



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 10 963 T2** 2006.11.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 399 459 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 10 963.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/01017**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 701 972.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/057289**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.01.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.07.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.03.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.04.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2006**

(30) Unionspriorität:
261256 P 16.01.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:
Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., US

(72) Erfinder:
SIMMS, Domenica A., Silver Spring, MD 20906, US

(74) Vertreter:
**Bosch, Graf von Stosch, Jehle
Patentanwalts-gesellschaft mbH, 80639 München**

(54) Bezeichnung: **REAGENZ ZUR ISOLIERUNG VON RNA**

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

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Reagenz, Verfahren und „Kits“ zum Isolieren von RNA aus RNA-enhaltenden Zellen und Gewebe und vorzugsweise aus Zellen und/oder Geweben aus Pflanzen und Pflanzenmaterialien.

Stand der Technik

[0002] Kommerzielle Reagenzien und „Kits“, die zum Isolieren von RNA verfügbar sind, sind nicht an schwierige Proben angepasst, insbesondere solche Proben, die reich an Polyphenolen (z.B. Konifernadeln) oder Stärke (z.B. Kartoffelknolle oder -samen) sind. RNA-Ausbeuten mit diesen Reagenzien und „Kits“ sind niedrig, oder die RNA – Qualität ist schlecht, wie durch ein niedriges $A_{260/280}$ -Verhältnis oder Gelelektrophorese gezeigt wurde.

[0003] In der Literatur sind zur Isolierung von RNA aus Föhren- und Fichtennadeln verschiedene Verfahren beschrieben, über die berichtet wird, dass sie RNA mit guter Qualität ergeben; siehe dazu z.B. Schneiderbauer, A. et al, Isolation of Functional RNA from Plants Rich in Phenolic Compounds Analytical Biochemistry 197:91-95 (1991); Graham, Glenn C., A method of extraction of total RNA from Pinus radiata and other conifers, Plant Molecular Biology Reporter, 11:32-37 (1993); Chang, Shujun, Puryear, Jeff and Cairney, John, A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees, Plant Molecular Biology Reporter 11:113-116 (1993); and Bahloul, Mouna and Burkard, Gerard An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues Plant Molecular Biology Reporter 11:212-215 (1993).

[0004] Alle diese bekannten Verfahren sind aber extrem arbeitsaufwändig. Beispielsweise extrahiert Schneiderbauer Föhren- oder Fichtenproben mit Aceton bei 70°C, um Polyphenole zu entfernen. Das Pellet wird dann in Gegenwart von 0,1% (v/v) Triton X-100, 15 mM DTT (Dithiothreitol) und Phenol homogenisiert. Der Homogenisierungsprozess setzt RNA, DNA und Proteine frei. Die Proteine werden durch Phasentrennung in einer organischen Extraktionsphase entfernt. Dann wird DNA durch Zentrifugation auf einem Cäsiumchlorid-Kissen entfernt.

[0005] Ein anderes Verfahren (Graham) verwendet Guanidin-Isothiocyanat, um das Gewebe zu zerstören, und RNA wird dann durch Zentrifugation auf einem Cäsium-Trifluoracetat-Kissen wieder gewonnen. Andere Verfahren verwenden kationische (Chang, et al) oder anionische (Bahloul, et al) Detergenzien, um die Nukleinsäuren freizusetzen, gefolgt von entweder einer mehrfachen Alkohol-Präzipitation oder Phenolextraktion und Lithiumchlorid-Präzipitation, um DNA aus der isolierten RNA zu entfernen.

[0006] Bugos RC et al., Biotechniques, Bd. 19, Nr. 5, November 1995, Seiten 734-737 beschreibt die RNA-Isolierung aus Pflanzengewebe, die gegen Extraktion mit Guanidin beständig sind.

[0007] Chirgwin JM et al., Biochemistry, Bd. 18, Nr. 24, 1979, Seiten 5294-5299 beschreibt die Isolierung biologisch aktiver Ribonukleinsäure aus Quellen, die mit Ribonuclease angereichert sind.

[0008] EP-A-1 044 984 beschreibt einen Kit zur Isolierung von RNA, der einen Extraktionspuffer und mindestens ein Absorptionsmaterial enthält.

[0009] WO 98/45311 beschreibt ein Reagenz und Verfahren zur Isolierung von RNA, wobei ein Phenol, ein Phenol-Lösungsvermittler, ein Chelatbildner und ein nichtionisches Detergenz chaotrope Substanzen und/oder RNase-Inhibitoren ersetzen.

[0010] WO 96/34949 beschreibt einen Pflanzenpromotor, der durch Pilzinfektion aktiviert wird, sowie seine Isolierung aus Pflanzengewebe.

[0011] Dong et al., Planta, Bd. 185, 1991, Seiten 38-45 beschreibt die Isolierung von RNA unter Verwendung von Guanidin-Isothiocyanat und die Herstellung der entsprechenden cDNA, die für 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase codiert.

[0012] Das Reagenz und die Verfahren der vorliegenden Erfindung vereinfachen den RNA-Extraktionspro-

zess, wobei qualitativ hochwertige RNA aus RNA-enthaltenden Materialien, insbesondere einfachen Pflanzenproben, und solchen, die mit Polyphenolen und Stärke angereichert sind, erhalten wird.

[0013] Somit stellt die vorliegende Erfindung ein Reagenz zur Extraktion von RNA bereit, umfassend:
 etwa 0,5-3% IGEPAL.RTM (Tergitol)
 etwa 0,02-0,25M EDTA
 etwa 0,01-0,5% SDS
 etwa 1-40% 2-Mercaptoethanol; und eine Menge an Natriumazid, die wirksam ist, die Haltbarkeit des Reagenz' zu verlängern.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt RNA-Extraktions-Reagenzien, Verfahren und „Kits“ bereit, die insbesondere zur Extraktion von RNA brauchbar sind. Die Reagenzien, Verfahren und „Kits“ der vorliegenden Erfindung sind insbesondere brauchbar zum Extrahieren von RNA, z.B. cytoplasmischer RNA, aus schwierigen Materialien, aus Pflanzen, insbesondere schwierigen Pflanzengeweben, wie solcher, die Phenole, Tannine, Polysaccharide (wie Stärke) und Harze enthalten. Relativ hohe Ausbeuten sind gemäß der vorliegenden Erfindung erhältlich, wenn sie mit üblichen Reagenzien und Verfahren verglichen werden. Die RNA-Präparationen, die gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten werden, haben auch eine hohe Qualität, was durch vorzügliche $A_{260/280}$ -Ergebnisse und durch Gel-Elektrophorese gezeigt wird.

[0015] [Fig. 1](#) zeigt eine Gel-Analyse von RNA, die aus Koniferen und Stechpalmen unter Verwendung des RNeasy-Formats („RNeasyFormat“) isoliert wurde.

[0016] [Fig. 2](#) zeigt eine Gel-Analyse von RNA, die aus Koniferen und Stechpalmen unter Verwendung eines RNA-Isolationsreagenz-Absorptionskartusche-Aufreinigungsverfahrens („RNA isolation reagent cartridge purification method“) isoliert wurde.

[0017] [Fig. 3](#) zeigt eine Gel-Analyse von RNA, die aus Koniferen und Stechpalmen unter Verwendung des RNA-Isolationsreagenz-Chloroform-Extraktionsformats („RNA isolation reagent chloroform extraction format“) isoliert wurde.

[0018] [Fig. 4](#) zeigt eine Gel-Analyse von RNA, die aus Koniferen und Stechpalmen unter Verwendung von TRIzol isoliert wurde.

[0019] In [Fig. 1–Fig. 4](#) sind die acht Assay-Banden mit a–h markiert, wobei a–h sind: (a) Blaufichtennadeln („blue spruce needles“), (b) Buschkiefer („scrub pine“) (Frühjahrstrieb) (c) Weymouthskiefer („white pine“) (Frühjahrstrieb), (d) Wacholder („juniper“), (e) Zeder („cedar“), (f) Stechpalmenblätter („holly leaves“) (Frühjahrsblätter), (g) Schiriling (Hernlock) und (h) RNA-Leiter („RNA ladder“).

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0020] Das RNA-Isolationsreagenz der vorliegenden Erfindung umfasst, wobei sie aber nicht auf eine oder mehr beschränkt ist, vorzugsweise zwei oder mehr der folgenden Komponenten:
 ein oder mehr nicht ionische/s Detergenz/ien
 ein oder mehr ionisches Detergenz/ien
 einen oder mehr Chelatbildner
 ein oder mehr Reduktionsmittel
 ein oder mehr antibakterielle Mittel (z.B. Natriumazid, etwa 0,5%).

[0021] Das Hauptdetergenz kann irgendeines der nicht-ionischen Detergenzien sein, die verfügbar oder in Benutzung sind, z.B. Igepal (Ersatz für NP-40), Tritone (TritonX-100), Tween 20 und ähnliche, etc. Es wird hinsichtlich seiner Fähigkeit ausgewählt, RNA ohne Coisolation von DNA zu extrahieren. Das nicht-ionische Detergenz liegt vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 4 Vol.-%, bevorzugter in einer Konzentration von etwa 0,5 bis 3% oder etwa 1 % bis 2% vor. Ein geeignetes nicht-ionisches Detergenz ist Igepal (tert.-Octylphenoxy-poly(oxyethylen)-ethanol) in einer Konzentration von 1 Vol.-%.

[0022] Das Helferddetergenz oder Sekundärdetergenz kann ein beliebiges der zur Verfügung stehenden kationischen oder anionischen Detergenzien (z.B. SDS, CTAB) sein, und es verbessert die RNA-Ausbeute, insbesondere bei hohen Konzentrationen des Reduktionsmittels, z.B. 2-Mercaptoethanol-Konzentrationen von etwa 40%. Vorzugsweise beträgt die Konzentration des ionischen Detergenz etwa 0,01% bis 0,5%, bevorzugter liegt es in einer Konzentration von etwa 0,01-0,1% vor. Ein geeignetes ionisches Detergenz ist SDS in einer Kon-

zentration von etwa 0,02% oder bis zu etwa 0,2%, abhängig vom Pflanzenmaterial und den Konzentrationen der anderen Komponenten, insbesondere des Reduktionsmittels.

[0023] Die Detergenzien werden in einer Menge gewählt, um die Zellmembranen permeabel zu halten, so dass Agentien in den Cytoplasma-Bereich der Zellen eindringen können und RNA den Cytoplasmen-Bereich der Zellen verlassen kann. Vorzugsweise werden die Mengen der Detergenzien und des Reduktionsmittel bzw. der Reduktionsmittel so gewählt, dass die Abbaukomponenten innerhalb der Zelle zurückzubehalten werden, so dass schädliche Enzyme etc. mit den Zellbruchstücken entfernt werden.

[0024] Je höher die Konzentration von 2-Mercaptoethanol oder ähnlichen Reduktionsmitteln in der Formulierung ist, desto höher ist die Konzentration des (ionischen) Sekundärdetergenz, das enthalten sein kann. Wenn die 2-Mercaptoethanol-Konzentration erhöht wird, nimmt die RNA-Ausbeute ab, aber die RNA wird besser geschützt, d.h. in höherer Qualität extrahiert. Diese hohe Qualität der RNA ist bemerkenswert, besonders für Pflanzen, die die höchsten Gehalte an Polyphenolen (z.B. Zeder oder Wacholder) enthalten, siehe Tabellen 1-13.

[0025] Der Chelatbildner kann auch das „Salz“-Erfordernis erfüllen, um die Zellmembran und/oder den Zellkern bei physiologischen Salzbedingungen zu halten, um osmotische Zerstörungen zu vermeiden. Der Chelatbildner kann unter denen ausgewählt werden, die allgemein verwendet werden. Zum Beispiel stellen EDTAs, EGTA, Citrate (wie Natriumcitrat), Citronensäuren, Salicylsäuren, Salze der Salicylsäuren, Phthalsäuren, 2,4-Pentandiene, Histidine, Histidinol-Dihydrochloride, 8-Hydroxychinoline, 8-Hydroxychinolin, Citrate und o-Hydroxychinone beispielhafte Chelatbildner aus dem Stand der Technik dar. Alternativ kann eine Komponente des Reagenz benutzt werden, um die Salzstärke einzustellen, wie NaCl, KCl, etc., und ein anderes Agenz (z.B. Betain) kann als Chelatbildner verwendet werden.

[0026] Vorzugsweise liegt der Chelatbildner in einer Konzentration von etwa 0,02-0,25M vor. Der Chelatbildner liegt bevorzugter in einer Konzentration von etwa 0,05-0,2M vor. Ein geeigneter Chelatbildner ist EDTA in einer Konzentration von etwa 0,1 M.

[0027] Das Reduktionsmittel kann unter 2-Mercaptoethanol oder unter irgendeinem, das 2-Mercaptoethanol ersetzen würde (z.B. DTT oder andere Mercaptane), ausgewählt werden. Vorzugsweise liegt das Reduktionsmittel in einer Konzentration von etwa 1% bis 40%, bezogen auf das Volumen, vor. Das Reduktionsmittel liegt bevorzugter in einer Konzentration von etwa 10%-40% vor. 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von entweder 20% oder 40% ergab RNA in guter Ausbeute und hoher Qualität in ausgewählten Geweben. Für einige Anwendungen sind 4% 2-Mercaptoethanol geeignet.

[0028] Das antibakterielle Mittel, z.B. Natriumazid, ist vorzugsweise enthalten, um die Haltbarkeit des Reagenz' zu verlängern. Dementsprechend ist ein antibakterielles Mittel nicht erforderlich, wenn frisch hergestellte Komponenten kurz vor Verwendung vereinigt werden. Daher ist auch ein antibakterielles Mittel zum Einsatz in der vorliegenden Erfindung geeignet, das die Haltbarkeit ohne unnötigen Verlust der Qualität der erhaltenen RNA verlängert. Die Menge des antibakteriellen Mittels hängt vom Mittel und den Lagerbedingungen ab und sollte so gewählt werden, dass das Extraktionsverfahren nicht beeinträchtigt und die gewünschte Haltbarkeit erhalten wird.

[0029] Bemerkenswerterweise ist Phenol im vorliegenden RNA-Isolationsreagenz nicht enthalten. Es wurde gefunden, dass Phenol als Substrat für (Poly)Phenoloxidasen wirkt, wodurch es zur Oxidation der extrahierten RNA beiträgt. Obwohl andere als die vorstehend aufgeführten Komponenten in dem Extraktionsreagenz der vorliegenden Erfindung enthalten sein können, ist eine nennenswerte Menge von Phenol nicht zugelassen.

[0030] Alle Komponenten und Oberflächen, die mit der Probe Kontakt haben können, sind vorzugsweise RNase-frei.

[0031] Eine Teilmenge der Komponenten kann vorher getrennt oder in Kombination hergestellt werden und mit den übrigen Komponenten zu einem Zeitpunkt vor Verwendung oder zu dem Zeitpunkt der Verwendung kombiniert werden, um die Arbeitsformulierung zu erhalten.

[0032] Das allgemeine Protokoll zum Isolieren von RNA nach der vorliegenden Erfindung ist für eine Vielzahl von RNA-enthaltenden Materialien geeignet, z.B. Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe, bspw. Zellen oder Gewebe, die aus Stämmen, Blättern, Wurzeln, Samen und Blüten der Pflanzen erhalten werden. Ein Pflanzengewebe wird zuerst zu einem groben oder feinen Pulver gemahlen. Wenn das Pflanzenmaterial eine Zell-

kultur ist, werden die Zellen z.B. durch Rütteln mit dem Extraktionsmedium während etwa 5 Min. gemischt. Wenn das Pflanzenmaterial ein Gewebematerial ist, wird das Pulver mit dem Extraktionsmedium während etwa 20 Min. gemischt. Das Pflanzenmaterial wird vorzugsweise mit dem Reagenz gemischt, bis das gemahlene Gewebe gründlich suspendiert ist.

[0033] Feineres Material erfordert eine geringere Mischzeit als groberes Material. Kürzeres Mischen ergibt niedrigere Ausbeuten. Ausgedehntes Mischen ergibt eine höhere Ausbeute, aber RNA mit niedrigerer Qualität. Die Mischzeit kann abhängig vom Pflanzenmaterial und von der Menge und Qualität der gewünschten RNA eingestellt werden.

[0034] Die Extraktpräparation wird dann zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Ferner kann ein Filtrations- oder Siebschritt durchgeführt werden. Konzentriertes NaCl wird dann zur Präparation dazugegeben, bspw. etwa 0,25 Teile einer 5 M NaCl. Ein organisches Extraktionslösungsmittel, wie CHCl_3 , wird zum Überstand zugegeben und damit gemischt. Die wässrige und die organische Phasen werden durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wird einer Alkoholpräzipitation, z.B. mit Ethanol, unterzogen, wodurch isolierte RNA erhalten wird.

[0035] Zwei Formulierungen werden in den nachfolgend beschriebenen Beispielen als bevorzugte Formulierungen verwendet. Andere Formulierungen sind im Allgemeinen oder für spezielle Pflanzengewebe geeignet. Bevorzugte Formulierungen sind die 40% 2-Mercaptoethanol-Formulierung und die 20% 2-Mercaptoethanol-Formulierung. Diese bevorzugten Formulierungen sind nachfolgend aufgeführt:

40% 2-Mercaptoethanol-Formulierung	20% 2-Mercaptoethanol-Formulierung
1 % Igepal	1 % Igepal
100 mM EDTA	100mM EDTA
0,2% SDS	0,02% SDS
40% 2-Mercaptoethanol	20% 2-Mercaptoethanol
0,5% Natriumazid	0,5% Natriumazid

[0036] Die 40% 2-Mercaptoethanol-Formulierung ist für Pflanzen mit hohen Konzentrationen von Polyphenolen bevorzugt; und die 20% 2-Mercaptoethanol-Formulierung ist für allgemeinere Anwendungen bevorzugt.

[0037] Die RNA-Extraktionsreagenzien der vorliegenden Erfindung extrahieren vorzugsweise cytoplasmatische RNA. Die Kernmembran bleibt erhalten, wodurch DNA und andere Kernkomponenten in der Zelle zurückgehalten werden. Die Zellmembran wird permeabilisiert, sie behält aber einen gewissen Grad an Unversehrtheit, wodurch viele cytoplasmatische Komponenten, wie abbauende Enzyme, in der Zelle zurückgehalten werden.

[0038] Alle Patente, Patentanmeldungen und Veröffentlichungen, die hier zitiert sind, werden in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme aufgenommen.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

Protokoll zum Isolieren von RNA im kleinen Maßstab mit Chloroform-Extraktion

[0039] Frisches Pflanzengewebe, z.B. ein Pflanzenblatt oder eine Pflanzenwurzel, wurde in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemahlen. Getrockneter Samen wurde bei Raumtemperatur gemahlen. Alle gemahlene Pflanzenmaterialien wurden bei -70°C gelagert. Zu 0,1 g gemahlenem Gewebe wurden 0,5 ml des vorliegenden RNA-Isolationsreagenz (z.B. 20% 2-Mercaptoethanol-Formulierung) zugegeben. Die Probe wurde gemischt, bis das gemahlene Gewebe gründlich re-suspendiert war, und dann während 5 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

[0040] Die Probe wurde während 2 Minuten bei $12000 \times g$ in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein RNase-freies Röhrchen übertragen. Ein Aliquot von 0,1 ml einer 5M NaCl wurde zum Überstand zugegeben, und die Probe wurde gemischt. Ein Aliquot von 0,3 ml Chloroform wurde zugegeben und gemischt. Die Probe wurde bei 4°C während 10 Min. bei $12000 \times g$ zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde in ein RNase-freies Röhrchen transferiert, und ein gleiches Volumen Isopropyl-Alkohol wurde zugegeben. Die Probe wurde gemischt und bei Raumtemperatur während 10 Min. stehen gelassen. Die Probe

wurde bei ca. 4°C während 10 Min. bei 12000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und in Wasser aufgelöst. Falls eine Trübung beobachtet wurde, wurde die Probe bei 12000 × g während 1 Min. zentrifugiert und der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen transfert.

BEISPIEL 2

Protokoll im kleinen Maßstab mit RNA-Kartuschen-Reinigung

[0041] Frisches Gewebe, z.B. ein Pflanzenblatt oder eine Pflanzenwurzel, wurde in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemahlen. Gerockneter Samen wurde bei Raumtemperatur gemahlen. Das gesamte gemahlene Pflanzenmaterial wurde bei -70° C gelagert. Zu 0,1 g gemahlenem Gewebe wurden 0,5 ml des vorliegenden RNA-Isolationsreagenz (z.B. 20% 2-Mercaptoethanol-Formulierung) zugegeben. Die Probe wurde gemischt, bis das gemahlene Gewebe gründlich re-suspendiert war, und dann während 5 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

[0042] Die Probe wurde auf ein Concert-Homogenisiergerät („Concert Homogenizer“) gegossen und während 2 Min. bei 12000 × g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, wodurch der RNA-Extrakt geklärt wurde. Zum Durchlauf wurde ein gleiches Volumen Guanidin-Isothiocyanat und Ethanol gegeben und durch die Concert-RNA-Kartusche („concert RNA cartridge“) verarbeitet, gewaschen und die RNA wurde mit Wasser entsprechend den Anweisungen des Herstellers eluiert.

BEISPIEL 3

Protokoll für die Isolierung von RNA aus Pflanzen im großen Maßstab

[0043] Frisches Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemahlen. Getrockneter Samen wurde bei Raumtemperatur gemahlen. Das gesamte gemahlene Pflanzenmaterial wurde bei -70° C gelagert. Zu 1 g des gemahlene Gewebes wurden 5ml des vorliegenden RNA-Isolationsreagenz (z.B. 20% 2-Mercaptoethanol-Formulierung) gegeben, gemischt bis die Probe gründlich re-suspendiert war und während 5 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Probe wurde bei 4° C während 5 Min. bei 2600 × g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein RNase-freies Röhrchen übertragen, wobei man die Lösung durch ein 100 µm Nylonsieb passieren ließ. Ein Aliquot von 1 ml 5M NaCl und 3 ml Chloroform wurde zum Überstand gegeben und gemischt. Die Probe wurde bei 4°C während 30 Min. bei 2600 × g zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde in ein RNase-freies Röhrchen übertragen, und ein gleiches Volumen Isopropylalkohol wurde zugegeben. Die Probe wurde gemischt und bei Raumtemperatur während 10 Min. stehen gelassen. Die Probe wurde bei 4°C während 30 Min. bei 2600 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und in Wasser gelöst. Falls eine Trübung beobachtet wurde, wurde die Lösung bei 12000 × g während 1 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen übertragen und bei -70°C gelagert.

Ergebnisse

[0044] Das vorliegende RNA-Isolationsreagenz isoliert RNA in hoher Qualität aus einer Vielzahl von RNA-enthaltenden Materialien, insbesondere aus Pflanzenproben einschließlich solcher, die mit Polyphenolen und Stärke (siehe Tabellen 1-13 und [Fig. 1](#)) angereichert sind. Bei Verwendung der zwei führenden kommerziellen RNA-Isolationsreagenzien (RNeasy und TRIzol) aus Proben, die reich an Polyphenolen und/oder Stärke sind, ist das $A_{260/280}$ -Verhältnis für die isolierte RNA niedrig, was die schlechte Qualität der RNA zeigt. Gel-Analyse zeigt, dass die unter Verwendung des vorliegenden RNA-Isolationsreagenz isolierte RNA intakt ist, unabhängig davon, ob die RNA aus Pflanzen isoliert wurde, die mit Polyphenolen angereichert sind oder nicht ([Fig. 1](#)).

[0045] Die in Tabellen 1-12 und [Fig. 1](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das vorliegende RNA-Isolationsreagenz der vorliegenden Erfindung RNA in hoher Qualität aus einer Vielzahl von Pflanzenproben, einschließlich solcher, die an Polyphenolen oder Stärke angereichert sind, isoliert. Das $A_{260/280}$ -Verhältnis ist vergleichsweise niedrig für RNA, die unter Verwendung der zwei führenden kommerziellen RNA-Isolationsreagenzien (RNeasy und TRIzol) aus Proben isoliert wurde, die an Polyphenolen oder Stärke reich waren, was die schlechte Qualität der RNA zeigt. Die Gel-Analyse zeigt, dass die RNA, die unter Verwendung des vorliegenden RNA-Isolationsreagenz der vorliegenden Erfindung isoliert wurde, intakt ist, selbst wenn die RNA aus an Polyphenolen angereicherten Pflanzen isoliert wurde ([Fig. 1](#)). RNA, die unter Verwendung des vorliegenden RNA-Isolationsreagenzes isoliert wurde, wurde erfolgreich als Templat für RT-PCR und für die Herstellung von

cDNA-Bibliotheken eingesetzt.

[0046] Die in Tabelle 1 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Weymouthskiefer vom Frühlingstrieb DTT erfordert, ein Reduktionsmittel, um RNA zu erhalten, die ausreichend unabgebaut ist, um seine 28S-Ribosomen-RNA-Bande beizubehalten, was durch Gel-Analyse bestimmt wurde (vgl. [Fig. 1](#) für ein Beispiel der RNA, die gemäß der vorliegenden Erfindung, isoliert durch Gel-Elektrophorese, erhalten wurde). Wie in Tabelle 2 gezeigt ist, wird beim Erhöhen der Konzentration des Reduktionsmittels auf 4% 2-Mercaptoethanol die höchste Qualität und höchste RNA-Ausbeute erhalten. Tabelle 3 zeigt, dass eine Konzentration von 4% 2-Mercaptoethanol nicht ausreichend ist, um die Unversehrtheit der RNA bei den problematischeren Koniferen, wie Wacholder und Zeder, die 40% 2-Mercaptoethanol erfordern, aufrechtzuerhalten. Ein Erhöhen der Konzentration von 2-Mercaptoethanol für die beiden Kiefern vermindert signifikant die RNA-Ausbeuten. Wenn variierende 2-Mercaptoethanol-Konzentrationen bei Tomatenblättern getestet wurden, die reich an Polyphenolen sind, zeigt Tabelle 5, dass das Isolieren von intakter RNA vorzugsweise mit einer Konzentration von 20% bis 40% des Reduktionsmittels erreicht wurde.

[0047] Pflanzen mit normalen Konzentrationen an Polyphenolen oder Stärke ergeben niedrigere RNA-Ausbeuten mit 40% 2-Mercaptoethanol, wenn es mit niedrigeren Mengen, z.B. 20%, 2-Mercaptoethanol verglichen wird. Puffmaissamen ergeben eine unbedeutende Menge RNA mit 40% 2-Mercaptoethanol. Eine Verringerung der 2-Mercaptoethanol-Konzentration auf 20% sowie eine Verringerung der SDS-Konzentration auf 0,02% ergibt eine Formulierung, die zum Isolieren von RNA in hoher Qualität aus Samen (hoher Stärkegehalt), Tomaten, Weymouthskiefer und Blaufichte (hoher Polyphenol-Gehalt) und Arabidopsis, Sojabohne, Reis und Mais, die normale Konzentrationen an Stärke und Polyphenolen haben, nützlich ist.

[0048] RNA, die unter Verwendung des vorliegenden RNA-Isolationsreagens isoliert wurde, wurde bei der RT-PCR und nach Poly(A⁺)-Selektion für die Herstellung von cDNA-Bibliotheken (Daten nicht gezeigt) verwendet.

Tabelle 1. RNA Ausbeute aus 100 mg Weymouthskiefer (Frühlingstrieb)

% Igepal	0.1 M EDTA in allen Assays, und Nachextraktionen NaCl, M Konzentration	%SDS	mM DTT	RNA, µg	RNA Qualität durch Gel - Analyse
1	0	0	0	19.0	Abgebaut
2	0	0	0	17.7	Abgebaut
4	0	0	0	16.9	Abgebaut
2	0	0	20	17.9	28S liegt vor
2	0	0.02	0	18.1	Abgebaut
2	0	0.02	20	22.8	28S liegt vor
2	0	0.1	0	26.2	Abgebaut
2	0	0.2	0	31.3	Abgebaut
4	0	0	20	22.4	28S liegt vor
4	0	0.02	0	24.8	Abgebaut
4	0	0.02	20	28.0	28S liegt vor
4	0	0.1	0	19.5	Abgebaut
4	0	0.2	0	33.0	Abgebaut
1	0	0.02	20	22.6	28S liegt vor
4	.25	0.02	20	27.2	28S liegt vor
4	.5	0.02	20	21.4	28S liegt vor
4	2.5	0.02	20	17.5	28S liegt vor

Tabelle 2. RNA Ausbeute aus 100 mg Weymouthskiefer (Frühlingstrieb)

% Igepal	%SDS	mM DTT	% 2-Mercaptoethanol	RNA, µg	RNA Qualität durch Gel - Analyse ; liegt 28S Bande vor?
1	0.02	20	0	27.9	
				28.8	Ja
1	0.2	100	0	34.2	Ja
4	0.02	20	0	34.4	Ja
				26.5	
4	0.02	100	0	35.2	Ja
1	0.02	0	0.4	31.7	Ja
1	0.2	0	4.0	50.4	Ja höchste RNA Qualität
4	0.02	0	0.4	30.8	Ja
4	0.2	0	4.0	12.2	Ja

Tabelle 3. RNA Ausbeute aus 100 mg Konifernadeln und Stechpalme			
Probe	% 2-Mercapto-ethanol	RNA, µg	RNA Qualität durch Gel - Analyse: liegt 28S Bande vor?
Blaufichte	4	29.8	Ja
Buschkiefer	4	20.0	Nein
Weymouthskiefer	4	42.6	Ja
Wacholder	4	11.8	Nein
Zeder	4	18.8	Nein
Stechpalme	4	53.2	Ja
Schierling	4	33.4	Ja
Blaufichte	20	28.6	Ja
Buschkiefer	20	25.2	Ja
Weymouthskiefer	20	38.0	Ja
Wacholder	20	5.6	Nein
Zeder	20	9.9	Nein
Stechpalme	20	80.0	Ja
Schierling	20	22.0	Ja
Blaufichte	40	22.4	Ja
Buschkiefer	40	15.2	Ja
Weymouthskiefer	40	8.2	-
Wacholder	40	5.4	Ja
Zeder	40	9.1	Ja
Stechpalme	40	56.6	Ja
Schierling	40	9.5	Ja

Tabelle 4: Vergleich der RNA – Ausbeute aus 100mg Pflanzennadeln oder Blättern unter Verwendung des RNA – Isolations-Reagenzvs. andere Verfahren

Probe	RNA – Isolations – Reagenz Chloroform – ExtraktionsFormat $\mu\text{g RNA}$ ($A_{260/280}$)	RNA – Isolations – Reagenz Kartuschen – aufreinigung $\mu\text{g RNA}$ ($A_{260/280}$)	TRIzol $\mu\text{g RNA}$ ($A_{260/280}$)	RNeasy $\mu\text{g RNA}$ ($A_{260/280}$)
Blaufichte	16.0 ^a (2.07)	10.5 ^a (2.08)	0.8 (0.92)	4.0 (1.28)
Buschkiefer	10.5 ^b (1.92)	17.7 ^b (1.99)	52.4 (1.07)	2.6 (1.21)
Weymouths-kiefer	37.2 ^b (2.04)	12.8 ^b (1.78)	16.0 (1.11)	1.6 (1.26)
Wacholder	18.0 ^a (1.49)	7.7 ^a (1.75)	14.4 (1.19)	3.0 (1.33)
Zeder	6.0 ^a (1.52)	8.3 ^a (1.65)	126.4 (1.23)	3.2 (1.10)
Stechpalme	39.2 ^b (1.98)	22.6 ^b (1.89)	47.4 (2.01)	23.6 (2.11)
Schierling	15.9 ^a (1.60)	16.5 ^a (1.76)	57.0 (1.35)	8.6 (1.07)

a 40% 2-Mercaptoethanol/100 mM EDTA/1% Igepal/0.2% SDS

b 20% 2-Mercaptoethanol/100 mM EDTA/1% Igepal/0.2% SDS

% 2-Mercaptoethanol	RNA, µg	RNA Qualität durch Gel – Analyse: liegt 28S Bande vor?
4	444	Nein
10	507	Nein
20	384	Ja
40	370	Ja

Plant Tissue	RNA-Isolations – Reagenz µg RNA (A _{260/280})	RNeasy µg RNA (A _{260/280})	TRIzol µg RNA (A _{260/280})
Arabidopsis-Blätter	37.8 (2.17)	23.8 (2.20)	32.8 (2.00)
Maisblätter	17.7 (2.13)	18.3 (2.16)	32.3 (1.95)
Reisblätter	7.0 (2.16)	14.7 (2.04)	21.5 (1.96)
Pflaumenblätter	23.0 (1.92)	0.6 (1.28)	12.7* (1.13)
Tomatenblätter	13.3 (1.99)	1.8 (0.96)	19.1* (1.44)
Tomatenwurzeln	7.8 (2.00)	5.3 (1.95)	7.5 (1.73)
Kartoffelknolle	15.7 (1.98)	2.0 (1.25)	69.9* (1.46)

* Stellt Überdosen dar, wenig oder keine RNA liegt bei Gel – Analyse vor.

Pflanze	40% 2-ME mit 1% Igepal 0.2% SDS 0.1%CTAB RNA, µg	40% 2-ME mit 1% Igepal 0.5%CTAB RNA, µg	40% 2-ME 1% Igepal 0.2% SDS RNA, µg	20% 2-ME kein 1% Igepal 0.2% SDS RNA, µg
Arabidopsis - Blätter	34.3 (5.5)	44.9 (2.1)	42.1 (2.8)	44.7 (4.4)
Maisblätter	13.3 (13.3)	19.4 (6.7)	17.5 (10.9)	24.9 (16.5)
Reisblätter	8.9 (14.4)	9.0 (7.3)	8.1 (16.3)	11.4 (32.3)
Weymouthskiefer Frühlingstrieb	13.3 (1.7)	26.6 (1.4)	17.3 (1.4)	14.4 (4.5)

Pflanzen- blatt.	40% βME 0.2% SDS 1% Igepal	20% βME 0.2% SDS 1% Igepal	20% βME 1% Igepal	20% βME 0.02%SDS 1% Igepal	20% βME 0.5%CTAB 1% Igepal	20% βME .05%CTAB 1% Igepal
Arabi- dopsis	37.8 (2.8)	52.6 (4.4)	55.0 (5.1)	54.0 (5.6)	42.8 (4.7)	53.6 (3.8)
Mais	15.1 (10.9)	24.9 (16.5)	29.1 (9.6)	37.8 (13.8)	21.9 (5.7)	30.0 (5.8)
Reis	7.9 (7.6)	19.0 (13.2)	38.3 (18.5)	17.0 (9.7)	14.3 (3.5)	33.5 (6.3)
Tomate	15.8 (3.9)	11.3 (12.0)	12.8 (11.7)	17.3 (13.3)	13.7 (4.7)	20.6 (8.5)

Puffmais- Menge, g	40% βME 1% Igepal 0.2% SDS	20% βME 1% Igepal 0.02% SDS	20% βME 1% Igepal 0.05% SDS
1.0	1.2 (17) 1.4 (71)	172.8 (6.6) 178.3 (5.7)	199.4 (9.1) 163.1 (10.9)

Gewebe	Salz **	RNA-Ausbeute μg (%DNA)
Zuckerrübenblatt, 1g	Nichts	531.3 (4.8)
Zuckerrübenblatt, 1g	2.5 M Am. Acetat	421.3 (5.6)
Puffmaissamen, 1g	Nichts	0.0
Puffmaissamen, 1g	2.5 M Am. Acetat	227 (9.6)
Puffmaissamen, 5g	1 M NaCl	1060.8 (6.4)
		1320.8 (5.9)
Kartoffelknolle, 5g	1 M NaCl	922.5 (3.7)

* 20% 2-Mercaptoethanol, 1% Igepal, 0.02% SDS, 100 mM EDTA, 0.5% Natriumazid-Formulierung

** Salz vor der Chloroformzugabe zu dem ungetrübten RNA-Extrakt zugeben

Gewebe	RNA- Isolations- Reagenz	RNeasy	TRIzol
Blätter	78.4	62.5	90.8
	86.6	53.3	110.2
Stamm	39.5	33.4	32.1
	39.7	27.7	27.0
Wurzeln	24.6	15.9	15.2
	19.3	15.0	12.8

* 20% 2-Mercaptoethanol, 1% Igepal, 0.02% SDS 100 mM EDTA, 0.5% Natriumazid-Formulierung

Probe	Menge, g	RNA-Ausbeute, mg
Arabidopsis, ganze Pflanze	20	9.7
Tomatenblätter	10	5.0 3.9
Reisblätter	10	4.1 4.7 4.1
Maisblätter	30	9.5
Futtermaissamen	40	8.0
Pilzmycel	1	2.7

* 20% 2-Mercaptoethanol, 1% Igepal, 0.02% SDS, 100 mM EDTA, 0.5% Natriumazid-Formulierung

Pflanzenmaterial	RNA, µg (A _{260/280})	Qiagen RNeasy RNA, µg (A _{260/280})	TRIzol RNA, µg (A _{260/280})	Ambion/ Plant Aid RNA, µg (A _{260/280})
Kartoffelknolle	21.9 (1.6)	1.1 (1.5)	5.8 (1.7)	0.0
	31.5 (2.0)	0.7 (1.5)	18.4 (1.8)	0.0
Kartoffelblätter	62.9 (2.0)	46.0 (2.0)	26.6 (1.5)	3.0 (1.9)
	93.8 (2.0)	38.0 (1.5)	50.2 (1.6)	12.0 (2.2)
Sojabohnen- samen	27.0 (2.0)	12.7 (2.0)	110 (1.7)	1.6 (1.8)
	67.4 (2.0)	4.0 (2.2)	112 (1.7)	4.6 (1.2)
Sojabohnen- blätter	135.8 (2.0)	44.1 (2.0)	109 (1.6)	0.8 (1.5)
	114.5 (1.7)	43.4 (2.0)	33.4 (1.8)	2.5 (1.8)
Weymouthskiefer Frühlingstrieb	21.8 (1.8)	0.5 (1.4)	9.3 (1.1)	0.9 (1.4)
	18.3 (1.8)	2.5 (1.5)	10.4 (1.1)	0.8 (1.2)
Blaufichten- nadeln	13.8 (1.8)	2.0 (1.4)	5.1 (1.4)	0.9 (1.2)
	27.4 (1.8)	8.8 (1.0)	2.8 (1.2)	1.0 (1.2)
Tomatenblätter	42.0 (2.0)	10.6 (2.0)	22.0 (1.8)	1.9 (1.7)
	179 (1.4)	5.5 (1.9)	25.0 (1.8)	9.4 (1.1)
Arabidopsis ganze Pflanze	148 (1.7)	25 (1.7)	36.0 (1.8)	3.9 (2.0)
	52.0 (1.9)	30 (1.9)	18.0 (1.7)	3.2 (2.0)

* 20% 2-Mercaptoethanol, 1% Igepal, 0.02% SDS, 100 mM EDTA, 0.5% Natriumazid-Formulierung

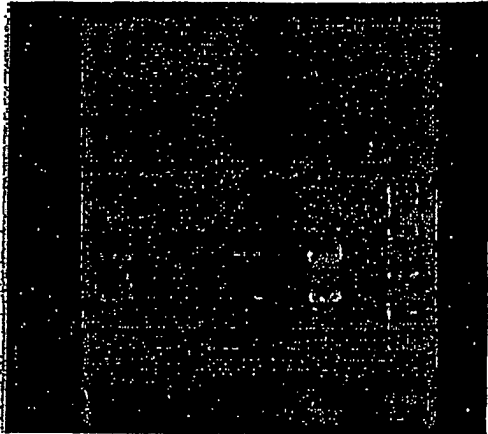
Patentansprüche

1. Reagenz zur Extraktion von RNA, umfassend:
etwa 0,5–3% IGEPAL
etwa 0,02–0,25 M EDTA
etwa 0,01–0,5% SDS
etwa 1–40% 2-Mercaptoethanol und
eine Menge an Natriumazid, die wirksam ist, die Haltbarkeit des Reagenz' zu verlängern.
2. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend:
etwa 1 % IGEPAL;
etwa 100 mM EDTA;
etwa 0,2% SDS;
etwa 40% 2-Mercaptoethanol und
etwa 0,5% Natriumazid.
3. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend:
etwa 1% IGEPAL;
etwa 100 mM EDTA;
etwa 0,02% SDS;
etwa 20% 2-Mercaptoethanol und
etwa 0,5% Natriumazid.
4. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 1–2% IGEPAL.
5. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 0,01–0,1% SDS.
6. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 0,02–0,2% SDS.
7. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 0,05–0,2 M EDTA.
8. Reagenz gemäß Anspruch 7, umfassend etwa 0,1 M EDTA.
9. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 10–40% 2-Mercaptoethanol.
10. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 4–40% 2-Mercaptoethanol.
11. Reagenz gemäß Anspruch 1, worin das Reagenz frei von Phenol ist.
12. Reagenz gemäß Anspruch 1, umfassend etwa 0,5% Natriumazid.
13. Verfahren zum Isolieren von RNA aus Pflanzenmaterial, umfassend das Mischen des Materials mit einem Extraktionsreagenz gemäß Anspruch 1, um einen Extrakt zu bilden.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, weiterhin umfassend:
(a) Trennen der Zellbruchstücke von dem Extrakt, um eine ungetrübte Fraktion zu bilden;
(b) organisches Extrahieren der ungetrübten Fraktion, um eine wässrige Phase und eine organische Phase zu bilden; und
(c) Präzipitieren der RNA aus der wässrigen Phase.
15. Verfahren gemäß Anspruch 13, worin das Pflanzenmaterial Pflanzengewebe, Pilzmyzel oder -samen umfasst, wobei das Verfahren weiterhin das Pulverisieren des Gewebes oder des Samens zum Bilden eines Pulvers oder einer Paste umfasst.
16. Verfahren gemäß Anspruch 14, worin die Zellbruchstücke durch Zentrifugation entfernt werden.
17. Verfahren gemäß Anspruch 14, worin das organische Extrahieren eine Chloroform-Extraktion umfasst.
18. Verfahren gemäß Anspruch 14, worin das Präzipitieren eine Alkohol-Präzipitation umfasst.

19. Verfahren gemäß Anspruch 13, weiterhin umfassend das Trennen der Zellbruchstücke von dem Extrakt zum Bilden einer ungetrübten Fraktion.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, weiterhin umfassend das Binden der RNA an eine feste Matrix.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, worin das Binden vorzugsweise das Binden von mRNA ist.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, weiterhin umfassend das Eluieren von der Matrix.
23. Verfahren gemäß Anspruch 13, worin das Pflanzenmaterial Pflanzengewebe, Pilzmyzel oder -samen umfasst und worin der Extrakt zytoplasmatische RNA aus Zellen oder Zellbruchstücken des Pflanzenmaterials enthält; wobei es weiterhin den Schritt des Trennens der zytoplasmatischen RNA aus den Zellen oder den Zellbruchstücken umfasst.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, worin das Trennen Filtrieren oder Sieben einschließt.
25. Verfahren gemäß Anspruch 23, worin das Trennen Präzipitieren von RNA und Sammeln des Präzipitats einschließt.
26. "Kit" zum Extrahieren von RNA, umfassend eine oder mehr der folgenden Komponenten:
(a) ein RNA-Extraktionsreagenz gemäß Anspruch 1;
(b) ein RNase-freies Waschreagenz;
(c) einen Gewebefilter und
(d) ein RNase-freies Probenaufbewahrungsröhrchen.
27. "Kit" gemäß Anspruch 22, weiterhin umfassend Komponenten zur organischen Extraktion der RNA.
28. "Kit" gemäß Anspruch 22, weiterhin umfassend eine RNase-freie Matrix zum Binden von RNA.

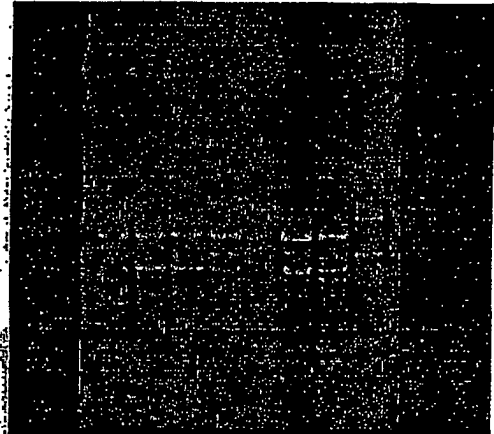
Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



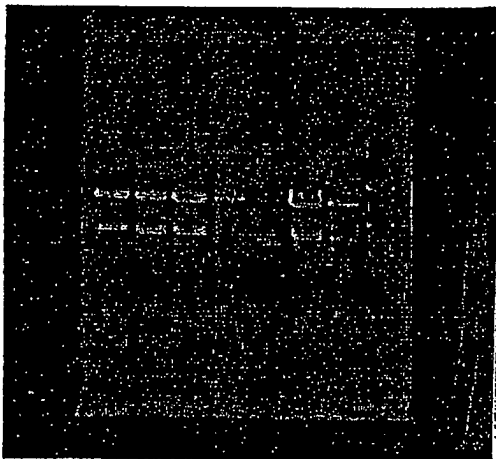
a b c d e f g h

FIG. 1



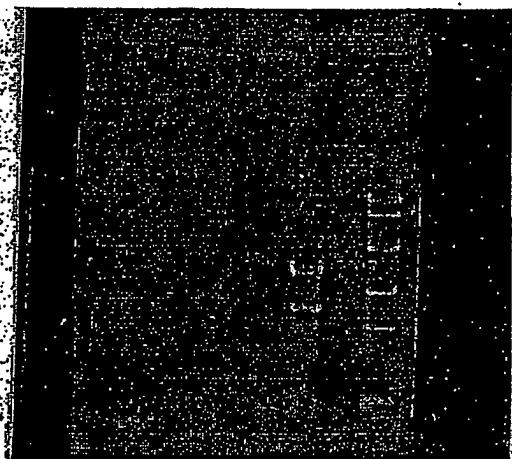
a b c d e f g h

FIG. 2



a b c d e f g h

FIG. 3



a b c d e f g h

FIG. 4