(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-507155
(P2014-507155A)
(43)公表日　平成26年3月27日(2014.3.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	4B029

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 20 頁）

(21)出願番号　特願2013-554672 (P2013-554672)
(86)(22)出願日　平成24年2月21日 (2012.2.21)
(85)翻訳文提出日　平成25年9月24日 (2013.9.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/025861
(87)国際公開番号　WO2012/115926
(87)国際公開日　平成24年8月30日 (2012.8.30)
(31)優先権主張番号　61/444,952
(32)優先日　平成23年2月21日 (2011.2.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　309023416
リーアニクス・インコーポレイテッド
Ｒｈｅｏｎｉｘ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国１４８５０ニューヨーク州
イサカ、ソーンウッド・ドライブ２２番
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(74)代理人　100157956
弁理士　稲井　史生

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイクロ流体素子を基礎とした核酸精製方法

(57)【要約】
マイクロ流体素子中の試料からの核酸を精製する方法を提供する。該方法は原核または真核生物、ウイルス、細胞、組織、器官などのような、核酸を含む当分野で既知のいかなる源からの核酸を精製するために使用できる。特定の実施例において、組織は全血である。該核酸を精製する方法は、マイクロ流体素子中で完全自動で作動し得る。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
好適なマイクロ流体素子を提供する；
溶解した溶液に有機溶媒を添加する；
溶解した溶液に電磁ビーズを添加する；
核酸をビーズに結合する；
核酸結合電磁ビーズを溶液から分離する；
核酸結合電磁ビーズを洗浄液中で洗浄する；
洗浄したビーズを洗浄液から分離する；
洗浄したビーズから核酸を溶出する；
溶出した核酸の適切な分子電荷を回復する；
溶液から核酸を再捕獲する；
再捕獲した核酸を洗浄液で洗浄する；および
再捕獲した核酸を溶出して精製された核酸を得る、
段階を含む、溶解した液体試料溶液からの、マイクロ流体素子を基礎とした核酸（例えばＤＮＡまたはＲＮＡ）精製方法。
【請求項２】
核酸の適切な分子電荷を回復する段階が、溶出した核酸に好適なバッファーを添加する段階、および溶液に有機溶媒を添加する段階をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
少なくともいくつかの試薬をマイクロ流体素子に添加し、精製工程を実施することを更に含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
自動的に精製工程を実施するために必要な試薬のすべてを含むマイクロ流体素子を提供することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
精製した核酸の評価、分析、および増幅の少なくとも１つをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
核酸結合電磁ビーズを洗浄液中で洗浄し、洗浄液から洗浄されたビーズを分離する段階を所望の回数繰り返すことをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＲＮＡｓｅ処理を実施して、ＲＮＡを除去してＤＮＡのみを精製することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＤＮＡｓｅ処理を実施して、ＤＮＡを除去してＲＮＡのみを精製することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
源の液体試料を得る；
液体試料を溶解し、液体試料溶液を作成する；
好適なマイクロ流体素子を提供する；
溶解した溶液に有機溶媒を添加する；
溶解した溶液に電磁ビーズを添加する；
核酸をビーズに結合する；
核酸結合電磁ビーズを溶液から分離する；
核酸結合電磁ビーズを洗浄液中で洗浄する；
洗浄したビーズを洗浄液から分離する；
洗浄したビーズから核酸を溶出する；
溶出した核酸の適切な分子電荷を回復する；
溶液から核酸を再捕獲する；

再捕獲した核酸を洗浄液で洗浄する；および
再捕獲した核酸を溶出して精製された核酸を得る、
段階を含む、核酸を含む源からの、マイクロ流体素子を基礎とした核酸（例えばＤＮＡまたはＲＮＡ）精製方法。
【請求項１０】
核酸の適切な分子電荷を回復する段階が、溶出した核酸に好適なバッファーを添加する段階、および溶液に有機溶媒を添加する段階をさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
少なくともいくつかの試薬をマイクロ流体素子に添加し、精製工程を実施することを更に含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
自動的に精製工程を実施するために必要な試薬のすべてを含むマイクロ流体素子を提供することをさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１３】
精製した核酸の評価、分析、および増幅の少なくとも１つをさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１４】
核酸結合電磁ビーズを洗浄液中で洗浄し、洗浄液から洗浄されたビーズを分離する段階を所望の回数繰り返すことをさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１５】
洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＲＮＡｓｅ処理を実施して、ＲＮＡを除去してＤＮＡのみを精製することをさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１６】
洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＤＮＡｓｅ処理を実施して、ＤＮＡを除去してＲＮＡのみを精製することをさらに含む、請求項９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、出典明示によりその全内容が本明細書に組み込まれる、２０１１年２月２１日に出願された、米国仮特許出願第６１／４４４，９５２号に関連し、その優先権を得る。
【０００２】
政府利益についての陳述
該当なし
【背景技術】
【０００３】
背景
発明の技術分野
本発明の実施形態は一般に核酸などの関心のある生体分子を調製、精製、増幅および検出するための方法、特に、マイクロ流体素子を用いて実施されるそのような方法を対象とする。
【０００４】
関連技術の説明
１９８０年代前半におけるその開始以来、分子診断学の使用は、特に感染症の原因となる成長の遅い、または難培養性の細菌の検出を可能にするための手段として、大いに拡大している。ウイルス量テストを含むウイルス性の病原菌の検出もまた、分子診断学によりかなり改良された。より多くのデータがヒトゲノムに関して利用可能になるに従い、薬理ゲノミクス、コンパニオン診断、および他のオーダーメイド医療アプリケーションにおける分子診断学の使用は本格化を続けている。

【０００５】
核酸増幅は、核酸が単離され、分子診断学および他の核酸スクリーニングの目的における使用のためにより正確および効率的に操作される、当分野で既知の標準的方法である。試料に存在するデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）やリボ核酸（ＲＮＡ）などの核酸を増幅するための様々な方法が文献に記載されている。これらの中で、最も広く行われているものが、米国特許番号４，６８３，１９５（マリスら、”Ｐｒｏｃｅｓｓ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ， ｄｅｔｅｃｔｉｎｇ， ａｎｄ／ｏｒ－ｃｌｏｎｉｎｇ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ，”を名称とする、１９８７年７月２８日に発行）および米国特許番号４，６８３，２０２（マリス、”Ｐｒｏｃｅｓｓ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ，”を名称とする、１９８７年７月２８日に発行）に記載された、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）である。簡潔に、ＰＣＲは、プライマーが、関心のある配列に隣接する（ｆｌａｎｋ）ように選択され、各々の鎖を短いオリゴヌクレオチドプライマーにアニーリングすることにより、標的となる配列に相補的な、変性した鎖を増幅することからなる。プライマーはその後、ポリメラーゼ酵素によって仲介され、それ自身がプライマーに相補的な伸長品を得て、それ故、標的となる配列の追加の複製を合成するためのテンプレートとして機能する。変性、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長の各々の連続したサイクルは、本質的には以前のサイクルで合成された標的の量を倍にし、標的の指数的な蓄積をもたらす。

【０００６】
一般に、ＰＣＲ方法論は当分野で既知のいくつかの制限に悩まされる。そのような制限の１つは、Ｔａｑなどの、一般的に使用される熱安定のポリメラーゼ酵素の貧しい忠実性による。これは１サイクルから次まで伝播されるヌクレオチド塩基の誤取込みをもたらす。そのような誤取込みは、１０００塩基の取込みあたり一回程度の頻度で起こり得ると見積もられる。２番目の制限は、異なったｃＤＮＡは異なった効率で増幅され、増幅産物中にいくつかのｃＤＮＡ配列の表現の不足および他の過剰な表現をもたらす。わずかな率の小さな違いでさえ、最小３０サイクルだけ増幅した後の産物におけるこれらのｃＤＮＡの表現において、数千倍の差をもたらし得る。

【０００７】
他の制限は、出発材料におけるＰＣＲの阻害剤の存在（例えば、血液中のヘモグロビン）である。これらの阻害剤はしばしば精製を経て運ばれ、精製から得られた核酸で行われる増幅反応を制限するかまたは完全に妨害する。したがって、このことはよりよい上流での精製戦略の必要性のため、他の原理を提供する（例えばＪ．Ｂｅｓｓｅｔｔｉ，Ｐｒｏｆｉｌｅｓ ｉｎ ＤＮＡ，ＰＣＲ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ，An Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ ＰＣＲ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ，Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍａｒｃｈ ２００７を参照）。

【０００８】
また、重要であることは、核酸増幅が増幅されるべき核酸の出発試料と同じくらい正確であるということである。純度の低い核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）は、出発試料の構造を反映しないかもしれない増幅産物をもたらし、したがって、診断目的で使用する（または信頼される）ことができない。

【０００９】
生化学および分子生物学の従来からの実務が、研究される対象の大きさに高頻度で反比例するスケールでの物理過程の資源を必要とする可能性があると認められる。例えば、予測分析のための核酸断片などの生体試料の調製および精製に関連する装置およびプロセス化学は、容易に無菌設備がある大規模な生物学実験室を必要とし得る。さらに、核酸断片を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの既知の核酸増幅手段を実施するために、同様の規模の環境面で隔離された施設が典型的に必要となり得る。

【００１０】
したがって、当技術において、分子診断および他の核酸のスクリーニングの目的において使用されるために、核酸がより正確に、効率的に精製、同定および操作され得るような

、核酸増幅技術における使用のための、改良された核酸精製方法の必要性がある。生物学的または化学的試料の分析のための、特に、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アミノ酸およびタンパク質などの、そのような試料に由来する生物学的に活性な巨大分子の検出および分析における、流体の処理のための改良されたマイクロ流体システムの必要性もまた存在する。システムが大量生産でき、安価で、好ましくは使い捨てであること；システムが簡単に操作され、多くのまたはほとんど全ての流体プロセス段階が自動化されていること；システムがカスタマイズ可能であり、システムが巨大分子の検出が望まれている様々なアプリケーションに適合するように簡単におよび速やかにシステムを再構築できるようなモジュールであること；およびシステムがわかりやすく有意義な分析結果を提供すること、は、有益であり、有利である。当分野における、挑戦および短所のさらに充実した議論、ならびに本発明の教示に関連して利用され得る例示的な解決策は、その主題が出典明示により本明細書に完全に組み込まれる、“Ｓｅｌｆ－ｃｏｎｔａｉｎｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｓｓａｙ Ａｐｐａｒａｔｕｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ，ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，”を名称とする、本出願人による同時係属の米国出願、番号１３／０３３，１６５（公開番号ＵＳ２０１１／０２７５０５８）に開示される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

概要

本発明の実施形態は、溶解した液体試料溶液から核酸（例えばＤＮＡまたはＲＮＡ）を精製するためのマイクロ流体素子を基礎とした方法である。方法は、好適なマイクロ流体素子を提供する；溶解された溶液に有機溶媒を添加する；電磁ビーズを溶解された溶液に添加する；ビーズに核酸を結合する；溶液から核酸結合電磁ビーズを分離する；洗浄液で核酸結合電磁ビーズを洗浄する；洗浄液から洗浄されたビーズを分離する；洗浄されたビーズから核酸を溶出する；溶出した核酸の適切な分子電荷を回復（ｒｅｅｓｔａｂｌｉｓｈｉｎｇ）する；溶液から核酸を再捕獲（ｒｅｃａｐｔｕｒｉｎｇ）し、再捕獲した核酸を洗浄液で洗浄する；および再捕獲した核酸を溶出し、精製された核酸を得る、段階を含む。本明細書および請求の範囲において使用される、好適なマイクロ流体素子は、開示された工程および請求された工程の段階を補助および実施する能力を有するマイクロ流体素子またはシステム（システムは一般に、マイクロ流体素子によって実施された工程段階を制御するために、マイクロ流体流体素子に接続された併用される機器（ｃｏｍｐａｎｉｏｎ ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ）を含む）を意味する。例示的な好適なマイクロ流体素子および併用される機器は、米国出願番号１３／０３３，１６５（ｉｄ）に開示されるようなものである。好適なマイクロ流体素子とシステムの他の例は当分野で既知である。例えば、限定を意味するものではないがシリコン、ガラス、水晶、エラストマー材料（例えばＰＤＭＳ）、および高分子（例えばポリスチレン、アクリル、ＣＯＣおよび他のもの）などのマイクロ流体素子の生産に一般的に使用されるいかなる材料からも、装置が構成され得る。マイクロ流体素子は、写真製版、エンボス加工、レーザーエッチング、機械加工、射出成形などのマイクロ流体システム生産に関するあらゆる既知の方法で生産され得；装置は、様々な材料を組み込み、または単一物質から組み立てられ得る。装置は、別個に組み立てられた部品を組み込むか、または方法を実行するために必要な機能を提供するように設計された様々な層で構成され得る。マイクロ流体素子は、全てか少なくともいくつかの試薬が精製を実施する間に装置に加えられるように、手動またはロボット制御で操作され得るか、または装置がリザーバーに配置された精製に必要な全ての試薬を含み、完全自動で作動し得る。一般にマイクロ流体素子は、マイクロ流体素子に設計された機能を実行できる器具に関連するであろう。非限定的で、例示的な様々な態様によると、方法は以下の段階、特性（ｆｅａｔｕｒｅ）、または特徴（ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）をさらに含み得る：

－精製の間に、核酸が基質に結合できるように、好適なバッファーを溶出した核酸に添加する段階をさらに含む、核酸の適切な分子電荷を回復する工程；

－少なくともいくつかの試薬をマイクロ流体素子に手動またはロボット制御で添加し、精製工程を実施する；
－自動的に精製工程を実施するために必要な試薬のすべてを含むマイクロ流体素子を提供する；
－精製した核酸の評価（ｅｓｔｉｍａｔｅ）、分析、および／または増幅；
－核酸結合電磁ビーズを洗浄液中で洗浄し、洗浄液から洗浄されたビーズを分離する工程を所望の回数繰り返す；
－核酸がビーズに結合するために十分な時間、溶液を混合する；
－洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＲＮＡｓｅ処理を実施して、ＲＮＡを除去してＤＮＡのみを精製する；
－洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＤＮＡｓｅ処理を実施して、ＤＮＡを除去してＲＮＡのみを精製する。

【００１２】

本発明の他の実施形態は、核酸を含む源（ｓｏｕｒｃｅ）から核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を精製するためのマイクロ流体素子を基礎とした方法である。方法は、源の液体試料を入手する；液体試料を溶解させ、液体試料溶液を作成する；好適なマイクロ流体素子を提供する；溶解させた溶液に有機溶媒を添加する；電磁ビーズを溶解された溶液に添加する；ビーズと核酸が結合するために十分な時間、溶液を攪拌する；溶液から核酸結合電磁ビーズを分離する；洗浄液中で核酸結合電磁ビーズを洗浄する；洗浄液から洗浄されたビーズを分離する；洗浄されたビーズから核酸を溶出する；溶出した核酸の適切な分子電荷を回復する；溶液から核酸を捕獲する；および捕獲した核酸を溶出し、精製された核酸を得る、段階を含む。非限定的で、例示的な様々な態様によると、方法は以下の段階、特性、または特徴をさらに含み得る：
－精製の間に、核酸が基質に結合できるように、好適なバッファーを溶出した核酸に添加する、および有機溶媒を溶液に添加する段階をさらに含む、核酸の適切な分子電荷を回復する工程；
－少なくともいくつかの試薬をマイクロ流体素子に手動またはロボット制御で添加し、精製工程を実施する；
－自動的に精製工程を実施するために必要な試薬のすべてを含むマイクロ流体素子を提供する；
－精製した核酸の評価、分析、および／または増幅；
－核酸結合電磁ビーズを洗浄液中で洗浄し、洗浄液から洗浄されたビーズを分離する段階を所望の回数繰り返す；
－洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＲＮＡｓｅ処理を実施して、ＲＮＡを除去してＤＮＡのみを精製する；
－洗浄したビーズからの核酸の溶出の段階後に、ＤＮＡｓｅ処理を実施して、ＤＮＡを除去してＲＮＡのみを精製する。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】図１は、例示された本発明の実施形態による、核酸を含む源から核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を精製するためのマイクロ流体素子を基礎とした方法のフローダイヤグラムである。

【００１４】

【図２】図２Ａ、Ｂは、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子の機能を制御するための機器の制御インターフェース部を示す。

【００１５】

【図３】図３Ａ～Ｇは、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子を示す。

【００１６】

【図４】図４は、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子から得られた、溶出ＤＮＡのマイクロリットルあたりのナノグラム（ｎｇ／μｌ）における、結果を示す。
【００１７】
【図５】図５は、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子から得られたＤＮＡからの、溶出ＤＮＡを紫外光分析（λ＝２６０ｎｍ；λ＝２８０ｎｍ）に供した結果を示す。
【００１８】
【図６】図６は、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子から得られたＤＮＡからの、溶出ＤＮＡを紫外光分析（λ＝２６０ｎｍ；λ＝２３０ｎｍ）に供した結果を示す。
【００１９】
【図７】図７は、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子から得られたＤＮＡからのゲル電気泳動の結果を示す。
【００２０】
【図８】図８は、本発明の例示的な実施態様による、生体試料からの核酸精製のための具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体素子から得られたＤＮＡからのゲル電気泳動の結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
発明の非限定的な、例示の実施形態の詳細な説明
図１は、核酸を含む源から核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を精製するためのマイクロ流体素子を基礎とした方法のフローダイヤグラム１００を示す。方法は以下の好適なマイクロ流体素子にて実施される。
【００２２】
図２ＡおよびＢは、核酸精製方法において使用されるマイクロ流体素子を制御し、溶解させた生体試料から解放された核酸を捕獲する媒体としての電磁ビーズで被覆されたシリカを含む、例示的に好適なマイクロ流体システム（以下、「マイクロ流体素子」）の制御インターフェース部１５を示す（米国出願番号１３／０３３，１６５（公開番号ＵＳ２０１１／０２７５０５８、ｉｄ）を参照）。
【００２３】
図３Ａは、具体化された方法を実施する例示的に好適なマイクロ流体システム（以下、「マイクロ流体素子」）の層にされた平面図を示しており、それはマイクロ流体素子の磁気分離／濃縮チャネル域５７および流体チャネル３９を標的とする選択的に活性化された磁石アセンブリ５１（図２Ｂ）を組み込んでいる制御インターフェース部１５と接続する。
【００２４】
図３Ｂ～Ｇは、以下の例示的な核酸精製工程をさらに説明する。図３Ｂを参照すると、生体試料は試料入力リザーバー３３中に置かれる。酵素は、共通試薬リザーバー３４の中に（手動または自動的に）分配されて、試料入力リザーバー３３にポンプ輸送され、その後ゆるやかに攪拌しながらインキュベートされる。溶解バッファーは、共通試薬リザーバー３４の中に分配さて、試料入力リザーバー３３にポンプ輸送され、その後ゆるやかに攪拌しながらインキュベートされる。電磁ビーズは、共通試薬リザーバー３４の中に分配さて、試料入力リザーバー３３にポンプ輸送され、その後ゆるやかに攪拌しながらインキュベートされる。有機アルコール（例えば、イソプロパノール）は、共通試薬リザーバー３４の中に分配さて、試料入力リザーバー３３にポンプ輸送され、その後ゆるやかに攪拌しながらインキュベートされ、元の生体試料中の細胞から解放された核酸を捕獲する電磁ビーズをもたらす。
【００２５】

図２Ｂおよび３Ｃをさらに参照すると、磁石４９は分離／濃縮チャネル５７の下に位置し、溶解された生体試料溶液は、分離／濃縮チャネル５７を通って廃棄リザーバー３５にポンプ輸送され、磁石４９により発生する磁場によって分離／濃縮チャネル５７において電磁ビーズに捕獲された核酸が捕獲される。磁石４９はその後、分離／濃縮チャネル５７下の離れた位置まで下げられ、電磁ビーズを捕獲した磁場が除かれる。次いで、共通試薬リザーバー３４（前処理（ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ））の中に洗浄バッファーを分配し、分離／濃縮チャネル５７にポンプ輸送し、分離／濃縮チャンネル５７で数回時計回りまたは反時計回りのいずれかで循環させ、ビーズを再懸濁および洗浄する。磁石４９を上げて分離／濃縮チャネル５７の下に位置させ、洗浄されたビーズを含む溶液は、分離／濃縮チャネル５７を通って廃棄リザーバー３５にポンプ輸送され、磁石４９により発生する磁場によって分離／濃縮チャネル５７において電磁ビーズに捕獲された核酸が捕獲される。磁石４９は分離／濃縮チャネル５７下の離れた位置まで下げられ、電磁ビーズを捕獲した磁場が除かれる。同じかまたは他の洗浄バッファーを共通試薬リザーバー３４（前処理）中に分配し、分離／濃縮チャネル５７にポンプ輸送し、分離／濃縮チャンネル５７で数回時計回りまたは反時計回りのいずれかで循環させ、ビーズを再懸濁および洗浄する。磁石４９を上げて分離／濃縮チャネル５７の下に位置させ、洗浄されたビーズを含む溶液は、分離／濃縮チャネル５７を通って廃棄リザーバー３５にポンプ輸送され、磁石４９により発生する磁場によって分離／濃縮チャネル５７において電磁ビーズに捕獲された核酸が捕獲される。アッセイで必要になる繰返し数まで上記の洗浄段階を続ける。共通試薬リザーバー３４（前処理）中に溶出バッファーを分配し、それを廃棄リザーバー３５にポンプ輸送し、前処理領域のリザーバー、チャネル、およびダイヤフラムからあらゆる残余の試薬を取り除く。磁石４９を下げ、溶出バッファーを共通試薬リザーバー３４（前処理）中に分配し、分離／濃縮チャネル５７にポンプ輸送し、分離／濃縮チャンネル５７で数回時計回りまたは反時計回りのいずれかで循環させ、ビーズから核酸を溶出する。磁石４９を上げて分離／濃縮チャネル５７の下に位置させ、溶出された核酸を含む溶液が分離／濃縮チャネル５７を通って共通試薬リザーバー３４（前処理）にポンプ輸送され、磁石４９により発生する磁場によって分離／濃縮チャネル５７において電磁ビーズが捕獲される。

【００２６】

図３Ｄをさらに参照すると、溶出した核酸を含む溶液が、いったん共通試薬リザーバー（３４）にポンプ輸送され、高塩濃度バッファーが共通試薬リザーバー３４（前処理）に分配される。核酸がさらなる精製のための適切な基質と結合できるように、溶出された核酸が現時点で回復された分子電荷を有するように、有機アルコール（例えばエタノール）が共通試薬リザーバー３４（前処理）に分配される。現時点で回復された適切な分子電荷の溶出された核酸を含む、共通試薬リザーバー３４（前処理）の中身を、シリカフィルターリザーバー３６中のシリカフィルター３６ｂの上部にポンプ輸送し、核酸がシリカフィルターに結合するように中身をシリカフィルターリザーバーに引き込み、残りの溶液を廃棄リザーバー３５にポンプ輸送する。

【００２７】

図３Ｅをさらに参照すると、同じまたは別の洗浄バッファーを共通試薬リザーバー３４（溶出（ｅｌｕｔｉｏｎ））に分配し、シリカフィルターリザーバー３６中のシリカフィルター３６ｂの上部にポンプ輸送し、シリカフィルターリザーバー３６中のシリカフィルター３６ｂを通じて中身を引き込み、廃棄リザーバー３５にポンプ輸送する。アッセイの要求に応じて、同じまたは別の洗浄バッファーで繰り返される。

【００２８】

図３Ｆをさらに参照すると、溶出バッファーをリザーバー３７（溶出）に分配し、それをシリカフィルターリザーバー３６中のシリカフィルター３６ｂの底部までポンプ輸送する。

【００２９】

図３Ｇをさらに参照すると、現状でシリカフィルターを通過した溶出された核酸を含むシリカフィルターリザーバー３６の中身を引き出し、それを溶出リザーバー３７（中央（

ｃｅｎｔｅｒ））、その後溶出リザーバー３７Ｌおよび３７Ｒに等しくポンプ輸送するか、あるいは溶出リザーバー３７（中央）を迂回してリザーバー３７Ｌおよび３７Ｒに等量を直接ポンプ輸送する。溶出された核酸はさらなる分析または増幅のための状態とする。この方法で精製された核酸は増幅反応を阻害する不純物を、通常用いられる精製を実施した核酸よりも低い濃度で含む。

【００３０】

図４－８は、具体化された核酸精製方法を実施するためのマイクロ流体素子を使用することにより得られた結果を示す。特に、図４は、Ａ２６０ＵＶ測定による、個別の精製試料（Ｓ１からＳ４）の核酸回復の評価、およびビーズのみを使用するより大きい回復、これは次の精製の間に元々回復された核酸の一部が失われた結果である、を示す。重要なことだが、第二の溶出は、常法のＤＮＡ分析および増幅のために、好適な多量のＤＮＡを提供する。図５は、Ａ２６０／Ａ２８０　ＵＶ測定による、４つの個別の精製試料（Ｓ１からＳ４）の一般的な核酸純度の評価を示す。ビーズのみの方法での従来の習慣から予想されるように、Ａ２６０／Ａ２８０法は、この測定によりある程度純粋な核酸を提供するであろうが、この測定はビーズのみの試料に実際に含まれるある汚染物質を捕捉しない。図６では、Ａ２６０／Ａ２３０　ＵＶ測定による、４つの個別の精製試料（Ｓ１からＳ４）の核酸純度の評価を示し、第二の精製からの有意な純度の改善を説明する。Ａ２６０／Ａ２３０測定は、Ａ２６０／Ａ２８０測定を使用することでは測定できないある汚染物質の存在を捕捉する。達成された純度は、より大きな量の阻害物質（特に全血からの核酸精製に関するもの）の除去の結果である。図７は、全血試料（Ｓ１からＳ４）からのゲノムＤＮＡのゲル電気泳動を示す。レーン１、３、５および７の試料は、ビーズのみの精製から溶出され、レーン２、４、６および８の試料は、ビーズの後に続くシリカカラムから溶出された。痕跡は、ビーズのみの精製試料に存在するより小さいＤＮＡ断片および多量のＲＮＡである。図８は、全血試料（Ｓ１からＳ４）からのＰＣＲアンプリコンのゲル電気泳動を示す。レーン１、３、５および７の試料は、ビーズのみの精製から溶出され、レーン２、４、６および８の試料は、ビーズの後に続くシリカカラムから溶出された。レーン２、４、６および８の、より暗く強いバンドは、減少された阻害物質および精製化学（ｐｕｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）のキャリーオーバーをもつより純粋なＤＮＡ溶出物からの増幅を示す。

【００３１】

本明細書に開示される方法の実施形態は原核または真核生物、ウイルス、細胞、組織、器官などのような、核酸を含む当分野で既知のいかなる源からの核酸を精製するために使用できる。例示的な態様において、組織は全血である。他の例示的な態様において、試料は液化されるか、または液体に溶解される。他の例示的な態様において、方法は、核酸精製に先立つ、対象となる核酸を含む細胞または生物の培養（または増殖）の段階を除外する。

【００３２】

典型的な態様によると、核酸（例えばＤＮＡ）を精製するための方法に先だって、以下の予備段階が実施できる：液体サンプルの溶解（例えば、リチカーゼ（Ｌｙｔｉｃａｓｅ）またはリゾチーム酵素の添加、他の好適な溶解酵素、カオトロピック剤、超音波処理、レーザー溶解または同様の性質を有すると当分野で知られている他の溶解システム、および任意に、好適なマイクロ流体素子におけるＲＮＡｓｅまたはＤＮＡｓｅによる液体試料および細胞成分を含む溶液の形成）；溶液の攪拌；好適な温度、例えば室温での溶液のインキュベート；プロテイナーゼＫ（または同様の性質を有すると当分野で知られている他のプロテイナーゼ）の溶液への添加；溶液の攪拌；好適な温度、例えば室温または５５℃まで、での溶液のインキュベート；当分野で既知の溶解／結合バッファーの溶液への添加（当分野で知られているいかなる溶解バッファー／結合バッファーも、（当分野で既知の方法を用いて）核酸が精製マトリクスに結合するために最適化されていれば、使用できる）；溶液の攪拌；好適な温度、例えば室温での溶液のインキュベート；電磁ビーズの溶液への添加（当分野で知られているいかなる好適な電磁ビーズが使用できる、ここで、ビー

ズは核酸が結合できるようにシリカ様化学品でコートされる）；（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）ＭｙＯｎｅ（登録商標）ＳＩＬＡＮＥ）；および再度の溶液の攪拌。そのような準備段階は、標準の卓上装置上、または精製を行うチップと同じかまたは異なるマイクロ流体チップ中で実施し得る。

【００３３】

上記の予備段階の実施後、以下の段階を含む精製方法が実施できる：ほぼ等しい容量の好適な、当分野で既知の有機溶媒（例えば、イソプロピルアルコール）の溶液への添加；溶液の攪拌；好適な温度、例えば室温での溶液のインキュベーション；例えば容器またはマイクロ流体システム外に磁石を置くことによる電磁ビーズの回収；マイクロ流体素子を用いる上清の除去；好適な、当分野で知られた、電磁ビーズに結合する核酸（例えばＤＮＡ）に最適化された洗浄バッファーの添加（シリカベースの結合、洗浄バッファーは典型的にカオトロピックまたは非カオトロピック塩、ｐＨバッファー、エタノールおよび任意に洗浄剤を含む。組み合わせが当分野で知られた方法を使用するシステムに最適化されていれば、シリカに結合した核酸に互換性のあるいかなるバッファーおよび洗浄システムを使用できる）；ビーズを再懸濁するための溶液の攪拌；ビーズの回収；任意に、電磁ビーズへの洗浄バッファーの添加、ビーズを再懸濁するための溶液の攪拌、およびビーズの回収の段階の繰り返し（溶出でのいかなるバッファーおよび／または有機溶媒の汚染または干渉を除去するように、ＤＮＡ溶出に先立つ容器内の残余の液体を除去できる）；好適な当分野で既知の核酸溶出バッファー（例えば無ヌクレアーゼ水）の添加；溶液の攪拌；電磁ビーズに結合した核酸（例えばＤＮＡ）の溶出のための、好適な温度、例えば室温での溶液のインキュベーション（この典型的な態様では、存在するＤＮＡだけが分析されるよりもむしろ、全核酸（対象となる所望のＤＮＡを含む）が結合および溶出されるため、ＲＮＡｓｅ処理は含まれない。あるいは、所望であれば、ＲＮＡを除去するためにＲＮＡｓｅ処理段階が含まれるであろうし、また全てのＤＮＡを除去してＲＮＡだけを精製するためにＤＮＡｓｅ処理も含まれるであろう）；例えば容器またはマイクロ流体システム外に磁石を置くことによる電磁ビーズの回収；好適な核酸溶解／結合バッファーの溶出ＤＮＡへの添加；溶液の攪拌；ほぼ等しい容量の好適な、当分野で既知の有機溶媒（例えば、無水エタノール）の溶液への添加；溶液の攪拌；溶液の、核酸精製カラムまたはフィルターへの移動（当分野で知られているいかなる好適な核酸精製のためのカラムまたはフィルターが使用できる。典型的な態様において、シリカフィルターがマイクロ流体素子に用いられる）；精製された核酸（例えばＤＮＡ）の精製カラムまたはフィルターからの溶出；および溶出した核酸（例えばＤＮＡ）の回収。

【００３４】

一旦、核酸を精製するための上記の方法から溶出・精製された核酸が回収されると、精製された核酸は例えば評価（ｅｓｔｉｍａｔｅ）され、ゲノムＤＮＡ分析のために標準ゲル上を泳動され、および／または例えば標的遺伝子の増幅のために、ＰＣＲ増幅または当分野で知られている他の核酸増幅方法に供される。

【００３５】

核酸精製のための具体化された方法は、自動化およびマイクロ流体素子中での動作に適合させることができる。例えば、米国出願番号１３／０３３，１６５（ｉｄ）において、図２４Ａ－２４Ｋおよび図２５はマイクロ流体素子上で実施される２段階ＤＮＡ精製の間の溶液の流れを示す。

【実施例】

【００３６】

実施例１：全血からＤＮＡを精製するための方法のプロトコル

この実施例は全血からＤＮＡを精製するための非限定的で、例示的な方法を記載する。

１）１２４Ｕｎｉｔのリチカーゼ酵素を５００μｌの全血に添加し、溶液を攪拌する。試料を室温で３０分間インキュベートする。

２）７１．４μｌの２０ｍｇ／ｍｌプロテイナーゼＫを試料に加え、溶液を軽く攪拌し、試料を室温で２分間インキュベートする。

３）５００μｌの溶解／結合バッファーをサンプルに添加し、溶液を攪拌し、室温で１０分間インキュベートする。
４）２５μｌの電磁ビーズを試料に加え、３０分間攪拌する。
５）５７１μｌのイソプロピルアルコールを加え攪拌し、攪拌しながら５分間室温でインキュベートする。
６）チューブ、チャネル、リザーバーの外側に磁石を置くことによりビーズを回収し、マイクロ流体システムを使用して上清を注意深く除去する。上清を廃棄する。
７）９５０μｌの洗浄バッファーを電磁ビーズに加え、ビーズ再懸濁のために溶液を攪拌する。ビーズを回収し、上清を廃棄する。
８）段階７を繰り返す。
９）９５０μｌの洗浄バッファー２を電磁ビーズに加え、ビーズ再懸濁のために溶液を攪拌する。ビーズを回収し、上清を廃棄する。
１０）ＤＮＡ溶出に先立ち、有機溶媒汚染を避けるためにチューブ、チャンネルまたはリザーバーに残るいかなる残余の液体も除去する。
１１）１００μｌの無ヌクレアーゼ水を加え、溶液を攪拌し、電磁ビーズに結合したＤＮＡを溶出するために室温で２分間インキュベートする。
１２）チューブ、チャネル、リザーバーの外側に磁石を置くことによりビーズを回収し、上清を注意深く第二の段階に移す。
１３）１００μｌの核酸溶解／結合バッファーを１００μｌの溶出ＤＮＡに添加し、溶液を攪拌する。
１４）１００μｌの無水エタノールを添加し、溶液を攪拌する。
１５）マイクロ流体システムのチューブ、チャネル、リザーバーにあるシリカフィルターインサートに溶液を移す。
１６）シリカフィルターを通して溶液をポンプ輸送する。
１７）シリカフィルターを通して２００μｌの洗浄バッファーをポンプ輸送する。
１８）シリカフィルターを通して別の２００μｌの洗浄バッファーをポンプ輸送する。
１９）シリカフィルターを通して５０μｌのヌクレアーゼ無しの水をポンプ輸送し、その後、流体がシリカフィルターを出た時に流体の方向を逆にし、溶出ＤＮＡを回収する。

【００３７】

精製されたＤＮＡはその後評価され、ゲノムＤＮＡ分析のためにゲル上を泳動され、および／または標的遺伝子の増幅のために、ＰＣＲ増幅または当分野で知られている他の核酸増幅方法に供され得る。

【００３８】

本明細書で引用される、刊行物、特許出願、および特許を含む全ての文献は、各文献が個々にかつ具体的に示され、出典明示により組み込まれるのと、また、その内容の全てが本明細書に説明されるのと同程度に、出典明示により本明細書に組み込まれる。

【００３９】

本発明の説明に関連して（特に、以下の請求項に関連して）、用語「一つの（ａ）」、「一つの（ａｎ）」、「その（ｔｈｅ）」および同様の指示語は、本明細書において特に明記しない限り、あるいは明らかに文脈と矛盾しない限り、単数形および複数形の両方に及ぶものと解釈される。用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」および「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」は、特に断りのない限り、オープンエンド形式の用語（すなわち、「～を含むがこれらに限定されない」を意味する）として解釈される。用語「接続された（ｃｏｎｎｅｃｔｅｄ）」は、たとえ何かが介在していようと、部分的あるいは完全に、内部に含有されている、付属している、結合されている、として解釈される。

【００４０】

本明細書において特に明記しない限り、本明細書中の数値範囲の列挙は、単にその範囲内に該当する各値を個々に言及するための略記法としての役割を果たすことだけを意図しており、各値は、本明細書中で個々に列挙されるかのように、本明細書中に組み込まれる

。

【００４１】

本明細書中で説明される全ての方法は、本明細書において特に明記しない限り、あるいは明らかに文脈と矛盾しない限り、あらゆる適切な順序で実施することができる。本明細書で提供される、あらゆる例または例示的な言い回し（例えば、「など（ｓｕｃｈ　ａｓ）」）の使用は、特に断らない限り、単に本発明の実施形態をより良く説明することだけを意図し、本発明の範囲に対する制限を設けるものではない。

【００４２】

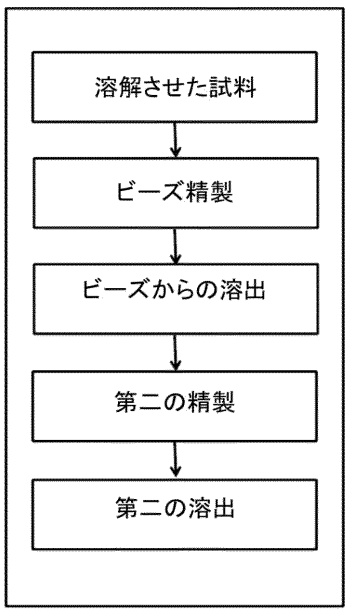
明細書中のいかなる言い回しも、本発明の実施に不可欠である、請求項に記載されていない要素を示すものとは解釈されないものとする。

【００４３】

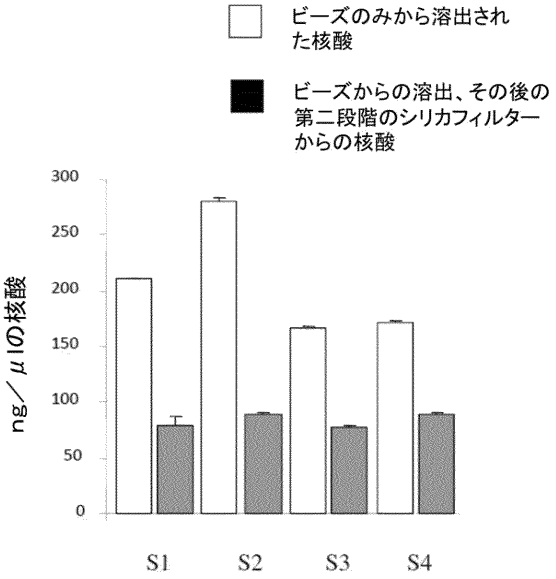
本発明の精神と範囲を逸脱しない範囲で、本発明に種々の改良および変形ができることは、当業者には明らかであろう。本発明を開示された特定の形態（単数または複数）に限定するように意図しておらず、逆に、その意図は、添付された特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲に該当する全ての修正物、代替構築物、および均等物を包括することである。従って、本発明は、添付された請求項およびそれらの均等物の範囲内にあるという条件で、この発明の修正物および変形に及ぶ、ということが意図される。

【図１】

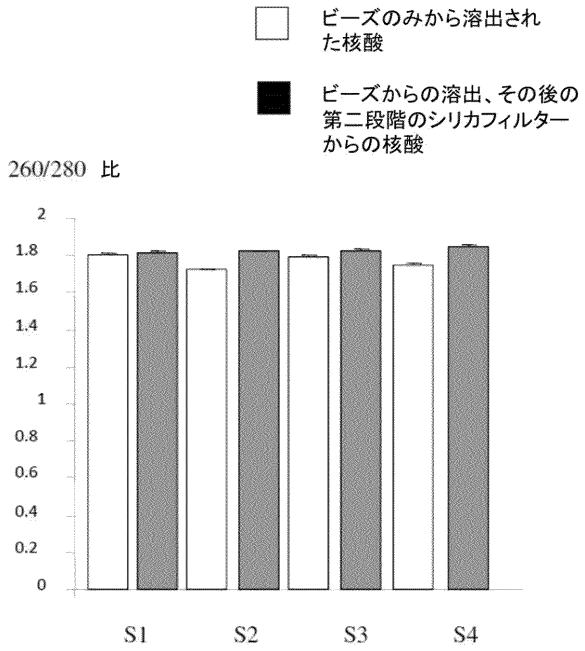
図1. フローダイヤグラム



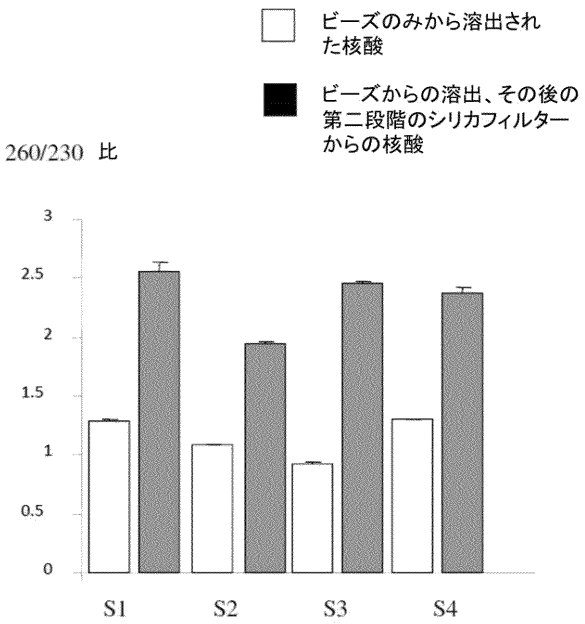
【図４】



【図５】



【図６】



【図８】

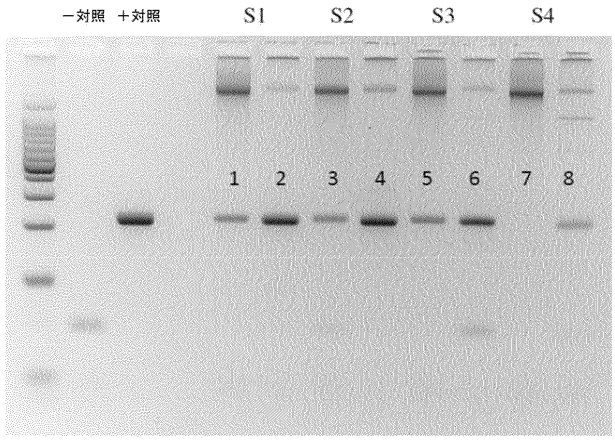


Fig. 2A

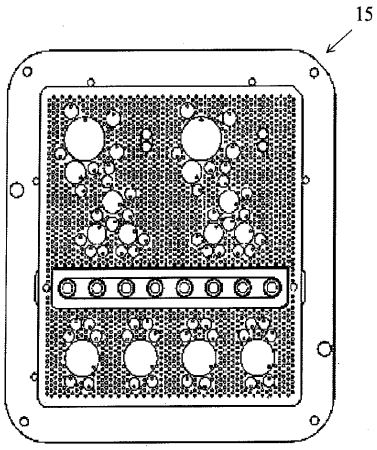


Fig. 2B

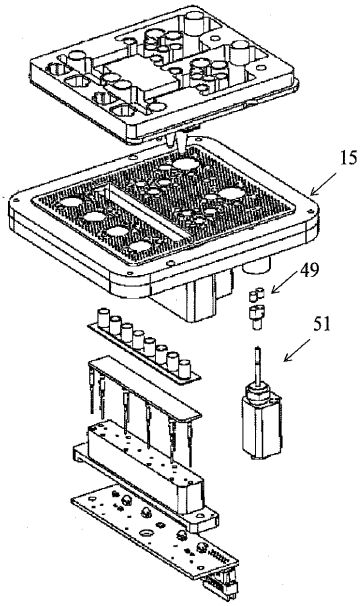


Fig. 3A

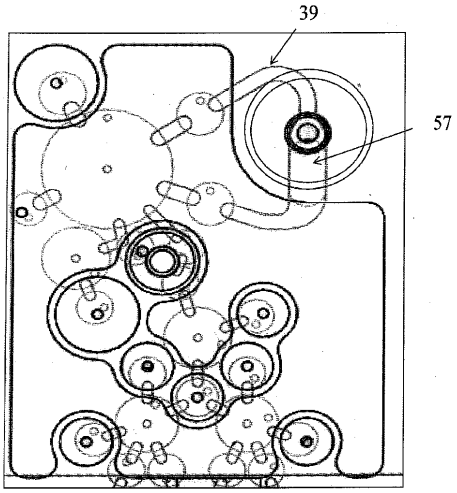


Fig. 3B

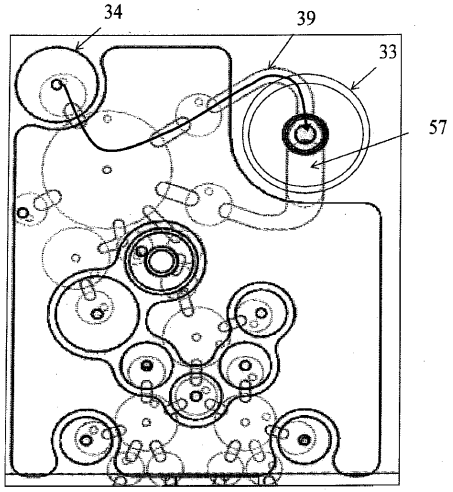


Fig. 3C

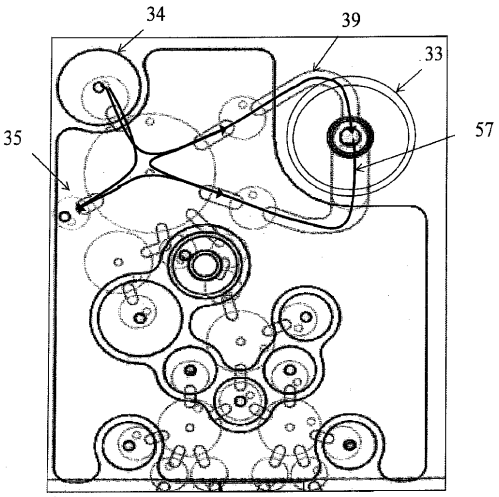


Fig. 3D

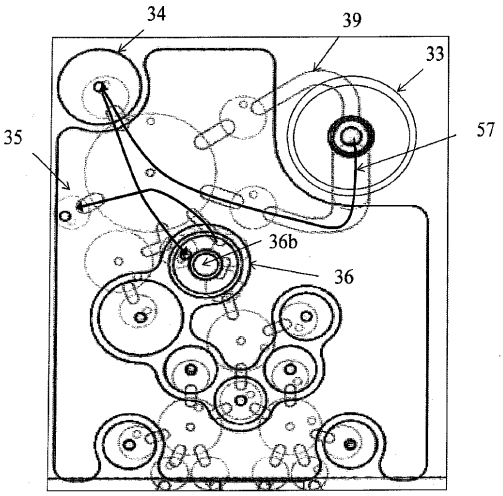


Fig. 3E

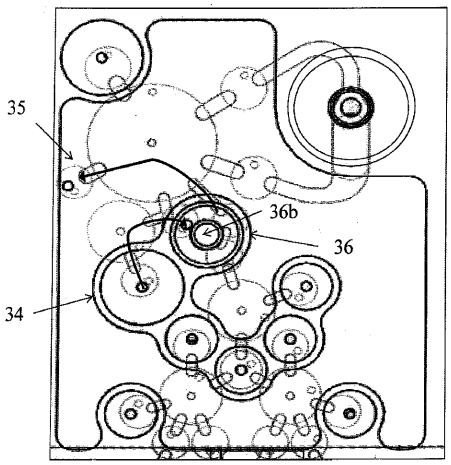


Fig. 3F

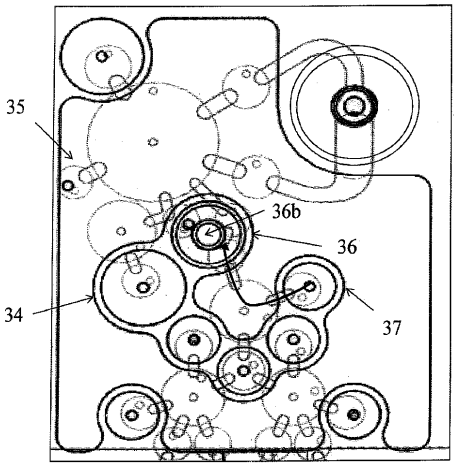


Fig. 3G

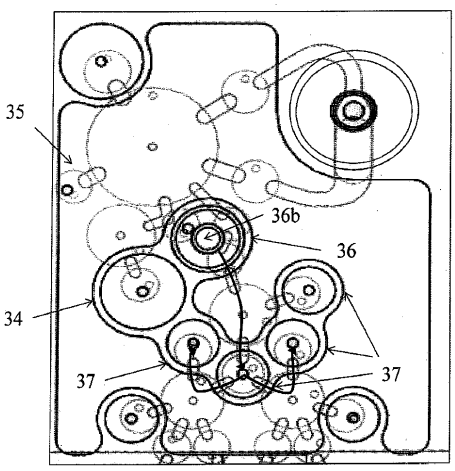


Fig. 4

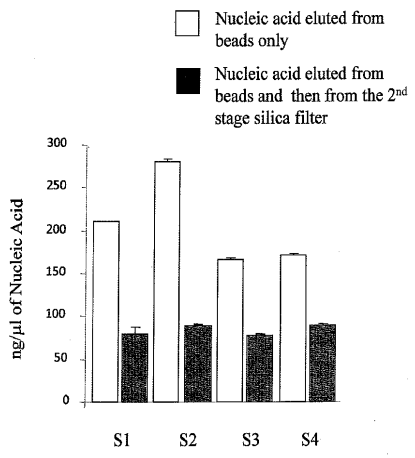


Fig. 5

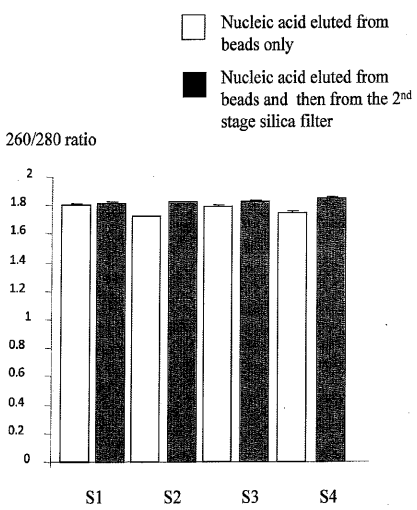


Fig. 6

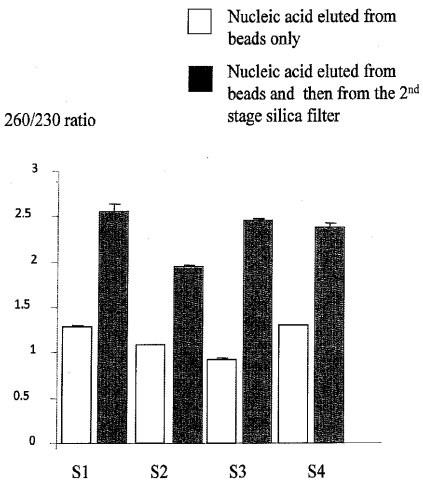


Fig. 7

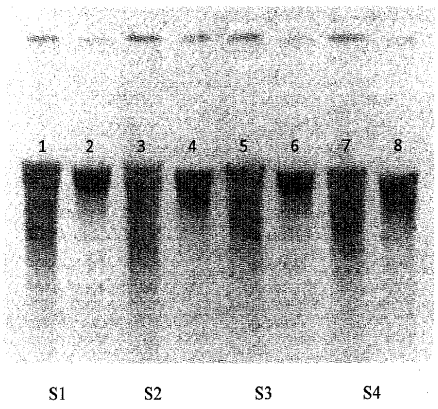
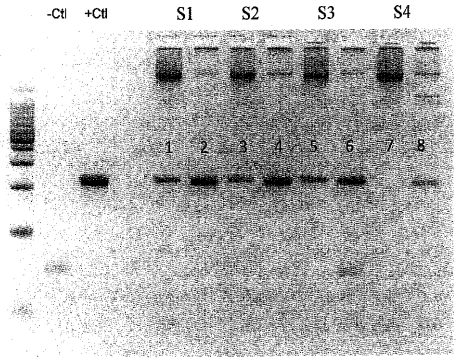


Fig. 8



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/025861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N 15/10; C12M 1/00; C12N 15/09; C12N 1/06; C12Q 1/68; C12N 1/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: purifying nucleic acid, lysed liquid solution

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004-0029166 A1 (KEJUN FAN) 12 February 2004. See abstract, claims 1-7.	1-16
A	JP 2002-500878 A (AVENTIS PASTEUR) 15 January 2002. See abstract, claims 12-20.	1-16
A	JP 2003-144149 A (TAKARA HOLDINGS INC) 20 May 2003. See abstract, claim 1.	1-16
A	EP 0245945 A2 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 19 November 1987. See abstract, claims 1-5.	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 NOVEMBER 2012 (27.11.2012)	**28 NOVEMBER 2012 (28.11.2012)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer PARK, Yeong-Gwan Telephone No. 82-42-481-8407

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2012/025861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004-0029166 A1	12.02.2004	DE 60323579 D1	30.10.2008
		EP 1388588 A1	11.02.2004
		EP 1388588 B1	17.09.2008
		JP 04-196185 B2	17.12.2008
		JP 2004-073193 A	11.03.2004
JP 2002-500878 A	15.01.2002	AU 1999-20604 A1	09.08.1999
		AU 1999-20604 B2	09.01.2003
		CA 2319021 A1	29.07.1999
		EP 1049766 A1	08.11.2000
		FR 2773818 A1	23.07.1999
		FR 2773818 B1	18.02.2000
		US 6664049 B1	16.12.2003
		WO 99-37750 A1	29.07.1999
JP 2003-144149 A	20.05.2003	TW 416867 B	01.01.2001
		WO 98-43724 A1	08.10.1998
EP 0245945 A2	19.11.1987	DE 3788082 D1	16.12.1993
		EP 0215533 A2	25.03.1987
		EP 0215533 A3	22.06.1988
		EP 0215533 B1	15.12.1993
		EP 0245945 A3	26.07.1989
		EP 0245945 B1	10.11.1993
		JP 08015437 B2	21.02.1996
		JP 08015438 B2	21.02.1996
		JP 61-167697 A	29.07.1986
		JP 63-022194 A	29.01.1988
		US 05346999 A	13.09.1994

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(72)発明者 リンカーン・シー・ヤング
アメリカ合衆国１４８５０ニューヨーク州イサカ、ローワー・クリーク・ロード５０４番
(72)発明者 ジョウ・ポン
アメリカ合衆国１８９４０ペンシルベニア州ニュータウン、スザンナ・ウェイ４４番
(72)発明者 グウェンドリン・スピズ
アメリカ合衆国１４８５０ニューヨーク州イサカ、エルム・ストリート４０４番
(72)発明者 ルビーナ・ヤスミン
アメリカ合衆国１４８５０ニューヨーク州イサカ、メドウラーク・ドライブ５番

Ｆターム(参考) 4B024 AA19 AA20 CA01 CA11 HA11
4B029 AA07 AA09 AA27 BB20 CC04 DG08 FA15 GB05 HA09