

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/006650

発行日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(43) 国際公開日 平成15年1月23日(2003.1.23)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 61 頁)

出願番号	特願2003-512408 (P2003-512408)	(71) 出願人	000000033 旭化成株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/006939		大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 国際出願日	平成14年7月9日(2002.7.9)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2001-208514 (P2001-208514)	(72) 発明者	菅野 仁喜 静岡県富士市森下64-11
(32) 優先日	平成13年7月9日(2001.7.9)	(72) 発明者	小田 直純 静岡県富士市中丸379-1 サンハイム カワシマ305号
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	有富 正治 静岡県富士市今泉8-11-3
(31) 優先権主張番号	特願2001-364878 (P2001-364878)	(72) 発明者	佐藤 晶子 静岡県富士市松岡1425-34
(32) 優先日	平成13年11月29日(2001.11.29)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不織布を用いた核酸精製法及び検出法

(57) 【要約】

血液や培養液などの細胞を含む試料から核酸を分離精製する方法。本発明の方法では、細胞を破壊して得られる細胞抽出液を不織布からなるフィルターに吸着させ、フィルターを洗浄後、核酸を溶出させる。核酸の溶出にはpH12以上のアルカリ条件を使用してもよく、また、フィルターに吸着した核酸を活性酸素処理したり、界面活性剤を使用して核酸を溶出することもできる。本発明の方法で分離精製した核酸は、核酸の増幅や塩基配列解析技術に使用可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程：

- (1) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；
- (2) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；および
- (3) 不織布から核酸を溶出する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製する方法。

【請求項 2】

不織布に吸着された核酸を 40 から 100 の温度範囲で加熱して核酸を溶出する請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 3】

不織布に吸着された核酸を pH 12 以上のアルカリ条件下で処理して核酸を溶出する請求項 1 ~ 2 の 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

不織布に吸着された核酸を断片化して溶出する請求項 1 ~ 2 の 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

活性酸素を用いて核酸を断片化する請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

還元糖に二価の金属イオンを添加して発生させた活性酸素を用いる請求項 5 記載の方法。 20

【請求項 7】

活性酸素が過酸化水素である請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

過酸化水素に二価の金属イオンを添加して発生させた活性酸素を用いる請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

酵素を用いて核酸を断片化する請求項 4 記載の方法。

【請求項 10】

不織布に吸着された核酸を界面活性剤で処理して溶出する請求項 1 ~ 2 の 1 項に記載の方法。 30

【請求項 11】

界面活性剤が非イオン性界面活性剤、または両性界面活性剤である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

以下の工程：

- (1) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；
- (2) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；
- (3) 該不織布に核酸を増幅するための溶液を加えて、該不織布に吸着された核酸を鋳型として核酸を増幅する工程；
- (4) 該反応液を回収する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して増幅する方法。 40

【請求項 13】

PCR 法または LAMP 法で核酸を増幅する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

以下の工程：

- (1) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；
- (2) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；
- (3) 該不織布に塩基配列を検出するための溶液を加えて反応させる工程；

50

(4) 該反応液を測定する工程；
を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して特定の塩基配列を検出する方法。

【請求項 15】

以下の工程：

- (1) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；
- (2) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；
- (3) 該不織布に塩基配列を検出するための溶液を加えて反応させる工程；
- (4) 該不織布表面を測定する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して特定の塩基配列を検出する方法。

10

【請求項 16】

PCR法またはLAMP法で塩基配列を検出する請求項 14～15の1項に記載の方法。

【請求項 17】

プローブを用いたハイブリダイゼーションで特定の塩基配列を検出する請求項 15に記載の方法。

【請求項 18】

プライマーと核酸合成酵素による核酸伸長反応で特定の塩基配列を検出する請求項 14～15の1項に記載の方法。

【請求項 19】

核酸伸長反応の際に標識ヌクレオチドを取り込ませて検出することを特徴とする請求項 18に記載の方法。

20

【請求項 20】

核酸伸長反応で生じるピロリン酸を検出することを特徴とする請求項 18に記載の方法。

【請求項 21】

以下の工程：

- (1) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；
- (2) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；

を含む、細胞の核酸を吸着した不織布を作製する方法。

【請求項 22】

以下の工程：

- (1) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；
- (2) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；
- (3) 該不織布に核酸を標識するための溶液を加えて反応させる工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して核酸を標識する方法。

【請求項 23】

ビオチン、蛍光、またはハプテンで核酸を標識する請求項 22に記載の方法。

【請求項 24】

不織布に吸着された核酸そのものを標識する請求項 22または23に記載の方法。

40

【請求項 25】

不織布の素材がポリエステル、ポリプロピレンまたはナイロンである請求項 1～24の1項に記載の方法。

【請求項 26】

不織布の素材がポリエチレンテレフタレートである請求項 1～24の1項に記載の方法。

【請求項 27】

不織布の孔径が2～150 μmである請求項 1～26の1項に記載の方法。

【請求項 28】

不織布の繊維径が0.3～20 μmである請求項 1～27の1項に記載の方法。

【請求項 29】

50

粘度増加剤、カオトロピック剤、およびアルコールを含まない細胞抽出液を使用する請求項 1 ~ 28 の 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

塩を含む細胞抽出液を使用する請求項 1 ~ 29 の 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

細胞抽出液に含まれる塩がナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、リン酸塩、硫酸塩または塩酸塩である請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

細胞抽出液に含まれる塩が塩化ナトリウムで、その濃度が 10 mM から 1000 mM である請求項 30 記載の方法。

10

【請求項 33】

細胞抽出液に含まれる塩が塩化マグネシウムで、その濃度が 1 mM から 100 mM である請求項 30 記載の方法。

【請求項 34】

細胞抽出液に含まれる塩がリン酸ナトリウムで、その濃度が 2 mM から 100 mM である請求項 30 記載の方法。

【請求項 35】

細胞抽出液に含まれる塩が硫酸アンモニウムで、その濃度が 20 mM から 1000 mM である請求項 30 記載の方法。

【請求項 36】

陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、または非イオン性界面活性剤を含む細胞溶解液を使用する請求項 1 ~ 35 の 1 項に記載の方法。

20

【請求項 37】

細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程を 80 ~ 110 の温度範囲で行う請求項 1 ~ 36 の 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程を還元剤の存在下で行う請求項 1 ~ 37 の 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

還元剤がチオール基を含む化合物である請求項 38 記載の方法。

30

【請求項 40】

細胞抽出液を不織布に接触させる方法が濾過である請求項 1 ~ 39 の 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程の後に、不織布を洗浄する工程が続く請求項 1 ~ 40 の 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

カオトロピック剤およびアルコールを含まない溶液で不織布を洗浄する請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

細胞溶解液で不織布を洗浄する請求項 41 ~ 42 の 1 項に記載の方法。

40

【請求項 44】

0.5 M ~ 2 M の濃度範囲の塩溶液で不織布を洗浄する請求項 41 ~ 43 の 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

(1) 不織布を組み込んだ装置；および(2) 細胞溶解液、核酸溶出液のいずれかを含む溶液；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製するキット。

【請求項 46】

(1) 不織布を組み込んだ装置；および(2) 細胞溶解液、洗浄液のいずれかを含む溶液；

50

を含む、細胞から核酸を抽出し、該核酸を吸着した不織布を作製するキット。

【請求項 47】

固体表面に吸着された核酸を pH 12 以上のアルカリ条件下で処理して溶出する方法。

【請求項 48】

固体表面に吸着された核酸を活性酸素で処理して溶出する方法。

【請求項 49】

固体表面に吸着された核酸を界面活性剤で処理して溶出する方法。

【請求項 50】

核酸を吸着した不織布。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、不織布を用いて細胞から高純度の核酸を簡便に調製する方法およびその調製キットに関する。更に本発明は、核酸を吸着した不織布から核酸を増幅する方法、および核酸を吸着した不織布から核酸の塩基配列を検出する方法、更には該方法で使用する核酸を吸着した不織布の作製法およびその作製キットに関する。

背景技術

DNA のような核酸を細胞から調製するためには、一般的に細胞を含む試料を SDS や Proteinase K で処理して可溶化した後、フェノールで蛋白質を変性除去して核酸を精製する (Molecular Cloning 2nd Edition、9.16 - 9.23、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)。しかし、手間と時間がかかることから、より簡便な方法が求められている。

より簡便な方法としては、例えばシリカを用いる方法が EP 0389063 で開示されている。該方法では、まず細胞をカオトロピック性試薬で処理して細胞を溶解し、核酸を遊離させる。次に、シリカまたはその誘導体から成る核酸結合性担体に核酸を吸着させて、この担体をカオトロピック性試薬や有機溶媒で遠心洗浄する。最後に、低塩の Buffer で核酸を溶出する。該方法はフェノール法に比較すると簡便であるとはいうものの、まだ多くの工程を含み、遠心操作が必要であるという欠点がある。また、PCR などの酵素反応を強く阻害するカオトロピック剤やエタノールを使用するので、これらの物質を完全に除く必要がある、そのため操作が煩雑になり時間がかかる、などの欠点がある。

白血球分離フィルターのような細胞吸着性繊維集合体を用いて末梢血白血球から核酸を調製する方法は、特公平 8 - 24583 号や特開平 8 - 280384 号で開示されている。特公平 8 - 24583 号によれば、まず白血球分離フィルターに血液を通して、血液中の白血球をフィルターに吸着させ、血液の他の成分と分離する。このフィルターに TE Buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.6) を通して洗浄し、ヘモグロビン等の蛋白質を除去する。こうして分離洗浄された白血球をフィルターごと例えば -80 で凍結した後、室温で放置して白血球を解凍する。それから繊維状物質に TE Buffer-mix (TE Buffer、10 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、pH 7.5) を加えて、フィルターの繊維状物質に吸着されていた白血球を繊維状物質から回収する。しかし、特公平 8 - 24583 号では、回収された白血球からゲノム DNA を抽出する操作は従来の技術で行っている。すなわち、白血球に 10% 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) などの界面活性剤と蛋白分解酵素 (Proteinase K) を加えて、65 で 15 時間インキュベートし、これに RNA 分解酵素 (RNase A) を加えて 37 で 1 時間インキュベートする。それからこれをフェノール試薬で処理し、DNA をエタノールで沈澱させて精製する。

特開平 8 - 280384 号では、有核細胞を吸着した後、有核細胞中の核酸または蛋白質を取り出す方法を開示している。核酸または蛋白質を取り出す方法としては、極細繊維集合体に細胞を結合したまま細胞溶解液を通液して溶解するか、あるいは破碎などを行う。この方法の利点は、吸着した細胞をそのまま破碎、溶解処理することが可能なことである。吸着した細胞を脱離することなく、吸着した細胞を破碎し、または溶解することから、

10

20

30

40

50

吸着した細胞を脱離する方法よりも容易に実施が可能である。しかし、細胞溶解後の核酸精製については従来の技術を用いており、新しい方法は開示されていない。すなわち、まず細胞を吸着した極細繊維集合体を精製水や界面活性剤で処理し、極細繊維集合体を通過した細胞溶解液から通常のフェノール・クロロホルム法で核酸を精製している。

以上のように、白血球分離フィルターのような細胞吸着性繊維集合体を用いて末梢血白血球から核酸を調製する方法は知られていたが、上記の方法では白血球の分離や核酸抽出のステップまでフィルターで行った後は既存の核酸精製法で核酸を精製しなければならず、工程が複雑になり時間と手間がかかるという欠点があった。

最近、フィルターを用いて細胞から核酸を直接精製する方法が、国際公開W000/21973号で開示された。該方法では、(1)まず、細胞を含む試料をフィルターにかけて細胞をフィルターに吸着させる。(2)次にフィルターに吸着された細胞を溶解し、(3)フィルターで濾過する。(4)フィルターに吸着された核酸を洗浄する。(5)最後に、核酸をフィルターから溶出する。吸着した核酸は40 から125 に加温すると溶出され、溶出BufferのpHは5から11の範囲で、塩濃度は高くても低くても良い。精製された核酸の吸光度比 A_{260}/A_{280} は1.8であり、PCRの鋳型として使用可能であった。国際公開W000/21973号では、核酸を精製する目的に使用可能なフィルターの例としてWhatman GF/D variant filtersが挙げられており、使用不可能な例としてWhatman GF/C filtersが挙げられている。また、該方法に適したフィルターの特徴として、精製DNAをフィルターに通しても精製DNAを捕捉できないこと、細胞を溶解してからフィルターにかけるとDNAの収率が80%低下して実用的でないことが述べられている。また該方法を用いて血液から核酸を調製する場合、実験者は白血球を溶解する前に赤血球を溶血させる必要がある。また、このような細胞をフィルターに吸着させてから精製する方法では、細胞の種類に応じてフィルターを選択しなければならないという欠点がある。

米国特許第5187083号および米国特許5234824号では、血液細胞を界面活性剤で溶解してからポアサイズが0.2 μ mから0.8 μ mのフィルターにかけてDNAを精製するという方法を開示している。米国特許5234824号でクレームしている方法は、血球から純粋なDNAを迅速に調製する方法であって次の工程を含む。(1)高剪断力がかからないように2分から40分かけて界面活性剤と粘度増強剤を含む溶液でゆるやかに細胞を溶解させて細胞のDNAを含む溶解液を調製する。この時、DNAはフィルターにトラップされるように十分大きな分子量を持っている必要がある。次に、(2)この抽出液を0.2 μ mから0.8 μ mの孔径を持ったフィルターで濾過してDNAをフィルターにトラップする。それから(3)フィルターを純水中で約100 5分から15分間加熱してDNAを抽出する。溶出液は、100mM以下のマグネシウムまたはカルシウムを含んでいてもよい。ここで、(1)の粘度増強剤としては、polyvinyl alcohol(分子量7万から10万)、水溶性ポリマー、糖、ポリペプチド、ゼラチンなどを使用する。また、この方法で血液からDNAを精製するには、血液を10倍以上希釈しなければならない。そうしないと、粘度が高すぎて該フィルターで濾過できない。

また、特表2001-520894号では(1)核酸類を所定の方向から表面へ投入すること、(2)前記表面上での核酸類の固定化、(3)前記表面からの固定化された核酸類の放出、及び(4)主に投入方向における前記表面から放出された核酸類の除去、の段階により核酸類を単離する方法が開示されている。表面としては膜が使用可能であり、膜は疎水性であっても親水性であっても良い。膜の材質としては、ナイロン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、並びにアクリル酸共重合体、ポリウレタン、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリフルオロカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンフルオリド、ポリビニリデンジフルオリド、ポリエチレン-テトラフルオロエチレン共重合化物、ポリエチレン-クロロトリフルオロエチレン共重合化物、またはポリフェニレンスルフィドが使用できる。膜の細孔は0.001~50 μ m、好ましくは0.01~20 μ m、最も好ましくは0.05~10 μ mの直径を有する。核酸類の固定化のために、鉍酸とアルカリ及びアルカリ土類金属類との塩類、ア

10

20

30

40

50

ルカリまたはアルカリ土類金属と一塩基もしくは多塩基または多官能性有機酸類とからの塩類、脂肪族または非環式飽和または不飽和炭化水素のヒドロキシル誘導体、フェノールまたはポリフェノール、またはカオトロピック剤が使用できる。

該方法では、核酸の収量を高めるためには吸着時にアルコールやカオトロピック剤を添加しなければならないという欠点がある。例えば、疎水性ナイロン膜である細孔 $1.2\ \mu\text{m}$ のヒドロロン (Hydrolon, Pall) に RNA を吸着させる場合、結合溶液に $1\ \text{M}\ \text{NaCl}$ を使用すると収量が $0.15\ \mu\text{g}$ であるのに対し、 36% エタノール含有 $1\ \text{M}\ \text{NaCl}$ を使用すると $1.55\ \mu\text{g}$ になり、収量は実に 10 倍異なる。また、結合溶液に 36% エタノール含有 $500\ \text{mM}$ イソチオシアン酸グアニジウムまたは 36% エタノール含有 $1\ \text{M}$ 塩酸グアニジニウムを用いると、収量は $2.3\ \mu\text{g}$ または $6.7\ \mu\text{g}$ になる。またカオトロピック剤を使用すると、その後アルコールを含む Buffer でよく洗浄し、更に乾燥する必要がある。

また、特表平 $11-501504$ 号では、サンプルを界面活性剤および固体支持体に接触させ、これによって上記サンプル中の可溶性核酸がこの支持体に結合し、次いでこの支持体を結合した核酸とともに上記サンプルから分離することからなる、サンプルから核酸を単離する方法が開示されている。該発明で用いる特に好適な固体支持体として、DYNABEADSとして販売される磁性粒子を挙げており、実施例もこれにつける。また、界面活性剤は、如何なる界面活性剤であってもよく、陰イオン性および陽イオン性を含むイオン性であっても、非イオン性または両イオン性であってもよい。

磁性粒子を用いる場合、サンプル容量は通常数 μl から数 $10\ \mu\text{l}$ になる。このため、サンプル容量が多い場合はあらかじめ遠心などの操作で細胞を濃縮する、あるいは不要な細胞、物質を除いてから目的の細胞を濃縮するなどの必要が出てくる。例えば、 $0.5\ \text{ml}$ の血液に含まれる白血球 DNA を精製する場合、まず溶血して、次に遠心して白血球をペレットにする、などの操作が必要である。また、DNA はゲル状の DNA / DYNABEADS 複合体として回収され、この複合体はピペティングなどの操作で簡単に破壊される。従って、ゆるやかに洗浄しないと複合体がバラバラになり、DNA 収量が著しく減少するので注意が必要である。

また、固体表面に吸着された核酸を活性酸素で溶出するという報告はこれまでない。同様に、固体表面に吸着された核酸をアルカリで溶出するという報告もない。

近年、ヒトゲノム解析が急速に進展し、その成果であるゲノム情報を医療の質的改善に結びつけようという試みが活発になってきている。一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) のデータが整備されれば、薬効の個人差を識別し、患者毎に至適薬物と投与量を決定する、いわゆるオーダーメイド医療が可能になると期待されている。このような SNPs を利用したオーダーメイド医療を実現するためには、迅速、正確、かつ安価な SNPs タイピング技術の開発が不可欠である。ここでいう SNPs タイピング技術とは、ゲノムの抽出・精製、核酸増幅、塩基配列の解析など検体の処理から検査結果のアウトプットに至るまでのすべての技術を意味する。

Polymerase Chain Reaction (PCR) などの核酸増幅反応で特定の塩基配列を増幅する場合、あるいは SNPs タイピング技術で塩基配列を解析する場合、増幅や配列解析の対象となる核酸は、通常、溶液状態で反応系に供給される。上記で引用したいずれの方法でも溶液として核酸を回収している (国際公開 W000/21973 号、米国特許第 5187083 号、米国特許第 5234824 号、特表 2001-520894 号)。核酸調製法としては一般的であるが、溶出には時間がかかり、またそれに適した溶出条件を設定する必要がある。この核酸溶出に要する時間を短くする、あるいは溶出工程そのものを省略して次の検査ステップに進めるなら、検査に要する時間は著しく短縮される。

米国特許第 5,756,126 号では、フィルターに吸着された核酸を直接解析する方法について述べられている。該方法では、(1) 弱塩基、キレート剤、陰イオン性界面活性剤、及び解析に必要な成分を吸着させた乾燥固体媒体に核酸物質を含有するサンプルを加え、(2) 該サンプルを保存し、(3) 該サンプルに含まれていた蛋白質またはヘモグロ

10

20

30

40

50

ピンを除いて、(4)該サンプルを解析する。米国特許第5,972,386号では、(イ)蛋白変性剤を吸着させた固体マトリックス、(ロ)解析に必要な成分、(ハ)該成分をマトリックス上に保持するための保持剤、の3要素からなる核酸保存のための乾燥固体媒体を用いて、フィルターに吸着された核酸を直接解析する方法について述べられている。すなわち、(1)該乾燥固体媒体に核酸物質を含有するサンプルを加え、(2)該サンプルを保存し、(3)該サンプルに含まれていた蛋白質またはヘモグロビンを除いて、(4)該サンプルを解析する。

上記2つの特許では乾燥固体媒体の例として、尿酸、トリス、EDTA、SDSを吸着させたセルロースペーパーを挙げている。この9mm²に血液3μlを載せて、あるいは100mm²に血液100μlを載せて乾燥させ保存し、その後解析する。またここでいう解析とは、PCRやRestriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)の電気泳動による解析を指す。該方法には、乾燥固体媒体の作製に手間がかかる、乾燥固体媒体に添加できるサンプルの容量に制限がある、そのため媒体上に固定できる核酸密度が小さい、ヘモグロビンなどの蛋白を除去するためにフェノールやアルコールなどの有機溶媒を使用しなければならない、操作が煩雑であり時間がかかる、などの欠点がある。

また、EP389,063では、試料、カオトロピック剤、核酸結合性固相体を混合して固相体に核酸を結合させた後、固相体を分離、洗浄して核酸を分離する方法が述べられている。核酸結合性固相体としては、シリカビーズの他にPVDF(Millipore)、Nitrocellulose(Schleicher and Schuell)、Hybond N(Amersham)などのフィルターを例として挙げている。核酸を吸着したフィルターを直接テンプレートとしてPCRする方法についても述べられている。核酸溶液をグアニジンチオシアネート溶液と該フィルターと混合して核酸をフィルターに吸着させて、カオトロピック剤、70%エタノールで洗浄し、56℃で乾燥させる。該フィルターをPCR反応系に直接加えて、標的核酸が増幅できることを示している。該方法では、カオトロピック剤や有機溶媒を使用しなければならない、カオトロピック剤やエタノールはPCR反応を強く阻害するのでこれらの物質を完全に除く必要がある、そのため操作が煩雑になり時間がかかる、などの欠点がある。また、該フィルターは通常プロットティングに使用されるもので、血液のような生体材料から核酸を精製する目的には適していない。

更に、国際公開WO98/51693号では、サンプル中の細胞を核酸で検出する一般的な方法が述べられており、(1)サンプル中の細胞を固体に結合させ、(2)細胞を溶解し、(3)細胞から遊離した核酸を(1)と同じ固体に結合させて、(4)標的細胞の核酸を検出する。該方法では、まず細胞を固体に結合させる必要があることから、細胞の種類に応じた固体を選択する必要がある、細胞を破壊することなく結合させなければならないので濾過の流速に制限がある、などの欠点がある。

発明の開示

本発明の課題は、血液のような細胞を含む試料から、従来の技術より簡便かつ高収率に細胞の核酸を精製する方法を提供することである。更に本発明の課題は、従来の核酸増幅技術や塩基配列解析技術に使用可能で、かつ迅速、簡便な核酸調製法を供給することにある。

本発明は、以下の発明を包含する。

(1)以下の工程：

(イ)細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；

(ロ)細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；および

(ハ)不織布から核酸を溶出する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製する方法。

(2)不織布に吸着された核酸を40℃から100℃の温度範囲、好ましくは80℃から95℃の温度範囲で加熱して核酸を溶出する(1)記載の方法。

10

20

30

40

50

(3) 不織布に吸着された核酸を pH 12 以上のアルカリ条件下で処理して核酸を溶出する (1) ~ (2) の 1 つに記載の方法。

(4) 不織布に吸着された核酸を断片化して溶出する (1) ~ (2) の 1 つに記載の方法。

(5) 活性酸素を用いて核酸を断片化する (4) 記載の方法。

(6) 還元糖に二価の金属イオンを添加して発生させた活性酸素を用いる (5) 記載の方法。

(7) 活性酸素が過酸化水素である (5) 記載の方法。

(8) 過酸化水素に二価の金属イオンを添加して発生させた活性酸素を用いる (5) 記載の方法。

(9) 酵素を用いて核酸を断片化する (4) 記載の方法。

(10) 不織布に吸着された核酸を界面活性剤で処理して溶出する (1) ~ (2) の 1 項に記載の方法。

(11) 界面活性剤が非イオン性界面活性剤、または両性界面活性剤である (10) 記載の方法。

(12) 以下の工程：

(イ) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；

(ロ) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；

(ハ) 該不織布に核酸を増幅するための溶液を加えて、該不織布に吸着された核酸を鋳型として核酸を増幅する工程；

(ニ) 該反応液を回収する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して増幅する方法。

(13) PCR 法または LAMP 法で核酸を増幅する (12) に記載の方法。

(14) 以下の工程：

(イ) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；

(ロ) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；

(ハ) 該不織布に塩基配列を検出するための溶液を加えて反応させる工程；

(ニ) 該反応液を測定する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して特定の塩基配列を検出する方法。

(15) 以下の工程：

(イ) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；

(ロ) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程；

(ハ) 該不織布に塩基配列を検出するための溶液を加えて反応させる工程；

(ニ) 該不織布表面を測定する工程；

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して特定の塩基配列を検出する方法。

(16) PCR 法または LAMP 法で塩基配列を検出する (14) ~ (15) の 1 つに記載の方法。

(17) プローブを用いたハイブリダイゼーションで特定の塩基配列を検出する (15) に記載の方法。

(18) プライマーと核酸合成酵素による核酸伸長反応で特定の塩基配列を検出する (14) ~ (15) の 1 つに記載の方法。

(19) 核酸伸長反応の際に標識ヌクレオチドを取り込ませて検出することを特徴とする (18) に記載の方法。

(20) 核酸伸長反応で生じるピロリン酸を検出することを特徴とする (18) に記載の方法。

(21) 以下の工程：

(イ) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程；

10

20

30

40

50

(口) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程 ;

を含む、細胞の核酸を吸着した不織布を作製する方法。

(22) 以下の工程 :

(イ) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程 ;

(口) 細胞抽出液を不織布に接触させて、細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程 ;

(ハ) 該不織布に核酸を標識するための溶液を加えて反応させる工程 ;

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製して核酸を標識する方法。

(23) ビオチン、蛍光、またはハプテンで核酸を標識する(22)記載の方法。 10

(24) 不織布に吸着された核酸そのものを標識する(22)または(23)に記載の方法。

(25) 不織布の素材がポリエステル、ポリプロピレンまたはナイロンである(1)~(24)の1つに記載の方法。

(26) 不織布の素材がポリエチレンテレフタレートである(1)~(24)の1つに記載の方法。

(27) 不織布の孔径が2~150 μmである(1)~(26)の1つに記載の方法。

(28) 不織布の繊維径が0.3~20 μmある(1)~(27)の1つに記載の方法。

(29) 粘度増加剤、カオトロピック剤、およびアルコールを含まない細胞抽出液を使用する(1)~(28)の1つに記載の方法。 20

(30) 塩を含む細胞抽出液を使用する(1)~(29)の1つに記載の方法。

(31) 細胞抽出液に含まれる塩がナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、リン酸塩、硫酸塩または塩酸塩である(30)記載の方法。

(32) 細胞抽出液に含まれる塩が塩化ナトリウムで、その濃度が10 mMから1000 mMである(30)記載の方法。

(33) 細胞抽出液に含まれる塩が塩化マグネシウムで、その濃度が1 mMから100 mMである(30)記載の方法。

(34) 細胞抽出液に含まれる塩がリン酸ナトリウムで、その濃度が2 mMから100 mMである(30)記載の方法。

(35) 細胞抽出液に含まれる塩が硫酸アンモニウムで、その濃度が20 mMから1000 mMである(30)記載の方法。 30

(36) 陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、または非イオン性界面活性剤を含む細胞溶解液を使用する(1)~(35)の1つに記載の方法。

(37) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程を80~110の温度範囲で行う(1)~(36)の1つに記載の方法。

(38) 細胞を破壊して細胞抽出液を調製する工程を還元剤の存在下で行う(1)~(37)の1つに記載の方法。

(39) 還元剤がチオール基を含む化合物である(38)記載の方法。

(40) 細胞抽出液を不織布に接触させる方法が濾過である(1)~(39)の1つに記載の方法。 40

(41) 細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させる工程の後に、不織布を洗浄する工程が続く(1)~(40)の1つに記載の方法。

(42) カオトロピック剤およびアルコールを含まない溶液で不織布を洗浄する(41)記載の方法。

(43) 細胞溶解液で不織布を洗浄する(41)~(42)の1つに記載の方法。

(44) 0.5 M~2 Mの濃度範囲の塩溶液で不織布を洗浄する(41)~(43)の1つに記載の方法。

(45) (イ) 不織布を組み込んだ装置 ; および(口) 細胞溶解液、核酸溶出液のいずれかを含む溶液 ;

を含む、細胞を含む試料から細胞の核酸を調製するキット。 50

(46) (イ) 不織布を組み込んだ装置；および(ロ)細胞溶解液、洗浄液のいずれかを含む溶液；

を含む、細胞から核酸を抽出し、該核酸を吸着した不織布を作製するキット。

(47) 固体表面に吸着された核酸をpH12以上のアルカリ条件下で処理して溶出する方法。

(48) 固体表面に吸着された核酸を活性酸素で処理して溶出する方法。

(49) 固体表面に吸着された核酸を界面活性剤で処理して溶出する方法。

(50) 核酸を吸着した不織布。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、細胞とは真核細胞、原核細胞、またはウイルスを意味し、特にヒト体細胞、ヒト末梢血白血球、感染症の原因となる真菌、細菌、ウイルスを含む。 10

本発明において、細胞を含む試料とは血液、尿、髄液、喀痰、体液、細胞浮遊液、細胞培養液など細胞を含むものならどのようなものでもあってもよい。また、それらの試料に何らかの処理をほどこした処理液であっても良い。処理の方法としては、例えば、喀痰のような粘性の高い試料を喀痰処理剤により溶解するなどの方法が考えられる。

本発明において、細胞抽出液とは細胞を破壊して得られる細胞の構成成分を含む混合物のことで、細胞を含む試料に細胞溶解液を作用させて作製することができる。細胞溶解液とは細胞を破壊して核酸を抽出するために用いられる溶液のことで、界面活性剤、酵素、EDTAなどを含むが、これらをすべて含む必要はない。酵素としては、蛋白質分解酵素、例えばProteinase Kなどを用いるが、細胞種によってはリゾチーム、リゾスタフィン(スタフィロコッカス属)、1,3-グルカナーゼ、マンナーゼ、キチナーゼ(真菌類)なども用いられる。RNAを除いた方が好ましい場合には、RNase AのようなRNA分解酵素を加えれば良い。また、酵素は含まなくとも良い。動物細胞では低張液に接触させるだけで細胞を破裂させることも可能である。EDTAはDNA分解酵素を阻害するために用い、通常25mMの濃度で使用する。また細胞抽出液は、細胞を含む試料に超音波をかけたたり、ホモジナイザーで破砕するなど物理的な力を加えて作製することも可能である。 20

細胞抽出液中の核酸を不織布に吸着させるには、塩を含む細胞抽出液を使用することが望ましい。塩は細胞溶解液に加えておいても良いし、細胞抽出液を不織布に接触させる際に加えても良い。いろいろな種類の塩が使用可能であるが、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、リン酸塩、硫酸塩、塩酸塩などが好ましい。核酸吸着を促進する濃度範囲は、塩の種類により異なる。例えば、塩化ナトリウムなら10mMから1000mM、好ましくは50mMから200mM、塩化マグネシウムは1mMから100mM、好ましくは2mMから20mM、リン酸ナトリウムは2mMから100mM、好ましくは20mMから100mM、硫酸アンモニウムは20mMから1000mM、好ましくは20mMから200mMが核酸を吸着させるのに適した濃度である。また、核酸吸着はpH6~11の範囲、好ましくはpH6~8の範囲で行うことが望ましい。 30

本発明において、不織布とは短繊維またはフィラメントを、機械的、熱的、化学的な手段を用いて接着または交絡させて作るシート状またはウェブ構造のものである(第2版 繊維便覧 繊維学会編 丸善)。不織布はさまざまな方法で生産されるが、基本的な工程はウェブ(繊維の方向がある程度揃った繊維塊のシート状のもの)の形成工程と、ウェブの接着工程、それに仕上げ工程である。不織布には天然繊維から化学繊維まで種々の繊維が用いられているが、一般的に用いられているのは綿、レーヨン、ポリエステル、ポリプロピレン、ナイロンで、その他アクリル、ビニロン、ガラス繊維、パルプ、炭素繊維なども使用される。ウェブを形成する方式は、湿式、乾式および直接式に大別される。直説法は紡糸直結式ともいわれる方法で、熔融高分子溶液から紡糸された繊維を集めて直接ウェブとする工程である。これに含まれる方法は、スパンレース法、スパンボンド法、メルトブロー法、ニードルパンチ法、ステッチボンド法などである。本発明にはメルトブロー法でつくられた超極細繊維不織布が最も適している。 40

本発明において、細胞抽出液を不織布に接触させるとは、例えば細胞抽出液に不織布を浮遊させる、細胞抽出液に不織布を浮遊させて浸透する、細胞抽出液を不織布表面上に流すなどの方法を含む。

本発明において、洗浄は不織布に付着した蛋白質、脂質などの物質を洗い流すために行う。洗浄液には、SDSやトリトンX-100などの界面活性剤、0.5M以上のNaClなどの塩溶液などを使用するが、必ずしもこれらに限定されるものではなく、付着した物質の種類に応じて選択すればよい。また場合によっては、洗浄工程を省略することも可能である。

本発明において、アルカリ処理とはフィルターをpH12以上の水溶液に浸すことを意味する。アルカリ溶液としては通常NaOH、KOHなどを用いるが、これらに限定されるものではない。また、アルカリ処理後は中和してpHを中性に戻すのが望ましく、中和にはリン酸塩など中性付近に緩衝能のある化合物または酸などが用いられる。

本発明において使用する活性酸素は、狭義の活性酸素である $^3\text{O}_2$ の1電子還元種であるスーパーオキシド($\text{O}_2^{\cdot -}$)、2電子還元種である過酸化水素(H_2O_2)、電子励起状態の酸素分子種である1重項酸素($^1\text{O}_2$)、及びヒドロキシラジカル(HO^{\cdot})、及び広義の活性酸素である、金属酸素錯体(金属オキソ酸も含む)を主として、これら活性種と生体分子(例えば、不飽和脂肪酸L)との反応に由来するペルオキシラジカル(LOO^{\cdot})、アルコキシラジカル(LO^{\cdot})、ヒドロキシペルオキシド(LOOH)、一酸化窒素(NO)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。活性酸素については、「活性酸素」(蛋白質核酸酵素、臨時増刊、Vol.33、No.16)や「抗酸化物質のすべて」(先端医学社)に詳しく記載されている。

活性酸素を発生させる方法としては様々な方法が報告されており、例えば次の様な方法で容易に活性酸素を発生させる事ができる。過酸化水素水は、これ自身が活性酸素であるが、過酸化水素水に Ca^{2+} や Fe^{2+} などの二価の金属イオンを添加すると過酸化水素は酸化剤として働きヒドロキシラジカル(HO^{\cdot})を発生する。D-リボース等の還元糖に金属イオン Cu^{2+} を添加すると活性酸素が発生して、細胞障害性や核酸の損傷を引き起こす事も報告されている。抗腫瘍性の抗生物質のブレオマイシンを、鉄(II)と酸素、あるいは、鉄(III)と過酸化水素と共存させると活性酸素錯体種が発生し、DNA切断を引き起こすことが知られている。

本発明において特に好適に用いられる活性酸素としては、D-ribose-5-phosphateやD-fructose-6-phosphate等の還元糖に Cu^{2+} や Fe^{2+} 等の二価金属イオンを添加して得られるヒドロキシラジカル、過酸化水素に Cu^{2+} や Fe^{2+} 等の二価金属イオンを添加して得られるヒドロキシラジカル等が挙げられる。二価の金属イオンを添加して活性酸素を発生させる場合、活性酸素反応液中にEDTA等の金属キレート剤を添加することにより、活性酸素の発生を停止させ、核酸が過度に損傷を受けることを防ぐことができるため、特に好適に使用され得る。活性酸素を用いた核酸の処理時間は1秒~10分、好ましくは1秒~5分、より好ましくは10秒~1分である。

不織布に吸着した核酸を溶出させる場合の好適な条件は、吸着した核酸量や種類にも依存するが、例えばD-ribose-5-phosphateに二価の金属イオンとして Fe^{2+} を添加してヒドロキシラジカルを発生させる場合、D-ribose-5-phosphateの濃度は1mMから1M、好ましくは10mMから500mM、更に好ましくは50mMから200mMである。また、 Fe^{2+} の濃度は、0.001mMから10mM、好ましくは0.01mMから10mM、更に好ましくは0.05mMから5mMである。反応温度は30から65、好ましくは40から60、更に好ましくは45から55である。

本発明において、不織布に吸着した核酸を断片化する方法として、活性酸素を用いる方法の他、核酸の特定の配列を認識して切断する制限酵素、任意配列を切断するDNase等の核酸分解酵素を使って断片化してもよい。また、不織布に紫外線を照射して核酸を断片化するなどの方法も考えられる。本発明において好適に使用される制限酵素としては、H

10

20

30

40

50

a e I I I、S a u 3 A I、E c o R I、B a m H I等が挙げられるがこれらに限定されない。認識する核酸の長さは制限酵素によって異なるが、例えば6塩基認識の制限酵素よりも4塩基認識の制限酵素の方が断片化によって生じる核酸断片がより短くなって不織布からの溶出効率が高まり、より好ましい。酵素を用いる場合、酵素の量(濃度、比率など)は、核酸の量及び酵素の種類に依存する。

本発明において、不織布に核酸を増幅するための溶液を加える、または塩基配列を検出するための溶液を加えるとは、核酸を吸着した不織布の一部または全体を、核酸の溶出操作を行うことなく、そのまま核酸増幅または塩基配列検出のための反応系に供することを意味する。

本発明において、核酸増幅法とはPCRに代表される特定の標的核酸配列を増幅させる方法であり、PCR以外にL i g a s e C h a i n R e a c t i o n (L C R)、T r a n s c r i p t i o n M e d i a t e d A m p l i f i c a t i o n (T M A)、B r a n c h e d D N A (b D N A) A s s a y、N u c l e i c A c i d S e q u e n c e B a s e d A m p l i f i c a t i o n (N A S B A)、S t r a n d D i s p l a c e m e n t A m p l i f i c a t i o n (S D A)、C y c l i n g P r o b e T e c h n o l o g y (C P T)、Q B e t a R e p l i c a s e A m p l i f i c a t i o n T e c h n o l o g y、R o l l i n g C i r c l e A m p l i f i c a t i o n T e c h n o l o g y (R C A T)、L o o p - M e d i a t e d I s o t h e r m a l A m p l i f i c a t i o n (L A M P)、I s o t h e r m a l a n d C h i m e r i c p r i m e r - i n i t i a t e d A m p l i f i c a t i o n o f N u c l e i c a c i d s (I C A N)などの方法を含むが、これらに限定されるものではない。Q B e t a R e p l i c a s e、R C A T、N A S B A、S D A、T M A、L A M P、I C A NなどはI s o t h e r m a l (一定温度)で増幅反応を行い、その他のPCR、LCRなどはT h e r m a l C y c l i n g (温度サイクリング)で増幅反応を行う。

本発明において、核酸塩基配列の検出法とは、電気泳動や質量分析計を用いずに、フィルター上で塩基配列解析が可能な技術を指す。これらには、例えば検出に蛍光、発光、発色、ラジオアイソトープを用いる一般的なプローブハイブリダイゼーション法、核酸のインターカレーターを用いる方法やSNPsタイピング技術が含まれる。SNPsタイピング技術の具体例としては、I n v a d e r ^{T M} A s s a y法、T a q M a n ^{T M}法、R o l l i n g C i r c l e A m p l i f i c a t i o n (R C A)法、P y r o s e q u e n c i n g法、P r i m e r E x t e n s i o n法、L A M P法、U C A N法などがある。

本発明において、プライマーと核酸合成酵素による核酸伸長反応とは、DNA依存性DNAポリメラーゼ、DNA依存性RNAポリメラーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、鎖置換型DNAポリメラーゼなどを用いてプライマー特異的に起こす5'→3' DNAまたはRNA合成反応のことである。DNAポリメラーゼとしては、K l e n o w F r a g m e n t、T 4 DNAポリメラーゼ、T a q DNAポリメラーゼなどが用いられるが、これらに限定されるものではない。またプライマーとDNAポリメラーゼによる核酸伸長反応で特定の塩基配列を検出する方法には、例えば前述のSNPsタイピング技術のP y r o s e q u e n c i n g法、P r i m e r E x t e n s i o n法、L A M P法などがある。

本発明において、カオトロピック剤とは水溶液中の水分子の構造を破壊する物質の総称である。

本発明において、界面活性剤とは1分子の中に親水性部分と親油性部分を共有している化合物を意味し、イオン性界面活性剤と非イオン性界面活性剤に大別される。イオン性界面活性剤は、更に陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤と両イオン性界面活性剤に大別することができる。本発明において細胞溶解液に使用できる界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤または非イオン性界面活性剤のいずれかであり、陽イオン性界面活性剤は使用できない。陰イオン性界面活性剤としては、例えばドデシル硫酸ナト

リウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ドデシル - N - サルコシン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム等が挙げられる。両性界面活性剤としては、例えば 3 - [(3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホン酸、3 - [(3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸、パルミトイルリゾレシチン、ドデシル - N - ベタイン、ドデシル - アラニン等が挙げられる。非イオン性界面活性剤としては、例えばオクチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、デカノイル - N - メチルグルカミド、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレンヘプタメチルヘキシルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル等が挙げられる。

本発明において不織布に吸着された核酸そのものを標識するとは、核酸を新規に合成することなく吸着された核酸に直接標識を導入することを意味する。このような標識法としては、例えば Biotin や Digoxigenin、あるいは Rhodamine、Fluorescein、Cy3、Cy5 などの蛍光物質を非酵素的、化学的に導入する方法があり、そのための試薬も市販されている。一方、本発明において不織布に吸着された核酸を標識するとは、前述の直接標識に加えて、核酸合成酵素と標識ヌクレオチドを用いて核酸の相補鎖を合成して標識することを含む。また本発明においてハプテンとは、単独では免疫原性が低い担体と化学的に結合すると特異的な抗体産生を誘導できる化合物をいう。例えば前述の Digoxigenin 標識では、Digoxigenin はハプテンとして利用されている。

以下、本発明を更に詳しく説明する。本発明者等はカオトロピック剤やエタノールなどの有機溶媒を使用せずに、簡便・迅速に核酸を精製する方法を検討した。その結果、不織布が核酸精製に非常に適していることを見出した。他の多孔質フィルターの場合、例えば比較例 2 に記載のように 8 μm の孔径を持つポリカーボネート製トラックエッチドメンブレンには核酸吸着能がなく、多孔質フィルターであれば何でも核酸精製に使用可能という訳ではなかった。該トラックエッチドメンブレンには 2 層の薄膜がコーティングされており、最上層は SiCN である。一方、不織布は孔径が約 10 ~ 約 130 μm 、繊維径が約 1.2 ~ 約 20 μm のものを検討したが、素材に拘わらず血液からの核酸精製に使用できた。すなわち、不織布は、平均孔径が 2 ~ 150 μm なら使用可能で、特に 7 ~ 13 μm のものが好ましい。また、平均繊維径は 0.3 ~ 20 μm なら使用可能で、特に 0.7 ~ 1.7 μm のものが好ましい。また、不織布の素材に関しては、血液からの核酸の収量、精製度に優劣はあるものの、ポリエステル、セルロース、アクリル、ポリプロピレン、ナイロンのいずれであっても、またその組み合わせであっても使用可能であった。また、適当な塩を含む精製ゲノム DNA 溶液にポリエチレンテレフタレート (PET) 平膜と不織布を浸して振盪すると、驚くべきことにゲノム DNA は不織布には結合したが平膜には結合しなかった。ここで PET 平膜とは細孔が全くない PET シートを意味する。DNA 溶液を不織布に接触させるだけで DNA が不織布に結合したことから、DNA はフィルター濾過されるといふより物理吸着で不織布に結合していると考えられた。以上の結果は、不織布という形態が核酸精製に非常に適していることを示している。

更に検討を重ねた結果、不織布の中でも PET 不織布、より好ましくは孔径が約 10 μm 、繊維径が約 1.2 μm の PET 不織布が最も優れていることを見出した。精製ゲノム DNA を PET 不織布に接触させるだけでその 80% から 90% が不織布に吸着した。核酸が不織布に結合するためには NaCl、MgCl₂、HPO₄²⁻ などの塩が必要であったが、特表 2001 - 520894 号のように核酸収量を増すためにカオトロピック剤やエタノールを添加する必要は全くなく、むしろエタノールを添加すると吸着量は著しく減少した。不織布に結合した核酸を溶出するためには、加熱または核酸の断片化が必要であった。核酸溶出には TE Buffer 中で 95、20 分加熱する必要があるが、アルカリ溶液中では時間を 5 分に短縮でき、更に活性酸素を用いると室温、10 秒で溶出する

10

20

30

40

50

ことを見出した。

更に本発明者等は、核酸吸着した不織布に驚くべき特徴があることを見出した。すなわち、吸着した核酸を溶出することなくPCRなどで核酸を増幅したり、不織布上でプローブをハイブリダイズさせたりすることができるばかりでなく、不織布上ではプライマー依存性の核酸伸長反応が起こることを見出した。この方法を用いると同一の不織布上で核酸の精製から検出まで行うことができ、操作時間や工程が著しく単純化された。不織布上での検出は、不織布の表面が平滑で薄いシートであることから可能となった。以上の検討により本発明を完成させるに至った。

以下、本発明を更に詳しく説明する。本発明の特徴の1つは、カオトロピック剤やエタノールなどの有機溶媒を使わず、簡便、迅速に細胞の核酸を精製することができる点にある。カオトロピック剤やエタノールなどの有機溶媒はPCRなどの酵素反応を強く阻害するので、これらを使用する方法では使用後よく洗浄するか、エタノールならよく乾燥させなければならない。本発明ではこれらの試薬を使用せず、従って徹底的な洗浄や乾燥が不要なので、簡便、迅速に細胞の核酸を精製することができるようになった。

また本発明の特徴の1つは、細胞から核酸を遊離させて溶液状態で不織布にかけるため、どのような細胞にも応用できる汎用性の高い方法になっている点にある。細胞は、ヒト白血球のような真核細胞でも大腸菌のような原核細胞であってもウィルスであっても良い。細胞を直接フィルターに捕捉してから溶解する方法では、細胞の種類に応じてフィルターの特性や吸着条件を至適化する必要がある。また細胞を破壊することなくフィルターに結合させなければならないので濾過の流速に制限があり、通常はフィルターをゆっくり通す必要がある。本発明では細胞抽出液をフィルターに通すので、流速を早くすることが可能である。

また本発明の特徴の1つは、細胞抽出液をそのまま不織布に通すだけで核酸が不織布に吸着される点にある。また、フィルターの核酸吸着能力の範囲内であれば、サンプル中に含まれる細胞数やサンプル容量に制限はない。一方、F T A^{T M}のような細胞溶液を基材にしみ込ませてから細胞を溶解する方法では、基材が吸収できるサンプル容量が処理量の上限となるので、大容量のサンプルから核酸を抽出する目的にはあまり適さない。例えば、細胞濃度が低い大容量のサンプルから、サンプル中に含まれる全細胞の核酸を回収したい場合は、遠心など他の手段であらかじめ細胞を濃縮する必要がある。本発明のフィルターには、このようなサンプル容量に関する制限はない。

細胞抽出液の作製法は重要である。細胞抽出液は不溶物がない溶液であることが望ましい。また、細胞抽出液の粘度があまり高いと不織布を通すことが困難になるので望ましくない。Proteinase K (終濃度 0.1 mg/ml) を添加した方が好ましいが、必須というわけではない。例えば、室温で血液を溶解する場合、Proteinase K を加えた方が核酸の収量は良い傾向にあるが、Proteinase K がなくても核酸は精製可能である。一方、50 で血液を溶解する場合、Proteinase K の添加は必須であり、Proteinase K を添加せずに作製した血液抽出液を不織布にかけると目詰まりを起こして核酸の精製が不可能になる。処理時間は、室温では5分で十分であり、5分以内でも可能である。また、処理時間を60分まで延長しても問題はない。また、本発明における細胞抽出液の調製に際しては、米国特許第5234824号のように血液を10倍以上に希釈する必要はなく、polyvinyl alcoholのような粘度増強剤を添加する必要もない。更に本発明者等は、喀痰などの粘性の高い試料は80~110の温度範囲で加熱処理する、あるいは還元剤の存在下で処理すると、粘性が低下して不織布を通し易くなることを見出した。例えば、喀痰は加熱処理または還元剤処理しないと目詰まりを起こして不織布を通すことができない。加熱処理あるいは還元剤の処理により、喀痰等に含まれている粘性を示す原因となる蛋白質等が変性して、粘性が低下することで、不織布に目詰まりを起こさずに通すことができるようになる。加熱温度は、80以上が好ましい。また、あまり高い温度は、核酸が分解する可能性があるので好ましくなく、110以下が好ましい。加熱時間は、試料内部まで加温されればよく、上記温度範囲で1分間以上であれば良く、好ましくは1分~15分である。還元剤としては、

10

20

30

40

50

蛋白質を変成させるが、核酸に影響を与えない物質であれば良い。このような還元剤としては、チオール基を含む物質が好ましい。例えば、ジチオスレイトール、システイン、アセチルシステイン、メルカプトエタノールなどが挙げられる。最適な還元剤処理の濃度や処理時間は、使用する還元剤の還元能力によって変化する。例えばジチオスレイトールの場合においては、濃度が1 mM ~ 10 mM程度、処理時間が1分 ~ 10分程度が好ましい。さらに、加熱処理と還元剤処理は同時に行っても良い。

また、細胞の核酸が分解しない限りどのような方法で保存された試料を使っても本発明で核酸を調製することができる。例えば、細胞を含む試料は、採取または調製直後のものであっても凍結保存した試料であっても良い。血液の場合、新鮮血からも凍結保存血からも核酸を精製できる。

本発明の特徴の1つは、多孔質フィルターとして不織布を使用する点にある。不織布の利点は、米国特許第5234824号で開示されているフィルターの孔径が0.2から0.8 μm であるのに比較して、本発明で使用される不織布の平均孔径は大きいので大きな流速が得られて目詰まりしにくいことが挙げられる。これは、血液の溶解液のような粘度の高い試料から核酸を精製する場合、特に有利である。例えば、A040C01の平均孔径は10 μm である。ここで、不織布の平均孔径とは水銀ポロシメーターによって測定した測定値(メディアン値)をいう。平均孔径は、フィルター要素を構成する繊維の絡み具合や空隙の大きさに関連している指標である。不織布では、繊維の方向が液の流れに垂直な平面方向に揃っており、かつ充填状態が均一で片流れが少ないために、大きな処理速度を維持しながら優れた核酸吸着能力を発揮したものと考えられた。目詰まりが問題となる場合には、繊維径や孔径が異なる不織布を組み合わせて用いることも考えられる。また、磁気ビーズと比較した場合の不織布の利点は、不織布ではフィルター濾過するだけで簡単にDNA溶液と接触させることが可能だ、という点である。磁気ビーズ法では、効率的にDNAをビーズに接触させるためにできるだけサンプル容量を少なく抑える必要があり、通常は数 μl ~ 数10 μl に限られる。このため、目的とする細胞を遠心などの操作で濃縮する、などの措置を行う。

不織布は、例えばA040C01/HM3コートのような親水性コート品もA040C01のような未コート品も核酸精製に使用可能である。A040C01とA040C01/HM3コートの精製ゲノムDNA吸着性能を比較すると、A040C01の方が高かった。ここでA040C01とは、PETを素材とした旭化成(株)製不織布である。A040C01/HM3コートとは、HM3(2-ヒドロキシエチルメタアクリレート(以下HEMAと略称する)とN,N-ジメチルエチルメタアクリレート(以下DMと略称する)からなる共重合体、HEMA:DM=97:3)をエタノールに溶解した溶液でA040C01をコーティングしたもので、旭メディカル(株)Sepacel11登録商標のメインフィルターとして使用されている。また不織布は、80 ~ 100の温度で表面コート剤などの成分が溶出しないもの、できるだけ目詰まりしにくいものが望ましい。また、不織布の白血球吸着能力と核酸吸着能力には相関関係がない。核酸吸着能力を示す不織布の中には、優れた白血球吸着能力を示すA040C01/HM3コートやA040C01があり、またほとんど白血球吸着能力を示さないE05070のようなフィルターもある。このことは、本発明で使用可能なフィルターの特性と例えば国際公開W000/21973号で要求されるフィルターの特性は異なることを示している。

また本発明は、国際公開W000/21973号のような細胞を直接フィルターに捕捉してから溶解する方法と比較すると工程数が少なく、より簡便な方法になっている。例えば血液から核酸を精製する場合、フィルターに核酸を吸着させるまでに国際公開W000/21973号では、1)血液を流し、2)溶血液を流して赤血球を破壊し、3)細胞溶解液を流して白血球を破壊する、という3工程が必要になる。本発明では、血液と細胞溶解液を混合してフィルターにかけるだけである。

不織布に吸着された核酸は、特表2001-520894号にあるように単にフィルターを水に漬けて10 ~ 30で1 ~ 2分放置するだけでは溶出しない。不織布に吸着された核酸は、水または低塩Buffer中で40 ~ 100の温度範囲、好ましくは80

10

20

30

40

50

から95の温度範囲で加熱すると溶出される。すなわち、本発明ではTE buffer中で80、60分加熱するか、または95で20分加熱すると核酸が溶出することを見出した。更に、アルカリ処理して溶出する方法を見出したが、この方法を用いるとTE Buffer中で溶出するより短時間で吸着DNAを溶出することができ、極めて有用であった。加熱すると溶出速度は更に早まり、95では5分で溶出された。アルカリ処理すると二本鎖DNAが一本鎖に変性することはよく知られているので、このような変性によりフィルターに吸着された核酸が溶出しやすくなったと考えられる。また、1.2N NaOHで90、10分処理すると核酸中のアデニンとシトシン、特にアデニンがより選択的に修飾されることが報告されている(Methods in Enzymology、Vol. 65、p537(1980))。本発明のアルカリ処理は0.2N以下のNaOHを使用しているため、上記のような塩基修飾が起こっている可能性は低いと考えられる。実際、アルカリ溶出した核酸はPCR反応のテンプレートとして使用可能であったし、ハイブリダイゼーションに使用するプローブをアルカリ溶出と同一の条件で処理しても、ハイブリダイゼーションは可能であった。

10

アルカリ溶出の特徴は溶出核酸の分子量が大きいことである。TE Buffer中で95、20分間加熱して溶出すると、核酸は数kbから数10kbの断片として回収されるが、アルカリ中で95、5分間加熱して溶出する場合には数100kb以上の断片もあった。サイズの大きなゲノムDNAを調製したい場合には、アルカリ溶出は極めて有用である。また本アルカリ溶出法は、本発明で調製された核酸吸着フィルター、例えば国際公開W000/21973号、米国特許第5187083号、米国特許第5234824号などで開示された方法によって作製された核酸吸着フィルターから核酸を溶出する場合にも有効である。

20

更に本発明者らは、酸性条件下での溶出を検討した。その結果、pH3からpH5の範囲、より好ましくはpH4からpH5の範囲の酸性溶液中で、70から100の温度範囲で加熱すると核酸の溶出が促進されることを見出した。例えば、95では10分で核酸がフィルターから溶出され、更にこの核酸はPCRのテンプレートとして使用可能であった。しかし、TE Bufferで溶出した場合と比較するとPCRによる増幅が起こりにくかったことから、酸溶出した核酸は何らかの損傷を受けている可能性がある。実際、DNAのデオキシリボースとピリミジン塩基とのグリコシド結合は酸性で安定であるが、プリン塩基とのグリコシド結合は酸性で加水分解されていわゆるアプリン酸を生ずることはよく知られている。この反応は塩基特異的な化学分解法として、DNA塩基配列決定法であるマクサムーギルパート法で使用されており、この場合pH2.0に合わせた0.1M piperidine formateで20、60分間処理する(Methods in Enzymology、Vol. 65、p535(1980))。本発明で記述されている条件はpH3からpH5の範囲であるが、このような塩基損傷が起こっている可能性がある。

30

アルカリ溶出では、溶出後にpHを中性に戻すという操作が必要であった。本発明者らはそのような後処理が不要な方法として界面活性剤の存在下で溶出する方法を見出した。不織布に吸着された核酸は水または低塩条件下で加熱すると溶出されるが、そこに界面活性剤を添加すると核酸溶出は更に促進される。TE Bufferで溶出する場合と比較すると、界面活性剤は溶出温度を下げ、溶出時間を短縮する効果があった。界面活性剤の中でも非イオン性界面活性剤や両性界面活性剤は1%ぐらいの濃度ではPCRやハイブリダイゼーションを阻害しないので、溶出核酸はそのまま使用することができ溶出剤として極めて有用であった。

40

更に本発明者らは、溶出時の温度制御が不要で、かつ短時間に溶出する方法も見出した。不織布に吸着された核酸を活性酸素処理して溶出させた場合、TE Buffer中での溶出やアルカリによる溶出より簡便で短時間に吸着DNAを溶出することができ、極めて有用であった。活性酸素により核酸残基のリン酸エステル結合が切断されて核酸の断片化が起こることはよく知られており、フィルターに吸着した核酸が断片化されてフィルターから容易に溶出されたと考えられる。金属イオンを添加した過酸化水素を用いた場合、金

50

属イオンを添加しない場合と比較すると、添加時のほうがフィルターに吸着したゲノムを短時間に断片化し、溶出させることが出来た。また、過酸化水素水の濃度を高めるとゲノムDNAの断片化に要する時間が短縮されて溶出に必要な時間が短縮した。

活性酸素を核酸に作用させた場合、核酸残基のリン酸エステル結合が切断されるだけでなく、特に核酸の塩基部分への損傷が生じることも知られているが、活性酸素処理を短時間で行う、あるいは、溶出した核酸溶液から活性酸素を迅速に取り除くことで核酸に対する損傷を最小限に抑えることができる。活性酸素を取り除く方法として、例えば、NucleospinTM (Marcherey-Nagel社)等の核酸精製カラムを使って核酸溶出液中の活性酸素を除く方法、限外濾過膜を使って核酸だけを精製して濃縮する方法、また、一般にエタノール沈殿法と呼ばれる塩の存在化で適量のアルコールを添加して核酸を沈殿させて核酸を精製させる方法がある。金属イオンの存在化で活性酸素を産生させたい場合には、金属イオンを含む活性酸素反応液に金属イオンのキレート剤を添加することで活性酸素の発生を止める方法もある。また、一般的にラジカルスカベンジャーと呼ばれる活性酸素消去剤を添加して活性酸素による核酸の切断と損傷を抑えることも可能である。例えば、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、スーパーオキシドを消去する事が知られており、アスコルビン酸やグルタチオンはヒドロキシラジカル、スーパーオキシドを消去する事がよく知られている。実際、活性酸素処理にて溶出したゲノムDNAをNucleospinTMカラムにて精製し、PCR反応のテンプレートとして使用することも可能であったし、ハイブリダイゼーションに使用するプローブを活性酸素溶出と同一の条件で処理しても、ハイブリダイゼーションは可能であった。

更により直接的な方法で、不織布から溶出したゲノムDNAがハイブリダイゼーションのターゲットとして、あるいはプローブとして使用可能であることを示した。すなわち、標品ゲノムDNAをピオチン標識して不織布から溶出したゲノムDNAとハイブリダイズさせる、あるいは不織布から溶出したゲノムDNAをピオチン標識して標品ゲノムDNAとハイブリダイズさせた。その結果、TE Bufferまたはアルカリ溶液中での加熱溶出、あるいは活性酸素による溶出のいずれの場合も、ターゲットとしてもプローブとしても使用可能であることが実証された。

更に本発明の特徴の1つは、核酸を溶出することなく核酸を吸着した不織布を直接用いてPCRなどの核酸増幅反応や塩基配列検出を行うことができる点にある。すなわち、核酸の抽出・精製から核酸増幅あるいは核酸の抽出・精製から塩基配列検出まで同一フィルター上で実施できる。このことにより、核酸の抽出から検査に至る全工程が著しく単純化され、更に溶出操作が不要なため処理時間も著しく短縮された。また不織布をアレイ状に配置すれば、あるいは同一の不織布上にアレイ状に核酸をスポットすれば、多項目検出が簡単に行える。本発明の使用としては核酸の抽出・精製から核酸増幅まで本発明で行った後、標的塩基配列を電気泳動やDNAマイクロアレイ、あるいは質量分析計を用いる検査法で解析することも可能である。

本発明の不織布に吸着された核酸は遊離しにくいことが特徴であり、このことが特別の固定操作なしで不織布上でプローブをハイブリダイズさせる、あるいは不織布上で核酸伸長反応を起こすことを可能にした。走査電顕で解析すると、繊維状の核酸が不織布の繊維表面上に吸着していることがわかる。電顕で観察される繊維状の核酸の分子量は巨大で、このような長い核酸は多数の点で不織布繊維と相互作用しているのが非常に遊離しにくいと考えられる。本発明の核酸吸着フィルターは、溶液中に Mg^{2+} や $NaCl$ などの塩が含まれると、加熱しても核酸を遊離しにくいという特性を持つ。そのため、二本鎖DNAを一本鎖にする通常の熱変性やアルカリ変性条件下でも核酸はフィルターに吸着したままで、従ってUV照射など特別な固定化操作を行わなくてもハイブリダイゼーションが可能となった。一方、核酸増幅反応では、例えばPCR反応液中にゲノムDNAを吸着した不織布の薄片を加えてゲノムDNAを鋳型にしたPCRを行うと、PCR増幅産物は溶液中に回収される。

更に本発明の大きな特徴の1つは、吸着された核酸を鋳型にしたDNA伸長反応が不織布上で起こるという点にある。上記のようなPCR増幅産物と異なり、DNA伸長鎖は溶液

10

20

30

40

50

中に遊離せず不織布に吸着したままである。このことを利用して感度の良い検出系を組むことができる。核酸伸長反応を行う際にDNAポリメラーゼの基質となる標識ヌクレオチドを加えれば、標識ヌクレオチドが新規合成DNAに取り込まれて伸長反応を検出できる。標識ヌクレオチドとしては、例えば蛍光標識ヌクレオチドやDigoxigenin (DIG) 標識ヌクレオチド (Roche Diagnostics) などが使用可能である。DIGシステムの場合、よく知られているように標識抗DIG抗体と組み合わせて蛍光、発光、発色による検出が可能である。標識ヌクレオチドの代わりに、DNA合成時に生成するピロリン酸を検出しても良い。ピロリン酸は、例えばPyrosequencing法と同様な反応で、ATPに変換してルシフェリン-ルシフェラーゼの系で発光させたり、ピロリン酸マグネシウムを形成して白濁させて検出できる。

10

本発明では不織布に吸着された核酸を直接標識することも可能である。溶液状態の核酸を標識する場合と比較すると、不織布上では未反応の標識試薬を洗浄で簡単に除去できるという利点がある。不織布上で標識された核酸は本発明で記述されている方法で簡単に溶出されるので、これを用いてハイブリダイゼーションなどの検出反応を行うことができる。本発明の不織布は単位面積当たり多数の細胞あるいは大容量のサンプルを処理できるので、容易に単位面積当たりの核酸固定量(核酸密度)を増加することができる。検査対象となる核酸の量が多くなれば検出も容易になるので、感染症診断のように感度が要求される場合、または核酸増幅が好ましくないような検査でサンプルの入手が比較的容易な場合は、本法は特に有用である。

実施例

20

以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

[実施例1] 不織布によるヒト新鮮血からの核酸精製

血液は健常人から採血し、抗凝固剤としてヘパリンナトリウム(清水製薬)を血液1mlあたり10単位添加した。血液中の白血球数は、LeucoCOUNT Kit (Becton Dickinson)を用いてフローサイトメーター(FACS Calibur、Becton Dickinson)で測定した。血液0.25ml中の白血球数は、 1.16×10^6 個であった。不織布は旭化成(株)の製品を使用した。不織布を直径12mmの円盤状に切断して、それを4枚重ねてフィルターホルダー(SWINNEX、MILLIPORE)にセットし、フィルターホルダーの上流には10mlの注射筒、下流には吸引ポンプを設置してフィルターホルダーに接続した。最初に3mlのDigestion Buffer (10mM Tris pH8; 100mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS)で不織布を洗浄した。

30

次に、0.25mlのヒト血液にProteinase K (PCR-Grade、Roche)を0.05 μ g加えて、更に2x Digestion Buffer (20mM Tris pH8; 200mM NaCl; 50mM EDTA; 1% SDS)を0.25ml加えて、室温で5分放置した。この処理で赤血球、白血球は完全に破壊された。この血液抽出液を不織布にかけて直ちに吸引濾過した。それから、吸引しながら8mlのDigestion Bufferを流してフィルターを洗浄した。

次に、3mlの1M NaClを含むPBS / 1mM EDTA、最後に3mlのTE Buffer (10mM Tris pH8; 1mM EDTA)を流して不織布を洗浄した。それから、不織布4枚をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5mlのTE Bufferを加えた。これを80 $^{\circ}$ Cで1時間保温した後、溶出液の A_{260} (260nmの吸光度)と A_{280} (280nmの吸光度)をUV-1600 UV-可視光スペクトロフォトメーター(島津)で測定した。溶出液の A_{260} / A_{280} が1.8 - 2.0の範囲にあれば、ほぼ純粋な核酸と考えられる。表1は、 A_{260} / A_{280} が1.8 - 2.0の範囲にあった不織布をリストアップしたものである。DNA濃度は、次の式により算出した(UV1600の付属ソフトDNA / 蛋白質PROGRAM PACK Ver 2.00)。

40

DNA濃度 (μ g/ml) = $K_1 * A_{260} - K_2 * A_{280}$

50

ここで、K1 = 62.90 K2 = 36.00
表1

商品名	不織布仕様	素材	DNA (μ g)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
	A040C01/HM3 コート	ポリエチレンテレフタレート	5.7	1.86
	A040C01	ポリエチレンテレフタレート	4.3	2.01
MICROWEB.	P020A(EL)	ポリプロピレン	2.3	1.94
MICROWEB.	P020C	ポリプロピレン	3.8	1.94
MICROWEB.	P090D	ポリプロピレン	4.0	1.91
ELTAS.	N05070	ナイロン	4.7	1.93
ELTAS.	E05070	ポリエステル	5.1	1.88

[実施例 2] ヒト精製核酸の解析

実施例1で得られた精製核酸を0.7% アガロース電気泳動にかけて、そのサイズを確認した。実施例1の溶出液10 μ lに10x Loading Buffer (1% SDS; 50% Glycerol; 0.05% Bromophenol Blue、TAKARA) 1.5 μ lを加えてよく混和し、全量を0.7% アガロース電気泳動にかけた。Mupidミニゲル泳動槽(Advance)で50V、90分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。図1に示す通り、精製核酸は数kb - 数10kbに及びいろいろなサイズの核酸断片を含んでいた。

次に、実施例1で得られた精製DNAがPCRの鋳型と成り得るかを確認した。プライマーには、Clontech社のGlycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) 0.45kb Control Amplimer Set (カタログ番号 5405-3)を使用した。実施例1の溶出液を蒸留水で10倍に希釈して、その5 μ lをPCR反応液(最終濃度10mM Tris HCl pH8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.2mM dATP; 0.2mM dGTP; 0.2mM dCTP; 0.2mM dTTP; 1.25U AmpliTaq (Applied Biosystems); G3PDH 3'-primer 0.5 μ M; G3PDH 5'-primer 0.5 μ M)に加えて50 μ lとした。

これをDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)で94 5分 1 cycle; 94 30秒、55 1分、72 1.5分、30 cycles; 72 7分 反応させた。PCR終了後、反応液10 μ lに10x Loading Bufferを1.5 μ l加えてよく混和し、全量を2% アガロース電気泳動にかけた。50V、45分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。結果を図2に示す。すべての精製DNA画分から452bpのPCR産物が増幅されており、PCRの鋳型として使用可能であることが示された。

[実施例 3] 大腸菌核酸の精製

A040C01/HM3コート(旭化成)を直径12mmの円盤状に切断して、それを4枚重ねてフィルターホルダー(SWINNEX、MILLIPORE)にセットし、フィルターホルダーの上流には10mlの注射筒、下流には吸引ポンプを設置した。最初に3mlのDigestion Buffer (10mM Tris pH8; 100mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS)で不織布を洗浄した。

E. coli DH5のグリセロールストック50 μ lを3mlのLB培地(Tryptone Peptone (DIFCO) 1g; Yeast Extract (DIFCO) 0.5g; NaCl 1g; 1N NaOH 200 μ l; 蒸留水 10

10

20

30

40

50

0 ml)に加えて、37 4.5時間培養して、 $A_{600} = 1.56$ の培養液を得た。吸光度からE. coli濃度は約 6.2×10^9 個/mlと考えられた。この培養液を1.6 ml (E. coli 10^{10} 個)取って15,000 rpmで1分間遠心した。菌の沈殿を0.25 mlのLB培地に懸濁した。Proteinase K (PCR-Grade, Roche)を0.05 μ g / 2.6 μ l加えて、更に2x Digestion Buffer (20 mM Tris pH 8; 200 mM NaCl; 50 mM EDTA; 1% SDS)を0.25 ml加えて、室温で5分放置した。この抽出液を上記で準備したA040C01/HM 3コートにかけて直ちに吸引濾過した。その後、吸引しながら8 mlのDigestion Bufferを流してフィルターを洗浄した。次に、3 mlの1 M NaClを含むPBS / 1 mM EDTA、最後に3 mlのTE Buffer (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA)を流してA040C01/HM 3コートを洗浄した。それから、4枚のA040C01/HM 3コートをフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5 mlのTE Bufferを加えた。これを80 で1時間保温した後、溶出液の吸光度を測定した。 $A_{260} / A_{280} = 1.84$ の精製核酸を64.1 μ g取得した。

10

[実施例4]大腸菌核酸の解析

実施例3で得られた精製核酸を0.7% アガロース電気泳動にかけて、そのサイズを確認した。実施例3の溶出液10 μ lに10x Loading Buffer (1% SDS; 50% Glycerol; 0.05% Bromophenol Blue、TAKARA) 1.5 μ lを加えてよく混和し、全量を0.7% アガロース電気泳動にかけて。Mupidミニゲル泳動槽(Advance)で50V、90分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。図3に示す通り、精製核酸は数100 bpから数10 kbの核酸断片を含んでいた。

20

次に、実施例3で得られた精製DNAがPCRの鋳型と成り得るかを確認した。PCRのプライマーには、大腸菌のリボソーム蛋白質L25をコードする遺伝子rplYの塩基配列393番目のcから413番目のaまでの配列(配列番号1)と塩基配列567番目のcから587番目のaまでの相補鎖の配列(配列番号2)を使用し、Sigma社に依頼して化学的に合成した。PCR増幅産物の長さは195 bpであった。実施例3の溶出液を蒸留水で4000倍に希釈して、その10 μ lをPCR反応液に加えて25 μ lとした(最終濃度 60 mM Tris / 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 10.0; 50 mM KCl; 3.5 mM MgCl₂; 0.2 mM dATP; 0.2 mM dGTP; 0.2 mM dCTP; 0.2 mM dTTP; 1.25 U TaKaRa Ex Taq(宝酒造); primer 各0.5 μ M)。

30

これをDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)で94 2分 1 cycle; 94 1分、55 1分、72 1分、30 cycles; 72 7分 反応させた。PCR終了後、反応液10 μ lに10x Loading Bufferを1.5 μ l加えてよく混和し、全量を3% NuSieve 3:1アガロース(BioWhittaker Molecular Applications)電気泳動にかけて。Mupidミニゲル泳動槽(Advance)で100V、40分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。結果を図4に示す。195 bpのPCR産物が増幅されており、PCRの鋳型として使用可能であることが確認された。

40

[実施例5]ヒト凍結保存血からの核酸精製

血液は健常人から採血し、抗凝固剤としてヘパリンナトリウム(清水製薬)を血液1 mlあたり10単位添加した。血液中の白血球数は、LeucoCOUNT Kit (Becton Dickinson)を用いてフローサイトメーター(FACS Calibur、Becton Dickinson)で測定した。血液0.25 ml中の白血球数は、 1.16×10^6 個であった。

0.25 mlの血液をエッペンドルフチューブに入れて-80 で凍結した。0.25 ml

50

1の凍結保存血に、37 に加温した2x Digestion Buffer (20mM Tris pH8; 200mM NaCl; 50mM EDTA; 1% SDS)を0.25ml加え、更にProteinase K (PCR-Grade, Roche)を0.05µg加えて、これを37の水浴で時々加温しながらvortexで攪拌して完全に溶解した。室温で5分放置後、この血液抽出液を不織布にかけて直ちに吸引濾過した。以下、実施例1で記述した方法に従って核酸を調製した。対照として、新鮮血を同様に処理した。結果を表2に示す。凍結保存血からも新鮮血と同じように精製核酸が得られた。

表2

	DNA (µg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
新鮮血	4.4	1.92
凍結保存血	3.0	1.90

10

[実施例6] 不織布に対するゲノムDNAの吸着

6.20x10⁷のヒト末梢血白血球に620µlのDigestion Buffer (10mM Tris pH8; 100mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS)とProteinase K (終濃度 0.1mg/ml、PCR-Grade, Roche)を加えて白血球を懸濁した。50 で12時間incubation後、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール=25:24:1 (Gibco BRL)を加えて完全に混和して1700xg、10分間遠心した。上清を取って、更に同じ操作を2回繰り返した。その上清を透析チューブに移して、4 で100容のTE Buffer (10mM Tris pH8; 1mM EDTA)に対して3回透析した。A₂₆₀/A₂₈₀=1.76のゲノムDNAが531µg得られた。

20

不織布A040C01/HM 3コートを経径12mmの円盤状に切断して、それを4枚重ねてフィルターホルダー (SWINNEX、MILLIPORE)にセットした。フィルターホルダーの上流には10mlの注射筒をセットし、テルフュージョンシリンジポンプTE-311 (テルモ)で3mlのPBSを流速26.2ml/hrで流して不織布を洗浄した。次に、26.3µgのゲノムDNAを1mlのPBSに溶かしてA040C01/HM 3コートで濾過した。その後、3mlのPBSで不織布を洗浄した。濾液はすべて回収した。最後に不織布をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5mlのTE Bufferを加えた。これを80 で1時間保温した後、TE Bufferを回収した。すべての濾液と溶出液の容量と吸光度を測定し、DNAの回収率を計算した結果を表3に示す。A040C01/HM 3コートに26.3µgのDNAをかけたところ、約65%のDNAが吸着されて51%のDNA (13.5µg)が回収された。なお、DNA回収率は次式で計算した。

30

回収率 (%) = 100 * 回収DNA (µg) / 26.3 (µg)

表3

	全DNA量	素通り	洗浄	溶出
DNA (µg)	26.3	6.6	2.7	13.5
回収率 (%)	100%	25%	10%	51%

40

[実施例7] 血液の溶解条件

実施例1と同様の条件で実験を行い、血液の処理時間、処理温度、Proteinase Kの有無を検討した。不織布にはA040C01/HM 3コートを使用した。血液0.25mlにProteinase K、2x Digestion Bufferを加えてから、室温または50 で、5分~60分処理してからA040C01/HM 3コートで核酸を精製した。結果を図5に示す。Proteinase Kなしで50 5分~15分処理すると、血液抽出液が目詰まりして不織布を通過できなくなり核酸を回収できなかった。また、室温で5分~60分処理の範囲では、Proteinase K添加または無添加どちらの系でも核酸を精製できた。

50

[実施例 8] 白血球吸着能と核酸吸着能

不織布は、A040C01/HM 3コート、A040C01、N05070、E05070を用いた。不織布を直径12mmの円盤状に切断して、それを4枚重ねてフィルターホルダー(SWINNEX、MILLIPORE)にセットした。フィルターホルダーの上流は10mlの注射筒に繋ぎ、注射筒はテルフュージョンシリンジポンプTE-311(テルモ)にセットした。不織布は3mlのEtOH、次に3mlのPBSを流して前処理した。流速はシリンジポンプで26.2ml/hrに設定した。前処理した不織布に血液1mlを流し、次に6mlのPBSで洗浄した。最後に不織布に空気を通して、洗浄液をすべて押し出した。素通りした血液と洗浄液はすべて回収して(合わせて濾液とした)、容量と白血球数を測定した。不織布にかける前の血液と濾液中の白血球数は、Leuc

10

oCOUNT Kit(Becton Dickinson)を用いてフローサイトメーター(FACS Calibur、Becton Dickinson)で測定した。白血球吸着率は次の式で算出した。

白血球吸着率(%) = $100 * (\text{血液} 1 \text{ ml の白血球数} - \text{濾液の白血球数}) / (\text{血液} 1 \text{ ml の白血球数})$

上記で求めた白血球吸着率と表1のDNA回収量をプロットしたのが図6である。不織布の白血球吸着能力(白血球除去能力)と核酸吸着能力に相関関係は認められなかった。

[実施例 9] アルカリ条件下での核酸溶出

実施例5と同様な条件で実験を行い、アルカリ条件下での核酸溶出を検討した。不織布は旭化成(株)の製品A040C01/HM 3コートを使用した。0.25mlの凍結保存血を実施例5の手順で不織布にかけて、最後に3mlのTE Bufferを流して不織布を洗浄した後、不織布4枚をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5mlのTE Buffer、0.05N NaOH、または0.2N NaOHを加えて不織布を浸して、ヒートブロックで95 5分から20分保温した。反応終了後、3M NaH₂PO₄を0.2N NaOHに対して1/10容(50μl)、0.05N NaOHに対して1/40容(12.5μl)加えて中和した。

20

溶出したDNAの量は、OliGreen登録商標 ssDNA定量キット(Molecular Probes社 商品番号0-11492)を用いて測定した。キット付属の18残基オリゴヌクレオチドを標準として、Ex 485nm、Em 535nmで蛍光プレートリーダーARVosx-3(ワックベルトールドジャパン(株))で定量した。不織布からの溶出液をTE Bufferで10倍に希釈し、更にRNAを除くために、DNase-free RNase(Roche社 商品番号1119915)を最終濃度2.5μg/mlになるように加えて37 30分反応させた。この処理でRNAは分解されて、OliGreenの測定系ではほとんど検出できなくなる。このことは、16Sおよび23SrRNA標品を用いて確認された。

30

測定結果を図7に示す。TE Buffer中95 で溶出すると、DNA量は20分まで反応時間の経過と共に増加するが(図7)、その後、溶出DNA量はプラトーに達した。一方、同じ量のDNAが、0.05Nまたは0.2N NaOHのアルカリ溶液中では95 5分で溶出可能であった。

40

この精製DNA10μlを0.7% アガロース電気泳動にかけて、そのサイズを確認した。図8に示した通り、アルカリ条件下で溶出したDNAのサイズは、TE Bufferで溶出したDNAより大きい傾向にあった。95 で5分、10分、20分と反応時間が長くなるにつれて溶出DNAのサイズは減少した。0.05N NaOHで溶出した方が0.2N NaOHで溶出した場合よりDNAサイズは大きく、いずれの場合もDNAサイズは数kbから数100kb以上に及んだ。

次に、アルカリ条件下で溶出した精製DNAがPCRの鋳型と成り得るかを確認した。PCRとその解析は、実施例2と同様に行った。すなわち、プライマーには、Clontech社のGlycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase(G3PDH)0.45kb Control Amplimer Setを使

50

用した。結果を図9に示す。アルカリ条件下で溶出した精製DNAからも452bpのPCR産物が増幅されており、PCRの鋳型として使用可能であることが示された。

[実施例10] アルカリ溶出に対する温度の影響

実施例9と同様な方法で、血液由来の核酸を吸着した不織布A040C01/HM3コートを作製し、溶出温度の影響を調べた。溶出は、TE Bufferで95 20分；0.05N NaOHで95 または70 10分；0.2N NaOHで95、70、60、50 または40 10分で行い、溶出したDNA量を比較した。DNA量は、実施例9と同様にOligreen登録商標 ssDNA定量キットで測定した。図10に示した通り、DNAの溶出量は温度が高くなるに従って増加し、特に70以上で顕著であった。

10

[比較例1] 酸性条件下でのDNA溶出

実施例9と同様な方法で、血液由来の核酸を吸着した不織布A040C01/HM3コートを作製した。溶出は、TE Bufferで95 10分、20分、または10mM Citrate (pH4.5) / 1mM EDTA Buffer中で95 10分を行った。溶出後、直ちに1M Tris (pH8.0)を溶出液に加えて中和した。次に、溶出液のA₂₆₀ (260nmの吸光度)とA₂₈₀ (280nmの吸光度)をUV-1600 UV可視光スペクトロフォトメーター(島津)で測定し、溶出核酸量を算出した。結果を表4に示す。DNA濃度は、次の式により算出した(UV1600の付属ソフトDNA/蛋白質PROGRAM PACK Ver2.00)。

DNA濃度(μg/ml) = K1 * A₂₆₀ - K2 * A₂₈₀

20

ここで、K1 = 62.90 K2 = 36.00

表4

	溶出DNA(μg)
TE、95°C 10min	1.1
TE、95°C 20min	6.4
pH 4.5、95°C 10min	4.5

この溶出DNAを実施例9と同様な方法で0.7% アガロース電気泳動にかけて、そのサイズを確認した。結果を図11に示す。pH4.5 95 10分で溶出した核酸のサイズは数kbから数10kbに及んでいた。次に、酸性条件下で溶出した精製DNAがPCRの鋳型と成り得るかを確認した。これも実施例9と同様な方法で行い、酸性条件下で溶出したDNAもPCRが可能であることを見出した(図12)。

30

[参考例1] アルカリ溶出のDNAプローブへの影響

不織布からアルカリ溶出されたDNAがハイブリダイゼーションに使用可能かどうかを評価するために、アルカリ溶出と同じ条件下においたdigoxigenin-11-dUTP(DIG)標識DNAを用いてハイブリダイゼーション実験を行った。DNAのDIG標識はRoche社PCR DIG Probe Synthesis KitとPCR DIG Labeling Mixを使い、ハイブリダイゼーションの検出にはRoche社のDIGハイプライムDNAラベリング/検出キットを用いた。1ng Lambda DNA(Takara)、日本バイオサービス社に依頼して化学的に合成した配列番号3のDNAプライマー(最終濃度0.4μM)と配列番号4のDNAプライマー(最終濃度0.4μM)を含むPCR反応液(最終濃度1.5mM MgCl₂を含むPCRバッファー；0.2mM dATP；0.2mM dGTP；0.2mM dCTP；0.19mM dTTP；0.01mM digoxigenin-11-dUTP；2.6U Expand High Fidelity AmpliTaq)50μlを調製して、これをDNA Thermal Cycler(Perkin Elmer)で94 3分 1 cycle；94 30秒、60 1分、72 3分、30 cycles；72 5分 反応させた。標識されたDNAをMacherey-Nagel社のNucleoSpinカラムにて精製し、50μlのDNA溶液を得た。これに最終濃度が0.05N、または0.2NとなるようにNaOHを加えて、ヒートプロ

40

50

ックで95 5分から20分保温し、アルカリ溶出と同じ条件下においた。保温終了後、3M NaH_2PO_4 を0.2N NaOH に対して1/10容、0.05N NaOH に対して1/40容加えて中和した。このDNA溶液を再度NucleoSpinカラムにて精製を行い、50 μl のハイブリダイゼーション用のDIG標識DNAプローブを得た。0.01ngから10 μg のLambda DNAをHybond N+膜(Amersham-Pharmacia)上にプロットし、アルカリ変性を行って一本鎖にした後、UVクロスリンクにて膜上に固定化した。これをDIG Easy Hyb(Roche)液中に浸し42にて3時間プレハイブリダイゼーションを行った後、熱変性にて一本鎖にした先のDIG標識DNAプローブを添加し42にて18時間保温させてハイブリダイゼーションを行った。これを2XSSC、0.1% SDSを使って室温5分間の洗浄を2回行った後、0.1XSSC、0.1% SDSを使って68 15分間洗浄の洗浄を2回行った。次に洗浄バッファー(最終濃度0.1M マレイン酸; 0.15M NaCl ; 0.3% Tween 20 pH 7.5)にて1分間平衡化を行った後、マレイン酸バッファー(最終濃度0.1M マレイン酸; 0.15M NaCl pH 7.5)で10倍希釈したブロッキング溶液(Roche)に1時間浸した。これに3 μl のアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体(Roche)を添加し室温にて30分間おいた。洗浄バッファーを用いて室温にて15分間の洗浄を2回行い、次にアルカリフォスファターゼバッファー(最終濃度0.1M Tris pH 9.5; 0.1M NaCl ; 50mM MgCl_2)にて2分間平衡化を行い、これに1/100容のCSPD ready-to-use(Roche)を添加して20分間37にて保温した後。これをHyper ECLフィルム(Amersham-Pharmacia)に30分間感光させ、現像機(Konica)にて現像を行った。この結果、アルカリ溶液で処理したDNAプローブは、アルカリ溶液で処理していないDNAプローブとほぼ同じ強度のシグナルを検出することが出来た(図13)。以上の結果は、実施例9に示したアルカリ条件下で溶出させたDNAはハイブリダイゼーションに使用可能であることを示唆している。

[実施例11] 過酸化水素水による核酸溶出

実施例5と同様な条件で実験を行い、過酸化水素水による核酸溶出を検討した。不織布は旭化成(株)の製品A040C01/HM 3コートを使用した。0.25mlの凍結保存血を実施例5の手順で不織布にかけて、3mlの1M NaCl を含むPBS/1mM EDTA、10mlの精製水を流して不織布を洗浄した後、そこに3%の過酸化水素水と0.1mMの CuCl_2 からなる活性酸素液1mlを添加してシリンジをゆっくり押し液を不織布全体に浸らせた。室温に1、2、3、5分間室温に置いた後、シリンジを押しラジカル液を全て押し出し、さらに1mlのTE Bufferで不織布に吸着した核酸を溶出させた。核酸はNucleoSpinカラム(Macherey-Nagel社)にて速やかに精製し、溶出液中に含まれる過酸化水素と金属イオンを除いた。精製した核酸量は、OD₂₆₀nmを測定して定量を行った。また、この精製核酸を0.7% アガロース電気泳動にかけて、その断片化の程度を確認した。その結果を図14に示す。短時間の過酸化水素処理にてフィルターに吸着した核酸が溶出される事が示された。

次に、このラジカル液で溶出し精製したゲノムDNAがPCRの鋳型と成り得るかを確認した。PCRとその解析は、実施例2と同様に行った。すなわち、プライマーには、Clontech社のGlycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase(G3PDH)0.45kb Control Amplimer Setを使用した。結果を図15に示す。過酸化水素にて溶出した精製ゲノムDNAをテンプレートとしてPCRによる核酸増幅が可能である事が示された。

[実施例12] 還元糖と金属イオンによる核酸溶出

実施例11と同様の方法にて、ヒトの核酸を吸着させたA040C01/HM 3コートの不織布を用意した。これをカラムフォルダーから取り出し、24穴プレート(SUMILON)に移し、ラジカル液として100mM D-ribose 5-phospha

te (SIGMA) と 0.1 mM CuCl_2 を各々 250 μl ずつ添加し、攪拌しながら 50 に置いた。1、3、5、10、30 分後に、0.5 M EDTA を 50 μl 添加して、活性酸素の発生を止めた。このうちの 10 μl を 0.7% のアガロースゲル電気泳動にかけた。50 V、45 分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色して BioImage Gel Print 2000i/VGA で撮影した。その結果を図 16 に示す。二価の金属イオンを添加した還元糖にて発生させた活性酸素によって、フィルターに吸着した核酸が溶出される事が示された。

次に、このラジカル液で溶出し精製したゲノム DNA が PCR の鋳型と成り得るかを、実施例 11 と同じ方法にて確認した。その結果を図 17 に示す。二価の金属イオンを添加した還元糖にて発生させた活性酸素によってフィルターから溶出したヒトゲノム精製 DNA をテンプレートとして PCR による核酸増幅は、短時間の活性酸素反応において可能である事が示された。

10

[実施例 13] 制限酵素による核酸溶出

実施例 11 と同様の方法にて、ヒトの核酸を吸着させた A040C01/HM 3 コートの不織布を用意した。これをカラムフォルダーから取り出し、24 穴プレート (SUMILON) に移し、制限酵素 Sau3AI (Takara) 2.5 μl を含む酵素溶液 50 μl を添加し、室温あるいは 37 にて 5、10、30 分間置いた。このうちの 50 μl を NucleoSpin カラムにて精製し 50 μl の溶出ゲノム溶液を得た。これらのうちの 10 μl を 0.7% のアガロースゲル電気泳動にかけた。50 V、45 分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色して BioImage Gel Print 2000i/VGA で撮影した。その結果を図 18 に示す。制限酵素によってフィルターに吸着したゲノム DNA が切断されて溶出される事が示された。

20

[参考例 2] 活性酸素溶出の DNA プロブへの影響

不織布から活性酸素にて断片化し溶出させたゲノム DNA が、ハイブリダイゼーションに使用可能かどうかを参考例 1 と同様な方法で確認した。Digoxigenin-11-dUTP (DIG) 標識 DNA を使ったハイブリダイゼーション実験にて確認した。DNA の DIG 標識は Roche 社 PCR DIG Probe Synthesis Kit と PCR DIG Labeling Mix を使い、ハイブリダイゼーションと検出には Roche 社の DIG ハイプライム DNA ラベリング/検出キットを用いた。1 ng Lambda DNA (Takara) と配列番号 3 と 4 記載の DNA プライマー (最終濃度各 0.4 μM) を含む PCR 反応液 50 μl を調製して、これを DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) で 94 3 分 1 cycle; 94 30 秒、60 1 分、72 3 分、30 cycles; 72 5 分 反応させた。標識された DNA を Macherey-Nagel 社の NucleoSpin カラムにて精製し、50 μl の DIG 標識 DNA プロブ水溶液を得た。この DIG 標識 DNA プロブに 100 mM D-ribose 5-phosphate と 0.05 mM CuCl_2 からなる活性酸素液 50 μl を添加し、50 にて 2、10 分間おいた。これを NucleoSpin カラムにて再度精製し、溶液中の活性酸素を取り除き活性酸素処理済み DIG 標識 DNA プロブとした。以下、参考例 1 と同様に行った。その結果を図 19 に示す。活性酸素処理した DIG 標識 DNA プロブにおいても、膜上に固定化した DNA とハイブリダイゼーションが可能であることが示された。

30

40

[実施例 14] 不織布に吸着されたヒトゲノム DNA の PCR

0.25 ml の凍結保存血 (白血球数 1.15×10^6 個) を実施例 11 と同様の方法で処理して、ヒトの核酸を吸着させた A040C01/HM 3 コート、A040C01、P020A (EL)、P090D、E05070、N05070 の不織布を用意した。3 ml の 1 M NaCl を含む PBS / 1 mM EDTA、3 ml の TE Buffer、最後に 3 ml の精製水を流して不織布を洗浄した後、不織布 4 枚をフィルターホルダーから取り外して、一番上流 (入り口) 側の不織布の中央部を 3 mm x 3 mm の長方形に切って、0.5 ml の PCR 用チューブの底に入れた。

PCR のシステムとしては、Clontech 社の Glycer aldehyde 3 -

50

Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) 0.45 kb Control Amplimer Set (カタログ番号 5405-3) を使用した。PCR用チューブに不織布の切片を入れて、以下実施例2と同様にPCR反応液50 μ lを加え、これをDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) で94 5分、1 cycle; 94 30秒、55 1分、72 1.5分、30 cycles; 72 7分 反応させた。PCR終了後、反応液10 μ lに10x Loading Bufferを1.5 μ l加えてよく混和し、全量を2% アガロース電気泳動にかけた。50V、45分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。結果を図20に示す。核酸を吸着したすべての不織布から452bpのPCR産物が増幅されており、不織布に吸着されたヒトゲノムDNAがPCRの鋳型として使用可能であることが示された。 10

[実施例15] 不織布に吸着された大腸菌ゲノムDNAのPCR
E. coli DH5のグリセロールストック50 μ lを3mlのLB培地に加えて、37 3.5時間培養して、A₆₀₀ = 0.9の培養液を得た。吸光度からE. coli濃度は約3.6 x 10⁹ 個/mlと考えられた。この培養液を1.4ml取って15,000rpmで1分間遠心した。菌の沈殿を0.25mlのLB培地に懸濁し、以下実施例3と同様に処理して、大腸菌の核酸を吸着させたA040C01/HM-3コートを用意した。3mlのTE Bufferを流して不織布を洗浄した後、不織布4枚をフィルターホルダーから取り外して、一番上流(入り口)側の不織布の中央部を3mm x 3mmの長方形に切って、0.5mlのPCR用チューブの底に入れた。次に、実施例4と同じPCRシステムを用いて大腸菌のリボソーム蛋白質L25をコードする遺伝子rplYをターゲットにしたPCR反応を行い、アガロース電気泳動で解析した。結果を図21に示す。195bpのPCR産物が増幅されており、不織布に吸着された大腸菌ゲノムDNAがPCRの鋳型として使用可能であることが確認された。 20

[実施例16] 不織布に吸着されたヒトゲノムDNAのプローブハイブリダイゼーションによる検出
0.25mlの凍結保存血(白血球数 1.15 x 10⁶ 個)を実施例11と同様の方法で処理して、ヒトの核酸を吸着させたA040C01/HM 3コート及びA040C01の不織布を用意した。3mlの1M NaClを含むPBS/1mM EDTA、次に3mlのTE Bufferを流して不織布を洗浄した。 30

洗浄した不織布をフィルターホルダーから取り出し浮遊細胞培養用の24wellプレート(SUMILON)に移し、アルカリ変性にて不織布上に吸着したゲノムDNAの一本鎖化を行った。膜表面へのゲノムDNAの固定化操作をせずに、直ちにこれに0.5mlのハイブリダイゼーションバッファー(5x Denhardt's; 2x SSPE; 0.2% SDS; 10ng/ml Salmon Sperm DNA (SIGMA)) を添加し、65 にて1時間置き、プレハイブリダイゼーションを行った。

ヒトG3PDH遺伝子に対するラジオアイソトープ標識DNAプローブとLambda DNAに対するラジオアイソトープ標識DNAプローブとを以下の方法にて調製した。まず、Clontech社のG3PDH用Control Amplimer Setを使用して次のPCR反応を行った。10ngのHuman Genomic DNA (GIBCO BRL)を入れたPCR用チューブに、最終量が50 μ lとなるようにPCR反応液(最終濃度10mM Tris HCl pH8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.2mM dATP; 0.2mM dGTP; 0.2mM dCTP; 0.2mM dTTP; 1.25U AmpliTaq (Applied Biosystems); G3PDH 3'-primer 0.5 μ M; G3PDH 5'-primer 0.5 μ M)を加えた。Lambda DNAプローブは、1ng Lambda DNA (Takara)、日本バイオサービス社に依頼して化学的に合成した配列番号3のDNAプライマー(最終濃度0.4 μ M)と配列番号4のDNAプライマー(最終濃度0.4 μ M)を入れたPCR用チューブに、最終量が50 μ lとなるようにPCR 40 50

反応液（最終濃度 10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM dATP; 0.2 mM dGTP; 0.2 mM dCTP; 0.2 mM dTTP; 1.25 U AmpliTaq (Applied Biosystems)) を加えた。これら PCR 反応液を DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) で 96 5 分、1 cycle; 96 30 秒、60 1 分、72 3 分、30 cycles; 72 5 分 反応させた。PCR 終了後、PCR 産物をそれぞれ NucleoSpin Extract キット (Macherey-Nagel) にて精製を行い、ヒト G3PDH 遺伝子と Lambda DNA それぞれの部分配列 DNA 断片を得た。これら各々の DNA 断片 20 ng を含む 45 μl の TE Buffer を 96 に 5 分間置いた後速やかに氷中に 5 分間おき DNA の一本鎖化を行った。これらに Rediprime II DNA Labelling System (Amersham Pharmacia biotech) の Labelling reaction mix と 1.85 MBq の Readyview [³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) を添加し緩やかに混合した後、37 にて 10 分間置き標識を行った。これを BioSpin Column G-30 (BIO RAD) にて精製して未反応の [³²P] dCTP を除いた後、再度 96 に 5 分間おいた後に氷中に 5 分間おき DNA の一本鎖化を行い、ラジオアイソトープ標識ヒト G3PDH DNA プローブと Lambda DNA プローブをそれぞれ得た。

ラジオアイソトープ標識プローブの一部をとり、シンチレーションカウンターにて放射性を測定した後、全放射活性が等しくなるようにヒト G3PDH プローブと Lambda DNA プローブの比率を変えて混合し、これらを先のプレハイブリダイゼーション液中に添加し、引き続き 65 にて 18 時間置いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、不織布を新たな 24 well プレートに移し、これに 0.5 ml の 2xSSC、1% SDS を添加し 65 にて 10 分間の洗浄を行い、次に 0.5 ml の 0.1xSSC、1% SDS を添加し 65 にて 10 分間の洗浄を計 2 回行った。洗浄後不織布を取り出し、5 ml の液体シンチレータの入ったバイアル瓶に移し、シンチレーションカウンターにて不織布に残存している放射活性を測定した。その結果を図 22 に示す。G3PDH プローブにて不織布上のゲノム DNA が検出され、ヒト G3PDH プローブの比率が低くなるのに依存して検出された放射活性も低くなっており、ヒト G3PDH プローブと不織布上のヒトゲノムに含まれる G3PDH 遺伝子の特異的なハイブリダイゼーションが検出されている事が示された。

[実施例 17] 不織布に吸着された核酸の遊離

0.25 ml の凍結保存血（白血球数 1.15×10^6 個）を実施例 11 と同様の方法で処理して、ヒトの核酸を吸着させた A040C01/HM 3 コートの不織布を用意した。3 ml の精製水を流して不織布を洗浄した後、不織布 4 枚をフィルターホルダーから取り外して、1.5 ml のエッペンドルフチューブに入れた。これを 5 組作製して、各々に表 5 に記載した溶液を加えてそれぞれの温度、時間で処理した。95 処理にはヒートブロックを使用した。相対溶出量 (%) とは、TE Buffer 中で 95、20 分処理した時に溶出した核酸量を 100% とした時の各条件での核酸溶出量である。表 5 の結果は、Mg²⁺ や高濃度の塩が含まれる溶液中では 95 で加温しても核酸は遊離しにくく、またアルカリ変性の条件下でも室温では核酸が遊離しにくいことを示している。

表 5

溶液	温度(°C)	時間(分)	相対溶出量(%)
TE	95	20	100
10mM Tris(pH8.0)/ 1 mM MgCl ₂	95	20	5
10mM Tris(pH8.0)/ 10 mM MgCl ₂	95	20	3
1M NaCl/1mM EDTA を含む PBS	95	20	4
0.05N NaOH	25	10	2

10

[実施例 18] 不織布に吸着された核酸の電顕写真

不織布 P03050 を用いて、実施例 14 と同様な方法で核酸吸着フィルターを作製した。精製水を流して不織布を洗浄した後、不織布 4 枚をフィルターホルダーから取り外して、一番上流(入り口)側の不織布を一枚取って凍結乾燥機 DC-41 (YAMATO 製) を用いて凍結乾燥した。また、血液を流さずに他は同一の操作をした不織布をつくり凍結乾燥してこれを対照とした。乾燥した不織布を約 5 mm 角に切り出して、SEM 用試料台にカーボンペーストを用いて固定した。これを風乾した後、オスミウムプラズマコーター OPC-80 (日本レーザー電子製) を用いて厚さ 20 nm でオスミウムプラズマコーティングを行い、検鏡用試料とした。この試料を電界放射型走査電子顕微鏡 S-900 (日立製) で加速電圧 1 kV にて SEM 観察した。図 23 の写真から、核酸は繊維状となって不織布繊維の表面に吸着していることが判明した。

20

[実施例 19] 界面活性剤の検討

実施例 5 と同様な条件で実験を行い、核酸抽出に使用する界面活性剤の種類を検討した。不織布は旭化成(株)の製品 A040C01 の HM 3 コート品を使用した。0.25 ml の凍結保存血中の白血球数は、 1.50×10^6 であった。0.25 ml の凍結保存血に、37 に加温した 2x Digestion Buffer (20 mM Tris pH 8; 200 mM NaCl; 50 mM EDTA; 1% 界面活性剤) を 0.25 ml 加えた。界面活性剤は、以下に記述する界面活性剤からいずれか 1 つを選択して使用した。すなわち、陰イオン性界面活性剤の Sodium dodecyl sulfate (SDS)、両性界面活性剤の 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) または 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO)、非イオン性界面活性剤の Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether (Triton X-114)、Polyethylene glycol tert-octylphenylether (Triton X-100)、Polyoxyethylene alkyl ether (Nissan Dispagnol TOC)、(Octylphenoxy)polyethoxyethanol (Igepal CA630) または Nonoxynol-8.5 (Nissan Nonion NS-208.5)、陽イオン性界面活性剤の Hexadecylpyridinium Chloride (HPC)、Hexadecylpyridinium Bromide (HPB)、Hexadecyltrimethylammonium Chloride (HTAC) または Hexadecyltrimethylammonium Bromide (HTAB) の中からいずれか 1 つを使用した。2x Digestion Buffer を加えた後、更に Proteinase K (PCR-Grade, Roche) を 0.05 μ g 加えて、これを 37 の水浴で時々加温しながら vortex で攪拌して完全に溶解した。室温で 5 分放置後、この血液抽出液を不織布にかけて直ちに吸引濾過した。次に、同じ界面活性剤を含む Digestion Buffer

30

40

50

r を 8 m l 流してフィルターを洗浄した。

更に、3 m l の 1 M NaCl を含む P B S / 1 m M E D T A 、 3 m l の T E B u f f e r (1 0 m M T r i s p H 8 ; 1 m M E D T A) を流して不織布を洗浄した。それから不織布 4 枚をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5 m l の T E B u f f e r に不織布を浸して、ヒートブロックで 95 で 2 0 分保温した。

不織布から溶出した DNA の量は、実施例 9 と同様に O l i G r e e n 登録商標 s s D N A 定量キットを用いて測定した。図 2 4 に示した通り、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、または非イオン性界面活性剤を使用した場合には核酸を精製できたが、陽イオン性界面活性剤を使うと核酸は回収できなかった。

[比較例 2] 不織布以外の多孔質フィルター

実施例 1 と同様な条件で実験を行い、不織布以外の多孔質フィルターが核酸精製に使用可能かどうか検討した。多孔質フィルターとしては多孔性ポリウレタンシート (イムガード I I I R C のメインフィルター、テルモ) または 8 μ m の孔径を持ち最上層が S i C N で薄膜コーティングされているポリカーボネート製トラックエッチドメンブレン (O I A f l o w t h r o u g h 膜、米国 B i o S t a r 社製) を使用し、対照として旭化成 (株) の不織布 A 0 4 0 C 0 1 の H M - 3 コート品を用いた。

フィルターを直径 1 2 m m の円盤状に切断して、多孔性ポリウレタンシートまたは O I A f l o w t h r o u g h 膜は 1 枚、不織布 A 0 4 0 C 0 1 / H M - 3 は 4 枚重ねてフィルターホルダー (S W I N N E X 、 M I L L I P O R E) にセットした。フィルターホルダーの上流には 1 0 m l の注射筒、下流には吸引ポンプを設置してフィルターホルダーに接続した。最初に 3 m l の D i g e s t i o n B u f f e r (1 0 m M T r i s p H 8 ; 1 0 0 m M NaCl ; 2 5 m M E D T A ; 0 . 5 % S D S) でフィルターを洗浄した。

次に、0.25 m l のヒト血液 (白血球数 1.62×10^6 個) に P r o t e i n a s e K (P C R - G r a d e 、 R o c h e) を 0 . 0 5 μ g 加えて、更に 2 x D i g e s t i o n B u f f e r (2 0 m M T r i s p H 8 ; 2 0 0 m M NaCl ; 5 0 m M E D T A ; 1 % S D S) を 0 . 2 5 m l 加えて、室温で 5 分放置した。この血液抽出液をフィルターにかけて直ちに吸引濾過した。以下、実施例 1 と同様に実験を行い、溶出した核酸量を吸光度で測定した。表 6 に示した通り、不織布 A 0 4 0 C 0 1 / H M - 3 と比較すると核酸の収量や純度は劣るものの、多孔性ポリウレタンシートでは核酸精製は可能であったが、O I A f l o w t h r o u g h 膜では核酸を精製できなかった。このことは、孔径が 8 μ m 程度の多孔質フィルターでも核酸精製に使用できないものがあることを示している。

表 6

多孔質フィルター	DNA (μ g)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
多孔性ポリウレタンシート	5.2	1.70
OIA flow through 膜	0.2	1.21
A040C01/HM-3	8.6	1.95

[実施例 2 0] 精製ゲノム DNA の吸着条件の検討 1 塩の影響

精製ゲノム DNA を用いて、不織布への DNA 吸着に対する溶液組成の影響を検討した。ゲノム DNA は、実施例 6 で精製した標品を使用した。旭化成 (株) の不織布 A 0 4 0 C 0 1 、 A 0 4 0 C 0 1 の H M - 3 コート品、A 0 6 6 A 、 A 0 4 0 B 、 E 0 1 0 3 0 のいずれかを直径 1 2 m m の円盤状に切断して、それを 4 枚重ねてフィルターホルダー (S W I N N E X 、 M I L L I P O R E) にセットした。次に、不織布を 3 m l エタノール、更に 3 m l T E B u f f e r で洗浄し、最後に S a m p l e B u f f e r を 3 m l 流して平衡化した。フィルターホルダーの上流に 1 0 m l の注射筒をつけて、シリンジポンプ H A R V A R D A P P A R A T U S M o d e l 5 5 - 2 2 1 9 (H A R V A R D A P P A R A T U S I n c) にセットした。

精製ゲノムDNAを溶解するSample Bufferとしては、10 mM Tris (pH 8) / 1 mM EDTA / 0 ~ 1000 mM NaClまたは10 mM Tris (pH 8) / 0 ~ 100 mM MgCl₂ または0 ~ 100 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH 7.4)、または10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH 7.4) / 0 ~ 1000 mM (NH₄)₂SO₄を使用した。約800 ngの精製ゲノムDNAを5 mlのSample Bufferに懸濁して、流速26.2 ml/hrで不織布に通した。更に、6 mlのSample Bufferで洗浄してから、3 mlのTE Bufferを流した。最後に不織布をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5 mlのTE Bufferを加えた。これを95 °Cで30分保温した後、TE Bufferを回収した。

10

不織布から溶出したDNAの量は、実施例9と同様にOliGreen登録商標 ssDNA定量キットを用いて測定した。キット付属の18残基オリゴヌクレオチドを標準として、Ex 485 nm、Em 535 nmで蛍光プレートリーダーSPECTRA MAX GEMINI XS (Molecular Devices社)で測定した。結果を図25、図26、図27、図28に示す。NaCl、MgCl₂、リン酸、(NH₄)₂SO₄などの塩はゲノムDNAの吸着を促進することが判明した。

[実施例21] 精製ゲノムDNAの吸着条件の検討 2 エタノールの影響

実施例20と同様な方法で、不織布へのDNA吸着に対するエタノールの影響を検討した。ゲノムDNAは、実施例6と同じ方法で精製した。不織布は、旭化成(株)の不織布A040C01、A066AまたはE01030を使用した。精製ゲノムDNAを溶解するSample Bufferとしては、10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH 7.4) / 0 ~ 40% エタノールを使用した。約800 ngの精製ゲノムDNAを5 mlのSample Bufferに懸濁して、流速26.2 ml/hrで不織布に通した。更に、6 mlのSample Bufferで洗浄してから、3 mlのTE Bufferを流した。最後に不織布をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5 mlのTE Bufferを加えた。これを95 °Cで30分保温した後、TE Bufferを回収した。

20

不織布から溶出したDNAの量は、OliGreen登録商標 ssDNA定量キットを用いて測定した。図29に示した通り、精製ゲノムDNAを溶解するSample Bufferにエタノールを添加するとDNA回収量は減少した。

30

[実施例22] DNAの振盪吸着

精製ゲノムDNA溶液にPET不織布またはPET平膜を添加して振盪し、DNAが吸着するかどうかを検討した。ゲノムDNAは、実施例6と同じ方法で精製した。不織布は、旭化成(株)の不織布A040C01、A066AまたはE01030を使用した。直径12 mmの円盤状に切断したPET不織布またはPET平膜4枚をポリプロピレン製の15 ml試験管(IWAKI)に入れた。この試験管に、まず3 mlのエタノールを加えて不織布を湿らせた。エタノールを吸引して除き、次に3 mlのTE Bufferを加えて不織布を洗浄し、同じく吸引除去した。最後に、同じように3 mlのSample Bufferで不織布を処理した。Sample Bufferには、10 mM Tris (pH 8) / 1 mM EDTA / 50 mM NaClまたは10 mM Tris (pH 8) / 2 mM MgCl₂ または50 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH 7.4)、または10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH 7.4) / 0.2 ~ 1.0 M (NH₄)₂SO₄のいずれかを使用した。

40

次に、不織布の入った試験管に5 mlのSample Bufferを加えて、ここに約800 ngの精製ゲノムDNAを添加してよく攪拌した。この試験管をMIX-ROTAR VMR-5 (IUCHI)に載せて、80 rpmで30分処理した。次に、試験管内のDNA溶液を吸引除去して、6 mlのSample Bufferを加えて、同じく80 rpmで15分処理した。Sample Bufferを除いた後、3 mlのTE Bufferを加えて、同じく80 rpmで15分処理した。試験管から不織布を取り出してロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、これに0.5 mlのTE Buffer

50

を加えて95℃で30分保温した。不織布から溶出したDNAの量は、Oligreen登録商標 ssDNA定量キットを用いて測定した。図30に示した通り、ゲノムDNAはPET不織布に吸着して回収されたが、PET平膜には吸着しなかった。このことは、不織布という形状がDNA吸着に重要であることを示している。

また、図31では10mMリン酸に対する硫酸アンモニウムの添加効果を見た。特に不織布E01030では、硫酸アンモニウムはDNA吸着を著しく促進した。また、この振盪吸着の場合、実施例20の濾過吸着と異なり、A040C01よりE01030の方がDNAを良く吸着し、約8割のDNAが回収された。このことは、吸着の条件によって核酸精製に最適な不織布が異なることを示している。

[実施例23] 不織布のスクリーニング

実施例1と同様な実験を行ってDNA精製に使用できる不織布をスクリーニングした。血液は5人の健常人から採血し、血液0.25ml中の白血球数は $0.94 \sim 1.91 \times 10^6$ 個であった。使用した不織布の一覧を表7に示した。これらはすべて旭化成(株)の製品である。ここで、平均孔径は水銀ポロシメーターによって測定し、平均繊維径はSEM写真から算出した。

0.25mlのヒト血液にProteinase Kを0.05μg加えて、更に2x Digestion Bufferを0.25ml加えて、室温で5分放置した。以下実施例1と同様に処理して、最後に3mlのTE Bufferを流して不織布を洗浄した。それから、不織布4枚をフィルターホルダーから取り外して、ロック付きのエッペンドルフチューブに入れ、0.5mlのTE Bufferを加えた。これを80℃で1時間保温した後、TE Bufferを回収した。

表7

10

20

商標	品番	素材	厚み (mm)	平均孔径 (μm)	平均繊維径 (μm)
	A040C01/HM-3	PET/HM-3コート	0.235		
	A040C01	PET	0.235	10	1.2
	A066A	PET	0.400	13	1.7
Bemliese	PS140	セルロース	0.080		
Bemliese	TS327	セルロース	0.270		
Bemliese	TS507	セルロース	0.320		
Bemliese	TS100	セルロース	0.400	45	12
HYBRID Bemliese	QT409	セルロース	0.290		
HYBRID Bemliese	RK629	セルロース	0.420		
MICROWEB	A040B	ポリエステル	0.130	10	
MICROWEB	A040C	ポリエステル	0.100		
MICROWEB	A045A	ポリエステル	0.130		
MICROWEB	A080A	ポリエステル	0.180		
MICROWEB	A090D	ポリエステル	0.370		
MICROWEB	P020A(EL)	ポリプロピレン	0.140		
MICROWEB	P020B(EL)	ポリプロピレン	0.200		
MICROWEB	P020C	ポリプロピレン	0.170		
MICROWEB	P050D(EL)	ポリプロピレン	0.470		
MICROWEB	P090C	ポリプロピレン	0.660		
MICROWEB	P090D	ポリプロピレン	0.740		
ELTAS	N05020	ナイロン	0.130		
ELTAS	N05030	ナイロン	0.170		
ELTAS	N05040	ナイロン	0.190		
ELTAS	N05050	ナイロン	0.210		
ELTAS	N05070	ナイロン	0.250		
ELTAS	E01012	ポリエステル	0.090	66	14
ELTAS	E01015	ポリエステル	0.110		
ELTAS	E01020	ポリエステル	0.130		
ELTAS	E01025	ポリエステル	0.170		
ELTAS	E01030	ポリエステル	0.200	130	12
ELTAS	E01040	ポリエステル	0.250		
ELTAS	E01050	ポリエステル	0.290		
ELTAS	E01070	ポリエステル	0.360		
ELTAS	E05070	ポリエステル	0.230		
ELTAS	P03015	ポリプロピレン	0.140	67	
ELTAS	P03020	ポリプロピレン	0.190		
ELTAS	P03025	ポリプロピレン	0.210		
ELTAS	P03040	ポリプロピレン	0.340		
ELTAS	P03050	ポリプロピレン	0.400	75	20
ELTAS	P03070	ポリプロピレン	0.500		
SHALERIA	C1050	アクリル90%;ポリエステル10%	0.350		
SHALERIA	C3040	アクリル70%;ポリエステル30%	0.260		
SHALERIA	CR050	アクリル65%;レーヨン35%	0.320		
SHALERIA	RC040S	アクリル35%;レーヨン65%	0.270		
スマッシュ	Y15050	ポリエステル	0.160	58	
スマッシュ	Y15100	ポリエステル	0.250		
スマッシュ	Y15150	ポリエステル	0.340		
スマッシュ	Y15200	ポリエステル	0.440		
スマッシュ	Y15250	ポリエステル	0.530		

10

20

30

40

回収した溶液中に含まれる核酸量は、TE Bufferで10倍に希釈した後、Oligreen登録商標 ssDNA定量キットを用いて測定した。結果を図32に示した。また核酸の純度は、溶出液の A_{260} (260nmの吸光度)と A_{280} (280nmの吸光度)をUV-1600 UV可視光スペクトロフォトメーター(島津)で測定して、 A_{260}/A_{280} を求めて評価した。結果を図33に示した。核酸の収量、純度は異なるものの、規格、素材の異なる様々な不織布が核酸精製に使用可能であった。

[実施例24] 不織布によって精製した核酸精製品中のRNA

実施例3で調製した大腸菌核酸中にRNAが含まれることをOligreen登録商標

50

ssDNA定量キットで確認した。OliGreen測定系は、DNAばかりでなくRNAも検出する。従って、核酸溶液をRNase処理してRNAを選択的に分解した後の測定値とRNase未処理の測定値を比較すれば、核酸溶液に含まれているRNA量を見積もることができる。このことは、rRNAを用いたControl実験で確認した。

不織布からの溶出液を150 μ l取り、これにウシ膵臓DNase free RNase (Roche社、商品番号1,119,915)を0.375 μ g/0.75 μ l加えた(終濃度2.5 μ g/ml)。ControlはRNase溶液の代わりにTE Bufferを加えて、以下同様に処理した。37 $^{\circ}$ Cで30分incubation後、氷冷してTE Bufferで40倍に希釈し、この100 μ lを取ってOliGreenで定量した。RNase未処理の核酸量は75.3 μ gであったが、RNase処理すると10.0 μ gに減少した。従って、核酸溶液にはDNAが約10 μ gとRNAが約65 μ g含まれていたことになり、不織布によりDNAもRNAも精製可能であることが示された。

10

[実施例25] 検体の加熱処理

喀痰は、ボランティアから採取し、6名分の試料を混合して、0.2mlずつエッペンドルフチューブに分注して、-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。また、大腸菌DH5 (TOYOBO)のグリセロールストックから、プラスチック製ディスポーザブル白金耳でLB培地 (Tryptone Peptone (DIFCO) 1g; Yeast Extract (DIFCO) 0.5g; NaCl 1g; 1N NaOH 200 μ l; 蒸留水 100ml)に植菌した。この液体を、37 $^{\circ}$ C、16時間培養して、 $A_{600} = 3.5$ の培養液を得た。培養液中の大腸菌濃度は、吸光度から約 1.4×10^{10} 個/mlと見積もられた。この培養液を用いて、 2×10^6 個/ml、 2×10^5 個/ml、 2×10^4 個/mlの菌体懸濁液を調製した。先の分注した喀痰試料を溶解し、その容器に、この懸濁液を50 μ lずつ加え、大腸菌添加喀痰試料とした。

20

不織布は旭化成(株)の製品A040C01を使用した。不織布を直径12mmの円盤状に切断して、それを4枚重ねてフィルターホルダー (SWINNEX、MILLIPORE)にセットし、フィルターホルダーの上流には10mlの注射筒、下流には吸引ポンプを設置してフィルターホルダーに接続した。最初に3mlのDigestion Buffer (10mM Tris pH8; 100mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS)で不織布を洗浄した。

30

大腸菌添加喀痰試料に、 $2 \times$ Digestion Buffer (20mM Tris pH8; 200mM NaCl; 50mM EDTA; 1% SDS)を0.25mlを加え、98 $^{\circ}$ Cで1分間処理を行った。冷却後、Proteinase K (PCR-Grade, Roche)を0.05mgを加えて、これを37 $^{\circ}$ Cの水浴上で時々攪拌しながら5分処理した。この大腸菌添加喀痰試料抽出液を不織布にかけて吸引濾過した。次いで、吸引しながら8mlのDigestion Bufferを流してフィルターを洗浄した。最後に、3mlの1M NaClを含むPBS/1mM EDTA、3mlのTE Buffer (10mM Tris pH8; 1mM EDTA)を流して不織布を洗浄した。

その後、フィルターホルダーから不織布4枚を取り外して、一番上流(入り口)側の不織布を取り出しエッペンドルフチューブに入れた。これに0.2mlのTE Buffer (10mM Tris pH8; 1mM EDTA)を添加し、95 $^{\circ}$ Cで20分間処理して溶出操作を行った。この溶出液を用いてPCR反応により、大腸菌およびヒト由来のDNAの検出を行った。

40

まず、溶出液中の大腸菌DNAの検出は以下の方法で行った。PCRのプライマーに、大腸菌のProteinase K蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列1283番目のgから1302番目のaまでの配列(配列番号5)と塩基配列2229番目のtから2248番目のgまでの相補鎖の配列(配列番号6)を使用し、Invitrogen社に依頼して化学的に合成した。溶出液10 μ lをPCR反応液に加え、全量を25 μ lとした(最終濃度10mM Tris/HCl pH8.3; 50mM KCl; 1.5mM M

50

g C l₂ ; 0 . 2 m M d A T P ; 0 . 2 m M d G T P ; 0 . 2 m M d C T P ; 0 . 2 m M d T T P ; 1 . 2 5 U T a q (S h i g m a) ; 上 記 プ ラ イ マ ー 各 0 . 5 μ M) 。 こ れ を D N A T h e r m a l C y c l e r (P e r k i n E l m e r) で 9 4 2 分、 1 c y c l e ; 9 4 3 0 秒、 5 5 3 0 秒、 7 2 1 分、 4 0 c y c l e s ; 7 2 5 分 反 応 さ せ た。

また、溶出液中のヒト由来DNAの検出は以下の方法で行った。PCRのプライマーに、Human HGFR (hepatocyte Growth Factor receptor) 蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列483番目のcから502番目のcまでの配列(配列番号7)と塩基配列1039番目のcから1058番目のcまでの相補鎖の配列(配列番号8)を使用し、Invitrogen社に依頼して化学的に合成した。溶出液10μlをPCR反応液に加え、全量を25μlとした。(最終濃度10mM Tris/HCl pH8.3.; 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.2mM dATP; 0.2mM dGTP; 0.2mM dCTP; 0.2mM dTTP; 1.25U Taq (Sigma); 上記プライマー各0.5μM)。これをDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)で94 2分、1 cycle; 94 30秒、60 30秒、72 1分、40 cycles; 72 5分 反応させた。それぞれのPCRを終了後、各反応液10μlに10x Loading Bufferを1.5μl加えてよく混和し、全量を1.5%アガロース(GibcoBRL)電気泳動にかけた。Mupidミニゲル泳動槽(Advance)で100V、30分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。結果を図34, 35に示す。図34からわかるように、大腸菌添加喀痰試料において、試料中に10³個相当以上の大腸菌が存在すれば、大腸菌由来の966bpのPCR産物が増幅されている。図35に示したようにヒト由来577bpのPCR産物は、大腸菌の添加量にかかわらず検出されている。従って、本実施例に示した加熱による試料の処理と、それに続く不織布による核酸精製によって試料中に存在する菌DNAが抽出精製され、その検出が可能であることが確認された。

[実施例 2 6] 検体の還元剤処理

実施例25に従って調製した大腸菌添加喀痰試料に、2x Digestion Buffer (20mM Tris pH8; 200mM NaCl; 50mM EDTA; 1% SDS)を0.25mlを加え、更に10% dithiothreitol溶液を5μl添加し、室温で攪拌しながら2分間の処理を行った。その後、Proteinase K (PCR-Grade, Roche)を0.05mgを加えて、これを37℃の水浴上で時々攪拌しながら5分処理した。この大腸菌添加喀痰試料抽出液を不織布A040C01にかけて吸引濾過した。次いで、吸引しながら8mlのDigestion Bufferを流してフィルターを洗浄した。最後に、3mlの1M NaClを含むPBS/1mM EDTA、3mlのTE Buffer (10mM Tris pH8; 1mM EDTA)を流して不織布を洗浄した。

その後、フィルターホルダーから不織布4枚を取り外して、一番上流(入り口)側の不織布を取り出しエッペンドルフチューブに入れた。これに0.2mlのTE Buffer (10mM Tris pH8; 1mM EDTA)を添加し、95℃で20分間処理して溶出操作を行った。この溶出液を用いて、実施例25と同様のPCR反応により大腸菌およびヒト由来のDNAの検出を行った。結果を図36, 37に示す。図36から明らかのように、大腸菌添加喀痰試料において、試料中に10³個相当以上の大腸菌が存在すれば、大腸菌由来の966bpのPCR産物が増幅されている。また、図37に示したようにヒト由来577bpのPCR産物は、大腸菌の添加量にかかわらず検出されている。従って、本実施例に示した還元剤による試料の処理と、それに続く不織布による核酸精製によって試料中に存在する菌DNAが抽出精製され、その検出が可能であることが確認された。

[比較例 3] 加熱処理または還元剤処理を行わずに大腸菌添加喀痰試料から核酸を精製

する場合

実施例25と同様にして、大腸菌を添加した喀痰試料、および核酸吸着フィルターを作製した。大腸菌添加喀痰試料に、2x Digestion Buffer (20 mM Tris pH 8; 200 mM NaCl; 50 mM EDTA; 1% SDS)を0.25 mlを加えた後、実施例25で行った加熱処理、あるいは実施例26で行った還元剤による処理を行わずに、Proteinase K (PCR-Grade, Roche)を0.05 mgを加えて、これを37 °Cの水浴上で時々攪拌しながら5分処理した。この時、実施例25あるいは実施例26とは異なり、喀痰は透明で均一な状態に溶けることなく、不均一に塊が残って濁っている状態であった。

次に、この大腸菌添加喀痰試料抽出液を不織布にかけて吸引濾過しようとした。この時、溶けずに残っていた喀痰成分の塊が、不織布表面上にはりついてしまい、吸引濾過が困難であった。さらに吸引を続けると、液体部分は吸引濾過できたが、不織布表面上にはりついた喀痰成分の塊を完全に濾過することはできず、以降の操作を継続することが困難であった。

[実施例27] 不織布上での核酸伸長反応

不織布上に吸着したゲノムDNAをテンプレートして、不織布上で核酸伸長反応が起きるかどうかを調べた。DNAのDIG標識はPCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)とPCR DIG Labeling Mix (Roche)を使い、ハイブリダイゼーションと検出にはDIGハイプライムDNAラベリング/検出キット (Roche)を用いた。

0.25 mlの凍結保存血 (白血球数 1.15×10^6 個) を実施例11と同様の方法で処理して、ヒトの核酸を吸着させたA040C01/HM 3コートの不織布を用意した。3 mlのTE Bufferを流して不織布を洗浄した後、この不織布を0.2 mlのDIG Easy Hybバッファー (Roche)を含む24穴プレートに入れて42 °Cにおいて2時間置いた。これに、日本バイオサービス社に依頼して化学的に合成した配列番号9のDNAプライマーbACT1と配列番号10のDNAプライマーbACT2を添加し、42 °Cにて18時間置いた。適当な洗浄液で洗浄して余分なプライマーを取り除いた後、酵素反応液 (最終濃度1.5 mM MgCl₂を含むPCRバッファー; 0.2 mM dATP; 0.2 mM dGTP; 0.2 mM dCTP; 0.19 mM dTTP; 0.01 mM digoxigenin-11-dUTP; 5 U Klenow Large Fragment (BioLabs)) を200 µl添加し、37 °Cにて18時間置いた。適当な洗浄液にて洗浄を行い、アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体を反応させ、NBT/BCIP基質にて核酸伸長反応中に取り込まれたDIGを検出した。その結果を図38に示す。添加したプライマー量に依存して検出できるシグナルが増加しており、不織布上でプライマー依存的に核酸伸長反応が起こっていることが示された。

[実施例28] LAMP法による不織布上での核酸の増幅および検出

不織布上に吸着したゲノムDNAをテンプレートにして、LAMP法による核酸の増幅が可能かどうかを調べた。LAMP法はLoopamp牛胚性判別キット (栄研化学) を使用した。まず以下の方法にてウシゲノムDNAを、不織布として旭化成 (株) の製品A040C01に吸着させた。0.25 mlのウシ保存血液 ((株) 日本バイオテスト研究所) に、37 °Cに加温した2x Digestion Buffer (20 mM Tris pH 8; 200 mM NaCl; 50 mM EDTA; 1% SDS)を0.25 ml加え、更にProteinase K (PCR-Grade, Roche)を0.05 µg加えて、これを37 °Cの水浴で時々加温しながらvortexで攪拌して完全に溶解した。室温で5分放置後、この血液抽出液を不織布にかけて直ちに吸引濾過した。それから、吸引しながら8 mlのDigestion Bufferを流してフィルターを洗浄した。次に、3 mlの1 M NaClを含むPBS / 1 mM EDTA、3 mlのTE Buffer (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA) を流して不織布を洗浄した。この不織布を3 mm四方の大きさに裁断し、これを0.5 mlマイクロチューブに入れた。これにLoopampのReaction Mix II 40 µlとBst D

10

20

30

40

50

NA polymerase 1 μ l を添加し、63 にてインキュベーションを行った。1 時間後増幅溶液の濁度を調べ、また、一部をアガロース電気泳動にかけた。この結果は、LAMP法により不織布に吸着されたウシゲノムDNAをテンプレートにした核酸増幅が起こることを示している(図39)。

[実施例29] 溶出ゲノムDNAのハイブリダイゼーション

実施例9および11にて示した溶出法にて得られたゲノムDNAがハイブリダイゼーションに使用可能かどうかを調べた。まず、ヒトゲノムDNA (Clontech) 1 μ g に Biotin Chem-link (Roche) を 1 μ l と全量が 20 μ l となるように水を添加し、85 にて1時間インキュベーションを行った後、5 μ l の反応停止液を添加し、ピオチン標識ゲノムDNA溶液を得た。次に、各溶出法にて得たゲノムDNAをナイロンフィルターHybond N+ (Amersham-Pharmacia) にドットし、アルカリ液による変性とUVクロスリンクによる固定化を行った。これにハイブリダイゼーション溶液Easy Hyb (Roche) を添加し、42 にて1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、先のピオチン標識ゲノムDNAを添加し42 にて18時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄を行った後、アルカリフォスファターゼ標識アビジンを反応させ、次にアルカリフォスファターゼ基質CSPD (Roche) を添加して反応させ、適当な時間X線フィルムに露光してシグナルの検出を行った。図40及び図41に示した通り、TE Buffer、アルカリ、過酸化水素のいずれの溶出法で得られたゲノムDNAもハイブリダイゼーションに使用可能であった。

10

20

30

[実施例30] 溶出ゲノムDNAをプローブとしたハイブリダイゼーション

実施例9および11にて示した溶出法にて得られたゲノムDNAがハイブリダイゼーション用のプローブとして使用可能かどうかを調べた。まず、不織布から溶出させたヒトゲノムDNA各1 μ g に Biotin Chem-link (Roche) を 1 μ l と全量が 20 μ l となるように水を添加し、85 にて1時間インキュベーションを行った後、5 μ l の反応停止液を添加し、ピオチン標識溶出ゲノムDNA溶液を得た。次に、ヒトゲノムDNA (Clontech) と DNA (Takara) をナイロンフィルターHybond N+ (Amersham-Pharmacia) にドットし、アルカリ液による変性とUVクロスリンクによる固定化を行った。これにハイブリダイゼーション溶液Easy Hyb (Roche) を添加し、42 にて1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、先のピオチン標識した各種溶出法のゲノムDNAを添加し42 にて18時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄を行った後、アルカリフォスファターゼ標識アビジンを反応させ、次にアルカリフォスファターゼ基質CSPD (Roche) を添加して反応させ、適当な時間X線フィルムに露光して、シグナルの検出を行った。結果を図42に示す。TE Buffer、アルカリ、過酸化水素のいずれの溶出法で得られたゲノムDNAもハイブリダイゼーション用のプローブとして使用可能であった。

[実施例31] 界面活性剤による核酸溶出

0.25 ml の凍結保存血(白血球数 1.16×10^6 個)を実施例11と同様の方法で処理して、ヒトの核酸を吸着させたA040C01の不織布を用意した。5 ml のTE Bufferを流して不織布を洗浄した後、不織布4枚をフィルターホルダーから取り外して、1.5 ml のエッペンドルフチューブに入れた。これに実施例19で使用した界面活性剤の中から、両性界面活性剤のCHAPS、CHAPSO、非イオン性界面活性剤のTriton X-114、Triton X-100、Nissan Dispanol TOC、Igepal CA630、Nissan Nonion NS 208.5を選んで、これらの0.5%水溶液を0.5 ml 加えた。更にTE Bufferを0.5 ml 加えた系を用意した。これらを80 で20分間加熱して、不織布に吸着された核酸を溶出した。不織布から溶出したDNAの量は、実施例9と同様にOligreen登録商標 ssDNA定量キットを用いて、溶出液をTE Bufferで10倍に希釈して測定した。結果を図43に示す。TE Buffer中で95 20分間加熱した時の溶出量を100%として表示した。TE Bufferを用いた場合と比較すると、いずれの界面活性剤も核酸溶出を促進した。

40

50

溶出した核酸を電気泳動した結果を図44に示す。溶出した核酸をNucleoSpinカラムで濃縮して、その10 μ lを0.7%アガロースゲル電気泳動にかけた。界面活性剤の存在下で溶出された核酸はTE Bufferで溶出した核酸と同じような分子量を持っていた。次に、界面活性剤の存在下で溶出した精製DNAがPCRの鋳型と成り得るかを確認した。PCRとその解析は実施例2と同様に行ったが、プライマーはClontech社のGlyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) Control Amplimer Set (カタログ番号5406-3)を使用した。結果を図45に示す。界面活性剤で溶出した精製DNAからも983bpのPCR産物が増幅されており、PCRの鋳型として使用可能であることが示された。

10

[参考例3] 界面活性剤のPCRへの影響

陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、及び非イオン性界面活性剤についてPCRへの影響を調べた。

PCRのプライマーとして、配列番号11記載の合成DNAを5'プライマー、配列番号12記載の合成DNAを3'プライマーとし、それぞれ最終濃度が0.4 μ Mとなるように、ヒトゲノムDNA (Clontech) 5ngを含むPCR反応液(最終濃度10mM Tris HCl pH8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.2mM dATP; 0.2mM dGTP; 0.2mM dCTP; 0.2mM dTTP; 0.5U AmpliTaq (Applied Biosystems))に加えた。

20

これに、実施例19で使用した陰イオン性界面活性剤のSDS、両性界面活性剤のCHAPS、CHAPSO、非イオン性界面活性剤のTriton X-114、Triton X-100、Nissan Dispanol TOC、Igepal CA630またはNissan Nonion NS 208.5をそれぞれ最終濃度が1%、0.5%、0.1%となるように添加し、PCRの反応液を20 μ lとした。

これをDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)で94 3分 1 cycle; 94 30秒、60 1分、72 3分、30 cycles; 72 7分 反応させた。PCR終了後、反応液5 μ lに10x Loading Bufferを1 μ l加えてよく混和し、全量を1.5%アガロース電気泳動にかけた。50V、45分間泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してBioImage Gel Print 2000i/VGAで撮影した。結果を図46に示す。溶出時に用いた濃度の界面活性剤のうちSDS以外は、PCRに影響しないことが示された。一方SDSは、0.1%でもPCRに影響を及ぼすことが示された。

30

[実施例32] 不織布に吸着させた核酸のビオチン化

不織布上に吸着した核酸を直接標識することが可能かどうか調べた。0.25mlの凍結保存血(白血球数 1.16×10^6 個)を実施例11と同様の方法で処理して、ヒトの核酸を吸着させたA040C01の不織布を用意した。これを4等分に切断し、0.5mlマイクロチューブに入れ、95 μ lの水と5 μ lのBiotin Chem-Link (Roche)に加え、85 $^{\circ}$ Cにて1時間置いてビオチン化を行った。上清を別のチューブに移し、95 $^{\circ}$ Cにて5分間置いて核酸を一本鎖化した後氷冷してプローブ1とした。Biotin Chem-Linkを反応させた前述の不織布を100 μ lのTE Bufferを入れたチューブに移して95 $^{\circ}$ Cにて20分間置き、不織布から核酸溶出と核酸の一本鎖化を同時に行った。その後これを氷冷し、プローブ2とした。100ngから0.1ngのヒトゲノムDNA (Clontech)とLambda DNA (Takara)とをHybond N+膜 (Amsham-Pharmacia)にドットし、アルカリ変性とUVクロスリンクによる固定化を行った。これを適当な密閉容器に移しEasy Hyb (Roche)を加えた。42 $^{\circ}$ Cにて1時間置いた後、1mlのEasy Hybに対し20 μ lのプローブ1またはプローブ2を添加し、引き続き42 $^{\circ}$ Cにて18時間置いてプローブをハイブリダイズさせた。これを2XSSC、0.1%SDSを使って室温5分間の洗浄を2回行った後、0.1XSSC、0.1%SDSを使って68 $^{\circ}$ C 15分間

40

50

の洗浄を2回行った。次に、洗浄 Buffer (最終濃度 0.1 M マレイン酸 ; 0.15 M NaCl ; 0.3% Tween 20 pH 7.5) にて1分間平衡化を行った後、マレイン酸 Buffer (最終濃度 0.1 M マレイン酸 ; 0.15 M NaCl pH 7.5) で10倍に希釈したプロッキング溶液 (Roche) に1時間浸した。5 ml の液量に対し 1 μ l のアルカリホスファターゼ標識アビジン (CALBIOCHEM) を添加し、ゆっくりと浸透させながら室温にて30分間置いた。洗浄 Buffer を用いて室温にて15分間の洗浄を2回行い、次にアルカリホスファターゼ Buffer (最終濃度 0.1 M Tris pH 9.5 ; 0.1 M NaCl ; 50 mM MgCl₂) にて2分間平衡化を行い、これに2/100容の NBT / BCIP (Roche) を添加して発色反応を行った。この結果を図47に示す。プローブ1、プローブ2ともに Hybond N+ 膜上にドットされたヒトゲノム DNA にハイブリダイズしており、不織布上にトラップされた核酸がビオチン標識されていることが示された。

10

産業上の利用の可能性

本発明の方法によれば、白血球や細菌などの細胞を含む試料から核酸を容易に精製することが可能である。また本発明を用いれば、核酸を吸着したフィルターから迅速に核酸を溶出することができる。最後に本発明の方法によれば、不織布を用いて白血球や細菌などの細胞を含む試料から核酸を迅速に精製し、更にその不織布上で核酸増幅や塩基配列検出などを直接行うことが可能である。これにより、試料の処理から核酸増幅、または塩基配列検出に至る工程の簡素化が可能となり、短時間で処理できるようになった。

配列表フリーテキスト

20

配列番号1 : 合成 DNA

配列番号2 : 合成 DNA

配列番号3 : 合成 DNA

配列番号4 : 合成 DNA

配列番号5 : 合成 DNA

配列番号6 : 合成 DNA

配列番号7 : 合成 DNA

配列番号8 : 合成 DNA

配列番号9 : 合成 DNA

配列番号10 : 合成 DNA

配列番号11 : 合成 DNA

配列番号12 : 合成 DNA

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA

<120> A method of purification and detection of nucleic acids using
nonwoven fabric

10

<130> PH-1593-PCT

<150> JP 2001-208514

<151> 2001-07-09

20

<150> JP 2001-364878

<151> 2001-11-29

<160> 12

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Synthetic DNA

40

<400> 1

caacgcagaa gtacgtaaag a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

10

<400> 2

tctttaccgt caacaacgat g 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Synthetic DNA

30

<400> 3

gcgacgtcca agaagccttg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ggcagacccc tccttattgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gtaggcgtgg aacagatcaa 20

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

cttgaagagt gcatgctgga 20

40

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

ctccccacag atagaagagc 20

10

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

gcagaatctg gcttgctttg 20

30

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Synthetic DNA

<400> 9

ctggcatcgt gatggactcc 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

10

<400> 10

cataactcctg cttgctgatc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> Synthetic DNA

30

<400> 11

tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

accacagtcc atgcatcac 20

【図面の簡単な説明】

10

図1は、血液から精製した核酸の0.7% アガロース電気泳動

Lane 1 1 kb DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2 Marker 7GT (Nippon Gene); Lane 3 A040C01/HM 3コートで精製した核酸; Lane 4 A040C01; Lane 5 P020A (EL); Lane 6 P020C; Lane 7 P090D; Lane 8 N05070; Lane 9 E05070

図2は、PCR増幅産物の2% アガロース電気泳動

血液から精製した核酸を鋳型としてG3PDH遺伝子のPCRを行った。Lane 1 100 bp DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2 ネガティブコントロール; Lane 3 ポジティブコントロール; Lane 4 A040C01/HM 3コート; Lane 5 A040C01; Lane 6 P020A (EL); Lane 7 P020C; Lane 8 P090D; Lane 9 N05070; Lane 10 E05070

20

図3は、大腸菌から精製した核酸の0.7% アガロース電気泳動

Lane 1 1 kb DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2 Marker 7GT (Nippon Gene); Lane 3 A040C01/HM 3コートで精製した核酸

図4は、PCR増幅産物の3% アガロース電気泳動

大腸菌から精製した核酸を鋳型としてリボゾーム蛋白L25遺伝子のPCRを行った。Lane 1 BioMarker Low (BioVentures); Lane 2 ネガティブコントロール; Lane 3 ポジティブコントロール; Lane 4 A040C01/HM 3コートで精製した核酸

30

図5は、血液の処理時間

室温、+Proteinase K; 室温、-Proteinase K; 50、+Proteinase K; 50、-Proteinase K

図6は、不織布の白血球吸着率とDNA回収量

図7は、アルカリ条件下でのDNA溶出

TE Buffer、0.2 N NaOH、または0.05 N NaOHに核酸を吸着させた不織布を浸し、95 で5分から20分保温して溶出されるDNA量を測定した。

TE Buffer; 0.2 N NaOH; 0.05 N NaOH

40

図8は、アルカリ条件下で溶出した核酸の0.7% アガロース電気泳動

Lane 1 1 kb DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2 Marker 7GT (Nippon Gene); Lane 3 TE Buffer、95 20分; Lane 4 0.2 N NaOH、95 5分; Lane 5 0.2 N NaOH、95 10分; Lane 6 0.2 N NaOH、95 20分; Lane 7 0.05 N NaOH、95 5分; Lane 8 0.05 N NaOH、95 10分; Lane 9 0.05 N NaOH、95 20分

図9は、PCR増幅産物の2% アガロース電気泳動

アルカリ条件下で溶出した核酸を鋳型としてG3PDH遺伝子のPCRを行った。

Lane 1 100 bp DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2

50

ネガティブコントロール； Lane 3 ポジティブコントロール； Lane 4 TE Buffer、95 20分； Lane 5 0.2N NaOH、95 5分； Lane 6 0.2N NaOH、95 10分； Lane 7 0.2N NaOH、95 20分； Lane 8 0.05N NaOH、95 5分； Lane 9 0.05N NaOH、95 10分； Lane 10 0.05N NaOH、95 20分

図10は、アルカリ溶出に対する温度の効果

□ TE Buffer； ■ 0.2N NaOH； ▨ 0.05N NaOH

図11は、酸性条件下で溶出した核酸の0.7% アガロース電気泳動

Lane 1 1kb DNA ladder (GibcoBRL)； Lane 2 Marker 7GT (Nippon Gene)； Lane 3 TE Buffer、95 20分； Lane 4 10mM Citrate (pH 4.5) / 1mM EDTA、95 10分

図12は、PCR増幅産物の2% アガロース電気泳動

酸性条件下で溶出した核酸を鋳型としてG3PDH遺伝子のPCRを行った。Lane 1 100bp DNA ladder (GibcoBRL)； Lane 2 ネガティブコントロール； Lane 3 ポジティブコントロール； Lane 4 TE Buffer、95 20分； Lane 5 10mM Citrate (pH 4.5) / 1mM EDTA、95 10分

図13は、アルカリ溶出のDNAプローブへの影響

DIG標識DNAプローブを0.05N NaOHにて95にて5分間処理(スポット1、2)と未処理(3、4)。固定化したLambda DNA量は、10ng(スポット1、3)と1ng(スポット2、4)。

図14は、過酸化水素にて溶出した核酸の0.7% アガロース電気泳動0.1mM CuCl₂を含む3% 過酸化水素にて溶出した。

Lane 1 1kb DNA ladder (GibcoBRL)； Lane 2 過酸化水素処理 室温1分； Lane 3 過酸化水素処理 室温2分； Lane 4 過酸化水素処理 室温3分； Lane 5 過酸化水素処理 室温5分

図15は、過酸化水素溶出の核酸を鋳型にしたPCR増幅産物の2% アガロース電気泳動

0.1mM CuCl₂を含む3% 過酸化水素にて溶出した核酸を鋳型としたヒトG3PDH部分配列のPCRによる増幅。Lane 1 100bp DNA ladder (GibcoBRL)； Lane 2 過酸化水素処理 室温1分； Lane 3 過酸化水素処理 室温2分； Lane 4 過酸化水素処理 室温3分； Lane 5 過酸化水素処理 室温5分

図16は、還元糖と金属イオンにて溶出した核酸の0.7% アガロース電気泳動

100mM D-ribose 5-phosphateと0.1mM CuCl₂を含む活性酸素液にて溶出させた。

Lane 1 1kb DNA ladder (GibcoBRL)； Lane 2 50 1分； Lane 3 50 3分； Lane 4 50 5分； Lane 5 50 10分； Lane 6 50 30分； Lane 7 TE Bufferによる溶出 95 20分(コントロール)

図17は、還元糖にて溶出した核酸を鋳型にしたPCR増幅産物の2% アガロース電気泳動

100mM D-ribose 5-phosphateと0.1mM CuCl₂を含む活性酸素液にて溶出させた核酸を鋳型としたヒトG3PDH部分配列のPCRによる増幅。Lane 1 100bp DNA ladder (GibcoBRL)； Lane 2 50 1分； Lane 3 50 3分； Lane 4 50 5分； Lane 5 100bp DNA ladder； Lane 6 50 10分； Lane 50

7 50 30分

図18は、不織布から制限酵素にて溶出した核酸の0.7% アガロース電気泳動

Lane 1 1 kb DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2 室温
5分間; Lane 3 室温 5分間(カラム精製); Lane 4 室温 10分間
; Lane 5 室温 10分間(カラム精製); Lane 6 室温 30分間; L
ane 7 室温 30分間(カラム精製); Lane 8 37 5分間; Lane
9 37 5分間(カラム精製); Lane 10 37 10分間; Lane 1
1 37 10分間(カラム精製); Lane 12 37 30分間; Lane
13 37 30分間(カラム精製); Lane 14 1 kb DNA ladd
er (GibcoBRL);

10

図19は、活性酸素にて処理のハイブリダイゼーションへの影響

最終濃度50 mM D-ribose 5-phosphateと25 μM CuCl₂に
て処理したDIG標識DNAプローブとナロンメンブレンに固定化したDNAとのハイブ
リダイゼーション。コントロールとして、活性酸素未処理とTE Buffer中で95
にて20分間処理したDIG標識DNAプローブを用いた。

図20は、不織布に吸着されたヒトゲノムDNAを鋳型にしたPCR

血液から抽出した核酸を不織布に吸着させてG3PDH遺伝子のPCRを行った。

Lane 1 100 bp DNA ladder (GibcoBRL); Lane 2
ネガティブコントロール; Lane 3 ポジティブコントロール; Lane 4 A0
40C01/HM 3コート; Lane 5 A040C01; Lane 6 P020A
(EL); Lane 7 P090D; Lane 8 N05070; Lane 9 E
05070

20

図21は、不織布に吸着された大腸菌ゲノムDNAを鋳型にしたPCR

大腸菌から抽出した核酸をA040C01/HM 3コートに吸着させてリボソーム蛋白
L25遺伝子のPCRを行った。Lane 1 BioMarker Low (BioVe
ntures); Lane 2 ネガティブコントロール; Lane 3 ポジティブコ
ントロール; Lane 4 A040C01/HM 3コート

図22は、不織布に吸着されたヒトゲノムDNAの検出

0.25 mlの血液から抽出したヒトゲノムを吸着させた2種類の不織布A040C01
/HM 3コート、A040C01へのラジオアイソトープ標識DNAプローブのハイブ
リダイゼーション。1 μg Human Genomic DNA (hgDNA)と1 μ
g Lambda DNA (DNA)を固定化したHybond N+ナイロンメンブ
レン(Amersham Pharmacia biotech)をコントロールとした
。凡例は、ヒトG3PDHプローブとLambda DNAプローブの混合比率を示す。
いずれも全放射活性が448,000 cpmとなるように混合した。

30

図23は、不織布に吸着された核酸の走査電子顕微鏡像

A:不織布P03050(対照)、B:血液中の核酸を吸着させた不織布P03050

図24は、細胞溶解液に使用する界面活性剤の検討

X-114 (Triton X-100)、TOC (Nissan Dispanol
TOC)、X-100 (Triton X-100)、CA630 (Igepal CA
630)、NS 208.5 (Nissan Nonion NS 208.5)、HP
C (Hexadecylpyridinium Chloride)、HPB (Hexa
decylpyridinium Bromide)、HTAC (Hexadecylt
rimethylammonium Chloride)、HTAB (Hexadecy
ltrimethylammonium Bromide)、CHAPS (3-[(3-
Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propa
nesulfonate)、CHAPSO (3-[(3-Cholamidopropy
l)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesu
lfonate)、SDS (Sodium dodecyl sulfate)

40

図25は、精製ゲノムDNA吸着のNaCl濃度依存性

50

A 0 4 0 C 0 1 ; A 0 6 6 A ; A 0 4 0 B

図 2 6 は、精製ゲノム DNA 吸着の $MgCl_2$ 濃度依存性

A 0 4 0 C 0 1 ; A 0 6 6 A ; A 0 4 0 B ; E 0 1 0 3 0

図 2 7 は、精製ゲノム DNA 吸着の HPO_4^{2-} 濃度依存性

A 0 4 0 C 0 1 ; A 0 6 6 A ; A 0 4 0 B ; A 0 4 0 C 0 1 / H
M - 3

図 2 8 は、精製ゲノム DNA 吸着の $(NH_4)_2SO_4$ 濃度依存性

A 0 4 0 C 0 1 ; A 0 6 6 A ; E 0 1 0 3 0

図 2 9 は、精製ゲノム DNA 吸着に対するエタノールの効果

10 mM リン酸 Buffer (pH 7.4) にエタノールを添加して、精製ゲノム DNA 吸着に対する影響を調べた。 10

■ 10 mM リン酸 (pH 7.4) ; ▣ 10 mM リン酸 (pH 7.4) /

10% エタノール ; ▤ 10 mM リン酸 (pH 7.4) / 20% エタノ

ール ; ▥ 10 mM リン酸 (pH 7.4) / 40% エタノール

図 3 0 は、精製ゲノム DNA の振盪吸着 1

10 mM Tris (pH 8) / 1 mM EDTA / 50 mM NaCl ;

▣ 10 mM Tris (pH 8) / 2 mM $MgCl_2$;

▤ 50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7.4)

20

図 3 1 は、精製ゲノム DNA の振盪吸着 2

10 mM リン酸 (pH 7.4) ; 10 mM リン酸 (pH 7.4) / 0.2

M 硫酸アンモニウム ; 10 mM リン酸 (pH 7.4) / 0.5 M 硫酸アンモニウム ; 10 mM リン酸 (pH 7.4) / 1.0 M 硫酸アンモニウム

図 3 2 は、不織布のスクリーニング - DNA 回収量 -

検体は新鮮血を使用した。Gr 1 ~ Gr 5 は使用した血液の供血者が異なることを示す。

図 3 3 は、不織布のスクリーニング - DNA 純度 A_{260} / A_{280} -

図 3 1 と同一サンプルの吸光度比 A_{260} / A_{280} を測定した。 30

図 3 4 は、大腸菌添加喀痰からの核酸精製 1 - 加熱処理 -

実施例 2 7 の大腸菌由来核酸の検出結果。PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動で解析した。

Lane 1 DNA 分子量マーカー ; Lane 2 10^5 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物 ; Lane 3 10^4 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物 ; Lane 4 10^3 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物 ; Lane 5 大腸菌未添加の喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物

図 3 5 は、大腸菌添加喀痰からの核酸精製 2 - 加熱処理 -

実施例 2 7 のヒト由来核酸の検出結果。PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動で解析した。 40

Lane 1 DNA 分子量マーカー ; Lane 2 10^5 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物 ; Lane 3 10^4 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物 ; Lane 4 10^3 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物 ; Lane 5 大腸菌未添加の喀痰試料から得られた核酸抽出液の PCR 増幅産物

図 3 6 は、大腸菌添加喀痰からの核酸精製 1 - 還元剤処理 -

実施例 2 8 の大腸菌由来核酸の検出結果。PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動で解析した。

Lane 1 DNA 分子量マーカー ; Lane 2 10^5 個の大腸菌添加喀痰試料から 50

得られた核酸抽出液のPCR増幅産物； Lane 3 10^4 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物； Lane 4 10^3 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物； Lane 5 大腸菌未添加の喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物

図37は、大腸菌添加喀痰からの核酸精製2 -還元剤処理-

実施例28のヒト由来核酸の検出結果。PCR増幅後、アガロースゲル電気泳動で解析した。

Lane 1 DNA分子量マーカー； Lane 2 10^5 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物； Lane 3 10^4 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物； Lane 4 10^3 個の大腸菌添加喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物； Lane 5 大腸菌未添加の喀痰試料から得られた核酸抽出液のPCR増幅産物

10

図38は、不織布上での核酸伸長反応

Klenow Large Fragment 酵素反応溶液に2種のプライマーbACT1とbACT2とを各 $10\mu\text{g}$ 、 100ng 、 1ng 、 0ng ハイブリダイズさせて37にて伸長反応を起こさせた。

図39は、LAMP法による不織布上での核酸の増幅及び検出

Loopampにて増幅させたウシゲノムDNAの1%アガロースゲル電気泳動。Lane 1 分子量マーカー； Lane 2 テンプレートとしてヒトゲノムDNAを吸着させた不織布； Lane 3 テンプレートとしてウシゲノムDNAを吸着させた不織布； Lane 4 テンプレートとして不織布に吸着させたウシゲノムDNAをTE Buffer中で熱溶出させた上清； Lane 5 テンプレート無し； Lane 6 テンプレートとしてキット付属のコントロールウシゲノムDNA

20

図40は、不織布によって精製されたゲノムDNAのハイブリダイゼーション1

TE Buffer溶出法とアルカリ溶出法を検定した。不織布によって精製されたDNA溶液各 $1\mu\text{l}$ をHybond N+膜上にドットして、ハイブリダイゼーションのターゲットとして使用した。

図41は、不織布によって精製されたゲノムDNAのハイブリダイゼーション2

TE Buffer溶出法と過酸化水素溶出法を検定した。不織布によって精製されたDNA溶液各 $1\mu\text{l}$ をHybond N+膜上にドットして、ハイブリダイゼーションのターゲットとして使用した。

30

図42は、不織布によって精製されたゲノムDNAのハイブリダイゼーション3

不織布によって精製されたDNAを標識して、ハイブリダイゼーションのプロープとして使用し、TE Buffer溶出法、アルカリ溶出法、過酸化水素溶出法を検定した。

図43は、界面活性剤による核酸の溶出

0.5%の界面活性剤を含む水溶液またはTE Bufferを $500\mu\text{l}$ 加えて8020分間加熱し、不織布に吸着した核酸を溶出した。TE Buffer中で9520分間加熱した時の核酸溶出量を100%とした。

図44は、界面活性剤で溶出した核酸の電気泳動

図43の溶出サンプルをNucleoSpinカラムで濃縮精製して0.7%アガロースゲル電気泳動にかけた。

40

図45は、界面活性剤で溶出した核酸のPCR増幅産物の電気泳動

図43の溶出サンプルを鋳型として、G3PDH遺伝子のPCRを行った。

図46は、PCR産物の電気泳動

ゲノム溶出に使用した界面活性剤をPCR反応系に添加し、G3PDH遺伝子のPCRを行った。DNAMakerとして1kbラダー(GIBCO BRL)を使用した。

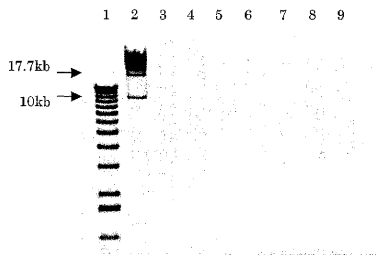
図47は、Biotin Chem-Link標識核酸プローブによるハイブリダイゼーション

ヒトゲノムDNAまたはLambda DNAをドットした膜にBiotin Chem-Link標識核酸プローブ1または2をハイブリダイズさせた。

50

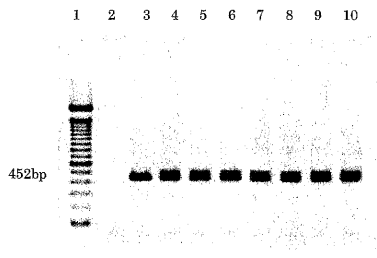
【 図 1 】

図 1



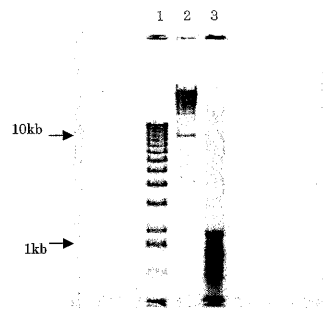
【 図 2 】

図 2



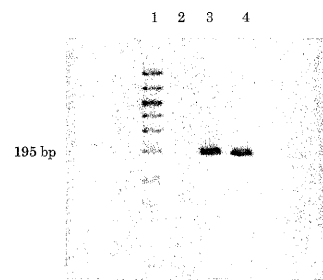
【 図 3 】

図 3



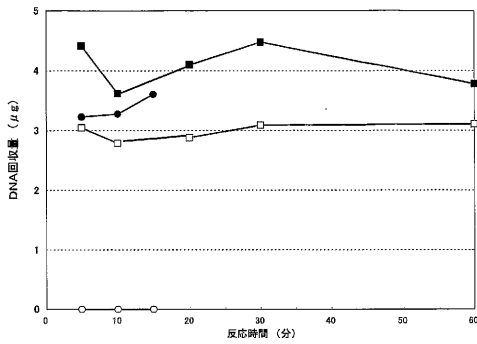
【 図 4 】

図 4



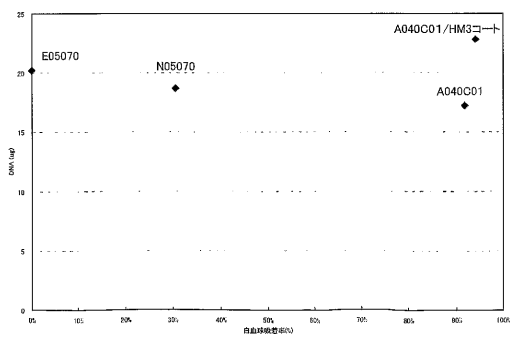
【 図 5 】

図 5



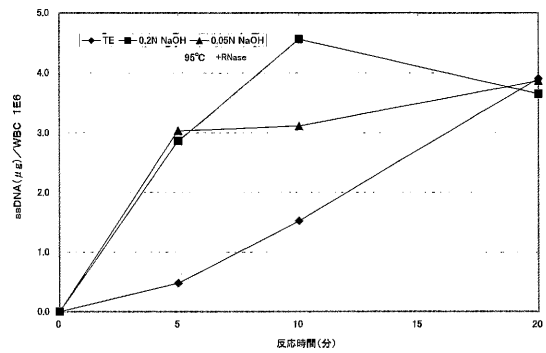
【 図 6 】

図 6



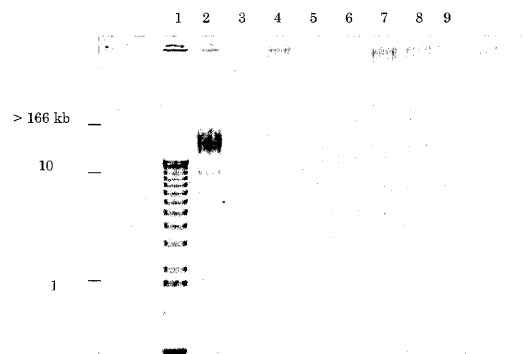
【 図 7 】

図 7

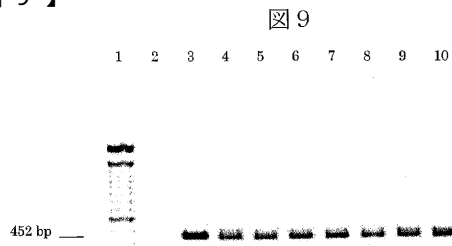


【 図 8 】

図 8



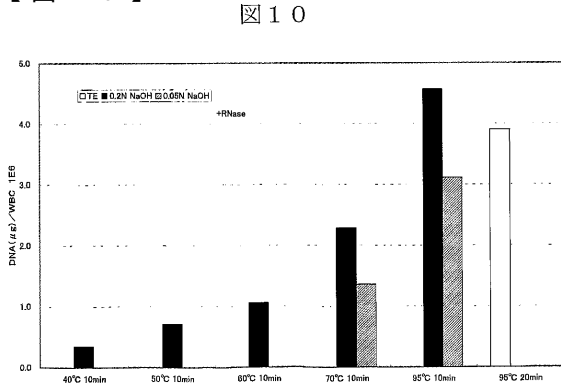
【 図 9 】



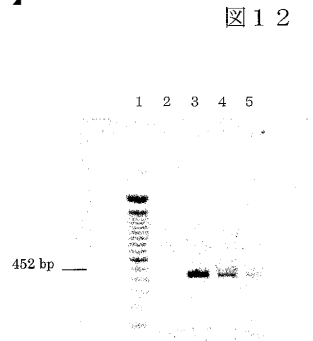
【 図 1 1 】



【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



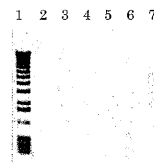
【 図 1 3 】

図 1 3



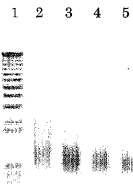
【 図 1 6 】

図 1 6



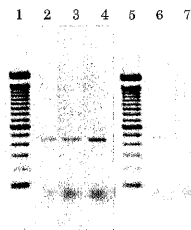
【 図 1 4 】

図 1 4



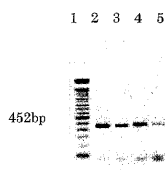
【 図 1 7 】

図 1 7



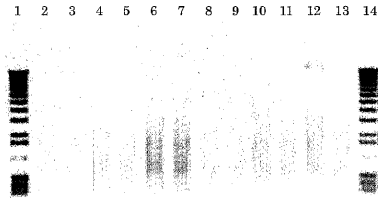
【 図 1 5 】

図 1 5



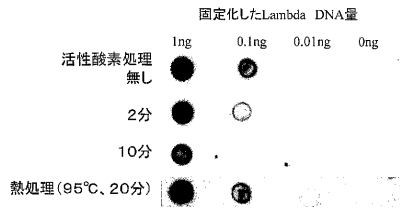
【 図 1 8 】

図 1 8



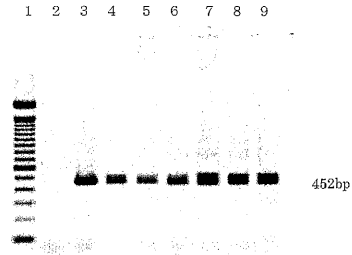
【 図 1 9 】

図 1 9



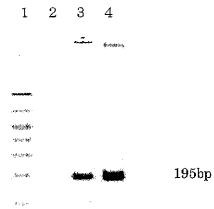
【 図 2 0 】

図 2 0



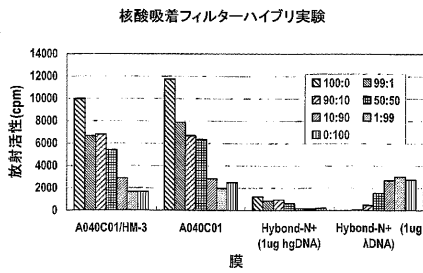
【 図 2 1 】

図 2 1



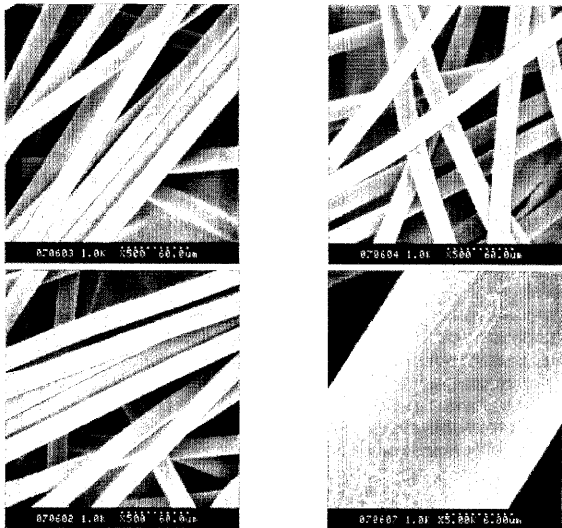
【 図 2 2 】

図 2 2



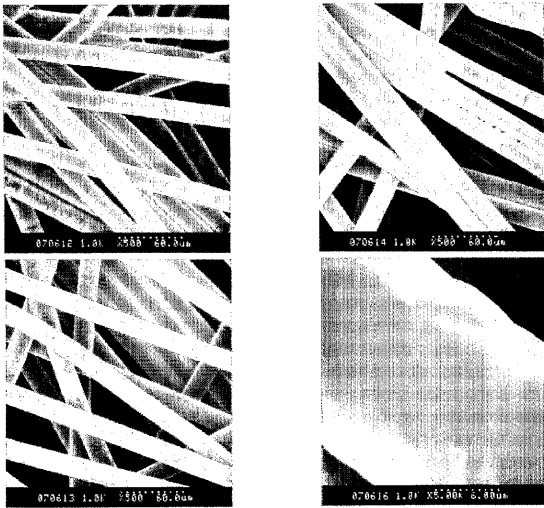
【 図 2 3 A 】

図 2 3 A



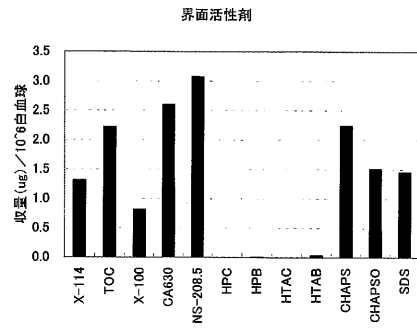
【 図 2 3 B 】

図 2 3 B



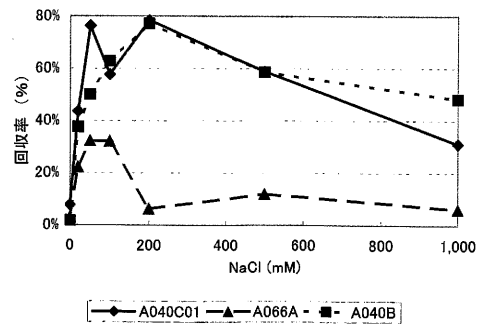
【 図 2 4 】

図 2 4



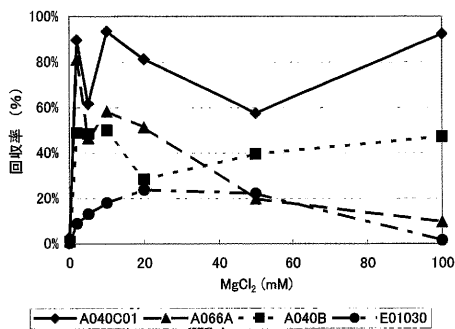
【 図 2 5 】

図 2 5



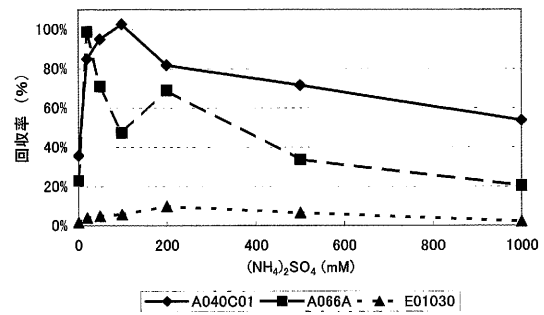
【 図 2 6 】

図 2 6



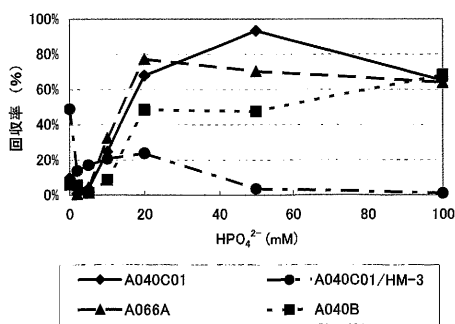
【 図 2 8 】

図 2 8



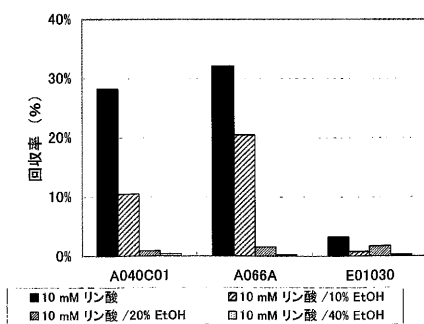
【 図 2 7 】

図 2 7

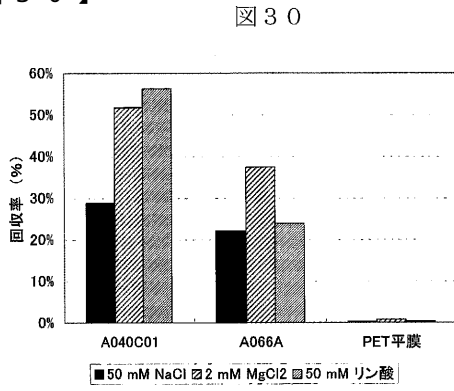


【 図 2 9 】

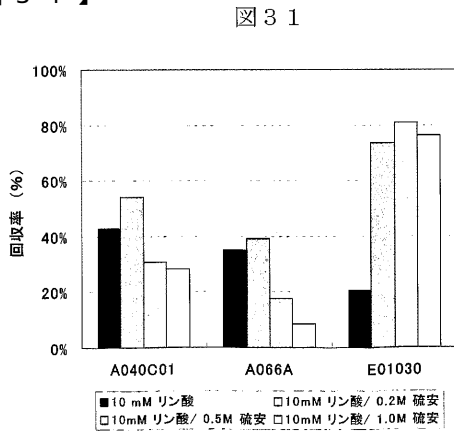
図 2 9



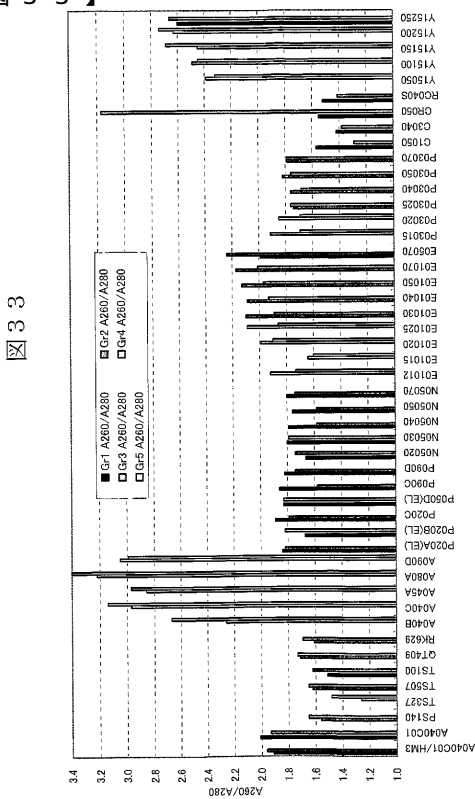
【 図 3 0 】



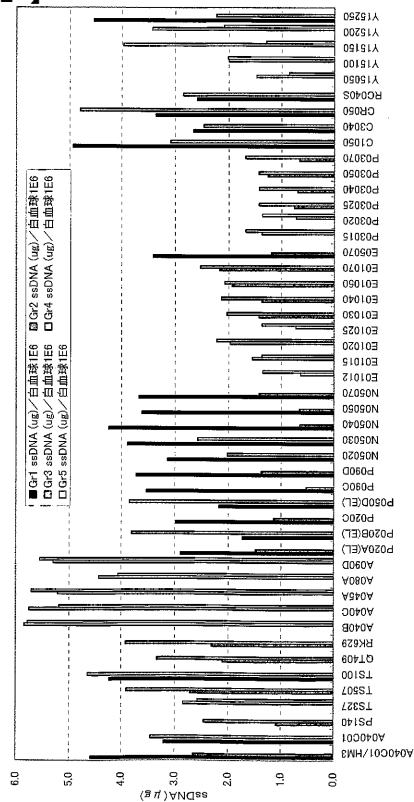
【 図 3 1 】



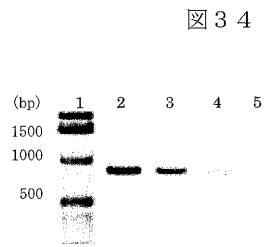
【 図 3 3 】



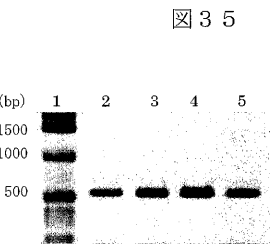
【 図 3 2 】



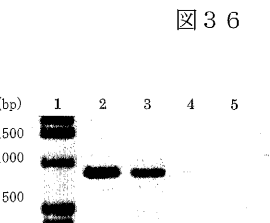
【 図 3 4 】



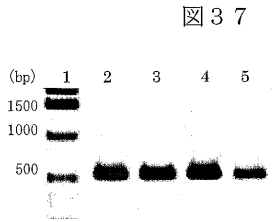
【 図 3 5 】



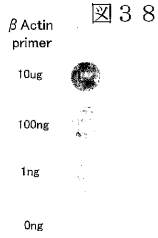
【 図 3 6 】



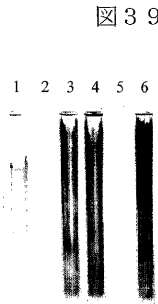
【 図 3 7 】



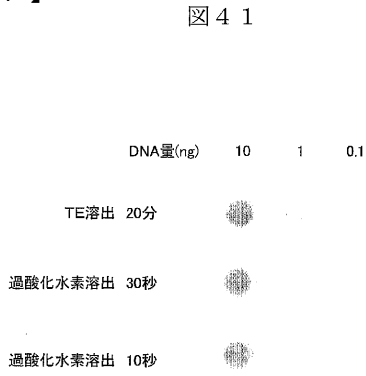
【 図 3 8 】



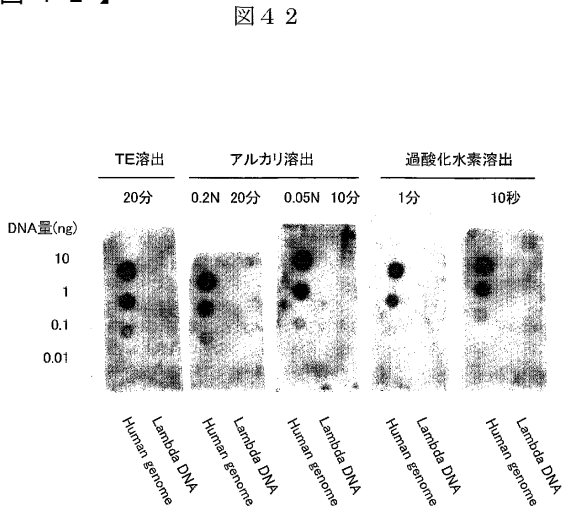
【 図 3 9 】



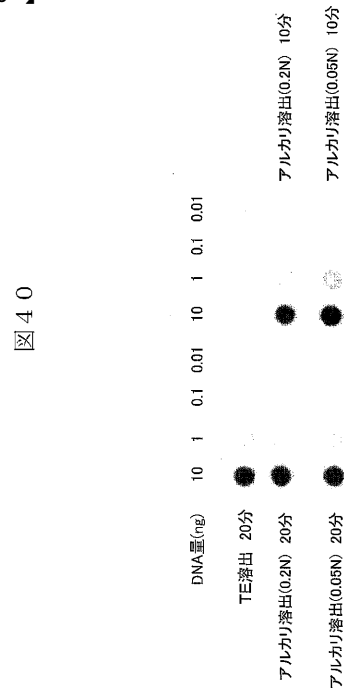
【 図 4 1 】



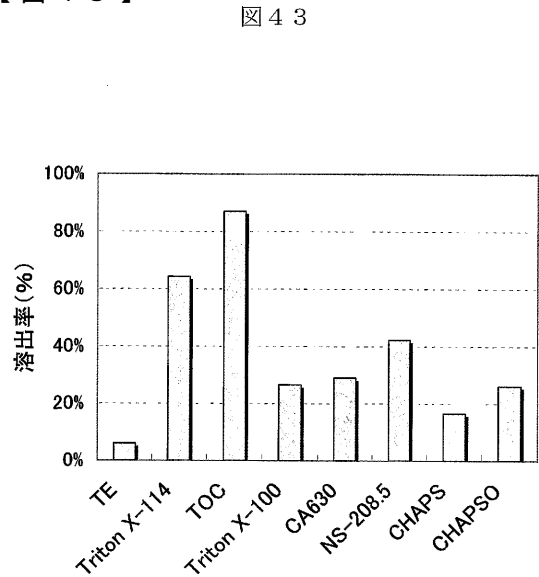
【 図 4 2 】



【 図 4 0 】

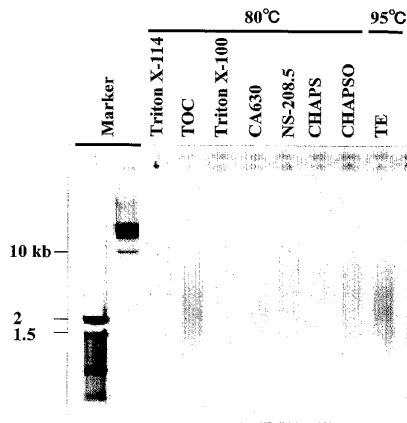


【 図 4 3 】



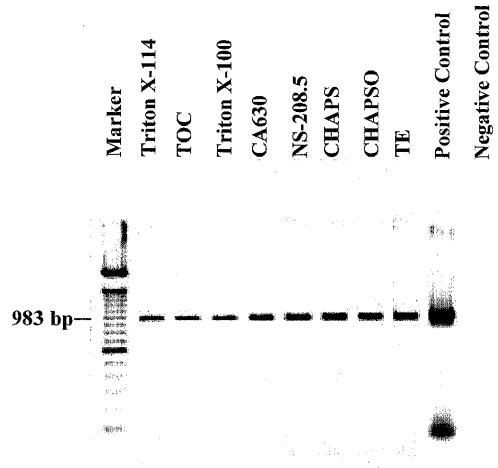
【 4 4 】

4 4



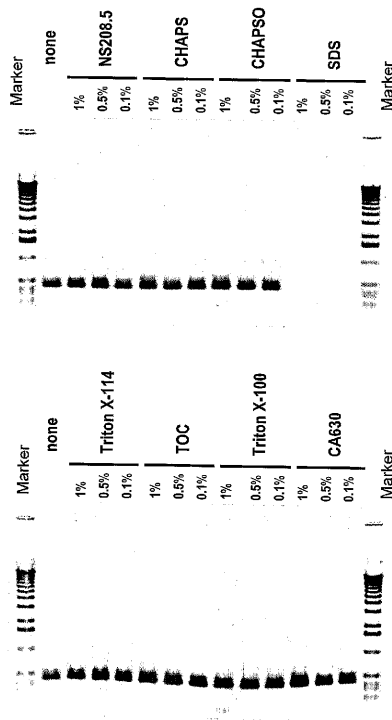
【 4 5 】

4 5



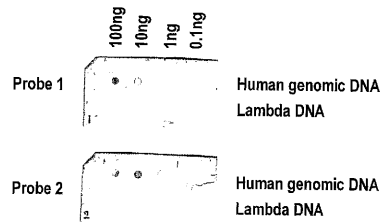
【 4 6 】

4 6



【 4 7 】

4 7



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/06939
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12M1/00, C12M1/12		
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) Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12M1/00, C12M1/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST FILE (JOIS), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5645723 A (TOMY SEIKO KABUSHIKI KAISHA), 18 February, 1997 (18.02.97), & JP 9-47278 A	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
Y	WO 95/24418 A1 (MINNESOTA MINING & MFG.), 14 September, 1995 (14.09.95), & JP 9-510200 A	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
Y	WO 96/18731 A1 (DYNAL AS.), 20 June, 1996 (20.06.96), & JP 11-501504 A	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
Y	JP 8-103653 A (Terumo Corp.), 23 April, 1996 (23.04.96), (Family: none)	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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 another 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 07 October, 2002 (07.10.02)		Date of mailing of the international search report 29 October, 2002 (29.10.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/06939

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2-295485 A (Kabushiki Kaisha Nitsusho), 06 December, 1990 (06.12.90), (Family: none)	1-50
A	WO 99/05321 A1 (RAPIGENE INC.), 04 February, 1999 (04.02.99), & JP 2001-511361 A	1-50

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/06939
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/09, C12M1/00, C12M1/12		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/09, C12M1/00, C12M1/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICSTファイル(JOIS), PubMed		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 5645723 A (TOMY SEIKO KK) 1997.02.18 &JP 9-47278 A	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
Y	WO 95/24418 A1 (MINNESOTA MINING & MFG) 1995.09.14 &JP 9-510200 A	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
Y	WO 96/18731 A1 (DYNAL AS) 1996.06.20 &JP 11-501504 A	1, 2, 4, 9-11, 21-46, 49, 50
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に異議を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07.10.02	国際調査報告の発送日
		29.10.02
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小森 道明	4B 9358
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/06939
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 8-103653 A (テルモ株式会社) 1996.04.23 ファミリーなし	1,2,4,9-11, 21-46,49,50
A	JP 2-295485 A (株式会社エツシヨウ) 1990.12.06 ファミリーなし	1-50
A	W0 99/05321 A1 (RAPIGENE INC) 1999.02.04 &JP 2001-511361 A	1-50

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。