

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-12011

(P2014-12011A)

(43) 公開日 平成26年1月23日 (2014.1.23)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A 4 B O 2 4

審査請求 有 請求項の数 6 O L 外国語出願 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2013-168812 (P2013-168812)	(71) 出願人	391008788
(22) 出願日	平成25年8月15日 (2013. 8. 15)		アボット・ラボラトリーズ
(62) 分割の表示	特願2001-546902 (P2001-546902) の分割		ABBOTT LABORATORIES
原出願日	平成12年12月21日 (2000. 12. 21)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット パーク アボット パーク ロード 10 0
(31) 優先権主張番号	09/470, 944	(74) 代理人	110001173
(32) 優先日	平成11年12月22日 (1999. 12. 22)		特許業務法人川口国際特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ジェラード・ジェイ・ガンドリング
			アメリカ合衆国、イリノイ・60045、 レイク・フオレスト、ワイルドウッド・ロ ード・153
		Fターム (参考)	4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 HA14 HA20

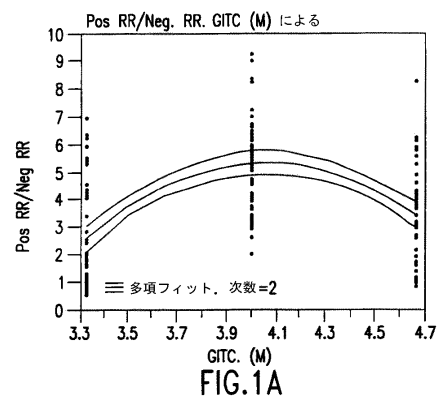
(54) 【発明の名称】 核酸の単離方法およびキット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】試験サンプルから核酸を分離するための方法の提供。

【解決手段】試験サンプルを酸化金属担体物質および結合バッファーと接触させて核酸 / 酸化金属担体物質複合体を形成させ、該複合体を該試験サンプルから分離し、該核酸を該酸化金属担体物質から溶出する工程を含む、試験サンプルから核酸を分離するための方法を提供する。結合バッファーが有機溶媒を含み、該結合バッファーの引火点が華氏130度より高い方法。核酸がRNAおよびDNAである方法。

【選択図】 図1A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a) 試験サンプルを酸化金属担体物質および結合バッファーと接触させて、核酸 / 酸化金属担体物質複合体を形成させ (該結合バッファーはカオトロピック剤および界面活性剤を含む)、

b) 該複合体を該試験サンプルから分離し、

c) 該核酸を該酸化金属担体物質から溶出することを含んでなる、試験サンプルから核酸を分離するための方法。

【請求項 2】

該結合バッファーが更に還元剤を含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

該結合バッファーが更に有機溶媒を含み、該結合バッファーの引火点が華氏 130 度より高い、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

該結合バッファーが更に有機溶媒を含み、該結合バッファーの引火点が華氏 130 度より高い、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

該複合体を該試験サンプルから分離した後で且つ該核酸を該酸化金属担体物質から溶出する前に、洗浄工程を更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

該核酸を該酸化金属担体物質から溶出することが、該複合体を、水またはホスファート含有バッファーから選ばれる試薬と接触させることを含む、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 7】

該核酸を該酸化金属担体物質から溶出した後、該核酸を検出する工程を更に含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

該核酸を該酸化金属担体物質から溶出した後で且つ該核酸を検出する前に、該核酸を増幅する工程を更に含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

該核酸が、異なる起源に由来する核酸を含む、請求項 7 記載の方法。

30

【請求項 10】

該核酸が RNA および DNA である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

a) 酸化金属粒子、

b) (i) カオトロピック試薬と

(ii) 界面活性剤とを含む結合バッファー、および

c) 水を含む溶出バッファーを含んでなる、試験サンプルから核酸を分離するためのキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

40

【0001】

(発明の分野)

本発明は、核酸を単離するための方法およびキット、より詳しくは、有意な濃度の可燃性成分を使用しない、核酸を単離するための方法およびキットに関する。

【背景技術】**【0002】**

(発明の背景)

種々の起源から核酸を単離するための幾つかの方法が良く知られている。初期の方法は、タンパク質を選択的に沈殿させ次いでそれを核酸含有溶液から除去するためにフェノールおよび / またはクロロホルムのような有機溶媒を使用するものであった。タンパク質を

50

除去したら、ついで溶存核酸を、アルコールを使用して沈殿させ、固体表面上に集めることが可能であった。ついで、該核酸を可溶化してそれを該固体表面から取り出すために、適当なバッファーを使用するものであった。

【0003】

前記のとおり、核酸配列を精製するための初期方法は、典型的には、起源材料中に存在するタンパク質または他の望ましくない物質から核酸配列を分別的に沈殿させるために有機溶媒を使用するものであった。核酸は、一旦沈殿すると、ガラス攪拌棒のような基体である固体上に容易に集められ、ついでそれは、精製された状態で可溶化される。また、核酸を精製するために、カオトロピック (chaotropic) 剤の存在下で固体基体に対して核酸が示すアフィニティーも利用されている。カオトロピック剤の使用も含めたこれらのサンプル精製方法は、典型的には、該核酸が該固体基体に結合すること又は洗浄操作中に該基体に結合したままであることを確認するために、アルコールのような有機溶媒を使用するものである。そのような方法では、初期の核酸単離方法 (この場合、有機溶媒は、使用する唯一の試薬であった) と比較して比較的低い濃度の有機溶媒を使用するが、それでもなお、これらの方法で用いるアルコール濃度は、大容積のサンプルを加工する場合には特に、処分および安全性についての重大な懸念を招く。

10

【0004】

核酸増幅反応、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼチェイン反応 (LCR)、および多コピーの標的核酸配列を合成するように設計された他の同様の方法の出現に伴い、起源材料 (「サンプル調製物」または「サンプル・プレップ」と、様々に称される) からの核酸配列の単離は、益々重要な研究領域となりつつある。核酸配列の単なる精製以外にも幾つかの点を考慮すると、有用なサンプル調製方法の発見は困難なものとなる。例えば、外部核酸によるサンプルからサンプルへの汚染は、十分に立証されている重大な懸念である。また、所望の核酸配列 (または「標的核酸配列」) を含有する初期サンプルは、しばしば、非常に低濃度の標的配列および比較的高濃度の外部核酸を含有する。さらに、サンプルの調製は、しばしば、使用され最終的には廃棄されうる試薬に関して厳しく管理された領域内で行われる。さらに、増幅反応に使用する目的で核酸を精製する場合には、増幅反応に一般に使用する酵素を阻害する成分を含まないバッファー中に、該核酸を最終的に存在させることが重要である。したがって、有用なサンプルの調製方法の設計においては、核酸配列の単なる精製以外にも幾つかの点を考慮しなければならない。

20

30

【0005】

このように、最低限の扱いで核酸の定量的単離をもたらす可燃性有機溶媒を必要としないサンプル調製方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

(発明の概要)

本発明は、試験サンプルを酸化金属担体物質および結合バッファーと接触させて核酸 / 酸化金属担体物質複合体を形成させ、該複合体を該試験サンプルから分離し、該核酸を該酸化金属担体物質から溶出する工程を含む、試験サンプルから核酸を分離するための方法を提供する。該結合バッファーは、一般には、カオトロピック (chaotropic) 剤および界面活性剤を含むが、有機溶媒および還元剤をも含むうる。好ましくは、該結合バッファーは、華氏 125 度より高い引火点を有する。該方法は、核酸が、異なる核酸含有起源 (例えば、細菌およびウイルス) から精製されそれが後に検出されうる程度に十分に有効である。

40

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図 1 A】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。

【図 1 B】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。

【図 1 C】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。

【図 1 D】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。

50

【図 1 E】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 1 F】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 2 A】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 2 B】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 2 C】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 2 D】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 2 E】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【図 2 F】実施例において得たデータのコンピューター解析を示す。
【発明を実施するための形態】
【0008】

10

(発明の詳細な記載)

本発明で提供する方法は、核酸を、試験サンプル中に存在する他の（必ずしも全てではない）成分から分離するために酸化金属担体物質を使用するものである。特に、該酸化金属は、試験サンプル中の他の成分から核酸を精製するために使用する。本発明で教示する酸化金属担体物質の使用は、現在利用可能なサンプル調製方法より優れた幾つかの重要な利点をもたらすことが見出された。例えば、酸化金属は核酸配列に対して高いアフィニティを有し、したがって、サンプルからサンプルへの汚染が最小限に抑制される。なぜなら、核酸は、望ましくない領域に逃れることなく該酸化金属担体に制御可能に結合しうるからである。また、酸化金属担体は、試験サンプル中の核酸の、より定量的な精製をもたらし、したがって、該試験サンプル中に存在しうる少量の所望の核酸でさえ、集められる。さらに、他のサンプル調製方法に従い一般に使用されるが処分についての重大な懸念を招く有機溶媒（例えば、アルコール、フェノールまたはクロロホルム）を低濃度で含む（または有機溶媒の使用を有意には伴わない）試験サンプルから核酸を分離するために、酸化金属粒子を使用することができる。さらに、増幅反応に完全に適合したバッファーを使用して、核酸を酸化金属担体から溶出することができる。すなわち、該溶出バッファーを増幅反応に適したバッファーと交換することなく、本発明で提供する方法で試験サンプルから分離された核酸を増幅反応において使用することができる。

20

【0009】

また、本発明で提供する方法は、DNAおよび種々の形態のRNAの両方を単一の試験サンプルから分離するために使用することができる。したがって、本発明で提供する方法を用いて、同じ試験サンプル中の種々の異なる細胞および/または生物から核酸を、それが後に検出されうるように分離することができる。

30

【0010】

一般には、該方法は、試験サンプルを酸化金属担体物質および結合バッファーと接触させることを含む。結合バッファーの存在下では、試験サンプル中に含有される全てのタイプの核酸、例えばDNAおよび種々の形態のRNAが該酸化金属担体物質に結合する。ついで該酸化金属担体物質およびそれに結合したいずれかの核酸が、該試験サンプルから分離されうる。所望により、該担体物質およびいずれかの結合核酸を、溶出バッファーを使用して、該核酸を溶出する前に洗浄することができる。ついで、溶出したいずれかの核酸を、よく知られた種々の検出技術のいずれかを用いて検出することができる。

40

【0011】

本発明で用いる「試験サンプル」なる語は、核酸を含有すると疑われるいずれかのものを意味する。該試験サンプルは、例えば血液、眼レンズ液、脳脊髄液、乳、腹水液、滑液、腹膜液、羊水、組織、発酵ブロス、細胞培養、増幅反応の産物、核酸合成産物などを含む生物学的起源のような任意の起源であることが可能であり、あるいはそれらに由来するものであることが可能である。また、試験サンプルは、例えば、下水または布を含む環境的または法的起源からのものでありうる。該試験サンプルは、該起源から得られたままの状態直接的に、あるいは該サンプルの特性を修飾するための前処理の後に使用することができる。したがって、該試験サンプルは、使用前に、例えば血液からの血漿の調製、生物学的流体からの細胞の単離、組織のホモジネーション、細胞またはウイルス粒子の破壊

50

、固体物質からの液体の調製、粘性流体の希釈、液体の濾過、液体の蒸留、液体の濃縮、阻害成分の不活性化、試薬の添加、核酸の精製などにより前処理することができる。

【0012】

本発明で用いる「酸化金属担体物質」は、金属元素の酸化物および水酸化物（その種々の原子価状態のいずれかのもの）を意味する。したがって、例えば、アルミニウム、マグネシウム、チタン、ジルコニウム、鉄、ケイ素、ニッケル、クロム、亜鉛および前記の組合せの酸化物は酸化金属担体物質である。酸化鉄は、好ましい酸化金属担体物質である。したがって、酸化第一鉄（ Fe_3O_4 ）および酸化第二鉄（ Fe_2O_3 ）は、好ましい酸化金属担体物質である。酸化金属担体物質は、例えば、プレート、粒子、コーティング、繊維、多孔性構造体（例えば、フィルター）のような任意の形態でありうる。粒子は、その大きな表面積のため、該酸化金属担体物質の好ましい形態である。

10

【0013】

「結合バッファー」は、試験サンプル中に存在する核酸の、酸化金属担体物質に対する結合を促進する。核酸は、多種多様なバッファー中、該バッファーのpHとは無関係に、酸化金属担体物質に結合することが判明している。したがって、該結合バッファーは、酸性pH（7未満）、中性pH（7に等しい）または塩基性pH（7より大きい）を有する。結合バッファーは、一般には緩衝系を含む。緩衝系は良く知られており、当業者により選択される。緩衝系は、典型的には、弱酸およびその対応塩基（例えば、リン酸ナトリウムおよびリン酸）の水溶液である。結合バッファーは、好ましくは3～12、より好ましくは3～11、最も好ましくは4～10のpHを有する。該結合バッファーはまた、当業者に良く知られた界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤、両性イオン界面活性剤を、1%～25%、好ましくは5%～20%の総濃度で含有する。

20

【0014】

核酸を、例えば、核酸を含有する細胞またはウイルス粒子から直接的に精製する場合には、該結合バッファーは、好ましくは更に、2M～10M、好ましくは3M～6Mの濃度のカオトロピック剤を含む。カオトロピック剤は当技術分野で良く知られており、タンパク質を分解または可溶化する物質を含む。代表的なカオトロピック試薬には、グアニジンイソチオシアナート（GITC）、グアニジンHCl、ヨウ化カリウム、尿素などが含まれるが、これらに限定されるものではない。また、還元剤、例えばメルカプトエタノール、ジチオトレイトールおよび2-メルカプトエタンスルホン酸を、25mM～150mM、好ましくは50mM～100mMの濃度で該結合バッファーに加えることができる。

30

【0015】

必ずしも必要ではないが、該結合バッファーはまた、華氏125°より高い引火点を有する結合バッファーを与えない濃度のアルコールまたは他の有機溶媒を含みうる。該バッファーの引火点は、液体の引火点を測定するための良く知られた方法のいずれかを用いて測定することができる。一般には、15%未満の濃度で使用する有機溶媒は、華氏125°より高い引火点を有する結合バッファーを与える。該結合バッファーに溶媒を加える場合には、低級アルコール、例えばメタノール、エタノール、プロパノールおよびイソプロパノールが、好ましいアルコールである。

40

【0016】

前記のとおり、該結合バッファーの存在下では、該試験サンプル中の核酸は該担体物質に結合する。該核酸と担体物質との複合体が形成したら、該担体物質を該結合バッファーおよび残りの試験サンプルから分離することができる。該担体物質の形態に応じて、分離方法が当業者により選択される。例えば、該担体物質が粒子形態である場合には、該担体物質は、例えば、沈降することが可能であり、残りの液体物質を、吸引により又は該担体物質から該液体を単に排出させることにより、該担体から除去することができる。本発明の担体物質の組成を考慮すると、粒子状担体物質の沈降または単離を促進させるために磁界を用いることが好ましい。

【0017】

所望により、該担体物質と複合体形成した核酸配列を、該担体物質から該核酸を解離し

50

ない任意のバッファーで洗浄することができる。典型的には、該担体物質およびそれと複合体形成した任意の核酸を、残留する及び望ましくない任意の試験サンプル成分から取り出すために、洗浄バッファーを使用する。そのような洗浄バッファーは当技術分野において良く知られており、典型的には、既に挙げられているような界面活性剤の同様の濃度の溶液を含有する。そのような界面活性剤は、典型的には、同様に前記で示した緩衝系中に希釈される。

【0018】

該担体物質と複合体形成した核酸は、洗浄されたか否かにかかわらず、水または溶出バッファーを使用して、該酸化金属担体物質から取り出したり又は解離させることができる。本発明の「溶出バッファー」は、該酸化金属担体物質から結合核酸を分離する任意の試薬または任意の試薬の組合せでありうる。好ましくは、そのような試薬は、該核酸に使用する検出系に適したものであり、特に、核酸増幅系において使用する試薬に適したものである。水（これは蒸留、脱イオン化または精製されうる）は、本発明の目的のための溶出バッファーとして役立ちうる。リン酸塩（ホスファート）またはピシンを含有する溶出バッファー（典型的には、前記の緩衝系を含む）はまた、適当な溶出バッファーであることが判明しており、他のバッファーは、当技術分野の通常の技術（例えば、酸化金属-核酸複合体をバッファーと接触させ、分離が生じたか否かを判定すること（後記で例示する））を用いて実験的に容易に見出されうる。該溶出バッファーは、10 mM ~ 300 mM、好ましくは10 mM ~ 100 mMの濃度の、少なくとも1つのホスファート官能性を含有する有機化合物であるリン酸ナトリウムまたは有機ホスファート化合物の添加を介して無機または有機ホスファートを含有しうる。O-ホスホセリン、ホスホエタノールアミン、カルバミルホスファート、ホスホクレアチン、アデノシン-リン酸（AMP）およびリントグステン酸は、有機ホスファート化合物の典型例である。溶出バッファーのための適当なpHは、6 ~ 10、好ましくは7 ~ 9でありうる。

【0019】

ついで、精製された核酸を、当技術分野で良く知られたアッセイを用いて検出することができる。例えば、検出の前に増幅工程を行い又は行うことなく、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイを用いることができる。例えばTMA、QB-レプリカゼ、NASBA、SDA、LCRおよびPCRのような良く知られた増幅反応は、本発明に従い精製された核酸を増幅するために用いることができる増幅反応の具体例である。

【0020】

前記増幅反応は、典型的には、広く知られた増幅試薬を使用する。本発明で用いる「増幅反応試薬」なる語は、核酸増幅反応に使用されることが良く知られた試薬を意味し、プライマー、プローブ、単一または複数の試薬、酵素、または逆転写、ポリメラーゼおよび/またはリガーゼ活性を別々に又は個々に有する酵素；酵素補因子、例えばマグネシウムまたはマンガン；塩；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）；およびデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）、例えばデオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシシトジン三リン酸およびチミジン三リン酸を含みうる（それらに限定されるものではない）。使用する厳密な増幅試薬は、概ね、使用する個々の増幅反応に基づき当業者により選択される。

【0021】

前記のとおり精製した核酸の増幅は、該酸化金属担体物質から該核酸を解離させるために使用する溶出バッファー中で行うことができる。特に、増幅試薬を該溶出バッファー中の核酸と組合せ、該核酸の増幅を直接的に行うことができる。

【0022】

本発明は更に、本発明の核酸を単離するための適当にパッケージングされた試薬を含むキットを提供する。該キットは、酸化金属担体物質、結合バッファー（前記のとおり）および溶出バッファー（前記のとおり）を含みうる。該キットはまた、単離された核酸を個々のアッセイにおいて使用するための他の適当にパッケージングされた試薬および物質を含有しうる。例えば、該キットは更に、核酸増幅プライマーおよび/または核酸プローブ

、バッファー、ヌクレオチド、酵素、コンジュゲートなどを含みうる。

【0023】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を例示するものであり、特許請求の範囲および明細書を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0024】

実施例 1

酸化金属担体物質を使用する放射能標識RNAの結合および溶出

本実施例では、放射能標識されたRNAを種々の酸化金属担体物質に結合させ、洗浄し、ついで該担体物質から溶出した。結合RNAの量および該洗浄中に失われたRNAの量、そして最終的には、溶出したRNAの量を測定するための方法の経過の全体にわたり、計数/分(CPM)をモニターした。

10

【0025】

本実施例で使用する放射能標識RNAは、Riboprobe T7 RNAポリメラーゼ転写系およびpGEMEX-1陽性対照鋳型(Promega Corporationからのもの)を使用して調製した。該結合および溶出実験においては、約8,000,000 CPMの該放射能標識プローブを、6mlのグアニジンイソチオシアナート-界面活性剤溶液(6M GITC, 10% Tween-20, 16mM セチルトリメチルアンモニウムブロミド, 100mM 酢酸ナトリウム, 100mM ジチオトレイトール, pH4.2, 7.5% エタノール)中の5mgのFe₃O₄またはFe₂O₃酸化金属粒子(ISK Magnetix; Valparaiso, INから入手される)の懸濁液に加えた。該RNAをそれぞれの粒子懸濁液に加えた後、該懸濁液を手短にボルテックスし、37で30分間インキュベートした。

20

【0026】

該インキュベーションの後、該酸化金属粒子をそれぞれのマイクロフュージチューブの表面に磁石で引き付け、該上清をピペットで吸引した。該上清のCPMを測定した。それを、後記表1に「未結合」RNAとして示す。

【0027】

ついで、前記のとおり該粒子を該マイクロフュージチューブの表面に引き付け、該洗浄溶液を該マイクロフュージチューブから吸引する前に、0.5mlの洗浄溶液を加え、新たに生成した懸濁液をボルテックスすることにより、該粒子を洗浄した。該粒子をグアニジンイソチオシアナート-界面活性剤溶液(2M GITC, 5% Tween-20, 50mM KOAc, pH6)で2回洗浄し、50mM Trisバッファー, pH8.0で2回洗浄した。該洗液をプールし、該粒子から除去された標識の量を測定した。それを表1に「洗液」として示す。

30

【0028】

該洗浄溶液を吸引した後、200μlの溶出バッファーを、該洗浄粒子を含有するチューブに加えた。該溶出バッファーは、100mM o-ホスホセリン(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)および300mM Tris塩基の溶液(8.0の最終pHを有する)であった。該溶出バッファーを加えた後、新たに生成した粒子懸濁液を手短にボルテックスし、該懸濁液を70で30分間インキュベートした。インキュベーション後、該粒子を、磁気ラック(magnetic rack)を使用して該チューブの表面上に捕捉し、溶離液を取り出した。該CPMを測定した。それを表1に「溶離液1」として示す。新鮮な溶出バッファーを該粒子に加え、該溶出方法を繰返した。該第2溶出のCPMを表1に「溶離液2」として示す。

40

【0029】

該粒子を200μlの第3アリコート溶出バッファーに再懸濁させ、溶出バッファーおよび再懸濁粒子を含有するサンプルを使用して、該粒子から遊離されないプローブの量を測定した。これを表1に「結合」として示す。

【0030】

50

表 1 に示す全ての値は、全 C P M に対する割合 (%) として表されている。

【 0 0 3 1 】

【 表 1 】

表 1
全 C P M に対する割合 (%)

粒子	未結合	洗液	溶離液 1	溶離液 2	結合
Fe_3O_4	10	2	70	15	3
Fe_2O_3	7	2	63	10	18

10

【 0 0 3 2 】

表 1 のデータにより示されるとおり、該酸化第二鉄および酸化第一鉄粒子は R N A に結合し、該 R N A は該リン酸バッファーでそれぞれの粒子から溶出した。

【 0 0 3 3 】

実施例 2

種々のリン酸濃度を用いる Fe_3O_4 からの R N A の溶出

本実施例では、実施例 1 のとおりに調製した放射能標識 R N A を Fe_2O_3 磁気粒子に結合させ、洗浄し、種々の濃度のリン酸ナトリウム (Na_2HPO_4) バッファーで溶出した。該溶出バッファー濃度は 10 ~ 50 mM Na_2HPO_4 (pH 9) の範囲であった。約 23, 000, 000 C P M の該放射能標識核酸を 30 ml のグアニジンイソチオシアナート - 界面活性剤溶液 (4 M G I T C , 10 % Tween - 20 , 16 mM セチルトリメチルアンモニウムブロミド , 100 mM 2 - メルカプトエタンスルホン酸 , 100 mM 酢酸カリウム , pH 6) 中の 25 mg の Fe_2O_3 酸化金属粒子の懸濁液 (水中の 10 % w / v 粒子懸濁液 0.25 ml) に加えた。ついで、5つの 1 ml サンプルの希釈効果を刺激するために、5 ml の水を該懸濁液に加えた。該懸濁液を手短にボルテックスし、それぞれ 7 ml の 5 つの等しいアリコートに分割し、該懸濁液の全てを 37 で 20 分間インキュベートした。

20

【 0 0 3 4 】

該インキュベーション後、該酸化金属粒子をそれぞれのマイクロフュージチューブの表面に磁石で引き付け、該上清をピペットで吸引した。未結合プローブの量をガイガー計数管でモニターし、同じ様態でモニターした該粒子に結合した放射能の量と比較して非常に少量の放射能標識核酸を捕捉した。該未結合物質の厳密な C P M は測定しなかった。

30

【 0 0 3 5 】

ついで、前記のとおり該マイクロフュージチューブの表面に該粒子を引き付け該洗浄溶液を該マイクロフュージチューブから吸引する前に、0.5 ml の洗浄溶液を加え、新たに生成した懸濁液をボルテックスすることにより、該粒子を洗浄した。該粒子を 2 M G I T C 、 5 % Tween - 20 、 50 M K O A c (pH 6) で 2 回洗浄し、50 mM T r i s バッファー (pH 8.0) で 2 回洗浄した。該洗浄をガイガー計数管でモニターした。また、該洗浄操作中に遊離された放射能の量は無視しうるものであることが判明した。該サンプルを該溶出バッファーのそれぞれの 0.2 ml で 73 で 10 分間にわたり溶出した。該溶離液を、該粒子の磁気捕捉後に集め、保存した。該溶出プロトコルを繰返し、該第 2 溶離液も保存した。また、溶出バッファーの第 3 アリコートに該粒子を加え、懸濁液中の粒子を使用して、結合プローブの量を測定した。該溶離液および粒子懸濁液のそれぞれの 20 μ l アリコートを 5 ml のシンチレーション蛍光体と混合し、計数した。表 2 は、この実験で使用した溶出バッファー中のリン酸ナトリウムの濃度 (第 1 欄) 、第 1 および第 2 溶出後に回収された全計数に対する割合 (%) (第 2 欄および第 3 欄) 、ならびに両方の溶出後の磁気粒子上に残存する計数に対する割合 (%) (「 結合 」) を示す。

40

50

【 0 0 3 6 】

【 表 2 】

表 2

溶出バッファー	溶出 1	溶出 2	結合
1 0 mM Na_2HPO_4	4 5	2 0	3 5
2 0 mM Na_2HPO_4	6 8	1 8	1 4
3 0 mM Na_2HPO_4	7 5	1 6	9
4 0 mM Na_2HPO_4	7 6	1 6	8
5 0 mM Na_2HPO_4	7 9	1 4	7

10

【 0 0 3 7 】

表 2 に示すとおり、種々の濃度のリン酸バッファーが該酸化金属粒子から該 RNA を溶出した。

【 0 0 3 8 】

実施例 3有機ホスファート溶出バッファーの使用

20

本実施例では、種々の有機ホスファートバッファーを、それらが酸化金属担体物質から核酸を溶出する能力に関して、無機ホスファートバッファーと比較して試験した。該溶出バッファー中で使用した有機ホスファート化合物の全ては、Sigma Chemical Co. から入手した。表 3 に示す場合を除き、すべてのバッファーは 5 0 mM で調製し、1 M トリス塩基で 6 . 5 ~ 9 の最終 pH に pH 調節した。前記実施例と同様、該放射能標識 RNA を実施例 1 のとおりに調製した。約 1 , 0 0 0 , 0 0 0 C P M の該放射能標識 RNA を 1 2 m l のグアニジンイソチオシアナート - 界面活性剤溶液 (6 M G I T C , 1 0 % Tween - 2 0 , 1 6 m M セチルトリメチルアンモニウムブロミド , 1 0 0 m M 酢酸ナトリウム , 1 0 0 m M ジチオトレイトール , pH 4 . 2 , 7 . 5 % エタノール) 中の 1 0 m g の Fe_2O_3 酸化金属粒子の懸濁液に加えた。サンプルの添加を刺激するために、2 m l の水を該懸濁液に加えた。該懸濁液を手短にボルテックスし、3 7 ° で 2 5 分間インキュベートした。該粒子を磁氣的に集め、該上清を除去した。ガイガー計数管で調べたところ、該上清中でシグナルの有意な喪失は観察されなかった。該粒子を 6 m l の 5 0 m M 酢酸カリウム (pH 6 . 0) に再懸濁させることにより、該粒子を洗浄した。該粒子を磁氣的に集め、該洗浄流体を取り出した。ガイガー計数管で調べたところ、該上清中でシグナルの有意な喪失は観察されなかった。該洗浄操作を繰返した。ついで該粒子を 6 m l の該酢酸カリウム洗浄流体に再懸濁させ、十分に混合し、0 . 5 m l アリコートをして 1 0 個の別々の 1 . 5 m l ミクロフージチューブ内に分注した。該チューブを磁気ラックに移し、該粒子を該チューブの表面に集め、該洗浄流体を除去した。ついで 1 0 0 μ l の種々の溶出バッファーを該微粒子に加え、7 0 ° で 1 0 分間インキュベートした。ついで 5 0 μ l の該溶出サンプルをシンチレーション計数管中で計数して、遊離したプローブの量を測定した。出発物質 (核酸) のおよその全計数は 4 0 , 0 0 0 C P M / サンプルであった。表 3 は、この実験の結果を示し、該溶出バッファーおよびその溶出バッファーで遊離した計数を示す。

30

40

【 0 0 3 9 】

【表 3】

表 3

溶出バッファー	遊離した計数
アデノシンーリン酸 (pH 6.5)	17, 229
ホスホクレアチン (pH 7)	9172
〇-ホスホリエタノールアミン (pH 7)	3379
カルバミルホスファート (pH 7)	27, 717
ホスホノ酢酸 (pH 8)	29, 367
ホスホリルコリン (pH 7)	404
リントングステン酸 (pH 8)	34, 825
〇-ホスホ-d l-セリン (pH 7)	18, 807
30mM Na ₂ HPO ₄ (pH 8)	29, 277
30mM Na ₂ HPO ₄ (pH 9)	20, 468

10

20

【0040】

表 3 に示すとおり、有機ホスファートバッファーは、酸化金属担体物質から結合核酸を溶出するための適当なバッファーである。

【0041】

実施例 4

血漿中の HIV ビリオンからの RNA の抽出

本実施例では、前記の酸化金属粒子を使用して、種々のレベルの HIV ビリオンを含有する 4 つの試験パネルの血漿から、HIV 核酸を抽出した。陰性血漿を陰性対照として使用した。また、商業的に入手可能な Q i a g e n ウイルス核酸抽出キット (Q i a g e n Inc. ; Valencia CA) を使用して、該血漿サンプルからの核酸を抽出した。A b b o t t L C x (登録商標) Q u a n t i t a t i v e HIV アッセイ (A b b o t t Laboratories ; A b b o t t Park , IL から入手可能) を用いて、該サンプル中の HIV 核酸を分析した。

30

【0042】

それぞれのサンプル調製方法は、それらの 4 つの試験パネルおよび該陰性対照のそれぞれからの 1 ml の血漿サンプルに対して行った。Q i a g e n 法を、該製造業者の説明に従い、該パネルに対して行い、A b b o t t L C x (登録商標) HIV アッセイを用いて該サンプルを定量した。試験パネル 1 ~ 4 は、それぞれ、28 ビリオン / ml、110 ビリオン / ml、800 ビリオン / ml および 10,000 ビリオン / ml を含有していた。1 ml の試験血漿サンプルを 6 ml の結合バッファー (5 M グアニジニウムイソチオシアナート, 10% Tween - 20, 16 mM セチルトリメチルアンモニウムブロミド, 100 mM ジチオトレイトール, 100 mM 酢酸 Na, pH 4.1) および 5 mg の Fe₂O₃ 粒子と混合することにより、該酸化金属法を行った。該ライセートを 37 で 20 分間インキュベートした。ついで、前記のとおり該粒子を該マイクロフュージチューブの表面に引き付け該洗浄溶液を該マイクロフュージチューブから吸引する前に、0.5 ml の洗浄溶液を加え、新たに生成した懸濁液をボルテックスすることにより、該粒子を洗浄した。該粒子を 2 M G I T C、5% Tween - 20、50 mM K O A c (pH 6) で 2 回洗浄し、50 mM T r i s バッファー (pH 8.0) で 2 回洗浄した。該洗浄溶液を吸引した後、200 μl の溶出バッファーを、該洗浄粒子を含有するチューブに加えた。該溶出バッファーは、50 mM o - ホスホセリンおよび 150 mM

40

50

Tris塩基の溶液（8.0の最終pHを有する）であった。該溶出バッファーを加えた後、新たに生成した粒子懸濁液を手短にボルテックスし、該懸濁液を70℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、該粒子を、磁気ラック（magnetic rack）を使用して該チューブの表面上に捕捉し、該溶離液を取り出した。ついで、それぞれのサンプル調製方法に従い回収された50μlの該溶液を増幅および検出に付した。

【0043】

それぞれのサンプル調製方法から50μlのアリコートを取逆転写し、PCRを用いて増幅した。1×EZバッファー、2.5mM塩化マンガン、それぞれ0.15mMの最終濃度で存在するdNTP（dATP、dGTP、dTTPおよびdCTP）および5単位 / 反応の濃度の組換えテルムス・テルモフィルス（Thermus thermophilus）ポリメラーゼを使用して、RT-PCRを行った。該標識プライマーは40nMの濃度で使用し、該未標識プライマー濃度は40nMの濃度で使用した。該プローブ（これは、前記のとおりに標識されており、最終的には、生じたハイブリッド複合体の検出の前に該標識プライマーの産物とハイブリダイズする）は、10nMの濃度で使用した。

【0044】

反応混合物を取逆転写し、増幅した。これはPerkin-Elmer 480 Thermal Cycler中で行った。反応混合物を、まず、該RNAを取逆転写するために62℃で30分間、ついで94℃で2分間インキュベートした。ついで、増幅の初期段階における該反応のストリンジェンシーを促進するために、タッチダウン（touchdown）またはステップ・ダウン（step-down）プロトコールによりPCR増幅を開始した。これは、以下のとおりの8サイクルを用いるものであった：94℃で30秒間およびそれに続く70℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く69℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く68℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く67℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く66℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く65℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く64℃で80秒間の1サイクル、ついで94℃で30秒間およびそれに続く63℃で80秒間の1サイクル。ついで、94℃で30秒間およびそれに続く62℃で80秒間の35サイクルで、更なる増幅を行った。該反応混合物をサーマル（熱的）サイクルに付した後、すべての複製体をプールし、サイクリングによるばらつきの排除のためにピペティングにより混合した。ついで該混合物を分割し、97℃で5分間変性させた。この後、温度を15℃に5分間低下させることにより、プローブオリゴハイブリダイゼーションを行った。ついで該温度を4℃に低下させ、該反応産物が検出されるまでサンプルを4℃に維持した。

【0045】

それらの4つの試験パネルおよび陰性対照に関して得られた結果を、後記表4にコピー / mlとして示す。

【0046】

【表4】

表4

サンプル調製方法	陰性対照	パネル1	パネル2	パネル3	パネル4
Qiagen	5	75	90	900	9,000
酸化金属	9	80	100	850	10,000

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

表 4 からの結果において示されるとおり、該酸化金属サンプル調製方法は、増幅および検出に十分な量で核酸を血漿から成功裏のうちに抽出した。

【 0 0 4 8 】

実施例 5

血漿中の H I V および H B V ビリオンからの核酸の抽出

本実施例では、前記の酸化金属粒子を使用して、H I V ビリオンおよび H B V ビリオンの両方をそれぞれ 1 0 0 0 ビリオン / m l の濃度で含有する 1 m l の血漿から、H I V 核酸 (R N A) および H B V 核酸 (D N A) を抽出した。陰性血漿を陰性対照として使用した。該細胞溶解条件は、G I T C (3 . 3 3 ~ 4 . 6 6 M)、D T T (0 ~ 1 0 0 m M)、T w e e n - 2 0 (1 3 . 3 ~ 2 4 %) および C T A B (0 ~ 2 4 m M) の濃度ならびに p H (4 ~ 1 0) ならびに温度 (3 5 ~ 5 5) の範囲に及ぶよう、様々に変化させた。4 5 個の異なる組合せの試薬および条件を該細胞溶解工程において使用し、3 m l の細胞溶解バッファーで全てのサンプルを抽出した。各抽出において 5 m g の F e ₂ O₃ 粒子を使用した。各条件は少なくとも 3 回使用し、中心 (c e n t e r p o i n t) 条件は 3 0 回使用した。該粒子を 2 M G I T C、5 % T w e e n - 2 0、5 0 M K O A c (p H 6) で 2 回洗浄し、5 0 m M T r i s バッファー (p H 8 . 0) で 2 回洗浄した。該洗浄溶液を吸引した後、2 0 0 μ l の溶出バッファーを、該洗浄粒子を含有するチューブに加えた。該溶出バッファーは、5 0 m M o - ホスホセリンおよび 1 5 0 m M T r i s 塩基の溶液 (8 . 0 の最終 p H を有する) であった。該溶出バッファーを加えた後、新たに生成した粒子懸濁液を手短にボルテックスし、該懸濁液を 7 0 ° で 3 0 分間インキュベートした。インキュベーション後、該粒子を、磁気ラック (m a g n e t i c r a c k) を使用して該チューブの表面上に捕捉し、該溶離液を取り出した。ついで、それぞれのサンプル調製方法に従い回収された溶液 5 0 μ l を増幅および検出に付した。該溶出物質を分割し、P C R に基づく 2 つのアッセイ (1 つは H I V および 1 つは H B V) を用いて分析した。該アッセイは「ビーコン」アッセイであり、ハイブリダイゼーションプローブ (これは、増幅された標的物質への該プローブの結合に際して蛍光の増加を示す) を用いる。

【 0 0 4 9 】

該 H I V アッセイのためには、それぞれのサンプル調製方法から 5 0 μ l アリコート逆転写し、P C R を用いて増幅した。1 × E Z バッファー、3 m M 塩化マンガン、それぞれ 0 . 1 0 0 m M の最終濃度で存在する d N T P (d A T P , d G T P , d T T P および d C T P) および 1 4 . 4 単位 / 反応の濃度の組換えテルムス・テルモフィルス (T h e r m u s t h e r m o p h i l u s) ポリメラーゼを使用して、R T - P C R を行った。フォワードプライマー (配列番号 1) は 1 8 8 n M の濃度で使用し、リバースプライマー (配列番号 2) は 4 6 9 n M の濃度で使用した。該 H I V ビーコンプローブ (配列番号 3) は 1 0 0 n M の濃度で使用した。反応混合物を逆転写し、増幅した。これは、9 6 ウェル増幅トレイを使用して P e r k i n - E l m e r 9 7 0 0 T h e r m a l C y c l e r 中で行った。反応混合物を、まず、該 R N A を逆転写するために 5 9 ° で 3 0 分間インキュベートした。ついで 9 2 ° で 1 5 秒間およびそれに続く 5 9 ° で 3 0 秒間およびそれに続く 7 2 ° で 1 5 秒間の 5 サイクルで P C R 増幅を行った。この後、9 2 ° で 4 秒間およびそれに続く 6 4 ° で 8 秒間およびそれに続く 7 2 ° で 4 秒間の 5 5 サイクルを行った。ついで該反応を 9 2 ° に 3 0 秒間加熱し、ついで 4 5 ° で 1 5 分間維持し、ついで 2 5 ° に低下させた。C y t o f l u o r S e r i e s 4 0 0 0 プレートリーダー中で該プレートを読み取ることにより、シグナルの量を測定した。

【 0 0 5 0 】

該 H B V アッセイのためには、それぞれのサンプル調製方法から 5 0 μ l アリコートを、P C R を用いて増幅した。1 × P C R バッファー、3 . 5 m M 塩化マグネシウム、それぞれ 0 . 1 0 0 m M の最終濃度で存在する d N T P (d A T P , d G T P , d T T P および d C T P) および 7 単位 / 反応の濃度の A m p l i T a q G o l d を使用して、

R T - P C Rを行った。フォワードプライマー（配列番号4）は200 n Mの濃度で使用し、リバースプライマー（配列番号5）は300 n Mの濃度で使用した。該H B Vビーコンプローブ（配列番号6）は50 n Mの濃度で使用した。反応混合物を、96ウェル増幅トレイを使用してP e r k i n - E l m e r 9700 T h e r m a l C y c l e r中で増幅した。反応混合物を、まず、該酵素を活性化するために94 で10分間インキュベートした。ついで94 で60秒間およびそれに続く58 で30秒間の45サイクルでP C R増幅を行った。ついで該反応を58 で10分間維持し、該温度を94 に5分間上昇させ、ついで55 で15分間維持し、ついで25 に低下させた。C y t o f l u o r S e r i e s 4000プレートリーダー中で該プレートを読み取ることにより、シグナルの量を測定した。

10

【0051】

該研究において種々のサンプルから生じたシグナルを、該H I Vサンプルに関しては表5に、該H B Vサンプルに関しては表6に示す。これらの表は、該サンプルに用いた細胞溶解条件、該サンプルで加工された内部対照（i n t C t r l）から生じたシグナル、および該サンプルからのH I VまたはH B Vシグナルを示す。陰性（N e g）サンプルからのシグナルに対する陽性（P o s）サンプルからのシグナルの比率をプロットし、S A S I n s t i t u t e I n c.からのJ M Pソフトウェアを使用して解析した。該H I V抽出物および該H B V抽出物の両方からの結果（それぞれ図1および2）は、H I VおよびH B Vの両方に関する方法において、広範囲の条件を使用することが可能であること、および多数の条件がH I VおよびH B Vの両方に関する同時抽出を可能にすることを示している。

20

【0052】

【表 5】

表 5

ハ ⁺ ター ⁻	mM CTAB	mM DTT	pH	% Tween-20	M GITC	温度	Neg Fam (HIV)	Neg TR (int Ctrl)	Pos Fam (HIV)	Pos TR(int Ctrl)
-----	0	0	4	13.3	3.33	35	5486.333	3692	11262	8526.333
----++	0	0	4	13.3	4.66	55	4424.667	9302	11482	7854.333
---+-+	0	0	4	24	3.33	55	5666	4089.333	7072.333	5088.333
---+--	0	0	4	24	4.66	35	5015.667	12252.33	19858.67	11733
--+--+	0	0	10	13.3	3.33	55	4879.333	13952	21567	12767
--+--+	0	0	10	13.3	4.66	35	4479.333	14033.33	23514.67	12948
-+++-	0	0	10	24	3.33	35	4977	9272	14768	7690
-++++	0	0	10	24	4.66	55	4806.333	10057.33	15730.33	8273.667
+----+	0	100	4	13.3	3.33	55	5393	6056.333	9859.333	6102.333
+---+-	0	100	4	13.3	4.66	35	5483.667	11603.67	14634.67	9215
+--+--	0	100	4	24	3.33	35	5834	6525.667	8937	5768.667
+--+++	0	100	4	24	4.66	55	5011.333	8967.333	11264	8388
++---	0	100	10	13.3	3.33	35	4099	8307.333	11902.33	7301.333
++-++	0	100	10	13.3	4.66	55	4374.667	3469.333	5251.333	3742.667
+++-+	0	100	10	24	3.33	55	4273.667	5029	7707	4766
+++-+	0	100	10	24	4.66	35	4448.333	10494	19596.33	10200.67
+----+	24	0	4	13.3	3.33	55	5432	8296	14120	9926.333
+---+-	24	0	4	13.3	4.66	35	4669.333	13721.67	15696	12326
+--+--	24	0	4	24	3.33	35	5425.667	5036	12432.67	7527
+--+++	24	0	4	24	4.66	55	4964.667	10306.33	14561	9487
++---	24	0	10	13.3	3.33	35	4827.333	15834	15675.33	12000
++-++	24	0	10	13.3	4.66	55	4698.333	9623.667	15484.67	7829
+++-+	24	0	10	24	3.33	55	4667	10944.33	12604	6841
+++-+	24	0	10	24	4.66	35	4761.333	11392.33	18971.67	9964.333
++---	24	100	4	13.3	3.33	35	5615	5676.333	12048.67	8041.667
++-++	24	100	4	13.3	4.66	55	4729.333	6406	10190.67	6842
++-+-	24	100	4	24	3.33	55	4918	4094	5869.667	4057.333
++-++	24	100	4	24	4.66	35	5823	12712.33	17049.67	9150
+++--	24	100	10	13.3	3.33	55	4287	4109	6732.333	4039
+++--	24	100	10	13.3	4.66	35	4724.667	6374	11157.33	5757
++++-	24	100	10	24	3.33	35	4672.333	9511.333	15455	7734
+++++	24	100	10	24	4.66	55	3979.333	3732	5256.667	3812
000000	12	50	7	18.65	3.995	45	4850.833	13233.87	21264.6	11335.3
-00000	0	50	7	18.65	3.995	45	4921	14609.67	27921.67	11625.67
+00000	24	50	7	18.65	3.995	45	4405.667	14558.33	25260	11686
0-0000	12	0	7	18.65	3.995	45	4490.333	13230.33	24602.33	11658
0+0000	12	100	7	18.65	3.995	45	4585.667	10166	19681.33	8925.333
00-000	12	50	4	18.65	3.995	45	5469.667	9663.333	15432.33	7177.667
00+000	12	50	10	18.65	3.995	45	4450.667	8384.333	16545.67	5780.667
000-00	12	50	7	13.3	3.995	45	4665	10743	21749	10346.33
000+00	12	50	7	24	3.995	45	4551	10010.33	21181.33	8998.667
0000-0	12	50	7	18.65	3.33	45	4614.667	10809.67	23293.33	11219
0000+0	12	50	7	18.65	4.66	45	4811.333	13213	22731.67	10757.33
00000-	12	50	7	18.65	3.995	35	5195	12653	21010.33	8770.667
00000+	12	50	7	18.65	3.995	55	4798.667	11609	20922	8777.333

【 0 0 5 3 】

【表 6】

表 6

ハートン	mM CTAB	mM DTT	pH	% Tween-20	M GITC	温度	Neg Fam (HBV)	Neg TR (int Ctrl)	Pos Fam (HBV)	Pos TR(int Ctrl)
-----	0	0	4	13.3	3.33	35	13763	15857	19806	18835
-----+	0	0	4	13.3	4.66	55	12691	16123	24121	16359
---++	0	0	4	24	3.33	55	16384	20296	20057	18493
---++-	0	0	4	24	4.66	35	13143	19228	17052	21522
--++	0	0	10	13.3	3.33	55	16249	20133	22242	22616
--++-	0	0	10	13.3	4.66	35	13593	24713	19682	26061
--++-	0	0	10	24	3.33	35	14912	19756	19189	22207
---+++	0	0	10	24	4.66	55	15950	27230	18497	24681
-+---+	0	100	4	13.3	3.33	55	15319	23021	27155	19706
-+---+	0	100	4	13.3	4.66	35	16135	24778	26854	20820
-+---+	0	100	4	24	3.33	35	17592	21386	27391	20735
-+---+	0	100	4	24	4.66	55	14416	22597	27652	17980
-++---	0	100	10	13.3	3.33	35	12321	17029	27663	18062
-++---	0	100	10	13.3	4.66	55	12937	24453	32857	19601
-++---	0	100	10	24	3.33	55	13406	23679	28120	19813
-++---	0	100	10	24	4.66	35	14247	23632	29093	19725
+---+	24	0	4	13.3	3.33	55	14825	22245	27359	21866
+---+	24	0	4	13.3	4.66	35	14557	20537	19770	19482
+---+	24	0	4	24	3.33	35	16013	19770	18575	14349
+---+	24	0	4	24	4.66	55	14816	21794	24068	18830
+---+	24	0	10	13.3	3.33	35	14828	13285	16079	9985
+---+	24	0	10	13.3	4.66	55	14470	19531	16739	21070
+---+	24	0	10	24	3.33	55	15201	23681	14966	18047
+---+	24	0	10	24	4.66	35	15645	18663	17625	21305
++---	24	100	4	13.3	3.33	35	14931	21110	27690	20362
++---	24	100	4	13.3	4.66	55	13502	17549	29140	16016
++---	24	100	4	24	3.33	55	13904	20313	24367	14119
++---	24	100	4	24	4.66	35	15840	26220	29686	21216
++---	24	100	10	13.3	3.33	55	14098	20319	26624	16095
++---	24	100	10	13.3	4.66	35	15464	27136	34458	17911
++---	24	100	10	24	3.33	35	15052	24848	29940	20050
++---	24	100	10	24	4.66	55	13094	19608	25388	14897
000000	12	50	7	18.65	3.995	45	14548	23128	24077	19954
-00000	0	50	7	18.65	3.995	45	13771	24107	18997	24754
+00000	24	50	7	18.65	3.995	45	12406	23835	17921	21838
0-0000	12	0	7	18.65	3.995	45	12699	23712	19340	24507
0+0000	12	100	7	18.65	3.995	45	13936	25988	26736	19736
00-000	12	50	4	18.65	3.995	45	14715	26245	27755	18442
00+000	12	50	10	18.65	3.995	45	13446	25754	26293	18507
000-00	12	50	7	13.3	3.995	45	12827	23411	23485	18005
000+00	12	50	7	24	3.995	45	13103	23340	25270	20891
0000-0	12	50	7	18.65	3.33	45	13992	24536	24898	21251
0000+0	12	50	7	18.65	4.66	45	14545	25227	25865	21429
00000-	12	50	7	18.65	3.995	35	15186	25297	23463	19417
00000+	12	50	7	18.65	3.995	55	15190	27421	23149	20780

【 0 0 5 4 】

実施例 6

尿中のクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエからの核酸の抽出

本実施例では、前記の酸化金属方法を用いて、クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis) およびナイセリア・ゴノレエ (Neisseria gonorrhoeae) の両方を含む 1ml の尿から核酸を抽出した。また、LCx (登録商標) Urine Specimen Preparation Kit を使用して、該尿サンプルからの核酸を抽出した。Abbott Laboratories からの LCx (登録商標) を使用して、該抽出サンプルをクラミジア・トラコマチス (Ch

lamydia trachomatis) およびナイセリア・ゴノレエ (Neisseria gonorrhoeae) の両方に関して試験した。

【0055】

クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis) およびナイセリア・ゴノレエ (Neisseria gonorrhoeae) の両方に関して陰性であると試験判定されたプールされた尿を使用して、Abbott Laboratories からの (登録商標) アッセイを使用して該サンプルパネルを作製した。クラミジア・トラコマチス (C. trachomatis) およびナイセリア・ゴノレエ (N. gonorrhoeae) の陽性ストックを該陰性尿に加えることにより、陽性尿パネルを作製した。「低陽性」パネルは、尿 1ml 当たり 0.5 基本小体 (EB) のクラミジア・トラコマチス (C. trachomatis) および 0.5 コロニー形成単位 (cfu) のナイセリア・ゴノレエ (N. gonorrhoeae) を含有していた。「高陽性」パネルは、尿 1ml 当たり 10 EB のクラミジア・トラコマチス (C. trachomatis) および 10 cfu のナイセリア・ゴノレエ (N. gonorrhoeae) を含有していた。

10

【0056】

それぞれのサンプル調製方法は、それらの2つの試験パネルおよび該陰性対照のそれぞれからの 1ml の尿サンプルに対して行った。1ml の試験尿サンプルを 3ml の細胞溶解バッファー (4.3M グアニジニウムイソチオシアナート, 18% Tween-20, 12mM セチルトリメチルアンモニウムブロミド, 50mM ジチオトレイトール, 100mM Tris, pH 7.6) および 5mg の Fe_2O_3 粒子 (M-2038, ISK Corporation) と混合することにより、該酸化金属法を行った。該抽出混合物はまた、7.5 μ g のポリA RNアーゼを担体として含有していた。該ライセートを 45 で 20 分間インキュベートした。該粒子を磁氣的に捕捉し、該ライセートを吸引により除去した。該粒子を 2M GITC、5% tween-20、50mM 酢酸K (pH 6) で2回洗浄し、50mM Tris バッファー (pH 8.0)、0.45% アジ化Naで2回洗浄した。該洗浄溶液を吸引した後、100 μ l の溶出バッファーを、該洗浄粒子を含有するチューブに加えた。該溶出バッファーは、保存剤として 0.045% アジ化Naを含有する水であった。該溶出バッファーを加えた後、該粒子をピペッティングにより再懸濁させ、該懸濁液を 70 で 20 分間インキュベートした。インキュベーション後、該粒子を、磁気ラック (magnetic rack) を使用して該チューブの表面上に捕捉し、該溶離液を取り出した。ついで、該サンプルから回収された 100 μ l を 900 μ l の LCx (登録商標) Urine Specimen Resuspension Buffer (50mM MgCl₂ および界面活性剤) で希釈した。該アッセイにおいて必要な MgCl₂ を加えるためには、該抽出サンプルに該再懸濁バッファーを加えなければならない。ついで 50 μ l の該サンプルを、Abbott Laboratories からのクラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis) およびナイセリア・ゴノレエ (Neisseria gonorrhoeae) LCx (登録商標) アッセイにおいて使用した。

20

30

【0057】

また、LCx (登録商標) Urine Sample Preparation Kit を使用して、該サンプルを調製した。1ml の尿サンプルを 9,000 $\times$ g で 15 分間にわたり遠心分離し、該上清を除去した。900 μ l の LCx (登録商標) Urine Specimen Resuspension Buffer を該ペレットに加え、該サンプルをボルテックスして該サンプルを再懸濁させた。ついで該サンプルを 97 で 15 分間加熱して、該DNAを遊離させた。冷却後、該酸化金属法に使用した 100 μ l の該溶出バッファー (水および 0.045% アジ化Na) を該抽出サンプルに加えて、該酸化金属抽出サンプルに対する成分の濃度を平衡化した。ついで 50 μ l の該サンプルを、Abbott Laboratories からのクラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis) およびナイセリア・ゴノレエ (Neisseria g

40

50

onorrhoeae) (登録商標) アッセイにおいて使用した。また、陰性および陽性対照を該アッセイにおいて使用した。クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis) アッセイに関する結果は、0 比率 (rate) シグナルを有する陰性対照、および 1600 の比率シグナルを有する陽性対照を含んでいた。クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis) アッセイに関する残りの結果を表 7 に示す。ナイセリア・ゴノレエ (Neisseria gonorrhoeae) アッセイに関する結果は、0 の比率シグナルを有する陰性対照、および 950 の比率シグナルを有する陽性対照を含んでいた。ナイセリア・ゴノレエ (Neisseria gonorrhoeae) アッセイに関する残りの結果を表 8 に示す。両方の細胞型に関する LCx (登録商標) アッセイのための標準的抽出方法および該酸化金属法を行った。

【0058】

【表 7】

表 7

アッセイ型&サンプル濃度	比 率
LCx®陰性尿	0
LCx®低陽性尿	1000
LCx®高陽性尿	1900
Fe ₂ O ₃ 陰性尿	0
Fe ₂ O ₃ 低陽性尿	1400
Fe ₂ O ₃ 高陽性尿	1900

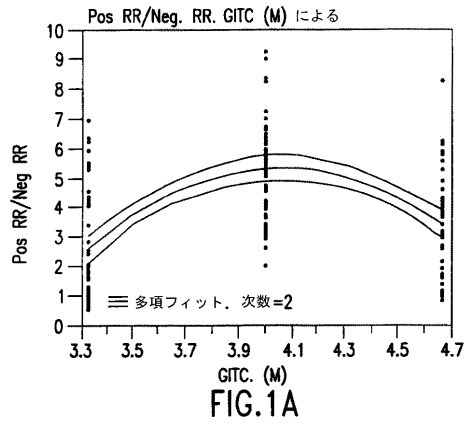
【0059】

【表 8】

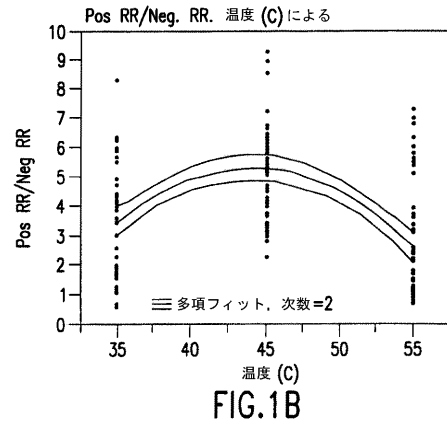
表 8

アッセイ型&サンプル濃度	比 率
LCx®陰性尿	0
LCx®低陽性尿	450
LCx®高陽性尿	1000
Fe ₂ O ₃ 陰性尿	0
Fe ₂ O ₃ 低陽性尿	500
Fe ₂ O ₃ 高陽性尿	1000

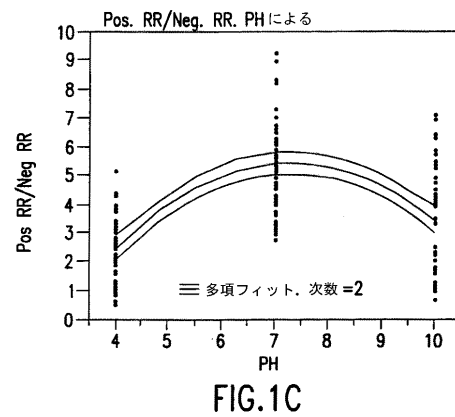
【図 1 A】



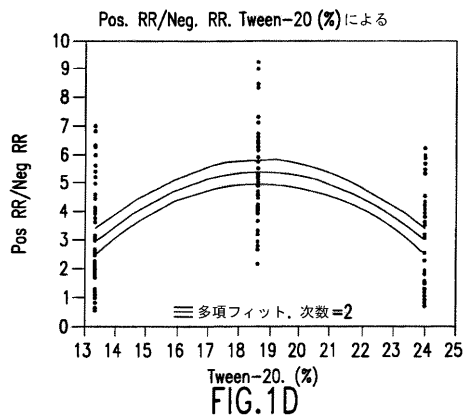
【図 1 B】



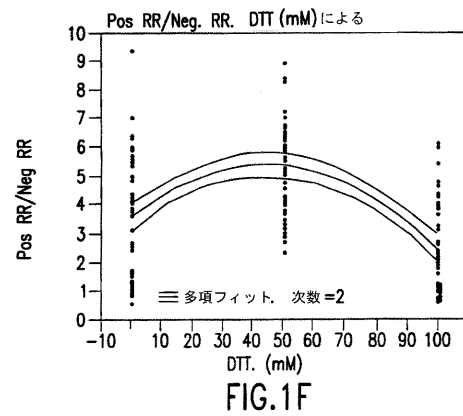
【図 1 C】



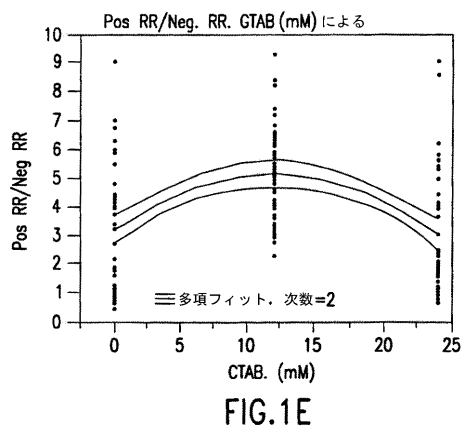
【図 1 D】



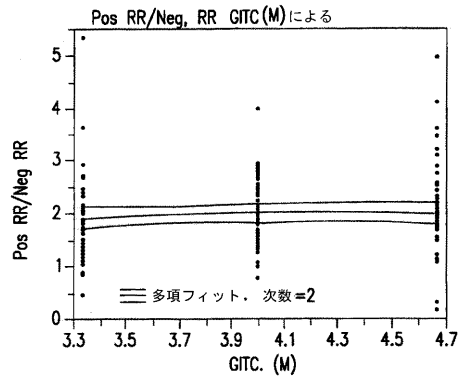
【図 1 F】



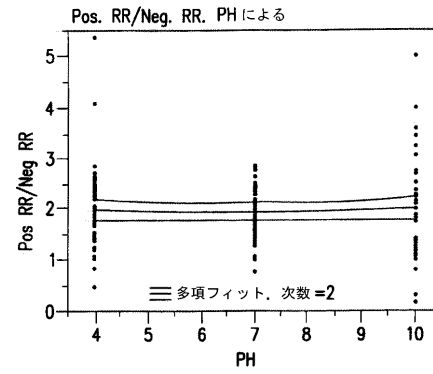
【図 1 E】



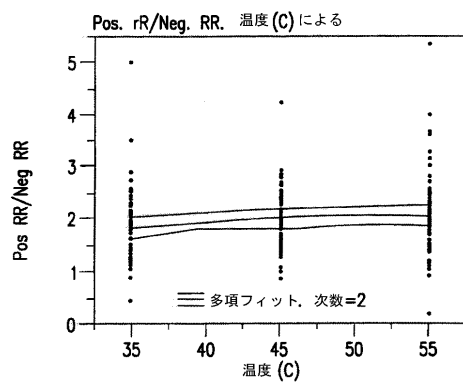
【 図 2 A 】



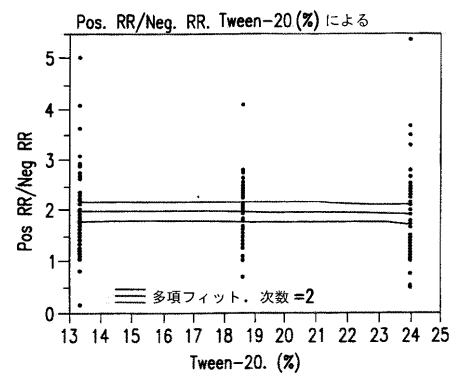
【 図 2 C 】



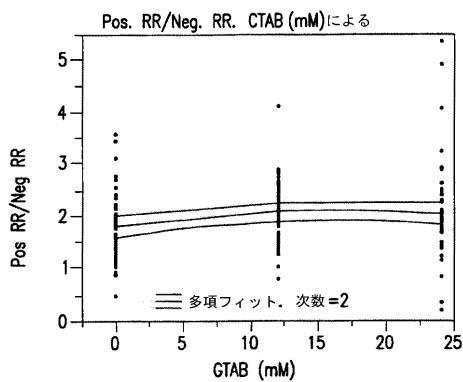
【 図 2 B 】



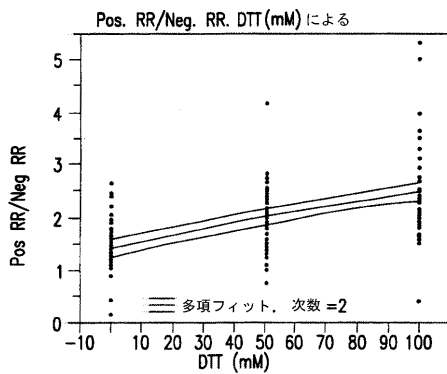
【 図 2 D 】



【 図 2 E 】



【 図 2 F 】



【配列表】

2014012011000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月9日(2013.9.9)

【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】

試験サンプルからRNAを分離するための方法であって、

a) 試験サンプルを酸化鉄担体物質および結合バッファーと接触させて、RNA / 酸化鉄担体物質複合体を形成させ(該結合バッファーはカオトロピック剤、有機溶媒および界面活性剤を含み、該結合バッファーの引火点は54.4 (華氏130度)より高い)、

b) 該複合体を該試験サンプルから分離し、ならびに

c) 該RNAを該酸化鉄担体物質から溶出することを含み、該RNAを該酸化鉄担体物質から溶出することが、該複合体をホスファート含有バッファーと接触させることを含み、

ここで、該方法によって溶出バッファーを交換することなく該RNAを増幅反応において直接使用することが可能となる該方法。

【請求項2】

該結合バッファーが更に還元剤を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

該複合体を該試験サンプルから分離した後で且つ該RNAを該酸化鉄担体物質から溶出する前に、洗浄工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

該RNAを該酸化鉄担体物質から溶出した後、該RNAを検出する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

該RNAを該酸化鉄担体物質から溶出した後で且つ該RNAを検出する前に、該RNAを増幅する工程を更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

該RNAが、異なる起源に由来するRNAを含む、請求項4に記載の方法。

【外国語明細書】
2014012011000001.pdf