(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6040226号
(P6040226)

(45)発行日　平成28年12月7日(2016.12.7)　(24)登録日　平成28年11月11日(2016.11.11)

| (51)Int.Cl. | | | F I | | |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N | 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | ZNAA |
| C12M | 1/00 | (2006.01) | C12M | 1/00 | A |
| C12Q | 1/68 | (2006.01) | C12Q | 1/68 | A |

請求項の数 11　(全 36 頁)

| | |
|---|---|
| (21)出願番号 | 特願2014-510505 (P2014-510505) |
| (86)(22)出願日 | 平成24年5月11日 (2012.5.11) |
| (65)公表番号 | 特表2014-517691 (P2014-517691A) |
| (43)公表日 | 平成26年7月24日 (2014.7.24) |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2012/037581 |
| (87)国際公開番号 | WO2012/155072 |
| (87)国際公開日 | 平成24年11月15日 (2012.11.15) |
| 審査請求日 | 平成27年5月11日 (2015.5.11) |
| (31)優先権主張番号 | 61/485,214 |
| (32)優先日 | 平成23年5月12日 (2011.5.12) |
| (33)優先権主張国 | 米国 (US) |
| (31)優先権主張番号 | 61/485,338 |
| (32)優先日 | 平成23年5月12日 (2011.5.12) |
| (33)優先権主張国 | 米国 (US) |

(73)特許権者　513195569
エクザクト　サイエンシーズ　コーポレイション
Ｅｘａｃｔ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ
アメリカ合衆国，５３７１９　ウィスコンシン州，マディソン，チャールマニー　ドライブ　４４１
４４１　Ｃｈａｒｍａｎｙ　Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ５３７１９，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸の単離

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒト排泄物試料から標的核酸を単離するための方法であって、

ａ）　前記試料からアッセイ阻害物質を除去し、浄化試料調製物を産生することと、

ｂ）　前記標的核酸を前記浄化試料調製物から捕捉することと、

を含み、

前記ａ）　試料からアッセイ阻害物質を除去し、浄化試料調製物を産生することは、以下のａ１）～ａ４）の工程を含み；

ａ１）　前記試料を均質化し、ホモジネートを産生すること、

ａ２）　前記ホモジネートを遠心分離し、上清を産生すること、

ａ３）　前記上清を、直径平均約１００～約１３０マイクロメートルを有する不溶性ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）粒子で処理し、阻害物質が存在する場合、ＰＶＰ－阻害物質複合物中の阻害物質に結合させること、

ａ４）　前記ＰＶＰ－阻害物質複合物を前記上清から、公称細孔径２０マイクロメートルを有する多孔性濾過材料のスピンフィルタを通して遠心分離することで分離することであって、前記ＰＶＰ－阻害物質複合物はスピンフィルタに留保され、前記上清の分画は前記多孔性濾過材料のスピンフィルタを通過し、浄化試料調製物を産生すること、

前記ｂ）　標的核酸を前記浄化試料調製物から捕捉することは、以下のｂ１）～ｂ４）の工程を含む、方法：

ｂ１）　前記浄化試料調製物を変性条件に暴露し、変性試料を産生すること、

ｂ２）　前記標的核酸を標的特異的捕捉試薬に結合し、捕捉複合物を形成すること、
ｂ３）　前記捕捉複合物を前記浄化試料調製物から単離すること、
ｂ４）　前記標的核酸を標的核酸溶液中の前記捕捉複合物から回収すること。
【請求項２】
ｃ）　前記単離工程ｂ３）後、残留浄化試料調製物を留保することと、
ｄ）　前記残留浄化試料および第２の捕捉試薬を使用して、前記工程ｂ１）～ｂ４）の捕捉、単離、および回収を繰り返すことと、
をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ポリビニルピロリドン粒子は、事前に測定された量のポリビニルピロリドンを含んでいるカプセルまたは圧入された錠剤として提供される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記スピンフィルタは中空本体と、底部端とを備え、当該中空本体および当該底部端の両方は、前記多孔性濾過材料から作製されている、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記標的特異的捕捉試薬は、前記標的核酸の少なくとも一部に相補的オリゴヌクレオチドを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記標的特異的捕捉試薬は、磁性粒子を含み、且つ
前記捕捉複合物の前記単離は、前記捕捉複合物を磁場に暴露することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記標的核酸の回収は、前記標的核酸を前記捕捉複合物から溶出することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記標的核酸は、ヒトの標的核酸である、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
標的ヒトＤＮＡをヒト排泄物試料から単離するための方法であって、
ａ）　質量少なくとも４グラムを有する排泄物試料をヒト対象から得ることと、
ｂ）　均質化緩衝剤中で前記排泄物試料を均質化し、均質化された排泄物試料を産生することと、
ｃ）　前記均質化された排泄物試料から排泄物上清を調製することと、
ｄ）　前記排泄物上清をＰＶＰで処理し、浄化排泄物上清を産生することと、
ｅ）　変性剤を前記浄化排泄物上清に添加し、試料溶液を産生することと、
ｆ）　前記試料溶液を加熱することと、
ｇ）　前記試料溶液に、磁性粒子に共有結合されるオリゴヌクレオチドを含む標的特異的捕捉試薬を添加することであって、前記オリゴヌクレオチドは、前記標的ヒトＤＮＡの少なくとも一部に相補的であることと、
ｈ）　前記試料溶液を前記標的特異的捕捉試薬とインキュベートし、前記標的特異的捕捉試薬および前記標的ヒトＤＮＡを含む複合物を産生することと、
ｉ）　前記複合物を含む試料溶液を磁場に暴露し、前記複合物を前記試料溶液から単離することと、
ｊ）　前記標的ヒトＤＮＡを前記複合物から溶出し、前記標的ヒトＤＮＡを含む標的核酸溶液を産生することと、
を含み、
前記ｄ）　前記排泄物上清をＰＶＰで処理し、浄化排泄物上清を産生することは、以下のｉ）～ｉｉ）の工程を含む、方法：
ｉ）前記上清を、直径平均約１００～約１３０マイクロメートルを有する不溶性ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）粒子で処理し、阻害物質が存在する場合、ＰＶＰ－阻害物質複合物中の阻害物質に結合させること：および

ｉｉ）前記ＰＶＰ－阻害物質複合物を前記上清から、公称細孔径２０マイクロメートルを有する多孔性濾過材料のスピンフィルタを通して遠心分離することで分離することであって、前記ＰＶＰ－阻害物質複合物はスピンフィルタに留保され、前記上清の分画は前記多孔性濾過材料のスピンフィルタを通過し、浄化試料調製物を産生すること。

【請求項１０】

前記標的核酸溶液に核酸検出反応を行うことをさらに含み、

前記核酸検出反応の体積の少なくとも３分の１は、前記標的核酸溶液に由来する、請求項１または請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記標的ヒトＤＮＡは、結腸直腸癌および／または結腸直腸腺腫と関連付けられた遺伝子に由来する、請求項９に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本願は、それぞれ、２０１１年５月１２日に出願された、米国仮特許出願第６１／４８５，２１４号、第６１／４８５，３３８号、第６１／４８５，３８６号、および第６１／４８５，４４８号の利益を主張するものであって、それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる。

〔技術分野〕

本明細書に提供されるのは、核酸を単離することに関連する技術である。特に、本技術は、排泄物等の厄介な試料から核酸を抽出するための方法およびキットに関する。

〔背景技術〕

特異的標的核酸を試料から単離することは、多くの医療診断アッセイのための重要なステップである。例えば、既知の遺伝子中のある突然変異およびメチル化状態は、疾患と相関する、それと関連付けられる、および／またはその前兆となる。これらの遺伝子を持つＤＮＡは、試料から回収され、特定の突然変異およびメチル化状態の存在に関して、試験されることができる。

【０００２】

実際は、そのようなアッセイは、いくつかの遺伝子標的を試料から単離し、アッセイを行うことを要求する。多くの検出方法に関して、単一遺伝子中で稀な突然変異またはメチル化事象を検出することは、大量のＤＮＡを単離し、試験を行うことを要求する。本問題は、遺伝子のパネルをアッセイするとき、そのそれぞれが、確実な診断試験のために、大量に存在しなければならず、複雑となる。したがって、複数の遺伝子中の稀な突然変異およびメチル化事象を検出するために、単離されたＤＮＡは、極めて濃縮され、検出アッセイの実質的部分を構成しなければならない。

【０００３】

しかしながら、本要件は、多くの問題を呈する。例えば、そのような量および濃度のＤＮＡの調製は、検出に十分な核酸を提供するために、入力として大量の試料（例えば、質量数グラム、例えば、約２～４グラムを有する）を要求し、したがって、大量の試料からＤＮＡを調製することができる方法を要求する。加えて、多くの場合、アッセイ阻害物質も単離され、ＤＮＡ調製物とともに濃縮される。その結果、従来の方法によって産生される、濃縮されたＤＮＡ調製物はまた、多くの場合、容認不可能な濃度の阻害物質を留保し、これは、次いで、後続アッセイに導入される。さらに、パネルの全標的が、同時に、バルク状の非選択的ＤＮＡ調製物として抽出される場合、調製物が、試験のために、分割量に分割されることにより、パネルの任意の１つの遺伝子から抽出されたＤＮＡが、アッセイ中にほとんど存在しないため、アッセイの感度は、損なわれる。一方、パネルの全部材が、抽出され、ともに試験され、したがって、同一のアッセイ混合物中に存在する場合、任意の単一の特定の標的を検出する感度は、非標的ＤＮＡ分子の存在によって損なわれる。

【０００４】

加えて、特定の診断標的が、複合試料中に存在する場合、試料中の他の物質（核酸および非核酸の両方）と比較して、少量で存在し、したがって、それを検出するために設計された分析方法に課題をもたらすであろう。例えば、排泄物試料からのＤＮＡの分析は、細菌が、糞便の乾燥質量の約６０％を占め、残りは、大部分が、対象によって食物として消化された植物性および動物性物質の残骸であるという事実によって複雑となる。したがって、ヒト対象の細胞は、消化管の内膜から剥がれ落ちるもののみであって、排泄物の非常に少量の分画であって、他の源からの実質的量の核酸が、存在する。さらに、結腸癌を示す遺伝子修飾を検出するためのアッセイでは、結腸内に存在し得る腫瘍から導出される細胞は、消化管内膜から剥がれ落ちるヒト対象の腸細胞の少量の分画のみを占めるであろう。その結果、癌細胞（および、それらが含有するＤＮＡ）は、最小量の排泄物質量を構成する。そのような試料はまた、多くの場合、非常に粘性であって、試料調製および核酸の単離に問題を呈する。

【０００５】

ＤＮＡを試料から単離するための従来の方法およびキットは、典型的には、試料から全体的ＤＮＡを調製する（例えば、非特異的沈殿方法によって）。排泄物試料等の複合試料に関して、これは、従来の方法の特定の短所である、排泄物試料から単離される全体的ＤＮＡは、対象からのＤＮＡとともに、腸常在細菌（および、存在する任意のウイルス、真核生物、および古細菌）からのＤＮＡを含む。さらに、従来の方法およびキットは、主に、少量の試料、例えば、質量１グラム未満、例えば、５０～２００ミリグラムを有する試料からＤＮＡを調製するように設計されており、複合試料からの標的核酸の収率を非常に少量に制限する。付加的短所は、大部分の従来の技術が、効果的に阻害物質を除去せず、多くの場合、長時間の処理ステップ、例えば、インキュベートを要求することである。その結果、従来の方法は、数グラムの排泄物試料等、大量の試料から十分な量の高濃度の阻害物質が存在しないＤＮＡを調製することができないため、高感度および高特異性多重遺伝子パネル分析に好適ではない。従来の方法で調製されたＤＮＡを使用するアッセイは、稀な突然変異またはメチル化事象を検出するために要求される感度閾値を伴ってアッセイされ得る試料を提供しないであろう。従来の方法またはキットを使用して、そのような感度を達成するために必要とされる開始量を達成することは、複数の試料からの複数のＤＮＡ抽出（例えば、複数のキットの使用）に加え、阻害物質を除去するための余剰精製ステップを要求する。したがって、必要とされるのは、診断アッセイにおいて使用するための遺伝子パネルの各部材のために、試料から濃縮された阻害物質が存在しないＤＮＡを調製する方法である。

〔発明の概要〕

本明細書に提供されるのは、核酸を単離することに関連する技術である。特に、本技術は、定量的かつ高感度のアッセイにおいて使用するために、排泄物標本中の剥離腸細胞から核酸を抽出および精製するための方法、システム、およびキットに関する。本技術は、阻害物質除去ステップおよび排泄物上清からのＤＮＡの直接捕捉、またはこれらのステップの組み合わせを利用する、特異的ＤＮＡを排泄物から精製するための新規方法において具現化される。本技術はさらに、排泄物試料等の複合かつ粘性試料と併用するための好適な濾過デバイスを提供する。故に、本明細書に提供されるのは、試料から標的核酸を単離するための方法であって、存在する場合、アッセイ阻害物質を試料から除去し、浄化試料を産生することと、存在する場合、捕捉試薬を用いて、標的核酸を浄化試料から捕捉し、捕捉複合物を形成することと、捕捉複合物を浄化試料から単離することと、存在する場合、標的核酸を核酸溶液中の捕捉複合物から回収することとを含む、方法である。いくつかの実施形態では、本方法はさらに、捕捉後、浄化試料を留保することと、留保された浄化試料および第２の捕捉試薬を使用して単離および回収することを繰り返すこととを含む。

【０００６】

いくつかの実施形態では、阻害物質の除去は、試料を均質化し、ホモジネートを産生することと、ホモジネートを遠心分離し、上清を産生することと、上清を阻害物質吸収組成物で処理し、存在する場合、阻害物質複合物中の阻害物質に結合させることと、阻害物質

複合物を上清から単離し、浄化試料を産生することとを含む。阻害物質吸収組成物は、いくつかの実施形態では、ポリビニルピロリドンである。いくつかの実施形態では、ポリビニルピロリドンは、不溶性であって、いくつかの実施形態では、ポリビニルピロリドンは、ポリビニルポリピロリドンである。いくつかの実施形態では、ポリビニルピロリドンを事前に測定された形態において提供することが有用であって、例えば、いくつかの実施形態では、ポリビニルピロリドンは、錠剤として提供される。種々の技法が、阻害物質複合物を試料から分離するために使用される。例えば、いくつかの実施形態では、阻害物質複合物の単離は、遠心分離を行い、阻害物質複合物を上清から分離することを含む。

【０００７】

いくつかの実施形態では、遠心分離は、スピンカラムを通した遠心分離を含む。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、濾過、特に、排他的ではないが、フィルタおよび遠心分離を用いた濾過の方法に関連する技術である。具体的には、本明細書に提供される技術のいくつかの実施形態は、スピンフィルタの底部端および本体の両方が、多孔性または浸透性材料から作製される技術を提供することによって、スピンフィルタの閉塞の問題に対処する。すなわち、スピンフィルタの壁は、従来の設計において、底部端でフィルタ手段のために使用されるものと同一または類似材料から作製される。したがって、フィルタの底部部分が、濾過の間、閉塞しても、壁が、付加的表面を提供し、それを通して、試料を濾過することができる。

【０００８】

本技術は、中空本体と、底部端と、底部端と反対の開放上部端とを備え、中空本体が、多孔性濾過材料から作製される、スピンフィルタとして、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、底部端は、多孔性濾過材料から作製される。スピンフィルタの中空本体および底部端は、フィルタが適用される濾過用途に適切な任意の形状をとる。例えば、いくつかの実施形態では、中空本体は、管であって、いくつかの実施形態では、底部端は、半球である。他の実施形態では、底部端は、円盤、円錐、または楕円体の一部である。さらに、スピンフィルタは、試料を濾過するために適切な任意の材料から作製される。したがって、いくつかの実施形態では、多孔性濾過材料は、ポリエチレンである。試料は、濾過によって除去されるべき、可変サイズの粒子、物質、沈殿物等を含む。故に、濾過材料は、所望の分離を提供する、物理的特性を有するように選択されることができる。例えば、いくつかの実施形態では、多孔性濾過材料は、公称細孔径２０マイクロメートルを有する。いくつかの実施形態では、フィルタの使用は、ユーザが付加的処理のために留保する、濾液を産生する。したがって、いくつかの実施形態は、説明されるようなスピンフィルタと、スピンフィルタを受容し、濾液を収集するように適合される収集容器とを備える、スピンフィルタアセンブリを提供する。

【０００９】

また、本明細書に提供されるのは、濾過させるべき試料をスピンフィルタに定置することと、スピンフィルタを遠心分離することとを含み、遠心分離の間、試料の分画が、該スピンフィルタの多孔性濾過材料を通過し、濾液を産生する、濾液を試料から産生するための方法である。

【００１０】

本技術は、試料分離において使用するためのキットとして提供することができる。そのようなキットの実施形態は、説明されるようなスピンフィルタと、使用説明書とを備える。いくつかの実施形態では、キットはさらに、収集容器を備える。いくつかの実施形態では、スピンフィルタを備えるキットはさらに、試料調製、例えば、阻害物質除去および／または標的核酸単離のための付加的試薬および物質を含む。

【００１１】

いくつかの実施形態では、本技術の方法およびシステムは、核酸標的を捕捉することを含む。標的核酸の捕捉は、いくつかの実施形態では、浄化試料調製物等の試料を変性試料を産生するための変性条件に暴露することと、変性試料中の標的核酸を捕捉試薬に結合させ、捕捉複合物を形成することとを含む。多くの処理および条件が、ＤＮＡ等の高分子の

変性において使用を見出す。例えば、いくつかの実施形態では、変性条件は、加熱を含み、例えば、いくつかの実施形態では、変性条件は、９０℃で加熱することを含む。変性されるべき試料を相補することは、変性を促進する。故に、いくつかの実施形態では、浄化試料はさらに、変性剤を含む。ある好ましい実施形態では、変性剤は、チオシアン酸グアニジンを含む。さらに、いくつかの実施形態では、捕捉試薬は、標的核酸の少なくとも一部に相補的オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの好ましい実施形態では、捕捉試薬は、粒子、例えば、磁性粒子を含む。オリゴヌクレオチドは、本技術のいくつかの実施形態では、標的核酸の少なくとも一部をハイブリダイズし、したがって、いくつかの実施形態では、結合は、オリゴヌクレオチドおよび標的核酸をハイブリダイズすることを含む。捕捉試薬（例えば、捕捉試薬／標的核酸複合物）の単離は、いくつかの実施形態では、捕捉試薬を磁場に暴露することによって達成される。すなわち、本明細書に提供されるいくつかの実施形態では、単離は、捕捉複合物を磁場に暴露することを含み、いくつかの実施形態では、捕捉複合物を磁場に暴露することは、標的核酸を局在化させる。磁場は、本方法のための任意の適切な磁石または磁気デバイスによって産生される。例えば、いくつかの実施形態では、単離は、試料に極めて近接するそのＮ極で方位付けられた第１の磁石と、試料に極めて近接するそのＳ極で方位付けられた第２の磁石とによって産生された磁場内に試料を定置することと、磁場が磁性粒子を所望の場所に移動させるために十分な時間の間、待機することとを含む。強磁場を産生するためのデバイスは、例えば、米国特許出願第１３／０８９，１１６号に説明されており、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【００１２】

本技術は、標的核酸を捕捉試薬から回収することを提供する。いくつかの実施形態では、標的核酸の回収は、例えば、いくつかの実施形態では、加熱によって、標的核酸を捕捉複合物から溶出することを含む。いくつかの実施形態では、捕捉複合物からの標的核酸の溶出は、例えば、いくつかの実施形態では、水酸化ナトリウムの溶液を添加することによって、捕捉複合物を高ｐＨに暴露することを含む。

【００１３】

いくつかの実施形態では、本技術は、単一試料、例えば、排泄物試料から複数の核酸を捕捉するための方法、システム、およびキットを提供する。例えば、本明細書に提供されるのは、排泄物試料を標的特異的捕捉試薬と接触させることと、存在する場合、標的核酸を標的特異的捕捉試薬に接合させ、複合物を形成することと、存在する場合、標的特異的捕捉試薬および標的核酸を含む複合物を排泄物試料から単離することと、存在する場合、標的核酸を複合物から溶出し、存在する場合、標的核酸を含む標的核酸溶液を産生することと、異なる標的特異的捕捉試薬を使用して、本方法を繰り返すこととを含む、核酸を排泄物試料から単離するための方法である。本方法は、例えば、質量少なくとも４グラムを有する、大量の試料に適切である。さらに、各溶出された標的核酸は、存在する場合、標的核酸溶液が、定量的ＰＣＲの体積の最大約３分の１を占めるとき、各溶出された標的核酸が、定量的ＰＣＲによって検出されるように、十分に精製され、十分に濃縮され、十分に阻害物質が存在しない。

【００１４】

提供される方法のいくつかの実施形態では、標的核酸は、ヒト標的核酸である。付加的実施形態では、標的核酸は、ＤＮＡである。核酸が排泄物試料から単離される手段に制限されるわけではないが、いくつかの実施形態では、標的特異的捕捉試薬は、配列特異的核酸捕捉試薬である。いくつかの実施形態では、配列特異的核酸捕捉試薬は、オリゴヌクレオチドであって、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、磁気または常磁性粒子に共有結合される。いくつかの実施形態は、磁石が単離のために使用されることを提供し、いくつかの実施形態は、単一単離ステップにおいて、複数の標的特異的捕捉試薬を使用して、２つ以上の標的の同時単離を提供する。

【００１５】

本方法は、処理される試料のタイプに制限されない。例えば、いくつかの実施形態では

、試料は、例えば、いくつかの実施形態では、１０センチポイズを上回る粘度を有する、いくつかの実施形態では、２０センチポイズを上回る粘度を有する、粘性試料である。加えて、試料は、広範囲のサイズである。本方法は、いくつかの実施形態では、質量２グラム以上を有する試料を処理するために使用され、いくつかの実施形態では、試料は、５グラムを上回る質量を有する。

【００１６】

本明細書に提供される技術は、アッセイを阻害する量を下回るように、阻害物質を試料から除去することを目的とする。したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、核酸溶液が、第２の量のアッセイ阻害物質未満の第１の量のアッセイ阻害物質を含み、５マイクロリットルの核酸溶液が、体積２５マイクロリットルを有するＰＣＲにおいて使用されるとき、第２の量のアッセイ阻害物質が、ＰＣＲを阻害することを提供する。いくつかの実施形態では、核酸溶液は、第２の量のアッセイ阻害物質未満の第１の量のアッセイ阻害物質を含み、１マイクロリットルの核酸溶液が、体積２５マイクロリットルを有するＰＣＲにおいて使用されるとき、第２の量のアッセイ阻害物質は、ＰＣＲを阻害する。

【００１７】

本技術は、医療分子診断に関連し、生物学的物質（例えば、分子）の状態、存在、量、配列等の照会が、医療査定を補助するために使用される。故に、いくつかの実施形態では、標的核酸は、結腸癌および腺腫から成る群から選択される、疾患状態と相関する。

【００１８】

本明細書に説明される技術は、いくつかの実施形態では、キット形態で提供される。例えば、実施形態は、本技術が、磁性粒子に共有結合されるオリゴヌクレオチドを含む捕捉試薬と、磁場を産生するための装置と、ポリビニルピロリドンと、使用説明書とを含む、試料から標的核酸を単離するためのキットであるように提供する。いくつかの実施形態では、キットはさらに、均質化溶液を含む。いくつかの実施形態では、キットはさらに、溶出溶液を含み、いくつかの実施形態では、キットはさらに、チオシアン酸グアニジンを含む。いくつかの実施形態では、ポリビニルピロリドンが、事前に測定された形態であることが便宜的である。例えば、ポリビニルピロリドンは、いくつかの実施形態では、錠剤またはカプセル内に提供される。キットのいくつかの実施形態は、ポリビニルピロリドンを除去するためのスピンフィルタを提供する。

【００１９】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、磁場を使用して単離される。したがって、本明細書に説明されるキットの実施形態は、磁場を産生する装置を提供する。本明細書に提供される技術の実施形態と併用するために好適な磁場を産生するために使用されるデバイスの１つは、２つの磁石または一式の磁石を備え、第１の磁石または一式の磁石のＮ極（複数可）を試料に極めて近接して定置し、第２の磁石または一式の磁石のＳ極（複数可）を試料に極めて近接して定置する。いくつかの実施形態では、キットはさらに、試料を収集するためのデバイス、例えば、本体と、本体に取り付けられた着脱可能試料カプセルとを有するデバイスであって、着脱可能試料カプセルが、試料を封入するために適合された試料収集空間を備える、デバイスを提供する（例えば、米国特許出願第６１／４７６，７０７号に説明されるように）。

【００２０】

いくつかの実施形態では、キットは、試料を処理し、試料を処理するために使用される種々の組成物または処理試料の処理から生じるものを保持するために使用される、容器（例えば、管、バイアル、瓶、および同等物）を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、キットはさらに、試料を保持するための容器を備え、いくつかの実施形態では、キットはさらに、単離された標的核酸を保持するための容器を備える。キットは、いくつかの実施形態では、試料が処理される場所および／または検体がアッセイされる場所以外の場所で使用される。故に、いくつかの実施形態では、キットはさらに、発送コンテナを備える。

【００２１】

本明細書に提供される技術は、核酸を試料から調製するためのシステムにおいて使用を見出す。いくつかの実施形態では、本システムは、阻害物質を試料から除去するためのポリビニルピロリドンと、標的核酸を試料から捕捉するための試薬と、磁場を産生するための機能性とを備える。いくつかの実施形態では、本システムはさらに、試料を収集するための機能性を備え、いくつかの実施形態では、システムはさらに、核酸溶液を発送するための機能性を備える。

【００２２】

付加的実施形態は、本明細書に含有される教示に基づいて、当業者に明白となるであろう。

〔図面の簡単な説明〕

本技術のこれらおよび他の特徴、態様、ならびに利点は、以下の図面に関連して、さらに理解されるであろう。

【００２３】

〔図１〕核酸単離プロセスの態様のチャートを提供する。図１Ａは、核酸単離プロセスのステップを示す、チャートを提供する。図１Ｂは、図１Ａの全体的プロセスの態様と同一の試料からの複数の標的の連続抽出に使用を見出す、プロセスの実施形態を示す、流れ図である。

【００２４】

〔図２〕ポリビニルピロリドンの化学構造である。

【００２５】

〔図３〕例示的スピンフィルタの図面である。

【００２６】

〔図４〕図３に示されるスピンフィルタの分解図を示す、図面である。

【００２７】

〔図５〕図３および４のスピンフィルタと関連付けられたスピンフィルタ底部端を示す、一連の図面である。図５Ａは、円盤形状の中実（例えば、非多孔性または非浸透性）底部端の図面であって、図５Ｂは、円盤形状の多孔性（浸透性）底部端の図面であって、図５Ｃは、多孔性の円錐形底部端の図面である。

【００２８】

〔図６〕収集管と組み立てられたスピンフィルタの図面である。

【００２９】

〔図７〕図６に描写されるスピンフィルタの裁断図である。

【００３０】

〔図８〕多孔性物質の本体と、フィルタ支持部によって提供される底部端とを備える、スピンフィルタの図面である。図８Ａは、組立図であって、図８Ｂは、分解図である。

【００３１】

〔図９Ａ～９Ｄ〕排泄物試料からの阻害物質の除去を示す、プロットである。

【００３２】

〔図１０Ａ～１０Ｄ〕スピン濾過が阻害物質の除去を改善することを示す、プロットである。

【００３３】

〔図１１Ａ〕粘度１センチポイズおよび２５センチポイズを有する試料に関する従来の技術の局在化効率を比較するデータのプロットである。図１１Ｂは、粘度１センチポイズおよび２５センチポイズを有する試料に関して提供される、Ｌｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒ（米国特許出願第１３／０８９，１１６号）によって提供される磁気局在化デバイスの局在化効率を比較するデータのプロットである。

【００３４】

〔図１２Ａ〕排泄物試料からの単一抽出が標的ＤＮＡの大部分を回収する、定量的ＰＣＲの結果を示す、プロットである。図１２Ｂは、第１の抽出および第２の抽出からの核酸溶液中の遺伝子Ａおよび遺伝子Ｖの濃度を示す。

【００３５】
〔図１３Ａ～１３Ｄ〕４つの標的ＤＮＡの回収が、４つの標的ＤＮＡが排泄物試料から抽出される順序にかかわらず類似する、定量的ＰＣＲの結果を示す、プロットを示す。
【００３６】
〔図１４〕実施形態のワークフロー（プロセスＡ）と、既存の方法（プロセスＢ、例えば、国際公開第２０１０／０２８３８２号参照）に基づくステップを使用して、ＤＮＡを排泄物試料から単離するための例示的プロセスを比較する、チャートを提供する。
〔発明を実施するための形態〕
本技術は、ＤＮＡ試料の産生に関し、特に、小体積（例えば、１００マイクロリットル未満、６０マイクロリットル未満）中に高度に精製された少量の核酸を含み、ＤＮＡ試料を試験するために使用されるアッセイ（例えば、ＰＣＲ、ＩＮＶＡＤＥＲ、ＱｕＡＲＴＳ等）を阻害する物質が実質的におよび／または効果的に存在しない、ＤＮＡ試料を産生するための方法に関する。そのようなＤＮＡ試料は、患者から採取した試料中に存在する、遺伝子、遺伝子変形（例えば、対立遺伝子）、または遺伝子修飾（例えば、メチル化）の存在を定質的に検出し、あるいはその活性、発現、または量を定量的に測定する、診断アッセイに使用を見出す。例えば、いくつかの癌は、特定の変異対立遺伝子または特定のメチル化状態の存在と相関し、したがって、そのような変異対立遺伝子またはメチル化状態を検出および／または定量化することは、癌の診断および治療に予測的価値を有する。
【００３７】
多くの貴重な遺伝子マーカーが、非常に少量として、試料中に存在し、そのようなマーカーを産生する事象の多くは、稀である。その結果、ＰＣＲ等の高感度の検出方法さえ、アッセイの検出閾値を満たす、またはそれを超えるための十分な少量の標的を提供するために、大量のＤＮＡを要求する。さらに、少量の阻害物質の存在さえ、そのような少量の標的を検出することを目的とするこれらのアッセイの正確度および精度を損なわせる。故に、本明細書に提供されるのは、そのようなＤＮＡ試料を産生するための体積および濃度の必要とされる管理を提供する方法である。
【００３８】
排泄物試料等のいくつかの生物学的試料は、ＰＣＲを阻害する、種々の異なる化合物を含有する。したがって、ＤＮＡ抽出手順は、ＰＣＲ阻害物質を除去および／または不活性化するための方法を含む。したがって、本明細書に提供されるのは、試料の処理および調製、特に、排他的ではないが、アッセイ阻害物質を核酸を含む試料から除去するための方法、システム、およびキットに関連する技術である。
定義
本技術の理解を促進するために、いくつかの用語および語句が、以下に定義される。付加的定義は、発明を実施するための形態全体を通して記載される。
【００３９】
本明細書に使用される際、「ａ」または「ａｎ」または「ｔｈｅ」は、１つ以上を意味し得る。例えば、「ａ」部品は、１つの部品または複数の部品を意味し得る。
【００４０】
本明細書に使用される際、「阻害物質」は、阻害物質が不在であるときのアッセイの活性、精度、または正確度と比較して、直接または間接的にのいずれかにおいて、アッセイの活性、精度、または正確度を低下させるように作用する、任意の化合物、物質、または組成物、あるいはそれらの組み合わせを意味する。阻害物質は、制限ではないが、分子、原子、あるいは分子または原子の組み合わせであり得る。
【００４１】
本明細書に使用される際、混合物をフィルタに通過させるプロセスは、「濾過」と呼ばれる。液体中の固体の懸濁液を濾過後に産生される液体は、「濾液」と呼ばれる一方、フィルタ内に残留する固体は、「残余分」、「残渣」、または「濾取」と呼ばれる。
【００４２】
本明細書に使用される際、「不溶性」は、物質が、実質的に、水中に溶解せず、本質的

に、それと非混和性である、特性を指す。水相が非水相から分離すると、不溶性物質は、水相中に分裂することも、またはそれとともに分裂することもない。

【００４３】

本明細書に使用される際、用語「対象」および「患者」は、イヌ、ネコ、鳥、家畜、特に、哺乳類、好ましくは、ヒト等の任意の動物を指す。いくつかの事例では、対象はまた、「ユーザ」である（したがって、ユーザもまた、対象または患者である）。

【００４４】

本明細書に使用される際、用語「試料」および「標本」は、同じ意味で、かつ広義に使用される。ある意味では、試料は、任意の源から得られた標本または培養物、ならびに生物学的および環境的試料を含むことを意味する。生物学的試料は、動物（ヒトを含む）から得られ、流体、固体、組織、および気体を包含し得る。生物学的試料は、血漿、血清、排泄物、尿、および同等物等の血液産物を含む。環境的試料は、表面物質、土壌、泥、汚泥、生物膜、水、結晶、および産業試料等の環境的物質を含む。しかしながら、そのような実施例は、本発明に適用可能な試料タイプを制限するものとして解釈されるべきではない。

【００４５】

用語「標的」は、核酸捕捉、検出、または分析方法の参照において使用される際、概して、ある特徴、例えば、標的核酸を含有すると疑われる試料中において、例えば、検出または分析されるべきヌクレオチドの特定の配列を有する核酸を指す。いくつかの実施形態において、標的は、メチル化状態を決定するのに望ましい、特定の配列を有する核酸である。ポリメラーゼ連鎖反応に関して使用される際、「標的」は、概して、ポリメラーゼ連鎖反応に使用されるプライマーによって結合される核酸の領域を指す。したがって、「標的」は、試料中に存在し得る他の核酸配列と区別しようとするものである。「セグメント」は、標的配列内の核酸の領域として定義される。用語「試料鋳型」は、標的の存在について分析される試料を起源とする核酸を指す。

【００４６】

本明細書に使用される際、用語「遺伝子座」は、遺伝子、または染色体もしくはＲＮＡ分子上の任意の他の特徴的な配列等、定義された核酸の領域またはセグメント内のＣｐＧジヌクレオチドにおける、例えば、突然変異、多型性、またはＣ残基の特定の位置を指す。遺伝子座は、いかなる特定の寸法または長さにも制限されず、染色体の一部、遺伝子、機能的遺伝要素、または単一のヌクレオチドもしくは塩基対を指し得る。メチル化され得るＣｐＧ部位に関して本明細書に使用される際、遺伝子座は、ＣｐＧジヌクレオチド中のＣ残基を指す。

【００４７】

本明細書に使用される際、「収集液体」は、試料が採取された標本の代表的試料として、その完全性を保存、安定化、および別様に維持するために、試料を定置するための液体である。収集液体としての使用を見出す組成物のタイプを制限するわけではないが、収集液体の実施例は、随意に、アセトニトリル等の防腐剤および有機溶媒を含む、水性緩衝剤である。

【００４８】

本明細書に使用される際、「捕捉試薬」は、検体（例えば、標的）に結合可能な任意の薬剤を指す。好ましくは、「捕捉試薬」は、例えば、任意の他の部分より検体に対して高い結合親和性および／または特異性を有する、検体に特異的に結合可能な任意の薬剤を指す。細胞、細胞器官、無機分子、有機分子、およびその混合物または複合物等の任意の部分が、検体に対して必要結合親和性および／または特異性を有する場合、捕捉試薬として使用することができる。捕捉試薬は、ペプチド、タンパク質、例えば、抗体または受容体、オリゴヌクレオチド、核酸、ビタミン、オリゴ糖、炭水化物、脂質、小分子、またはその複合物であることができる。核酸、例えば、オリゴヌクレオチドを含む、捕捉試薬は、配列特異的ハイブリダイゼーション（例えば、従来のワトソン・クリック塩基対の形成を通して）によって、または他の結合相互作用を通して、核酸標的を捕捉してもよい。捕捉

オリゴヌクレオチドが、標的核酸にハイブリダイズすると、ハイブリダイゼーションは、オリゴヌクレオチドの一部または完全オリゴヌクレオチド配列に関与し得、オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の一部または全部に結合し得る。

【００４９】

本明細書に使用される際、「ＰＶＰ」は、モノマーＮ－ビニルピロリドンから成る水溶性ポリマーである、ポリビニルピロリドンを指す。用語ＰＶＰは、本明細書では、当技術分野においてポリビニルポリピロリドン（ＰＶＰＰ）としても公知であり得る、ＰＶＰの調製を含む、架橋結合重合の種々の状態におけるＰＶＰを指すために使用される。

【００５０】

本明細書に使用される際、「磁石」は、磁場を産生する物質または物体である。磁石は、永久磁石または電磁石であり得る。

【００５１】

核酸の文脈における用語「増幅する」または「増幅」は、典型的には、少量のポリヌクレオチド（例えば、単一ポリヌクレオチド分子）から開始する、ポリヌクレオチドの複数のコピーまたはポリヌクレオチドの一部の産生を指し、増幅産物またはアンプリコンは、概して、検出可能である。ポリヌクレオチドの増幅は、種々の化学および酵素プロセスを包含する。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）またはリガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ；例えば、米国特許第５，４９４，８１０号参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）の間、標的または鋳型ＤＮＡ分子の１つまたは少数のコピーからの複数のＤＮＡコピーの発生は、増幅の形態である。増幅の付加的タイプとして、対立遺伝子特異的ＰＣＲ（例えば、米国特許第５，６３９，６１１号参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、アセンブリＰＣＲ（例えば、米国特許第５，９６５，４０８号参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、ヘリカーゼ依存性増幅（例えば、米国特許第７，６６２，５９４号参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、ホットスタートＰＣＲ（例えば、米国特許第５，７７３，２５８号および第５，３３８，６７１号参照；それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、配列間特異的ＰＣＲ、インバースＰＣＲ（例えば、Ｔｒｉｇｌｉａ，ｅｔ ａｌｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１６：８１８６参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、ライゲーション介在ＰＣＲ（例えば、Ｇｕｉｌｆｏｙｌｅ，Ｒ．ｅｔ ａｌｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２５：１８５４－１８５８（１９９７）；米国特許第５，５０８，１６９号参照；それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、メチル化特異的ＰＣＲ（例えば、Ｈｅｒｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９６）ＰＮＡＳ９３（１３）９８２１－９８２６参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、ミニプライマーＰＣＲ、多重化ライゲーション依存性プローブ増幅（例えば、Ｓｃｈｏｕｔｅｎ，ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３０（１２）：ｅ５７参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、多重化ＰＣＲ（例えば、Ｃｈａｍｂｅｒｌａｉｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １６（２３）１１１４１－１１１５６；Ｂａｌｌａｂｉｏ，ｅｔ ａｌ．，（１９９０）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ８４（６）５７１－５７３；Ｈａｙｄｅｎ，ｅｔ ａｌ．，（２００８）ＢＭＣＧｅｎｅｔｉｃｓ９：８０参照；それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、ネステッドＰＣＲ、オーバーラップ・エクステンションＰＣＲ（例えば、Ｈｉｇｕｃｈｉ，ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ１６（１５）７３５１－７３６７参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、リアルタイムＰＣＲ（例えば、Ｈｉｇｕｃｈｉ，ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１０：４１３－４１７；Ｈｉｇｕｃｈｉ，ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１１：１０２６－１０３０参照；それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、逆転写ＰＣＲ（例えば、Ｂｕｓｔｉｎ，　Ｓ．Ａ．（２０００）Ｊ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅ

ｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ２５：１６９－１９３参照；参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）、固相ＰＣＲ、熱非対称インタレースＰＣＲ、およびタッチダウンＰＣＲ（例えば、Ｄｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ（１９９１）１９（１４）４００８；Ｒｏｕｘ，Ｋ．（１９９４）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１６（５）８１２－８１４；Ｈｅｃｋｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２０（３）４７８－４８５参照；それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）が挙げられるが、それらに制限されない。ポリヌクレオチド増幅もまた、デジタルＰＣＲ（例えば、Ｋａｌｉｎｉｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２５；１９９９－２００４、（１９９７）；Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎ　ａｎｄ　Ｋｉｎｚｌｅｒ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９６；９２３６－４１，（１９９９）；国際特許公報第ＷＯ０５０２３０９１Ａ２号；米国特許出願公報第２００７０２０２５２５号参照；それぞれ、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）を使用して達成することができる。

【００５２】

用語「ポリメラーゼ連鎖反応」（「ＰＣＲ」）は、クローニングまたは精製を伴わずに、ゲノムあるいは他のＤＮＡまたはＲＮＡの混合物中の標的配列のセグメントの濃度を増加させるための方法を説明する、Ｋ．Ｂ．Ｍｕｌｌｉｓ米国特許第４，６８３，１９５号、第４，６８３，２０２号、および第４，９６５，１８８号の方法を指す。標的配列を増幅させるための本プロセスは、大量の過剰な２本のオリゴヌクレオチドプライマーを所望の標的配列を含有するＤＮＡ混合物への導入と、その後のＤＮＡポリメラーゼの存在下、熱的サイクルの正確な繰り返しから成る。この２本のプライマーは二重鎖の標的配列、その個別の鎖に相補的である。増幅をもたらすために、混合物は、変性され、プライマーは、次いで、標的分子内のその相補的配列にアニーリングされる。アニーリング後、プライマーは、新しい相補鎖の対を形成するためポリメラーゼにより伸長される。変性、プライマーのアニーリング、およびポリメラーゼによる伸長のステップは、多数回（すなわち、変性、アニーリング、および伸長が１「サイクル」を形成する；多数の「サイクル」が存在し得る）繰り返され、高濃度の所望の標的配列の増幅されたセグメントを得ることができる。所望の標的配列の増幅されたセグメントの長さは、相互に対するプライマーの相対的位置によって決定され、したがって、この長さは、制御可能パラメータである。プロセスの繰り返し態様によって、本方法は、「ポリメラーゼ連鎖反応」（「ＰＣＲ」）と称される。標的配列の所望の増幅されたセグメントは、混合物中で優性配列（濃度の観点から）となるため、これらは、「増幅ＰＣＲ」と呼ばれ、「ＰＣＲ産物」または「アンプリコン」である。当業者は、用語「ＰＣＲ」が、例えば、リアルタイムＰＣＲ、ネステッドＰＣＲ、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、単一プライマー、および任意プライムＰＣＲ等を使用する、元々説明される方法の多くの変形例を包含することを理解するであろう。

【００５３】

本明細書に使用される際、用語「核酸検出アッセイ」は、着目核酸のヌクレオチド組成を判定する任意の方法を指す。核酸検出アッセイとして、ＤＮＡシーケンシング法、プローブハイブリダイゼーション法、構造特異的切断アッセイ（例えば、ＩＮＶＡＤＥＲ　ａｓｓａｙ，（Ｈｏｌｏｇｉｃ，Ｉｎｃ．）、例えば、米国特許第５，８４６，７１７号、第５，９８５，５５７号、第５，９９４，０６９号、第６，００１，５６７号、第６，０９０，５４３号、および第６，８７２，８１６号；Ｌｙａｍｉｃｈｅｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１７：２９２（１９９９）、Ｈａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，ＵＳＡ、９７：８２７２（２０００）、および米国特許第ＵＳ２００９／０２５３１４２号に説明されており、それぞれ、あらゆる目的のために、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；酵素ミスマッチ切断法（例えば、Ｖａｒｉａｇｅｎｉｃｓ、米国特許第６，１１０，６８４号、第５，９５８，６９２号、第５，８５１，７７０号、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；前述のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）；分枝ハイブリダイゼーション法（例えば、Ｃｈｉｒｏｎ、米国特

許第５，８４９，４８１号、第５，７１０，２６４号、第５，１２４，２４６号、および第５，６２４，８０２号、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；ローリングサークル複製（例えば、米国特許第６，２１０，８８４号、第６，１８３，９６０号、および第６，２３５，５０２号、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；ＮＡＳＢＡ（例えば、米国特許第５，４０９，８１８号、参照することによって本明細書に全体として組み込まれる）；分子ビーコン技術（例えば、米国特許第６，１５０，０９７号、参照することによって本明細書に全体として組み込まれる）；Ｅセンサ技術（Ｍｏｔｏｒｏｌａ、米国特許第６，２４８，２２９号、第６，２２１，５８３号、第６，０１３，１７０号、および第６，０６３，５７３号、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；サイクリングプローブ技術（例えば、米国特許第５，４０３，７１１号、第５，０１１，７６９号、および第５，６６０，９８８号、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；Ｄａｄｅ　Ｂｅｈｒｉｎｇシグナル増幅法（例えば、米国特許第６，１２１，００１号、第６，１１０，６７７号、第５，９１４，２３０号、第５，８８２，８６７号、および第５，７９２，６１４号、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）；リガーゼ連鎖反応（例えば、Ｂａｒａｎａｙ　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ８８，１８９－９３（１９９１））；およびサンドイッチハイブリダイゼーション法（例えば、米国特許第５，２８８，６０９号、参照することによって本明細書に全体として組み込まれる）が挙げられるが、それらに限定されない。

【００５４】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、増幅され（例えば、ＰＣＲによって）、増幅された核酸が、侵入型切断アッセイを使用して、同時に検出される。増幅アッセイと組み合わせて、検出アッセイ（例えば、侵入型切断アッセイ）を行うために構成されるアッセイは、米国特許公報第ＵＳ２００９０２５３１４２Ａｌ号（出願第１２／４０４，２４０号）に説明されており、参照することによってあらゆる目的のために、全体として本明細書に組み込まれる。付加的増幅と侵入型切断検出構成は、ＱｕＡＲＴＳ法と称され、米国特許出願第１２／９４６，７３７号、第１２／９４６，７４５号、および第１２／９４６，７５２号に説明され、あらゆる目的のために、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる。

【００５５】

用語「侵入型切断構造」は、本明細書に使用される際、ｉ）標的核酸、ｉｉ）上流核酸（例えば、ＩＮＶＡＤＥＲオリゴヌクレオチド）、およびｉｉｉ）下流核酸（例えば、プローブ）を含み、上流および下流核酸は、標的核酸の連続領域にアニールし、上流核酸の３′位と下流核酸と標的核酸との間に形成される二本鎖との間に重複が形成される、切断構造を指す。重複は、上流核酸の重複塩基（複数可）が、標的核酸と相補的であるかどうかにかかわらず、かつそれらの塩基が、天然塩基または非天然塩基であるかどうかにかかわらず、上流および下流核酸からの１つ以上の塩基が、標的核酸塩基に対して、同一の位置を占有する場合に生じる。いくつかの実施形態では、下流二本鎖と重複する上流核酸の３′位は、例えば、開示される、例えば、米国特許第６，０９０，５４３号に開示され、参照することによって全体として本明細書に組み込まれるように、芳香環構造等の非塩基化学部分である。いくつかの実施形態では、核酸のうちの１つ以上は、例えば、核酸ステムループなどの共有結合を通して、または非核酸化学結合（例えば、多炭素鎖）を通して、相互に付着し得る。

【００５６】

本明細書に使用される際、ポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を参照して使用される用語「相補的」または「相補性」は、塩基対合則によって関連するポリヌクレオチドを指す。例えば、配列「５′－Ａ－Ｇ－Ｔ－３′」は、配列「３′－Ｔ－Ｃ－Ａ－５′」に相補的である。相補性は、「部分的」であり得、核酸塩基のいくつかのみ、塩基対合則に従って一致する。または、核酸間に「完全」または「全体的」相補性が存在してもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率およ

び強度に有意な影響を有する。これは、特に、増幅反応ならびに核酸間の結合に依存する検出方法に重要である。

【００５７】

本明細書に使用される際、用語「プライマー」は、精製された制限消化物におけるように、自然に発生する、または合成的に産生されるかにかかわらず、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（例えば、ヌクレオチドおよび生体触媒（例えば、ＤＮＡポリメラーゼまたは同等物）等の誘導剤の存在下）に置かれた場合に合成の開始点として作用することができる、オリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、典型的には、増幅における最大効率のために、一本鎖であるが、代替として、部分的または完全に、二本鎖であってもよい。鋳型核酸にハイブリダイズするプライマーの部分は、誘導剤の存在下で伸長産物の合成をプライミングするために十分に長い。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー源、および方法の使用を含む、多くの要因に依存するであろう。プライマーは、標識、タグ、捕捉部分等を含んでもよい。

【００５８】

本明細書に使用される際、用語「核酸分子」は、ＤＮＡまたはＲＮＡを含むが、それらに制限されない、任意の核酸含有分子を指す。本用語は、４アセチルシトシン、８－ヒドロキシ－Ｎ６－メチルアデノシン、アジリジニルサイトシン、プソイドイソシトシン、５－（カルボキシヒドロキシル－メチル）ウラシル、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウラシル、５－カルボキシメチル－アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルアデニン、１－メチルプソイド－ウラシル、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチル－グアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチル－シトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－メチルアデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノエチルウラシル、５－メトキシ－アミノ－メチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン、５′－メトキシカルボニルメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、Ｎ－ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、および２，６－ジアミノプリンを含むが、これに限定されない、ＤＮＡおよびＲＮＡの任意の既知の塩基類似体を含む配列を含む、配列を包含する。

【００５９】

本明細書に使用される際、用語「核酸塩基」は、「ヌクレオチド」、「デオキシヌクレオチド」、「ヌクレオチド残基」、「デオキシヌクレオチド残基」、「ヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）」、またはデオキシヌクレオチド三リン酸（ｄＮＴＰ）を含む、当技術分野において使用する他の用語と同意語である。

【００６０】

「オリゴヌクレオチド」は、少なくとも２つの核酸モノマー単位（例えば、ヌクレオチド）、典型的には、３つを超えるモノマー単位、より典型的には、１０を超えるモノマー単位を含む、核酸を指す。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは、概して、オリゴヌクレオチドの最終機能または使用を含む、種々の要因に依存する。さらに例証するために、オリゴヌクレオチドは、典型的には、２００未満の残基長（例えば、１５～１００）であるが、しかしながら、本明細書に使用される際、本用語はまた、より長いポリヌクレオチド鎖を包含することを意図する。オリゴヌクレオチドは、多くの場合、その長さによって言及される。例えば、２４残基オリゴヌクレオチドは、「２４量体」と称される。典型的には、ヌクレオシドモノマーは、関連付けられた対イオン、そのような対イオンが存在する場合、例えば、$H^+$、$NH_4^+$、$Na^+$、および同等物を含む、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ホスホロアミデート、および同等物を含む、リン酸

ジエステル結合またはその類似体によって結合される。さらに、オリゴヌクレオチドは、典型的には、一本鎖である。オリゴヌクレオチドは、随意に、制限されないが、既存または天然配列の単離、ＤＮＡ複製または増幅、逆転写、適切な配列のクローニングおよび制限消化、あるいはＮａｒａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：９０－９９のホスホトリエステル法；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：１０９－１５１のホスホジエステル法；Ｂｅａｕｃａｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．２２：１８５９－１８６２のジエチルホスホロアミダート法；Ｍａｔｔｅｕｃｃｉ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．１０３：３１８５－３１９１のトリエステル法；自動化合成法；またはＣａｒｕｔｈｅｒｓ ｅｔ ａｌ．に１９８４年７月３日発行の米国特許第４，４５８，０６６号「ＰＲＯＣＥＳＳ ＦＯＲ ＰＲＥＰＡＲＩＮＧ ＰＯＬＹＮＵＣＬＥＯＴＩＤＥＳ」の固体支持法、もしくは当業者に公知の他の方法等の方法による直接化学合成を含む、任意の好適な方法によって調製される。これらの参考文献は全て、参照することによって組み込まれる。

【００６１】

バイオポリマーの「配列」は、バイオポリマー中のモノマー単位（例えば、ヌクレオチド、アミノ酸等）の順序および同定を指す。核酸の配列（例えば、塩基配列）は、典型的には、５′から３′方向に読まれる。

【００６２】

用語「野生型」は、自然に発生する源から単離された遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する、遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、ある集団において最も頻繁に観察され、したがって、随意に、「通常」または「野生型」形態の遺伝子に設計される。対照的に、用語「修飾」、「突然変異」、および「変形」は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較して、配列または機能特性における修飾（すなわち、変化した特徴）を示す遺伝子または遺伝子産物を指す。自然発生突然変異体を単離することが可能であり、つまり、これらが、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較して、変化した特徴を有するという事実により同定されることに留意されたい。

【００６３】

本明細書に使用される際、用語「遺伝子」は、ポリペプチド、前駆体、またはＲＮＡ（例えば、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ）の産生に必要なコーディング配列を備える、核酸（例えば、ＤＮＡ）配列を指す。ポリペプチドは、全長または断片ポリペプチドの所望の活性または機能特性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル変換、免疫原性等）が留保される限り、全長コーディング配列またはコーディング配列の任意の部分によってコードされることができる。本用語はまた、構造遺伝子のコーディング領域と、いずれかの端部において、遺伝子が全長ｍＲＮＡの長さに対応するように、約１ｋｂ以上の距離にコーディング領域の５′および３′端の両方に隣接して位置する配列とを包含する。コーディング領域の５′に位置し、ｍＲＮＡ上に存在する配列は、５′非翻訳配列と称される。コーディング領域の３′または下流に位置し、ｍＲＮＡ上に存在する配列は、３′非翻訳配列と称される。用語「遺伝子」は、遺伝子のｃＤＮＡおよびゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と称される非コーディング配列によって中断されるコーティング領域を含有する。イントロンは、核ＲＮＡ（例えば、ｈｎＲＮＡ）に転写される遺伝子のセグメントである。イントロンは、調節要素（例えば、エンハンサー）を含有してもよい。イントロンは、核または一次転写産物から除去または「スプライシング除去」される。イントロンは、したがって、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）転写物中には存在しない。ｍＲＮＡは、翻訳中に機能し、新生ポリペプチド中のアミノ酸の配列または順序を規定する。

【００６４】

イントロンを含有することに加え、遺伝子のゲノム形態はまた、ＲＮＡ転写物中に存在する配列の５′および３′端の両方に位置する配列を含んでもよい。これらの配列は、「隣接」配列または領域と称される（これらの隣接配列は、ｍＲＮＡ転写物上に存在する非

翻訳配列の５′または３′に位置する）。５′隣接領域は、遺伝子の転写を制御またはそれに影響を及ぼす、プロモーターおよびエンハンサー等の調節配列を含有してもよい。３′隣接領域は、転写の終了、転写後の切断、およびポリアデニル化を指示する配列を含有してもよい。

【００６５】

本明細書に使用される際、用語「キット」は、物質を送達するための任意の送達システムを指す。核酸精製システムおよび反応アッセイの文脈では、そのような送達システムは、ある場所から別の場所への試薬とデバイス（例えば、適切なコンテナ内の阻害物質吸着剤、粒子、変性剤、オリゴヌクレオチド、スピンフィルタ等）および／または補助材（例えば、緩衝剤、手順を行うための説明書等）の保管、輸送、または送達を可能にする、システムを含む。例えば、キットは、関連反応試薬および／または補助材を含有する、１つ以上の封入体（例えば、箱）を含む。本明細書に使用される際、用語「細分化キット」は、それぞれ、全体的キット構成要素の一部を含有する、２つ以上の別個のコンテナを備える、送達システムを指す。コンテナは、ともにまたは別個に、意図された受領者に送達されてもよい。例えば、第１のコンテナは、試料収集および緩衝剤のための材料を含有してもよい一方、第２のコンテナは、捕捉オリゴヌクレオチドおよび変性剤を含有する。用語「細分化キット」は、連邦食品・医薬品・化粧品の第５２０（ｅ）章に規制される、検体特異的試薬（ＡＳＲ）を含有するキットを包含することが意図されるが、それらに限定されない。実際、全体的キット構成要素の一部をそれぞれ含有する、２つ以上の別個のコンテナを備える任意の送達システムは、用語「細分化キット」に含まれる。対照的に、「組み合わせキット」は、単一コンテナ（例えば、所望の構成要素の各単一箱筐体）内に、反応アッセイの構成要素の全てを含有する送達システムを指す。用語「キット」は、細分化および組み合わせキットの両方を含む。

【００６６】

用語「システム」は、本明細書に使用される際、特定の目的のために使用するための物品の収集を指す。いくつかの実施形態では、物品は、例えば、物品、紙、または記録可能媒体（例えば、ディスケット、ＣＤ、フラッシュドライブ等）上に供給される情報として、使用説明書を備える。いくつかの実施形態では、使用説明書は、ユーザをオンラインの場所、例えば、ウェブサイトに誘導する。

【００６７】

本明細書に使用される際、用語「情報」は、事実またはデータの任意の収集を指す。インターネットを含むが、それらに制限されない、コンピュータシステム（複数可）を使用して記憶または処理された情報を参照する際、本用語は、任意の形式（例えば、アナログ、デジタル、光学等）で記憶された任意のデータを指す。本明細書に使用される際、用語「対象に関連する情報」は、対象（例えば、ヒト、植物、または動物）に関する事実またはデータを指す。用語「ゲノム情報」は、制限されないが、核酸配列、遺伝子、メチル化の割合、対立遺伝子頻度、ＲＮＡ発現レベル、タンパク質発現、遺伝子型に相関する表現型等を含む、ゲノムに関する情報を指す。「対立遺伝子頻度情報」は、制限されないが、対立遺伝子同定、対立遺伝子の存在と対象（例えば、ヒト対象）の特性との間の統計的相関、個人または集団における対立遺伝子の存在または不在、１つ以上の特定の特性を有する個人に存在する対立遺伝子の可能性の割合等を含む、対立遺伝子頻度に関する事実またはデータを指す。

本技術の実施形態

本明細書の本開示は、ある例証される実施形態を参照するが、これらの実施形態は、制限としてではなく、一例として提示されることを理解されたい。

１．方法概略

本明細書に提供されるのは、ＤＮＡ、例えば、排泄物試料から単離するための方法である。図１に要約されるように、本プロセスは、試料（例えば、排泄物試料）を好適な緩衝剤中で均質化することと、上清をホモジネートから調製することとを含む。上清は、組成物（例えば、ポリビニルポリピロリドン（ＰＶＰＰ）等の架橋結合ポリビニルピロリドン

（ＰＶＰ））で処理され、阻害物質を除去し、浄化上清を産生する。浄化上清中のＤＮＡは、例えば、チオシアン酸グアニジン（ＧＴＣ）を添加することによって、および／または試料を加熱することによって、変性される。次いで、標的捕捉試薬、例えば、標的に相補的オリゴヌクレオチドが結合される、磁気ビーズが、添加され、溶液が、標的と捕捉試薬の会合（例えば、ハイブリダイゼーションによって）を助長し、標的、すなわち、捕捉試薬複合物を産生する条件（例えば、周囲温度で１時間）下、インキュベートされる。標的、すなわち、捕捉試薬複合物（例えば、磁場の印加によって）を単離および除去後、結果として生じる溶液は、再び、加熱され、浄化上清中の残りのＤＮＡを変性させ、別の標的捕捉試薬が、添加され、別の標的を単離することができる。本プロセスは、例えば、少なくとも４回、繰り返され、アッセイのための必要に応じた数の標的を単離することができる（例えば、連続または順次抽出）。単離された標的、すなわち、各捕捉および単離ステップからの捕捉試薬複合物は、洗浄され、標的ＤＮＡが、下流分析に好適な少量の緩衝剤を使用して溶出される。

２．阻害物質除去

試料は、核酸を分解する、または酵素反応を阻害する、不純物を含有する、物質の試料であり得る。特に、そのような不純物は、核酸、例えば、制限エンドヌクレアーゼ、逆転写酵素、核酸ポリメラーゼ、リガーゼ等の核と相互作用する酵素、特に、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、ＬＣＲ（リガーゼ連鎖反応）、ＴＭＡ（転写媒介増幅）、ＮＡＳＢＡ（核酸塩基特異的増幅）、３ＳＲ（自立配列複製）、および同等物のために使用される酵素の触媒活性を阻害する。

２．１ＰＶＰ

いくつかの実施形態では、試料中の阻害物質は、ポリビニルピロリドンによる処理によって除去される（また、例えば、米国特許出願第６１／４８５，３３８号参照、参照することによって本明細書に組み込まれる）。ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）は、モノマーＮ－ビニルピロリドン（図２参照）から成る水溶性ポリマーである。ポリビニルポリピロリドン（ＰＶＰＰ）は、高度に架橋結合されたＰＶＰの修飾である。架橋結合の程度は、可変であって、ＰＶＰとＰＶＰＰとの間の分裂を確立する規定の閾値は存在しない。故に、用語ＰＶＰは、本明細書では、当技術分野においてＰＶＰＰとしても公知であり得る、ＰＶＰの調製を含む、架橋結合された重合の種々の状態におけるＰＶＰを指すために使用される。しかしながら、重要な特性は、架橋結合の程度が増加するにつれて、ポリマーが、水にますます不溶性になることである。架橋結合された形態は、水を吸収し、ポリマーを膨張させる。ＰＶＰおよびＰＶＰＰの合成および物理的特性は、当技術分野において公知である（例えば、Ｈａａｆ，Ｓａｎｎｅｒ，＆Ｓｔｒａｕｂ．Ｐｏｌｙｍｅｒｓ ｏｆ Ｎ－ｖｉｎｙｌｐｙｒｒｏｌｉｄｏｎｅ：ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ ｕｓｅｓ．Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｊ．１７（１）：１４３（１９８５）参照）。

【００６８】

ＰＶＰは、血液血漿増量剤として、多くの医薬品錠剤中の結合剤として、スティックのりおよびホットメルト中の接着剤として、電池、セラミック、繊維ガラス、インク、インクジェット紙のため、および化学機械的平坦化プロセスにおける添加剤として、溶液重合のための乳化剤および崩壊剤として、フォトレジストとして、透析および水精製フィルタ等の膜の生産のため、歯漂白ゲル中の増粘剤として等の使用を含む、多くの技術的用途において使用されている。

【００６９】

ＰＶＰはまた、不純物の結合およびそれらの溶液からの除去において、特に、ポリフェノールを除去するためのワイン醸造およびビール醸造において、その使用が見出されている（例えば、Ｒｅｄｍａｎｊｉ，Ｇｏｐａｌ，＆Ｍｏｌａ．Ａ ｎｏｖｅｌ ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｅｅｒ ｗｉｔｈ Ｐｏｌｙｃｌａｒ Ｂｒｅｗｂｒｉｔｅ．ＭＢＡＡＴＱ３９（１）：２４（２００２）参照）。ＰＶＰの可溶性および不溶性形態の使用は、例えば、フェノールを中和するための手段として、生物学的試料の処理に関連

して説明されている（例えば、米国特許第７，００５，２６６号；Ｓｈａｍｅｓ，ｅｔａｌ．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｗｉｄｅｓｐｒｅａｄ Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｈｅｐａｔｉｃｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｆｅｃｅｓ ｉｎ ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌ ｍｏｕｓｅ ｃｏｌｏｎｉｅｓ ｂｙ ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ ＰＣＲ ａｓｓａｙ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３３（１１）：２９６８（１９９５）；Ｍｏｒｇａｎ ｅｔ ａｌ．Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ＰＣＲ ａｎｄ ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｆｅｃａｌ ｓｐｅｃｉｍｅｎｓ：Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３６（４）：９９５（１９９８）参照）。

【００７０】

ＰＶＰは、例えば、粉末、スラリー、懸濁液、顆粒、および同等物として、処理されるべき試料中へのその導入を可能にする形態で提供される。本明細書に提供される技術のいくつかの実施形態では、ＰＶＰは、すぐに使える形態で事前に測定されて提供される。例えば、いくつかの実施形態では、ＰＶＰは、試料を処理するために適切なＰＶＰの質量を含む錠剤に圧入される。異なるサイズおよび形状の錠剤が、試料の異なる体積およびタイプのために提供される。不活性結合剤、充填剤、および他の組成物が、錠剤に添加され、物理的、熱的、化学的、および生物学的安定性を提供する、あるいは試料内の拡散改善または制御放出等の他の所望の特性を提供してもよい。

【００７１】

架橋結合の程度およびＰＶＰ粒子のサイズは両方とも、結果として生じる核酸調製の下流アッセイに影響を及ぼすパラメータである。例えば、可溶性ＰＶＰは、いくつかの下流アッセイを阻害することが見出されている。故に、本方法は、下流処理ステップ（例えば、遠心分離および／またはスピン濾過）によるＰＶＰの適正な除去を可能にするために十分に不溶性（例えば、十分に架橋結合された）である、ＰＶＰの使用から利益を享受する。加えて、架橋結合されたＰＶＰ粒子が、小さすぎると、それらがスピンカラム内にぎっしりと充填され、スピンカラム収集空間内への試料の流出物流を制限する。例えば、本技術のいくつかの実施形態の開発の間に行われた実験は、平均粒子サイズ１００～１３０マイクロメートルを有するＰＶＰが、満足のゆく結果をもたらした一方、平均粒子サイズ３０～５０マイクロメートルを有するＰＶＰは、流動および濾過を制限することを実証した。さらなる実験は、他のサイズおよび溶解度も、本方法の実施形態のために適切であり得ることを示し得る。

２．２スピンフィルタ

本明細書に提供される技術は、ＰＶＰに結合された阻害物質を除去するように処理されたＰＶＰ処理試料を濾過するために、例えば、米国特許出願第６１／４８５，２１４号に提供されるようなスピンフィルタの使用を包含する。前述のように、ＰＶＰ処理方法の開発の間、実験は、底部端にフィルタフリットを有する従来のスピンカラムが、いくつかの条件下、閉塞することを実証した。故に、本技術のいくつかの実施形態は、閉塞防止スピンフィルタの使用を含む。図３～８は、組立図および分解図における、収集管と関連付けられた閉塞防止スピンフィルタの種々の構成を描写する。閉塞防止フィルタは、底部端が、試料からの残渣で閉塞される場合、試料が、本体壁を通して濾過されることを可能にするように設計される。

【００７２】

本明細書に提供される技術と併用するために適切なスピンフィルタは、概して、試料に対して不活性である材料から作製される。すなわち、材料は、後続アッセイに影響を及ぼす（例えば、試料の劣化を生じさせる、その分解を生じさせる、または同等物）ように、それを濾過する以外、試料と反応しない、あるいは別様にそれを汚染または修飾させない。そのような材料の実施例は、ポリエチレンである。他の好適な材料は、例えば、ナイロン、酢酸セルロース、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ、また、Ｔｅｆｌｏｎとしても知られる）、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）、ポリエステル、およびポリエーテ

ルスルホンである。動作圧力、濾過されるべき組成物の化学および物理的特性、試料から除去するための実体のサイズ、および物質の機械的特性（例えば、濾過用途のために要求される速度における遠心分離に耐える能力）は、適切なスピンフィルタを選択するときに検討される要因である。

【００７３】

フィルタは、異なる濾過用途に適切な種々の細孔径を有するように製造される。例えば、０．２マイクロメートルの細孔径を伴うフィルタは、典型的には、大部分の細菌を除去することが認められているが、より小さい細孔径が、ウイルスおよび細菌胞子を除去するために要求される。より大きな微粒子を除去するためには、より大きな細孔径が、適正である。例えば、本明細書に提供される技術の一態様は、２０マイクロメートル細孔径を有するスピンフィルタを使用するが、濾過用途に使用を見出す他の細孔径は、０．２２、０．４５、１０、２０、３０、および４５マイクロメートルである。故に、より大きなおよびより小さな細孔径、ならびにこれらの特定の値によって境界される間隔内の中間の細孔径が、想定される。いくつかの濾過用途に関して、フィルタは、フィルタによって留保される分子の平均分子量によって特徴付けられる。例えば、５，０００Ｄａ分画分子量（ＭＷＣＯ）を伴うフィルタは、少なくとも、分子量約５，０００Ｄａを有する分子および複合物を留保するように設計される。フィルタは、ＭＷＣＯ１０，０００Ｄａ、３０，０００Ｄａ、５０，０００Ｄａ、１００，０００Ｄａ、および濾過タスクのために要求される他の限界を提供することができる。動作圧力および試料から除去するための実体のサイズは、細孔径またはカットオフ値を選択するときに考慮すべき要因である。

３．核酸捕捉

標的核酸は、配列特異的標的捕捉試薬、例えば、標的に相補的オリゴヌクレオチドが結合される、磁気ビーズを使用して捕捉される。捕捉試薬を添加後、溶液は、標的と捕捉試薬の会合（例えば、ハイブリダイゼーションによって）を助長し、標的、すなわち、捕捉試薬複合物を産生する条件下、インキュベートされる。標的、すなわち、捕捉試薬複合物の単離および除去後（例えば、磁場の印加によって）、結果として生じる溶液は、再び、加熱され、浄化上清中の残りのＤＮＡを変性させ、別の標的捕捉試薬が、添加され、別の標的を単離することができる（例えば、ハイブリダイゼーションおよび磁場の印加によって）。本プロセスは、例えば、少なくとも４回、繰り返され、アッセイの必要に応じた数の標的を単離することができる（例えば、例えば、米国特許出願第６１／４８５，３８６号によって説明され、参照することによって本明細書に組み込まれるような連続または順次単離プロセス）。また、２つ以上の標的が、複数の捕捉配列を含む捕捉試薬を使用することによって、捕捉ステップにおいて単離することができる。

３．１捕捉試薬

一態様では、本明細書に提供される方法は、捕捉試薬の使用に関連する。そのような試薬は、優先的に（例えば、特異的かつ選択的に）、単離および精製されるべき特定の標的と相互作用する、分子、部分、物質、または組成物である。検体標的に対して所望の結合親和性および／または特異性を有する任意の捕捉試薬が、本技術において使用される。例えば、いくつかの実施形態では、捕捉試薬は、高分子、例えば、ペプチド、タンパク質（例えば、抗体または受容体）、オリゴヌクレオチド、核酸（例えば、標的核酸とハイブリダイズ可能な核酸）、ビタミン、オリゴ糖、炭水化物、脂質、または小分子、あるいはその複合物である。例証的かつ非制限的実施例として、アビジン標的捕捉試薬が、ビオチン部分を含む標的を単離および精製するために使用されてもよく、抗体が、適切な抗原またはエピトープを含む標的を単離および精製するために使用されてもよく、オリゴヌクレオチドが、相補的オリゴヌクレオチドを単離および精製するために使用されてもよい（例えば、ポリ－ｄＴオリゴヌクレオチドが、ポリＡ末端を含む標的を単離および精製するために使用されてもよい）。

【００７４】

標的に結合または特異的に結合可能である、一本鎖、二本鎖、および三本鎖核酸を含む、任意の核酸が、本デバイスにおける捕捉試薬として使用される。そのような核酸の実施

例は、Ａ－、Ｂ－、またはＺ－型ＤＮＡ等のＤＮＡ、ならびにｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、およびｒＲＮＡ等のＲＮＡ、アプタマー、ペプチド核酸、ならびに糖、リン酸塩、またはヌクレオシド塩基への他の修飾等を含む。したがって、標的を捕捉するための多くの戦略が存在し、故に、多くのタイプの捕捉試薬が、当業者に公知である。標的核酸が捕捉され得る手段を制限するわけではないが、本明細書に提供される技術の実施形態は、標的に相補的であって、したがって、標的核酸に特異的かつ選択的にハイブリダイズすることによって、標的を捕捉する、オリゴヌクレオチドの使用を含む。

【００７５】

加えて、標的捕捉試薬は、捕捉試薬を局在化、濃縮、凝集等するための機能性を備え、したがって、例えば、標的、すなわち、捕捉試薬複合物が、形成されるとき、捕捉試薬に捕捉（例えば、結合、ハイブリダイズ等）されると、標的を単離および精製するための方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、標的（例えば、オリゴヌクレオチド）と相互作用する標的捕捉試薬の一部は、ユーザによる巨視的尺度での操作を可能にする、固体支持体（例えば、ビーズ、表面、樹脂、カラム）に結合される。多くの場合、固体支持体は、標的、すなわち、捕捉試薬複合物を異種溶液から単離および精製するための機械的手段の使用を可能にする。例えば、ビーズに結合されると、分離は、ビーズを異種溶液から除去することによって、例えば、物理的移動によって、達成される。ビーズが、磁気または常磁性である実施形態では、磁場は、捕捉試薬（したがって、標的）の異種溶液からの物理的分離を達成するために使用される。標的を単離するために使用される磁気ビーズは、当技術分野において、例えば、米国特許第５，６４８，１２４号および欧州特許出願第８７３０９３０８号に説明され、あらゆる目的のために、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる。

【００７６】

いくつかの実施形態では、標的（例えば、オリゴヌクレオチド）と相互作用する捕捉試薬の成分は、捕捉試薬の成分に共有結合され、標的、すなわち、捕捉試薬複合物の局在化、濃縮、および／または凝集（例えば、磁気ビーズ）を提供する。そのような供給結合された捕捉試薬の例示的実施形態は、Ｓｔｏｎｅ，ｅｔ ａｌ．（“Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｒＲＮＡ ｆｒｏｍ ｆｏｕｒ ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｐａｔｈｏｇｅｎｓ ｕｓｉｎｇ ａｎ ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｑβ ｒｅｐｌｉｃａｓｅ ａｓｓａｙ”，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ １０：３５９－３７０（１９９６））によって提供され、あらゆる目的のために、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる。これらの共有結合された捕捉試薬は、同一の試料調製物からの複数の特異的標的の連続単離に使用を見出す。さらに、これらの捕捉試薬は、他の方法と関連付けられた問題の多くを伴うことなく、ＤＮＡ標的の単離を提供する。例えば、ビオチン化標的を捕捉するための従来のストレプトアビジンビーズの使用は、遊離ビオチンが、標的の単離に干渉するため、大量の遊離ビオチン（例えば、排泄物試料）を含む試料を処理するには厄介である。

３．２磁性粒子局在化剤

標的、すなわち、捕捉試薬複合物は、磁性粒子局在化剤を使用して捕捉される。しかしながら、試料粘度は、磁性微小粒子に影響を及ぼす粘性抵抗のため、局在化効率に著しい影響を及ぼし得る。排泄物試料は、粘度２０センチポイズ～４０センチポイズを有するが、参考として、２０°Ｃの水は、粘度約１センチポイズを有し、２０℃の蜂蜜は、粘度約３，０００センチポイズを有する。したがって、いくつかの用途に関して、より効率的単離を提供するために、より強い磁場が、好ましくあり得る。

【００７７】

特に、効率的単離は、特定の配列の磁石を有する磁気デバイスを使用して得られることが分かっている。例えば、ある特に有効な配列は、試料の周囲において、平行平面層に円形に配列される２セットの磁石を提供するものであって、ある層内の磁石は全て、試料に向かって、そのＮ極に方位付けられ、他層内の磁石は全て、試料に向かって、そのＳ極に方位付けられる（すなわち、両層内の全Ｎ極または全Ｓ極が、試料に向かって方位付けら

れる、「Ｎ－Ｎ」方位等の他の方位とは対照的である、「Ｎ－Ｓ」構成）。そのようなデバイスの実施例は、Ｌｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒ、米国特許出願第１３／０８９，１１６号（「Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ　Ｄｅｖｉｃｅ」）によって提供され、あらゆる目的のために、全体として本明細書に組み込まれる。いくつかの構成では、デバイスの磁石は、試料内に磁束を産生するように、その中に試料管（例えば、５０ミリリットル円錐形管）が定置される、孔の周囲に配列される。磁束は、標的ＤＮＡの回収物の除去を促進する、試料管の面積内に凝集、濃縮、および／または単離されるように、溶液内の磁性粒子の移動に影響を及ぼす（Ｌｉｇｈｔ、上記参照）。

【００７８】

そのようなデバイスは、大きな粘性試料（例えば、排泄物試料）中の磁性粒子の局在化のために特に有効であることが示されており、したがって、そのような試料からのＤＮＡの単離に有用である（Ｌｉｇｈｔ、上記参照）。例えば、図１１Ａおよび１１Ｂは、従来の磁気技術（１１Ａ）またはＬｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒ（１１Ｂ）（Ｌｉｇｈｔ、上記参照）の磁気局在化技術を使用して、１または２５センチポイズ粘度の溶液から磁性ビーズの排除に及ぼす試料粘度の影響を示す。示されるグラフでは、吸収率の低下は、溶液中に懸濁した微小粒子の濃度の低下を示す。２５センチポイズ溶液に関して収集されたデータは、正方形（■）で示され、１センチポイズ溶液に関して収集されたデータは、菱形（◆）で示される。これらのグラフは、従来の技術が使用されるとき、粘度の増加が、劇的分離を示す一方、Ｌｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒの磁性粒子局在化デバイスが、速度の軽度の減速のみ伴って、より多くの粘性溶液を排除することを示す。

【００７９】

前述の化学物質およびプロセスは、組み合わせて使用されるとき、以前に使用された方法より有意に高速である、排泄物試料等の複合かつ阻害性試料からの核酸の単離のためのシステムを提供する。さらに、本システムは、実質的に、阻害物質がほとんどない核酸調製物を産生し、例えば、診断試験のための標的核酸のより高い収率をもたらす。さらに、本システムの実施形態は、任意の下流分析または検出技術と併用するために、効率的試料処理のための実験室ワークフローに容易に統合される。本システムの実施形態と例示的従来のシステムのワークフロー、タイムライン、およびプロセス収率の比較は、図１４に示される。

４．キット

本技術の実施形態は、キットの形態で提供されることが想定される。キットは、本明細書に説明される組成物、デバイス、装置等の実施形態と、キットの使用説明書とを備える。そのような説明書は、検体を試料から調製する、例えば、試料を収集し、試料から核酸を調製するための適切な方法を説明する。キットの個々の構成要素は、適切なコンテナおよびパッケージング（例えば、バイアル、箱、ブリスターパック、アンプル、瓶、ボトル、管、および同等物）内にパッケージ化され、構成要素は、キットのユーザによる便宜的保管、発送、および／または使用のための適切なコンテナ（例えば、箱または複数の箱）内にともにパッケージ化される。液体成分（例えば、緩衝剤）は、凍結乾燥された形態で提供され、ユーザによって戻されてもよいことを理解されたい。キットは、キットの性能を査定、検証、および／または保証するための対照または参照を含んでもよい。例えば、試料中に存在する核酸の量をアッセイするためのキットは、比較のための既知の濃度の同一または別の核酸を含む、対照を含んでもよい、いくつかの実施形態では、対照核酸に特異的検出試薬（例えば、プライマー）を含んでもよい。キットは、臨床環境における使用に適切であって、いくつかの実施形態では、ユーザの自宅における使用に適切である。キットの構成要素は、いくつかの実施形態では、試料から核酸溶液を調製するためのシステムの機能性を提供する。いくつかの実施形態では、システムのある構成要素は、ユーザによって提供される。

〔実施例〕

実施例１

本明細書に提供される技術の実施形態の開発の間、ＰＶＰ（例えば、ＰＶＰＰ）が、ＰＣＲ阻害物質を排泄物試料から除去することが実証された（図９参照）。２０ミリリットルの体積を、２つの異なる排泄物上清試料の上清から採取した。各排泄物試料に関して、一方の分割量は、ＰＶＰで処理され、他方は、未処理のままとした。その他の点では、試料は、２つの異なる核酸標的（図９、遺伝子Ａおよび遺伝子Ｖ）を同様に捕捉するように処理された。捕捉および最終溶出後、２つの標的の回収物を、２５マイクロリットル反応体積中１マイクロリットルの溶出液を使用して、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ定量ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）アッセイによってモニタリングした。両方の排泄物上清からの両標的に関して、ＰＶＰで処理された分割量を増幅させた一方、未処理の分割量は、いかなるｑＰＣＲシグナルも産生しなかった。これらの結果は、定量ＰＣＲアッセイによるアッセイのために、ＤＮＡを排泄物試料から抽出するとき、阻害物質除去処理としてのＰＶＰの必要性および有効性を実証する。

実施例２

本明細書に提供される技術の実施形態の開発の間、スピン濾過がＰＣＲ阻害物質の除去を改善することを実証する、データを収集した。実験において、ＰＣＲ阻害物質を排泄物上清試料から除去する能力のために、異なるサイズのＰＶＰ（例えば、ＰＶＰＰ）を比較した。２つの市販のＰＶＰ組成物を比較した。すなわち、Ｐｏｌｙｃｌａｒ（登録商標）１０およびＰｏｌｙｐｌａｓｄｏｎｅ（登録商標）ＸＬであって、それぞれ、平均直径３０～５０マイクロメートルおよび１００～１３０マイクロメートルを有するＰＶＰ粒子から成る。２つのＰＶＰ組成物による阻害物質の除去を、ｑＰＣＲによって査定し、１マイクロリットルまたは５マイクロリットルの単離されたＤＮＡ溶出液が、２５－マイクロリットル反応体積中で使用された。最初に、両タイプのＰＶＰを、沈渣化（遠心分離）によって、排泄物上清から分離した。両ＰＶＰタイプに関して、試料は、１マイクロリットルの溶出されたＤＮＡがｑＰＣＲに添加されると、等しい回収および増幅曲線形状を示した。しかしながら、５マイクロリットルの溶出液の使用は、いかなるｑＰＣＲシグナルも産生せず、ＰＣＲ阻害物質が試料中に残留したことを示した（図１０Ａおよび１０Ｂ参照）。

【００８０】

次に、代替方法として、ＰＶＰを排泄物上清から分離するために、スピンカラム濾過を試行した。より小さい粒子サイズＰＶＰは、ＰＶＰが、明らかに、液体排泄物上清が通過し得ないほどスピンカラム中にぎっしりと充填されたため、このように処理することができなかった。しかしながら、より大きな粒子サイズＰＶＰは、この同一の問題がなく、試料調製は、容易にスピン濾過され得た。スピンカラムは、ＰＶＰを収集するために、ポリエチレンフリット（２０マイクロメートル公称細孔径）を含有していた。ポリエチレンフリットを具備したスピンカラム濾過を介して、大粒子ＰＶＰを排泄物上清から分離すると、ｑＰＣＲにおける溶出液体積は、明白な阻害なく、５マイクロリットルまたは６マイクロリットルまで増加することができた（図１０Ｃおよび１０Ｄ参照）。表１に示されるように、５または６マイクロリットルの溶出液を使用するときの計算された鎖数は、１マイクロリットルの溶出液を使用したときに計算された鎖数の約５倍または６倍であった。これらの結果は、排泄物試料からのＰＣＲ阻害物質の除去のためのＰＶＰ処理に加えた、スピンカラム濾過の利点を実証する。

【００８１】

【表１】

表１

| 処理 | 体積 | 鎖 | 期待% |
|---|---|---|---|
| PVPP 30-50<br>スピンフィルタなし | 1 μL | 950 | |
| | 5 μL | シグナルなし(完全阻害) | 0 |
| PVPP 100-130<br>スピンフィルタなし | 1 μL | 907 | |
| | 5 μL | シグナルなし(完全阻害) | 0 |
| PVPP 100- 130<br>スピンフィルタあり | 1 μL | 1136 | |
| | 5 μL | 6751 | 119 |
| PVPP 100- 130<br>スピンフィルタあり | 1 μL | 3110 | |
| | 6 μL | 18600 | 99.68 |

【００８２】

実施例３

本明細書に提供される技術の実施形態の開発の間、低（すなわち、１センチポイズ）および高（すなわち、２５センチポイズ）粘度の試料に関して、従来の技術（例えば、１インチ外径×８分の１インチ厚Ｎ５２ネオジム磁石で裏張りされたＰｒｏｍｅｇａ　ＰｏｌｙＡ　Ｔｒａｃｔ）とＬｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒの磁性微小粒子局在化デバイス（Ｓ－Ｎ構成におけるグレードＮ５２ネオジム磁石）の局在化効率を比較するための実験を行った。

【００８３】

適切な粘度（例えば、１または２５センチポイズ）の試験溶液を、試験のために、従来のデバイスまたは本明細書に提供される技術の実施形態内に定置した。試料を磁場に暴露し、液体を各試料に関して示された時間間隔で吸引し、懸濁液中に残留する粒子を分光分析によって定量化した。吸収率の低下は、溶液中に懸濁した微小粒子の濃度低下を示す（すなわち、磁気分離によって、より多くの粒子が局在化し、懸濁液から除去された）。従来の技術に関する結果は、以下の図１１Ａに提供される。磁性微小粒子局在化デバイスに関する結果は、図１１Ｂに提供される。図１１ＡおよびＢでは、２５センチポイズ溶液に関して収集されたデータは、正方形（■）で示され、１センチポイズ溶液に関して収集されたデータは、菱形（◆）で示される。

実施例４

本明細書に提供される技術の実施形態の開発の間、所与の標的のＤＮＡの大部分が、単一抽出において、排泄物上清から欠失されることが実証された。抽出は、図１に示される流れ図に従って行った。最終溶出後、抽出物１および２からの２つの標的（遺伝子Ａおよび遺伝子Ｖ）の回収物を、２５マイクロリットル体積反応中１マイクロリットルの溶出液を使用して、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＰＣＲアッセイによってモニタリングした。両標

的に関して、抽出物１は、標的の良好な回収をもたらした一方、抽出物２からの溶出液は、いずれの標的に対しても、いかなるｑＰＣＲシグナルも産生しなかった（図１２）。

実施例５

本明細書に提供される技術の実施形態の開発の間、排泄物上清中のヒトＤＮＡの完全性を損なうことなく、最小４サイクルの変性／ハイブリダイゼーションを通して、単一試料において、ＤＮＡ抽出を繰り返し行うことができることが実証された。本実施例では、４つの標的（遺伝子Ａ、Ｆ、Ｖ、およびＷ）を試料から捕捉し、その捕捉の順序を変更した。溶出後、各標的の回収物を、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＰＣＲによってモニタリングした。図１３では、プロットは、抽出配列において、１番目、２番目、３番目、および４番目に捕捉されたときの各遺伝子の増幅曲線を示す。増幅曲線の重畳は、回収が、抽出の順序にかかわらず、ほぼ等しかったことを実証する。表３は、図１３からの結果を定量化する。

【００８４】

【表２】

表３

| 標的 | 抽出 | 平均 $C_p$ | 平均鎖／μL |
|---|---|---|---|
| 遺伝子Ａ | #1 | 28.92 | 862 |
| | #2 | 28.89 | 878 |
| | #3 | 28.85 | 907 |
| | #4 | 28.73 | 984 |
| 遺伝子 Ｆ | #1 | 29.32 | 499 |
| | #2 | 29.36 | 489 |
| | #3 | 29.29 | 511 |
| | #4 | 29.01 | 614 |
| 遺伝子Ｖ | #1 | 31.29 | 129 |
| | #2 | 31.01 | 155 |
| | #3 | 31.18 | 139 |
| | #4 | 30.84 | 177 |
| 遺伝子Ｗ | #1 | 29.17 | 724 |
| | #2 | 29.11 | 757 |
| | #3 | 28.99 | 819 |
| | #4 | 29.16 | 730 |

【００８５】

全４つの遺伝子に関して、平均Ｃ$_p$（交差点－増幅曲線が固定閾値を超えるサイクル数）および鎖数は、本質的に、抽出の順序にかかわらず、等しかった。

実施例６

複数の標的核酸の順次単離のための例示的手順：

図１に概略されるように：

１．排泄物試料を、例えば、緩衝剤で均質化し、排泄物ホモジネートを形成する。ホモジネートを、例えば、遠心分離または濾過によって、残留固体を流体から分裂するように処理し、「排泄物上清」を産生する。

２．排泄物上清を処理し、アッセイ阻害物質を除去し（例えば、米国特許出願第６１／４８５，３３８号に説明され、参照することによって全体として本明細書に組み込まれるように、ポリビニルポリピロリドンによって）、「浄化上清」を産生する。

３．１０ミリリットルの浄化上清（約４グラムの排泄物の均等物を表す）を、最終濃度２．４Ｍまでチオシアン酸グアニジン（ＧＴＣ）と混合する。

４．混合物を、次いで、１０分間、９０℃の水浴中で加熱し、排泄物中に存在するＤＮＡ（および、タンパク質）を変性させる。

５．着目標的配列（複数可）に相補的である、共有結合（連結）されたオリゴヌクレオチ

ド（「標的特異的捕捉プローブ」）を含有する常磁性粒子を、試料に添加する。試料を、次いで、１時間、インキュベートし（例えば、周囲温度約２２～２５℃で）、磁性粒子上の捕捉プローブへの標的ＤＮＡのハイブリダイゼーションをもたらす。
６．浄化上清、ＧＴＣ、および粒子の混合物を、磁場に暴露し、粒子（現時点では、捕捉プローブにハイブリダイズされた標的ＤＮＡを含有する）を排泄物上清／ＧＴＣ混合物から分離し、これを新しい管に移送する。例えば、米国特許出願第１３／０８９，１１６号（参照することによって本明細書に組み込まれる）を参照されたい。
７．常磁性粒子を、次いで、洗浄し、標的ＤＮＡを溶出させ、検出アッセイにおける使用に備える。
８．ステップ６において留保された上清／ＧＴＣ混合物を、１０分間、９０℃の水浴に戻し、変性を繰り返す（ステップ４）。ステップ５を、次いで、異なる標的ＤＮＡに相補的捕捉プローブを含有する磁性粒子を添加することによって繰り返し、ハイブリダイゼーション、粒子分離、および溶出ステップを繰り返し、第２のＤＮＡ標的の精製された試料を産生する。
【００８６】
変性／ハイブリダイゼーション／分離サイクル（ステップ４－６）を、少なくとも４回以上繰り返し、同一の排泄物上清試料から、異なる標的ＤＮＡを順次抽出することができる。
実施例７
本明細書に提供される技術の実施形態の開発の間、臨床用途において、本方法を試験した。以下は、本発明のシステムおよび方法を使用するワークフローの実施例を提供する。
研究設計
本研究は、米国およびデンマーク内の高度医療センターおよび地域医療センターを含む、複数の医療センターからの特徴がはっきりした保存用排泄物に基づく。承認は、施設内倫理委員会から得た。排泄物は、少なくとも１つの結腸直腸腺腫≧１センチメートルを伴う、結腸直腸癌（ＣＲＣ）が確認された症例患者と、腫瘍形成が結腸内視鏡検査によって査定されなかった、年齢および性別が一致する対照患者とから調達した。患者は、臨床およびスクリーニング環境の両方から募集し、一部は、症候性であった。既知の癌症候群または炎症性腸疾患を伴う者は、除外した。約７００例の試料を試験し、そのうち、１３３例は、腺腫≧１センチメートルであって、２５２例は、癌患者であった。
【００８７】
含まれる４つのメチル化遺伝子（ビメンチン、ＮＤＲＧ４、ＢＭＰ３、およびＴＦＰＩ２）、変異ＫＲＡＳ、参照遺伝子β－アクチン（ＡＣＴＢ）、およびヘモグロビンを含む、多重マーカー排泄物試験を行った。試験性能を評価するために、症例および対照排泄物を、バランスの取れた方法で、２つの異なる試験施設に分散した。全アッセイは、盲検化された状態の技術者によって行った。
排泄物収集および保管
至適基準としての役割を果たす、結腸内視鏡検査に先立って、排泄物全体をプラスチックバケツ内に収集した。防腐緩衝剤を排泄物に添加し、緩衝された排泄物を－８０℃で保存した。しかしながら、緩衝剤添加のタイミング、排便と凍結との間の期間、および試料が、保管に先立って均質化されたかどうかは、標準化しておらず、関与センター間で変動する。
マーカー選択
候補遺伝子は、個々にまたは組み合わせて（例えば、ＫＲＡＳ＋ＢＭＰ３＋ＮＤＲＧ４＋ＴＦＰＩ２＋ビメンチン＋参照、および／またはＡＣＴＢ＋ヘモグロビン）、正常粘膜からの結腸直腸新生物のほぼ完全分離をもたらしたことが同定された。４つのメチル化遺伝子マーカーが、大部分の判別子として出現した（ＮＤＲＧ４、ＢＭＰ３、ビメンチン、およびＴＦＰＩ２）。変異ＫＲＡＳおよびヘモグロビン検出相補的メチル化遺伝子マーカーも、排泄物中で検出され、故に、同様に、マーカーパネルにおいて評価した。最後に、参照遺伝子β－アクチン（ＡＣＴＢ）のアッセイは、排泄物中の総ヒトゲノム均等物を判

定し、排泄物中のヒトＤＮＡレベルが、結腸直腸新生物に伴って増加するにつれて、候補マーカー自体としての役割を果たすために使用された。

排泄物処理および標的遺伝子捕捉

解凍直後、緩衝された排泄物を、完全に均質化および遠心分離した。１４ミリリットルの分割量の排泄物上清を、次いで、５０ミリグラム／ミリリットルの濃度において、ポリビニルポリピロリドンで処理した。オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによる標的遺伝子配列の直接捕捉を、上清物質上で行った。概略すると、１０ミリリットルの不溶性ＰＶＰで処理された上清を、９０℃で１０分間、２．４Ｍグアニジンチオシアネート（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．ＬｏｕｉｓＭＯ）中で変性させた。各オリゴヌクレオチド捕捉プローブで官能化された３００～５００マイクログラムのＳｅｒａ－Ｍａｇカルボン酸塩修飾ビーズ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ ＭＡ）を、続いて、変性された排泄物上清に添加し、室温で1時間、インキュベートした。Ｓｅｒａ－Ｍａｇビーズを磁性ラック上に収集し、ＭＯＰＳ洗浄緩衝剤（１０ ｍＭ ＭＯＰＳ；１５０ ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ ７．５）を使用して、3回、洗浄し、次いで、２０ナノグラム／マイクロリットルｔＲＮＡ（Ｓｉｇｍａ）で、６０マイクロリットルのヌクレアーゼが含まれない水中に溶出させた。本研究では、４つの選択されたメチル化マーカー、ビメンチン、ＮＤＲＧ４、ＢＭＰ３、およびＴＦＰＩ２と、１つの参照遺伝子ＡＣＴＢを、１つのハイブリダイゼーション反応において、ともに捕捉した。突然変異マーカーＫＲＡＳを、続いて、別のハイブリダイゼーション反応で捕捉した。ここでは、その５′－６炭素アミノ修飾結合（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，ＩＡ）とともに示される、使用された捕捉プローブは、以下であった。

ビメンチン：

／５ＡｍＭＣ６／ＣＴＧＴＡＧＧＴＧＣＧＧＧＴＧＧＡＣＧＴＡＧＴＣＡＣＧＴＡＧＣＴＣＣＧＧＣＴＧＧＡ－３′（配列番号：１）；

ＮＤＲＧ４：

／５ＡｍＭＣ６／ＴＣＣＣＴＣＧＣＧＣＧＴＧＧＣＴＴＣＣＧＣＣＴＴＣＴＧＣＧＣＧＧＣＴＧＧＧＧＴＧＣＣＣＧＧＴＧＧ－３′（配列番号：２）；

ＢＭＰ３：

／５ＡｍＭＣ６／ＧＣＧＧＧＡＣＡＣＴＣＣＧＡＡＧＧＣＧＣＡＡＧＧＡＧ－３′（配列番号：３）；

ＴＦＰＩ２：

／５ＡｍＭＣ６／ＣＧＣＣＴＧＧＡＧＣＡＧＡＡＡＧＣＣＧＣＧＣＡＣＣＴ－３′（配列番号：４）；

ＡＣＴＢ：

／５ＡｍＭＣ６／ＣＣＴＴＧＴＣＡＣＡＣＧＡＧＣＣＡＧＴＧＴＴＡＧＴＡＣＣＴＡＣＡＣＣ－３′（配列番号：５）；

ＫＲＡＳ：

／５ＡｍＭＣ６／ＧＧＣＣＴＧＣＴＧＡＡＡＡＴＧＡＣＴＧＡＡＴＡＴＡＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＧＣ－３′（配列番号：６）；および

／５ＡｍＭＣ６／ＣＴＣＴＡＴＴＧＴＴＧＧＡＴＣＡＴＡＴＴＣＧＴＣＣＡＣＡＡＡＡＴＧＡＴＴＣＴＧＡＡＴＴＡＧＣ－３′（配列番号：７）

メチル化アッセイ

メチル化マーカーを、前述のようなＱｕＡＲＴＳ法によって定量化した（例えば、米国特許出願第１２／９４６，７３７号、第１２／９４６，７４５号、および第１２／９４６，７５２号（あらゆる目的のために、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。本方法は、ポリメラーゼベースの標的ＤＮＡ増幅プロセスと侵入型切断ベースのシグナル増幅プロセスを組み合わせる。我々は、ＥＺ－９６ＤＮＡメチル化キット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｒｖｉｎｅ ＣＡ）を使用して、４５マイクロリットルの捕捉されたＤＮＡを重亜硫酸塩で処理し、９６ウェルＰＣＲプレート

上で、２０ナノグラム／マイクロリットルｔＲＮＡ（Ｓｉｇｍａ）とともに、試料を５０マイクロリットルの１０ｍＭＴｒｉｓ、０．１ｍＭＥＤＴＡｐＨ８．０中に溶出させた。１０マイクロリットルの重亜硫酸塩で処理されたＤＮＡを、９６ウェルＰＣＲプレート上で、３０マイクロリットル反応体積中に、ＱｕＡＲＴＳ方法を用いてアッセイした。ＰＣＲプレートをＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ４８０（Ｒｏｃｈｅ）内で循環させた。

【００８８】

２つの別個の三重ＱｕＡＲＴＳアッセイを設計し、それぞれに対する参照遺伝子としてＡＣＴＢを使用して、メチル化マーカー（ビメンチン、ＮＤＲＧ４、ＢＭＰ３、およびＴＦＰＩ２）を検出した。第１の三重アッセイは、ＡＣＴＢ、ビメンチン、およびＮＤＲＧ４を含有し、第２の三重アッセイは、ＡＣＴＢ、ＢＭＰ３、およびＴＦＰＩ２を含有した。各ＱｕＡＲＴＳ反応は、４００～６００ｎＭプライマーおよび検出プローブ、１００ｎＭ侵入型オリゴヌクレオチド、各６００～７００ｎＭのＦＡＭ（Ｈｏｌｏｇｉｃ，　Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）、Ｙｅｌｌｏｗ（Ｈｏｌｏｇｉｃ）、およびＱｕａｓｏｒ６７０（ＢｉｏＳｅａｒｃｈ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，　Ｎｏｖａｔｏ　ＣＡ）蛍光共鳴エネルギー移動レポーターカセット（ＦＲＥＴ）、６．６７５ナノグラム／マイクロリットルＣｌｅａｖａｓｅ２．０（Ｈｏｌｏｇｉｃ）、１ユニットホットスタートＧｏＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ，　Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）、１０ｍＭ　ＭＯＰＳ、７．５　ｍＭ　$MgCl_2$、ならびに各２５０μＭのｄＮＴＰを取り込んだ。ＱｕＡＲＴＳサイクル条件は、９５°Ｃで３分間、次いで、それぞれ、９５℃で２０秒間、６７℃で３０秒間、および７０°Ｃで３０秒間を含む、１０サイクル後、それぞれ、９５℃で２０秒間、５３℃で１分間、および７０℃で３０秒間を含む、４５サイクル、最後に、４０℃で３０秒間の保持から構成した。

以下の各標的に関して、２つのメチル化特異的プライマーおよびプローブ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，　Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，　ＩＡ）は、以下であった。

ビメンチン：

プライマー５′－ＧＧＣＧＧＴＴＣＧＧＧＴＡＴＣＧ－３′（配列番号：８），

プライマー５′－ＣＧＴＡＡＴＣＡＣＧＴＡＡＣＴＣＣＧＡＣＴ－３′（配列番号：９），

プローブ５′－ＧＡＣＧＣＧＧＡＧＧＣＧＡＧＴＣＧＧＴＣＧ／３′Ｃ６／（配列番号：１０）；

ＮＤＲＧ４：

プライマー５′－ＣＧＧＴＴＴＴＣＧＴＴＣＧＴＴＴＴＴＴＣＧ－３′（配列番号：１１），

プライマー５′－ＧＴＡＡＣＴＴＣＣＧＣＣＴＴＣＴＡＣＧＣ－３′（配列番号：１２），

プローブ５′－ＣＧＣＣＧＡＧＧＧＴＴＣＧＴＴＴＡＴＣＧ／３′Ｃ６／（配列番号：１３）；

ＢＭＰ３：

プライマー５′－ＧＴＴＴＡＡＴＴＴＴＣＧＧＴＴＴＣＧＴＣＧＴＣ－３′（配列番号：１４），

プライマー５′－ＣＴＣＣＣＧＡＣＧＴＣＧＣＴＡＣＧ－３′（配列番号：１５），

プローブ５′－ＣＧＣ　ＣＧＡ　ＧＧＣ　ＧＧＴ　ＴＴＴ　ＴＴＧ　ＣＧ／３′Ｃ６／（配列番号：１６）；および

ＴＦＰＩ２：

プライマー５′－ＴＣＧＴＴＧＧＧＴＡＡＧＧＣＧＴＴＣ－３′（配列番号：１７），

プライマー５′－ＡＡＡＣＧＡＡＣＡＣＣＣＧＡＡＣＣＧ－３′（配列番号：１８），

プローブ５′－ＧＡＣＧＣＧＧＡＧＧＣＧＧＴＴＴＴＴＴＧＴＴ／３′Ｃ６／（配列番号：１９）。

ＴＦＰＩ２アッセイは、特異的侵入型オリゴヌクレオチドを有していた：

５′－ＧＣＧＧＧＡＧＧＡＧＧＴＧＣＣ－３′（配列番号：２０）。
亜硫酸水素塩で処理されたＡＣＴＢを検出するためのプライマーおよびプローブは、以下であった：
プライマー５′－ＴＴＴＧＴＴＴＴＴＴＴＧＡＴＴＡＧＧＴＧＴＴＴＡＡＧＡ－３′（配列番号：２１），
プライマー５′－ＣＡＣＣＡＡＣＣＴＣＡＴＡＡＣＣＴＴＡＴＣ－３′（配列番号：２２），
プローブ５′－ＣＣＡＣＧＧＡＣＧＡＴＡＧＴＧＴＴＧＴＧＧ／３′Ｃ６／（配列番号：２３）。

【００８９】

各プレートは、亜硫酸水素塩で処理したＤＮＡ試料、標準的曲線試料、陽性および陰性対照、および水ブランクを含んだ。標準的曲線は、改変プラスミドから切り出した３００～１０００標的配列を使用して作成した。亜硫酸水素塩で処理したＣｐＧｅｎｏｍｅ汎用メチル化ＤＮＡ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，　Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）およびヒトゲノムＤＮＡ（Ｍｅｒｃｋ．，Ｇｅｒｍａｎｙ）を、陽性および陰性対照として使用した。ＤＮＡ鎖数を、関連アッセイに関して、標的遺伝子の$C_p$と標準的曲線を比較することによって判定した。各マーカーに対する％メチル化を、メチル化遺伝子の鎖数をＡＣＴＢ鎖数で除算し、１００で乗算して判定した。

ＫＲＡＳ突然変異

ＫＲＡＳ遺伝子を、最初に、１０マイクロリットルの捕捉されたＫＲＡＳ　ＤＮＡを鋳型として使用して、コドン１２／１３に隣接するプライマーでＰＣＲ増幅した。ＰＣＲを、１×ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ　Ｍａｓｔｅｒ（Ｒｏｃｈｅ，Ｇｅｒｍａｎａｙ）および各２００ｎＭプライマーを用いて行った。サイクル条件は、９５℃で３分間後、それぞれ、９５℃で２０秒間、６２℃で３０秒間、および７２℃で３０秒間、１５サイクル続けた。プライマー配列は、以下であった：
５′－ＡＧＧ　ＣＣＴ　ＧＣＴ　ＧＡＡ　ＡＡＴ　ＧＡＣ　ＴＧ－３′（配列番号：２４）、および
５′－ＣＴＡ　ＴＴＧ　ＴＴＧ　ＧＡＴ　ＣＡＴ　ＡＴＴ　ＣＧ　ＴＣ－３′（配列番号：２５）。

【００９０】

各増幅された試料を、ヌクレアーゼが含まれない水中に、５００倍に希釈した。１０マイクロリットルの分割量の５００倍の試料希釈物を、自動化液体処理装置（ｅｐＭｏｔｉｏｎ，　Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ，Ｈａｕｐｐａｕｇｅ　ＮＹ）を用いて９６ウェルＰＣＲプレートに添加した。ＱｕＡＲＴＳアッセイを、次いで、使用し、ＫＲＡＳ遺伝子のコドン１２／１３における７つの突然変異を評価した。各突然変異アッセイを、単一アッセイとして設計した。ＫＲＡＳ突然変異特異的順方向プライマーおよびプローブは、以下であった：
Ｇ１２Ｓ突然変異：
プライマー５′－ＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＧＣＡＡ－３′（配列番号：２６）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＡＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧＣ／３′Ｃ６／（配列番号：２７）；
Ｇ１２Ｃ突然変異
プライマー５′－ＡＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＣＣＴＴ－３′（配列番号：２８）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＴＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧＣ／３′Ｃ６／（配列番号：２９）；
Ｇ１２Ｒ突然変異
プライマー５′－ＴＡＴＡＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＣＣＴＣ－３′（配列番号：３０）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＣＧＴＧＧＣＧＴＡＧＧＣ／３′Ｃ６／（配列番号：３

１）；
Ｇ１２Ｄ突然変異
プライマー５′－ＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＧＣＴＣＡ－３′（配列番号：３２）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＡＴＧＧＣＧＴＡＧＧＣＡ／３′Ｃ６／（配列番号：３３）；
Ｇ１２Ｖ突然変異
プライマー５′－ＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＧＣＴＣＴ－３′（配列番号：３４）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＴＴＧＧＣＧＴＡＧＧＣＡ／３′Ｃ６／（配列番号：３５）；
Ｇ１２Ａ突然変異
プライマー５′－ＡＡＣＴＴＧＴＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＧＡＴＧＣ－３′（配列番号：３６）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＣＴＧＧＣＧＴＡＧＧＣＡ／３′Ｃ６／（配列番号：３７）；
Ｇ１３Ｄ突然変異
プライマー５′－ＧＧＴＡＧＴＴＧＧＡＧＣＴＧＧＴＣＡ－３′（配列番号：３８）
プローブ５′－ＧＣＧＣＧＴＣＣＡＣＧＴＡＧＧＣＡＡＧＡ／３′Ｃ６／（配列番号：３９）。

全ＫＲＡＳ突然変異に関して、使用された逆方向プライマーは、以下である。
５′－ＣＴＡＴＴＧＴＴＧＧＡＴＣＡＴＡＴＴＣＧＴＣ－３′（配列番号：４０）

ＱｕＡＲＴＳサイクル条件およびＫＲＡＳの試薬濃度は、メチル化アッセイにおけるものと同一であった。各プレートは、改変プラスミドから成る標準、陽性および陰性対照、および水ブランクを含有し、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ４８０（Ｒｏｃｈｅ）にかけられた。ＤＮＡ鎖数を、そのアッセイに対して、標的遺伝子の$C_p$と標準的曲線を比較することによって、判定した。５０マイクロリットルのＫＲＡＳ中の各突然変異マーカーの濃度を、５００倍の希釈係数および増幅効率１．９５に基づいて計算した。本値を、メチル化アッセイ中のＡＣＴＢ濃度で除算し、次いで、１００で乗算し、％突然変異を判定した。

ヘモグロビンアッセイ

排泄物中のヘモグロビンを定量化するために、半自動化ＨｅｍｏＱｕａｎｔ試験を、Ａｈｌｑｕｉｓｔ，ｅｔ ａｌ．（“ＨｅｍｏＱｕａｎｔ，ａ ｎｅｗ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ｆｅｃａｌ ｈｅｍｏｇｌｏｂｉｎ．Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｗｉｔｈ Ｈｅｍｏｃｃｕｌｔ”．Ａｎｎ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ １０１：２９７－３０２（１９８４））に説明されるように、患者毎に、２つの緩衝された排泄物分割量（それぞれ、１６ミリグラムの排泄物に正規化された）上で行った。本試験は、糞便ヘモグロビンの相補的値の査定を可能にした。

データ分析

説明されるメチル化および突然変異マーカーと組み合わせた、阻害物質除去および標的捕捉精製を含む、本明細書に説明される試料処理方法の組み合わせを使用して、６７８例の試料の本研究は、以下の感度レベルを達成した。すなわち、腺腫検出に対して、感度６３．８％、および特異性レベル９０％において、結腸直腸癌に対して、感度８５．３％であった。

前述の明細書に記載の全刊行物および特許は、そのあらゆる目的のために、参照することによって全体として本明細書に組み込まれる。説明される組成物、方法、および技術の使用の種々の修正および変形例が、説明される技術の範囲および精神から逸脱することなく、当業者に明白となるであろう。本技術は、具体的例示的実施形態に関連して説明されたが、請求される本発明は、そのような具体的実施形態に過度に制限されるべきではないことを理解されたい。実際、薬理学、生化学、医学、または関連分野における当業者に明白である、本発明を実行するための説明される形態の種々の修正は、以下の請求項の範囲内

であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【００９１】

【図１】核酸単離プロセスの態様のチャートを提供する。図１Ａは、核酸単離プロセスのステップを示す、チャートを提供する。図１Ｂは、図１Ａの全体的プロセスの態様と同一の試料からの複数の標的の連続抽出に使用を見出す、プロセスの実施形態を示す、流れ図である。

【図２】ポリビニルピロリドンの化学構造である。

【図３】例示的スピンフィルタの図面である。

【図４】図３に示されるスピンフィルタの分解図を示す、図面である。

【図５】図３および４のスピンフィルタと関連付けられたスピンフィルタ底部端を示す、一連の図面である。図５Ａは、円盤形状の中実（例えば、非多孔性または非浸透性）底部端の図面であって、図５Ｂは、円盤形状の多孔性（浸透性）底部端の図面であって、図５Ｃは、多孔性の円錐形底部端の図面である。

【図６】収集管と組み立てられたスピンフィルタの図面である。

【図７】図６に描写されるスピンフィルタの裁断図である。

【図８】多孔性物質の本体と、フィルタ支持部によって提供される底部端とを備える、スピンフィルタの図面である。図８Ａは、組立図であって、図８Ｂは、分解図である。

【図９Ａ－９Ｄ】排泄物試料からの阻害物質の除去を示す、プロットである。

【図１０Ａ－１０Ｄ】スピン濾過が阻害物質の除去を改善することを示す、プロットである。

【図１１Ａ】粘度１センチポイズおよび２５センチポイズを有する試料に関する従来の技術の局在化効率を比較するデータのプロットである。図１１Ｂは、粘度１センチポイズおよび２５センチポイズを有する試料に関して提供される、Ｌｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒ（米国特許出願第１３／０８９，１１６号）によって提供される磁気局在化デバイスの局在化効率を比較するデータのプロットである。

【図１２Ａ】排泄物試料からの単一抽出が標的ＤＮＡの大部分を回収する、定量的ＰＣＲの結果を示す、プロットである。図１２Ｂは、第１の抽出および第２の抽出からの核酸溶液中の遺伝子Ａおよび遺伝子Ｖの濃度を示す。

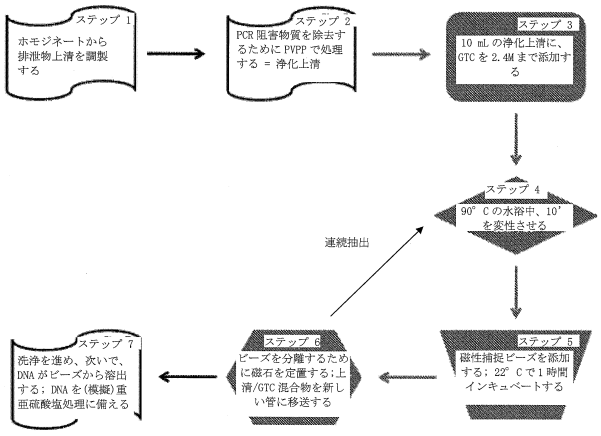
【図１３Ａ－１３Ｄ】４つの標的ＤＮＡの回収が、４つの標的ＤＮＡが排泄物試料から抽出される順序にかかわらず類似する、定量的ＰＣＲの結果を示す、プロットを示す。

【図１４】実施形態のワークフロー（プロセスＡ）と、既存の方法（プロセスＢ、例えば、国際公開第２０１０／０２８３８２号参照）に基づくステップを使用して、ＤＮＡを排泄物試料から単離するための例示的プロセスを比較する、チャートを提供する。

【図１Ａ】

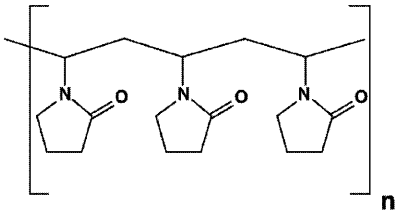
| |
|---|
| 1. 浄化上清の調製 |
| 8g 排泄物を緩衝剤と混合する |
| 遠心分離 |
| 上清を収集する |
| 阻害物質除去樹脂で処理する |
| スピン濾過 |
| 浄化上清の回収 |
| |
| 2. 着目 DNA の連続捕捉 |
| グアニジンイソチオシアネートを添加し、加熱する |
| オリゴヌクレオチド-複合常磁性ビーズを添加する |
| (代替として、混合型ビーズをグアニジンイソチオシアン酸溶液へ添加し、次いで、加熱する) |
| ハイブリダイズ |
| |
| 3. 捕捉された DNA の単離 |
| ビーズを磁石で溶液から引き寄せる |
| 上清を除去する<br>(図 1B における、次の標的の捕捉のために上清を再使用する) |
| ビーズを 3 回洗浄する |
| DNA を溶出する |

【図１Ｂ】




【図２】

FIG. 2




【図３】

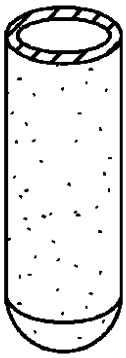


FIG. 3

【図４】

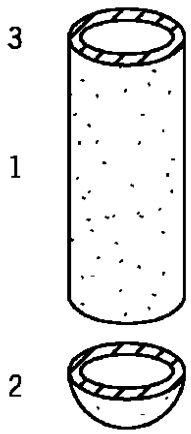



FIG. 4

【図５Ａ】



FIG. 5A

【図５Ｂ】



FIG. 5B

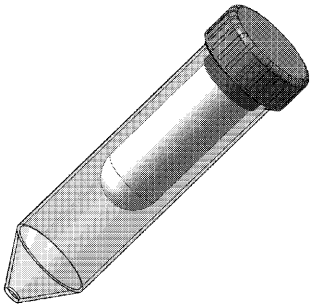
【図５Ｃ】



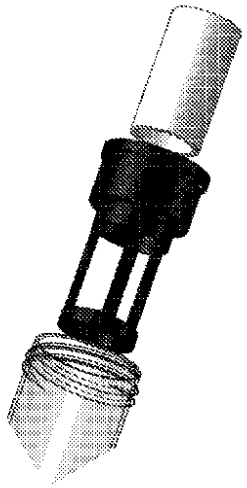
FIG. 5C

【図６】

FIG. 6



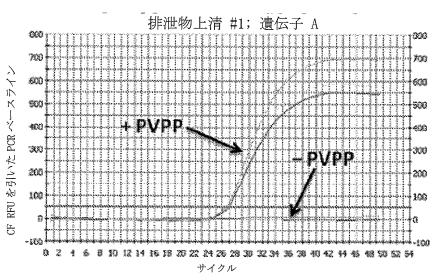
【図８Ｂ】



B

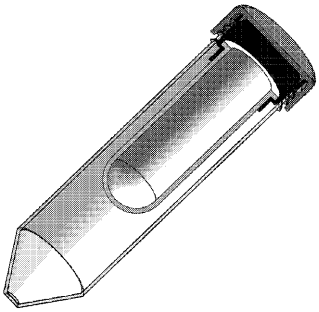
【図９Ａ】

A

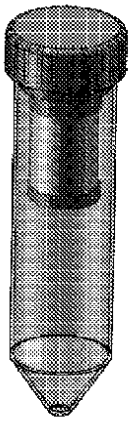



【図７】

FIG. 7



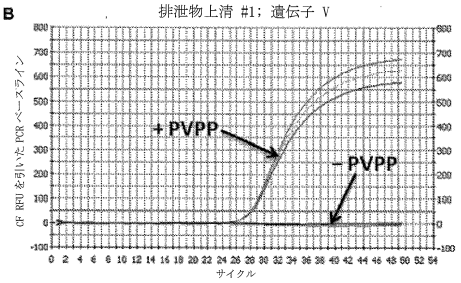
【図８Ａ】



A

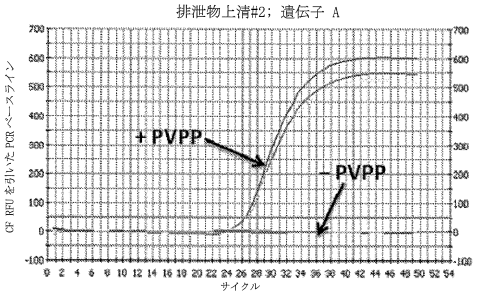
【図９Ｂ】

B

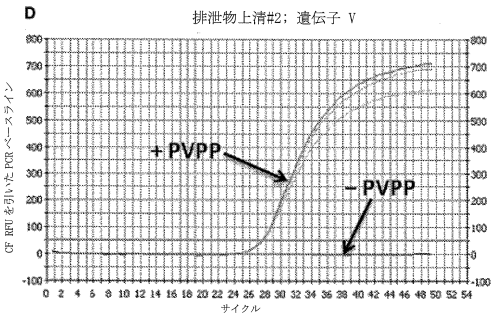



【図９Ｃ】

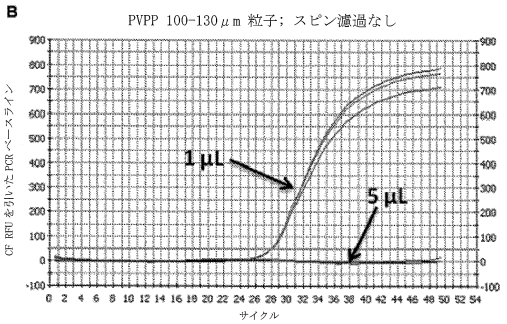
C



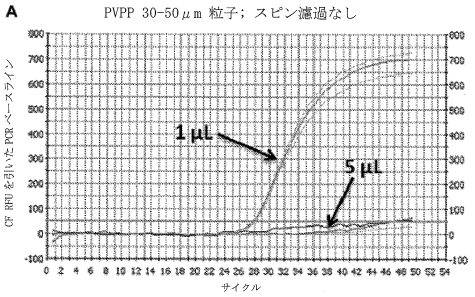
【図９Ｄ】



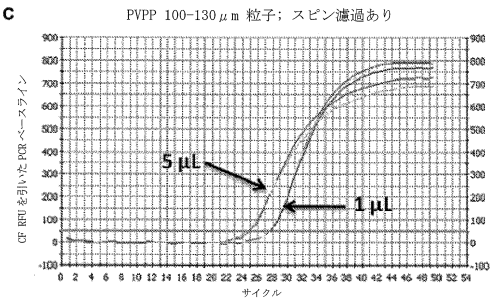

【図１０Ｂ】



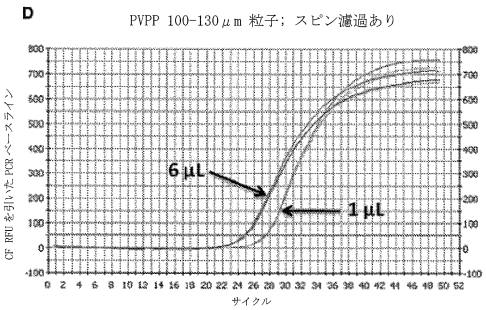

【図１０Ａ】



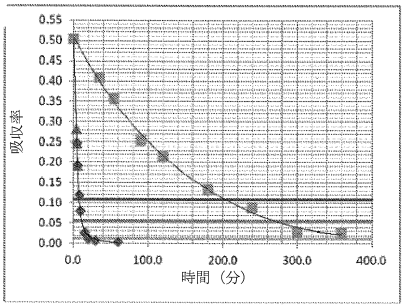

【図１０Ｃ】

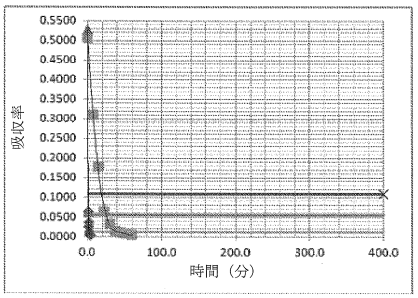



【図１０Ｄ】

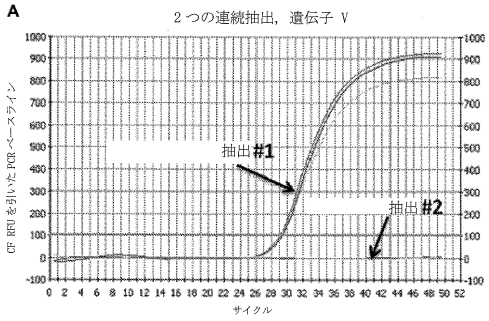



【図１１】



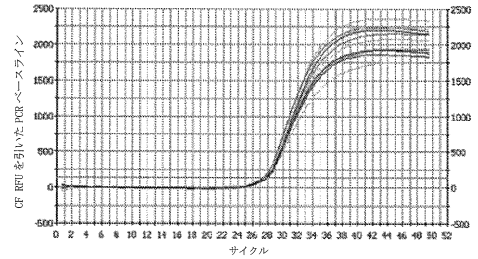
【図１２】



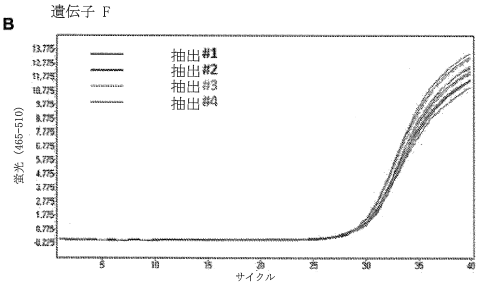

B

| 試料 | 抽出 | 鎖/μL |
|---|---|---|
| 遺伝子 A | #1 | 2,020 |
| | #2 | 該当なし |
| 遺伝子 V | #1 | 505 |
| | #2 | 該当なし |

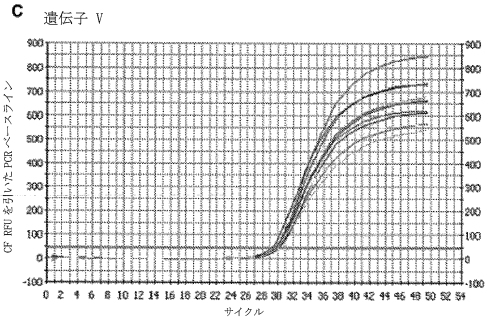
【図１３Ａ】



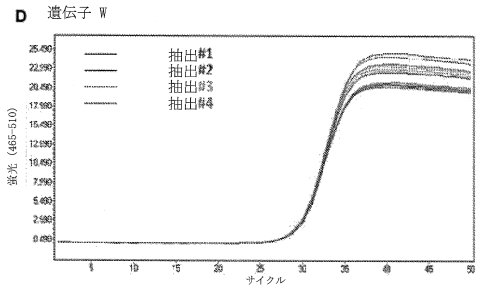

【図１３Ｂ】




【図１３Ｃ】




【図１３Ｄ】




【図１４】

| プロセス A | | プロセス B | |
|---|---|---|---|
| | 総時間（分） | | 総時間（分） |
| 浄化上清の調製 | 55 | 浄化上清の調製 | 一晩（例えば、960 分） |
| 8g の排泄物を 32 ml の緩衝剤と混合する | | 3g の排泄物を 7 vol の緩衝剤と混合する | |
| 遠心分離 | | 遠心分離 | |
| 上清を収集する（24 ml） | | 上清を収集する | |
| 14 ml を阻害物質除去樹脂で処理する | | 0.45μm フィルタを通して濾過する | |
| スピン濾過 | | 浄化上清の回収 | |
| 浄化上清の回収 | | 内在ストレプトアビジンを除去するために、イソプロパノールで沈殿させる | |
| | | 遠心分離；上清の処分 | |
| | | 一晩 4.9 ml の TE 緩衝剤中に沈殿物を溶解する | |
| 着目 DNA の連続捕捉 | 15 | 着目 DNA の並行捕捉 | 30 |
| グアニジンチオシアネート 10 ml を添加し、加熱する | | 300 μL 分割量に、グアニジンイソチオシアネートおよびビオチン化 プローブオリゴヌクレオチドを添加する | |
| オリゴヌクレオチド-複合常磁性ビーズを添加する | | ハイブリダイズ | |
| ハイブリダイズ（60 分／サイクル） | 60 | ストレプトアビジン-被覆常磁性ビーズを添加する | 15 |
| | | オリゴヌクレオチド/DNA 混合物をビーズにハイブリダイズする | |
| 捕捉された DNA の単離 | 30 | 捕捉された DNA の単離 | 15 |
| ビーズを磁石*で溶液から引き寄せる | | ビーズを磁石で溶液から引き寄せる | |
| 上清を除去する（次の標的捕捉のための上清を留保する） | | 流体を除去および処分する | |
| ビーズを洗浄する | | ビーズを洗浄する | |
| DNA を溶出する | | DNA を溶出する | |
| 精製の総時間（分） | 160 | 精製の総時間（分） | 1020 |
| 増幅のための精製された特異遺伝子 DNA をもたらす排泄物の均等質量 | 2.0 グラム | 増幅のための精製された特異遺伝子 DNA をもたらす排泄物の均等質量 | 0.18 グラム |

*改良された磁石構成に関するテキストを参照されたい。

【配列表】
0006040226000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/485,386
(32)優先日 平成23年5月12日(2011.5.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/485,448
(32)優先日 平成23年5月12日(2011.5.12)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 110000338
特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
(72)発明者 ブルーインスマ, ジャネル ジェイ.
アメリカ合衆国, ５３７０４ ウィスコンシン州, マディソン, ホアード ストリート ２６２９
(72)発明者 ドメニコ, ミシェル ジェイ.
アメリカ合衆国, ５３５６２ ウィスコンシン州, ミドルトン, エリントン ウェイ ８４９２
(72)発明者 リドガード, グラハム ピー.
アメリカ合衆国, ５３７１７ ウィスコンシン州, マディソン, ティンバー ウルフ レーン ８９２１
(72)発明者 ゾウ, ホンジー
アメリカ合衆国, ５３５６２ ウィスコンシン州, ミドルトン, ＃２１０, プレザント ビュー ロード １０６６
(72)発明者 ウェイズバーグ, ウィリアム ジー.
アメリカ合衆国, ９２１２８ カリフォルニア州, サン ディエゴ, ビア メダノス １１７３８
(72)発明者 シノーイ ヘマンス ディー.
アメリカ合衆国, ５３５９３ ウィスコンシン州, ベローナ, ミリタリー リッジ ドライブ ４２１
(72)発明者 ライト, ザ セカンド, ジェームズ, ピー.
アメリカ合衆国, ５３５６２ ウィスコンシン州, ミドルトン, シューティング スター アベニュー ４５３５

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 特表２０１０－５３３８５１（ＪＰ, Ａ）
特表２０１０－５３３８５３（ＪＰ, Ａ）
特開２０１０－２７９３７４（ＪＰ, Ａ）
Teegan Trochimchuk et al., A comparison of DNA extraction and purification methods to detect Escherichia coli O157:H7 in cattle manure, Journal of Microbiological Methods, ２００３年, Vol.54, pp.165-175
BEN SHAMES et al., Identification of Widespread Helicobacter hepaticus Infection in Feces in Commercial Mouse Colonies by Culture and PCR Assay, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, １９９５年, pp.2968-2972

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ
Ｃ１２Ｍ
Ｃ１２Ｑ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）