

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4868697号
(P4868697)

(45) 発行日 平成24年2月1日(2012.2.1)

(24) 登録日 平成23年11月25日(2011.11.25)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 H 21/04 (2006.01)	C O 7 H 21/04 A
B O 1 D 11/02 (2006.01)	B O 1 D 11/02 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 1 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2002-549695 (P2002-549695)	(73) 特許権者	502221282
(86) (22) 出願日	平成13年12月14日 (2001.12.14)		ライフ テクノロジーズ コーポレーション
(65) 公表番号	特表2004-521881 (P2004-521881A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
(43) 公表日	平成16年7月22日 (2004.7.22)		08, カールスバッド, バン アレン
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/005524		ウェイ 5791
(87) 国際公開番号	W02002/048164	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成14年6月20日 (2002.6.20)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成16年12月13日 (2004.12.13)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	09/736,632		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成12年12月14日 (2000.12.14)	(72) 発明者	ジョン・マシュー・ペーカー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イギリス・ケント・エムイー15・9ユー
前置審査			ジェイ・メイドストーン・ルーズ・ロード
			・481

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の分離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料から核酸を抽出する方法に使用するための水溶性生成物であって、

前記方法が、

(i) 第1のpHにおいて、含まれる化学種が正のイオン化可能な窒素原子および少なくとも2つのヒドロキシル基を有する物質であって、前記ヒドロキシル基のうち少なくとも1つは2つの原子でイオン化可能な窒素原子から隔てられて存在し、かつ前記第1のpHにおいて正電荷を有する前記物質と、試料とを接触させることにより、前記物質に核酸を結合させる工程と、

(ii) 物質上の電荷が負、中性またはより小さい正電荷となる第2のより高いpHで前記核酸を遊離させる工程
とを含み、前記正のイオン化可能な窒素原子が4.5~8.5のpKaを有し、かつ前記核酸の遊離が、核酸が変性されず、および/または分解されず、および/または脱プリン化されない条件下、および/または生理学的条件下で起こる方法であり；ならびに

前記生成物が、別個に重合体に結合するか、または互いに架橋剤により重合されたことを特徴とする複数のイオン化可能な基を含み、かつ前記イオン化可能な基が以下に示す群から選択される化学種により供給される、前記水溶性生成物：

N-2-アセトアミド-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、

N-2-アセトアミド-2-イミノ二酢酸(ADA)、

アミノメチルプロパンジオール(AMP)、

10

20

3-1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (AMPSO)

N,N-ビス2-ヒドロキシエチル-2-アミノエタンスルホン酸 (BES)、

N,N-ビス-2-ヒドロキシエチルグリシン (BICINE)、

ビス-2-ヒドロキシエチルイミノトリスヒドロキシメチルメタン (ビス-トリス)、

1,3-ビストリスヒドロキシメチルメチルアミノプロパン (ビス-トリスプロパン)、

4-シクロヘキシルアミノ-1-ブタンスルホン酸 (CABS)、

3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸 (CAPS)、

3-シクロヘキシルアミノ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸 (CAPSO)、

2-N-シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸 (CHES)、

10

3-N,N-ビス-2-ヒドロキシエチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (DIPSO)、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-3-プロパンスルホン酸 (EPPS)、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-4-ブタンスルホン酸 (HEPBS)、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸 (HEPES)、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-プロパンスルホン酸 (HEPPSO)、

2-N-モルホリノエタンスルホン酸 (MES)、

4-N-モルホリノブタンスルホン酸 (MOBS)、

3-N-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS)、

3-N-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (MOPSO)、

ピペラジン-N,N-ビス-2-エタンスルホン酸 (PIPES)、

20

ピペラジン-N,N-ビス-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (POPSO)、

N-トリスヒドロキシメチル-メチル-4-アミノブタンスルホン酸 (TABS)、

N-トリスヒドロキシメチル-メチル-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPS)、

3-N-トリスヒドロキシメチル-メチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (TAPSO)

N-トリスヒドロキシメチル-メチル-2-アミノエタンスルホン酸 (TES)、

N-トリスヒドロキシメチルメチルグリシン (TRICINE)、

トリスヒドロキシメチルアミノメタン (トリス)、

ポリヒドロキシル化されたイミダゾール類、

トリエタノールアミン二量体類および重合体類、

30

ジ/トリ/オリゴアミノ酸、

Gly-Gly、

Ser-Ser、

Gly-Gly-Gly、ならびに

Ser-Gly

からなる群。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料から核酸を抽出する方法、およびこれらの方法、特に血液のような生体試料から核酸を抽出する方法を実施する際に有用な生成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

一連の目的のためのDNA分析の非常に大きい需要があり、このため、DNAおよび他の核酸の分離および精製の迅速、安全かつ高処理能力の方法が必要となっている。

【0003】

DNAの同定または分析用の試料は、動物および植物細胞、糞、組織等の生物材料のような広範囲の源から採取することができ、また、試料は土壌、食糧、水等からも採取することができる。

【0004】

50

DNAの抽出の既存の方法としては、フェノール/クロロホルムの使用、塩析、カオトロピック塩およびシリカ樹脂の使用、アフィニティ樹脂の使用、イオン交換クロマトグラフィーならびに磁性ビーズの使用などがある。方法は、米国特許第5057426号（特許文献1）、米国特許第4923978号（特許文献2）、欧州特許公開第0512767A1号（特許文献3）および欧州特許第0515484B号（特許文献4）および国際公開第95/13368号（特許文献5）、国際公開第97/10331号（特許文献6）および国際公開第96/18731号（特許文献7）に記載されている。これらの特許および特許出願は、固体担体上に核酸を吸着させ、次いで、核酸を分離する方法を開示している。以前に使用された方法では核酸を分離するのにいくつかの種類の溶媒を使用しており、これらの溶媒は引火性、可燃性または有毒であることが多い。

10

【0005】

欧州特許公開第0707077A2号（特許文献8）は、核酸を酸性pHで沈殿させ、アルカリ性pHで遊離させるための合成水溶性重合体を記載している。核酸の再溶解は、核酸、特にRNAが変性、分解した状態になり得る、あるいは保存および分析の前にさらなる精製または調整を必要とするpH、温度の極値および/または高い塩濃度で行われる。

【0006】

国際公開第96/09116号（特許文献9）は、pH変化を用いる高または低イオン強度の水溶液からの標的化合物、特にタンパク質の回収のための混合方式の樹脂を開示している。樹脂は、標的化合物が結合するpHでは疎水性の特性を有し、標的化合物が脱離するpHでは親水性かつ/または静電的特性を有している。

20

【0007】

血液試料は広範囲の理由のために日常的に採取されるので、血液はDNA分析用の最も豊富な試料源の1つである。しかし、血液は粘性があり、タンパク質性であるため、既知のDNA抽出法を用いる場合、比較的少量のDNAを含む大量の試料を取り扱うことが困難であることから、オートメーションを用いて遂行することは困難であることが立証された。従来、核酸抽出は、有害な試薬とゆっくりした処理時間を用いることによってのみ部分的に自動化されている。

【0008】

国際公開第99/29703号（特許文献10）は、低pH(例えば、pH6)で試料中の核酸を固相に結合させ、より高いpH(例えば、pH8)で核酸を遊離させる、核酸を精製するための電荷スイッチ物質を開示している。適用例は、ヒスチジンまたはポリスチジン基を取り込んだ固相の使用を例示している。

30

【特許文献1】米国特許第5057426号

【特許文献2】米国特許第4923978号

【特許文献3】欧州特許公開第0512767A1号

【特許文献4】欧州特許第0515484B号

【特許文献5】国際公開第95/13368号

【特許文献6】国際公開第97/10331号

【特許文献7】国際公開第96/18731号

【特許文献8】欧州特許公開第0707077A2号

40

【特許文献9】国際公開第96/09116号

【特許文献10】国際公開第99/29703号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

(発明の概要)

概して、本発明は、国際公開第99/29703号に開示されている初期の研究を超えて存続し、改善されている、核酸を抽出または精製するための新規物質および条件に関する。

【0010】

私は今回、血液および他の生物材料ならびに核酸を含む他の試料からの核酸および他の

50

生体分子の抽出の改善された方法を発明した。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明により、生物材料を、生体分子を第1のpHにおいて結合することができる固相と接触させることと、次いで、第2のpHにおいて溶離溶媒を用いて溶離により固相に結合している生体分子を抽出することを含む、生物材料から生体分子を抽出する方法を提供する。

【0012】

特に、核酸を含む試料から核酸を抽出する方法であって、試料を、正電荷を有し、負に荷電した核酸に結合する第1のpHで前記固相と接触させる工程と、次いで、固相が中性、負電荷または第1のpHにおけるよりも小さい正電荷を有する、より高いpHで核酸を遊離させる工程とを含む方法を提供する。

10

【0013】

一般的に固相は、総括的正電荷を有する。すなわち、全体として固相上のすべての正および負電荷の合計が正である。しかし、全体として固相が負に荷電しているが、核酸が結合することができる主として正の電荷の部分をも有することも可能である(好ましくないが)。そのような固相は、本発明の範囲内である。

【0014】

固相の電荷の変化は、本明細書では「電荷スイッチング」と称し、固相中、固相上または固相としての「電荷スイッチ物質」の使用により達成される。

20

【0015】

電荷スイッチ物質は、周囲条件に従って電荷を変化させるイオン化可能な基を含む。電荷スイッチ物質は、イオン化可能な基のpKaが、核酸を固相に結合させ、核酸を固相から遊離させることが望まれる条件に適切であるように選択する。一般的に、核酸は、電荷スイッチ物質が正に荷電する、pKaより低いまたはほぼ等しいpHで電荷スイッチ物質に結合し、電荷スイッチ物質がより小さい正電荷を有するか、中性または負に荷電する、より高いpH(通常pKaより高い)で遊離する。

【0016】

本発明はより詳細には、核酸の結合および/または遊離(特に遊離)が温度および/またはpHおよび/またはイオン強度の温和な条件下で起こることを可能にする電荷スイッチ物質の使用を対象とする。

30

【0017】

一般的に電荷スイッチ物質は、pHが正のイオン化可能な基のpKaをまたがる範囲で、または近くまで増加するとき、正のイオン化可能な基における電荷が正からより小さい正または負に変化するため、電荷を変化させる。これはまた、負のイオン化可能な基における電荷の中性またはより小さい負の値からより大きい負の値への変化とも組み合わせられることがある。しかし、別の実施形態(下に記載する)において、電荷スイッチ物質は、両pH値で正に荷電する物質(金属酸化物のような)と、pHがそのpKaをまたがる範囲で、または近くまで増加するとき、その電荷がより負になる、負のイオン化可能な基を含む。

【0018】

電荷スイッチ物質は、約3~9のpKaを有するイオン化可能な基を含むことがある。正のイオン化可能な基の場合、pKaはより好ましくは、少なくとも約4.5、5.0、5.5、6.0または6.5および/または多くて約8.5、8.0、7.5または7.0である。正のイオン化可能な基の特に好ましいpKaは約5~8であり、さらに好ましくはpKaは約6.0~7.0、さらに好ましくは約6.5~7.0である。負のイオン化可能な基のpKaは約3~7、さらに好ましくは約4~6であり、さらに好ましくは、核酸を結合することが望まれるpHとほぼ同じである。

40

【0019】

複数のpKa値(例えば、異なるイオン化可能な基)を有する物質または異なるpKa値を有する物質の配合も、第1(より低い)のpHで物質が正電荷を有し、より高いpHで電荷がより小さい正、中性または負であるならば、本発明による電荷スイッチ物質としての使用に適し

50

ている。

【 0 0 2 0 】

一般的に電荷スイッチは、pHを当該イオン化可能な基または1つのイオン化可能な基のpKaより低い値から高い値に変化させることによって達成される。しかし、pHが特定のイオン化可能な基のpKaと同じであるとき、個々のイオン化可能な基の50%が荷電され、50%が中性であることは理解されるであろう。したがって、電荷スイッチ効果は、イオン化可能な基のpKaに近いが、またがらない範囲でpHを変化させることによって達成させることができる。例えば、カルボキシ基(pKaは一般的に約4)のような負のイオン化可能な基のpKaにおいて、そのような基の50%がイオン化した形態(例えば、 COO^-)にあり、50%が中性の形態(例えば、 COOH)にある。pHが増加するにつれて、基が負の形態にある割合が増加する。

10

【 0 0 2 1 】

好ましくは、結合工程はイオン化可能な基のpKaより低いpHで、あるいは(これは好ましくはないが)pKaの上の約1pH単位内で行う。一般的に、遊離工程はイオン化可能な基のpKaより上のpH、好ましくはpKaの上1~3pH単位内で行う。

【 0 0 2 2 】

欧州特許第0707077号に開示されているような従来技術の方法は、しばしば高いpHを用いて核酸を遊離させている。例えば、NaOHのような強い塩基を用いている。そのような高いpHは、例えば、サザンまたはノーザンブロッティングもしくはPCRのような検出および/または増幅技術における核酸のその後の使用の妨げとなり得る、不完全な複製の問題につながる核酸の脱プリン化を引き起こす可能性がある。

20

【 0 0 2 3 】

再び欧州特許第0707077号におけるような加熱と組み合わせた強塩基または弱塩基の使用も、RNAの分解(特に、10またはそれ以上のpHでの)およびPCRにおける特異的結合の欠如につながり得る2本鎖DNAの変性(すなわち、2本鎖形から少なくとも部分的に1本鎖形への不可逆的変換)の原因となり得る。

【 0 0 2 4 】

本発明によるpKa値の適切な選択は、従来技術と異なり、固相からDNAを遊離させる工程を温和な条件下で実施することを可能にする。本明細書で用いているように、「温和な条件」という用語は一般的に、核酸が変性されない、かつ/または分解されない、かつ/または脱プリン化されない条件、および/または実質的に生理学的である条件を意味する。

30

【 0 0 2 5 】

好ましくは遊離工程は約pH10.5以下、より好ましくは約pH10.0、9.8、9.6、9.4、9.2、9.0、8.9、8.8、8.7、8.6または8.5以下のpHで実施する。電荷スイッチ物質のpKa(s)によって、遊離工程を8.0、7.5または7.0のようなより低いpHで実施してもよい。好ましくは遊離工程はNaOHの実質的な非存在下で、また好ましくは他のアルカリ金属水酸化物の実質的な非存在下で、より好ましくは強無機塩基の実質的な非存在下で実施する。実質的な非存在とは、濃度が25mM未満、好ましくは20mM未満、より好ましくは15mMまたは10mM未満であることを意味する。

【 0 0 2 6 】

pHの望ましい変化は、溶液のイオン強度および/または温度を変化させることにより実現することができる。その理由は、pHはこれらの2つの因子に依存するためである。しかし、高温も高イオン強度も一般的に望ましい温和な条件に適合せず、したがって、pHの変化をイオン強度または温度の大きい変化により実現することは好ましくない。さらに、イオン強度を増加させることは、固相への結合に対する荷電化学種の核酸との競合を増大させ、そのため、核酸の遊離を促進する可能性がある。したがって、イオン強度の小さい変化は、許容できるものであり、好ましくは以下に示す限度および範囲内で、核酸を遊離させるためにpHの変化とともに用いてもよい。

40

【 0 0 2 7 】

好ましくは遊離工程を実施する温度は約70 以下、より好ましくは約65 、60 、55

50

、50、45 または40 以下である。より好ましくは、そのような温度を全工程に適用する。遊離工程または全工程は、35、30 または25 のようなより低い温度で実施することさえもできる。

【0028】

さらに、遊離工程は好ましくは低イオン強度の条件下、適切には1Mまたは500mM未満、好ましくは400mM、300mM、200mM、100mM、75mM、50mM、40mM、30mM、25mM、20mMまたは15mM未満の条件下で行う。それは10mM未満であってもよい。イオン強度は、少なくとも約5mM、より好ましくは約10mMであってもよい。より好ましくはこれらのイオン強度を結合工程にも適用する。

【0029】

PCRは、pHおよび荷電汚染物質の存在に敏感である。特に好ましい実施形態において、遊離工程は、核酸を保存するのに適した試薬(市販の保存緩衝液、例えば、10mMトリス-HCl、pH8.0~8.5、任意に1mM EDTAの存在下)を用いて、あるいは核酸が受ける処理に使用するのに適した試薬(PCR緩衝液、例えば、10mMトリス-HCl、50mM KCl、pH8.5)を用いて実施される。

【0030】

既に知られている一般的な核酸抽出法は、例えばPCRに適した溶液を調製するために、核酸を含む溶離生成物を希釈する工程を必要とする。本発明は遊離した核酸を希釈することを避けることが好ましい。

【0031】

DNAを結合する工程が温和な条件下、適切には3.0以上、好ましくは3.5、4.0、4.5または5.0以上のpHで行われることが好ましい。以前の方法では、8Mグアニジンのような高濃度のカオトロピック物質を用いた。そのような条件は、結合工程が1Mまたはそれ以下の総濃度の溶液中で行われることが好ましい本発明の実施には必要ではない可能性がある。より好ましい温度およびイオン強度は、遊離工程について上で詳述したとおりである。

【0032】

核酸の遊離のためのそのような温和な条件の使用は、さらなる精製工程(例えば、従来技術の方法において高イオン濃度の使用により必要とされた工程)なしに、あるいは高イオン強度を希釈すること(核酸を溶離するために高イオン強度を用いる従来技術の方法の場合のように)を必要とせずに、抽出されたDNAまたはRNAを反応または保存チューブに直接加えることができるので、少量の核酸を抽出するのに特に有用である。したがって、容器を変えることによる核酸の損失、精製工程における不完全な回収、分解または変性、および少量の核酸の希釈を避けることができる。これは、特定の検出および/または増幅方法におけるような、問題の核酸が試料中に低コピー数で存在する(または存在すると予想される)場合に特に有利である。

【0033】

概して、本発明による電荷スイッチ物質としての使用に好ましい化学種は、正にイオン化可能な窒素原子と、そのpKaを低下させるために窒素原子に十分に近い、少なくとも1つであるが、好ましくは複数の電気陰性基(ヒドロキシ、カルボキシ、カルボニル、リン酸またはスルホン酸基)または二重結合(例えば、C=C二重結合)を含む。そのような分子は、本発明による温和な条件下での核酸の抽出に適したpKa値を有する傾向があることが見いだされた。少なくとも1つ(しかし、好ましくは複数)の電気陰性基が2つ以下の原子(通常炭素原子)によりイオン化可能な窒素から隔てられていることが好ましい。ヒドロシキル基が特に好ましい電気陰性基である(特にいくつかのヒドロシキル基が存在する、例えばトリス($C(CH_2OH)_3-NH_2$)またはビス-トリス(下記を参照)のようなポリヒドロキシアミン中に存在する場合)。その理由は、それらが(1)窒素原子のpKaを(例えば、アミノ基、例えば、約10または11から)中性(すなわち、約7のpKa)のまわりの適切な値に低下させる、(2)アミノ基の窒素原子がその正電荷を失うとき、その化学種がpKa以上の可溶性/親水性に留まることを可能にする、(3)固体基質、例えばポリカルボキシル化重合体(ポリアクリル酸のような)に対する共有結合の部位を与える、そして(4)遊離工程に適し、PCRのような処理

10

20

30

40

50

が実施されるpH(一般的にpH8.5)において変化せず、荷電化学種の存在はPCRを特に妨害する可能性があるためである。特に好ましいものは、イオン化可能な窒素原子および少なくとも2、3、4、5または6個のヒドロキシル基を有する化学種である。ポリヒドロキシル化されたアミンのさらなる例は、ジエタノールアミンのようなジアルコールアミン試薬である。一実施形態において、これらの化合物に基づくシラン試薬を用いて、 $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_n]_2-\text{N}-(\text{CH}_2)_m-$ 部分[式中、nおよびmは1~10から選択される]を固相に結合させることができる。3-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノプロピル-トリエトキシシランを用いたこの例を以下に示す。

【0034】

多くの標準的弱塩基性緩衝液は、中性(すなわち、7)に近いpKa値を有するので、電荷ス

10

【0035】

電荷スイッチ物質として使用するために、イオン化可能な基を含む化学種を固体担体(例えば、ビーズ、粒子、チューブ、ウエル、プローブ、ディップスティック、ピペットチップ、スライド、ファイバー、膜、紙、セルロース、アガロース、ガラスまたはプラスチック)上に単量体または重合体の形態で、吸着、イオンまたは共有結合相互作用により固定化させるか、あるいは重合体主鎖に共有結合させ、次にこれを固体担体上に固定化させることができる。あるいは、それらを本質的に電荷スイッチングを示す不溶性の形態(重合体主鎖への結合を伴うまたは伴わない)で固体、例えば、ビーズ、粒子、チューブ、ウエル、プローブ、ディップスティック、ピペットチップ、スライド、ファイバー、膜また

20

【0036】

固相物質、特にビーズおよび粒子は、磁化性、磁性または常磁性であってよい。これは、核酸のさらなる処理または保存の前に遊離した核酸を含む溶液から固相を取り出すのに役立てることができる。

【0037】

好ましくは弱塩基性緩衝液は、生物学的緩衝液、すなわち、生物学的緩衝液に一般的に用いられている種類の緩衝液から選択される緩衝液である。生物学的緩衝液の例は、シグマ(Sigma)カタログのような商用化学カタログに見いだすことができる。

【0038】

イオン交換樹脂中のイオン化可能な基を供給するのに用いる化学種の浸出(すなわち、固相から液相中の溶液への移動)は、特に化学種が固相に吸着により付着している場合に、事実上ある程度まで避けられない現象である。そのような浸出は一般的に、得られる生成物中の不純物の原因となり、これが、特に生成物がPCRに用いるためのものである場合(および特に化学種が荷電している場合)、重要な問題につながる可能性がある。電荷スイッチ物質におけるイオン化可能な基を供給するために生物学的緩衝液を使用することにより、この問題を回避することができる。その理由は、そのような緩衝剤が液相中に浸出したとしても、核酸に対しても、また核酸が供される可能性があるPCRのような下流の過程に対しても一般的に有意な影響がないからである。確かに、多くの生物学的緩衝液がPCR

40

【0039】

特に好ましい実施形態において、遊離工程は、電荷スイッチ物質中、電荷スイッチ物質として、または電荷スイッチ物質上で用いられている同じ生物緩衝剤を含む緩衝液中で行われる。

【0040】

本発明による電荷スイッチ物質中で用いるための適切な生物緩衝剤およびそれらのpKa値は次のとおりである。

N-2-アセトアミド-2-アミノエタンスルホン酸 $\ddagger$ (ACES)、pKa 6.8、

N-2-アセトアミド-2-イミノ二酢酸 $\ddagger$ (ADA)、pKa 6.6、

アミノメチルプロパンジオール $\dagger$ (AMP)、pKa 8.8、

50

3-1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸† (AMPSO)、pKa 9.0、

N,N-ビス2-ヒドロキシエチル-2-アミノエタンスルホン酸†† (BES)、pKa 7.1、

N,N-ビス-2-ヒドロキシエチルグリシン† (BICINE)、pKa 8.3、

ビス-2-ヒドロキシエチルイミノトリスヒドロキシメチルメタン‡‡ (ビス-トリス)、pKa 6.5、

1,3-ビストリスヒドロキシメチルメチルアミノプロパン‡‡ (ビス-トリスプロパン)、pKa 6.8、

4-シクロヘキシルアミノ-1-ブタンスルホン酸(CABS)、pKa 10.7、

3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸(CAPS)、pKa 10.4、

3-シクロヘキシルアミノ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CAPSO)、pKa 9.6、

2-N-シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸(CHES)、pKa 9.6、

3-N,N-ビス-2-ヒドロキシエチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸†† (DIPSO)、pKa 7.6、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-3-プロパンスルホン酸†† (EPPSまたはHEPPS)、pKa 8.0、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-4-ブタンスルホン酸† (HEPBS)、pKa 8.3、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸†† (HEPES)、pKa 7.5、

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-プロパンスルホン酸†† (HEPPSO)、pKa 7.8、

2-N-モルホリノエタンスルホン酸‡ (MES)、pKa 6.1、

4-N-モルホリノブタンスルホン酸†† (MOBS)、pKa 7.6、

3-N-モルホリノプロパンスルホン酸†† (MOPS)、pKa 7.2、

3-N-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸‡‡ (MOPSO)、pKa 6.9、

ピペラジン-N,N-ビス-2-エタンスルホン酸‡‡ (PIPES)、pKa 6.8、

ピペラジン-N,N-ビス-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸†† (POPSO)、pKa 7.8、

N-トリスヒドロキシメチル-メチル-4-アミノブタンスルホン酸† (TABS)、pKa 8.9、

N-トリスヒドロキシメチル-メチル-3-アミノプロパンスルホン酸†† (TAPS)、pKa 8.4

、
3-N-トリスヒドロキシメチル-メチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸†† (TAPSO)、pKa 7.4、

N-トリスヒドロキシメチル-メチル-2-アミノエタンスルホン酸†† (TES)、pKa 7.4、

N-トリスヒドロキシメチルメチルグリシン† (TRICINE)、pKa 8.1、

トリスヒドロキシメチルアミノメタン† (トリス)、pKa 8.1、

ヒスチジン*、pKa 6.0およびポリヒスチジン‡‡、

イミダゾール*、pKa 6.9およびその誘導体* (すなわちイミダゾール類)、特にヒドロキシル基を含む誘導体**、

トリエタノールアミン二量体**、オリゴマー**および重合体**、ならびに

ジ/トリ/オリゴアミノ酸**、例えば、Gly-Gly、pKa 8.2、ならびにSer-Ser、Gly-Gly-GlyおよびSer-Gly、後者3つが7~9の範囲のpKaを有する。

【0041】

好ましい実施形態において、上で星印(*)で印を付けた緩衝剤は本発明の目的のための生物緩衝剤であるとはみなされない(化学カタログにそれとして指定されているであろうとなかろうと)。より好ましい実施形態において、2つの星印(**)で印を付けたものも生物緩衝剤であるとはみなされない。好ましい生物緩衝剤には短剣符(†)で印を付け、より好ましい生物緩衝剤には2つの短剣符(††)で印を付け、さらにより好ましい生物緩衝剤には二重短剣符(‡)で印を付け、最も好ましい生物緩衝剤には2つの二重短剣符(‡‡)で印を付けている。

【0042】

イオン化可能な基を含むこれらおよび他の化学種は、共有結合、イオンまたは吸着相互作用を用いて固相担体上に単量体として被覆することができる。さらに、または、代わる

10

20

30

40

50

べきものとして、それらをそのような固相担体上に重合体の形態で(好ましくは縮合重合)、例えば、負に荷電した表面上(例えば、露出したCOOHまたはSO₃基を有する表面)への吸着により、あるいは共有結合により被覆することができる。さらに、または、代わるべきものとして、イオン化可能な基を含む化学種を重合体(下記を参照)に結合させ、次いでこの重合体を、例えば、吸着または共有結合により固体担体に結合させることができる。

【0043】

望ましいpKa値を有するイオン化可能な基(通常、窒素原子であるが、これに限定されない)が核酸を結合し、遊離させることが依然としてできるように、化学種または重合体主鎖がヒドロキシル基または他の基を介して固体担体に共有結合により結合していることが好ましい。

10

【0044】

正のイオン化可能な基を含む生物緩衝剤および他の化学種は、好ましくは上記の範囲内の適切なpKaを有する負のイオン化可能な基を含む化学種とともに用いることができる。例えば、生物緩衝剤(一以上の正にイオン化可能な窒素原子を含む)を、生物緩衝剤の結合の後でさえも露出したカルボキシ基を有する重合体または他の固相物質に結合させることができる。そのような物質は、カルボキシ基のうちの少数のものが負に荷電し(すなわち、少数のものがCOO⁻の形態で、ほとんどがCOOHの形態である)、イオン化可能な窒素原子の大部分が正に荷電している低いpHで核酸を結合することができる。より高いpHでは、負電荷がより強く(すなわち、カルボキシ基がCOO⁻の形態である割合がより大きい)かつ/または正電荷がより弱いので、核酸は固相により反発される。

20

【0045】

イオン化可能な基を含む化学種(上記の生物緩衝剤のような)は、既知の化学を用いて重合体主鎖に結合させることができる。例えば、ヒドロキシル基を含む化学種は、カルボジイミド化学を用いてカルボキシル化重合体主鎖に結合させることができる。当業者が利用できる他の化学としては、他の重合体主鎖(ポリエチレングリコール(PEG)または炭水化物をベースとする)を用い、一連の標準的なカップリング化学(例えば、すべてを本願明細書に援用する Immobilised Affinity Ligand Techniques, Greg T. Hermason, A. Krishna Mallia and Paul K. Smith, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1992年、ISBN 01234 23309を参照)を用いることなどが挙げられる。

【0046】

あるいは、イオン化可能な基を含む化学種は、主鎖重合体を用いずに、架橋剤、例えば、ヒドロキシ基を介して結合する試薬(例えば、カルボニルジイミダゾール、ブタンジオールジグリシジルエーテル、ジアルデヒド、ジイソチオシアナート)を用いて重合することができる。適切なpKaを有する重合アミノ酸、例えば、Gly-Glyを生成させるために、単純縮合化学により重合体を生成させることもできる。

30

【0047】

イオン化可能な基を含む化学種のそのような固定化、結合および/または重合は、イオン化可能な基のpKaに影響を及ぼさないか、あるいはそれを上記の望ましい範囲に留めるものであることが好ましい。例えば、正にイオン化可能な窒素原子を介して化学種を結合または重合させないことが一般的に好ましい(例えば国際公開第97/2982号と異なる)。本発明の実施に際して、ヒドロキシル基を介して化学種を固定化、結合および/または重合させることが特に好ましい。

40

【0048】

好ましい重合物質は、ビス-トリスの二量体またはオリゴマー、もしくは複数のビス-トリス分子をポリアクリル酸主鎖に結合させることにより、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を用いてビス-トリス単量体をポリアクリル酸と反応させることにより生成した物質である。重合体は、適切な試薬または水に対する透析を用いて反応物から容易に分離することができる。ポリアクリル酸は約500と5,000,000またはそれ以上との間の分子量を有することが好ましい。ポリアクリル酸は100,000~500,000の分子量を有することがより好ましい。

50

【0049】

得られるビス-トリス/ポリアクリル酸分子の性質は結合成分の比率に依存する。その理由は、重合体はビス-トリスで修飾されているアクリル酸基の割合によって異なる性質を有するからである。例えば、カルボキシ基の存在は低pHでビス-トリスが核酸に結合することを妨げない(特にビス-トリスが過剰である場合)が、より高いpHでのそれらの負電荷が核酸の遊離の助けとなるので、一部のカルボキシ基が修飾されずに残っていることが望ましい。本発明における使用の場合、ビス-トリス:カルボキシ基のモル比(結合の前)は、好ましくは5:1~1:5、より好ましくは3:1~1:3、さらにより好ましくは2:1~1:2、さらにより好ましくは1.5:1~1:1.5、最も好ましくは約1:1である。

【0050】

高残存電荷の存在(すなわち、荷電化学種が抽出された核酸とともに溶液中に存在する)は、PCRによる核酸の分析に悪影響を及ぼし、あるいは核酸へのプライマー、dNTPsまたはポリメラーゼの結合、もしくはPCRに不可欠である Mg^{2+} のキレート化合物形成を妨げる。残存正電荷を避けることが特に好ましい。

【0051】

上記の生物緩衝剤のような本発明において使用する好ましい物質は、核酸が遊離されるpHおよび/または8~8.5のpHにおいて、下流処理の妨害または阻害をもたらす可能性がない、最小限の残存正電荷(好ましくは最小限の電荷)を有するものである。

【0052】

同じ発明者の特許出願PCT/GB00/02211は、本発明の範囲内の特定の方法を開示しており、本発明の例示としてその全部を本願明細書に援用する(その態様のすべてを-本発明の他の態様については下記を参照)。特に、生物材料から生体分子を抽出する方法であって、低いpHで核酸に結合する傾向があるヒスチジンまたはポリヒスチジンを含む固相と接触させる工程と、次いで、pHが増加するときに結合した核酸を遊離させる溶離溶媒を用いて固相に結合した生体分子を溶離により抽出する工程とからなる方法を開示している。

【0053】

本発明の別の実施形態は、0~12または0~14のような広いpH範囲にわたって正に荷電している物質(例えば、pKa値が欠如している、あるいはpKa値が極端に高いpHにある、金属酸化物、金属、強または弱塩基などの電気陽性物質)を使用している。そのような正に荷電した物質を、核酸に結合することが望ましいpH値と遊離させることが望ましいpH値との中間、もしくは核酸に結合することが望ましいpHのわずかに下のpKaを有する負にイオン化可能な物質と組み合わせる。このような物質の組合せにより、負にイオン化可能な物質のpKaの前後および下の特定のpH値において、負に荷電した基がより少ないとき、核酸が結合するが、pHが増加し、より多数のイオン化可能な基が負に荷電するとき、核酸を遊離させることが可能になる。例えば、鉄II、III酸化物とポリカルボキシレートとの複合体(実施例を参照)は、負電荷が相対的に欠乏しているので正に荷電している鉄酸化物が核酸に結合することができるpH4で核酸に結合する。pHが約8に増加するとき、カルボキシ基の大部分が負に荷電するようになり、鉄酸化物上の正電荷が存続しているにもかかわらず、全体的な正電荷が減少するため核酸が遊離される。

【0054】

核酸精製の電荷スイッチ分子のさらなる例は、疎水性部分と適切なpKaを有する正のイオン化可能な基、例えば、デシルメチルイミダゾールまたはドデシル-ビス-トリスを含む親水性部分を有する洗剤または界面活性剤に基づいている。これらの洗剤/界面活性剤を表面上、例えば、プラスチック上に疎水性部分を介して吸着させることができ、親水性(イオン化可能な)部分を用いて核酸を捕捉することができる。

【0055】

核酸の捕捉および容易な遊離に適した物質の他のファミリーは、炭水化物、例えば、グルコサミン、ポリグルコサミン(キトサンを含む)、カナマイシンおよびそれらの誘導体、すなわち、核酸の結合および遊離のために適切なpKaを与える酢酸または硫酸基のような他の基も含むことができるヒドロキシル基により囲まれた一以上の窒素原子を含む糖環に

10

20

30

40

50

基づく構造である。

【0056】

適切なpKa値を有する他の群の物質は、核酸塩基、例えば、シチジン(pKa 4.2)である。これらは、カルボジイミドを用いて重合体または固相カルボキシ基にヒドロキシ基を介して固定化することができる。

【0057】

適切なpKa値を有するメンバーを有するさらなる群の物質は、複素環式含窒素化合物である。そのような化合物は、芳香族または脂肪族であってよく、モルホリン、ピロール、ピロリジン、ピリジン、ピリジノール、ピリドン、ピロリン、ピラゾール、ピリダジン、ピラジン、ピペリドン、ピペリジンまたはピペラジン含有化合物のような単量体、二量体または重合体、例えば、ポリビニルピリジンであってよい。そのような化合物は、イオン化可能な窒素原子のpKa値を例えば上記で限定したような許容できる範囲にするために電気陰性基で置換してもよい。しかし、一部の化合物においては、pKaが既にそのような範囲にあるので、必要でない。

10

【0058】

核酸を結合するためのさらなる群の固相は、表面アミン基、および特にポリアミンではないアミン基を有する。これらのモノアミン基は、式-NR₁R₂[式中、R₁およびR₂は水素もしくは置換または非置換アルキルである]によって表すことができる。これらの物質は一般的に本発明の好ましい実施形態において使用される物質よりも高いpKa値を有するが、それらは核酸の抽出に用いることができ、任意に固相の総括pKaを修正するために本明細書に記載のような負に荷電している化学種とともに用いられる。

20

【0059】

電荷スイッチ物質として作用し、核酸を結合することができるイオン化可能な基を供給する物質のさらなる群は、色素、および特に5~8のpKaを有する生体色素である。これらの物質は、固相上に固定化するか、被覆することができる。生体色素の例は、以下の実施例46で使用するニュートラルレッドである。

【0060】

本発明による使用のための好ましい物質は、親水性であり、例えば、水溶性である(または固定化または重合の前に水溶性である化学種を含む)電荷スイッチ物質を含む。

【0061】

電荷スイッチ物質を含む適切な固相が調製されたならば、pHを上または下に調節することにより、核酸の捕捉および放出の反復を行うことができる。したがって、同じ固相を用いて核酸について逐次反応または分析を行うことができる。例えば、電荷スイッチ物質を含むPCRチューブを用いて生物試料からDNAを分離することができる。次いで、PCR後に、同じチューブ内のpHを調節することにより、増幅されたDNA産物を緩衝液成分またはプライマーから分離することができる。

30

【0062】

特に好ましい固相物質は、無孔性である。多孔性担体は、担体の細孔内に捕捉することができるタンパク質を分離するのに一般的に用いられている。しかし、核酸は、一般的に用いられているそのような担体の細孔内に入るには大きすぎる傾向があり、したがって、担体の表面に結合するようになり、不純物が細孔内に捕捉される可能性がある。

40

【0063】

1本および2本鎖分子上の電荷密度は異なっているため、pHまたは塩濃度の適切な操作により1本鎖RNAまたはDNAを2本鎖DNAから分離するのに本方法を用いることができる。一般的に、1本鎖分子は、2本鎖分子よりも低いpHで固相への結合から開放される。

【0064】

任意には、例えば遺伝子チップの構築のため、およびプローブの調製のために、1本鎖DNAを調製することが望ましいことがある。pHおよび/またはイオン強度の操作は、1本鎖核酸の精製および遊離の助けとなり得る。本発明の方法は、試料中の2本鎖核酸を1本鎖核酸に変換する(好ましくは強塩基、例えば100mM NaOHもしくは高温、例えば60~100 °Cで弱塩

50

基を用いる)前工程を含めることができる。固相物質は、試料のpHを1本鎖核酸を結合するためのpH(一般的に4~7のpH)に変化させる緩衝液と同時に加えることが好ましい。

【0065】

本明細書に記載する物質は、結合により液相から例えば、ろ過または遠心分離により分離するのに十分に大きい架橋格子が生じるように、液相中の核酸を捕捉するのにも用いることができる。

【0066】

したがって、第2の態様において、本発明は、核酸を含む試料から核酸を抽出する方法であって、電荷スイッチ物質が正電荷を有し、負に荷電した核酸と結合する第1のpHにおいて試料を電荷スイッチ物質と接触させる工程と、次いで、電荷が中性、負または第1のpHにおけるよりも小さい正電荷となる第2のより高いpHにおいて核酸を遊離させる工程とを含み、電荷スイッチ物質が前記第1のpHで可溶性で、電荷スイッチ物質と結合した核酸との複合体が前記第1のpHにおいて、またはそれよりも高く、前記第2のpHよりも低いpHで不溶性である、方法を提供する。

10

【0067】

この方法の好ましい特徴は、電荷スイッチ物質を固相物質中に生成させるか、固相物質に固定化するか、もしくは結合させることを除いて、上述のとおりである。

【0068】

通常、電荷スイッチ物質は、第2のpHで可溶性であり、核酸の遊離時に核酸とともに溶液中に留まる。弱塩基性緩衝剤(任意には可溶性主鎖、例えばポリアクリル酸に結合した)を電荷スイッチ物質として用いることにより、上述のような汚染の問題を回避することができる。

20

【0069】

本発明の方法の結合工程と遊離工程との間に一以上の洗浄工程を含めることが好ましい。そのような洗浄工程は、核酸が洗浄工程で実質的に遊離しないように、一般的に前記の第1のpHで、もしくは前記の第1のpHよりも高いが、前記第2のpHよりも低いpHで行う。

【0070】

先に示したように、本発明の方法は、次に保存またはさらに処理(例えば、PCRにより)される核酸を抽出するのに特に適しており、これは電荷スイッチ物質が、そのような保存および/または処理を行うことができる、例えばチューブまたはウエルの形態であるときに特に適している。しかし、疑念を避けるために、遊離工程とその後の保存または処理は、不連続の工程として行う必要はなく、前記の保存または処理が核酸の遊離が起こるpHで行われる場合、同時に行うことができることを強調する。例えば、本発明の方法は、核酸を、PCRチューブに被覆した、あるいはPCRチューブにより別の方法で供給される電荷スイッチ物質に結合させ、結合した核酸を洗浄し、次いで、遊離工程を切り離すことなく、核酸の遊離を引き起こすPCR緩衝液を用いているPCR反応を開始することを含む。

30

【0071】

さらなる態様において、本発明は、遠のいた(receding)態様の方法に用いるための新規の電荷スイッチ物質を提供する。本発明は、さらにそのような方法におけるそのような電荷スイッチ物質の使用を含む。方法に関連して上述した電荷スイッチ物質のすべての好ましい特徴は、本発明のこの態様に同等かつ独立して適用される(すなわち、この態様に関する特徴の好ましい組合せは、方法の態様に関する好ましい組合せと異なっていることがある)。

40

【0072】

さらなる態様において、本発明は、電荷スイッチ物質、好ましくは生物緩衝剤を含む電荷スイッチ物質で被覆、含む、または形成された容器(好ましくはPCRまたは保存チューブまたはウエルもしくはピペットチップ)を提供する。

【0073】

以下の記述は、血液からの核酸の抽出を特に対象とするものであるが、あらゆる液体試料、特に、生物学的試料またはPCRのような実験技術の適用時に生成した試料からの核酸

50

の抽出にも当てはまる。

【0074】

この方法は、生物材料が血液である場合に特に有用であるが、プラスミドおよびベクターのような物質の分離ならびに植物DNA抽出などの一連の適用例に用いることができる。

【0075】

好ましくは血液中の細胞を溶解させて、核酸を放出させ、イオンおよび非イオン洗剤、塩類の低張溶液、プロテアーゼ、カオトロピック物質、溶媒との接触、pH変化または熱を用いるなどの既知の溶解剤および方法を用いることができる。細胞を溶解させて、核酸を分離する方法は、国際公開第96/00228に記載されている。

【0076】

生物材料が血液からなっている場合、操作および処理をより容易にするために、任意に試料を水または他の希釈剤で希釈することもできる。

【0077】

10倍までの希釈を用いることができ、一般的により大きい希釈度が良好であり、血液の低希釈を可能にすることが本発明の特徴である。

【0078】

血液を接触させる固相は、核酸に対して元来親和性を有する物質から生成させることができ、あるいは核酸を結合させるか、または核酸に対する親和性を増大させると思われる薬剤で表面を処理した物質から生成させることができる。適切な物質は、細孔制御ガラス、多糖(アガロースまたはセルロース)、他の種類のシリカ/ガラス、セラミック材料、単一成形部品としての多孔性プラスチックプラグまたは標準チューブ中のインサートのような多孔性プラスチック材料、ポリスチレンビーズ常磁性ビーズ等である。大きさと多孔度は重要でなく、様々であるので、特定の適用例ごとに選択することができる。

【0079】

固相の表面を処理または誘導体化する適切な手段としては、表面に電荷、例えば正電荷を導入することができるか、あるいは固相に親水性または疎水性表面を導入することができる物質、例えばヒドロキシ基、硝酸基、自己反応性基、色素および他の芳香族化合物で処理することなどがある。

【0080】

本発明の好ましい実施形態において、固相は1つのpHにおいてDNAを血液試料中の汚染物質に優先して結合させ、それとは異なるpHで溶離液と接触したときに結合核酸を遊離させるであろう。このシステムは、例えば6よりも小さい、低いpHで核酸に結合し、pHを増加、例えば8よりも大きくしたときに結合した核酸を遊離させる傾向があるヒスチジンまたはポリヒスチジンを組み込んだ固相とともに用いることができる。あるいは、核酸を実質的に中性pHでアミノ化した表面に結合させ、非常に高いpHで遊離させる。

【0081】

本発明の他の実施形態において、核酸を表面に結合させるように、結合剤を表面に組み込み、血液試料を表面と接触させるために、例えばプレートのウェル等のプラスチック成形物に結合剤を組み込むことができる。次いで、血液試料を除去し、表面を溶離剤で処理して、結合した核酸を遊離させる。表面がマルチウェルプレートのウェルの一部である場合、全システムを迅速大規模サンプリングおよび抽出技術に容易に適合させることができる。

【0082】

使用することができる結合剤は、pHをそのpKaより上に変化させることにより電荷を逆または中性にすることができる正に荷電した固相、例えば、ヌクレオチド、ポリアミン、イミダゾール基および適切なpKa値を有する他の同様な試薬を用いた荷電を切換え可能なイオン交換樹脂などである。

【0083】

また、核酸は、固相に組み込まれた様々な層間化合物、例えば、アクチノマイシンD、臭化エチジウム等を用いて挿入により結合させることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

本発明のさらなる実施形態において、プラスチック表面を官能基を含むように修飾することができる。プラスチックは、試料を含めるのに用いられるあらゆるプラスチック、例えば、ポリプロピレンであってよい。官能基は、適切な緩衝液中で核酸と結合するように正または負に荷電してよい。

【 0 0 8 5 】

あるいは、官能基は、他のリガンドまたは重合体と共有結合することができる化学基であってよい。

【 0 0 8 6 】

プラスチックをプラスチック成形物、例えば、プレートのウェルに、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)チューブとして用いる場合、成形配合物、例えば、射出成形配合物に適切な化学物質を含めるか、添加することにより、プラスチックの表面特性を本発明用に適切に修飾することができる。

【 0 0 8 7 】

これをPCRチューブまたはディープウェルプレートに用いる場合、チューブまたはウェルを用いて、少量のDNAまたはRNAを分離し、固定化して、後続のPCRまたは他の遺伝分析および操作の純粋な鋳型を得ることができる。

【 0 0 8 8 】

プラスチックがポリプロピレンで、例えば、それが薄壁PCRチューブの形態である場合、ポリプロピレン表面を、過マンガン酸カリウムおよび硫酸のような酸化剤で酸化して、カルボキシ基をさらに修飾することができる。このチューブは、溶液または粗試料、例えば血液からのDNAの分離を改善するために用いることができる。pH、比誘電率、溶解度またはイオン強度を調節することにより、DNAまたはRNAをチューブの壁に固定化し、洗浄して汚染物質を除去し、PCRまたは他の分析法に備えることができる。

【 0 0 8 9 】

電荷相互作用による核酸の結合を可能にするために、イミダゾールのような陰性基またはポリヒスチジンもしくは強または弱イオン交換体を共有結合させることにより、カルボキシ基をさらに修飾することができる。次いで、このチューブを溶液または粗試料、例えば血液からのDNAの分離を改善するために用いることができる。この場合にも、pH、比誘電率またはイオン強度を調節することにより、DNAまたはRNAをチューブの壁に固定化し、洗浄して汚染物質を除去し、PCRまたは他の分析法に備えることができる。

【 0 0 9 0 】

核酸は、PCRまたは他の分析法に備えるために、低塩濃度の緩衝液で溶離することができる。

【 0 0 9 1 】

混合/攪拌装置中で固相と混合し、血液試料を固相上に通して、固相を血液試料と接触させることができる。もしくは固相を常磁性とし、磁場により操作することができる。本発明は、特に血液からの核酸の分離または単離に適しているが、細胞壁破片または不溶性粒子の除去を特に必要とする一連の生体分子について用いることができる。

【 0 0 9 2 】

本発明の好ましい実施形態において、固相はカラム中に粒状で存在し、カラムを通して付与されている圧力差により血液試料が持ち上げられ、血液試料が空気とともに持ち上げられて、粒状固体物質が流動化するようになり、それにより、混合および接触速度が増加し、閉塞が最小限となる。

【 0 0 9 3 】

本発明の方法は、異なる試料から一連の抽出を実質的に同時に行うことができる場合にマルチウェル方式での使用に適しており、これは、迅速な高処理量の抽出を行うことを可能にし、コンビナトリアルケミストリーを実施することを可能にする抽出過程のオートメーションを促進する。これは、多種類の試料を同時に自動的に処理することができるように、標準的なウェル配列、例えば、8×12ウェル配列で高処理量を実現することを可能と

10

20

30

40

50

する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0094】

(詳細な説明)

本発明を種々の態様について実施例のみにより詳細に記述する。

【0095】

実施例1: 全血からの核酸の抽出

1gのアミノ化ガラスビーズを20mgのポリヒスチジンを含むpH8の0.1M重炭酸ナトリウム中0.01容積%のグルタルアルデヒドと混合することにより、グルタルアルデヒドを用いてポリヒスチジンを100 μ mガラスビーズに共有結合させることによって、電荷スイッチ型イオン交換体を調製した。一夜インキュベートした後に、ガラスビーズを徹底的に洗浄して、非共有結合物質を除去し、0.1容積%トウイーン20を含むpH5の10mM MES中に保存した。

10

【0096】

約300mgの100 μ m誘導体化ガラスビーズを、両端を閉じた1mlプラスチックカラムに加えた。

【0097】

血液試料を、1%トウイーン20、プロテアーゼ(200 μ g/ml)および1mM EDTAを含む同じ容積の10mM MES(pH5)とともにインキュベートした。消化が完了した後に、ガラスビーズを含むカラムに血液を吸い上げさせると、DNAが固定化され、汚染タンパク質が通過して廃棄される。

20

【0098】

固定化されたDNAを含むガラスビーズを、1%トウイーン20および1mM EDTAを含む10mM MES(pH5)からなる緩衝液で洗浄し、洗液が無色になるまで、これを繰り返した。

【0099】

洗浄後、ビーズを空気で乾燥し、DNAを少量の10mMトリス-HCl(pH8.5)で溶離し、無菌チューブに収集して分析に備える。このようにして、DNAが血液から分離された。異なる生体分子について、緩衝液等を適宜変更することができる。

【0100】

実施例2: カルボキシル化ビーズ上ポリヒスチジン

1gのカルボキシル化常磁性ビーズを50mMイミダゾール緩衝液(pH6)で洗浄し、次いで、50mlの50mMイミダゾール緩衝液(pH6)に100mgのポリヒスチジンを加えたものと混合した。化学結合剤(EDC)を1ml当たり5mgの最終濃度で加え、一夜混合した。ビーズを水、0.5M塩化ナトリウム、1%トウイーン20、100mMトリス-HCl(pH8)で洗浄し、10mM MES、0.1%トウイーン20 pH5中に保存した。

30

【0101】

血液からDNAを抽出するために、1mgのビーズを、25mM MES、1mM EDTAを含む10%トウイーン20 pH5で希釈した血液と混合した。ビーズを磁石で分離し、1mM MES、0.1%トウイーン20に再懸濁して洗浄した。DNAを溶離するために、ビーズを10mMトリス-HCl pH8.5に再懸濁し、磁石で分離して、DNAを溶液中に残す。

【0102】

実施例3: ビス-トリス固相磁性ビーズ

200mgのカルボキシル化1 μ m磁性粒子を1段階法で50mMイミダゾール緩衝液pH6.0中で100mgのビス-トリスおよび100mgのカルボジイミド(EDC)と反応させた。一夜インキュベートした後に、磁性粒子を洗浄し、プラスミドDNAを分離するのに用いた。

40

【0103】

アルカリ溶解法を用いて5mlの清澄細菌ライゼートを調製して、0.5M酢酸カリウムpH5中プラスミドを含む上清を得た。上清に2.5mgの磁性粒子を加え、1分間混合した。磁気分離し、水pH5で洗浄した後、200 μ lの10mMトリス-HCl pH8.5で純粋なプラスミドDNAを溶離した。

【0104】

50

磁性ビーズは、プロテイナーゼKを含む洗剤を主成分とする消化試薬を用いて全血からDNAを直接抽出するのにも用いた。

【0105】

実施例4: 固相磁性ビーズ上のトリシン

50mgのカルボキシル化1 μ m磁性粒子を1段階法で50mMイミダゾール緩衝液pH6.0中で50mgのトリシンおよび100mgのカルボジイミド(EDC)と反応させた。一夜インキュベートした後に、磁性粒子を洗浄し、プラスミドDNAを分離するのに用いた。アルカリ溶解法を用いて5mlの清澄細菌ライゼートを調製して、0.5M酢酸カリウムpH5中プラスミドを含む上清を得た。上清に2.5mgの磁性粒子を加え、1分間混合した。磁気分離し、水pH5で洗浄した後、200 μ lの10mMトリス-HCl pH8.5中で純粋なプラスミドDNAを溶離した。

10

【0106】

実施例5: ビス-トリス固相ポリスチレンビーズ

1gのカルボキシル化60 μ mポリスチレン粒子を1段階法で50mMイミダゾール緩衝液pH6.0中で500mgのビス-トリスおよび500mgのカルボジイミド(EDC)と反応させた。一夜インキュベートした後に、磁性粒子を洗浄し、上記のようにプラスミド核酸を分離するのに用いた。

【0107】

実施例6: ビス-トリス重合体

160mgの分子量240,000のポリアクリル酸、1.6gのビス-トリスおよび1.6gのEDCを50mMイミダゾールpH6.0中で混合して、ビス-トリス単量体を重合体に変換した。一夜インキュベートした後、混合物を水中で透析した。精製重合体を磁性COOHビーズ上に被覆するか、または液相中で血液からのゲノムDNAを結合させるのに用いた。5mlの血液試料を遠心分離して、核およびWBC集団を得て、得られたペレットを1% SDSで消化した。酢酸カリウムで沈殿させた後、上澄液を25mgの磁性-ビス-トリスまたは液体としての約250 μ gのポリ-ビス-トリスと混合した。両者の場合に、捕捉されたDNAを分離することができ、水で洗浄し、次いで、10mMトリス-HCl pH8.5に純粋な形態で再懸濁した。

20

【0108】

実施例7: 不溶性トリス-HCl重合体

この実施例では、80mgのポリアクリル酸を50mMイミダゾールpH6中で800mgのトリス-HClおよび800mgのEDCと混合して、固有の電荷スイッチ特性を有する不溶性重合体を調製した。生成した不溶性沈殿物は粒子状固相であり、ゲノムDNAについて実施例4に記載したのと同様にDNAを捕捉し、遊離させるのに用いた。

30

【0109】

実施例8: ピペットチップ上の固定化ポリビス-トリス

実施例2と同様に調製した0.1M重炭酸pH8中1mg/mlポリビス-トリス溶液を20個の200 μ lポリプロピレンピペットチップとともに60 $^{\circ}$ で8時間インキュベートした。次いで、チップを洗浄し、吸引、排出を10回繰り返して、透明細菌ライゼートから約150ngのプラスミドDNAを捕捉するのに用いた。水pH5で迅速洗浄した後、50 μ lの10mMトリス-HCl pH8.5中でDNAを溶離した。

40

【0110】

実施例9: PCRチューブ上の固定化ポリビス-トリス

実施例2と同様に調製した0.1M重炭酸pH8中1mg/mlポリビス-トリス溶液を8 $\times$ 12チューブの200 μ l PCRプレート中で60 $^{\circ}$ で8時間インキュベートした。洗浄した後、チューブを用いて、実施例4に従って調製した試料におけるゲノムDNAを結合させた。その後、10mMトリス-HCl pH8.5を用いてチューブ当たり約50ngのDNAを溶離した。

【0111】

実施例10: 液相中の電荷スイッチ洗剤

血液試料を実施例4に記載のように調製し、得られた上清にデシルイミダゾールをpH4で加えて、DNAを沈殿させた。遠心分離によりDNAペレットを集め、10mMトリスpH8.5に再溶解した。

50

【 0 1 1 2 】

実施例11: 固相上の電荷スイッチ洗剤

pH4の0.1M酢酸ナトリウム中1%溶液に浸漬して、デシルイミダゾールを200 μ lプラスチックピペット上に吸着させた。血液試料を実施例3に記載のように調製し、チップを用いて、吸引、排出を繰り返してDNAを結合させた。水で洗浄した後、pH10で約50ngのDNAを水中に回収した。

【 0 1 1 3 】

実施例12: ポリグルコサミン

10mgの低分子量キトサンを酸性化水に、次いで50mMイミダゾールpH5.5に溶解し、これを100mgのカルボキシ1 μ m磁性ビーズと、および50mMイミダゾールpH5.5中20mgのカルボジイミドEDCと混合した。一夜インキュベートした後、ビーズを洗浄し、10mM MES pH5に再懸濁した。ゲノムDNAを結合させるために、2mgの磁性粒子を実施例1で前述した方法により調製した上清に加え、磁気分離した後、100mMトリス-HCl pH9.5を用いてDNAを溶離した。

10

【 0 1 1 4 】

実施例13: カナマイシン

ゲノムDNAの溶液を実施例3に記載のように調製した。この試料に2mgのカナマイシンを10mg/mlの濃度で加えた。得られたDNAの沈殿をろ過し、水でpH5で洗浄し、水にpH10で再溶解した。

【 0 1 1 5 】

実施例14: カルボキシル化ポリスチレン中の磁化性鉄酸化物

標準アルカリ溶解試薬を用いて5mlプラスミドミニプレップを調製し、0.5M pH4の酢酸カリウム組成物を用いて、清澄リゼートを得た。この上澄液に2.5mgの市販の1 μ mカルボキシル化ポリスチレン磁化性粒子を加えて、プラスミドDNAを結合させた。粒子を水でpH4で洗浄し、次いで、10mMトリス-HCl pH8.5を用いてDNAを溶離した。260および280nmにおける典型的なUV比は、1.7~2.0であり、標準ゲル電気泳動で認められた単一バンドを有する純粋の核酸であることを示している。

20

【 0 1 1 6 】

実施例15: ポリスチレンマイクロタイタープレート中二酸化チタン

0.1M酢酸カリウムpH4中100 μ g/mlのDNA溶液を300 μ l平底マイクロタイタープラスチックプレート中に1時間放置した。このプラスチックプレートは、プレートを形成するときにプラスチックに粉末として混入させた二酸化チタンを含んでいた。pH4で洗浄した後、水でpH10でDNAを回収し、2mlを二酸化チタンを含まない無添加ポリスチレンプレートに対して260nmで測定した。無添加ポリスチレンプレートにおける0と比較して、二酸化チタンを混入したプレートにおいて300 μ lウエル当たり約50ngのDNAが回収された。

30

【 0 1 1 7 】

実施例16: 磁性ビーズに結合させたシチジン

1gのカルボキシル化1 μ m磁性粒子を1段階法で50mMイミダゾール緩衝液pH6.0中で500mgのシチジンおよび500mgのカルボジイミド(EDC)と反応させた。十分に洗浄した後、実施例1に記載のようにビーズを用いてプラスミド調製試料における核酸を結合させ、pH10で水中に純粋な核酸を回収した。

40

【 0 1 1 8 】

実施例17: ポリビニルピリジン(PVP)

20mgの市販のPVPビーズを、実施例4に記載の5ml血液抽出によるゲノムDNAを含む上清と混合した。DNAを結合させた後、ビーズを水でpH5で洗浄し、水を用いてpH10でDNAを回収した。260および280nmにおける紫外分析で、純度比が1.65であることが示された。

【 0 1 1 9 】

実施例18: RNAとDNAの分離

1M塩化ナトリウムを含む50mM酢酸カリウム緩衝液pH6.5中30 μ g/mlのtRNAおよび剪断ゲノムDNAの溶液を調製した。約4mgの磁性ポリヒスチジンビーズを1mlの核酸溶液と結合が

50

完了するまで1分間混合した。ビーズを水でpH5で十分に洗浄した。結合した物質を溶離するために、ビーズを300 μ lの10mMトリス-HCl、10mM NaCl、pH8.5と混合した。ゲル分析で、大部分のtRNAが溶液中に残り、ビーズに結合しなかったことが示された。溶離した物質は大部分ゲノムDNAを含み、tRNAをほとんどまたは全く含んでいなかった。

【0120】

実施例19: 表面アミン基を有するPCRチューブ

DNAまたはRNAを結合するための表面アミン基を導入するためにPCRチューブを修飾した。pUC19プラスミド調製試料からの透明ライゼートの約200 μ lの上清をチューブ中で10分間インキュベートした。次いで、チューブを水で洗浄し、チューブの壁に結合したDNAをpUC19用のプライマーを含むPCR反応混合物で処理した。PCR反応混合物が完了した後、チューブの内容物を臭化エチジウムを含む1%ゲル上にのせた。ゲルは、PCR反応が成功したことを示す強いバンドを示した。

10

【0121】

実施例20: 表面アミン基を有する磁性ビーズ

DNAまたはRNAを結合するための表面アミン基を有する市販の4 μ m磁性ビーズをpUC19プラスミド調製試料からの透明ライゼートの約200 μ lの上清と混合し、チューブ中で10分間インキュベートした。次いで、5 μ lのビーズ(約100 μ gのビーズ)を水で洗浄し、ビーズをpUC19用のプライマーを含むPCR反応混合物に加えた。PCR反応混合物が完了した後、混合物を臭化エチジウムを含む1%ゲル上にのせた。ゲルは、PCR反応が成功したことを示す強いバンドを示した。

20

【0122】

実施例21: 表面アミン基を有する磁性ビーズ

DNAまたはRNAを結合するための表面アミン基を有する市販の4 μ m磁性ビーズをpUC19プラスミド調製試料からの透明ライゼートの約200 μ lの上清と混合し、チューブ中で10分間インキュベートした。次いで、5 μ lのビーズ(約100 μ gのビーズ)を水で洗浄し、PCR反応に十分なDNAを溶離させるためにNaOHを用いてビーズを100 μ lの水中pH10で混合した。約10 μ lの溶離したDNAをpUC19用のプライマーを含むPCRマスターミックスと混合した。PCR反応混合物が完了した後、混合物を臭化エチジウムを含む1%ゲル上にのせた。ゲルは、PCR反応が成功したことを示す強いバンドを示した。

30

【0123】

実施例22: 表面アミン基を有する磁性ビーズ

DNAまたはRNAを結合するための表面アミン基を有する市販の4 μ m磁性ビーズをpUC19プラスミド調製試料からの透明ライゼートの約200 μ lの上清と混合し、チューブ中で10分間インキュベートした。次いで、5 μ lのビーズ(約100 μ gのビーズ)を水で洗浄し、PCR反応に十分なDNAを溶離させるために100 μ lの10倍強度PCR緩衝液中でビーズを混合した。約5 μ lの溶離したDNAをpUC19用のプライマーを含む45 μ lの水と混合した。PCR反応混合物が完了した後、混合物を臭化エチジウムを含む1%ゲル上にのせた。ゲルは、PCR反応が成功したことを示す強いバンドを示した。

【0124】

実施例23: ポリアクリル酸-ジアミンエチレン混合電荷重合体

100mgのポリアクリル酸Mr 240Kを50mlの0.1Mイミダゾール緩衝液pH6.5中で20mgのジアミンエチレンと混合し、300mgのEDC架橋剤を加えて、DNAまたはRNAを結合するための混合電荷重合体を調製した。一夜インキュベートした後、混合物を徹底的に透析し、pH5の7M尿素を含む白血球消化物に100 μ lを加えることによりDNAを結合するのに用いた。得られたDNAと重合体との複合体を遠心分離により集め、水でpH5で洗浄し、水にpH10で再溶解した。

40

【0125】

実施例24: ポリアクリル酸-トリエタノールアミン混合電荷重合体

100mgのポリアクリル酸Mr 240Kを50mlの0.1Mイミダゾール緩衝液pH6.5中で1gのトリエタノールアミンと混合し、1gのEDC架橋剤を加えて、DNAまたはRNAを結合するための重合

50

体を調製した。一夜インキュベートした後、混合物を徹底的に透析し、pH5の7M尿素を含む白血球消化物に100 μ lを加えることによりDNAを結合するのに用いた。得られたDNAと重合体との複合体を遠心分離により集め、水でpH5で洗浄し、水にpH10で再溶解した。

【0126】

実施例25: ポリアクリル酸-ビス-トリス混合電荷重合体

100mgのポリアクリル酸Mr 240Kを50mlの0.1Mイミダゾール緩衝液pH6.5中で20mgのビス-トリスと混合し、300mgのEDC架橋剤を加えて、DNAまたはRNAを結合するための混合電荷重合体を調製した。一夜インキュベートした後、混合物を徹底的に透析し、pH5の7M尿素を含む白血球消化物に100 μ lを加えることによりDNAを結合するのに用いた。得られたDNAと重合体との複合体を遠心分離により集め、水でpH5で洗浄し、10mMトリス-HCl pH8.5に再溶解した。

10

【0127】

実施例26: カルボキシル基磁性ビーズおよびビス-トリス

100mgのビーズと10mgの重合体および20mgのEDCをpH6の0.1Mイミダゾール中に加えて、前述したCOOHとビス-トリスとの混合電荷重合体をCOOH磁性ビーズに結合させた。ビーズは、pH5で精製DNAの有意な結合と10mMトリス-HCl pH8.5中での遊離を示した。

【0128】

実施例27: ポリアクリル酸およびポリビス-トリス

0.1Mイミダゾール緩衝液pH6.5中でポリアクリル酸をビス-トリスと1:10の比率で混合することにより、多孔性プラスチックプラグの内部にin-situでポリビス-トリスの可溶性重合体を生成させた。EDCをポリアクリル酸に10倍過剰に加えて、重合体を生成させた。これを16mM酢酸カリウムpH4で洗浄して、非結合物質を除去し、プラグを用いて、pH5で白血球の7M尿素消化物からのDNAを結合させた。10mMトリス-HClを用いてpHを8.5に上昇させることによりDNAをプラグから溶離することができた。

20

【0129】

実施例28: ポリアクリル酸およびポリビス-トリス

0.1Mイミダゾール緩衝液pH5.5中でポリアクリル酸をビス-トリスと1:10の比率で混合することにより、多孔性プラスチックプラグの内部にin-situでポリビス-トリスの不溶性重合体を生成させた。EDCをポリアクリル酸に10倍過剰に加えて、重合体を生成させた。これを16mM酢酸カリウムpH4で洗浄して、非結合物質を除去し、プラグを用いて、pH5で白血球の7M尿素消化物からのDNAを結合させた。10mMトリス-HClを用いてpHを8.5に上昇させることによりDNAをプラグから溶離することができた。

30

【0130】

実施例29: ビス-トリスで誘導体化した磁性ビーズ

pUC19プラスミドを含む大腸菌培養の清澄ライゼート上清を標準的なアルカリ溶解試薬を用いて調製した。約50 μ lのpH4の上澄液を0.25mgのビス-トリスで誘導体化した磁性ビーズと混合して、プラスミドDNAを結合させた。不純物を水で洗い流した後、DNAを結合したビーズをPCRチューブ中でのPCR反応において混合し、適切なプライマーを用いた増幅のためにサーマルサイクラーに移した。PCR後に、酢酸カリウムを用いてpHを4に調節し、PCR生成物を同じ磁性ビーズに結合させた。ビーズを水で洗浄し、清浄なPCR生成物を10mMトリス-HCl pH8.5で溶離し、ゲル上および配列決定による分析に供した。最終結果は、ビーズがプラスミドを精製することができ、ビーズの存在下でのPCRを可能にし、最終的に、PCR生成物の再結合と溶離によりPCR生成物を精製して、検出またはさらなる操作に備えることを可能にしたことを示していた。

40

【0131】

実施例30: ポリビス-トリスを用いたマイクロタイタープレート

血漿処理および10mM酢酸カリウムpH5中0.5mg/mlのポリビス-トリス溶液による洗浄により、カルボキシル化マイクロタイタープレートを調製した。非結合物質を洗い流した後、1%トゥーン20を含む10mM炭酸/重炭酸アンモニウムpH7で10倍希釈した血液の溶液を加えた。30分間のインキュベーション時間の後、DNAがウエルの壁に固定化されたので、汚染物

50

質を水で洗い流した。次いで、10mMトリス-HCl pH8.5とともに混合してDNAを回収した。

【0132】

実施例31: ポリビス-トリスを用いたプラスチックチップ

200mM酢酸カリウム緩衝液pH5中50 µg/mlのヒトDNAの溶液を等容積のイソプロパノールと混合した。得られた沈殿物を、ポリビス-トリスを被覆したCOOHプラスチックチップを用いて分離した。すべての廃液を除去した後、DNAの沈殿を10mMトリス-HCl pH8.5に再溶解した。

【0133】

実施例32: ポリビス-トリスを含む半融ディスク

ビス-トリスで修飾したいいくつかの磁性ビーズを空气中で乾燥し、次いで、乳棒と乳鉢を用いて粉碎した。この粉末をいくつかのプラスチック微粒と混合して、厚さが約3mm、直径が6mmの焼結ディスクを調製した。ディスクは、50 µg/ml pH4のウシ胸腺DNAの溶液のDNAを結合し、10mMトリス-HCl pH8.5を用いて溶離して、DNAを回収するために用いることができた。

10

【0134】

実施例33: シリカ上のポリヒドロキシ化されたアミン

1gの直径約60 µmのシリカ粒子をアセトン中10容量%の3-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノプロピルトリエトキシシランで60 で18時間処理した。修飾された粒子をアセトン、次いで水で洗浄し、10mM酢酸カリウムpH4中50 µg/mlのウシ胸腺DNAを結合するのに用いた。その後、DNAを10mMトリス-HCl pH10で遊離させた。

20

【0135】

実施例34: ビス-トリスを含む磁性ビーズを用いた示差結合

標準アルカリ溶解試薬を用いて清澄細菌ライゼートを調製し、0~500mMの酢酸アンモニウムを最終濃度として加えることにより、大腸菌のRNAおよびDNAの示差結合を実証した。約0.5mgのビス-トリス磁性ビーズを混合物に加えて、核酸を結合させた。水で洗浄した後、ビーズを10mMトリス-HCl pH8.5で溶離した。ゲル結果は、塩を増加させることにより、ビーズに結合するRNAの量がDNAと比較して減少することを示しており、これは260nmのUVを用いたdsDNAと1本鎖DNA/RNAとの比の測定およびピコグリーン結合により確認された。

【0136】

実施例35: ポリビス-トリスを含むフィルター

3 µmガラス繊維紙フィルターを10mM酢酸カリウムpH4中0.5mg/mlの過剰のポリビス-トリスに浸漬し、3日間風乾した。DNAの50 µgスポットをフィルターにのせ、保存し、保管することができるように再び乾燥した。DNAを回収するために、フィルターを水で洗浄し、次いで、2mlの10mMトリス-HCl pH8.5に10分間浸漬したところ、260nmでのUV吸光度がDNAの80%の回収率を示した。

30

【0137】

実施例35: ビス-トリスを含む磁性ビーズ

類細胞塗末標本を用いて試料を採取し、20mM重炭酸アンモニウム、1%トウイーン20および200 µg/mlのプロテイナーゼKを含むpH7消化緩衝液に入れた。50 で20分間の後、液体を酢酸カリウムpH4と1mgの磁性ビス-トリスビーズを含む新たなチューブに移した。短時間インキュベートした後、ビーズを磁石で分離し、水で洗浄した。DNAまたはRNAを10mMトリス-HCl pH8.5を用いて溶離し、ゲル上で可視化し、PCRにより試験した。

40

【0138】

実施例36: ポリビス-トリスを含む磁性ビーズ

50 µlの血液試料を20倍過剰の0.01% SDS、10mMトリス-HCl pH7で希釈し、室温で5分間インキュベートした。ポリビス-トリスを被覆した磁性ビーズを用いてDNAを捕捉し、水で洗浄した後、10mMトリス-HCl pH8.4を用いてDNAを溶離した。

【0139】

実施例37: カルボキシ基およびビス-トリスを含む磁性ビーズ

COOHおよびビス-トリスリガンドを含む磁性ビーズを調製し、コンゴレッドおよびニュ

50

ートラルレッド色素の結合により確認した。酢酸緩衝液pH4中50 µg/mlの精製ゲノムDNAを1mgのビーズと混合し、その後の結合物質の複合体を洗浄し、100 µlの10mMトリス-HCl pH 8.5を用いて溶離して、DNAを回収した。これをpUC19を含む大腸菌からのプラスミド抽出について繰り返し、前述のように純粋なプラスミドをトリス溶離緩衝液で遊離させた。

【 0 1 4 0 】

実施例38:カルボキシル基およびビス-トリスを含むシリカ粒子

表面COOH基を有する直径が約60 µmの1gのシリカ粒子を20mlの0.1MイミダゾールpH6中1gのビス-トリスおよび200mgのEDCと混合した。修飾粒子を洗浄し、アルカリ溶解試薬を用いて調製した清澄ライゼートからのpUC19プラスミドを結合し、溶離するのに用いた。

【 0 1 4 1 】

10

実施例39:表面アミン基およびポリアクリル酸を含むシリカ粒子

表面アミン基を有する直径が約60 µmの1gのシリカ粒子を20mlの0.1MイミダゾールpH6中1gのポリアクリル酸Mr 240Kおよび200mgのEDCと混合した。修飾ポリCOOH粒子を洗浄し、20mlの0.1MイミダゾールpH6中1gのビス-トリスおよび400mgのEDCと混合した。修飾粒子を、アルカリ溶解試薬を用いて調製した清澄ライゼートからのpUC19プラスミドを結合し、溶離するのに用いた。

【 0 1 4 2 】

実施例40:磁性ビス-トリスビーズを用いた示差結合

磁性ビス-トリスビーズのpKa近傍での結合が得られるようにpHを調節することにより、プラスミド調製試料からのRNAおよびDNAの示差結合および溶離が実証された。中和後のプラスミドを結合するための最終pHが4~6となるように、pH4.0、4.2、4.4、4.6、4.8の酢酸沈殿緩衝液を用いてアルカリ溶解試薬を調製した。ビーズからの溶離後の1本鎖RNAと2本鎖DNAを測定することにより、それぞれの相対的比の推定値を計算した。この場合、RNAの結合または溶離はかなり一定のままであったのに対して、DNAの結合または溶離はpHの上昇とともに減少した。

20

【 0 1 4 3 】

実施例41:ビス-トリスを含む磁性ビーズによるPCR不純物除去

精製に供する40 µlを用いてpUC19の600bpおよび1.5kb PCR反応を調製することにより、PCR不純物除去反応が実証された。40 µlのPCR反応に500 µlの約0.5M酢酸緩衝液pH4および0.25mgのビス-トリス磁性ビーズを加えた。PCR生成物を結合したビーズを水で洗浄し、50 µlの10mMトリス-HCl pH8.5で溶離した。

30

【 0 1 4 4 】

実施例42:CMC重合体およびビス-トリスビーズ

カルボキシメチルセルロース重合体(グレード9H4F)を用いて1%水溶液を調製した。次いで、混合物を1M塩化カルシウム溶液に1滴ずつ加えて、表面COOH基を有する高分子電解質複合体を生成させた。次いで、得られたビーズを、イミダゾール緩衝液pH6中過剰のビス-トリスおよびEDCを用いてビス-トリスビーズに変換した。ビーズは、pH4およびpH8.5緩衝液を用いた場合、それぞれ純DNAの結合および遊離を示した。

【 0 1 4 5 】

実施例43:不溶性ビス-トリス

40

160mgのポリアクリル酸MR 240Kと50mlの0.1MイミダゾールpH5.9中1.6gのビス-トリスと1.6gのEDCとを混合することにより、不溶性のポリビス-トリスを調製した。沈殿した重合体を遠心分離により集めた。小粒子はpH4およびpH9でそれぞれDNAの結合および遊離を示した。

【 0 1 4 6 】

実施例44:ビス-トリスを含む磁性ビーズ

オリゴヌクレオチドが修飾磁性ビーズに結合するかどうかを試験するために、1mgのビス-トリスビーズを10mM酢酸カリウムpH4中で10 µgのpUC19 PCRプライマーと混合した。水pH4で洗浄した後、ビーズを10mMトリス-HCl pH8.5を用いて溶離したところ、UVの読みは5 µgのDNAの回収を示した。Sybrグリーン色素を含む1%ゲルも低分子量DNAの強いバンドを

50

示した。

【0147】

実施例45:磁鉄鉱およびポリアクリル酸

直径が0.01~10 μ mの磁鉄鉱(鉄II、III酸化物)の懸濁液を過剰のポリアクリル酸Mr 240 Kと混合した。洗浄後、DNAの結合と遊離を促進するために粒子をポリビス-トリスで処理した。複合粒子を50 μ g/ml pH4のDNAに入れて、低pHで洗浄した後、DNAを10mMトリス-HCl pH8.5で溶離することができた。

【0148】

実施例46:カルボキシル基およびニュートラルレッドを含む磁性ビーズ

COOH磁性ビーズを過剰の0.1mMニュートラルレッド(pKa6.7)pH4で洗浄した。次いで、DNAがビーズ上の正に荷電した色素に結合するかどうかを試験するために、ビーズを50 μ g/mlの純粋なDNAの溶液pH4に入れた。pH8.5での溶離により、DNAに結合し、そして、pHが変化したとき、それを遊離させたことが示された。

【0149】

実施例47:DNA分析

先のすべての実施例において、抽出されたDNAを以下の一以上の方法により分析した。

(1):核酸濃度の尺度とするための260nmおよび280nmでの紫外(UV)分析、

(2):分子の大きさを測定し、核酸の量の推定を行うための、臭化エチジウム染色を用いた、対照としてのDNAの市販の調製試料に対して60Vで20分間行うTBE緩衝液中1%アガロースを用いたゲル電気泳動、

(3):核酸の完全性を試験するための、アクチンまたは他の遍在性遺伝子に特異的プライマーを用いたPCR

【0150】

結果は、(1):機器からの直接の読み、および(2):および(3):ゲル図として示す。

【0151】

すべての場合に、実施例で、有意に損傷していなかった核酸の有効な抽出が示された。

フロントページの続き

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 国際公開第99/029703(WO, A1)
国際公開第00/069872(WO, A1)
特表平10-506987(JP, A)
米国特許第05770712(US, A)
米国特許第05434279(US, A)
BITNER R, PROCEEDINGS OF THE SPIE, 米国, SPIE, 2000年, V3926N3926, P126-133
MCLAUGHLIN L W, CHEMICAL REVIEWS, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1989年, V89, P309-319
FLUKA CATALOGUE 1995/96, スイス, FLUKA CHEMIE AG, 1995年, P354
FLUKA CATALOGUE 1995/96, スイス, FLUKA CHEMIE AG, 1995年, P879
Biotechnol.Prog., 1990年, vol.6, pp.283-285

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 21/04
C07H 1/08
B01D 11/02
C12N 15/09
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)