

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512274
(P2019-512274A)

(43) 公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

| (51) Int.Cl. | F 1 | | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------|-------|-------------|
| C 12 N 15/10 (2006.01) | C 12 N 15/10 | 1 O O | 4 B 0 6 3 |
| C 12 N 5/07 (2010.01) | C 12 N 5/07 | | 4 B 0 6 5 |
| C 12 Q 1/68 (2018.01) | C 12 Q 1/68 | | 4 H 0 1 1 |
| A O 1 N 1/02 (2006.01) | A O 1 N 1/02 | | |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 | M | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2019-501754 (P2019-501754) | (71) 出願人 | 518336226 オールフレックス ヨーロッパ エスア フランス国 35500 ビトレ, リュ デ オー 35 |
| (86) (22) 出願日 | 平成29年3月22日 (2017.3.22) | (74) 代理人 | 100078282 弁理士 山本 秀策 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成30年11月13日 (2018.11.13) | (74) 代理人 | 100113413 弁理士 森下 夏樹 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/EP2017/056782 | (74) 代理人 | 100118371 弁理士 ▲駒▼谷 剛志 |
| (87) 國際公開番号 | W02017/162721 | (74) 代理人 | 100181674 弁理士 飯田 貴敏 |
| (87) 國際公開日 | 平成29年9月28日 (2017.9.28) | (74) 代理人 | 100181641 弁理士 石川 大輔 |
| (31) 優先権主張番号 | 16162349.1 | | |
| (32) 優先日 | 平成28年3月24日 (2016.3.24) | | |
| (33) 優先権主張國 | 歐州特許庁 (EP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物の使用

(57) 【要約】

本発明は、組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物の使用、および組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物の使用方法に関する。さらには、本発明は、動物の組織試料を調製するためのシステムに関する。一実施形態では、前記水性組成物は、好適な容器内に含有され、そのような容器は、好ましくは、組織サンプリングの前には前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の一部分を形成するが、そのような容器は、前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の取り外し可能な一部分であり、組織サンプリング後にそれらから取り外され得るかつ／または取り外される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物の組織試料由来の核酸、好ましくはDNA、およびタンパク質から選択される生体分子を溶解させるため、および、その後の

- a) 前記生体分子の保存、または
- b) 前記生体分子のさらなる処理

のための水性組成物の使用であって、前記使用は、以下：

- 動物の組織をサンプリングして、前記動物の組織試料を作製するステップ、
- サンプリング後に直ちに、規定の期間、前記組織試料を水性組成物と接触させることによって、前記試料を前記組成物に曝露するステップであって、前記組成物は、
 - 25において7～9のpH範囲に緩衝化することが可能であり、任意選択で、酸性化剤またはアルカリ化剤などのpH調整剤を含む、緩衝剤と、
 - 界面活性剤と、
 - 5～10重量%の濃度の塩と、
 - キレート剤および水と

を含み、

- ここで、動物の前記組織は、組織サンプリングタグ、好ましくは耳札、または組織サンプリング生検針を使用してサンプリングされ、かつ前記試料は、前記試料を前記組成物中に導入することによって前記組成物と接触させられ、かつ前記試料を前記組成物に曝露することによって、前記組織試料由来の核酸およびタンパク質から選択される生体分子は、前記水性組成物中に溶解されて、生体分子溶液を生じる、ステップ、

- 前記生体分子の保存、または、前記生体分子のさらなる処理、例えば、病原体、例えばBV DVの検出、もしくは遺伝子型判定、シークエンシング、ハイブリダイゼーション解析、もしくは定量的リアルタイムPCRのために前記生体分子溶液を使用するステップ、あるいは、マーカータンパク質、またはマーカー核酸、薬物、ホルモン、または代謝産物の検出のために前記生体分子溶液を使用するステップ、

- 任意選択で、後に使用するために前記組織試料を貯蔵するために前記水性組成物を使用するステップ
を含む、使用。

【請求項 2】

前記塩が、1M～2M、好ましくは1M～1.5M、より好ましくは1.3M～1.5M、よりいっそう好ましくは1.4Mの濃度で存在するNaClである、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記水性組成物が、プロテイナーゼK、好ましくはいかなるプロテイナーゼも含有しない、請求項1または2のいずれかに記載の使用。

【請求項 4】

前記組成物中の前記界面活性剤が、N-ラウロイルサルコシン、好ましくはN-ラウロイルサルコシンのナトリウム塩である、上記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 5】

前記緩衝剤がトリスであり、かつ/または前記キレート剤がEDTA、好ましくはEDTA二ナトリウム二水和物であり、かつ/または前記pH調整剤がアルカリ水酸化物、例えばNaOHもしくはKOHである、上記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

前記水性組成物が、以下の成分：

トリス 5～20mM、好ましくは10～15mM

NaOH 5～20mM、好ましくは8～10mM

N-ラウロイルサルコシンのナトリウム塩 2～15mM、好ましくは5～8mM、より好ましくは6～7mM

EDTA・2Na・2H₂O 1～5mM、好ましくは1～3mM

10

20

30

40

50

N a C l 1 ~ 3 M、好ましくは 1 ~ 2 M、より好ましくは 1 ~ 1 . 5 M、より好ましくは 1 . 3 ~ 1 . 5 M

水

および、任意選択で、生体分子、好ましくは核酸の存在を指し示す色素を含み、好ましくは前記成分からなる、上記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 7】

前記水性組成物が、以下の成分：

トリス 1 3 m M

N a O H 8 . 5 ~ 8 . 6 m M、好ましくは 8 . 5 5 m M

E D T A · 2 N a · 2 H₂O 1 . 9 ~ 2 . 1 m M、好ましくは 1 . 9 9 ~ 2 m M 10

N - ラウロイルサルコシンのナトリウム塩 6 ~ 7 m M、好ましくは 6 . 7 ~ 6 . 9 m M
、より好ましくは 6 . 8 m M

N a C l 1 . 3 5 ~ 1 . 4 5 M、好ましくは 1 . 3 8 ~ 1 . 4 2 M、および水

を含み、好ましくは前記成分からなる、上記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 8】

前記生体分子溶液が、前記生体分子のさらなる処理のために使用され、前記さらなる処理は、前記生体分子溶液中、したがって前記組織試料中の B V D V の検出であり、好ましくは、B V D V の前記検出は、核酸増幅および増幅された前記核酸の検出を介して、または、B V D V タンパク質の E L I S A などの B V D V タンパク質の抗体に基づく検出をして為される、上記請求項のいずれかに記載の使用。 20

【請求項 9】

動物の組織試料を、その後の

a) 前記組織の遺伝子型判定、

b) 前記組織中の病原体の検出、または

c) 後に使用するための前記組織試料の貯蔵および保存

のために調製するためのシステムであって、

前記システムは、組織サンプリングタグ、好ましくは組織サンプリング耳札、または組織サンプリング生検針、および動物の組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物を含み、前記組成物は容器中に含有されており、前記組成物は、請求項 1 ~ 7 のいずれかにおいて記載されるものである、システム。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物の使用、および組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物の使用方法に関する。さらには、本発明は、動物の組織試料を調製するためのシステムに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

家畜動物をタグ付けし、それと同時に前記動物から試料を採取するために、組織サンプリングタグが今日一般に使用されている。そのような試料はその後、特定の遺伝形質、病原体の存在もしくは不在について、または前記動物の遺伝子型判定のために、試験室において分析される。あるいは、試料は、前記試料が採取された動物の起源を追跡するために、単に保持され、貯蔵される。組織試料は、組織サンプリングタグ、または生検針などの組織サンプリングユニットを使用することによって得られ得る。組織サンプリングタグは一般に公知であり、また例えば本出願人である A l l f l e x E u r o p e S . A . から市販されている。 40

【0 0 0 3】

試料をさらに分析するために、それをさらに処理することが必要である。これは通常、動物から試料を得た後にそれを輸送した試験室において行われる。 W O 9 9 / 1 2 4 7 5

には、試料のさらなる処理用の不特定の試薬を含有する耳札の試料カプセルが開示されている。E P 1 0 8 8 2 1 2 には、組織試料のタンパク質部分を不活化するための材料が含有された試料受け入れ容器を含む耳札が開示されている。組織試料のタンパク質部分を不活化するためのそのような材料の例として、以下のものが言及されている：プロテイナーゼK、強アルカリ性溶液、モレキュラーシーブ、および試料中のタンパク質部分の不活化を支援するその他の成分。このアプローチによれば、組織試料は組織試料受け入れ容器中に含有され、そこでそのタンパク質部分が不活化される。試料は、試料の実際の分析が行われる試験室に輸送される。先行技術に開示されるような手順は、労力を要し、かつ時間を消費する。それは、試験室での多数のワークアップステップを必要とし、最終的に試料を全て失うことに繋がり得る。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 4】

【特許文献1】国際公開第99/12475号

【特許文献2】欧州特許出願公開第1088212号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

本発明は、先行技術による処理を改善するために為されたものである。したがって、本発明の目的は、組織試料のより迅速な処理を可能とする方法論を提供することであった。さらには、本発明の目的は、より長い期間にわたって組織試料を貯蔵することを可能とするのと同時に、特定の遺伝形質(g e n e t i c t r a d e)、その遺伝子型、B V D Vなどのある特定の病原体の存在または不在に関して試料の即座の分析を実施できる方法論を提供することであった。

20

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

全てのこれらの目的は、動物の組織試料由来の核酸、好ましくはDNA、およびタンパク質から選択される生体分子を溶解させるため、および、その後の

a) 前記生体分子の保存、または

b) 前記生体分子のさらなる処理

30

のための水性組成物の使用であって、前記使用は、以下：

- 動物の組織をサンプリングして、前記動物の組織試料を作製するステップ、
- サンプリング後に直ちに、規定の期間、前記組織試料を水性組成物と接触させることによって、前記試料を前記組成物に曝露するステップであって、前記組成物は、
- 25において7~9のpH範囲に緩衝化することが可能であり、任意選択で、酸性化剤またはアルカリ化剤などのpH調整剤を含む、緩衝剤と、
- 界面活性剤と、
- 5~10重量%の濃度の塩と、
- キレート剤および水と

を含み、

- ここで、動物の前記組織は、組織サンプリングタグ、好ましくは耳札、または組織サンプリング生検針を使用してサンプリングされ、かつ前記試料は、前記試料を前記組成物中に導入することによって前記組成物と接触させられ、かつ前記試料を前記組成物に曝露することによって、前記組織試料由来の核酸およびタンパク質から選択される生体分子は、前記水性組成物中に溶解されて、生体分子溶液を生じる、ステップ、

- 前記生体分子の保存、または、前記生体分子のさらなる処理、例えば、病原体、例えばB V D Vの検出、もしくは遺伝子型判定、シークエンシング、ハイブリダイゼーション解析、もしくは定量的リアルタイムP C Rのために前記生体分子溶液を使用するステップ、あるいは、マーカータンパク質、またはマーカー核酸、薬物、ホルモン、または代謝産物の検出のために前記生体分子溶液を使用するステップ、

40

50

- 任意選択で、後に使用するために前記組織試料を貯蔵するために前記水性組成物の部分を使用するステップ
を含む、使用によって解決される。

【0007】

一実施形態では、前記水性組成物は、好適な容器内に含有され、そのような容器は、好みしくは、組織サンプリングの前には前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の一部分を形成するが、そのような容器は、前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の取り外し可能な一部分であり、組織サンプリング後にそれから取り外され得るかつ／または取り外される。

【0008】

一実施形態では、前記曝露するステップは、サンプリングから0.1秒から10秒後の期間内、好みしくはサンプリングから0.1秒から5秒後の期間内に行われる。

【0009】

一実施形態では、前記水性組成物は、アルカリ水酸化物などのアルカリ化剤、より好みしくはNaOHまたはKOHも含む。

【0010】

一実施形態では、前記塩は、1M～2M、好みしくは1M～1.5M、より好みしくは1.3M～1.5M、よりいっそう好みしくは1.4Mの濃度で存在するNaClである。

【0011】

一実施形態では、前記水性組成物は、プロテイナーゼK、好みしくはいかなるプロテイナーゼも含有しない。

【0012】

一実施形態では、前記組成物中の前記界面活性剤は、N-ラウロイルサルコシン、好みしくはN-ラウロイルサルコシンのナトリウム塩である。

【0013】

一実施形態では、前記緩衝剤はトリスであり、かつ／または前記キレート剤はEDTA、好みしくはEDTA二ナトリウム二水和物である。

【0014】

一実施形態では、前記水性組成物は、以下の成分：

トリス 5～20mM、好みしくは10～15mM

NaOH 5～20mM、好みしくは8～10mM

N-ラウロイルサルコシンのナトリウム塩 2～15mM、好みしくは5～8mM、より好みしくは6～7mM

EDTA・2Na・2H₂O 1～5mM、好みしくは1～3mM

NaCl 1～3M、好みしくは1～2M、より好みしくは1～1.5M、より好みしくは1.3～1.5M

水

および、任意選択で、生体分子、好みしくは核酸の存在を指し示す色素を含み、好みしくは前記成分からなる。

【0015】

一実施形態では、前記水性組成物は、以下の成分：

トリス 13mM

NaOH 8.5～8.6mM、好みしくは8.55mM

EDTA・2Na・2H₂O 1.9～2.1mM、好みしくは1.99～2mM

N-ラウロイルサルコシンのナトリウム塩 6～7mM、好みしくは6.7～6.9mM、より好みしくは6.8mM

NaCl 1.35～1.45M、好みしくは1.38～1.42M、および水

を含み、好みしくは前記成分からなる。

10

20

30

40

50

【0016】

一実施形態では、前記生体分子溶液は、前記生体分子のさらなる処理のために使用され、前記さらなる処理は、前記生体分子溶液中、したがって前記組織試料中のBVDVの検出であり、好ましくは、BVDVの前記検出は、核酸増幅および増幅された前記核酸の検出を介して、または、BVDVタンパク質のELISAなどのBVDVタンパク質の抗体に基づく検出を介して為される。

【0017】

本発明の目的は、また、動物の組織試料を、その後の
a) 前記組織の遺伝子型判定、
b) 前記組織中の病原体の検出、または
c) 後に使用するための前記組織試料の貯蔵および保存
のために調製するためのシステムであつて、

前記システムは、組織サンプリングタグ、好ましくは組織サンプリング耳札、または組織サンプリング生検針、および動物の組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物を含み、前記組成物は容器中に含有されており、前記組成物は、上で規定されるものである、システムによって解決される。

【0018】

一実施形態では、前記水性組成物は、好適な容器内に含有され、そのような容器は、好ましくは、組織サンプリングの前には前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の一部分を形成するが、そのような容器は、前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の取り外し可能な一部分であり、組織サンプリング後にそれから取り外され得るかつ／または取り外される。

【0019】

本明細書中で使用する場合、「動物の組織試料を調製するためのシステム」という用語は、作動可能に互いに連結した製品の組み合わせを指すことを意図する。そのようなシステムに含まれる製品は、組織サンプリングタグ、好ましくは組織サンプリング耳札、または組織サンプリングタグの代わりに組織サンプリング生検針、および、それらと作動可能に連結した、本発明による組織試料由来の生体分子を溶解させるための水性組成物である。本明細書中で使用する場合、「作動可能に連結した」という用語は、一方では組織サンプリングタグまたは組織サンプリング生検針と、他方では水性組成物との間の物理的接続を指し得るか、あるいは、組織試料のサンプリング後に、本発明による水性組成物を組織サンプリングタグまたはその部分と物理的に接触させることなく、そのような組織試料がそのような組成物と直ちに接触され得るように、本発明による水性組成物が提供される構成を指し得る。例えば、一実施形態では、前記水性組成物は、好適な容器内に含有されてもよく、そのような容器は、好ましくは、組織サンプリングの前には前記システムの前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の一部分を形成するが、そのような容器は、前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針または前記システムの取り外し可能な一部分であり、組織サンプリング後にそれから取り外され得るかつ／または取り外される。試料を組成物と接触させるという文脈において本明細書中で使用される場合、「～と接触させる」という用語は、組織試料が水性組成物と物理的に接続させられる行為を指し得る。そのような行為は、すすぐ、浸す、しみ込ませる、沈める、浴す、つける（dunking）、軽く浸す（dipping）、または組織試料を前記水性組成物で完全にもしくは部分的に被覆することであり得る。本明細書中で使用する場合、「組織サンプリングタグ」という用語は、動物に、（動物と共にあるまま、動物中にあるまま、動物上にあるまま、または任意のその他の様式で動物に取り付けられたままとなる）タグまたは目印を提供することができると共に、それと並行してその後の使用のためにその動物から組織試料を得ることができるデバイスを指す。本明細書中で使用する場合、「組織サンプリングユニット」、またはそれと同義の「組織サンプリング生検針」は、それを用いた例えは、こすり取る、穿孔する、裂く、またはその他の行為を通じて動物から組織試料を得ることができるが、前記動物にプラスチック、金属、または木から作

10

20

30

40

50

られたタグなどのタグまたは目印を取り付けない器具を指すことを意図する。

【0020】

本発明の目的は、また、動物の組織試料由来の核酸、好ましくはDNA、およびタンパク質から選択される生体分子を溶解させるため、および、その後の

- a) 前記生体分子の保存、または
- b) 前記生体分子のさらなる処理

のための水性組成物を使用する方法であって、前記方法は、以下：

- 動物の組織をサンプリングして、前記動物の組織試料を作製するステップ、
- サンプリング後に直ちに、規定の期間、前記組織試料を水性組成物と接触させることによって、前記試料を前記組成物に曝露するステップであって、前記組成物は、
- 25において7～9のpH範囲に緩衝化することが可能であり、任意選択で、酸性化剤またはアルカリ化剤などのpH調整剤を含む、緩衝剤と、
- 界面活性剤と、
- 5～10重量%の濃度の塩と、
- キレート剤および水と

を含み、

- ここで、動物の前記組織は、組織サンプリングタグ、好ましくは耳札、または組織サンプリング生検針を使用してサンプリングされ、かつ前記試料は、前記試料を前記組成物中に導入することによって前記水性組成物と接触させられ、かつ前記試料を前記水性組成物に曝露することによって、前記組織試料由来の核酸およびタンパク質から選択される生体分子は、前記水性組成物中に溶解されて、生体分子溶液を生じる、ステップ、

- 前記生体分子の保存、または、前記生体分子のさらなる処理、例えば、病原体、例えばBV DVの検出、もしくは遺伝子型判定、シークエンシング、ハイブリダイゼーション解析、もしくは定量的リアルタイムPCRのために前記生体分子溶液を使用するステップ、あるいは、マーカータンパク質、またはマーカー核酸、薬物、ホルモン、または代謝産物の検出のために前記生体分子溶液を使用するステップ、

- 任意選択で、後に使用するために前記組織試料を貯蔵するために前記水性組成物を使用するステップ

を含む、方法によって解決される。

【0021】

一実施形態では、前記水性組成物は、好適な容器内に含有され、そのような容器は、好ましくは、組織サンプリングの前には前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の一部分を形成するが、そのような容器は、前記組織サンプリングタグまたは前記組織サンプリング生検針の取り外し可能な一部分であり、組織サンプリング後にそれらから取り外され得るかつ／または取り外される。

【0022】

本発明者らは、驚くべきことに、組織試料を直ちに本発明による好適な水性組成物に曝露することによって、組織試料を動物から得た後に直ちにその処理を開始することができることを見出した。本発明の実施形態によれば、そのような好適な水性組成物は、少なくとも5～10重量%または少なくとも1Mの高い塩濃度、界面活性剤、キレート剤、および緩衝剤の存在によって特徴付けられる。組織試料を動物から採取した後、それを直ちに本発明による水性組成物に曝露する。本明細書中で使用する場合、「直ちに」という用語は、0.5秒から2分、好ましくは0.5秒から20秒、より好ましくは0.5秒から5秒に及ぶ期間を指すことを意図する。試料が前記水性組成物に曝露されるその後の曝露時間は、5分から数時間、例えば、1時間、2時間、3時間、・・・12時間、・・・24時間、・・・48時間、・・・72時間、・・・120時間、・・・168時間、・・・、336時間、・・・、720時間といった任意の期間であり得る。本発明の実施形態による水性組成物は、試料の貯蔵および／または保存を助けるだけでなく、そのような試料由来の核酸およびタンパク質から選択される生体分子を組成物中に溶解させるのも助け、したがってこの組成物を、いかなるさらなるワークアップステップも行うことなく、その

10

20

30

40

50

後に直接使用することができる。本発明の実施形態によれば、水性組成物は、25において7~9のpH範囲に緩衝化することが可能な緩衝剤、界面活性剤、少なくとも5~10重量%または少なくとも1Mの濃度の塩、キレート剤、および水、ならびに任意選択で、酸性化剤またはアルカリ化剤などのpH調整剤(pH-setting agent)を含む。一実施形態では、前記塩の濃度は、5~10重量%または1M~3M、好ましくは1~2M、より好ましくは1~1.5Mの範囲内である。好適な緩衝剤は様々である。良好な例はトリスである。

【0023】

本明細書中で使用する場合、「緩衝剤」という用語は、当業者によって理解される緩衝剤の概念を指すことを意図する。より具体的には、それは、弱酸とその共役塩基との組み合わせ、または弱塩基とその共役酸との組み合わせであって、水に溶解した時に、規定の範囲内にpH値を保つことができるものを指す。そのような「緩衝剤」は、「緩衝系」とも呼称され得る。本発明の実施形態において使用され得る好適な緩衝剤としては、TAPS、ビシン(Bicine)、トリス、トリシン、TAPSO、HEPES、TES、およびMOPSが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0024】

いかなる理論に縛られることも望まないが、本発明者らは、本発明による水性組成物が、動物の組織試料を前記水性組成物に曝露すると、前記組織試料を起源とする生体分子を取り込むことができることを見出したと考える。これらの生体分子は、穿孔する、裂く、またはこするなどの組織サンプリング行為に起因する組織試料中の一部の細胞の機械的溶解/破碎に起因して、組織試料から漏出することがあり得、または、生体分子の一部が、本発明による水性組成物中の界面活性剤の存在に起因して、組織試料から放出されることがあり得る。本発明による水性組成物中に組み込まれる、好ましくはその中に溶解される「生体分子」は、前記組織試料由来の核酸、タンパク質、またはその両方であり得る。同様にまたは代替的に、それらは、組織試料中に含有された、代謝産物または外来物質、例えば薬物であり得る。「生体分子」は、組織試料が採取された動物由来の生体分子であり得るか、または、それは、その動物を冒す病原体に由来する生体分子であり得る。好ましい実施形態では、本発明による水性組成物中に取り込まれる生体分子は核酸である。別の実施形態では、そのような生体分子はタンパク質である。他のさらなる実施形態では、そのような生体分子は、核酸およびタンパク質の両方の組み合わせである。

20

【0025】

本明細書中で使用する場合、「核酸」は、DNA、RNA、またはその両方の混合物である。

30

【0026】

前記組成物の界面活性剤として、種々の界面活性剤が使用され得る。好適な例としては、SDSまたはN-ラウロイルサルコシン、好ましくはそのナトリウム塩が挙げられる。キレート剤について多くの例があり、好適なものとしては、EDTA、好ましくはEDTA·2Na·2H₂Oである。本発明者らは、驚くべきことに、水性組成物が、潜在的な将来の使用のために可能な限り組織をインタクトに保つことを可能にするのと同時に、組成物は試料を起源とする生体分子を溶解させるので、それを用いた試験室でのさらなる分析作業を促進することを見出した。これらの生体分子は、十分に高い濃度において水性組成物中に存在して、水性組成物中のそのような(液体の)生体分子溶液のさらなる処理を可能とする。そのため例えば、動物の核酸および/またはタンパク質、ならびにウイルス(例えば、BVDV)などの前記動物を冒す病原体は、試料を水性組成物に曝露すると、組織の外に染み出され得る。これは、数分間で、すなわち、試料が飼育場から試験室への輸送の途中にうちに済むほど速やかに起こり得る。本明細書中で使用する場合、「動物」という用語は、任意の家畜動物または農場動物、好ましくは、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、およびその他の好適な家畜動物を指すことを意図する。

40

【0027】

本発明の実施形態による水性組成物は、その中に溶解された生体分子を保存するために

50

も好適である。したがって、本発明の実施形態による水性組成物は、その中に溶解された生体分子を直ちにさらに処理するために役立ち得るだけでなく、その中に浸されている組織試料または水性組成物中に溶解された生体分子のいずれかの長期間の貯蔵のためにも役立ち得る。本発明者らは、驚くべきことに、前記水性組成物中に溶解された生体分子は、数週間から数ヶ月間などの長期にわたってその中に貯蔵され得ることを見出した。同様に、組織試料は、数週間から数ヶ月間などの長期にわたって本発明による水性組成物中に貯蔵され得る。生体分子または組織試料のそのような貯蔵の例示的な期間は、1週間から12ヶ月間、例えば、2週間、3週間、4週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、9ヶ月間、10ヶ月間、11ヶ月間、または12ヶ月間である。

10

【0028】

一実施形態では、水性組成物は、プロテイナーゼK、好ましくはいかなるプロテイナーゼも含有しない。本発明者らは、驚くべきことに、プロテイナーゼK、またはいかなるプロテイナーゼさえ存在しないにも関わらず、それでもなお、遺伝子型判定、またはBVDVなどの病原体の検出などのさらなる処理のために十分に高くかつ純粋な核酸濃度を得ることが可能であることを見出した。

【0029】

一実施形態では、本発明の実施形態による水性組成物中の塩は、高濃度、好ましくは、1M～3M、好ましくは1M～2M、より好ましくは1～1.5M、より好ましくは1.3M～1.5M、よりいっそう好ましくは約1.4Mの範囲内の濃度において存在する。
一実施形態では、そのような塩はNaClである。

20

【0030】

本発明者らは、驚くべきことに、組織サンプリングタグまたは組織サンプリング生検針と組み合わせた水性組成物中の高濃度の塩の使用は、大きな困難なく、組織試料の処理、および所望であれば長期間の貯蔵／保存を可能とすることを見出した。具体的には、本発明による高濃度の塩を含有する水性組成物は、組織試料を一旦それに曝露したら、それ自体がさらなる分析のために使用され得る。多くの下流の処理適用のために、高濃度の塩の存在は、そのような高い塩の水性組成物中に含有される生体分子のさらなる分析に干渉しない。水性組成物中の高濃度の塩の存在がその後の適用に干渉する場合においては、そのような高い塩濃度は、組成物の生体分子含有量に影響することなく、単純な脱塩ステップまたは透析ステップによって容易に除去され得る。例えば、脱塩は、例えばGEHealthcareのPD-10脱塩カラムなどの市販の好適な脱塩カラムによって容易に達成することができる。

30

【0031】

多くの異なる界面活性剤が、本発明による水性組成物中に存在し得る。好ましい界面活性剤は、N-ラウロイルサルコシン、好ましくはそのナトリウム塩である。N-ラウロイルサルコシンは、前記水性組成物中に存在する高濃度の塩にとって特に好適なようである。本発明の実施形態によれば、好ましい緩衝剤はトリスであり、好ましいキレート剤はEDTA、好ましくはその二ナトリウム二水和物である。

【0032】

本発明によれば、本発明による水性組成物は、長期にわたって生体分子または組織試料を保存するため、ならびに／あるいは前記生体分子および／または組織試料のさらなる処理のために使用され得る。そのようなさらなる処理は、動物由来の組織試料のゲノムDNAに関する診断試験であり得、これは、そのような組織試料の遺伝子型判定、すなわち特定の遺伝形質の存在または不在の検出を伴い得る。そのような遺伝子型判定としては、制限断片長多型（RFLP）の同定、ゲノムDNAのランダム增幅多型検出（RAPD）、増幅断片長多型検出（AFLP）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、DNAシークエンシング、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）プローブ、核酸マイクロアレイまたはビーズへのハイブリダイゼーションを挙げることができる。一部の実施形態では、さらなる処理は、同様にまたは代替的に、病原体の検出を含み得る。そのような病原体

40

50

は、ウイルス、細菌、または、寄生生物などの単細胞もしくは多細胞真核生物であり得る。そのような病原体の検出は、それらの核酸またはタンパク質を介して為され得る。核酸の検出は、既に記載されている通り、適切な核酸技術、例えば、ハイブリダイゼーション実験、リアルタイムPCR、適切な核酸プローブが固定化されたマイクロアレイまたはチップまたはビーズ上でのハイブリダイゼーションなどの好適な増幅／検出方法論を使用して行われる。タンパク質の検出は、例えば、適切な抗体を伴う免疫吸着アッセイを介して行われ得る。そのような免疫吸着アッセイの典型例はELISAである。BVDVを一例とすると、それに典型的なその各々の核酸または特定のタンパク質を検出することによって、それを検出することができる。一実施形態では、BVDVのタンパク質の検出は、BVDVにおいて見られるそのような目的のために好適な任意のタンパク質、例えば、Npor、カプシドタンパク質、エンベロープ糖タンパク質、例えばERNs、E1またはE2、非構造タンパク質、例えばp7、NS2、NS3、NS4A、NS4Bなどから選択される任意のタンパク質を介するものである。

【0033】

さらなる実施形態では、本発明による水性組成物中の生体分子溶液は、組織試料中、したがって動物中の、特定のマーカーの存在または不在、動物に以前に投与されたまたは投与されたことが推定される薬物の存在または不在、特定のホルモンの存在または不在、ならびに／あるいは代謝産物の存在または不在などの、その他の作用物質の検出のためにもさらに使用され得る。

【0034】

本発明の一実施形態によれば、前記水性組成物の使用は、動物の組織試料中の病原体、特にはBVDVの検出用である。そのような検出は、前記組織試料から得られた生体分子溶液に対して任意の好適な手段を使用して、ハイブリダイゼーション実験、定量的リアルタイムPCR、適切な核酸プローブが固定化されたマイクロアレイまたはチップまたはビーズ上でのハイブリダイゼーション、フローサイトメトリー、免疫組織化学、およびその他の好適な方法論などの任意の好適な増幅／検出方法論をそれに対して実施することによって、実施され得る。好適な組織サンプリングタグまたは組織サンプリングユニット／生検針は、本出願人であるA11flex Europe S.A.を含む様々な製造業者から市販されている。本発明による水性組成物は、好適な容器中に含まれ得、得られた任意の組織試料は、そのような好適な容器中のそのような水性組成物に曝露される。一実施形態では、そのような好適な容器は、組織サンプリングタグもしくは組織サンプリング生検針または組織サンプリングシステムと作動可能に連結され得る。例えば、容器は、前記組織サンプリングタグもしくは組織サンプリング生検針または組織サンプリングシステムの取り外し可能な一部分であり得、そのような容器は、組織試料を取得／サンプリングした後にそれを前記容器に直ちに導入することを可能とし、次いで、前記組織試料のその後のさらなる処理もしくは取扱いまたは貯蔵のために、前記組織サンプリングタグもしくは組織サンプリング生検針または前記システムからその容器を取り外し、またはその接続を解除し、または解放し、または除去し得る。水性組成物の使用の際、上記に概要を述べたように、サンプリング後に直ちに組織試料を前記水性組成物に曝露する。

さらに、以下の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、ウシから得られた組織試料の本発明による水性組成物への曝露、およびゲル電気泳動でのその後のその分析の結果を示す。

【0036】

【図2】図2は、ウシから得られた組織試料を抽出し、この試料を2週間本発明による水性組成物中に保持し（すなわち、試料保管）、次いでこの試料を本発明の実施例1による新たに作製された水性組成物を使用して再曝露し、次いでこの再曝露により生じた溶液を分析した結果を示す。図1と同様、図2の結果は、溶解された核酸のゲルの写真として示している。

10

20

30

40

50

【0037】

【図3】図3は、実施例1にしたがって調製された組成物中に12ヶ月間貯蔵された試料のゲノムDNAのゲル電気泳動分離の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

さらに、本発明を限定するためなく、その実例を示すために与える以下の実施例を参照する。

【実施例】

【0039】

(実施例1：本発明の実施形態による水性組成物)

10

以下を混合することによって、1リットルの本発明の実施形態による水性組成物を製造する。

1.576グラムのトリス

0.342グラムのNaOHのペレット

0.744グラムのEDTA·2Na·2H₂O

2グラムのN-ラウロイルサルコシン(N-Lauroyl sarcosine)のナトリウム塩

81.82グラムのNaCl

超純水を用いて1リットルとする

モル濃度では、

トリス MS 121.14 - 1.576 g / 1 13 mM

NaOH MW 39.997 - 0.342 g / 1 8.55 mM

EDTA 2 Na 2 H₂O MW 372.24 - 0.744 g / 1 1.999 mM

N-ラウロイルサルコシンのナトリウム塩 MW 293.38 - 2 g / 1 6.81 mM

NaCl MW 58.44 81.82 g / 1 1.4 M

20

超純水を用いて11とする

【0040】

(実施例2：Allflexの組織サンプルタグ(TST)および組織サンプルユニット(TSU)を用いた実施例1による水性組成物の試験)

30

組織サンプリングタグ(tissue sampling tag; TST)および組織サンプリングユニット(tissue sampling unit; TSU)は、本出願人であるAllflex Europe S.A.より市販されている。

【0041】

本実施例の研究の目的は、Allflexの組織サンプルタグ(Tissue Sample Tag; TST)および組織サンプルユニット(Tissue Sample Unit; TSU)(=組織サンプリング生検針)が、組織試料それ自体の代わりに、試料がその中に保存された実施例1の水性組成物のみを使用することによって、BeadChimp(Illumina Inc.、San Diego, CA, USA)分析のために十分なDNAを生じさせることができるかどうかを試験することである。

40

【0042】

材料および方法

6つのインタクトな耳を試験用に屠殺場から受領した。全ての試料を数回穿孔し、また試験結果の確認用に陽性対照および陰性対照を含めた。TSTおよびTSUの両方は本研究の一部分であり、独立して試験した。

【0043】

本発明による組成物(実施例1)のアリコートを0時間後、3時間後、19時間後、24時間後、48時間後、72時間後、168時間後、336時間後、720時間後に試料から採取した。組成物の安定性を試験するために、5週続けて新たな水性組成物を6つの試料に加え、チューブ内に残っていた緩衝液は廃棄する補充研究を実施した。

50

【 0 0 4 4 】

全ての試料を GGP LD Bovine Bead Chip (GeneSeek、Lincoln、NE、USA) を用いて試験した。生成されたコール率 (call rate) をデータの質を決定するために使用した。0.85 より大きいコール率を有効な試験結果と認める。

【 0 0 4 5 】**結果**

計 156 の試料の遺伝子型判定に成功した。3つの試料は、0.85 より大きいコール率を生じるという基準を満たさなかった。試料の再試験は行わなかった。失敗した試料を除いて、観察されたコール率の平均は 0.985 であった。

10

【 0 0 4 6 】

安定性研究の結果は、TSU システムについて 0.993、TST 試料について 0.953 という平均コール率を与える。補充研究は、TSU および TST 試料について、4 度目の組成物の補充後にコール率がわずかに低下したことを明らかにした。しかしながら、全ての試料はそれでもなお、0.85 より大きいコール率という包含基準を満たしている。

【 0 0 4 7 】**結論**

本研究は、Alfle のサンプリングにおいて本発明による水性組成物を使用することにより、DNA の供給源としての組織サンプリング技術 (Tissue Sampling Technology) (TSU および TST) を、Illumina Bead Chip による遺伝子型判定の成功裡の実施において使用できることを示す。TSU および TST の両システムは、Illumina 解析のために使用された時に、匹敵するコール率を生じる。

20

【 0 0 4 8 】

0 ~ 720 時間後に解析した試料間で注目すべき有意差はなかった。耳をサンプリングした直後に、下流の適用のために本発明の水性組成物を使用することができる。これにより、このシステムは、直接的な遺伝形質および疾患の試験のために大いに適用可能となる。

30

【 0 0 4 9 】**(実施例 3：核酸の抽出、保管、および遺伝子型判定の試験)**

組織試料由来の核酸の溶解および / または抽出および / または保存のための好適性について、本発明による水性組成物を評価した。Alfle の組織サンプリングユニット (= 組織サンプリング生検針) (TSU) を使用してウシから得られた、選ばれた組織試料を、サンプリング後に直ちに各々の組織試料を実施例 1 による水性組成物 (「TSU 緩衝液」) 中に置くことによって、そのような組成物に曝露した。以下の結果が得られた。

【表A】

| 事例番号 | 試料 | 処理 | QUBIT濃度 ng/pl | Nanodrop濃度 ng/pl | Nanodrop A260/280 |
|--------|------|----------|------------------|---------------------|----------------------|
| 470003 | 3954 | TSU緩衝液のみ | 5.09 | 22.66 | 1.87 |
| 470004 | 3970 | TSU緩衝液のみ | 6.7 | 34 | 2.06 |
| 470005 | 3971 | TSU緩衝液のみ | 6.81 | 32.31 | 1.92 |
| 470006 | 3995 | TSU緩衝液のみ | 7.99 | 58.99 | 1.67 |
| 470007 | 4208 | TSU緩衝液のみ | 6.24 | 33.93 | 1.82 |
| 470008 | 4214 | TSU緩衝液のみ | 9.44 | 54.02 | 1.79 |
| 470009 | 4247 | TSU緩衝液のみ | 12.4 | 53.11 | 1.85 |
| | | 平均 | 7.81 | 41.29 | 1.85 |

10

20

30

40

【0050】

十分に高濃度の核酸が得られることがこの表および図1から分かる。「Qubit濃度」とは、Qubit(登録商標)定量(Thermo Fisher Scientific)を使用することによって決定される核酸濃度を指す。曝露の結果も添付の図1に見ることができ、ゲル上に試料の(ゲノム)核酸のバンドをはっきりと示している(M=マークーDNA)。レーン上の数字は試料番号を指示する。

【0051】

さらには、組織サンプリングユニット(TSU)を使用して得られた、選ばれた組織試料を実施例1による水性組成物中に2週間貯蔵した。その後、組成物を交換した後に、新たに作製した実施例1による組成物にこれらの組織を再曝露した。そのような再曝露の結果は、以下の表および図2に要約することができる。

【表B】

| 事例番号 | 試料 | 処理 | QUBIT濃度 ng/pl | Nanodrop濃度 ng/pl | Nanodrop A260/280 |
|--------|------|----------|------------------|---------------------|----------------------|
| 470010 | 3954 | TSU緩衝液のみ | | 15.59 | 1.72 |
| 470011 | 3970 | TSU緩衝液のみ | | 15.75 | 2.25 |
| 470012 | 3971 | TSU緩衝液のみ | | 24.72 | 2.05 |
| 470013 | 3995 | TSU緩衝液のみ | | 94.9 | 1.47 |
| 470014 | 4208 | TSU緩衝液のみ | | 37.57 | 1.79 |
| 470015 | 4214 | TSU緩衝液のみ | | 45.3 | 1.59 |
| 470016 | 4247 | TSU緩衝液のみ | | 17.27 | 1.72 |
| | | 平均 | | 35.87 | 1.80 |

【0052】

したがって、本発明による水性組成物は、サンプリング後に直ちに試料由来の核酸を溶解させるために好適であるだけでなく、その中に組織試料を貯蔵した後、新鮮な本発明の水性組成物中でのさらなる再曝露のためにそのような試料を使用するためにも好適であることがこれらのデータから明らかである。

【0053】

50

(実施例4：本発明による水性組成物中の組織試料の長期貯蔵)

A 1 1 f 1 e x の鉗子システムおよびA 1 1 f 1 e x の組織サンプリング生検針(T S U)を使用して、新たに屠殺されたウシの両耳から100個の耳のパンチ試料を収集した。実施例1による水性組成物で満たしたプラスチックの受容器(recipient)中に試料を押し入れた。本実施例4では、そのような本発明による水性組成物を「D液」または「保存剤D液」と呼ぶこともある(さらに下記を参照)。試料の収集、試料容器のラベリング、およびクーリエサービスによる即座の配送は、A 1 1 f 1 e x が実行した。1日後、試料は見たところ全く欠点のない状態で試験室に到着した。受領の際に、これらの試料を試料のラベリングおよび表1の情報を反映して選別し、実施例1の水性組成物中に暗所で貯蔵した。

10

【表1】

表1:試料のラベリングおよび試料の貯蔵の概要

| 保存 | | 貯蔵の継続時間 | | | | |
|----|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0ヶ月 | 3ヶ月 | 6ヶ月 | 9ヶ月 | 12ヶ月 |
| D液 | 24°C | D101-D105 | D201-D205 | D301-D305 | D401-D405 | D501-D505 |
| | 4°C | D106-D110 | D206-D210 | D306-D310 | D406-D410 | D506-D510 |
| | -20°C | D111-D115 | D211-D215 | D311-D315 | D411-D415 | D511-D515 |

【0054】

表1に表されるように、5つの試料の第1ラウンドの調製および検査の処理を試料の受領の翌日に行い(時間表「0ヶ月」)、全てのその後の検査を3ヶ月間隔の後で行った(時間表「3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、および12ヶ月」)。

20

【0055】

組織試料からのDNAの抽出、ならびに質および量の決定

全ての日常的実験手順および検査は、標準化されたプロトコールにしたがって行った。

【0056】

5つの試料をDNA抽出の約30分前に貯蔵容器(24、4、-20)から取り出し、室温で平衡化した。一般に、耳の各パンチ試料の一部分(約1/3)をDNA抽出のために使用した。

30

【0057】

組織試料からのゲノムDNAの単離は、NaOHおよび/またはプロテイナーゼ溶解を使用する中等度の溶解条件の下で伝統的なプロトコールにしたがって行った。単離されたDNAを100μlのトリス緩衝液(10mM)中に可溶化した。

【0058】

適用する試料材料の量

本プロジェクトの初めに、日常的実験手順のための試料の量の2つの変形例を比較した。

【0059】

変形例1は、耳のパンチ試料全体を利用し、変形例2は、耳のパンチ試料の一部分(耳のパンチ試料の約3分の1)に基づくものであった。日常的手順の間の試料の処理は常に連続的かつ再現性があるべきであることは必須事項であるので、この比較は重要であると思われた。耳のパンチ試料全体は、一度に実行することができ、よってより迅速に処理することができるときに、より狭い濃度範囲内にDNA濃度を保ち、それにより主観的影響を排除できると想像できる。それとは対照的に、本実施例において使用する日常的手段の間、予備に保持するために、元々のプローブの一部分のみを使用した。

40

【0060】

DNAの濃度および純度の光度測定による評価

全ての試料をNanodrop光度測定によって測定した。各試料は、260nmに最大吸収を有するきれいなDNAのスペクトルを示し、またタンパク質、溶媒、および塩によって引き起こされる希薄な不純物を示した(230nm、280nm)。表2は、2つ

50

の貯蔵変形条件下での時間表「0ヶ月」の量変形例2についてのNanodrop値の概要を与える。

【表2】

表2:DNAの濃度および純度の光学測定による決定 - 0ヶ月の貯蔵

| 保存剤D液 | | | | |
|-------|------|-------|---------|---------|
| | 試料ID | ng/μl | 260/280 | 260/230 |
| 24°C | D101 | 181,9 | 2,21 | 2,35 |
| | D102 | 240,9 | 2,10 | 2,10 |
| | D103 | 179,1 | 2,16 | 1,40 |
| | D104 | 320,6 | 1,98 | 1,44 |
| | D105 | 323,1 | 1,99 | 1,49 |
| | MW | 249,1 | 2,09 | 1,76 |
| | STDV | 70,8 | 0,10 | 0,44 |
| 4°C | D106 | 282,3 | 2,03 | 1,97 |
| | D107 | 83,3 | 2,62 | 0,69 |
| | D108 | 238,7 | 2,01 | 1,07 |
| | D109 | 295,7 | 2,03 | 2,03 |
| | D110 | 288,6 | 2,03 | 1,88 |
| | MW | 237,7 | 2,14 | 1,53 |
| | STDV | 89,1 | 0,27 | 0,61 |
| -20°C | D111 | 288,7 | 1,98 | 1,80 |
| | D112 | 287,0 | 2,58 | 2,22 |
| | D113 | 315,8 | 2,00 | 1,62 |
| | D114 | 55,5 | 4,12 | 1,76 |
| | D115 | 280,7 | 1,86 | 1,76 |
| | MW | 245,5 | 2,51 | 1,83 |
| | STDV | 107,1 | 0,94 | 0,23 |

10

20

30

40

【0061】

耳のパンチ試料全体を使用する量変形例1のDNA濃度は、191~829ng/μl（データ示さず）の範囲であり、耳のパンチ試料の約1/3を使用する量変形例2のDNA濃度は、55~323ng/μlの範囲であった。これは、全試料を使用することで有意により高いDNAの収量を示すが、測定値の広がりもより大きいことを示す。したがって、全てのさらなる分析のために試料の一部分（1/3）のみを使用することに決めた。

【0062】

表3~6は、組織試料の貯蔵の3ヶ月後、6ヶ月後、9ヶ月後、および12ヶ月後に対応するデータを示す。各試料は、十分な量のゲノムDNAを生成した。DNAの濃度は、それぞれ以下の範囲を示した：59~213ng/μl（3ヶ月）、204~663ng/μl（6ヶ月）、98~524ng/μl（9ヶ月）、および70~654ng/μl（12ヶ月）。

【表3】

表3:DNAの濃度および純度の光学測定による決定 — 3ヶ月の貯蔵

| 保存剤D液 | | | | |
|-------|------|--------|---------|---------|
| | 試料ID | ng/μl | 260/280 | 260/230 |
| 24°C | D201 | 109.65 | 1.87 | 1.19 |
| | D202 | 118.36 | 1.85 | 0.81 |
| | D203 | 58.9 | 1.9 | 1.58 |
| | D204 | 182.7 | 1.86 | 1.2 |
| | D205 | 204.0 | 1.86 | 1.16 |
| | MW | 134.7 | 1.87 | 1.19 |
| | STDV | 58.6 | 0.02 | 0.27 |
| | | | | |
| 4°C | D206 | 185.2 | 1.84 | 0.98 |
| | D207 | 213.4 | 1.77 | 1.03 |
| | D208 | 133.1 | 1.88 | 0.96 |
| | D209 | 117.38 | 1.82 | 0.86 |
| | D210 | 142.5 | 1.85 | 0.89 |
| | MW | 158.3 | 1.83 | 0.94 |
| | STDV | 39.7 | 0.04 | 0.07 |
| | | | | |
| -20°C | D211 | 173.7 | 1.87 | 1.06 |
| | D212 | 174.3 | 1.85 | 1 |
| | D213 | 107.74 | 1.84 | 0.86 |
| | D214 | 127.19 | 1.85 | 0.88 |
| | D215 | 177.2 | 1.9 | 1.4 |
| | MW | 152.0 | 1.86 | 1.04 |
| | STDV | 32.3 | 0.02 | 0.22 |

10

20

30

40

【表4】

表4:DNAの濃度および純度の光学測定による決定 — 6ヶ月の貯蔵

| 保存剤D液 | | | | |
|-------|--------|-------|---------|---------|
| | 試料ID D | ng/μl | 260/280 | 260/230 |
| 24°C | D301 | 259.9 | 1.80 | 1.80 |
| | D302 | 594.6 | 1.80 | 1.92 |
| | D303 | 472.6 | 1.71 | 1.50 |
| | D304 | 508.2 | 1.80 | 1.77 |
| | D305 | 398.2 | 1.79 | 1.83 |
| | MW | 446.7 | 1.78 | 1.76 |
| | STDV | 126.1 | 0.04 | 0.16 |
| | | | | |
| 4°C | D306 | 592.7 | 1.76 | 1.63 |
| | D307 | 662.7 | 1.78 | 1.47 |
| | D308 | 549.2 | 1.77 | 1.76 |
| | D309 | 271.1 | 1.68 | 1.33 |
| | D310 | 213.0 | 1.66 | 1.16 |
| | MW | 457.7 | 1.73 | 1.47 |
| | STDV | 202.0 | 0.06 | 0.24 |
| | | | | |
| -20°C | D311 | 271.4 | 1.76 | 1.44 |
| | D312 | 334.5 | 1.76 | 1.53 |
| | D313 | 204.3 | 1.75 | 1.31 |
| | D314 | 655.3 | 1.88 | 1.73 |
| | D315 | 272.4 | 1.84 | 1.47 |
| | MW | 347.6 | 1.80 | 1.50 |
| | STDV | 178.1 | 0.06 | 0.15 |

【表5】

表5:DNAの濃度および純度の光学測定による決定－9ヶ月の貯蔵

| 保存剤D液 | | | | |
|-------|------|-------|---------|---------|
| | 試料ID | ng/ul | 260/280 | 260/230 |
| 24°C | D401 | 152,8 | 1,98 | 2,39 |
| | D402 | 324,6 | 1,89 | 2,21 |
| | D403 | 445,8 | 1,86 | 2,08 |
| | D404 | 330,7 | 1,90 | 2,26 |
| | D405 | 98,4 | 2,01 | 1,40 |
| | MW | 270,5 | 1,93 | 2,07 |
| | STDV | 142,1 | 0,06 | 0,39 |
| 4°C | D406 | 505,9 | 1,83 | 2,01 |
| | D407 | 363,0 | 1,79 | 1,42 |
| | D408 | 283,3 | 1,83 | 1,87 |
| | D409 | 150,2 | 1,97 | 2,20 |
| | D410 | 125,3 | 1,97 | 1,80 |
| | MW | 285,6 | 1,88 | 1,86 |
| | STDV | 157,0 | 0,09 | 0,29 |
| -20°C | D411 | 248,1 | 1,96 | 2,13 |
| | D412 | 320,3 | 1,88 | 2,04 |
| | D413 | 312,7 | 1,84 | 1,49 |
| | D414 | 311,3 | 1,87 | 2,02 |
| | D415 | 524,3 | 1,84 | 1,98 |
| | MW | 343,4 | 1,88 | 1,93 |
| | STDV | 105,3 | 0,05 | 0,25 |

10

20

30

40

【表6】

表6:DNAの濃度および純度の光学測定による決定－12ヶ月の貯蔵

| 保存剤D液 | | | | |
|-------|------|-------|---------|---------|
| | 試料ID | ng/ul | 260/280 | 260/230 |
| 24°C | D501 | 234,3 | 1,84 | 1,75 |
| | D502 | 164,0 | 1,81 | 1,86 |
| | D503 | 212,9 | 1,66 | 1,32 |
| | D504 | 239,1 | 1,78 | 1,84 |
| | D505 | 202,6 | 1,77 | 1,73 |
| | MW | 210,6 | 1,77 | 1,70 |
| | STDV | 30,1 | 0,07 | 0,22 |
| 4°C | D506 | 245,7 | 1,69 | 1,24 |
| | D507 | 653,5 | 1,75 | 1,39 |
| | D508 | 82,5 | 1,76 | 1,20 |
| | D509 | 70,1 | 1,84 | 1,24 |
| | D510 | 276,1 | 1,72 | 1,40 |
| | MW | 265,6 | 1,75 | 1,29 |
| | STDV | 236,0 | 0,06 | 0,09 |
| -20°C | D511 | 479,6 | 1,78 | 1,87 |
| | D512 | 649,0 | 1,73 | 1,40 |
| | D513 | 203,9 | 1,75 | 1,54 |
| | D514 | 567,9 | 1,72 | 1,51 |
| | D515 | 437,4 | 1,74 | 1,58 |
| | MW | 467,6 | 1,74 | 1,58 |
| | STDV | 168,5 | 0,02 | 0,18 |

【0063】

0ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、9ヶ月後、および12ヶ月後に得られた試料を上記の通りに処理(すなわち溶解)し、ゲル電気泳動で分離し、分析した。そのようなゲル電気泳動分析の例示的な結果を図3に示す。図3は、本発明の水性組成物中に12ヶ月間貯蔵した試料についてのゲノムDNAのゲル電気泳動分離を示している。これらの試料は、はっきりと観察できる、ゲノムDNAを指し示す高分子のDNAバンドを示しており、試験

50

したいずれの貯蔵変形例中の試料貯蔵についても、12ヶ月の貯蔵期間後においてさえ、その後の分子遺伝学的診断のために非常に良好なDNAの質を生じたという結論に繋がることは明らかとなっている。したがって、本発明による水性組成物は、組織試料の長期間の貯蔵のためにも好適であり、そしてこの試料は、貯蔵後にその後のさらなる処理および分析のために使用できる。

【0064】

明細書、特許請求の範囲、および／または添付の図面中に開示した本発明の特徴は、個別におよびこれらの任意の組み合わせの両方において、本発明をその様々な形態で実現するための材料であり得る。

【図1】



Figure 1

【図2】



Figure 2

【図3】

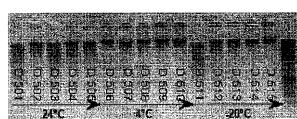


Figure 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/056782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | WO 2012/054613 A2 (BIO RAD LABORATORIES [US]; OKINO STEVEN T [US]; WANG YAN [US]) 26 April 2012 (2012-04-26) paragraph [0004] - paragraph [0059] ----- | 1,4,5 |
| X | Kay ET AL: "Standard Operating Procedure Tissue sample collection and storage for mammals", 1 December 2015 (2015-12-01), XP055304780, Retrieved from the Internet: URL: https://www.dpaw.wa.gov.au/images/documents/plants-animals/monitoring/sop/sop08.4_tissuesample_v1.0.pdf [retrieved on 2016-09-22] the whole document ----- -/- | 1-9 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 May 2017

16/05/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Westphal-Daniel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2017/056782 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | EP 1 088 212 A1 (AGROBIOGEN GMBH [DE]) 4 April 2001 (2001-04-04) cited in the application paragraph [0001] - paragraph [0065]; claims 1-17 ----- | 1-9 |
| A | WO 99/12475 A1 (BIOPSYTEC GMBH [DE]; DITTMANN THOMAS CLAUS [DE]; GUT IVO GLYNNE [DE]);) 18 March 1999 (1999-03-18) cited in the application page 1, line 8 - page 32, line 29 ----- | 1-9 |
| A | MICHAEL A. GRAY ET AL: "Comparison of DNA preservation methods for environmental bacterial community samples", FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY., vol. 83, no. 2, 8 October 2012 (2012-10-08), pages 468-477, XP055304779, NL ISSN: 0168-6496, DOI: 10.1111/1574-6941.12008 the whole document ----- | 1-9 |
| A | WO 2009/085355 A2 (LONGHORN VACCINES & DIAGNOSTIC [US]; FISCHER GERALD W [US]; DAUM LUKE) 9 July 2009 (2009-07-09) page 3, line 17 - page 26, line 10; examples 1-7 ----- | 1-9 |
| A | WO 2016/029020 A1 (ABOGEN INC [US]) 25 February 2016 (2016-02-25) page 7, line 27 - page 24, line 10 ----- | 1-9 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/056782

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|----|------------------|----|-------------------------|--|------------------|
| WO 2012054613 | A2 | 26-04-2012 | US | 2012100597 A1 | | 26-04-2012 |
| | | | WO | 2012054613 A2 | | 26-04-2012 |
| ----- | | | | | | |
| EP 1088212 | A1 | 04-04-2001 | AR | 019576 A1 | | 27-02-2002 |
| | | | AT | 209342 T | | 15-12-2001 |
| | | | AU | 765204 B2 | | 11-09-2003 |
| | | | BG | 64014 B1 | | 30-09-2003 |
| | | | BG | 104976 A | | 30-04-2001 |
| | | | BR | 9815866 A | | 16-01-2001 |
| | | | CN | 1301341 A | | 27-06-2001 |
| | | | DE | 29824186 U1 | | 24-08-2000 |
| | | | DE | 59802771 D1 | | 21-02-2002 |
| | | | DK | 1088212 T3 | | 13-05-2002 |
| | | | EA | 200001073 A1 | | 25-06-2001 |
| | | | EP | 1088212 A1 | | 04-04-2001 |
| | | | ES | 2168765 T3 | | 16-06-2002 |
| | | | HU | 0101861 A2 | | 28-12-2001 |
| | | | IL | 139890 A | | 11-02-2007 |
| | | | JP | 3836676 B2 | | 25-10-2006 |
| | | | JP | 2002516669 A | | 11-06-2002 |
| | | | NZ | 507811 A | | 28-03-2003 |
| | | | PL | 344256 A1 | | 22-10-2001 |
| | | | TR | 200003503 T2 | | 20-04-2001 |
| | | | UA | 66854 C2 | | 17-09-2001 |
| | | | WO | 9961882 A1 | | 02-12-1999 |
| | | | YU | 73700 A | | 18-10-2002 |
| ----- | | | | | | |
| WO 9912475 | A1 | 18-03-1999 | AT | 262831 T | | 15-04-2004 |
| | | | AU | 752275 B2 | | 12-09-2002 |
| | | | CA | 2303243 A1 | | 18-03-1999 |
| | | | CN | 1275894 A | | 06-12-2000 |
| | | | DE | 19758617 B4 | | 14-06-2006 |
| | | | DE | 19758619 C2 | | 18-12-2003 |
| | | | DE | 19758633 C2 | | 23-10-2003 |
| | | | DE | 59811112 D1 | | 06-05-2004 |
| | | | EA | 200000308 A1 | | 30-10-2000 |
| | | | EP | 1014861 A1 | | 05-07-2000 |
| | | | ES | 2215328 T3 | | 01-10-2004 |
| | | | HU | 0003451 A2 | | 28-02-2001 |
| | | | NZ | 503521 A | | 20-12-2002 |
| | | | PL | 339223 A1 | | 04-12-2000 |
| | | | UA | 75323 C2 | | 16-10-2000 |
| | | | US | 6659338 B1 | | 09-12-2003 |
| | | | WO | 9912475 A1 | | 18-03-1999 |
| ----- | | | | | | |
| WO 2009085355 | A2 | 09-07-2009 | AU | 2008343745 A1 | | 09-07-2009 |
| | | | CA | 2701168 A1 | | 09-07-2009 |
| | | | CA | 2861667 A1 | | 09-07-2009 |
| | | | DK | 2195466 T3 | | 14-01-2013 |
| | | | DK | 2535428 T3 | | 23-11-2015 |
| | | | EP | 2195466 A2 | | 16-06-2010 |
| | | | EP | 2535428 A2 | | 19-12-2012 |
| | | | EP | 3020832 A1 | | 18-05-2016 |
| | | | ES | 2552858 T3 | | 02-12-2015 |
| | | | IL | 204756 A | | 28-06-2012 |
| | | | NZ | 584308 A | | 27-04-2012 |
| | | | US | 2009312285 A1 | | 17-12-2009 |
| | | | US | 2012100529 A1 | | 26-04-2012 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/056782

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| | US 2013040288 A1 | | 14-02-2013 |
| | US 2014011187 A1 | | 09-01-2014 |
| | US 2014193804 A1 | | 10-07-2014 |
| | WO 2009085355 A2 | | 09-07-2009 |
| WO 2016029020 | A1 25-02-2016 | NONE | |

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/53

D

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 デ メレメーステル, ヨハン

ベルギー国 9 8 4 0 デ ピンテ, カイストラート 1 5

(72) 発明者 ルメール, エマニュエル

フランス国 0 2 1 0 0 サン カンタン, リュ ヴォルテール 1 0 1

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ05 QQ06 QQ10 QQ42 QQ52 QS08

QS10 QS13 QS14 QS15 QS25 QS34

4B065 AA90X BD02 BD12 BD29 BD50 CA23 CA46

4H011 BB06 BB18 CA05 CB08 CD02 DA13