

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5230196号
(P5230196)

(45) 発行日 平成25年7月10日(2013.7.10)

(24) 登録日 平成25年3月29日(2013.3.29)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 30/00 (2006.01)

G O 1 N 30/00

A

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2007-520771 (P2007-520771)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月15日(2005.7.15)
 (65) 公表番号 特表2008-506932 (P2008-506932A)
 (43) 公表日 平成20年3月6日(2008.3.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/007726
 (87) 国際公開番号 W02006/008085
 (87) 国際公開日 平成18年1月26日(2006.1.26)
 審査請求日 平成19年5月10日(2007.5.10)
 (31) 優先権主張番号 102004034474.4
 (32) 優先日 平成16年7月15日(2004.7.15)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 599072611
 キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ
 ユレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦国、ヒルデン 40724、キ
 アゲン シュトラーセ 1
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 ジンガー トルシュテン
 ドイツ連邦共和国 42697 ゴーリン
 ゲン シュライフェルスベルク 13

審査官 河野 隆一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸のより効率的な単離のための器具および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 a) ~ c) の工程を含む中間 (Midi) または最大 (Maxi) 規模の核酸洗浄方法、

a) i) 入口開口と出口開口を有し、下記 b) に記載の中空体 (2) に取り外し可能に配置されている開通中空体 (1) と、

ii) 入口開口と出口開口を有し、その内部に膜を有する開通中空体 (2) である最小 (Mini) 型のカラム

とからなるカラム結合体を含む器具に核酸混合物を導入する工程であって、前記膜が 2 ~ 4 μm の範囲の孔径を有するガラス繊維膜である工程、

b) カオトロピック塩の非存在下で核酸を前記膜に結合する工程であって、該結合が 1 ~ 5 の炭素原子を有する脂肪族系アルコールの存在下で行われる工程

c) 溶出緩衝液で該中空体 (2) 内の膜から核酸を溶出する工程。

【請求項 2】

G F / D 膜が該ガラス繊維膜として用いられていることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸のより効率的な洗浄のための器具および該器具を利用する方法に関し、
 ならびに該方法を実施するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

当該分野において知られているとおり、複合生物学的出発原料からの核酸の単離は強い変性かつ減少条件下で実施される。核酸を含む出発原料は部分的にタンパク質分解酵素を用いて溶解され、そして流出した核酸留分はフェノール/クロロホルム抽出工程によって洗浄される。核酸はそれから後に透析 (dialysis) またはエタノール沈殿によって水層から獲得される (J. サンプロック (Sambrock)、E. F. フリッチ (Fritsch) および T. マニアティス (Maniatis)、1989、Cold Spring Harbor、"Molecular Cloning")。

【0003】

10

当該分野において知られている核酸単離方法は、しかしながら、時間を浪費し、器具に相当な経費を必要とするという不利な点を有する。さらに、例えばフェノールやクロロホルムのような化学物質を使用するために、該方法は健康に害を及ぼすものであることを示しうる。

【0004】

実験を実施するために必要とされる時間のさらなる減少と併せて、核酸の有害かつ高価なフェノール/クロロホルム抽出を回避するために、異なる生物学的出発原料から核酸を単離するための様々な代替方法が過去に開発されている。

【0005】

該方法はアガロースゲルから DNA 断片を予備的かつ分析的に洗浄するためのヴォゲルステイン (Vogelstein) およびギレスピー (Gillespie) によりはじめて記載された方法 (Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 1979, 76, 615 ~ 619 頁) に基づく方法を含む。該方法は、カオトロピック塩 (NaJ) の飽和溶液中に単離されるべき DNA バンドを含んでいるアガロースを溶解することと、その後のガラス粒子に DNA を結合することとを兼ね備えている。

20

【0006】

ガラス粒子に固定された DNA は次に洗浄液 (20 mM トリス塩酸 [pH 7.2]、200 mM 塩化ナトリウム; 2 mM EDTA; 50 % v/v エタノール) で洗浄され、そしてその後担体粒子から排出される。該方法は、そのうち頻繁に修正されるようになり、そして現在は初めのものと大幅に異なる様々な核酸の抽出および洗浄方法として利用されている。

30

【0007】

多数の試薬システム (キット) が現在存在し、血液、組織およびさらに細胞培養物からのより長鎖の核酸 (ゲノム DNA、細胞内 RNA) の追加的な単離と関連する、主にアガロースゲルからの DNA 断片の洗浄用および細菌溶解物からの原形質 DNA の単離用のものもある。

【0008】

該市販キットは異なるカオトロピック塩溶液の存在下において無機担体類に核酸を結合するという十分によく知られた原理に基づいており、該無機担体類は、例えば、微細磨ガラス粉末の懸濁物 (例えば、グラスミルク (Glass milk)、BIO 101、ラ

40

ジョラ (Lajolla)、CA)、ダイアトミックアース (シグマ (Sigma)) またはシリカゲル (キアゲン (Qiagen)、DE 4139664 A1) さえも含む。

【0009】

さらに、カオトロピック緩衝液によって出発原料を DNA 結合固体層に結合するために、様々な核酸を単離するための方法が最新技術の中で利用されている (US 5,234,809)。ここで、カオトロピック緩衝液は出発原料の溶解用およびさらに固体層への核酸の結合用の両方で利用されている。

【0010】

該方法を用いて、少試料量からの核酸が利用され、特にウイルス核酸の単離のために利用されうる。カオトロピック緩衝液および DNA 結合固体層を伴った出発原料の保温は、

50

カオトロピック緩衝液により実現されることになる細胞分解をすべての材料に対して使うことができず、そしてまた極端に非効率におよびより多量の出発原料に対して特有および相当な時間浪費を伴って利用されるに違いないという不利な点を有する。したがって、さらなる機械的な均質化方法がしばしば使われる（例えば、組織試料からのDNA単離において）。多岐にわたる様々な高濃度カオトロピック緩衝液を異なる目的に使わなければならない、そしてそれゆえに 本来的に 例外なく適用することができない。

【0011】

出発原料の起こりうる困難な溶解を簡単にするために、一連の市販製品が核酸を単離するために利用することができるが、しかしながら簡単に操作できるいわゆる「シングルチューブ」法にはもはや基づいていない。

10

【0012】

核酸のその後の結合のために（例えば、膜を遠心分離すること）必要なカオトロピック塩を、溶解が完了するときに特別な方法工程において溶解調製物に加えなければならない。一方で、該カオトロピック塩は溶解緩衝液の一部になることができず、しかしながら、タンパク質破壊機能はカオトロピック物質に本来備わっており、および該カオトロピック塩はまた効率的な溶解に必要なタンパク質分解酵素を破壊するであろう。

【0013】

カオトロピック塩を用いる核酸を単離するための上記および当該分野において知られている方法は、世界中で確立され、そして市販製品を用いて大衆に自由に利用されている。

【0014】

20

出発原料溶解の原理に従って、ある簡単な実施において、遠心分離カラム内の担体基質上に配置せしめるガラスまたはシリカ膜の固体層に核酸を結合することができる。結合せしめた核酸は次により低いイオン強度の緩衝液で溶出される。

【0015】

カオトロピック塩の存在下における無機担体類への核酸の結合の物理化学的原理は、専門家団体で説明されている。無機担体類表面への核酸の結合は、核酸が無機材料、特にガラスまたはシリカ粒子、の表面に吸着することにより水環境の多重構造（superimposed structures）を打ち破ることに基づくということが前提とされている。

【0016】

30

カオトロピック塩の濃度が高い場合、反応はほとんど定量的に進行する。この理由のため、核酸結合固体層へ核酸を結合するために、高イオン強度のカオトロピック塩を有する緩衝組成物が重要である。

【0017】

各担体表面への核酸の結合のために、緩衝液は主要要素として少なくとも一つのカオトロピック塩を含む。ある状況下において、該緩衝液には溶解緩衝液または、タンパク質分解酵素を使うシステムにおける、必要な結合緩衝液さえ含み、該緩衝液は溶解が完了した後に出発原料に加えられる。

【0018】

負に帯電した、中性または塩基性のタンパク質溶液を塩析するためのホフマイスター系列（Hofmeister series）はカオトロピック塩の基本原則を形成する。カオトロピック塩は、タンパク質を分解し、水中で非極性物質の溶解性を増加し、および疎水性相互作用を破壊するという特徴がある。該特徴はまた、選択された固体層への核酸の結合を促進するために、カオトロピック塩の緩衝システムによる水環境の多重構造の破壊をもたらす。

40

【0019】

核酸を単離するためのカオトロピック塩の最もよく知られた例には、過塩素酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、グアニジニウム - イソ - チオシアン酸塩およびグアニジニウム塩酸塩を含む。しかしながら、それらはコスト強制的であり、そしてまた、ある程度まで、毒性または刺激性である。

50

【 0 0 2 0 】

細胞をグアニジニウム塩酸塩を含む緩衝液中に分散しエタノールで沈殿したという内容で、組織および細胞系列からのDNAの単離方法が先行技術文献に記載されている (Analytical Biochemistry 162、1987年、463頁)。一方で、該方法はコンタミネーションに対して影響を受けやすく、しかし他方においては、使用可能な核酸生産物を数時間内に単離することができる。

【 0 0 2 1 】

さらに、アンチカオトロピック物質を使用する核酸の単離方法は当該分野において知られている。ここで、改善せしめた核酸の単離を、溶解/結合緩衝液システムにおけるアンチカオトロピック塩の追加により同様に達成することができる。アンチカオトロピック成分はアンモニア塩、セシウム塩、ナトリウム塩および/またはカリウム塩、好ましくは塩化アンモニアを含む。カオトロピック塩構成成分のない溶解/結合緩衝液システムを使用する場合、核酸、特にゲノムDNA、を無機担体材料に結合し、そしてさらに、通常の反応条件の下で溶出することができる。

10

【 0 0 2 2 】

さらに、事前に共通の(代わりの)反応成分および担体材料を用い、および同じ反応プロセスを用いた様々な複合出発原料(例えば、血液、組織、植物)からのゲノムDNAの抽出において、少なくとも同量かつ同質の結果を溶解/結合緩衝液で達成することができ、該緩衝液の主要成分は、例えば、カオトロピック塩の代わりにアンモニウム塩であるということがわかっている。

20

【 0 0 2 3 】

タンパク質を変性させずに安定化しおよび分解せずに疎水性相互作用を強化する塩類によって、複合出発原料からの核酸の単離もまた等しく可能であることをその後観察している。

【 0 0 2 4 】

低濃度の塩類(1M未満)が、核酸を固体担体層へ結合するために適当である。ある適用例では、さらなる高イオン濃度はより大量の出発原料からの核酸の量的な単離のために必要になるので、0.5M未満の濃度が好ましい。

【 0 0 2 5 】

少なくとも1つのアンチカオトロピック塩成分を有する当該分野において知られている該溶解/結合緩衝液システムは、したがって、負に帯電した表面を有し、または負電荷電位を示しうる表面を含む固体層に核酸を結合することができる。

30

【 0 0 2 6 】

複合出発原料からの核酸単離の反応シーケンスは、出発原料の溶解を実施し、核酸を結合し、結合した核酸を洗浄し、および反応槽中に核酸を溶出することにより実現され、および少なくとも1つの遠心分離工程を必要とする。

【 0 0 2 7 】

これまでに当該分野において知られている通常の間および最大システムを用いるプラスミドDNAを単離する手段は、しかしながら、ただスケールアップせしめた最小調製法だけであり、必要量を達成するために、該調製法の有するカラムをより大きな直径に増大しているか、または該カラムを非常に多くの膜層で補っているかのいずれかである。この種のシステムを、例えばストラタジェン(Stratagen)またはシグマなどの製造業者が現在供給している。

40

【 0 0 2 8 】

ここに採用されたガラス繊維膜は、ほとんどが膜の表面への選択的な結合のためにカオトロピック塩を使用して働く。

【 0 0 2 9 】

主な不利な点は、複雑な取り扱い(大規模な床設置型の遠心分離機を伴う多くの遠心分離工程)である。該不利に加えられるものは、大内部表面および該表面に起因するより大きな膜容量による大死容量(dead volume)と結びついた相対的に多量の溶出

50

量である。

【0030】

容量を増加するために必要である該表面積に起因して、カオトロピック結合化学を維持すると同時に最小型 (mini format) に基づいた器具を用いる、より大規模な調製プロセスはこれまで不可能であった。

【0031】

一方では、アルコール結合化学に基づいたプラスミド単離は、インバイテック (Invitex) 社 (ベルリン) により製造された Invisorb^(登録商標) プラスミド・キットを使用してのみ以前は可能であった。しかし、該キットでさえ、カラムは使用され、カラム面積により中間 / 最大規模での調製は適当でない。したがって、既に記載された不利な点は該キットに当てはまる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

本発明の目的は、今後、DNA プラスミドの単離を大規模 (いわゆる最大または中間調製において) に実施することを可能にし、そして同時に大規模な床設置型の遠心分離機を使用した時間を浪費する遠心分離工程を回避する器具と方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0033】

本発明によれば、その問題をいわゆるミニスピナカラムの使用により解決し、該カラム自体当該分野において知られているが、しかし該カラムは特別な膜を有する。本発明によれば、該膜は、溶解物 / アルコール混合物の迅速なる過を一方では可能にし、そして、他方においては、十分に大きな結合 / 過容量を保証する。一つの選択 (必要条件に依存する) として、さらなる過層を早期の目詰まりを防ぐために該膜に優先して置きうる。

20

【0034】

本発明によれば、発明に係る方法のための上記の膜の使用はシリカ膜への DNA の結合に明確な影響をもたらし、該膜を好ましくはクロマトグラフィー、特にイオン交換クロマトグラフィーに適したカラムの中空体内に配置しうる。該膜は適切な細孔径を有し、一方では、DNA を阻止することができ、および、他方においては、大量にろ過する場合目詰まりなしで良好なる過をもまた可能にするということはここで確保されなければならない。さらに、クロマトグラフィーカラムの内側面はイオン交換に適したクロマトグラフィー材料で覆われるべきである。

30

【0035】

本発明によれば、ワットマン (Whatman) のいわゆる GF / A、GF / B および GF / D 膜を使用する。該膜類は、マイクロガラス繊維から構成され、および主としてろ過目的に使用される (例えば水を清浄化するための) 膜である。ここで、GF / D (2.7 μm) >> GF / A (1.6 μm) > GF / B (1 μm) の順に減少するろ過速度がある。

【0036】

カオトロピック塩類の存在における無機担体類表面への核酸の結合は、許容収量を達成するために約 1 μm の膜細孔径を必要とし、結合工程が実際に時間を浪費するであろうという程度の大容量に対してろ過時間を増加する。

40

【0037】

驚くべきことに、膜は、2 ~ 4 μm の範囲にある細孔径を有し、代替りの (非カオトロピックな) 結合化学が使用される場合、高ろ過速度で高収量に DNA を結合するということがわかった。

【0038】

該膜は、長いろ過時間の不都合を回避しうる。したがって、本発明によれば、より大きな膜孔の使用を可能とする、1 ~ 5 炭素原子を有する脂肪族アルコール - 好ましくはエタノールまたはイソプロパノール - が核酸の結合に使用され、およびその後、ろ過時間お

50

よび、これに関連して、調製時間を決定的に減少する。

【0039】

本発明を実施することは、さらに少量の緩衝液を備えた最小型のカラムで核酸を溶出することを可能にする。

【0040】

ここで、上記の中間型 (mid i format) および最大型 (max i format) で使用せしめる膜と比較して、比較的小さな膜を使用して得られた溶出量は、使用する緩衝液量と同一であった。このいわゆる「迅速調製方法」の一定溶出量の利点は、全収量を決定するために実容量を個別に決定する必要はないという事実にある。さらに、DNA 溶液を高度に濃縮し、必要ならば容易に薄めることができる。これとは対照的に、最新技術方法を使用して得られたあまりに希釈された溶液は、相当により多くの努力で濃縮されなければならないであろう。

10

【0041】

中間 / 最大規模のための大容量に適合するために、スピнкаラムには適切な拡張用チューブを取り付ける。核酸を洗浄するための発明に係る器具は、したがって、下記のものからなるカラム結合体を含む：

a . 入口開口と出口開口を有し、さらに下記 b に記載の中空体 (2) に配置されている開通中空体 (1)

b . 入口開口と出口開口を有し、その内部に取り付けられた 1 又はそれ以上の膜を有する開通中空体 (2)

20

【0042】

カラム / 拡張用器具結合体を、その後、真空槽 (例えばキアゲン社、40724 ヒルデン、によって製造された Q I A v a c (登録商標) 6 S) に置き、そして試料は真空によって膜を通して汲み出される。拡張用チューブはその後廃棄され、そして、該ミニスピнкаラムを公知の最小調製方法 (例えば、キアゲン社、40724 ヒルデン、によって製造された Q I A p r e p (登録商標) を使用して) に従ってさらに処理する。

【発明の効果】

【0043】

本発明および共に使用される器具による提案された方法の大きな利点は、核酸を洗浄するための短い処理時間にあり、および非実用的で複雑な遠心分離工程を省くことにある。これに加わるものとして、低溶出量および低死容量、および関連する高い最終 DNA 濃度にある。

30

【0044】

本発明のさらなる詳細情報を、添付の図面 (図 1 ~ 10) および下記の典型的な実施例に関してより詳細に説明する。

【実施例 1】

【0045】

<いわゆる中間規模での大腸菌からのプラスミド DNA の単離用プロトコール>

大腸菌からのプラスミド DNA の単離用プロトコール：

40

プラスミド p C M V (B D バイオサイエンス (BD Biosciences) 社からの D H 5 / p C M V) を有する 25 m l の大腸菌 D H 5 - の培養。

【0046】

- (1) 2 m l の再懸濁緩衝液で細菌ペレットを再懸濁する (3 分)。
- (2) 2 m l の溶解緩衝液を加えて、注意深く混合する。約 3 分間溶解する。
- (3) 2 m l の中性化緩衝液を加えて、ひっくり返すことにより混合する (1 分間)。
- (4) シリカ (クイアフィルター (Q I A f i l t e r) キアゲン) を含む過カラムに原溶解物を置き、室温で 3 分間培養し、原溶解物をカラム材料内に押し通す。
- (5) スピнкаラム上に 10 m l の拡張用チューブを置き、そして Q I A v a c (登録商標) (キアゲン) 上に配置する。

50

(6) 溶解物に 2 . 5 m l のイソプロパノールを加えて、よく混合して、そしてカラム上に置く。

(7) 真空の助力により 2 分間カラム材料を通して混合物液を吸う。

(8) 拡張用チューブを廃棄する。

(9) 回収用チューブ (回収容器) 上にシリカ膜を含むスピнкаラムを置く。

(1 0) 7 5 0 μ l の緩衝液 P E (キアゲン、市販のアルコール洗浄緩衝液) を加えることにより洗浄し、1 4 , 0 0 0 r p m で 1 分間遠心分離する。

(1 1) 緩衝液残留物を除去するために 1 4 , 0 0 0 r p m で 1 分間、一度以上遠心分離する。

(1 2) スピнкаラムを 1 . 5 m l のエッペンドルフチューブに交換する。

(1 3) 溶出のために、2 0 0 μ l の溶出緩衝液 (E B) 、例えば市販の溶出緩衝液 T E を膜の上にピペットで加え、1 分間置き、そして遠心分離する (1 4 , 0 0 0 r p m で 1 分間) 。

【 0 0 4 7 】

ここで、該プラスミド D N A 単離用プロトコールの中でリストされている項目 (4) 、(7) および (1 0) ~ (1 3) は、公知のシステムと比較して、プラスミド D N A の顕著により速い単離を導く。

上に挙げた例に関して、下記のシリカを基礎とした製品を用いた参考調製を実施した：

1) インバイテック・インピソープ・プラスミド・ミディ・キット (Invitex Invisorb Plasmid Midi Kit) (インバイテック) ,

2) シグマ・ジーンエルト・E F ・ミディ・キット (SIGMA GeneElute EF Midi Kit) (シグマ (SIGMA-ALDRICH)) ,

3) ストラタジェン・ストラタプレップ・E F ・ミディ (Stratagene Strataprep EF Midi) (ストラタジェン) ,

4) 本発明に係る器具

【 0 0 4 8 】

他の 2 つのシステムとよりよく適合させるために、調製 (2) および (3) において、前記プロトコール変形体をプロトコール中で特定せしめた選択的なエンドトキシン除去工程を省いて実施した。

【 0 0 4 9 】

さらに、インバイテック・インピソープ・プラスミド・ミディ・キット (1) および本発明に係る器具を使用した方法 (4) は、非カオトロピックシリカ化学に基づく。他方では、シグマ (2) およびストラタジェン (3) のキットはカオトロピック塩類による従来型の結合に基づく。

【 0 0 5 0 】

図 2 は異なる 4 つのカラム調製の分単位 (分) での調製時間を示す。ここで、2 0 分をもって、公知のインバイテック、シグマおよびストラタジェンからの方法よりも本発明に係る器具は明確により短い調製時間で核酸単離を達成することができる。

【 0 0 5 1 】

さらに、4 つのカラム調製のマイクログラム単位 (μ g) での収量を図 3 に示し、本発明に係る器具またはこの器具 (「迅速調製中間」) で実施された方法の 2 7 5 μ g の収量は、インバイテック、シグマまたはストラタジェン調製の収量より明確に高い。

【 0 0 5 2 】

図 4 は、本発明に従って実施した調製が当該分野において知られている方法で単離した試料と同一品質であることを疑いなく示す。

【 0 0 5 3 】

4 つのカラム調製のマイクロリットル (μ l) 単位での溶出量を図 5 で比較する。該溶出量は、本発明に係る最小型で使用せしめたカラムがより少量の緩衝液で溶出せしめうることを明確にさせる。小さな膜は死容量がないという結果になり、そのために得られた溶出量は使用緩衝液量と同一である。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

「迅速調製方法」のあまりに少くかつ一定の溶出量はDNA溶液を高度に濃縮し、そして必要ならば容易に薄めることができるので、全収量を決定することおよび以降の利用に対して大きな利点を与える。これとは対照的に、希釈された溶液は相当により多くの努力で濃縮されなければならないであろう。

【実施例 2】

【 0 0 5 5 】

<いわゆる最大規模での大腸菌からのプラスミドDNAの単離>

大腸菌からのプラスミドDNAの単離用プロトコール。

プラスミドpCMV (BDバイオサイエンス社からの、DH5 / pCMV) を有する100mlの大腸菌DH5 - の培養。 10

(1) 5mlの再懸濁緩衝液で細菌ペレットを再懸濁する(3分)。

(2) 5mlの溶解緩衝液を加えて、注意深く混合する。約3分間溶解する。

(3) 5mlの中性化緩衝液を加えて、ひっくり返すことにより混合する(1分間)。

(4) シリカ(クイアフィルター キアゲン)を含む過カラムに原溶解物を置き、室温で3分間培養し、原溶解物をカラム材料内に押し通す。

(5) スピンカラム上に20mlの拡張用チューブを置き、そしてQIAvac(登録商標)(キアゲン社)上に配置する。

(6) 溶解物に7mlのイソプロパノールを加えて、よく混合して、そしてカラム上に置く。 20

(7) 真空の助力により2分間カラム材料を通して混合物液を吸う。

(8) 拡張用チューブを廃棄する。

(9) 回収用チューブ(回収容器)上にシリカ膜を含むスピンカラムを置く。

(10) 750μlの緩衝液PE(キアゲン社、市販のアルコール洗浄緩衝液)を加えることにより洗浄し、14,000rpmで1分間遠心分離する。

(11) 緩衝液残留物を除去するために14,000rpmで1分間、一度以上遠心分離する。

(12) スピンカラムを1.5mlのエッペンドルフチューブに交換する。

(13) 溶出のために、200μlの溶出緩衝液(EB)、例えば市販の溶出緩衝液TEを膜の上にピペットで加え、1分間置き、そして遠心分離する(14,000rpmで1分間)。 30

【 0 0 5 6 】

上に挙げられた例に関して、下記のシリカを基礎とした製品を用いた参考調製を実施した：

1) インバイテック・インピソープ・プラスミド・ミディ・キット(インバイテック)

2) 本発明に係る器具

【 0 0 5 7 】

本発明に係る器具およびインバイテック製品の両方が非カオトロピックシリカ化学に基づく。

【 0 0 5 8 】

図6は、2つの異なるカラム調製の調製時間(分単位)を示す。ここに、(例1にあるとおり)、20分をもって、同じ化学に基づいたインバイテック調製と比較して、本発明に係る器具は核酸単離に対して明確により短い調製時間を同様に示す。 40

【 0 0 5 9 】

図7は、(例1にあるとおり)2つのカラム調製のDNA収量(μg単位)を示す。

【 0 0 6 0 】

図8中のアガロースゲル内のバンドを参照することによって、同一品質の2つの参考調製を達成し、一方で発明に係る器具を使用する場合の1282μgの収量は、しかしながら比較調製(インバイテック)の収量より明確に高いということを示しうる。

【 0 0 6 1 】

膜内表面上の結合部分をミニスピncラムの該使用および本発明に係る方法を除外する場合にのみ使用しうるので、該収量をカオトロピック結合化学をもってして達成することはできない。

【0062】

本発明に係る方法に従って使用した最小型カラムを用いると、DNAもまたさらに少量の緩衝液で溶出されうることが明確にわかる、2つのカラム調製の溶出量(μl 単位)が図9で比較されている。小さく完全な膜は事実上死容量を有しないという結果にあり、そのために、得られた溶出量は、使用緩衝液量と実際に同一である。

【実施例3】

【0063】

<中間規模から最小規模までに減少されたカラム調製を変更する場合における核酸単離用の本発明に係る器具におけるGF/D膜の効果>

合成溶解物を、再懸濁緩衝液、溶解緩衝液および中性化緩衝液から製造した。各場合での6mlのこの「溶解物」をその後異なる量のプラスミドDNA($10\mu\text{g} \sim 250\mu\text{g}$)と混合し、イソプロパノールを加えそして各場合にGF/D膜(ワットマン社から)の2つの層を含む本発明に係る器具のカラムに通して吸収した。

【0064】

図10は、プラスミドDNA量を増加して加えた後($10\mu\text{g} \sim 250\mu\text{g}$)のカラム調製のDNA収量(μg 単位)を示す。プラスミドDNA量を増加することで($10\mu\text{g} \sim 250\mu\text{g}$)、達成可能なDNA収量が $211\mu\text{g}$ にまで上昇することを示した。

【0065】

ろ過速度は $10 \sim 35\text{ml}/\text{分}$ の間にあり、適用せしめた真空力(約 $600 \sim 20\text{mbar}$)に依存する。

【0066】

追加実験は、 $2 \sim 5\mu\text{m}$ の記載上の平均細孔径を有する膜を使用する場合、大きなろ過速度で高い収量を達成することができることを示す。

【実施例4】

【0067】

<最大規模で敷いているフィルターを使用したろ過速度>

この実験は、本発明に係る器具のろ過速度におけるフィルター・マット($35\text{g}/\text{m}^2$)の効果を示す。

【0068】

大腸菌からのプラスミドDNAの単離用プロトコール：
プラスミドpCMV (BDバイオサイエンス社からのDH5 / pCMV)を有する大腸菌DH5 - の 100ml の培養。

【0069】

大腸菌培養物を、例2で記載した最大プロトコールによる調製工程に従って溶解し、該溶解物をろ過によって浄化し、およびイソプロパノールに混合した。

【0070】

該溶解物/イソプロパノール混合物を、その後 200mbar でカラムに押し通した。調製カラムにフィルター・マット($35\text{g}/\text{m}^2$)を取り付けた。

【0071】

$7.2\text{ml}/\text{分}$ のろ過速度を、本発明に係る器具およびフィルター・マットを用いて観察した。

【0072】

該方法をより大規模でも使用しうる結果として、相当により高容量の溶解物を該膜の目詰まりへの改善せしめる抵抗のために処理しうる。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1a】図1aは、入口開口と出口開口を有する開通中空体(1)、および入口開口と

10

20

30

40

50

出口開口を有し中空内にろ過層を含む開通中空体（２）を示す。

【図１ｂ】図１ｂは、該中空体（１）および該中空体（２）からなるカラム結合体を示す。

【図２】図２は、核酸の洗浄の間に実施例１による４つの異なるカラム調製 インバイテック社（製品１）、シグマ社（製品２）、ストラタジェン社（製品３）からのカラム材料および本発明に係る器具（製品４）を用いて の調製時間（分単位）を示す。

【図３】図３は、核酸の洗浄の間に実施例１による４つの異なるカラム調製 - インバイテック社（製品１）、シグマ社（製品２）、ストラタジェン社（製品３）からのカラム材料および本発明に係る器具（製品４）を用いて - のDNA収量（μg単位）を示す。

【図４】図４は、４つのカラム調製 インバイテック社（製品１）、シグマ社（製品２）、ストラタジェン社（製品３）からのカラム材料および本発明に係る器具（製品４）を用いて のバンドを有するアガロースゲルを示す。

10

【図５】図５は、中間調製から最小調製までのカラム型を変更する間の４つの異なるカラム調製 インバイテック社（製品１）、シグマ社（製品２）、ストラタジェン社（製品３）からのカラム材料および本発明に係る器具（製品４）を用いて の溶出量（μl単位）を示す。

【図６】図６は、最大調製を最小調製に変更する前に核酸の洗浄の間の２つの異なるカラム調製 インバイテック社からのカラム材料および本発明による器具を用いて の調製時間（分単位）を示す。

【図７】図７は、最大調製から最小調製までのカラム型の減少の間に核酸を洗浄するための２つの異なるカラム調製 インバイテック社からのカラム材料および本発明に係る器具を用いて のDNA収量（μg単位）を示す。

20

【図８】図８は、２つのカラム調製 インバイテック社からのカラム材料（１）および本発明に係る器具（２）を用いて のバンドを有するアガロースゲルを示す。

【図９】図９は、最大調製から最小調製までのカラム型の変更の間の２つの異なるカラム調製 インバイテック社からのカラム材料および本発明による器具を用いて の溶出量（μl単位）を示す。

【図１０】図１０は、DNA収量（μg単位）における２．７μmの孔径を有するGF/D膜の効果を示す。

【図 2】

調製時間 (分)

製品 1	製品 2	製品 3	製品 4
4 5	1 0 0	7 0	2 0

図 2

【図 6】

調製時間 (分)

インバイテック	本発明に係るもの
5 0	2 0

図 6

【図 3】

収量 (μ g)

	製品 1	製品 2	製品 3	製品 4
試験 1	1 2 6	2 0 1	2 4 6	3 0 4
試験 2	1 1 5	2 3 9	1 5 4	2 4 6
中間値	1 2 1	2 2 0	2 0 0	2 7 5

図 3

【図 7】

収量 (μ g)

試験	インバイテック	本発明に係るもの
1	1 0 8 4	1 3 9 5
2	9 0 0	1 1 6 8
中間値	9 9 2	1 2 8 2

図 7

【図 5】

溶出量 (μ l)

製品 1	製品 2	製品 3	製品 4
4 8 0	7 2 0	9 7 0	1 0 0
4 6 0	8 0 0	9 7 0	1 0 0

図 5

【図 9】

溶出量

インバイテック	本発明に係るもの
6 7 0	2 0 0
6 6 0	2 0 0

図 9

【図 10】

使用された DNA の量	1 0 μ g	5 0 μ g	1 0 0 μ g	2 5 0 μ g
1	6. 8	2 0	7 0	2 3 3
2	6. 0	2 9	7 3	1 9 0
中間値	6. 4	2 9	7 1. 5	2 1 1

図 10

【図 1 a】

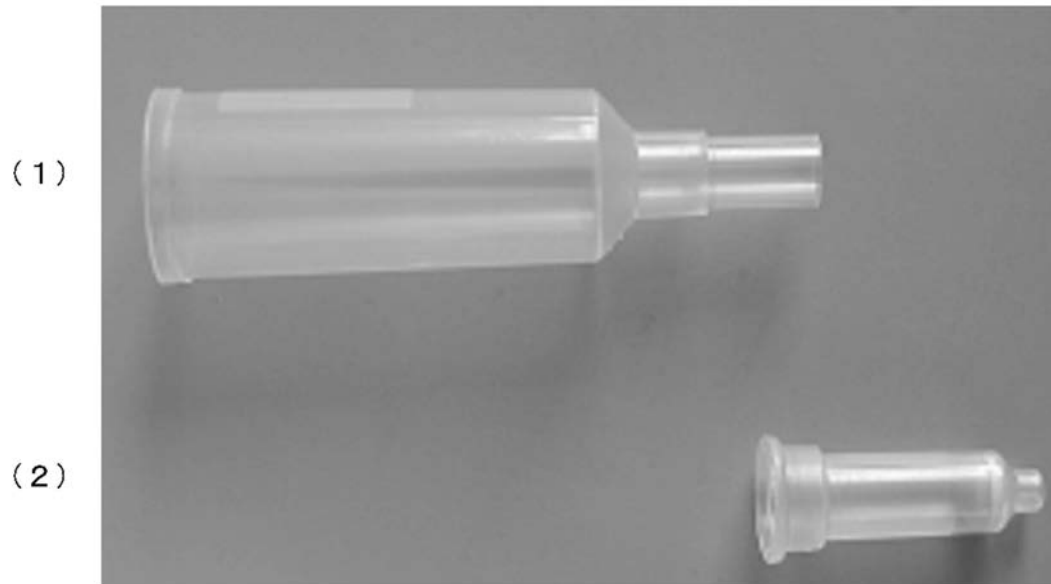


図 1 a

【図 1 b】

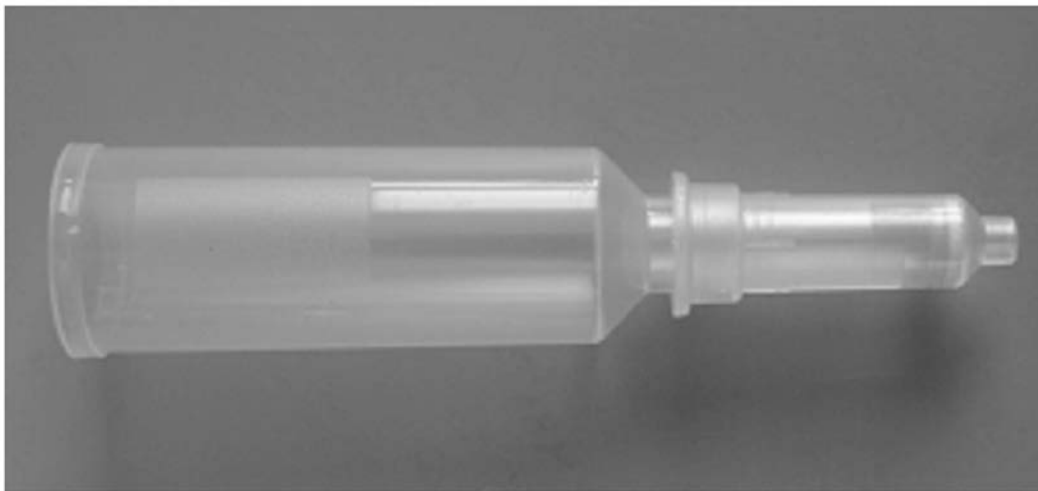


図 1 b

【図 4】

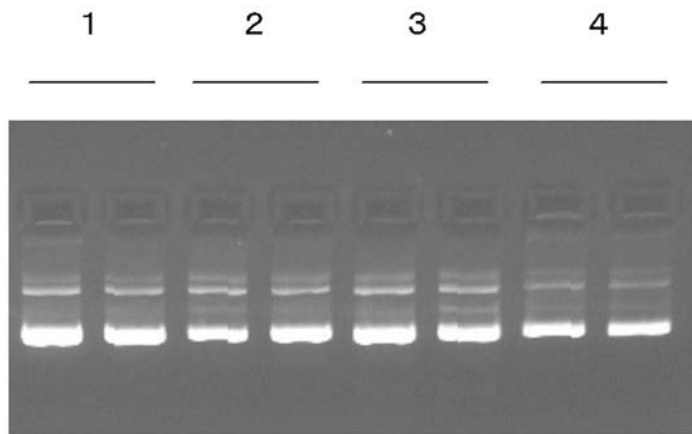


図 4

【図 8】

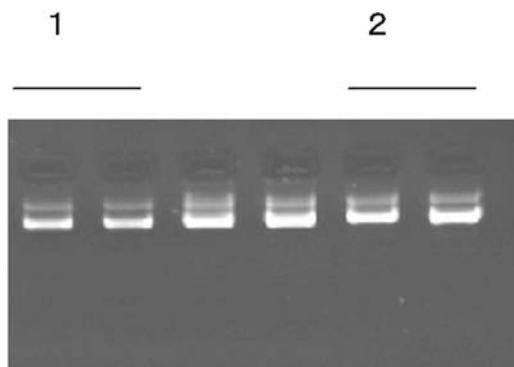


図 8

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2002-531126(JP,A)
特開平04-036198(JP,A)
特開2002-345465(JP,A)
特開平08-281098(JP,A)
特開平03-007581(JP,A)
特開2002-209580(JP,A)
特開2001-095572(JP,A)
特開2002-191351(JP,A)
特開2000-162208(JP,A)
特表平09-505890(JP,A)
特表平07-501223(JP,A)
特表平07-501222(JP,A)
特表2002-507121(JP,A)
特表2001-513586(JP,A)
国際公開第03/073095(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N	30/00
G01N	30/88
C12N	15/10