichteter Primer 0,5 µM, Donorsonde 250 nM, Akzeptorsonde 250 nM, Matrize 10 µl, gesamtes PCR-Volumen 20 µl.

5.6.2 PCR-Bedingungen

Denaturierung 10 min/95°C
55 Zyklen
95°C/10 s
65°C/10 s – Signalerfassung
72°C/10 s Rampenzeit 20°C/s

[0074]

5.6.3 Ergebnis:

Probennummer	Methylierte DNA pro PCR	Crossing Point
1	20 ng	34,90
2	20 ng	35,27
3	20 ng	36,09
4	20 ng	36,80

[0075] Bei jeder Reaktion wurde eine Wachstumskurve nachgewiesen und der Crossing Point wurde berechnet. Dieses Ergebnis zeigt, dass Desaminierung und Desulfonierung auf der festen Phase aus Glasvlies möglich ist.

Referenzliste

- Abramson, R. D., und Myers, T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-7
Alderton, R. P., et al., *Anal Biochem* 201 (1992) 166-9
Ausubel, F., et al., in "Current protocols in molecular biology" (1994), Hrsg. F. Ausubel, R. Brent und K. R.E., Wiley & Sons Verlag, New York
Barany, F., *PCR Methods Appl* 1 (1991) 5-16
Barany, F., *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 189-93
Benyajati, C., et al., *Nucleic Acids Res* 8 (1980) 5649-67
Braunauer, in "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943), Princeton University Press
Clark, S. J., et al., *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 2990-7
DE 3724442
DE-A3734442
EP 0 200 362
EP 0 201 184
EP 0 389 063
EP 0 439 182
Feil, R., et al., *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 695-6
Frommer, M., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 1827-31
GB 91/00212
Grigg, G., und Clark, S., *Bioessays* 16 (1994) 431-6
Grigg, G. W., *DNA Seq* 6 (1996) 189-98
Grunau, C., et al., *Nucleic Acids Res* 29 (2001) E65-5
Guatelli, J. C., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 1874-8
Jakobi, R., et al., *Anal Biochem* 175 (1988) 196-201
Komiyama, M., und Oshima, S., *Tetrahedron Letters* 35 (1994) 8185-8188
Kwoh, D. Y., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 1173-7
Lottspeich und Zorbas, in "Bioanalytik" (1998), Hrsg. L. a. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Deutschland
Marko, M. A., et al., *Anal Biochem* 121 (1982) 382-7
Morrow, C.S., et al., *Gene* 75 (1989), 3-11
Oakeley, E. J., *Pharmacol Ther* 84 (1999) 389-400
Olek, A., et al., *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 5064-6
Paulin, R., et al., *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 5009-10
Raizis, A. M., et al., *Anal Biochem* 226 (1995) 161-6
Sambrook, J., et al., in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Hrsg. J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
Spray Drying Handbook (1991), John Wiley & Sons, New York
US 4.683.202
US 5.130.238
US 5.137.806
US 5.210.015
US 5.234.809
US 5.487.972
US 5.552.277
US 5.595.890

US 5.639.611
US 5.786.146
US 5.804.375
US 6.174.670
US 6.331.393
Vogelstein, B., und Gillespie, D., Proc Natl Acad Sci USA 76 (1979) 615-9
Warnecke, P. M., et al., Methods 27 (2002) 101-7
Whelen, A. C., und Persing, D. H., Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73
WO 00/32762
WO 00/37291
WO 01/37291
WO 01/98528
WO 02/31186
WO 90/01069
WO 90/06045
WO 92/02638
WO 92/0880A
WO 96/418111
WO 99/16781
WO 99/40098
Wu, D. Y., und Wallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Verbessertes Verfahren zur Bisulfit-Behandlung

<130> 21371

<140>
<141>

<150> 02019097.1
<151> 2002-08-29

<150> 02028114.3
<151> 2002-12-18

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 4261
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> spezielles Signal
<222> (1156) .. (1162)
<223> transkriptionsregulatorisches Motiv, mutmaßlich

<220>
<221> GC-Signal
<222> (1169) .. (1174)

<220>
<221> GC-Signal
<222> (1179) .. (1184)

<220>
<221> TATA-Signal
<222> (1194) .. (1198)

<220>
<221> Exon
<222> (1225) .. (1254)

<220>
<221> polyA-Signal
<222> (4041) .. (4046)

<300>
<308> Genbank:M24485
<309> 2000-03-04

<300>

<303> Gene
 <304> 75
 <305> 1
 <306> 3-11
 <307> 1989
 <308> Morrow et al.

<300>
 <310> US5552277
 <311> 1994-07-19
 <312> 1996-09-03

<400> 1
 aacaagagat caatctctag aataaantgga gatctgcaaa tcaacagaaa gtaggcagca 60
 aagccaaaga aatagccta aggcacagcc actaaaagga acgtgatcat gtcctttgca 120
 gggacatggg tggagctgga agccgttagc ctcagcaaac tcacacagga acagaaaacc 180
 agcgagaccg catggtctca cttataagtg ggagctgaac aatgagaaca catggtcaca 240
 tggcggcgat caacacacac tgggtcctgt tgagcggggg gctggggagg gagagtacca 300
 ggaagaatag ctaagggata ctgggcttaa tacctgggtg atgggatgat ctgtacagca 360
 aaccatcatg gcgcacacac ctatgtaaca aacctgcaca tcctgcacat gtaccccaga 420
 acttcaaata aaagtggac ggccaggcgt ggtggctcac gcctgtaac ccagcacttt 480
 ggaagaccga ggcgtgcaga tcacctaagg tcaggagttc gagaccagcc cggccaacat 540
 ggtgaaaccc cgtctctact aaaaatacaa aatcagcca gatgtggcac gcacctataa 600
 ttccacctac tcgggaggct gaagcagaat tgcttgaacc cgagaggcgg aggttgcaat 660
 gagccgccga gatcggcca ctgcactcca gcctgggcca cagcgtgaga ctacgtcata 720
 aataaataa aataaacaca aataaataa aataaataa aataaataa aataaataa 780
 ataaaataa ataaaataa ataaaataa ataaagcaat ttccttctct ctaagcggcc 840
 tccacccctc tccccgccc tgtgaagcgg gtgtgcaagc tccgggatcg cagcggctct 900
 agggaatttc cccccgcat gtccccggc gccagttcgc tgcgcacact tcgctgcggt 960
 cctcttctct ctgtctggtt actccctagg ccccgctggg gacctgggaa agagggaaag 1020
 gcttccccgg ccagctgcgc ggcgactccg gggactccag ggcgcccctc tgcggccgac 1080
 gcccggggtg cagcggccgc cggggctggg gcgggaggga gtccgcggga cctccagaa 1140
 gagcggccgg ccgctgact cagcactggg gcggagcggg gcgggaccac ccttataagg 1200
 ctcgaggcc gcgaggcctt cgct gga gtt tcg ccg ccg cag tct tcg cca 1251

cca gtgagtaacg gcggccccgt ccccggggat ggggctcaga gctcccagca 1304
 tggggccaac ccgcagcatc aggcccggtc tcccggcagg gctcctcgcc cacctcgaga 1364
 cccgggacgg gggcctaggg gacccaggac gtccccagtg ccgttagcgg ctttcagggg 1424
 gcccggagcg cctcggggag ggatgggacc ccgggggctg ggaggggggg caggctgcgc 1484
 tcaccgcgcc ttggcctcct cccccgggct ccagcaact tttctttgtt cgctgcagtg 1544
 ccgacctaca ccgtggctta tttcccagtt cgaggtagga gcatgtgtct ggcagggaag 1604
 ggaggcaggg gctggggctg cagcccacag cccctcgccc acccggagag atccgaacct 1664
 ccttatccct ccgtcgtgtg gcttttacc cgggcctcct tcctgttccc cgctctccc 1724
 gccatgcctg ctccccgcc cagtgttgtg tgaatcttc ggaggaaact gtttacctgt 1784
 tcctccctg cactcctgac ccctccccgg gttgctgcga ggcggagtcg gcccggtccc 1844
 cacatctcgt acttctcct ccccgagggc cgctgcgctg ccctgcgcat gctgctggca 1904
 gatcagggcc agagctgaa ggaggagggt gtgaccgtgg agacgtggca ggagggtca 1964
 ctcaaagcct cctgcgtaag tgaccatgcc cgggcaaggg gagggggtgc tgggccttag 2024
 ggggctgtga ctaggatcgg gggacgcccc agctcagtgc ccctccctga gccatgcctc 2084
 ccccaacagc tatacgggca gctccccaag ttcagggacg gagacctcac cctgtaccag 2144
 tccaatacca tctgcgtca cctggggctg acccttgggt agtcttgaac ctccaagtcc 2204
 agggcagcca tgggcaagcc tctgccccgg gagccctttt gtttaaatca gctgccccgc 2264
 agccctctgg agtggaggaa actgagacct actgaggtta cgtagtctgc ccaagggtca 2324
 gcctgggtgc ctgcaatcct tgccctgtgc caggctgcct cccagggtgc aggtgagctc 2384
 tgagcacctg ctgtgtggca gtctctcctc ctccacgca catctcttc cctcctccc 2444
 aggctggggc tcacagacag ccccttgggt ggcccatccc cagtgactgt gtgttgatca 2504
 ggcggccagt cacgggctt gctcccctcc acccaacctc agggctctat gggaggacc 2564
 agcaggaggc agccctgtg gacatggtga atgacggcgt ggaggacctc cgctgcaat 2624
 acatctccct catctacacc aactatgtga gcatctgcac cagggttggg cactgggggc 2684
 tgaacaaaga aaggggcttc ttgtgcctc acccccctta cccctcagggt ggcttgggct 2744
 gacccctct tgggtcaggg tgaggggctt gggctcagctc tgggaccagg gcccaggggc 2804
 ctgggacaag acacaacctg cacccttatt gcctgggaca tcaaccagcc aagtaacggg 2864
 tcatgggggc gagtgcagg acagagacct ccagcaactg gtggttctc atctcctggg 2924

gtggcgaggg cttcctggag tagccagagg tggaggagga tttgtcgcca gtttctggat 2984
 ggaggtgctg gcacttttag ctgaggaaaa tatgcagaca cagagcacat ttggggacct 3044
 gggaccagt t cagcagaggc agcgtgctg cgcgtgctg tgcgtgctg tgcgtgctg 3104
 tgtgtacgct tgcatttctg tgggtgggt aaggagatag agatgggctg gcagtaggcc 3164
 caggtcccga aggcctttaa cccactggtt tggagtctcc taagggaat gggggccatt 3224
 gagaagtctg aacagggctg tgtctgaatg tgaggtctag aaggatcctc cagagaagcc 3284
 agctctaag cttttgcaat catctggtga gagaaccag caaggatgga caggcagaat 3344
 ggaatagaga tgagctggca gctgaagtgg acaggattt gacttagcct ggttctgggg 3404
 agcaagcaga ggagaatctg ggactctggt gtctggcctg gggcagacgg ggggtctca 3464
 ggggctggga gggatgagag taggatgata catggtggtg tctggcagga ggcgggcaag 3524
 gatgactatg tgaaggcact gcccgggcaa ctgaagcctt ttgagacctc gctgtcccag 3584
 aaccagggag gcaagacctt cattgtggga gaccaggtga gcatctggcc ccatgctgtt 3644
 ccttctctgc caccctctgc tccagatgg acacaggtgt gagccattt tttagcaag 3704
 cagagcagac ctaggggatg ggcttaggcc ctctgcccc aattcctcca gcctgctccc 3764
 gctggctgag tccctagccc cctgcccctg cagatctctc tcyctgacta caacctgctg 3824
 gacttctctg tgatccatga ggtcctagcc cctggtctgc tggatgctt ccccctgctc 3884
 tcagcatatg tggggcgctt cagtgcccgg cccaagctca aggccttctt ggcctcccct 3944
 gagtactgta acctcccct caatggcaac gggaaacagt gagggttggg gggactctga 4004
 gcgggaggca gacttctctt tctttctcc aggaccaata aatttctaa gagagctact 4064
 atgagcactg tgtttcctgg gacggggctt aggggtctc agcctcgagg tgggtgggag 4124
 ggcagagcag aggactagaa aacagctcct ccagcacagt cagtggcttc ctggagccct 4184
 cagcctggct gtgttactg aacctacaa actagaagag gaagaaaaa aaagagagag 4244
 agaaacaaag agaaata 4261

Patentansprüche

1. Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase in einer Nucleinsäure durch Bisulfitbehandlung in eine Uracilbase, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nucleinsäure während der Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritte an eine feste Phase gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, dass die feste Phase aus Glas oder Siliciumdioxid, einem Glas oder Siliciumdioxid umfassenden Material, einem Ionenaustauscher oder Hydroxylapatit ausgewählt ist.

2. Verfahren zur Umwandlung der Cytosinbase in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase nach Anspruch 1, umfassend die Schritte

- a) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase,
- b) Inkubieren der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfitionen, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
- c) gegebenenfalls Waschen der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
- d) Inkubieren der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird,
- e) gegebenenfalls Waschen der desaminierten und desulfonierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und
- f) gegebenenfalls Eluieren der desaminierten und desulfonierten Nucleinsäure von der festen Phase.

3. Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase nach Anspruch 1, umfassend die Schritte
 - a) Inkubieren der Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfitionen, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
 - b) Binden der desaminierten Nucleinsäure an eine feste Phase,
 - c) gegebenenfalls Waschen der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
 - d) Inkubieren der desaminierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird,
 - e) gegebenenfalls Waschen der desaminierten und desulfonierten, an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure und
 - f) gegebenenfalls Eluieren der desaminierten und desulfonierten Nucleinsäure von der festen Phase.
4. Verfahren zur Umwandlung einer Cytosinbase in einer Nucleinsäure in eine Uracilbase nach Anspruch 1, umfassend die Schritte
 - a) Binden der Nucleinsäure an eine feste Phase,
 - b) Inkubieren der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure in Anwesenheit von Sulfitionen, wodurch die Nucleinsäure desaminiert wird,
 - c) gegebenenfalls Waschen der an die feste Phase gebundenen Nucleinsäure,
 - d) Eluieren der desaminierten Nucleinsäure von der festen Phase und
 - e) Inkubieren der desaminierten Nucleinsäure unter alkalischen Bedingungen, wodurch die desaminierte Nucleinsäure desulfoniert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der festen Phase um ein Glasvlies oder eine Glasmembran handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der festen Phase um ein magnetisches Glasteilchen handelt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das magnetische Glasteilchen einen mittleren Durchmesser zwischen 0,5 μm und 5 μm hat.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass das magnetische Glasteilchen einen magnetischen Gegenstand mit einem Durchmesser zwischen 5 und 500 nm enthält.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das magnetische Glasteilchen einen magnetischen Gegenstand mit einem mittleren Durchmesser von 23 nm enthält.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das magnetische Glasteilchen durch das Sol-Gel-Verfahren hergestellt ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Sol-Gel-Verfahren die Schritte umfasst,
 - a) magnetische Gegenstände in einem Sol zu suspendieren,
 - b) das Sol zu hydrolysieren, um die magnetischen Gegenstände mit einem Gel zu überziehen,
 - c) die mit einem Gel überzogenen magnetischen Gegenstände in einem Sprühtrockner mit zwei Düsen sprühtrocknen,
 - d) das sprühtrocknete Pulver zu sintern, um aus dem Gel, das die magnetischen Gegenstände überzieht, ein Glas zu bilden.
12. Verwendung einer festen Phase beim Desaminierungs- und/oder Desulfonierungsschritt einer Reaktion, wobei eine Cytosinbase in einer Nucleinsäure in Anwesenheit von Bisulfitionen in eine Uracilbase umgewandelt wird, wobei die feste Phase aus Glas oder Siliciumdioxid, einem Glas oder Siliciumdioxid umfassenden Material, einem Ionenaustauscher oder Hydroxylapatit ausgewählt ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei es sich bei der festen Phase um ein Glasvlies oder eine Glasmembran handelt.
14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei es sich bei der festen Phase um ein magnetisches Glasteilchen handelt.

15. Kit zum Durchführen eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11, der eine Bisulfitionen umfassende Lösung und eine feste Phase enthält, wobei die feste Phase aus Glas oder Siliciumdioxid, einem Glas oder Siliciumdioxid umfassenden Material, einem Ionenaustauscher oder Hydroxylapatit ausgewählt ist.

16. Kit nach Anspruch 15, wobei es sich bei der festen Phase um ein Glasvlies oder eine Glasmembran handelt.

17. Kit nach Anspruch 15 oder 16, wobei es sich bei der festen Phase um ein magnetisches Glasteilchen handelt.

18. Verwendung des Kits nach einem der Ansprüche 15 bis 17 für eine Reaktion, wobei eine Cytosinbase in einer Nucleinsäure in Anwesenheit von Bisulfitionen in eine Uracilbase umgewandelt wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Abbildung 1

