

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6704621号
(P6704621)

(45) 発行日 令和2年6月3日(2020.6.3)

(24) 登録日 令和2年5月15日(2020.5.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/10 (2006.01)

C 12 N 15/10 1 O O Z

C 12 Q 1/6806 (2018.01)

C 12 Q 1/6806 Z

C 12 M 1/00 (2006.01)

C 12 M 1/00 A

請求項の数 12 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2016-533928 (P2016-533928)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月14日 (2014.8.14)
 (65) 公表番号 特表2016-527897 (P2016-527897A)
 (43) 公表日 平成28年9月15日 (2016.9.15)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/067453
 (87) 國際公開番号 WO2015/022410
 (87) 國際公開日 平成27年2月19日 (2015.2.19)
 審査請求日 平成29年8月10日 (2017.8.10)
 (31) 優先権主張番号 13/968,497
 (32) 優先日 平成25年8月16日 (2013.8.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 390041542
ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 123
45、スケネクタディ、リバーロード、1
番
(74) 代理人 100188558
弁理士 飯田 雅人
(74) 代理人 100154922
弁理士 崔 允辰
(74) 代理人 100207158
弁理士 田中 研二

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸の抽出及び保存のための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固体マトリックスであって、

1種以上のタンパク質変性剤と、

当該マトリックスに乾燥状態で含浸した1種以上の酸又は酸滴定緩衝剤とを含んでおり、当該マトリックスが、乾燥固体マトリックスであって、水和時に3~6の範囲内の酸性pHをもたらし、試料から核酸を抽出し、周囲温度において核酸を乾燥状態で保存するように構成されており、

当該マトリックスが、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維又はそれらの組合せを含み、

抽出及び保存される核酸が、リボ核酸(RNA)、又はリボ核酸(RNA)とデオキシリボ核酸(DNA)との組合せを含み、試料から抽出され前記マトリックスに乾燥状態で保存されたRNAが、5~8のRNAインテグリティナンバー(RIN)を有し、

当該マトリックスが1種以上の酸を含んでいて、1種以上の酸が、酢酸、クエン酸、酒石酸、塩酸、酸化トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン-塩酸(TECPOH-C1)、バニリン酸、又はそれらの組合せを含み、

タンパク質変性剤が、チオシアノ酸ゲアニジン、チオシアノ酸ナトリウム、及びそれらの組合せからなる群から選択される、マトリックス。

【請求項 2】

UV保護剤、ラジカルスカベンジャー、キレート剤又はそれらの組合せをさらに含んで

いて、U V 保護剤又はラジカルスカベンジャーが、ハイドロキノンモノメチルエーテル (M E H Q) 、ハイドロキノン (H Q) 、トルヒドロキノン (T H Q) 及びアスコルビン酸からなる群から選択される、請求項 1 に記載のマトリックス。

【請求項 3】

R N a s e 阻害剤をさらに含んでいて、R N a s e 阻害剤が、三リン酸塩、ピロリン酸塩又はそれらの組合せを含む、請求項 1 又は 2 に記載のマトリックス。

【請求項 4】

R N a s e 阻害剤が、バナジルリボヌクレオシド複合体 (V R C) 、ピロリン酸ナトリウム、三リン酸ナトリウム、ヌクレオチド類似体又は市販のR N a s e 阻害剤を含む、請求項 3 に記載のマトリックス。

10

【請求項 5】

1種以上の還元剤をさらに含んでいて、1種以上の還元剤が、ジチオトレイトール (D T T) 、2 - メルカプトエタノール (2 - M E) 、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (T C E P - H C 1) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 乃至 4 のいずれか1項に記載のマトリックス。

【請求項 6】

当該マトリックスが多孔質である、請求項 1 乃至 5 のいずれか1項に記載のマトリックス。

【請求項 7】

R N A 抽出マトリックスであって、
カオトロピック剤、洗剤又はそれらの組合せを含むタンパク質変性剤と、
当該マトリックスに乾燥状態で含浸された酸又は酸滴定緩衝剤と
を含んでおり、当該マトリックスが、R N A を抽出し、抽出R N A を5 ~ 8 のR N A インテグリティナンバー (R I N) で安定させるために、水和時に3 ~ 6 の範囲内のp H をもたらすように構成された多孔質乾燥固体マトリックスであり、

20

当該マトリックスが1種以上の酸を含んでいて、1種以上の酸が、酢酸、クエン酸、酒石酸、塩酸、酸化トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン - 塩酸 (T C E P - O - H C 1) 、バニリン酸、又はそれらの組合せを含み、

タンパク質変性剤が、チオシアノ酸グアニジン、チオシアノ酸ナトリウム、及びそれらの組合せからなる群から選択される、マトリックス。

30

【請求項 8】

M E H Q 、 H Q 、 T H Q 、 アスコルビン酸及びそれらの組合せからなる群から選択されるU V 保護剤又はラジカルスカベンジャーをさらに含む、請求項 7 に記載のマトリックス。

【請求項 9】

前記マトリックスが、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラス纖維又はそれらの組合せを含む、請求項 8 に記載のマトリックス。

【請求項 10】

R N A 抽出マトリックスであって、
カオトロピック剤、洗剤又はそれらの組合せを含むタンパク質変性剤と、
酸又は酸滴定緩衝剤と、
当該マトリックスに乾燥状態で含浸した三リン酸塩又はピロリン酸塩を含むR N a s e 阻害剤と

40

を含んでおり、当該マトリックスが、水和時に3 ~ 6 のp H をもたらし、R N A を5 ~ 8 のR I N 値で安定させるように構成された多孔質乾燥固体マトリックスを含み、

当該マトリックスが1種以上の酸を含んでいて、1種以上の酸が、酢酸、クエン酸、酒石酸、塩酸、酸化トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン - 塩酸 (T C E P - O - H C 1) 、バニリン酸、又はそれらの組合せを含み、

タンパク質変性剤が、チオシアノ酸グアニジン、チオシアノ酸ナトリウム、及びそれら

50

の組合せからなる群から選択される、マトリックス。

【請求項 1 1】

前記マトリックスが、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維又はそれらの組合せを含む、請求項 1 0 に記載のマトリックス。

【請求項 1 2】

試料から核酸を抽出及び保存する方法であって、

請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載のマトリックス上の試料を用意するステップと

、
水和によって試料から核酸を抽出するための 3 ~ 6 の範囲内の酸性 pH を生じさせるステップと、

10

抽出核酸を含むマトリックスを乾燥させるステップと、

周囲温度においてマトリックス上の抽出核酸を乾燥状態で保存するステップと
を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、固体基質、並びに乾燥フォーマットの生物学的試料からの核酸の周囲抽出及び安定化のための方法に関する。乾燥固体基質から、核酸を、収集、抽出、保存、回収するための方法についても記載されている。

【背景技術】

20

【0 0 0 2】

生物学的試料からの単離又は精製中に生体分子の構造的及び機能的整合性を保存することは、種々のダウンストリーム用途に必須である。精製生体分子のダウンストリーム用途は、被験物質検出、検知、法医学的、診断的又は治療的用途、シークエンシング、增幅等を包含し得る。これらのダウンストリーム用途の成功は、標的生体分子の一体構造及び機能を維持することによって決まり得る。温度、圧力、pH、化学的もしくは酵素的加水分解、又は汚染物質の存在等の種々の要因が、DNA、RNA 又はタンパク質等の生体分子の分解を引き起こし得る。

【0 0 0 3】

RNA は、化学的自己加水分解及び酵素媒介性分解により最も不安定な生体分子の 1 つである。生物学的試料に由来する RNA の抽出及び安定化は、RNA を抽出する又は収集するために使用される緩衝液、溶液 pH、温度、及び特に強固なリボヌクレアーゼ (RNAse) の遍在的存在を包含するがこれらに限定されない多数の環境要因に対して感受性である。RNA は、典型的には、冷凍 (例えば、4 、 -20 又は -80) 下、精製及び未精製両方の形態で保存されて、加水分解及び酵素的分解を防止し、故に、RNA 試料の整合性を保存する。周囲温度下での RNA の抽出及び安定化のための方法及び物品は、RNA 試料の整合性を維持するための冷凍に関連する費用及び空間要求を回避するためには望ましい。

30

【0 0 0 4】

周囲温度下で RNA を安定させるための現在の方法論は、例えば、洗剤、カオトロピック化合物、還元剤、遷移金属、有機溶媒、キレート剤、プロテアーゼ、RNase ペプチド阻害剤及び抗 RNase 抗体の過剰な液体溶液中で RNase を不活性化することに焦点を合わせてきた。さらなる取り組みでは、トランスエステル化及び自己加水分解を制限するための RNA の化学修飾に焦点を合わせてきた。乾燥フォーマットでの RNA の収集及び保存の成功を求める乾燥状態技術は、典型的には、RNA の保存前に試料から RNA が「予め精製」され濃縮されることを必要とする。乾燥フォーマットでの RNA の保存のための他の乾燥状態技術は、追加の乾燥施設 (例えば、強制対流、凍結乾燥又は熱処理) を必要とする。したがって、これらの方法は、顕著な試料加工のない試料 (例えば、生物学的試料) からの直接的 RNA 収集につながらない。

40

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第2007/008722号

【発明の概要】

【0006】

したがって、单一プロセスステップ以内で、周囲条件下、生物学的試料からの乾燥状態RNA抽出及び安定化を可能にする組成物及び方法が必要である。さらに、乾燥した生物学的試料を周囲温度で長期間保存し、その後さらなる分析のためにインタクトなRNAを回収する能力は、非常に望ましい。

【0007】

10

固体マトリックスの一実施形態は、1種以上のタンパク質変性剤と、当該マトリックスに乾燥状態で含浸した1種以上の酸又は酸滴定緩衝剤とを含み、マトリックスは、水和時に酸性pHをもたらし、試料から核酸を抽出し、周囲温度において核酸を実質的に乾燥状態で保存するように構成されている。

【0008】

別の実施形態では、RNA抽出マトリックスは、カオトロピック剤、洗剤又はそれらの組合せを含むタンパク質変性剤と、当該マトリックスに乾燥状態で含浸した酸又は酸滴定緩衝剤とを含み、マトリックスは、RNAを抽出し、抽出RNAを4以上のRNAインテグリティナンバー(RIN:RNA integrity number)で安定させるために、水和時に2~7の範囲内のpHをもたらすように構成された多孔質非溶解性乾燥材料である。

20

【0009】

一実施形態では、RNA抽出マトリックスは、カオトロピック剤、洗剤又はそれらの組合せを含むタンパク質変性剤と、酸又は酸滴定緩衝剤と、当該マトリックスに乾燥状態で含浸した三リン酸塩又はピロリン酸塩を含むRNase阻害剤とを含み、マトリックスは、水和時に2~7のpHをもたらし、RNAを4以上のRNAインテグリティナンバー(RIN)で安定させるように構成された多孔質非溶解性乾燥材料を含む。

【0010】

試料から核酸を抽出及び保存する方法の一例は、タンパク質変性剤及び酸又は酸滴定緩衝剤を含む乾燥固体マトリックス上の試料を用意するステップと、水和によって試料から核酸を抽出するための酸性pHを生じさせるステップと、抽出核酸を含むマトリックスを乾燥させるステップと、周囲温度においてマトリックス上の抽出核酸を実質的に乾燥状態で保存するステップとを含む。

30

【0011】

本発明の上記その他の特色、態様及び利点は、下記の詳細な説明を添付の図面を参照して読むと、よく理解され、図面全体を通して、類似の文字は類似の部品を表す。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TEP)の酸化及びTEP酸化物(TEP-O)の調製を示す P^{31} NMRプロファイルの図である。

【図2】セルロース試料に対するTEP及びTEP-O還元活性についての5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)比色分析アッセイから誘導された棒グラフを示す図である。

40

【図3】TEP又はTEP-Oを含有する化学処理したセルロース紙上で収集された乾燥血斑についてRNAインテグリティナンバー(RIN)を示す図である。

【図4】種々の化学処理したセルロースマトリックス上で収集され、アジレント2100バイオアナライザでのRNA分析前、5、6又は12日間周囲温度で保存された乾燥血斑について、RNAインテグリティナンバー(RIN)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の実施形態は、RNA等の核酸の周囲抽出及び保存のための好適なマトリックス

50

及び方法を提供する。RNAは、概して、インタクトな形態で保存することが困難な不安定分子として公知である。本発明の1以上の実施形態は、核酸抽出マトリックスに関し、マトリックスは、單一プロセスステップ以内で生物学的試料から核酸を収集し、抽出し、長期間保存し、続いて種々の用途において使用するよう構成されている。マトリックスは、実質的に乾燥状態で核酸を周囲温度で保存し、核酸の整合性を実質的に保持するよう構成されている。

【0014】

特許請求されている発明の主題をより明確にかつ簡潔に記載するために、下記の記載及び添付の請求項において使用される具体的な用語に下記の定義を提供する。明細書全体を通して、具体的な用語の例示は、非限定的な例とみなされるべきである。

10

【0015】

単数形で記載したものであっても、前後関係から明らかでない限り、複数の場合も含めて意味する。本明細書及び請求項で用いる近似表現は、数量を修飾し、その数量が関係する基本機能に変化をもたらさない許容範囲内で変動しうる数量を表現する際に適用される。したがって、「約」のような用語で修飾された値はその厳密な数値に限定されない。場合によっては、近似表現は、その値を測定する機器の精度に対応する。必要に応じて、範囲が設定されるが、それらの範囲は、それらすべての中間範囲を含めたものである。

【0016】

用語「核酸」は、本明細書では、RNA(例えば、mRNA、miRNA、rRNA、tRNA、piRNA、ncRNA)、DNA(例えば、ゲノムDNA、mtDNA)、並びにヌクレオチド類似体を使用して生じさせたDNA又はRNAの組換えRNA及びDNA分子又は類似体のすべての形態を含む。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。核酸は、コード鎖又は非コード鎖を包含し得る。該用語は、開示されている抽出方法を使用して回収され得る自然発生のRNA又はDNA等の核酸のフラグメントも含む。「フラグメント」は、核酸(例えば、RNA又はDNA)の一部を指す。

20

【0017】

用語「生物学的試料」は、本明細書では、ヒトを包含する生物から取得された、血液、血清、組織及び唾液を包含するがこれらに限定されない。生物学的試料は、自己診断試験(例えば、血糖モニタリング)を受けている個体によって、又は、熟練した医療専門家によって、例えば、針を使用して血液を吸引すること、又は患者の皮膚上の病変等の特定の領域を解体する又は拭き取ることを包含する様々な技術を介して、取得され得る。種々の生物学的試料を収集するための方法は、当技術分野において周知である。用語「試料」は、上記で定義した通りの生物学的試料を包含するが、例えば、組織培養細胞及び精製核酸も包含する。

30

【0018】

用語「還元剤」は、本明細書では、別の化学種に電子を提供する化学種を包含する。様々な還元剤が当技術分野において公知である。例示的な還元剤は、ジチオトレイトル(DTT)、2-メルカプトエタノール(2-ME)及びトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TEP)を包含する。さらに、上記その他の還元剤の組合せを使用してよい。特定の実施形態では、還元剤はTEPである。

40

【0019】

用語「緩衝液」は、本明細書では、例えば、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1,3-ジオール(トリス)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、クエン酸緩衝液、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)及びリン酸緩衝液を包含する。この潜在的な緩衝液の一覧は、例証のみを目的とするものである。本明細書で開示されている組成物及び方法において使用するために選択される緩衝液のpHは、典型的には、2~7の範囲内で酸滴定されている。

【0020】

固体マトリックスの1以上の実施形態は、1種以上のタンパク質変性剤と、当該マトリ

50

ックスに乾燥状態で含浸した1種以上の酸又は酸滴定緩衝剤とを含み、マトリックスは、水和時に酸性pHをもたらすように構成されている。マトリックスは、試料から核酸を抽出し、周囲温度において核酸を実質的に乾燥状態で保存するようにも構成されている。本明細書では、用語「実質的に乾燥状態」は、およそ2%未満の水分含量を有するように試料をさらに乾燥させることを指す。

【0021】

試料からの核酸の抽出及び保存のための固体マトリックスは、1以上の酸又は酸滴定緩衝液及びタンパク質変性剤を乾燥状態で含む。用語「マトリックス」は、本明細書において、「抽出マトリックス」と交換可能に使用される。用語「固体マトリックス」は、本明細書では、非溶解性なマトリックスを指す。マトリックスは、マトリックス材料を可溶化することなく、核酸の収集、抽出及び保存を可能にする。固体マトリックスは、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラス纖維又はそれらの組合せ等の材料を包含するがこれらに限定されない。マトリックスへの組成物の「組み込み」は、後述する「浸漬」手順を包含するがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、そのような方法は、乾燥固体マトリックスへの組成物の組み込みを遂行する。乾燥固体マトリックスへの組成物の組み込み後、任意の適切な方法を使用して固体マトリックスを乾燥させる。

10

【0022】

前述した通り、固体マトリックスは、組成物を乾燥状態で含み、また、抽出核酸を乾燥条件下で保存する。抽出及び保存のための乾燥固体マトリックスの使用は、液体ベースの抽出よりも有利であり、なぜなら、乾燥マトリックスが、マトリックスに適用される試料の最小体積希釈を確実にするからである。当業者であれば、液体ベースの抽出は、試料の濃縮物を、過剰体積の安定化試薬中で希釈することができるであろう。試料を収集し、抽出し、保存するための乾燥固体マトリックスの使用は、試料の濃度を維持し、液体保存料中での試料の不適切な希釈に関連する試料分解等の問題を解消する。加えて、固体マトリックスは、乾燥試薬の固定組成物を含み、これにより、水和時にRNA等の核酸の効率的な抽出を、続いて周囲温度での抽出RNAの安定化を可能にする。

20

【0023】

用語「周囲条件」又は「周囲温度」は、以後、交換可能に使用される。本明細書では、用語「周囲温度」は、0から60の間の範囲内の温度を指す。1以上の実施形態では、周囲温度は室温である。いくつかの実施形態では、マトリックスは、核酸を、周囲温度下、乾燥した状態で保存又は保存するように構成されている。

30

【0024】

前述した通り、固体マトリックスは、核酸を、乾燥状態で長期間保存又は保存するように構成されている。用語「ように構成されている」又は「のために構成されている」は、本明細書において、マトリックスに核酸がある期間にわたって周囲温度で抽出及び保存させることができるマトリックスの構造又は組成物を称する。用語「保存」又は「保存」は、抽出核酸をさらなる分析に好適なフォーマットで維持することに関して、本明細書において交換可能に使用され得る。より具体的には、核酸は、固体核酸抽出マトリックス中に保存又は保存されてよく、マトリックスは、分子の整合性を確実に維持する。

40

【0025】

いくつかの実施形態では、核酸抽出マトリックスは固相抽出マトリックスである。マトリックスは、固相抽出法が使用される場合、本明細書において、固相抽出マトリックスと称される。固相抽出(SPE)技術は、シーケンシング及び他の用途のための高純度核酸の抽出時間を低減させるために活用されてきた。固相抽出は、固相及び液相を使用して、同じ種類又は異なる種類の1以上の分子を材料から単離する抽出法である。固相抽出マトリックスは、例えば、クロマトグラフ法又は他の分析法の上流の試料を精製するために使用される。方法の一例は、試料(例えば、生物学的試料)を固相抽出マトリックスに充填するステップと、マトリックスを周囲温度で保存して実質的に乾燥状態を実現するステップと、マトリックスを好適な緩衝液で再水和してマトリックスからRNAを差次的に抽出するステップとを含む。

50

【0026】

用語「抽出」は、試料から、より詳細には生物学的試料から、核酸を分離する又は単離するための任意の方法を指す。RNA及びDNA等の核酸は、例えば細胞溶解によって放出され得る。一実施形態では、核酸は、蒸発細胞溶解中に放出され得る。別の実施形態では、細胞は、細胞溶解試薬を含むマトリックスとの接触時に溶解する。細胞を含む生物学的試料をマトリックスと接触させることで、例えばFTA(商標)溶出セルロース紙を使用することによって、核酸を放出する細胞溶解をもたらす。

【0027】

固体マトリックスは多孔質であってよい。一実施形態では、固体マトリックスは、ワットマン(商標)製のセルロースマトリックス等の多孔質セルロース紙である。一例において、ワットマン(商標)製のセルロースマトリックスは、903-セルロース、FTA(商標)又はFTA(商標)溶出を含む。

10

【0028】

1以上の例において、抽出マトリックスに、1以上の試薬を含浸させる。前述した通り、例の実施形態では、マトリックスは、乾燥状態で含浸した1種以上のタンパク質変性剤を含む。一実施形態では、マトリックスは、1種以上の酸又は酸滴定緩衝剤をさらに含む。別の実施形態では、マトリックスは、1以上の還元剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、含浸試薬は、溶解試薬、核酸安定化試薬、核酸保存化学物質及びそれらの組合せを含む。

【0029】

20

いくつかの実施形態では、マトリックスに含浸した乾燥試薬は、緩衝液、水又は試料を添加することによって水和される。一実施形態では、含浸乾燥試薬は、核酸の抽出又は保存のためにマトリックス上に配置された試料、より具体的には生物学的試料によって水和される。いくつかの他の実施形態では、試料に加えて、水又は緩衝液を添加してマトリックスを水和し、マトリックスに埋め込まれている試薬を再構成する又は活性化する。いくつかの実施形態では、マトリックスの水和は、マトリックスにおいて酸性pHを生じさせる。いくつかの実施形態では、水和はさらに、マトリックス中に乾燥形態で存在するタンパク質変性剤、酸又は酸滴定緩衝剤等の試薬を再構成するという結果をもたらす。

【0030】

1以上の実施形態では、マトリックスはタンパク質変性剤を含む。タンパク質変性剤は、カオトロピック剤又は洗剤を含み得る。特定の変性剤に限定することは意図しないが、タンパク質変性剤は、それらの生物物理学的特性及び生物学的酵素活性(例えば、RNAse)を完全に阻害する能力に応じて、弱い変性剤又は強い変性剤のいずれかとして分類され得る。いくつかの実施形態では、弱いタンパク質変性剤(例えば、洗剤)は、細胞を溶解し、核酸を変性させることなくタンパク質間相互作用を妨害するために使用され得る。さらなる実施形態では、強いタンパク質変性剤(例えば、カオトロピック塩)の使用は、細胞及びタンパク質を変性させるのに加えて核酸二次構造も変性させ得る。多数のタンパク質変性剤が当技術分野において公知であり、本明細書において記載されている組成物及び方法において使用するために選択され得る。特定のタンパク質変性剤に限定することは意図しないが、例示的なタンパク質変性剤は、チオシアノ酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアノ酸ナトリウム、チオシアノ酸カリウム、アルギニン、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、尿素又はそれらの組合せを包含する。例示的な洗剤は、イオン洗剤、非イオン洗剤又は両性イオン洗剤として分類され得る。イオン洗剤は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)等のアニオニン洗剤又はエチルトリメチルアンモニウムプロミド等のカチオニン洗剤を含み得る。細胞溶解のための非イオン洗剤の非限定的な例は、トリトンX-100、NP-40、ブリッジ35、ツイン20、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド又はジギトニンを包含する。いくつかの両性イオン洗剤は、3-[3-コールアミドプロピル]ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)及び3-[3-コールアミドプロピル]ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(CHAPSO)を含み得る。

30

40

50

【0031】

1以上の実施形態では、タンパク質変性剤はチオシアノ酸塩を含む。マトリックスの1以上の実施形態は、乾燥状態で含浸した酸滴定チオシアノ酸塩を含む。例示的なチオシアノ酸塩は、チオシアノ酸グアニジン、チオシアノ酸ナトリウム、チオシアノ酸カリウム又はそれらの組合せを包含するがこれらに限定されない。

【0032】

抽出マトリックスは、生物学的試料からのRNA抽出後、RNAの安定性及び整合性を所望のレベルに維持する。一実施形態では、マトリックスに、核酸安定化試薬を含浸させる。これらの安定化試薬は、RNase阻害剤、酸滴定緩衝液又はキレート剤（例えば、EDTA）を包含し得る。組成物は、紫外線（UV）阻害剤又はラジカルスカベンジャーをさらに含み得る。

10

【0033】

前述した通り、マトリックスはRNase阻害剤をさらに含み、RNase阻害剤は、バナジルリボヌクレオシド複合体（VRC）、ヌクレオチド類似体又は市販のRNase阻害剤（例えば、SUPERase-In（商標））を含む。RNase阻害剤は、ピロホスフェート化合物をさらに含み得る。一実施形態では、ピロリン酸ナトリウム二塩基をRNase阻害剤として使用してよい。RNase阻害剤の1以上の実施形態は、三リン酸ナトリウム等の三リン酸塩をさらに含み得る。一例において、酸滴定緩衝液へのピロリン酸ナトリウムの添加は、液体状態及び乾燥フォーマットの両方においてRNA安定性を増強する。

20

【0034】

マトリックスの実施形態は、酸又は酸滴定緩衝剤を乾燥状態で含み、これは、核酸の抽出中に再水和され得る。酸の例は、酢酸、クエン酸、酒石酸、リン酸、塩酸、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン-塩酸（TCEP-HCl）、酸化トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン-塩酸（TCEP-O-HCl）、硫酸、硝酸、バニリン酸、3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸又はそれらの組合せを包含するがこれらに限定されない。前述した通り、マトリックスは、水和によって抽出核酸を抽出し安定させる酸性pHをもたらし、水和は、試料、水その他の溶液（例えば、緩衝液）を添加することによって実現され得る。マトリックスの1以上の実施形態は、水和時に2~7の範囲内のpHをもたらす。いくつかの実施形態では、マトリックスは、水和時に3~6の範囲内のpHをもたらす。

30

【0035】

抽出核酸、特にRNAは、表IVに示す通り、酸性条件下で安定する。一実施形態では、酸滴定緩衝液はチオシアノ酸グアニジンを含む。2~7の酸性pH、より詳細には3~6のpHで、乾燥固体マトリックス上の酸性範囲内のチオシアノ酸グアニジン及びピロリン酸ナトリウムの乾燥状態混合物は、図4中のRINスコアによって示す通り、周囲温度で乾燥血斑内の高品質RNAを安定させる。一実施形態では、酸滴定緩衝液はチオシアノ酸グアニジンを含み、2~7の酸性pH、より詳細には3~6のpHで、乾燥固体マトリックスにおける三リン酸ナトリウムの存在は、図4でRINスコアによって示す通り、高品質RNAを安定させる。

40

【0036】

前述した通り、いくつかの実施形態では、マトリックスは、UV保護剤、ラジカルスカベンジャー、キレート剤又はそれらの組合せをさらに含む。任意の特定のUV保護剤に限定することは意図しないが、例示的な抗酸化剤は、例えば、ハイドロキノンモノメチルエーテル（MEHQ）、ハイドロキノン（HQ）、トルヒドロキノン（THQ）及びアスコルビン酸を包含する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤はTHQである。

【0037】

いくつかの実施形態では、マトリックスは、1以上の還元剤をさらに含み、還元剤は、ジチオトレイトール（DTT）、2-メルカプトエタノール（2-ME）、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）及びそれらの組合せからなる群から選択され

50

る。

【0038】

抽出核酸は、リボ核酸（RNA）、デオキシリボ核酸（DNA）又はそれらの組合せを含む。一実施形態では、抽出核酸はRNAを含む。RNAは、mRNA、tRNA、rRNA、スマールRNA、siRNA、miRNA、非コードRNA、動物RNA、植物RNA、ウイルスRNA又は細菌RNAであつてよい。

【0039】

マトリックスは、実質的にインタクトな状態下、周囲温度で、乾燥フォーマットの核酸を保存するように構成されている。RNAの状態は、RNAの品質又はRNAの整合性を指す。RNAの安定性及び品質は、以下に基づいて評価することができる：mRNA標的の定量的RT-PCR增幅、全細胞RNAの容量を損なう28s:18sリボソームRNA（rRNA）の比、並びにアジレント2100バイオアナライザでのRIN分析。前述した通り、RNA品質は、28S及び18SリボソームRNA強度値の比として決定され、該比は、抽出されたrRNAのゲル電気泳動、続いてエチジウムプロマイド染色によつて28S及び18S rRNAの強度を取得することにより、算出される。高品質細胞RNAは、概して、1より大きい28s:18s rRNA比を呈する。さらに、高品質細胞RNAは、低含量及びラージ（例えば、1kBより大きい）mRNA両方の効率的な増幅を支援する。利便性を目的として、rRNAシグナル強度及び28s:18s rRNAの比は、ゲル電気泳動によつて、強固なRNA保存特性を持つ試料を迅速にスクリーニングし同定するために高頻度で使用される。

【0040】

前述した通り、一実施形態では、RNA品質は、バイオアナライザを介する抽出RNAのキャピラリー電気泳動によつて決定される。恒例により、RNA品質はRINとして定量化され、RINは、抽出RNA内に存在する種々のRNAの量のアルゴリズム評価によつて算出される。高品質細胞RNAは、概して、10に近似するRIN値を呈する。1以上の実施形態では、乾燥マトリックスから抽出したRNAは、4以上のRIN値を有する。いくつかの実施形態では、マトリックスは、生体試料の周囲抽出及び安定化を提供し、4から10の範囲内のRIN値を持つインタクトな高品質RNAを生成するか、又は一実施形態では、RIN値は5から8の範囲内である。

【0041】

試料から核酸を抽出及び保存する方法の例は、試料を、タンパク質変性剤及び酸又は酸滴定緩衝剤を含む固体マトリックスに提供するステップと、試料又は任意の外部から添加された液体による固体マトリックスの水和時に、試料からの核酸の抽出のための酸性pHを生じさせるステップと、抽出核酸を含むマトリックスを乾燥させるステップと、抽出核酸を実質的に乾燥状態でマトリックス上に周囲温度下で保存するステップとを含む。用語「試料を提供する」の非限定的な例は、ピペット、カテーテル、シリンジ又は導管を使用して、試料を適用する又は試料を抽出マトリックス上に配置することを包含する。試料をマトリックス上に注いでよい。

【0042】

方法は、抽出核酸を乾燥状態でマトリックス上に周囲温度において保存するステップを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1か月を超える期間にわたって保存されてよい。いくつかの実施形態では、核酸は、6か月を超える期間にわたって保存されてよい。RNAは概して分解する傾向があるため、マトリックスを使用するRNAの抽出及び保存は有用であり、種々のダウントリーム用途にさらに使用され得る。

【0043】

方法の1以上の実施形態は、固相抽出技術によってマトリックスから核酸を回収するステップを含む。1以上の実施形態では、核酸は、マトリックスを、水溶液、緩衝液又は有機溶液中で再水和することによって固体マトリックスから回収され、核酸はさらなる分析に供される。試料（例えば、未精製生物学的試料）からの核酸、特にRNAの抽出をもたらす方法を用いてよい。上記で描写した方法は、さらなる分析のために固体マトリックス

10

20

30

40

50

から核酸を回収するステップの前に、マトリックスを洗浄するステップを場合により包含してよい。例えば、マトリックスを、核酸の回収前に、好適な緩衝液又は水で1回又は複数回洗浄してよい。核酸は、固体マトリックス（例えば、セルロース紙）を、水溶液、上記で定義した通りの緩衝液、又は有機溶液中で再水和することにより、回収され得る。いくつかの実施形態では、核酸は、電気泳動溶出によって固体マトリックスから回収される。

【0044】

一実施形態では、核酸（例えば、RNA、DNA又はそれらの組合せ）を抽出し保存するための方法は、固体マトリックスを提供するステップであって、組成物が、1種以上のタンパク質変性剤、酸又は酸滴定緩衝剤、及び場合により乾燥したフォーマットで固体マトリックスに組み込まれたラジカルスカベンジャーを含むステップと、試料（例えば、生物学的試料）を固体マトリックスに適用して、酸性pH下で核酸を抽出するステップと、固体マトリックスを乾燥させるステップと、核酸を実質的に乾燥状態で固体マトリックス上に周囲温度において保存するステップとを含む。

10

【0045】

方法のある特定の例において、マトリックスは、核酸、特に、保存するには不安定な生体分子であることが広く知られているRNAの、周囲温度における乾燥フォーマットでの（例えば、固体マトリックス上への）保存を可能にする。この方法において利用される試料は、ヒトを包含する任意の生物から取得された、血液、血清、組織及び唾液等の生物学的試料を包含するがこれらに限定されない。

20

【実施例】

【0046】

試薬：31-ETFはGEヘルスケア製であった。TCEPはソルテックバイオサイエンス（米国マサチューセッツ州ベリ）製であり、MOPSはアルドリッヂ（米国ミズーリ州）から購入した。

【0047】

実施例1：TCEPの酸化によるTCEP-Oの調製

TCEPをTCEP-Oに酸化して、乾燥した生体試料においてRNA保存に対する還元活性の寄与を分析した。およそ1グラムのTCEPを25mLの30%過酸化水素に溶解し、水酸化ナトリウムを使用して溶液pHを8.0に調整した。反応混合物を3時間インキュベートして、酸化反応を完了させ、その後の分析のために生成物をオープン内で乾燥させた。P³¹NMRは、TCEP基準と比べた反応生成物におけるTCEPの損失を確認した。この酸化反応を抗酸化剤THQの存在下で繰り返し、同様の結果であった。結果は図1に明記されている。

30

【0048】

実施例2：TCEP-Oでコーティングした乾燥マトリックス上における還元活性の損失の確認

紙試料は、単純なディップコーティングプロセスを使用し、TCEP又はTCEP-Oを含有する溶液中で調製した。簡潔に述べると、コーティング溶液は、表Iにおいて記載されている通りに調製した。対照試料25-1は3.5のpHを有する最終溶液をもたらし、その他すべての試料をHClでpH3.5に調整した。31-ETFセルロース紙を各コーティング溶液に浸漬し、完全飽和後、紙をニップローラに通して、過剰な溶液を除去した。次いで、紙試料をオープン内で乾燥させ、乾燥剤とともにマイラー・ホイルバッグ内に梱包し、使用するまで4で保存した。

40

【0049】

【表1】

表I. TCEPまたはTCEP-Oを含有する紙試料の調製

試料	MOPS(mg/mL)	GuSCN(mg/mL)	TCEP(mg/mL)	TCEP-O(mg/mL)	THQ(mg/mL)	プロセス
25-1	20	300	10		5	MOPS緩衝液pH7を調製し、他の成分を添加し、最終pHは3.5である
25-3	20	300		10	5	MOPS緩衝液pH7を調製し、他の成分を添加し、HClでpHを3.5に調整する
27-5		300	10			GuSCNおよびTCEPを水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する
27-6		300		10		GuSCNおよびTCEP-Oを水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する

試料調製後、DTNB比色分析アッセイを使用して、紙の還元活性を分析した。1mM DTNB希釈標準溶液を、水中2.5mMストック溶液からPBS中で調製した。試料穿孔部（直径3mm）を表Iにおいて記載されている各紙から抜き、5mLのDTNB希釈標準溶液に浸し、30分間振とうした。次いで、得られた溶液中のTNB（チオビス-(2-ニトロ安息香酸)を、412nmのUV吸光度によって測定し、これを図2に明記する。TCEP-Oを含有する試料25-3及び27-6は、DTNBからTNBへの還元を示さず、還元力の損失を示していた。TCEPを含有する試料25-1及び27-5は、DTNB比色分析アッセイを使用して、DTNBをTNBに変換することにより、強い還元活性を示す。これらの結果は、実施例1における先のNMR分析を確認するものであった。

【0050】

実施例3：乾燥血斑からのRNA安定性分析

表Iにおいて記載されている通りの実施例2からの試料に、全血で斑点を付け、室温でRNAを安定させる能力について試験した。50μLのラット全血を試験動物の尾静脈から収集し、試料25-1、25-3、27-5及び27-6に斑点を付けた。血斑を風乾させ、湿度を制御（約20%RH）下、周囲室温で5日（25-1、25-3）又は12日（27-5、27-6）間保存した。ベータ-メルカプトエタノールで強化されたRLT溶解緩衝液（キアゲン）を使用して7mmの中心穿孔部からRNAを抽出し、従来のシリカ膜スピニカラムを使用し、当技術分野において公知のプロトコール（例えば、キアゲンQIAamp RNA血液キット）に従って精製した。精製RNAを、ヌクレアーゼフリー水を用いてスピニカラムから溶出し、試料のそれぞれについてのRINを、RNA6000ピコラボチップスを使用するアジレント2100バイオアナライザで測定した。慣例により、6超のRINは高品質RNAを示すものであり、RT-PCR又はマイクロアレイ用途等の定量的ダウンストリーム分析に非常に望ましい。

【0051】

前述した通り、RIN値は、表1に収載されている各組成物について、RNA6000ピコラボチップスを使用するアジレント2100バイオアナライザによって決定し、データを図3に示す。予想外にも、TCEP-Oを含有する試料は、TCEPを含有するものに匹敵するRNA整合性を提供した。RINスコアは、TCEP（試料25-1、27-5）の存在下で、完全に酸化されたTCEP（試料25-3、27-6）のスコアよりもわずかに高いだけであった。この現象は酸性pHに依存し得るものであり、なぜなら、TCEP-HClを含有する対照製剤25-1の自然なpH終点を複製するために、すべての試料を、3.5の最終pHに滴定されたコーティング溶液から調製したからである。

【0052】

実施例4：酸性又は塩基性pHプロファイルにおける代替的化学の基質調製

10

20

30

40

50

実施例4は、異なる溶液pHにおける、酸、抗酸化剤、カオトロピック塩、洗剤、及びピロリン酸塩又はポリリン酸塩の異なる混合物の効果を調査するようにデザインされた。紙試料は、上述した単純なディップコーティングプロセスを使用して調製した。簡潔に述べると、コーティング溶液は、表IIにおいて記載されている通りに調製した。31-E TFセルロース紙を各コーティング溶液に浸漬し、完全飽和後、紙をニップローラに通して、過剰な溶液を除去した。次いで、紙試料をオープン内で乾燥させ、使用するまで乾燥剤とともにマイラー・ホイルバッグ内に梱包した。

【0053】

【表2】

表I I . 酸性または塩基性pHプロファイルにおける紙試料の調製:酸

試料	MOPS (mg/ml)	GuSCN (mg/ml)	SDS (mg/ml)	p-ク マリン 酸 (mg/ml)	バニリ ン酸 (mg/ml)	酢酸 (mg/ml)	クエン 酸 (mg/ml)	酒石酸 (mg/ml)	リン酸 (mg/ml)	プロセス
26-8	20	300			5.5					MOPS緩衝液pH 7.0を調製し、他の成分を添加し、HClでpHを3.5に調整する
26-7	20	300		3.5						MOPS緩衝液pH 7.0を調製し、他の成分を添加し、HClでpHを3.5に調整する
27-2	20	300								MOPS緩衝液pH 7.0を調製し、他の成分を添加し、HClでpHを3.5に調整する
28-9	20		20		5.5					MOPS緩衝液pH 7.0を調製し、他の成分を添加し、HClでpHを3.5に調整する
27-8		300			5.5					GuSCNおよびバニリン酸を水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する
27-7		300		3.5						GuSCNおよびp-クマリン酸を水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する
28-2		300				20				GuSCNおよび酢酸を水に溶解し、NaOHでpHを3.5に調整する
28-5		300						20		GuSCNおよび酒石酸を水に溶解し、NaOHでpHを3.5に調整する
28-4		300					20			GuSCNおよびクエン酸を水に溶解し、NaOHでpHを3.5に調整する
28-3		300							20	GuSCNおよびリン酸を水に溶解し、NaOHでpHを3.5に調整する

【0054】

10

20

30

40

【表3】

表III. 酸性または塩基性pHプロファイルにおける紙試料の調製: ポリーおよびピロリン酸塩

試料	GuSCN(mg/ml)	NaSCN(mg/ml)	三リン酸ナトリウム(mg/ml)	ピロリン酸ナトリウム(mg/ml)	プロセス
27-10	300		20		GuSCNおよび三リン酸ナトリウムを水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する
27-11	300			20	GuSCNおよびピロリン酸ナトリウムを水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する
26-11	300		20		GuSCNおよび三リン酸ナトリウムを水に溶解し、HClでpHを7.2に調整する
26-12	300			20	GuSCNおよびピロリン酸ナトリウムを水に溶解し、HClでpHを7.2に調整する
28-6		206	20		NaSCNおよび三リン酸ナトリウムを水に溶解し、HClでpHを3.5に調整する
28-7		206	20		NaSCNおよび三リン酸ナトリウムを水に溶解し、HClでpHを7.2に調整する

実施例5: 代替的化学における乾燥血斑からのRNA安定性分析

表II及び表IIIにおいて記載されている実施例4からの試料に、全血で斑点を付け、周囲温度でRNAを安定させる能力について試験した。50 μLのラット全血を試験動物の尾静脈から収集し、紙試料に直接斑点を付けた。血斑を乾燥させ、周囲温度であるが湿度を制御して(約20%RH)、5、6又は12日間保存した。7mmの中心穿孔部から溶解緩衝液中にRNAを抽出し、シリカ膜スピンドカラムを介し、当技術分野において公知のプロトコールに従って精製した。精製及び溶出後、RINを、RNA6000ピコラボチップスを使用するアジレント2100バイオアナライザで測定した。6超のRINは高品質RNAを暗示するものであり、RT-PCR又はマイクロアレイ用途等の定量的ダウンストリーム分析に望ましい。

【0055】

実施例5の結果は図4に明記されている。酸滴定力オトロピック塩又は洗剤組成物は、RINスコアに基づきある特定の製剤が他のものより好ましいが、乾燥血斑から妥当な品質のRNAを産出したことが発見された。例えば、試料28-2及び28-5はチオシアニン酸グアニジン(GuSCN)を含有し、酢酸中及び酒石酸中において、pH3.5でそれぞれ7.8及び7.0のRIN値を示した。酢酸(7.8)及び酒石酸(7.0)のRIN値は、pH3.5のクエン酸(試料28-4、RIN5.8)及びリン酸(試料28-3、RIN4.9)中の同じ組成物よりも高かった。特に、ピロリン酸塩又は三リン酸塩の有効性は、カオトロピック剤の存在下でRNAを安定させるのに明らかなpH依存を示し、全般的な酸性pHが非常に高いRINスコアを提供した。中性pHに滴定した同一の製剤は、重度のRNA分解をもたらした。例えば、pH3.5のチオシアニン酸グアニジン(GuSCN)又はチオシアニン酸ナトリウム(NaSCN)及び三リン酸ナトリウムのいずれかでコーティングした試料27-10及び28-6は、pH7.2の同じ試薬を含有する試料26-11及び28-7と比較して、それぞれ7.1及び7.0という高いRIN値を示した。同様に、試料27-11及び26-12は、GuSCN及びピロリン酸ナトリウムを含有し、pH3.5で6.7及びpH7.2で1.6のRIN値をそれぞれ示した。ピロホスフェート及びトリホスフェート部分は、概して小分子RNase阻害剤

10

20

30

40

50

であると理解されており、これに対する乾燥状態での作用の pH 依存性機構は直観的ではない。

【 0 0 5 6 】

実施例 6 : R I N 性能と固体 - マトリックス pH との相関関係

実施例 1 (表 I において記載されている) 及び実施例 4 (表 I I 及び表 I I I において記載されている) からの試料を使用して固体 - マトリックスの pH を測定し、生物学的 R I N 性能と比較した。固体 - マトリックス pH を測定するために、9 つの穿孔部 (7 mm の円形) を各紙から抜き、1 mL の水に浸した。高せん断ラボホモジナイザを使用して穿孔部を均質化してパルプにし、pH 試験紙を用いて水性相の pH を決定した。

【 0 0 5 7 】

実施例 6 の結果は表 I V に明記されている。各乾燥固体マトリックスの pH は、ある特定の製剤が他のものより好ましいが、概して固体マトリックスをコーティングしている溶液の元の pH から維持されている。特定の理論に限定されることなく、結果は、酸性 pH 下で組成物から誘導された R N A 試料についての R I N 値が周囲保存の数日後に 4 以上となることから、酸性 pH を持つ固体マトリックスが乾燥血斑から妥当な品質の R N A を産出することを確認するものである。

【 0 0 5 8 】

【表 4】

表 I V : 酸性または塩基性 pH における周囲条件下の異なるマトリックス組成物についての R I N 値

試料コード	組成物					pH		R I N	周囲貯蔵
	変性剤	緩衝液	酸	抗酸化剤	リン酸塩	浸漬溶液	紙		
25-1	GuSCN	MOPS	TCEP-HCL	THQ		3.6	4	6.5	5 日間
25-3	GuSCN	MOPS	TCEP-O-HCL	THQ		3.6	4.5	6.3	5 日間
27-5	GuSCN		TCEP-HCL			3.5	4	5.3	12 日間
27-6	GuSCN		TCEP-O-HCL			3.5	4	5.3	12 日間
26-8	GuSCN	MOPS	バニリン酸			3.3	4	5.7	5 日間
26-7	GuSCN	MOPS	p-クマリン酸			3.5	4.5	5.3	5 日間
27-2	GuSCN	MOPS	H C I			3.5	5.5	4.9	5 日間
28-9	SDS	MOPS	バニリン酸			3.3	4	4.3	6 日間
27-8	GuSCN		バニリン酸			3.5	4	4.1	5 日間
27-7	GuSCN		p-クマリン酸			3.5	4.5	3.3	5 日間
28-2	GuSCN		酢酸			3.5	5.5	7.8	6 日間
28-5	GuSCN		酒石酸			3.5	4.5	7	6 日間
28-4	GuSCN		クエン酸			3.4	4.5	5.8	6 日間
28-3	GuSCN		リン酸			3.6	5	4.9	6 日間
27-10	GuSCN		HCl		三リン酸ナトリウム	3.5	5	7.1	12 日間
27-11	GuSCN		HCl		ピロリン酸ナトリウム	3.5	5	6.7	12 日間
26-11	GuSCN		HCl		三リン酸ナトリウム	7.2	8	1.9	6 日間
26-12	GuSCN		HCl		ピロリン酸ナトリウム	7.2	8	1.6	6 日間
28-6	GuSCN		HCl		三リン酸ナトリウム	3.5	5	7	6 日間
28-7	GuSCN		HCl		三リン酸ナトリウム	7.3	8.5	2.6	6 日間

本発明のある特定の特色のみが本明細書において例証及び記載されているが、当業者は多くの修正及び変更に想到するであろう。したがって、添付の請求項は、そのような修正及び変更すべてを本発明の範囲内にあるとして網羅するように意図されていることを理解されたい。

10

20

30

40

【 四 1 】

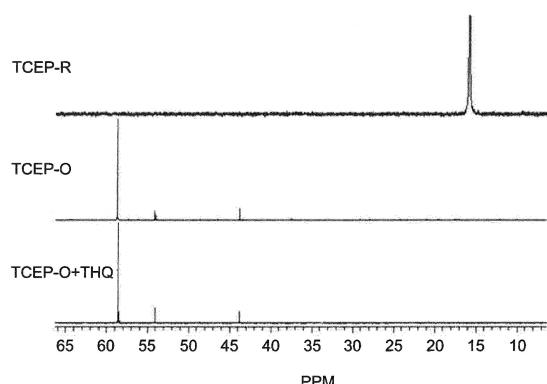


FIG. 1

【 図 2 】

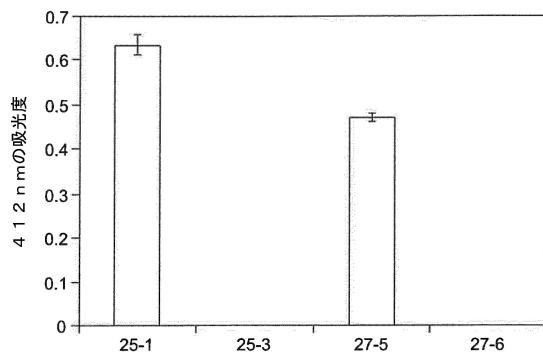


FIG. 2

【 四 3 】

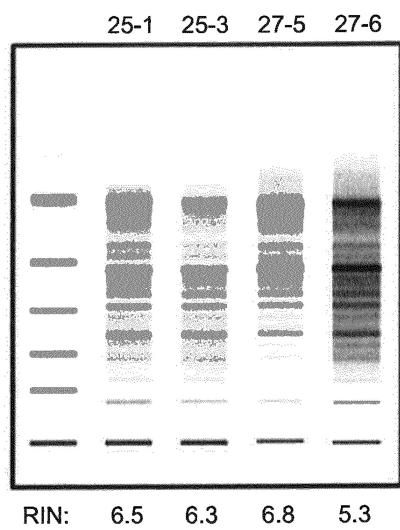


FIG. 3

【図4】

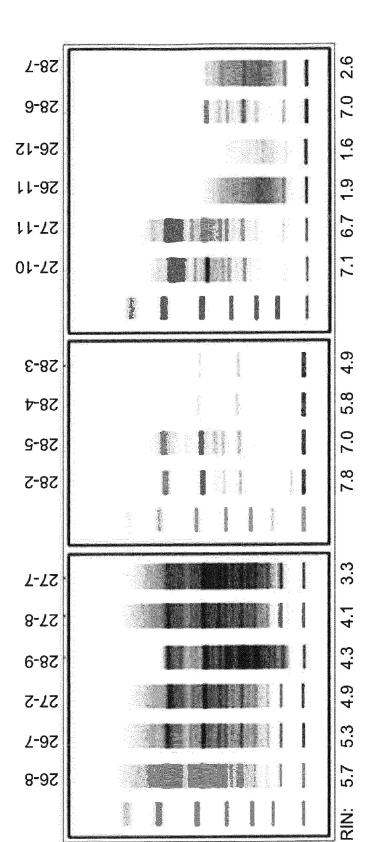


FIG. 4

フロントページの続き

(72)発明者 クバム, エリック・リーミング

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ・グローバル・リサーチ、
ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ

(72)発明者 リー, ビン

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ・グローバル・リサーチ、
ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ

(72)発明者 ベイルズ, ブライアン・クリストファー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ・グローバル・リサーチ、
ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ

審査官 山本 匠子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0081363(US, A1)

特表2012-501681(JP, A)

国際公開第2012/018638(WO, A1)

特表2010-536377(JP, A)

特許第6248095(JP, B2)

AbouHaidar, MG, et al., Non-Enzymatic RNA Hydrolysis Promoted by the Combined Catalytic Activity of Buffers and Magnesium Ions, Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences, 1999年, 54, 542-548

Kumar, K., et al., Inhibition of mammalian ribonuclease by endogenous adenosine dinucleotides, Biochemical and Biophysical Research Communication, 2003年, 300, 81-86

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

C12M 1/00-3/10

C12Q 1/00-3/00

G01N

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

CAPLus / WPIDS / MEDLINE / REGISTRY / EMBASE / BIOSIS
(STN)