

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年8月23日(2007.8.23)

【公表番号】特表2007-500008(P2007-500008A)

【公表日】平成19年1月11日(2007.1.11)

【年通号数】公開・登録公報2007-001

【出願番号】特願2006-521947(P2006-521947)

【国際特許分類】

C 12 P 19/34 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 P 19/34 A

C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月5日(2007.7.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、細胞から小型RNA分子を単離するための方法：

- a)溶解産物を生じるように細胞を溶解溶液で溶解する段階；
- b)約35%～約70%のアルコール濃度まで、溶解産物へアルコール溶液を添加する段階；
- c)溶解産物を固体支持体に適用する段階；
- d)小型RNA分子を固体支持体から溶出する段階；および
- e)小型RNA分子を用いるか、または特徴付ける段階。

【請求項2】

小型RNA分子がmiRNA、siRNA、snRNA、snoRNAおよび/またはtRNA分子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

小型RNA分子がmiRNA分子である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

溶解溶液がカオトロピック剤または界面活性剤を含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

カオトロピック剤が少なくとも約2.0Mの濃度でグアニジニウムを含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】

界面活性剤が濃度約0.1%～約2%でN-ラウロイルサルコシンを含む、請求項4記載の方法。

【請求項7】

溶解産物を固体支持体に適用する段階の前に有機溶媒を含む抽出溶液で溶解産物から小型RNA分子を抽出する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

抽出溶液がフェノールおよびクロロホルムを含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

溶解産物に添加されるアルコール溶液の量が溶解産物を約50%～約60%アルコールにす

る、請求項1記載の方法。

【請求項10】

アルコール溶液が有機溶媒での抽出の前に溶解産物へ添加される、請求項9記載の方法。

【請求項11】

溶解産物を固体支持体に適用した後に、固体支持体をグアニジニウムおよびアルコールを含む第一洗浄溶液で洗浄する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項12】

第一洗浄溶液で洗浄した後、固体支持体をアルコールを含む第二洗浄溶液で洗浄する段階をさらに含む、請求項11記載の方法。

【請求項13】

小型RNA分子が約60～約100の温度で固体支持体から溶出される、請求項1記載の方法。

【請求項14】

小型RNA分子が低イオン強度溶液で固体支持体から溶出される、請求項1記載の方法。

【請求項15】

固体支持体が無機物支持体または重合体支持体を含む、請求項1記載の方法。

【請求項16】

遠心分離またはガス圧力により溶解産物を固体支持体に通過させる段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項17】

溶出された小型RNA分子がフィルター上に捕獲され、その後、収集される、請求項1記載の方法。

【請求項18】

小型RNA分子が一本鎖である、請求項1記載の方法。

【請求項19】

小型RNA分子が二本鎖である、請求項1記載の方法。

【請求項20】

小型RNA分子が多くとも70またはそれ未満のヌクレオチドを有する、請求項1記載の方法。

。

【請求項21】

小型RNA分子が多くとも30またはそれ未満のヌクレオチドを有する、請求項20記載の方法。

【請求項22】

以下の段階を含む、試料からmiRNAまたはsiRNAを単離するための方法：

- a) miRNAまたはsiRNAを有する試料を得る段階；
- b) 約35%～約70%のアルコール濃度まで、試料へアルコール溶液を添加する段階；
- c) 試料へ抽出溶液を添加する段階；
- d) 試料を無機物または重合体支持体に適用する段階；および
- e) 溶出したsiRNAまたはmiRNAを形成するため、無機物または重合体支持体からイオン溶液でsiRNAまたはmiRNAを溶出する段階。

【請求項23】

溶出された試料が、miRNAまたはsiRNAについて質量で少なくとも約10倍、濃縮される、請求項22記載の方法。

【請求項24】

以下の段階を含む、試料からmiRNA分子を単離するための方法：

- a) 約35%～約70%のアルコール濃度まで、試料へアルコール溶液を添加する段階；
- b) 試料を無機物または重合体支持体に適用する段階；
- c) 支持体からイオン溶液でmiRNA分子を溶出する段階；および
- d) miRNA分子を用いるか、または特徴付ける段階。

**【請求項 25】**

以下の段階を含む、試料から小型RNA分子を単離するための方法：

- a) 試料中の細胞を、グアニジニウムを含む溶解溶液で溶解する段階であって、少なくとも約1Mグアニジニウムの濃度をもつ溶解産物が產生される、段階；
- b) 溶解産物からフェノールを含む抽出溶液で小型RNA分子を抽出する段階；
- c) 溶解産物/アルコール混合物を形成するために、溶解産物へアルコール溶液を添加する段階であって、混合物におけるアルコールの濃度が約35%～約70%の間である、段階；
- d) 溶解産物/アルコール混合物を無機物または重合体支持体に適用する段階；
- e) 無機物または重合体支持体からイオン溶液で小型RNA分子を溶出する段階；
- f) 小型RNA分子を捕獲する段階；および
- g) 単離された小型RNA分子を用いる段階。

**【請求項 26】**

以下の段階を含む、試料から小型RNA分子を単離するための方法：

- a) 溶解産物を產生するように、溶解溶液中で細胞を溶解する段階；
- b) 溶解産物からフェノールを含む抽出溶液で小型RNA分子を抽出する段階；
- c) 約20%～約35%のアルコールの溶解産物/アルコール混合物を形成するために溶解産物へアルコール溶液を添加する段階；
- d) 溶解産物/アルコール混合物を第一固体支持体に適用する段階；
- e) フロースルー溶解産物/アルコール混合物を収集する段階；
- f) 段階e)のフロースルー溶解産物/アルコール混合物へアルコール溶液を添加し、約35%～約70%アルコール濃度を有する溶解産物/アルコール混合物を形成する段階；
- g) 段階f)の溶解産物/アルコール混合物を第二固体支持体に適用する段階；および
- h) 第二固体支持体からイオン溶液で小型RNA分子を溶出する段階。

**【請求項 27】**

試料を無機物または重合体支持体に適用した後、無機物または重合体支持体を、グアニジニウムおよびアルコールを含む第一洗浄溶液で洗浄する段階をさらに含む、請求項24記載の方法。

**【請求項 28】**

無機物または重合体支持体を、アルコールを含む第二洗浄溶液で洗浄する段階をさらに含む、請求項27記載の方法。

**【請求項 29】**

以下の段階を含む、試料から小型RNA分子を単離するための方法：

- a) 約35%～約70%のエタノール濃度をもたらすまで、試料へエタノール溶液を添加する段階；
- b) 試料を無機物支持体に適用する段階；
- c) 無機物支持体を、グアニジニウムおよび70%エタノールを含む第一洗浄溶液で洗浄する段階；
- d) 無機物支持体を、80%エタノールを含む第二洗浄溶液で洗浄する段階；
- e) 支持体から小型RNA分子を溶出する段階；および
- f) 小型RNA分子を用いるか、または特徴付ける段階。

**【請求項 30】**

以下のものを含む、小型RNA分子を単離するためのキット：

- a) 酸性フェノール-クロロホルム；
- b) 溶解/結合緩衝液；
- c) ホモジネート添加物；
- d) 洗浄溶液；
- e) 溶出溶液；および
- f) フィルターカートリッジ