



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 198 54 973 B4** 2010.02.04

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **198 54 973.3**
(22) Anmeldetag: **30.11.1998**
(43) Offenlegungstag: **31.05.2000**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **04.02.2010**

(51) Int Cl.⁸: **C09C 1/00** (2006.01)
C09C 3/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07H 19/20 (2006.01)
C07H 1/06 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Institut für Neue Materialien gem. GmbH, 66123
Saarbrücken, DE; Roche Diagnostics GmbH,
68305 Mannheim, DE**

(72) Erfinder:
**Harttig, Herbert, 67122 Altrip, DE; Riedling,
Michael, 66386 St Ingbert, DE; Mennig, Martin,
66287 Quierschied, DE; Schmidt, Helmut, 66130
Saarbrücken, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

| | | |
|-----------|-------------------|-----------|
| DE | 195 37 985 | A1 |
| DE | 43 07 262 | A1 |
| DE | 689 20 778 | T2 |
| GB | 21 16 206 | A |
| EP | 07 57 106 | A2 |
| DE | 195 20 398 | A1 |

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren**

(57) Hauptanspruch: Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche, wobei mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm haben dadurch gekennzeichnet, daß die Glasoberfläche sich aus SiO₂, B₂O₃, K₂O, CaO, Al₂O₃ und ZnO zusammensetzt.

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Anmeldung ist eine Zubereitung von Partikeln mit einer Glasoberfläche, ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Zubereitung sowie ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe dieser Zubereitung.

[0002] Nukleinsäuren sind in jüngerer Zeit immer mehr in den Blickpunkt des Interesses der medizinischen Diagnostik gerückt. So wurden mittlerweile eine Vielzahl von Nachweisverfahren erarbeitet, bei denen die Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter Nukleinsäuren als Anzeichen für eine Erkrankung bewertet wird. Hierzu gehören z. B. Nachweise infektiöser Organismen, z. B. von Viren oder Bakterien in Körperflüssigkeiten, aber auch der Nachweis von Mutationen in genomischen Nukleinsäuren, z. B. in der Onkologie. Nukleinsäuren liegen in dem üblicherweise verwendeten Probenmaterial jedoch in sehr geringen Konzentrationen vor. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verfahren zur Isolierung der Nukleinsäuren von anderen Probenbestandteilen, wie Proteinen oder anderen zellulären Bestandteilen, die teilweise die anschließenden Nachweisverfahren stören, erarbeitet. Ein Teil dieser Verfahren verwendet festphasengebundene Fangsonden, die mit den abzutrennenden Nukleinsäuren hybridisieren können und diese an der Festphase zurückhalten, während die übrigen Probenbestandteile entfernt werden. Ein solches Verfahren ist beispielsweise in EP-B-0 305 399 beschrieben. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß sie sich jeweils nur für die Reinigung von Nukleinsäuren mit einer ganz speziellen Nukleotidsequenz eignen.

[0003] In WO 91/12079 ist ein Verfahren für die Isolierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Magnetpartikeln aus Zellulose und Eisenoxid beschrieben, wobei die Partikelgröße mit zwischen 1 und 10 µm angegeben ist. Diese Partikel enthalten keine Glasoberfläche und sind nur für eine Isolierung unter Präzipitation von Nukleinsäuren geeignet. Durch Aggregation werden jedoch eine Vielzahl von Probenbestandteilen eingeschlossen, die spätere Verfahrensschritte stören.

[0004] In EP-B-0 389 063 wird ein Verfahren vorgeschlagen, bei dem die Probe mit einem Gemisch eines chaotropen Guanidiniumsalzes und Silicapartikeln gemischt wird. Unter diesen Bedingungen binden Nukleinsäuren relativ sequenzunabhängig an die Silica-Oberfläche. Die übrigen Probenbestandteile können abgewaschen und die Nukleinsäuren anschließend eluiert werden.

[0005] In WO 96/41811 bzw. DE 195 20 398 A1 und DE 195 37 985 A1 werden magnetische Partikel mit einer im wesentlichen porenfreien Glasoberfläche zur sequenzunabhängigen Reinigung von Nukleinsäuren beschrieben. Die dort verwendeten Partikel haben eine bevorzugte Korngröße von zwischen 10 und 60 µm.

[0006] In WO 96/41840 werden Pigmente beschrieben, die eine Glasoberfläche einer Dicke von mindestens 0,8 µm aufweisen. Als eine glasbildende Komponente werden auch Verbindungen von Zink vorgeschlagen. Es entstehen dabei Pigmentpartikel mit einer Teilchengröße von vorzugsweise 2 bis 20 µm.

[0007] DE 689 20 778 T2A1 beschreibt magnetisch anziehbare Teilchen und ein dazugehöriges Herstellverfahren.

[0008] DE 43 07 262 A1 hat ein magnetisches polymeres Siliciumdioxid zum Gegenstand.

[0009] EP 0 757 106 A2 offenbart nukleinsäurebindende magnetische Träger in Form von superparamagnetischen Silicapartikeln mit einer spezifischen Oberfläche von etwa 100 bis 800 m²/g.

[0010] GB 2 116 206 A beschäftigt sich mit Mikroträgern mit einer Glasoberfläche für die Zellkultivierung.

[0011] Es hat sich nun herausgestellt, daß bei den bisher beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Partikeln nach dem Sol-Gel-Prozeß, bei dem Kernpartikel einer vorgegebenen Größe mit einem Gel beschichtet werden und anschließend eine Verdichtung zu einer Glasoberfläche stattfindet, ein hoher Anteil von Partikeln gebildet wird, die kein Kernpartikel enthalten. Dies führt entweder dazu, daß bei mit solchen Zubereitungen durchgeführten Nukleinsäurenachweisverfahren große Verluste an Nukleinsäuren stattfinden oder die Feianteile zur Erhöhung der Ausbeute aufwendig abgetrennt werden müssen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, den vorliegenden Stand der Technik ganz oder teilweise zu verbessern, insbesondere Partikel mit einer relativ engen Korngrößenverteilung herzustellen und die Ausbeute bei Nukleinsäurereinigung weiter zu erhöhen.

[0012] Gegenstand der Erfindung ist eine Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche, wobei

mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm haben.

[0013] Weitere Gegenstände der Erfindung sind ein Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln enthaltend einen Kern ummantelt mit einer Gelschicht oder einer Glasschicht und ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Zubereitung.

[0014] Als Partikel bezeichnet der Fachmann feste Materialien mit einem geringen Durchmesser. Bevorzugt haben diese Partikel eine im wesentlichen kugelige Oberfläche. Um für die Reinigung von Nukleinsäuren besonders gut geeignet zu sein, ist es wünschenswert, daß das Partikel einen Kern (Pigmentanteil) aufweist, der bevorzugt magnetisch ist und der mit einer Glasschicht ummantelt ist. Solche Kerne enthalten bevorzugt Metalloxide, wie Aluminiumoxid, Eisenoxid, Chromoxid, Kupferoxid, Manganoxid, Bleioxid, Zinnoxid, Titanoxid, Zinkoxid und Zirkoniumoxid. Die Zusammensetzung dieses Kerns ist für die erfindungsgemäßen Partikel weniger wesentlich, da der Kern mit einer Glasoberfläche ummantelt wird, so daß der Kern nicht direkt mit der Probe, aus der die Nukleinsäure isoliert werden soll, in Berührung kommt. Solche Kerne sind kommerziell erhältlich. Sofern der Kern Fe_3O_4 (Magnetit) oder Fe_2O_3 (Maghämit) enthält, sind diese Kerne magnetisch.

[0015] Eine Glasoberfläche im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einem siliziumhaltigen amorphen Material. Das Glas enthält bevorzugt neben Siliziumoxid einen oder mehrere der folgenden Komponenten (in mol%):

B_2O_3 (0–30%), Al_2O_3 (0–20%), CaO (0–20%), BaO (0–10%), K_2O (0–20%), Na_2O (0–20%), MgO (0–18%), Pb_2O_3 (0–15%), ZnO (0–6%).

[0016] In geringerem Umfang von 0–5% können auch eine Vielzahl anderer Oxide, wie z. B. Na_2O , Mn_2O_3 , TiO_2 , As_2O_3 , Fe_2O_3 , CuO , ZrO_2 , CoO usw. enthalten sein. Als besonders wirksam haben sich Oberflächen einer Zusammensetzung von SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , CaO , K_2O , und ZnO erwiesen. Unter dem Gesichtspunkt der Ausbeute an Nukleinsäuren besonders bevorzugte Borsilikatgläser haben einen Zinkoxidgehalt von 2–6, bevorzugt von ca. 4 mol%. Besonders bevorzugt besteht die Glasschicht aus 68–79 mol% SiO_2 , 15–5 mol% B_2O_3 , 6–2.5 mol% Gesamtmenge an K_2O und Na_2O , 4–1 mol% CaO , 8–2 mol% Al_2O_3 , 6–2 mol% ZnO . Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Gläser, die durch den sogenannten Gel-Sol-Prozeß und anschließendes Trocknen und Verdichten der gebildeten Schicht gebildet werden. Dieser Prozeß ist in seinen Grundzügen bekannt und wurde z. B. in C. J. Brinker, G. W. Scherer "Sol Gel science – The physics and chemistry of Sol Gel Processing", Academic Press Inc. 1990 und Sol-Gel Optics, Processing and Applications Lisa C. Klein Ed. Kluwer Academic Publishers 1994, Seite 450 ff. sowie in DE-A-1941191, DE-A-3719339, DE-A-4117041 und DE-A-4217432 beschrieben. Im Gel-Sol-Prozeß werden Alkoxide von netzwerkbildenden Komponenten, z. B. SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 und ZnO zusammen mit Oxiden und Salzen anderer Komponenten, z. B. in alkoholischer Lösung, vorgelegt und hydrolysiert.

[0017] Durch die Zugabe von Wasser wird der Hydrolyseprozeß der Ausgangskomponenten in Gang gesetzt. Die Reaktion verläuft relativ rasch, da die Alkaliionen katalytisch auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Kieselsäureesters einwirken. Nach Ablauf der Gelbildung kann das entstehende Gel getrocknet und durch einen thermischen Prozeß zu einem Glas verdichtet werden.

[0018] Das Mengenverhältnis Sol/Pigment hat einen erheblichen Einfluß auf die Ausbeute an erfindungsgemäßen magnetischem Pigment. Grenzen sind dadurch gegeben, daß der Pigmentanteil so gering ist, daß eine noch pump- und sprühfähige Masse entsteht. Bei zu geringem Pigmentanteil wird der Feinanteil, z. B. von nicht-magnetischem Material zu groß und stört. Als im Hinblick auf die Pigmentaushute zweckmäßige Mengenverhältnisse wurden 10 bis 45 g Pigment/100 ml Sol gefunden.

[0019] Die Aufschlammung wird zur Entstehung eines Pulvers bevorzugt durch eine Düse versprüht und das Aerosol auf einer Fallstrecke getrocknet. Die Düse wird bevorzugt geheizt, um die Trocknung der Aufschlammung zu beschleunigen. Abhängig von der Geometrie der Düse beträgt die Düsensentemperatur bevorzugt ca. 120 bis 250°C. Ein Kompromiß wird gefunden durch ausreichende Verdampfungsgeschwindigkeit, jedoch Vermeiden von Verspritzen.

[0020] Im Hinblick auf die Ausbeute ist die Verdichtungstemperatur möglichst hoch zu wählen. Ist sie jedoch zu hoch, verkleben die Partikel untereinander und es bilden sich Agglomerate, die herausgesiebt werden sollten. Ein Zusatz von Zink in der Schicht erhöht jedoch überraschenderweise den Schmelzpunkt, so daß eine höhere Verdichtungstemperatur (zwischen 710 und 800°C) möglich ist. Die Nachbehandlung unter Luft führt bei zu hohen Temperaturen zu einem Verlust der magnetischen Eigenschaften, weshalb zu hohe Temperaturen vermieden werden sollten. Auch hier sind bei Zusatz von Zink andere Temperaturen möglich (bevorzugt

zwischen 150 und 250°C).

[0021] Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zubereitung wird eine Zubereitung von Kernpartikeln, in der mehr als 75 Gew.% der Kernpartikel eine Korngröße von zwischen etwas weniger als 0.5 und etwas weniger als 15 µm haben, in den Sol/Gel-Prozeß eingesetzt. Die Kernpartikel müssen um soviel kleiner sein als die glasmantelnden Partikel, wie die Dicke der Glasschicht ausmacht. Die Glasschicht wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zwischen 5 nm und 1 µm groß sein, abhängig von den jeweils gewählten Umständen, wie Verhältnis Gel zu Kernpartikel. Im Durchschnitt dürfte die Glasschicht zwischen 0.2 und 0.3 µm dick sein.

[0022] Besonders bevorzugt ist eine Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche wobei mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 2 und 15 µm haben. Besonders bevorzugt ist der Anteil der Partikel mit der bestimmten Korngröße größer als 90 Gew.%.

[0023] Besonders bevorzugt werden magnetische Kernpartikel eingesetzt. Die erfindungsgemäße Zubereitung hat den Vorteil, daß bevorzugt mehr als 95 Gew.% der Partikel mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm, bevorzugt zwischen 2 und 15 µm magnetisch sind. Dies bedeutet, daß gegenüber den bekannten Verfahren der Anteil von nicht-kernhaltigen Partikeln drastisch reduziert ist. Dies kann man daran erkennen, nur wenig nicht-magnetische Partikel enthalten sind. Dies führt dazu, daß es praktisch nicht mehr erforderlich ist, die gebildeten nicht-magnetischen Partikel von den magnetischen Partikeln abzutrennen, bevor die Zubereitung in Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren eingesetzt wird. Dies bedeutet eine Vereinfachung im Herstellprozeß.

[0024] Außerdem kann die erfindungsgemäße Zubereitung dadurch charakterisiert werden, daß bevorzugt weniger als 50% der Partikel eine Korngröße von weniger als 2 µm haben. Dies hat zur Folge, daß der nicht-magnetische Feinanteil, der bei kleinen Korngrößen einen hohen relativen Anteil ausmacht, stark reduziert ist. Besonders bevorzugt haben weniger als 2% der Partikel eine Korngröße von weniger als 0.5 µm.

[0025] Bevorzugt sind nicht mehr als 10%, besonders bevorzugt zwischen 10 und 40% der Partikel der Zubereitung Partikel mit einer Korngröße von mehr als 10 µm.

[0026] Die erfindungsgemäße Zubereitung kann neben den erfindungsgemäßen Partikeln noch weitere nicht-glashaltige Bestandteile enthalten, wie z. B. Puffersubstanzen oder ein Suspensionsmittel, z. B. Wasser oder alkoholische Lösungen von Wasser.

[0027] Die Glasschicht der Partikel der erfindungsgemäßen Zubereitung enthält bevorzugt einen Anteil von zwischen 2 und 6 mol%, besonders bevorzugt 4 mol% Zinkoxid. Dies kann dadurch erreicht werden, daß der Anteil von Zinkoxid an der festen Masse des Sols, verglichen mit den Anteilen der übrigen festen Komponenten, in diesem Größenordnungsbereich liegt. Der Anteil von Zinkoxid vergrößert sich mit Reduzierung des Anteils von Boroxid, insbesondere bei längerem Erhitzen, da Boroxid unter den Herstellbedingungen schon flüchtig ist.

[0028] Partikel, die eine Glasschicht aufweisen, in der der Anteil von Zinkoxid zwischen 2 und 6 mol% liegt, haben sich als besonders wirksam bei der Reinigung von Nukleinsäuren herausgestellt. Die Ausbeute an Nukleinsäuren konnte, verglichen mit derselben Glasschicht ohne Zinkoxid, teilweise um 50% erhöht werden.

[0029] Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln mit einem Kern ummantelt mit einer Gelschicht enthaltend weniger als 5 Gew.% kernlose Partikel enthaltend die Schritte Suspendieren von Kernpartikeln in einem Sol unter Verwendung einer Kernpartikelzubereitung und Sprühtrocknen der Suspension unter Gelbildung, wobei die Kernpartikelzubereitung zu 75 Gew.% aus Partikeln mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm, bevorzugt zwischen 2 und 15 µm besteht.

[0030] Zur Durchführung des Gel/Sol-Prozesses, welchen das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren benutzt, wird auf die Beschreibung im Stand der Technik verwiesen. Der wesentliche Unterschied der Erfindung zu dem Vorbeschriebenen, ist der Einsatz einer bestimmten Kernpartikelzubereitung, durch welche eine Zubereitung mit weniger als 5 Gew.% kernloser Partikel hergestellt werden kann. Als besonders vorteilhaft hat sich ein Verfahren erwiesen, bei dem zunächst ein Sol aus Tetraalkylorthosilikaten, Alkylboraten, Aluminiumalkoholaten und Alkalialkoholaten in Ethanol hergestellt wird und diese Mischung mit Kalzium erhitzt wird. Anschließend wird die Mischung durch Zusatz von Wasser hydrolysiert. In das so gebildete Sol werden die Kernpartikel in Festform zugegeben und, bevorzugt mit Ultraschall, suspendiert. Anschließend wird die Suspension unter Gelbildung in einem Sprüh-Trocknungsverfahren, bei dem die Düse geheizt wird, und bei dem im wesentlichen

Partikel entstehen, in denen 1 bis nur wenige Kernpartikel pro Partikel enthalten sind (bevorzugt enthalten weniger als 1% der Partikel mehr als 10 Kernpartikel), versprüht. Das Sprühprodukt wird anschließend erhitzt, um das Gel zu einem Glas zu verdichten. Auch hier hat der Zusatz von Zinkoxid zum Gel einen erheblichen Vorteil. Die Verdichtung kann bei höheren Temperaturen als bei solchen ohne Zinkzusatz durchgeführt werden, da der Erweichungspunkt des entstehenden Glases höher liegt. Dadurch lassen sich organische Restbestandteile aus den eingesetzten Materialien leichter austreiben.

[0031] Da nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Zubereitung mit einem sehr geringen Anteil von kernlosen Partikeln entsteht, ist im allgemeinen keine anschließende Fraktionierung nach kernlosen/kernhaltigen Partikeln mehr erforderlich.

[0032] Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren durch nicht-kovalente Bindung der Nukleinsäuren aus einer Probe an Partikel mit einer Glasoberfläche, Entfernen nicht-gebundener Probenbestandteile und Elution der gebundenen Nukleinsäuren von der Glasoberfläche, wobei eine erfindungsgemäße Zubereitung eingesetzt wird. Das Verfahren wird besonders einfach, wenn die Partikel magnetisch sind.

[0033] Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe magnetischer Partikel mit einer Glasoberfläche sind in WO 96/41811 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hier voll inhaltlich Bezug genommen. Als Proben für das erfindungsgemäße Reinigungsverfahren kommen insbesondere klinische Proben, wie Blut, Serum, Mundspülflüssigkeit, Urin, Zerebralflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Plasma, Punktate oder Knochenmarksproben in Frage. Bevorzugtes Probenmaterial ist Serum. Zur Reinigung der Nukleinsäuren wird die Probe, erforderlichenfalls nach Lyse eventuell enthaltender zellulärer Strukturen und Verdau von störenden Probenbestandteilen, mit der erfindungsgemäßen Zubereitung versetzt, z. B. in Form einer bestimmten Menge einer Suspension der Partikel. Nach einer Inkubationszeit, während derer die Nukleinsäuren an die Glasoberfläche sequenzspezifisch binden, wird die Flüssigkeit zusammen mit den nicht-gebundenen Probenbestandteilen entfernt und die Partikel gewünschtenfalls gewaschen, um Reste zu entfernen. Die noch daran gebundenen Nukleinsäuren werden durch Elution mit einer Flüssigkeit, in der sich die Nukleinsäuren gut lösen, von der Oberfläche entfernt. Die resultierende Flüssigkeit kann nun beliebig weiter bearbeitet werden, insbesondere in Amplifikationsverfahren eingesetzt werden, wie z. B. die PCR, da während des Reinigungsverfahrens die meisten Enzyminhibitoren abgetrennt wurden.

[0034] Sofern die Partikel magnetisch sind, ist die Entfernung der Flüssigkeit von Partikeln mit den Nukleinsäuren besonders einfach, da die Partikel mit Hilfe eines Magneten gesammelt und festgehalten werden können, während die Flüssigkeit entfernt wird. Wenn die Partikel nicht magnetisch sind, können sie von der Flüssigkeit durch Filtration mit einem geeigneten Filter abgetrennt werden.

[0035] Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Sol zur Herstellung einer zinkfreien Schicht ($74 \text{ SiO}_2 \times 15 \text{ B}_2\text{O}_3 \times 4 \text{ K}_2\text{O} \times 2 \text{ CaO} \times 5 \text{ Al}_2\text{O}_3$)

[0036] In einen 5 Liter Rundkolben werden 1750 ml Tetraethylorthosilikat (Hersteller: Wacker, Burghausen) vorgelegt und bei Raumtemperatur unter Rühren (500 U/min) zügig zugegeben:

541 ml Triethylborat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

250 ml Kaliummethanolat (25%ig in Methanol (Hersteller: Fluka, Deisenhofen))

261 g Aluminium-sec.-Butylat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

292 ml Ethanol und

8,49 g Calcium (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

[0037] Die Mischung wird anschließend unter Rühren erhitzt bis zum starken Rückfluß. Über 30 Minuten wird eine Mischung von insgesamt 583 ml Ethanol und 233 ml Wasser zugetropft. Nach Abkühlen auf $< 50^\circ\text{C}$ wird das Sol umgefüllt in einen offenen Behälter und 1200 g Pigment IRIODIN 600 Black Mica (Hersteller: Merck, Darmstadt) dazugegeben. Das Sol wird nach vollständiger Pigmentzugabe noch 1 Minute bei 500 U/min gerührt und anschließend 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach der Ultraschallbehandlung wird das Sol-Pigment-Gemisch mit einem Dissolverrührer bei ca. 500 U/min gerührt, bis die gesamte Menge aufgebraucht ist.

Beispiel 2

Herstellung von glasbeschichtetem Pigment (MGP)

[0038] Versprüht wird in einem Sprühturm der Fa. Nubiosa, Konstanz, mit einem Durchmesser von 0,75 m, einer Höhe von 2,5 m und einer Verdunstungsleistung (bezogen auf Wasser) von 1–3 Liter/Stunde. Die Luft-einlaßtemperatur beträgt 270°C, die Auslaßtemperatur ca. 130°C. Der Durchsatz der Luft ist 7,2 m³/min. Zum Sprühen wird eine Zweistoffdüse verwendet mit einem Sprühdruk von 2 bar. Die Förderleistung der verwendeten Kugelventilmembranpumpe beträgt 60 g Sol/min.

[0039] Das Sprühprodukt wird in einem Zyklon abgefangen, an Luft bei 250°C 1 Stunde vorverdichtet und anschließend in einem Stickstoffofen mit einer Heizrate von 1 K/min auf eine Temperatur von 675°C gebracht, 1 Stunde dort gehalten und abgekühlt auf 300°C. Bei 300°C wird Sauerstoff zudosiert, 1 Stunde gehalten, dann abgekühlt auf Raumtemperatur. Nach dem Abkühlen erfolgt eine Siebung mit einem Sieb mit einer Maschenweite von 50 µm zur Entfernung von eventuell vorhandenen Aggregaten. Damit ist die Herstellung abgeschlossen.

Beispiel 3

Sol zur Herstellung einer zinkhaltigen Schicht (70,67 SiO₂ × 14,33 B₂O₃ × 4 K₂O × 2 CaO × 5 Al₂O₃ × 4 ZnO)

[0040] In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wird ein zinkhaltiges Sol bereitet. Dazu werden folgende Ädunkte eingewogen und analog behandelt:

1258 ml Tetraethylorthosilikat (Hersteller: Wacker, Burghausen)

387 ml Triethylborat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

188 ml Kaliummethanolat 25%ig in Methanol (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

196 g Aluminium-sec.-Butylat (Hersteller: Aldrich, Steinheim)

1285 ml Ethanol

6,39 g Calcium (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

58,5 g Zinkacetat dehydriertes Dihydrat (Hersteller: Fluka, Deisenhofen)

[0041] Nach dem Kochen unter Rückfluß werden 178 ml H₂O zusammen mit 444 ml Ethanol binnen 30 Minuten zugetropft. Nach dem Abkühlen werden 1200 g Pigment zugesetzt. Ansonsten siehe Beispiel 1.

Beispiel 4

Herstellung von zinkhaltigen glasbeschichtetem Pigment

[0042] Das pigmenthaltige Sol aus Beispiel 3 wird analog Beispiel 2 verarbeitet. Die Verdichtungstemperatur beträgt jedoch 750°C.

Beispiel 5

Herstellung von zinkhaltigen glasbeschichtetem Pigment mit modifizierter Nachbehandlung (MGP)

[0043] Das pigmenthaltige Sol aus Beispiel 3 wird analog Beispiel 2 verarbeitet. Die Verdichtungstemperatur beträgt jedoch 750°C und die Temperatur bei der Behandlung in Sauerstoff beträgt 200°C.

Beispiel 6

Ermittlung der Ausbeute von DNA bzw. RNA mit radioaktivem ³²P

[0044] Zum direkten Nachweis von gebundener bzw. nicht-gebundener DNA bzw. RNA werden ³²P-markierter HIVgag RNA Standard mit 1,4 kb bzw. ³²P-markierter Lambdaamplikon mit 3 kb eingesetzt. Als Probe dient Negativplasma (human) enthaltend jeweils 10⁹ Kopien.

Durchführung der Probenvorbereitung

[0045] In ein 2 ml Eppendorf-Gefäß werden 500 µl Negativplasma mit 10⁹ Kopien ³⁷P gelabelte Lambdaamplikon gegeben. Dazu werden 480 µl Bindepuffer/Proteinase K-Lösung (5:1) zupipettiert, gevortext und bei

70°C für 10 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 400 µl isopropanolische MGP-Suspension mit einem Gesamtinhalt von 3 mg MGP zupipettiert. Unmittelbar darauf wird durch Vortexen gemischt. Die Probe wird dann für 15 Minuten auf einem Mischer, z. B. Thermomischer 5436 von Eppendorf, inkubiert.

[0046] Die MGP werden durch Überführung der Probe in einen Magnetseparator konzentriert. Nach 1 Minute wird der Überstand vollständig abpipettiert.

[0047] 5 ml Waschpuffer werden zu den MGPs pipettiert. Die Probe wird gevortext und dann in den Magnetseparator überführt. Der Überstand wird nach 1 Minute abpipettiert. Die Waschprozedur wird noch 2 × wiederholt.

[0048] Zu den MGP werden 200 µl Elutionspuffer zugesetzt. Bei 80°C wird 10 Minuten auf einem Thermomischer bei 1400 RPM inkubiert. Die Probe wird in den Magnetseparator überführt und nach 1 Minute wird das gesamte Eluat abgenommen. Das Eluat wird dann in ein neues Gefäß überführt und in einem Szintillationszähler vermessen.

[0049] Aus dem Verhältnis der Radioaktivität des Eluates zu der Radioaktivität der Probe vor der Reinigungsprozedur kann die Ausbeute ermittelt werden.

[0050] Ergebnisse mit MGPs unterschiedlicher Beschichtung:

| | Ausbeute DNA | Ausbeute RNA |
|--|--------------|--------------|
| MGP gemäß Beispiel 2 (ohne Zink) | 44% | 44% |
| MGP gemäß Beispiel 4 (mit Zink) | 62% | 59% |
| MGP gemäß Beispiel 6 (mit Zink, modifizierte Nachbehandlung) | 66% | 70% |

Beispiel 7

Black Mica als Pigmentbasis

[0051] Gemäß Beispiel 1 wird eine Charge gefertigt, bei der das Pigment Black Mica (BM) ist.

Beispiel 8

Black Mica als Pigmentbasis

[0052] Gemäß Beispiel 1 wird eine Charge gefertigt, bei der das Pigment MMB (Microna Matte Black (Hersteller: Merck, Darmstadt)) ist.

Beispiel 9

Signalhöhe nach Amplifikation bei Probenvorbereitung mit MGP auf verschiedener Pigmentbasis

[0053] MGP gemäß den Beispielen 7 und 8 wird bei einer Probenvorbereitung eingesetzt. Als Probe dient Humanplasma mit 100 Kopien/ml HCV-Viren. Das Eluat der Probenvorbereitung wird einer Amplifikation unterworfen und das Amplifikationsergebnis mit einem Elektrolumineszenzverfahren detektiert. In einem weiteren Versuch war die Probe Humanplasma mit 600 Kopien/ml HBV-Viren.

| | HCV ECL Counts | HBV ECL Counts |
|----------------------------|----------------|----------------|
| MGP gemäß Beispiel 7 (BM) | 97000 | 25000 |
| MGP gemäß Beispiel 8 (MMB) | 127000 | 43000 |

Patentansprüche

1. Zubereitung enthaltend Partikel mit einer Glasoberfläche, wobei mehr als 75 Gew.% dieser Partikel eine Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm haben **dadurch gekennzeichnet**, daß die Glasoberfläche sich aus SiO₂, B₂O₃, K₂O, CaO, Al₂O₃ und ZnO zusammensetzt.

2. Zubereitung gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß mehr als 95 Gew.% der Partikel mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm magnetisch sind.
3. Zubereitung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß weniger als die Hälfte der Partikel eine Korngröße von weniger als 2 µm haben.
4. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß weniger als 2% der Partikel eine Korngröße von weniger als 0.5 µm haben.
5. Zubereitung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel einen magnetischen Kern aufweisen, der mit Glas ummantelt ist.
6. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nicht mehr als 10% dieser Partikel Partikel mit einer Korngröße von mehr als 10 µm sind.
7. Zubereitung gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen Glasmantel aufweisen, der einen Anteil von zwischen 2 und 6 mol% Zinkoxid enthält.
8. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln mit einem Kern ummantelt mit einer Gelschicht enthaltend weniger als 5 Gew.% kernlose Partikel und wobei die Gelschicht sich aus SiO₂, B₂O₃, K₂O, CaO, Al₂O₃ und ZnO zusammensetzt, enthaltend die Schritte
 - Suspendieren von Kernpartikeln in einem Sol unter Verwendung einer Kernpartikelzubereitung
 - Sprühtrocknen der Suspension unter Gelbildungdadurch gekennzeichnet, daß die Kernpartikelzubereitung zu 75 Gew.% aus Partikeln mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm besteht.
9. Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren durch nicht-kovalente Bindung der Nukleinsäuren aus einer Probe an Partikel mit einer Glasoberfläche enthaltend ZnO, Entfernen nicht-gebundener Probenbestandteile und Elution der gebundenen Nukleinsäuren von der Glasoberfläche.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einer Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 in Kontakt gebracht wird.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel magnetisch sind und bei Entfernung der Probenbestandteile durch einen Magneten festgehalten werden.
12. Verwendung von Zinkoxid in nach dem Sol/Gel-Prozeß erzeugten Glasschichten zur Erhöhung der Bindfähigkeit der Glasoberfläche für Nukleinsäuren.
13. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von Partikeln mit einem Kern ummantelt mit einer Glasschicht enthaltend weniger als 5 Gew.% kernlose Partikel und wobei die Glasoberfläche sich aus SiO₂, B₂O₃, K₂O, CaO, Al₂O₃ und ZnO zusammensetzt, enthaltend die Schritte
 - Suspendieren von Kernpartikeln in einem Sol unter Verwendung einer Kernpartikelzubereitung
 - Sprühtrocknen der Suspension unter Gelbildung
 - Verdichtung des Gels zum Glasdadurch gekennzeichnet, daß die Kernpartikelzubereitung zu 75 Gew.% aus Partikeln mit einer Korngröße von zwischen 0.5 und 15 µm besteht.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen