

【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20年4月24日(2008.4.24)

【公開番号】特開2006-280277(P2006-280277A)

【公開日】平成18年10月19日(2006.10.19)

【年通号数】公開・登録公報2006-041

【出願番号】特願2005-104816(P2005-104816)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 07 H 21/04 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 A

C 07 H 21/04 A

C 12 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成20年3月11日(2008.3.11)

【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】

粒子の表面に形成されたアミノ基に核酸を吸着させ、該アミノ基に吸着させた核酸をリン酸塩溶液と反応させることにより、該アミノ基に吸着させた核酸を脱離させることを特徴とする核酸抽出方法。

【請求項2】

前記粒子は、バクテリア由来の磁性体、人工磁性体、金属、プラスチックビーズ、ガラスビーズ、ゲル状物質の粒子から選ばれる少なくとも1つであることを特徴とする請求項1記載の核酸抽出方法。

【請求項3】

前記リン酸塩溶液の濃度は、1.0 mM ~ 500 mMであることを特徴とする請求項1又は請求項2のいずれか1項に記載の核酸抽出方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明者等は、上記課題を解決すべく銳意研究した結果、粒子の表面に形成されたアミノ基に吸着させた多量の核酸にリン酸塩溶液を特定条件下で反応させることにより、該アミノ基に吸着させた核酸を極めて効率良く脱離し、抽出することができるを見出し、本発明を完成するに至った。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0011】**

本発明は以下の事項に関する。すなわち、

(1) 粒子の表面に形成されたアミノ基に核酸を吸着させ、該アミノ基に吸着させた核酸をリン酸塩溶液と反応させることにより、該アミノ基に吸着させた核酸を脱離させることを特徴とする核酸抽出方法。

(2) 前記粒子は、バクテリア由来の磁性体、人工磁性体、金属、プラスチックビーズ、ガラスピース、ゲル状物質の粒子から選ばれる少なくとも1つであることを特徴とする(1)に記載の核酸抽出方法。

(3) 前記リン酸塩溶液の濃度は、1.0 mM ~ 500 mM であることを特徴とする(1)又は(2)のいずれかに記載の核酸抽出方法。

【手続補正4】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0016****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0016】**

本発明の核酸の抽出方法は、粒子の表面に形成されたアミノ基に多量の核酸を吸着させ、該アミノ基に吸着させた核酸をリン酸塩溶液と反応させることにより、核酸を脱離し、抽出することを特徴としている。

【手続補正5】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0027****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0027】**

<核酸の脱離>

[リン酸塩溶液について]

本発明において、粒子表面に形成されたアミノ基と静電相互作用による相補的結合により吸着した多量の核酸を効率よく脱離するためにリン酸塩溶液を使用する。リン酸塩溶液中の陰イオンがアミノ基と吸着している核酸に置き換わり、これによって吸着していた核酸の脱離が起こる。

【手続補正6】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0028****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0028】**

リン酸塩としては、アミノ基との静電相互作用が核酸よりも大きいものであれば良く、特に制限されるものではないが、具体的にはリン酸水素アンモニウム、リン酸水素カリウム等を例示することができる。これらの中でもリン酸ナトリウム塩緩衝溶液が特に好ましい。なお、上記緩衝溶液には、少量の塩化ナトリウム等の電解質を添加することもでき、溶液のイオン強度を調整することができる。

【手続補正7】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0029****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0029】**

上記リン酸塩溶液の濃度は、1.0 mM ~ 500 mM であることが必要である。濃度が1

. 0 mM 未満であると、核酸の脱離が不十分となり、一方、濃度が 500 mM を超えると、分離、抽出後の核酸に支障をきたし、PCR 法による核酸増幅に障害が生じる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

多量の核酸が吸着した粒子上に上記リン酸塩溶液を加え、所定の温度にてインキュベートした後、核酸を脱離する。インキュベートする温度としては、10 ~ 90、好ましくは 20 ~ 80 である。インキュベートする温度が 10 未満であると核酸の脱離が起こりにくく、90 以上であると脱離した核酸に障害を与えることとなり好ましくない。なお、リン酸塩溶液の濃度とインキュベートする温度の最適化、PCR 法の適用を考えると、核酸の脱離する割合が同程度ならば、核酸脱離用リン酸塩溶液は低塩下であることが好ましいので、リン酸塩の濃度を低く設定するとよい。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

本発明において、吸着した核酸をリン酸塩溶液によって脱離した核酸等の定量は、核酸が吸着した微粒子にリン酸塩溶液を加えた後の上澄み溶液に遊離している核酸を測定することにより行う。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

(比較例 1)

実施例 1 で使用したリン酸ナトリウム緩衝溶液に代えて、比較例として塩化ナトリウム溶液を使用した以外は実施例 1 と同様にして DNA の脱離、抽出を行い、同様に抽出した DNA の割合を測定し、比較例 1 とした。測定結果を図 2 に示す。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

<リン酸ナトリウム緩衝溶液の濃度について>

(実施例 2 ~ 実施例 5)

リン酸塩溶液として、リン酸ナトリウム緩衝溶液を使用し、DNA 脱離の温度を 25 とし、その濃度を変化させた以外は、実施例 1 と同様にして DNA の脱離、抽出を行った。DNA の抽出量の測定結果を図 3 に示す。

(実施例 6 ~ 実施例 9)

DNA 脱離の温度を 80 とした以外は実施例 4 と同様にして DNA の脱離、抽出を行った。DNA の抽出量の測定結果を図 3 に示す。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

図1～図3からも明らかなように、リン酸塩溶液として、リン酸ナトリウム緩衝溶液を使用し、温度を80℃に設定することにより、アミノ基修飾磁性細菌粒子に吸着した多量のDNAをほぼ100%という極めて高効率で脱離し、抽出することができる事が理解される。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

【図1】添加したDNAの量(n g)とアミノ基修飾磁性磁気微粒子(BMPs)によるDNAの吸着量(n g / 10 μg-BMPs)との関係を示す図である。

【図2】各リン酸塩溶液とDNAの脱離割合(%)の関係を示す図である。

【図3】リン酸ナトリウム緩衝溶液の濃度(mM)とDNAの脱離割合(%)との関係を示す図である(25、80)。

【図4】抽出したDNAのPCR反応後における電気泳動写真である。

【図5】ヒト全血から抽出したDNAのPCR反応後における電気泳動写真である。

【図6】ヒト全血から抽出したDNAのPCR産物に対するSNP検出結果を示す図である(アルデヒド脱水素酵素ALDH2遺伝子)。

【手続補正14】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2】

