

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4554080号  
(P4554080)

(45) 発行日 平成22年9月29日(2010.9.29)

(24) 登録日 平成22年7月23日(2010.7.23)

| (51) Int.Cl.   |              | F I              |                 |
|----------------|--------------|------------------|-----------------|
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/09</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 A |
| C 1 2 Q        | 1/68         | (2006.01)        | C 1 2 Q 1/68 A  |
| G O 1 N        | 33/50        | (2006.01)        | G O 1 N 33/50 P |

請求項の数 41 (全 23 頁)

|               |                               |           |  |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2000-562562 (P2000-562562)  | (73) 特許権者 | 500150366                                |
| (86) (22) 出願日 | 平成11年7月30日 (1999.7.30)        |           | アンバイオン, インコーポレイテッド                       |
| (65) 公表番号     | 特表2002-521071 (P2002-521071A) |           | アメリカ合衆国テキサス州78704, オースティン, ウッドワード・ストリート  |
| (43) 公表日      | 平成14年7月16日 (2002.7.16)        |           | 2130, ナンバー200                            |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US1999/017375             | (74) 代理人  | 100099623                                |
| (87) 国際公開番号   | W02000/006780                 |           | 弁理士 奥山 尚一                                |
| (87) 国際公開日    | 平成12年2月10日 (2000.2.10)        | (74) 代理人  | 100096769                                |
| 審査請求日         | 平成18年7月26日 (2006.7.26)        |           | 弁理士 有原 幸一                                |
| (31) 優先権主張番号  | 09/127, 435                   | (74) 代理人  | 100107319                                |
| (32) 優先日      | 平成10年7月31日 (1998.7.31)        |           | 弁理士 松島 鉄男                                |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       | (72) 発明者  | レイダー, エリック・エス                            |
|               |                               |           | アメリカ合衆国テキサス州78727, オースティン, ブロッサムウッド・ドライブ |
|               |                               |           | 12410                                    |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞および組織試料中にRNAを保存するための方法および試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

無傷のままの少なくとも1の細胞を含む試料中のRNAの保存方法であって、硫酸アンモニウム塩又は硫酸セシウム塩を含むRNA保存液により試料を処理するステップを含み、ここで、前記塩は、細胞に浸潤し、RNAをヌクレアーゼから保護し、溶液の最終塩濃度は30g/100mlからその塩の飽和濃度の間である、方法。

【請求項2】

塩が、30g/100mlから80g/100mlの濃度の硫酸アンモニウムである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

RNA保存液が、少なくとも2種類の塩の組み合わせを含む請求項1に記載の方法。

【請求項4】

塩の総濃度が、30g/100mlから100g/100mlである請求項3に記載の方法。

【請求項5】

RNA保存液が、二価カチオンのキレート剤を含む請求項1に記載の方法。

【請求項6】

RNA保存液が、緩衝液を含む請求項1に記載の方法。

【請求項7】

RNA保存液のpHが、4から8である請求項1に記載の方法。

10

20

## 【請求項 8】

試料が、細胞懸濁液である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

試料が、固体組織試料である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

試料が、血液試料である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

試料が、水試料である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

試料が、生物体全体を含む請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 13】

生物が、組織試料またはその他の生物内に存在する病原体である請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

保存された RNA の単離ステップを更に含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

RNA が -20 より高い温度で単離される請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

RNA の単離前に試料が RNA 保存液に保存されている請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 17】

組織が -20 から 37 で凍結されずに保存されている請求項 16 に記載の方法。

20

## 【請求項 18】

試料が 0 より高い温度で保存されている請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

(i) 細胞に浸潤し、RNA をヌクレアーゼから保護する RNA 保存液と、ここで、RNA 保存液は硫酸アンモニウム塩又は硫酸セシウム塩を含み、溶液の最終塩濃度は 30 g / 100 ml からその塩の飽和濃度の間である、

(ii) 試料から RNA を抽出する試薬と  
を含んでなる、無傷のままの少なくとも 1 の細胞を含む試料中の RNA を保存し、前記試料から RNA を単離するためのキット。

30

## 【請求項 20】

RNA を抽出する試薬が、グアニジニウムを基剤とする RNA 抽出試薬である請求項 19 に記載のキット。

## 【請求項 21】

RNA を抽出する試薬が、塩化リチウムを基剤とする RNA 抽出試薬である請求項 19 に記載のキット。

## 【請求項 22】

液体中で硫酸アンモニウム塩又は硫酸セシウム塩と試料とを混合して、細胞に浸潤し RNA をヌクレアーゼから保護する RNA 保存組成物を形成するステップを含み、ここで、溶液の最終塩濃度は 30 g / 100 ml からその塩の飽和濃度の間である、無傷のままの少なくとも 1 の細胞を含む試料中の RNA の保存方法。

40

## 【請求項 23】

試料と塩の混合前に、試料が液体に含まれている請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

試料が血液細胞であり、液体が血清である請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 25】

液体が、水である請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 26】

液体が、緩衝液である請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 27】

50

試料と液体とを混合する前に、塩が固体である請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

試料と塩とを混合する前に、塩が液体に含まれている請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 9】

塩が 3 0 g / 1 0 0 m l から 8 0 g / 1 0 0 m l の濃度の硫酸アンモニウムである請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 0】

R N A 保存組成物が、少なくとも 2 種類の塩の組み合わせを含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 1】

R N A 保存組成物が、二価カチオンのキレート剤を含む請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 2】

R N A 保存組成物が、緩衝液を含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記緩衝液の p H が、4 から 8 である請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

保存された R N A の単離ステップを更に含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

R N A が - 2 0 より高い温度で単離される請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

R N A の単離前に試料が保存されている請求項 3 4 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

試料が 0 より高い温度で保存されている請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

無傷のままの細胞を含む、R N A を含む試料と、液体と、R N A をヌクレアーゼから保護するのに十分な濃度の 3 0 g / 1 0 0 m l からその塩の飽和濃度の間である濃度の硫酸アンモニウム塩又は硫酸セシウム塩とを含んでなる、試料中の R N A 保存用組成物。

【請求項 3 9】

緩衝液を含む請求項 3 8 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

p H が 4 から 8 である請求項 3 9 に記載の組成物。

30

【請求項 4 1】

二価カチオンのキレート剤を含む請求項 3 8 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

背景技術

本発明は、1998年7月31日に出願された同時継続中の米国特許出願番号09/127,435の一部継続出願である。上記明細書全ての本文全体は、特にことわりがなければ、引用することにより本明細書の一部を成すこととする。

【0 0 0 2】

40

1. 発明の分野

本発明は、分子生物学の領域に関するもので、RNA単離前に組織または細胞試料中のリボ核酸(RNA)を保存し、分解から保護するための新しい方法と試薬を提供するものである。

【0 0 0 3】

2. 関連技術の説明

高品質かつ無傷のRNAを入手することは、多くの基礎分子生物学実験を実施するために、第一の、しばしば最も重要なステップである。無傷RNAは、ノーザンブロッティング法、ヌクレアーゼ保護分析、RT-PCRによるRNA発現の定量および定性分析に必要である。

【0 0 0 4】

新鮮(または急速凍結)細胞または組織から無傷RNAを単離する方法を記述した多数の報告

50

が発表されている。これらの技術の殆どが、急速に細胞を破壊するステップを利用しており、この場合、組織はカオトロピック剤(例えば、グアニジニウム塩またはリチウム塩)を含む強力なタンパク質変性溶液に分散される。この急速な細胞膜の破壊と内在性リボヌクレアーゼの不活化が、RNAの分解防止に重要である。

#### 【0005】

高品質のRNAを入手するためには、細胞溶解中に遊離されるRNase活性を最小限に抑え、それ以外に由来するRNAの分解を防止する必要がある。これは、組織を破壊すると同時にRNaseを不活化または阻害する単離方法を利用することにより通常達成される。内在性リボヌクレアーゼ含有量が低い試料の場合、単離プロトコールは、膜を可溶化する界面活性剤を含む抽出緩衝剤と、胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤またはバナジリリボヌクレオシド複合体等のリボヌクレアーゼ阻害剤を通常利用している。無傷の組織または内在性リボヌクレアーゼ含有量が高い細胞のようなより困難な試料からのRNAの単離は、より積極的な方法を要求する。これらの場合、組織または細胞は、ヌクレアーゼを不可逆的に不活化し、細胞膜を可溶化するために、強力なタンパク質変性剤(通常はグアニジウムイソシアネート)中に急速にホモジェナイズされる。組織試料を迅速にホモジェナイズできない場合には、液体窒素に浸して急速凍結し、-80 で保存しなくてはならない。この方法で凍結された試料は、RNA単離前に絶対に解凍してはならない。さもないと、凍結時に起こる細胞溶解時に遊離されたりボヌクレアーゼにより、RNAが急速に分解される。組織は、液体窒素のプールに浸し、乳鉢と乳棒で微細粉末に粉碎しなくてはならない。粉末化したら、まだ凍結している組織をRNA抽出緩衝剤中でホモジェナイズする。実験室において、RNA抽出を延期するために試料を急速凍結することは、実施処理時間を大幅に遅延する点で不利である。複数の試料を液体窒素と乳鉢および乳棒で処理することは、非常に面倒である。

#### 【0006】

実験室環境外では、急速凍結は益々不都合であるが、本技術分野においてはなお必要と見なされている。分析検体を収集する本分野の科学者達は、高速ホモジェナイザーを扱うことはない。彼らは、超低温フリーザーに移せるまで、試料を保存するのに十分量の液体窒素またはドライアイス維持することを余儀なくされている。同様に、病理学者はRNAを保存するために検体を通常の手法では急速凍結していないので、ヒト生検試料から抽出されるRNAは、普通一部または殆どが分解されている。

#### 【0007】

急速凍結方法により調製されなかった保存試料からRNAを単離する試みがなされている。例えば、Esser et al., 1995は、RNase阻害剤を含む5%酢酸、95%エタノールにより固定された細胞から全長のRNAを単離したと主張している。しかし、この論文において、懸濁液中の単離細胞は、-20 の酢酸/エタノール溶液において固定され、比較的短時間4 で維持された。残念ながら、本発明者によるテストによれば、Esser et al.の95%エタノール/5%酢酸溶液は、本発明により必要とされる実施基準を満たしていない。4 で20時間保持された懸濁液中の組織試料と脾臓細胞の両者から回収されたRNAは、一部分解されているように見えたが、環境温度で保存された組織から単離されたRNAは完全に分解されていた。Esser et al.により報告された実験により、この方法は、エタノールにより引き起こされた細胞からの漏出により、RNAの喪失を引き起こすことが示されている。この方法を用いると、70%のRNAが固定後直ちに消失し、1時間後には80%のRNAが消失する。更に、組織試料および脾臓細胞を25 の95%エタノール/5%酢酸溶液に一晩保存したテストでは、細胞および組織試料のRNAは共に完全に分解した。データは、図1に示してある。

#### 【0008】

高純度で無傷のRNAを使用することは、ノーザンブロット法、ヌクレアーゼ保護分析、RT-PCRおよび医学的診断の様な種々の分子生物学的分析および実験を実施するための基本である。RNA固有の不安定性と試料中にRNaseが存在することにより、無傷RNAの単離は困難である。更に、RNA含有試料の単離と分析は、典型的には、時間と手間を要する。分子生物学実験室の人為的ミスによるRNase汚染は破滅的結果に至る可能性がある。従って、RNAの単離および分析方法を更に鋭敏に、更に特異的に、更に迅速に、更に使いやす

10

20

30

40

50

く、人為的ミスと取り扱いの可能性を更に減少させるための改善された技術を開発する必要がある。従って、自動化されたRNA保存プロトコルを利用することは、多くの事例において研究施設にとって有利である。例えば、効率的な自動化されたRNA保存法および分析法のために、本発明を、迅速RNA分析技術または集積核酸診断装置(米国特許No.5,726,012、米国特許No.5,922,591。これらの文献は、引用することにより本明細書の一部を成すこととする)と組み合わせることができる。

#### 【0009】

米国特許No.5,256,571は、哺乳動物細胞を固定するために十分な量の水混和性アルコール、抗凝集剤、緩衝剤を含む細胞保存溶液を報告している。少なくとも1件の報告において、Dimulescu et al.は、RNA単離前に子宮頸癌細胞と臍帯血液リンパ球を保存するためのこの固定剤を利用することを明らかに報告している。

10

#### 【0010】

多くの文献が、エタノールとアセトンの組み合わせが、保存組織から将来核酸を回収するための最良の公知の固定剤であることを示唆している。それにもかかわらず、発明者等の研究を考慮すると、この様なエタノール/アセトン混合物はRNA保存液の所望の特性の全ては提供していない。この混合物は環境温度においてRNAを保護せず、固体多細胞試料中のRNAの保存を考慮に入れておらず、可燃性でもあり、一般的用途の試薬として本質的に魅力に欠ける。

#### 【0011】

固定あるいは保存された組織試料からRNAを保存または回収するための周辺関連技術が幾つかある。これらの報告には、組織試料中のRNAを(回収ではなく)検出するin situハイブリダイゼーションにより得られるシグナルを最大限にするための組織固定剤の多数の適性評価が含まれる(例えば、米国特許No.5,196,182および5,260,048)。その他の報告は、PCR™による限定分子分析のために固定組織から断片化されたRNAを回収する方法を詳細に記述している(Koopman et al., Foss et al., Stanta et al., Houze et al.)。この断片化されたRNAを回収するために、典型的には、試料はプロテイナーゼKを用いて処理され、組織の構成成分を分解され、次いでグアニジニウムを基剤とする溶液を用いて抽出される。固定組織から回収されるRNAは、極めて品質が低く、平均すると約200塩基の大きさである(Stanta 1991)。これは、内因性RNase活性と固定中の細胞内基質におけるRNAの架橋結合とを含む多くの要因によるものと思われる。RNAは殆ど分解されているので、ノーザンブロットング分析またはヌクレアーゼ保護分析に利用できない。RT-PCRには使用できるが、非常に小さな断片の増幅に限られる。

20

30

#### 【0012】

硫酸アンモニウムを使用して、溶液からタンパク質を沈殿させる方法は公知であるが、発明者の知る限り、RNAを保存するために硫酸アンモニウムを使用する方法は、本技術において公知ではない。2件の報告において、哺乳動物のリボヌクレアーゼAの折り畳みと活性を研究するために硫酸アンモニウムの利用が報告されている(Allewell et al., and Lin et al.)。Allewell et al.は、リボヌクレアーゼAの折り畳みと活性に及ぼす硫酸アンモニウムの影響を検討した。pH5.5で、リボヌクレアーゼAの活性は、広範囲にわたる硫酸アンモニウム濃度において未処理対照濃度の約10%まで抑制される。この活性抑制は著者等の予想通りであり、塩により引き起こされたタンパク質変性作用によるものと思われる。残念ながら、10%のRNase活性でさえも、試料中のRNAを経時的に顕著に分解した。従って、多くの適用例において、この阻害作用はRNAを保護するためには不十分である。硫酸アンモニウムがpH7.0の時、予想通り低濃度ではRNaseAの活性は抑制されるが、意外なことに、より高濃度(3M)では未処理対照の110%に上昇する。著者等は、中性pHと高濃度の塩の組み合わせがタンパク質を交互の高活性構造に再生すると理論づけている。しかし、Allewell et al.のグループは、多くのRNaseを含む細胞試料においてではなく、溶液中の純粋なRNaseAの活性を検討していた。

40

#### 【0013】

上記の見地から、環境温度付近または環境温度において組織試料から高品質の無傷RNAを

50

保存および回収できる方法と試薬が必要とされている。

【0014】

#### 発明の概要

本発明は、RNA単離前に、数日から数ヶ月の長期間、保存剤の凝固点以上の温度において、組織断片中のRNAを保存するための新しい方法と試薬に関する。本明細書に報告されているものと類似の試薬または方法を開示した報告は過去には全くない。この躍進的方法により、RNAを抽出するために直ちに試料を処理する必要性も、あるいは液体窒素またはドライアイスが供給される場所においてのみ組織を単離しなくてはならないという制限も緩和される。

【0015】

本明細書は、(1)RNAを含む試料を入手して、(2)試料に浸潤するRNA保存液を用いて試料を処理して、RNAをヌクレオチドから保護することを含むRNA保存液の組成物とRNAを保存する方法に関する。好ましい一実施例において、RNA保存液は、試料中の細胞タンパク質と共に試料中のRNAの沈殿を引き起こす。このRNAと細胞タンパク質の共沈により、物理的にRNAはヌクレアーゼに接触できなくなり、同時にRNA保存液の作用によりヌクレアーゼの作用は不活化または阻害される。

【0016】

幾つかの好ましい実施例において、RNA保存液は、細胞タンパク質と共に試料中のRNAを沈殿させる塩を含む。現在のところより好ましい実施例において、硫酸塩、例えば、硫酸アンモニウム、重硫酸アンモニウム、硫酸セシウム、硫酸カドミウム、硫酸セシウム鉄(II)、硫酸クロム(III)、硫酸コバルト(II)、硫酸銅(II)、硫酸リチウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸カリウム、硫酸ナトリウムまたは硫酸亜鉛である。

【0017】

塩を含むRNA保存液において、塩は、典型的には、細胞タンパク質と共に試料中のRNAを沈殿させるのに十分な濃度で存在する。塩は典型的には、20g/100mlから塩の飽和濃度の濃度で存在する。具体的には、塩濃度は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140または150g/100mlが可能で、これらの濃度のいずれか2つの値の間に定義される濃度範囲も可能である。

【0018】

勿論、使用中、例えば、試料中の液体により塩濃度が多少希釈される場合がある。従って、これらの塩濃度は使用時の最終塩濃度よりも高くてもよい。更に、本発明に関して飽和濃度を上回る塩量を使用される場合が企図されている。この様な実施例において、塩はRNA保存液に溶解されない状態で存在できる。これはRNA保存液のRNA保存能に影響は及ぼさないうちである。事実、飽和濃度以上の塩を含む保存液は、保存液が液体試料に添加される適用例において用途がある。この様な場合、液体試料に添加時、添加前に溶解されていない塩が液量増加のため溶解される可能性がある。従って、最終塩濃度は、飽和塩濃度または飽和塩濃度以下の保存液が使用された場合に可能な濃度よりも高濃度が可能である。

【0019】

20g/100ml以上の溶解度を有する好ましい塩は、硫酸アンモニウム、重硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、硫酸セシウム、硫酸カドミウム、硫酸セシウム鉄(II)、硫酸クロム(III)、硫酸コバルト(II)、硫酸銅(II)、塩化リチウム、酢酸リチウム、硫酸リチウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、塩化カリウム、硫化ナトリウム、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化亜鉛、酢酸亜鉛、または硫酸亜鉛である。

【0020】

好ましい一実施例において、塩は20g/100mlから100g/100ml、30g/100mlから100g/100mlまたは30g/100mlから80g/100mlの濃度の塩化アンモニウムである。現行の好ましい市販例において、塩は70g/100mlの濃度の硫酸アンモニウムである。

【0021】

本発明は、硫酸アンモニウムの使用に制限されず、以下の理由により、その他の塩または

10

20

30

40

50

化合物も組織試料および細胞試料中のRNAを保護するために有用である。個々のタンパク質の溶解度は、水性環境のpHと塩濃度に主として左右される。殆ど全てのタンパク質が純粋な水に不溶である。保存液のイオン強度が高くなるにつれ、タンパク質は溶けやすくなる。これは、タンパク質の「塩溶」として知られている。あるイオン強度を超えると、タンパク質の溶解度は低下する。この低下が生じる条件は各タンパク質/塩の組み合わせに固有である。事実、ある塩濃度で、あるタンパク質は完全に不溶であるが、別のタンパク質は溶解度が最大となる。この現象は、「塩析」として知られている。ある塩は、他の塩よりも高濃度でより極めて劇的な塩析作用を有する(例えば、 $\text{NO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{酢酸塩}^- < \text{SO}_4^{2-}$ )。この現象はイオンに備わった固有の特徴の結果である(例えば、大きさ、水和性、大きさ、その他)。本RNA保護液は、高濃度の塩の塩析作用に基づくものと考えられている。その理論は、組織試料または細胞試料中のタンパク質の塩析により、RNA保護タンパク質/RNA複合体の形成を引き起こすというものである。本適用にとって「塩析」現象の重要性は幾点もある。

10

#### 【0022】

第一に、高濃度の塩を使用するタンパク質沈殿によるRNA保護の効果が複雑であり、またある処方において特定のイオン強度(塩濃度)とpHの組み合わせが、他のpHまたは濃度よりも特定の塩を遥かに有効とする可能性があることを強調している。第二に、本適用における試薬による作用の基本機序の確固たる科学的基盤を提供し、本発明の範囲内の更なるRNA保護化合物を探索する指針となる。別の塩または推定されるRNA保護化合物が本発明の方法および試薬において機能するかどうかを決定するには、単に塩または化合物を入手し、具体例に記述されている方法で実験するだけでよい。具体例の支持に従うことにより、本技術に精通する者は、候補物質が実際にRNA保護化合物であるかどうか容易に明らかにすることができる。第三に、細胞内タンパク質の沈殿が、in situでRNAを保護する鍵であり、これによって、殆どの適用に必要な保護作用には至らないが、なぜアルコールやアセトン(異なる機序によるが、タンパク質を沈殿することが可能な試薬)組織のRNA保護作用を部分的に発揮するかが説明される。

20

#### 【0023】

幾つかの実施例において、RNA保存液は、細胞タンパク質と共に試料中のRNAを沈殿させる少なくとも2種類の塩の組み合わせを含む。この方法において、ある塩の総濃度は20g/100mlを超えない可能性がある。しかし、予想される好ましい実施例において、少なくとも2種類の塩の組み合わせは、細胞タンパク質と共に試料中のRNAを沈殿させるのに十分な総塩濃度で存在する。幾つかの実施例において、総塩濃度は20g/100mlから100g/100mlである。

30

#### 【0024】

RNA保存液は、更にエタノール、メタノール、アセトン、トリクロロ酢酸、1-プロパノール、2-プロパノール、ポリエチレングリコール、または酢酸を更に含むことができる。これらの更なる可能な成分は、保存細胞中のタンパク質を沈殿させることが可能で、これによってRNAを保護する。しかし、これらの更なる可能な成分は、塩ではない。幾つかの実施例において、本明細書に報告されている発明のRNA保存液の1つを入手するために、一定濃度の塩と組み合わせるこれらの有機溶媒を利用することが予測される。例えば、20g/100ml以下の塩と組み合わせるこれらの有機溶媒の1種類以上の組み合わせにより、本発明の発明の目的を達成することが予測される。

40

#### 【0025】

幾つかの実施例において、RNA保存液は、硫酸アンモニウム、重硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、硫酸セシウム、硫酸カドミウム、硫酸セシウム鉄(II)、硫酸クロム(III)、硫酸コバルト(II)、硫酸銅(II)、塩化リチウム、酢酸リチウム、硫酸リチウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マンガン、塩化マンガン、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化亜鉛、酢酸亜鉛、または硫酸亜鉛等の塩と、メタノール、トリクロロ酢酸、1-プロパノール、2-プロパノール、ポリエチレングリコール、または酢酸を含む。更に、RNA保存液は二価

50

カチオンのキレート剤、例えば、EDTAを含むことができる。

【0026】

典型的には、RNA保存液は、一定のpHを維持できるように、緩衝剤を含む。例えば、緩衝剤は、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸カリウム、または酢酸カリウムが可能である。現行の好ましい市販されている実施例において、緩衝剤は酢酸ナトリウムである。典型的には、RNA保存液のpHは、4から8である。現在好ましい市販されている実施例では、pH5.2である。

【0027】

RNA保存液に保存されている試料は、多種類の試料のいずれでもよい。例えば、試料は、骨髄吸引液、白血球、精子、血液、血清、血漿、細菌、組織培養細胞または藻類のような細胞の懸濁液が可能である。あるいは、試料は例えば、心臓、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、精巣、卵巣、腫瘍、組織生検材料、植物の茎、根、葉等の固体組織が可能である。場合によっては、試料は生物体全体を含む。例えば、生物体は魚、昆虫、オタマジャクシ、サンゴ、胚が可能である。プロトコールの中には、解離中にRNA保存液に生物体または試料が保持されていることが有利である。例えば、試料が組織試料またはその他の生物体内部で病原体である生物体を含む場合、RNA保存液の中で生物体を解離するのが有利な場合がある。この方法で、病原体のRNAを保存できる。更に、組織試料またはその他の生物体のRNAも保存される。

10

【0028】

多くの好ましい実施例において、本発明の実施例には、保存されたRNAの単離ステップが更に含まれる。本RNA保存液の長所の1つは、従来技術で可能であったよりも高温で組織からRNAを単離できる点である。例えば、-20よりも高い温度でRNAを単離できる。事実、RNAは室温で単離できる。

20

【0029】

場合によっては、RNA単離前にRNA保存液の中に試料を保存できる。例えば、組織は凍結されずに、-20から45で保存される。RNA保存液の塩含量によっては、試料は-20で凍結しない。好ましい実施例において、試料は0以上で保存できる。

【0030】

本発明は、(1)試料に浸潤し、ヌクレアーゼからRNAを保護または単離するRNA保存液と、(2)試料からRNAを抽出する試薬とを含んでなり、試料中にRNAを保存し、試料からRNAを単離するためのキットも意図している。幾つかの実施例において、RNA抽出試薬は、有機溶媒を含まないRNA抽出試薬である。更に、RNA抽出試薬は、グアニジニウムを基剤とするRNA抽出試薬が可能である。あるいは、RNA抽出試薬は、塩化リチウムを基剤とするRNA抽出試薬である。

30

【0031】

本発明のその他の実施例において、RNAを保存する方法は、RNA含有試料を入手し、塩を供給し、試料に浸潤させ、RNAをヌクレアーゼから保護するRNA保存組成物を形成するために試料と塩を液体の中で混合することを含む。一実施例において、試料は、試料を塩と混合する前の段階で液体に含まれている。別の実施例において、塩は、試料と液体を混合する前の段階で固体である。更なる別の実施例において、塩は、試料と塩を混合する前の段階で、液体に含まれている。

40

【0032】

本発明の一実施例において、試料は血球であり、液体は血清である。別の実施例において、試料は尿である。他の実施例において、液体は水である。更なる別の実施例において、液体は緩衝剤である。

【0033】

幾つかの実施例において、RNA保存組成物は、RNA含有試料を入手し、塩を供給し、試料と塩を液体中で混合することを含む。液体は、試料の成分でも、試料と塩に添加されてもよい。塩は典型的には、細胞タンパク質と共に試料中のRNAを沈殿させるのに十分な濃度で存在する。塩は典型的には、溶液中の最終濃度が20g/100mlから塩の飽和濃度の間となる

50

様に添加される。場合によっては、非常に高濃度の塩、飽和塩または過飽和塩を液体試料に添加するのが効率的である。最終液体試料中の塩濃度が飽和濃度を上回る可能性がある量の塩を添加するのは、RNA保存濃度に速やかに到達でき、かつある試料中の特定濃度に到達するのに必要な塩の量を念入りに検討する必要がなくなる点で有利である。更に、溶解しない塩はいずれも、組成物のRNA保存特性に影響を及ぼさない。特に、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140または150g/100mlの最終濃度が用いられ、これらの濃度のいずれか2つの間に定義される濃度範囲も可能である。場合によっては、試料中の液体の容量が増えるため、塩が更に溶解するとの前提で、塩濃度が飽和濃度以上の塩を含む液体が利用される。

【0034】

好ましい実施例において、塩は硫酸塩で、この場合、塩は硫酸アンモニウムである。硫酸アンモニウムは、20g/100ml から塩の飽和濃度の間の最終濃度で溶解されて存在する。好ましい実施例において、塩は30g/100mlから80g/100mlの間の最終濃度で溶解されている。他の実施例において、RNA保存組成物は、少なくとも2種類の塩を含み、この場合総塩濃度は、溶解された状態で20g /100mlから100g/100mlの間の最終濃度である。別の実施例において、RNA保存組成物は、二価カチオンのキレート剤である。更なる別の実施例において、RNA保存組成物は

緩衝剤を含み、この場合前記緩衝剤のpHは4から8である。

【0035】

本発明の固体成分(例えば、塩、緩衝剤、シェルター)は、水性試料に添加されたとき、溶解されて所望の最終成分濃度となるように調製される。固体成分は更に、RNA保存組成物の所望の特性を提供する粉末、錠剤、丸剤、またはその他の適切な製剤として供給できる。固体成分は、試料に直接添加する、試料/液体混合物に添加する、あるいは試料または試料/液体混合物の収集前に収集容器に添加することができる。所望の固体特性を提供するために(例えば、溶解度、保存安定性、粒子分散性を改善するために)、マンニトール、乳糖、デンプン、セルロース等の賦形剤および充填剤を添加することも、粉末、錠剤、丸剤の処方時に考慮される。本発明の固体成分は、試料収集前、試料収集後、それらを組み合わせ合わせたあらゆる段階で添加できる。

【0036】

本発明の一実施例において、固体または液体RNA保存組成物の予め測定されたを試料収集容器に入れ、適切な容量のRNA含有試料を加えることができる。次に、収集容器を激しく揺り動かし、RNA保存組成物の固体成分を全て溶解し、操作者がRNA試料に接触するのを最小限に留める。例えば、固体RNA保存組成物は前記塩のいずれでもよい。従って、本発明の特定の実施例において、前記の様に、血液または尿の様な生体検体中にRNAを安定化させることが企図される。

【0037】

一具体例において、尿または血液のような検体収集容器は、RNA保存組成物の予め測定されたアリコートを入れることができる。前記検体収集直後、容器を激しく揺り動かし、RNA含有検体(すなわち試料)をRNA保存組成物と混合する。迅速な収集とRNA含有試料の混合に、外側に突出した針を含む真空採血管を本発明に使用することが企図されている(米国特許No.5,090,420、引用することにより全体を本明細書の一部を成すこととする。)。一実施例において、自動RNA保存が企図されている。自動RNA保存法は、使用に長時間を要さず、迅速、容易であり、人為的ミスおよび操作の可能性が低い。

【0038】

郵送用に改変された臨床検体収集キットをRNA保存組成物の予め測定された部分標本と共に使用することが企図されている(米国特許No.5,921,396、引用することにより全体を本明細書の一部を成すこととする。)。RNA含有試料を収集し(例えば、検査施設から離れた場所で)、容器に供給されているRNA保存組成物の予め測定された部分標本と混合し、適切なRNA分析施設に発送するためにRNAを保存することができる。

【0039】

10

20

30

40

50

あるいは、RNA保存組成物を錠剤または丸剤に圧縮し、ばらで保存することができる。錠剤は保存に好都合な組成物で、あらゆるタイプの容器中のあらゆるサイズの試料に正確な量を加えることができる。従って、本発明の他の実施例において、貯水池、下水処理場、または酪農産業から生じる試料の野外収集に使用するための錠剤または丸剤の形態のRNA保存成分が企図されている。場合によって、予め決定された最終塩濃度または過飽和塩を含むRNA保存組成物をまとめてパッケージとして供給することができる。RNA保存塩または過飽和塩のパッケージは、分析機器のスペースや資源が限られている可能性があるため、野外検査において特に有用と思われる。例えば、パッケージは、1ml、5ml、10mlの試料用にアリコートとして予め決定され、包装された状態で供給される。勿論、種々の塩量を含むあらゆるサイズのパッケージを、無水粉末、含水粉末として、あるいは粉末と液体を別々に、あるいはそれらを組み合わせて供給できる。従って、試料中のRNAを保存するために、試料にパッケージの中身を加えて、混合するだけでよい。

10

**【0040】**

固体成分のRNA保存組成物を使用する幾つかの利点は、保存および輸送時の重量が少なく、済み、固体成分は流出しにくく、容量を小さくすることができる(すなわち、乾燥試薬を用いて試料を保存することにより、試料の最終容量は最小限に留まる。)

**【0041】**

本発明の他の実施例において、RNA保存組成物は更に、保存されたRNAの単離を含み、この場合RNAは-20以上の温度で単離される。他の実施例において、試料はRNA単離前に保存され、この場合試料は0以上で保存される。

20

**【0042】**

特定の実施例における、RNA含有試料、液体、RNAをヌクレアーゼから保護するのに十分な濃度の塩から成る物質の組成物。好ましい実施例において、塩は硫酸塩で、この場合硫酸塩は硫酸アンモニウムである。他の実施例において、組成物は少なくとも2種類の塩の組み合わせを含む。別の実施例において、組成物はpH4から8の緩衝剤を含む。更に別の実施例において、組成物二価カチオンのキレート剤を含む。

**【0043】**

発明者の研究により、pH7.0の3M硫酸アンモニウムは、極温(37-42)以外の全ての温度において無傷組織試料中の無傷RNAの保存に極めて有効である。試料に適用時に、硫酸アンモニウムは組織と細胞内に拡散し、保護された複合体の中に細胞タンパク質を沈殿させる(in vivoで多種多様のタンパク質と密接な関係にあるRNAも恐らく一緒に)。更に、細胞質小胞に存在するRNaseも沈殿し、細胞RNAに接近できなくなる。

30

**【0044】**

本発明の作用機序とAllewellらの作用機序は、異なるものであると信じられている。本発明の作用機序が、Allewell et al.の報告において観察されたものと同一であったならば、発明の緩衝剤に保存された組織から単離されたRNAは分解するものと予測される。Allewell et al.は、pH5のリボヌクレアーゼが標準pHよりも活性が高いことを報告している。従って、RNAlater™が同一の機序により作用するとすれば、リボヌクレアーゼ活性の上昇が予想される。明らかに、これはRNA保存組成物のRNA保存能を制限するものである。このような分解が起こらないという観察結果に基づき、本発明はAllewell et al.によって報告された機序と異なる機序によって作用している。

40

**【0045】**

「RNAlater™」は、本明細書に開示されているRNA保存液の特定の市販処方of Ambion社の登録商標である。一般に、「RNAlater™」という言葉は、具体例2に開示されている処方を示すために使用されており、これはpH5.2の25mMクエン酸ナトリウム、10mM EDTA、70g硫酸アンモニウム/100ml溶液を含む。この試薬は、高濃度の硫酸アンモニウムを細胞に急速に浸潤させ、細胞タンパク質の塊状沈殿を発生させることにより機能する。重要なことは、細胞構造が無傷のままである点である。この利点は、細胞を保存でき、組織学的になお同定できる点である。

**【0046】**

50

長年の特許法に従って、請求項または明細書に単語「含む(comprising)」と組み合わせて使用されている単語「a」または「an」は、1つ以上を意味する。

【0047】

#### 実施例の説明

本発明は、分子生物学の領域に関するもので、RNA単離前に組織または細胞試料中のリボ核酸(RNA)を分解させずに保存し、保護するための新しい方法と試薬を提供するものである。驚くべきことに、これが超低温保存または試料の破壊を行わずに達成される。例えば、研究者が分析のためにRNAを抽出する時間ができるまで、単離されたヒト生検組織をRNA保存液の中に入れ、長時間冷蔵保存することが可能である。

【0048】

以下の具体例は本発明の有用性を説明するものである。全ての具体例により、新鮮動物または植物組織、懸濁液に含まれた生体細胞またはRNAを含むその他の試料が利用されるようになる。本方法および組成物は、広範囲にわたる細菌、植物およびヒトを含む動物種由来のRNA保存に応用できる。Molecular Cloning, Laboratory Manual.(Maniatis,et al.)に記載されているように、これらの実験において回収されたRNA試料は、ホルムアルデヒド/アガロースゲル電気泳動、臭化エチジウムによる染色、300nm紫外線を用いる照度により分析された。

【0049】

具体例は、本発明の好ましい実施例を説明するために含まれている。本技術に精通する者にとって、発明者により発見された代表的な技術に従う具体例において開示されている技術は、本発明の実施において十分機能するためのものであり、従って、本発明を実施するにあたり好ましい方法を構成するものと考えてよい。しかし、本技術に精通する者にとって、本開示に照らして、開示されている具体例に多くの変更が可能であり、本発明の精神と範囲を逸脱せずに同様の結果が得られることは明らかである。

【0050】

#### 具体例1

##### RNAが「無傷」であるかどうかを決定するためのRNA分析基準

発明者は、この様な試料が無傷性を評価するために考案されたRNAの分析を日常的に実施している。この基準は、RNAlater™、その他の発明のRNA保存液、またはその他の溶液中に保存された組織から回収されたRNAの品質を客観的に評価するために、後記の具体例において使用された。

【0051】

RNAは、“Molecular Cloning, a Laboratory Manual”(Maniatis, Fritsch, Sambrook編、Cold Spring Harbor Press)に記載されている基本的プロトコルを用いて、ホルムアルデヒドアガロースゲル上で電気泳動にかけて分析する。ゲル中のRNAを視覚化するために、挿入色素臭化エチジウムを試料に加える。臭化エチジウムが核酸の中に挿入されると、紫外線により蛍光を発生し、核酸が可視化される。無傷RNAは、異種mRNA(0.5キロベースから約10キロベース)の幅広のスミアとして観察され、これにバックグラウンドスミアに重なり、2つの非常に顕著な不連続なバンド(28Sと18SのリボソームRNA)が2:1の比率で共に観察される。18Sと28Sの間サイズの不連続なバンドは殆ど認められないはずである。部分的に分解されたRNAは、高分子ヘテロRNAの減少、複数の小さなリボソームRNA切断産物、28Sと18Sの2.1の比率の変動(28Sは分解を受けやすい)により特徴づけられる。極度に分解されたRNAは、28S対18S比が1:1より小さくなり、約2キロベースから0.1キロベース以下に小さくなった分解されたりリボソームRNAのスミアを示す。

【0052】

本明細書に使用されている様に、「部分的に分解された」という言葉は、28S:18S rRNA比が異常となり、1:1まで低くなることがあるが、rRNAバンドはまで明瞭であることを意味する。

【0053】

本明細書に使用されている様に、「殆ど分解された」という言葉は、28S:18S 比が1:1以

10

20

30

40

50

下となることを意味する。28Sは、殆ど視認できないが、28S rRNAのおよその位置から下に延びるスミアの中にまだ核酸が存在している。

本明細書に使用されている様に、「完全に分解された」という言葉は、18SrRNAの正常な位置より下の低分子量のスミアの中にのみRNAが存在することを意味する。

【0054】

#### 具体例2

##### 例となるRNAlater™保存液調製法

本具体例は、RNAlater™を調製する一方法を説明するものである。まず、以下の原液と試薬を入手する。即ち、0.5M EDTA 二ナトリウム、二水和物(18.61g/100ml、攪拌しながらNaOHを加えてpH8.0までとする)、1Mクエン酸ナトリウム三ナトリウム塩、二水和物(29.4g/100ml、攪拌して溶解)、硫酸アンモニウム、粉末状のもの、滅菌水である。

【0055】

ビーカーの中に、40mlの0.5M EDTA、25mlの1M クエン酸ナトリウム、700gmの硫酸アンモニウム、935mlの滅菌蒸留水を合わせ、低温のホットプレートスターで、硫酸アンモニウムが完全に溶解するまで攪拌する。冷却し、1MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて溶液のpHを調整する。ねじ口瓶に移し、室温または冷蔵保存する。

【0056】

#### 具体例3

##### RNA保存液中に組織を保存する一般的な例示的方法

RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の中に保存される組織試料は、できるだけ速やかに切除し、RNAlater™またはその他のRNA保存液の中に入れなくてはならない。組織試料の中には、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の浸潤を妨げる、葉のろう状コーティングまたは腎臓または精巣の被膜の様な、保護膜またはその他のバリアを有するものがある。これらの保護バリアは、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液が試料の中に速やかに浸潤できる様に、破壊しなくてはならない。更に、大きな試料は、拡散を最大にするために小さな断片に切断しなくてはならない。一般的指針として、試料の厚さは、少なくとも長さと同幅で0.5cmまでに制限される。懸濁液に含まれた細胞から成る試料は、損傷を与えず細胞を沈殿させるのに十分な重力で緩徐な遠心分離により少量に濃縮し、最小量の取り出した上清の中に再懸濁し、5倍量のRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液(v/v)と混合する。濃縮が不可能な場合には、細胞懸濁液を10倍量のRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液に溶解する。あるいは、RNAを保存するそれと異なる容量の溶液、必須溶液または固体RNA保存組成物を使用できる。緩衝剤は細胞を破壊しないので、後に遠心分離による濃縮が可能である。

【0057】

1週間未満保存される試料は、環境温度(25 )で保存できる。長期間安定させるには、試料は冷蔵すべきである。永久的に保存するには(数ヶ月から数年)、標準フリーザ(-20 )で保存できる。処理された試料からRNAを単離するには、組織試料を組織抽出緩衝液の中に直接移さなくてはならない。懸濁液中の細胞は遠心分離により沈殿させ、次いでRNA抽出緩衝液の中に再懸濁し、処理される。

【0058】

#### 具体例4

##### 新鮮組織試料中のRNAは不安定である。

新鮮マウス肝臓、精巣、脾臓試料(約0.5cm<sup>3</sup>)をRNAlater™または4Mのグアニジニウムイソチオシアネート(GITC)を基剤とするRNA抽出液、または水の中に4 にて12時間入れた。このグアニジニウム溶液は典型的なRNA抽出緩衝液である(また、Ambion社の市販されているToTally RNA™およびRNAqueous™キットにも含まれている。)。GITCは、殆ど全てのRNA単離プロトコールにおいて単独またはその他の試薬と組み合わせて試料される強力なカオトロピック剤である。一晚インキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析する。無傷RNAは、RNAlater™に保存された組織に対応するレーンにおいてのみ観察された。GITCに保存された試料から抽出されたRNAは極度に分

10

20

30

40

50

解していた。従って、GITCは、無傷組織試料中のRNAを保存しない。水または通常の生理食塩水の様な生物学的緩衝液に保存された動物組織は、同一の一晩インキュベーション後に測定可能なRNAを生じない。データを図2に示す。

【 0 0 5 9 】

#### 具体例5

組織中のRNAを保護する硫酸アンモニウムの有効濃度範囲の決定。

新鮮に単離されたマウス肝臓を、種々の濃度の硫酸アンモニウムを含む種々の推定されるRNA保存液の中に入れた。試料は、0、10%、20%、30%、40%、50%または70%硫酸アンモニウムを含んでいた。4℃で24時間インキュベーション後、RNAを試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。

10

【 0 0 6 0 】

硫酸アンモニウムを含まない試料において、観察された全てが低分子量のスミアである。リボソームRNAの特異的バンドは観察できない。10%硫酸アンモニウムでは、rRNAバンドを僅かに観察できる。20%硫酸アンモニウムでは、18Sバンドがより明らかで、予想される28S rRNAの位置から下に延びる分解された28S rRNAのスミアがより多く存在する。特異的な28Sバンドは観察されない。30%硫酸アンモニウムでは、28Sおよび18S rRNAバンドが視認できるが、分解が大量である(28S:18Sの異常な比率と観察された多くのスミアバンドに基づく)。40%硫酸アンモニウムを用いた試料は、殆ど無傷に見え、収率は30%よりも10倍高い。これらの実験は、組織RNAの保護にとって30-40%硫酸アンモニウムが最小必要条件であることを示唆しているが、有効濃度は組織の種類、組織断片の大きさ、保存温度、保存期間によって異なる。

20

【 0 0 6 1 】

より厳重なインキュベーション条件においては、RNAの保存により高濃度の硫酸アンモニウムが必要である。例えば、25℃においては組織試料中のRNAの保護に55g/100mlが必要であり、具体例6に記載されているように、37℃では組織試料中のRNAを最大限に保護するには、70g/100mlが必要と思われる。更に、試料が37℃において24時間55g以下の硫酸アンモニウムに保存された場合には、少なくとも幾つかの研究において、1:1の28S:18S rRNA比による判定に基づき、部分的に分解されたRNAを生じた。データを図3に示す。

【 0 0 6 2 】

#### 具体例6

pHと硫酸アンモニウム濃度を至適化することによる極温におけるRNAlater™の効力の増強

30

極温におけるpHと硫酸アンモニウムの影響を評価した。新鮮マウス肝臓を室温または37℃で24時間、4種類の処方テストRNA保存液の中で保存した。RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。pH7.0の55g/100mlの硫酸アンモニウムを含む処方は、環境温度で有効であったが、37℃ではRNAを完全には保護しなかった。低いpH(5.0)とより高濃度(70g/100ml)の硫酸アンモニウムの組み合わせは、元の処方よりも有効で、37℃で3日後に無傷のRNAを生じた。いずれか片方(低pHまたは高濃度の硫酸アンモニウム)だけを変えても、元の処方よりもRNAの安定性を明らかに増強することはなかった。データを図4に示す。

40

【 0 0 6 3 】

#### 具体例7

RNA保存液の有効性に対する硫酸アンモニウムの特異性。

テストRNA保存液の4種類の更なる処方を作製した。硫酸アンモニウムを飽和量の炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸カリウム、または硫酸マグネシウムと置き換えた。新鮮肝臓試料を25℃および37℃で3日間5種類の緩衝液の中でインキュベーションした。RNAを抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。対照の硫酸アンモニウムだけがRNAの分解を阻止した。保護を最大にするには、アンモニウムイオンと硫酸イオンの両方を高濃度にする必要があると思われる。硫酸アンモニウムは、水溶性が他の塩に比べて遥かに高く、塩含有量を非常に高くできるため、恐らく試験された塩の中で最も有効である

50

。この仮説は、2つの秘伝の(かつより高価な)塩である硫酸セシウム(極めて可溶性が高い、362g/100ml で飽和)と塩化セシウム(70g/100ml)を評価することにより検討された。これらの塩は(等しい質量で)具体例2に説明されている溶液と上記の処理された肝臓において、硫酸アンモニウムと置き換えられた。硫酸セシウムと塩化セシウムは、4 で肝臓RNAを部分的に保護した。まとめると、データは、被験塩の中で、硫酸アンモニウムが無傷組織において分解からRNAを保護する優れた能力を有することを示している。しかし、高濃度の他の塩に部分的保護作用が認められたことから、有効性に差はあるが、作用機序が共通であることが示唆される。データを図5に示す。

【0064】

#### 具体例8

RNAlater™の中で4 で保存された哺乳動物から単離されたRNA。

新鮮マウス脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓(レーン1~5)をRNAlater™溶液の中に入れ、具体例2の方法で調製し、4 で保存した。1週間、2週間、および4週間のインキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。RNA試料は全て無傷であった。新鮮マウス脳、腎臓、肝臓、脾臓試料を10倍量のRNAlater™の中に入れ、4 で保存した。1週間、2週間、4週間のインキュベーション後、等しい重量の組織断片を取り出し、処理した。各組織試料をグアニジニウムイソシアナート溶解塩基の中に入れ、ホモジェナイズし、AmbionのRNAaqueous™キットを用いて単離した(具体例20に記載されている方法で)。RNAの濃度を0.D.<sub>260</sub>の吸光度により測定した。RNAを具体例1に記載されている様にホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動により分析した。

【0065】

RNA試料全てが、28S:18Sが2:1の明瞭なリボソームRNAバンドに基づき「無傷」と判定された。更に、総合的品質は、異種RNAの視認可能なバックグラウンドのスミアとリボソームRNAの観察可能な分解生成物が欠失していることにより判定された。

【0066】

#### 具体例9

RNAlater™の中で環境温度(25 )で保存された哺乳動物から単離されたRNA。

新鮮マウス脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓をRNAlater™溶液の中に入れ、環境温度(25 )で保存した。2週間または4週間のインキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。2週間後に回収されたRNAは無傷であった。1ヶ月のインキュベーション後に回収されたRNAは、18Sと28リボソームバンドの外見から判定すると、まだ約50%無傷であった。データを図7に示す。

【0067】

#### 具体例10

RNAlater™の中で極温(37 )で保存された哺乳動物から単離されたRNA。

新鮮マウス肝臓、腎臓、脾臓をRNAlater™溶液の中に入れ、37 で保存した。3日間のインキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。単離されたRNAは無傷であった。1週間から10日間インキュベーションされた組織から単離されたRNAは部分的に分解されている(約50%無傷)。このRNAは、本技術に精通する者にとって共に公知の方法であるヌクレアーゼ保護分析またはRT-PCR(逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応)の基質としてまだ適切である。データを図8に示す。

【0068】

#### 具体例11

RNAlater™の中で4 で保存されたアフリカツメガエル、魚類、昆虫、細菌、植物組織から単離されたRNA

発明者は、ツメガエル(Xenopus)の心臓と肝臓、金魚の肝臓、カブトムシを丸のまま、シヨウジョウバエ(Drosophila)を丸のまま、大腸菌、タバコ、アルファルファのRNAの保存に関するRNAlater™の有効性を検討した。それぞれをRNAlater™溶液の中に入れ、4 で保存した。24時間インキュベーション後、RNAを試料から抽出し、具体例1に記載されている様に、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。全てのRNAが無傷に見えた。この

10

20

30

40

50

事実は、多様な生物の組織に対する一般的試薬としてのRNAlater™の有効性を証明するものである。

【0069】

#### 具体例12

##### ノーザンブロッティング分析の標的としてのRNAlater™のRNAの適切性の証明

新鮮マウス肝臓、腎臓、脾臓をRNAlater™溶液の中で24時間、25 または37 にてインキュベーションした。RNAを抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分解し、陽電荷を帯びたナイロン膜(Brighstar Plus™、Ambion、Austin、Texas)に移し、製造者の推奨に従って(Northern Max™ Kit、Ambion、Austin、Texas)、放射性同位元素標識アンチセンス アクチンRNAプローブとハイブリッド形成させた。1.8キロベースの アクチン転写産物に対応する別個のシグナルが全ての試料において検出され、それは、全ての試料中のメッセンジャーRNAが完全に無傷であり、ノーザン解析でハイブリダイゼーションに使用可能であることを示すものである。

10

【0070】

#### 具体例13

##### RT-PCRの鑄型としてのRNAlater™のRNAの適切性

RNAlater™の中に37 で24時間保存されたマウス肝臓、脾臓、腎臓、精巣を、複合RT-PCR増幅において構成的に発現する遺伝子(ハウスキープ遺伝子シクロフィリンとRIG/S15)の2対のPCR™プライマーを用いるRT-PCRの鑄型として使用した。予想される生成物(216bpシクロフィリン、324bp RIG/S15)が全例において得られた。従って、回収されたRNAは、RT-PCR分析に適している。

20

【0071】

#### 具体例14

##### 臨床試料を保護するためのRNA保存液の利用

RT-PCRによりヒト臨床試料の遺伝子分析を行う傾向が増加している。これらの臨床試料には、充実性腫瘍、単離細胞、血清、尿、血液または糞便が含まれる。充実性腫瘍の生検材料は、その異常発現が多く、癌において主要な役割を果たす、P53の様な特異的な指標遺伝子の発現に関してしばしば分析される。正常または白血球血液から単離された白血球は、インターロイキン遺伝子の発現に関してしばしば分析される。尿、血液、血清、血漿、糞便は、病原微生物の存在に関して、しばしば分析される。予想される使用法において、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液を、臨床環境で単離される緩衝液検体の保持緩衝液として利用できる。これらの試料中のRNAは、分析のために無傷RNAが抽出される実験室環境に試料を移せる時点まで、この段階で保護される。予想される使用法において、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液は、後の診断のために、血液製剤中の通常は不安定なウイルスRNA(例えば、HIV)を安定化するために使用できる。

30

【0072】

#### 具体例15

##### 野外検体を保存するためのRNA保存液の使用

世界中の野外生物学者は、実験室で後に分析するために野外で収集した試料をどの様に保存するかという共通の問題に直面している。しばしばRNA発現の研究が、ドライアイスまたは液体窒素中に凍結された検体の維持が論理的に困難なことから、簡単に回避されてしまう。予想される使用法において、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液を、後に実験室環境に戻るまで、試料を保存する必要がある科学者によって野外で単離された検体の保持緩衝液として使用できる。RNAlater™またはその他のRNA保存液の重要な利点は、小さな検体(微生物の様な)を無傷の状態のままにできる点である。従って、水試料から単離された微生物集団の様な複雑な検体をまとめて保存し、実験室で分類により区分けし、次いで遺伝子発現に関して分析することができる。

40

【0073】

#### 具体例16

##### 解離液としてのRNA保存液の使用

50

生物学者は、RNA分析のための検体を単離するために、しばしば複雑な解離を行う。通常、時間の遅延は、試料から単離されたRNAの品質が低くなることを意味する。初期マウス胚発生を研究している発生生物学者は、子宮の脱落膜から初期胚を分離するために細かい解離を実施しなくてはならない。別の例では、神経解剖学者は、RNA分析のために脳の特定部分を除去するために複雑な解離を行わなくてはならない。予想される使用法において、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液は、非常に有効な解離液である。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液に試料を浸すことにより、解離時にRNAを保護し、同時に試料の完全性を保持する(グアニジニウムの様なその他の試薬は広範な細胞溶解を引き起こし、解離を障害する可能性がある。)。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液を使用することにより、試料中のRNAが分解することを懸念せずに、長時間を要する試料の解離を容易にすることができる。

10

【0074】

具体例17病原性テストのために試料を保存するためのRNA保存液の使用

病原微生物を検出し、分類するための核酸分析は、急速に成長しつつある技術である。予想される使用法において、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液を、衛生検査官により収集される検体用の保持緩衝液として使用できる。試料をRNAlater™または発明のRNA保存液に入れることにより試料中のRNAが保存される。次に、試料を核酸技術を用いて病原微生物の存在に関して分析できる。例えば、米国農務省の検査官は、屠殺場からヌクレアーゼの試料を収集し、次いでRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液に入れることができる。試料表面に存在する病原微生物のRNAは、無傷で保存される。後に試料から肉を取り出し、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液から病原体を回収し、分析のためのRNAを単離することが可能である。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の1つの重要な特徴は、殺菌性があるが、細胞を溶解しない点である。従って、病原微生物の力価は試料保存中に変化せず、見かけの数も歪曲せず、試料は更なる情報を得るために顕微鏡により分析することも可能である。

20

【0075】

具体例18病原体を保存するためのRNA保存液の使用

毎年数千もの検体が保存され、ドライアイスを入れて、病原体を検出するためにRNA分析を実施する中央検査室まで送られる。予想される使用法において、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液を出荷用緩衝液として使用し、感染症を引き起こす微生物のRNAを保存することができる。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液により、RNA分解を懸念せずに、試料を環境温度または環境温度付近で送ることが可能となる。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液により多大な恩恵を蒙り、出荷コストの大幅な削減が可能となり、実現できる機関は、病原性検査のために多くのヒトおよび動物試料を受け取る疾病管理センター(CDC)である。

30

【0076】

具体例19FACS分離におけるRNA保存液の使用

蛍光細胞分析分離装置(Fluorescent Activated Cell Sorting: FACS)は、懸濁液中の細胞を、細胞表面マーカーの差に基づいて単離できる一方法である。我々は、FACSに流すために細胞の懸濁液としてRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の利用を想定している。この方法において、細胞内RNAは保存されるものと思われる。一旦細胞が単離されれば、分析のために無傷RNAを単離することが可能である。

40

【0077】

具体例20土壌細菌を保存するためのRNA保存液の使用

細菌種を同定するためのRT-PCR法の出現により、引き続きRNA単離を行うために、土壌から土壌細菌を単離する方法の必要性が増加しつつある。しかし、細菌のRNAは極めて不安

50

定で、単離プロトコールの中に急速に分解される。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の予想される使用法は、土壌細菌からのRNA単離における第一段階としての使用である。直ちに細菌内RNAを保護するが、細菌を無傷に保つRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液に土壌を分散することができる。次に、低速遠心分離により土壌を安全に除去してから、細菌をより構想的遠心分離により回収することができる。RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液は、単離手順中にRNAが分解されるのを防止する。

【0078】

#### 具体例21

RNAlater™またはその他の発明のRNA保存の中に保存されたRNAの単離方法

組織試料からRNAを単離する幾つかの方法の適切性が、RNA保存液に保存された組織に関して評価されている。この様な方法の幾つかはAmbion社から入手可能なキットにより実施可能である。勿論、Ambion キットで、RNA保存液に保存されていた組織からRNAを単離しなくてはならないわけではなく、RNA保存液に保存された組織および細胞からRNAを単離するその他の方法またはキットが本明細書に網羅されている。例えば、Boom et al.(ガラス基質への核酸の選択的結合と保持-Aiaprep™, Quiagen社)、Chomczynski et al.(Trizol™, MRC)、Macfarlane et al.(Catrimox 14™, アイオワ州、Biotechnology社)、Bugos et al.(グアニジン:塩化リチウム)またはAuffray et al.(LiCl:尿素抽出)またはこの様な方法を実施するためのキットの様な公知の方法のいずれでもこの観点から利用できる。

【0079】

以下の具体例は、RNAlater™またはその他の発明のRNA保存液に保存された組織試料または細胞からRNAを単離するためのAmbionキットの利用に関する説明である。Ambion社は、組織試料または細胞内RNAを保存し、続いてこれらの試料からRNAを単離する組み合わせキットを販売することを選択できる。

【0080】

#### 具体例22

Ambion ToTally™RNAキットを用いるRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の中に保存された試料からの細胞RNAの単離方法

Ambion ToTally™RNAキットは、細胞RNAを調製するためのグアニジウム/酸性フェノール法である。

【0081】

組織試料のRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液とToTally RNA™法を組み合わせることの有用性を証明するために、RNAlater™の保存液から組織試料を取り出し、4Mのグアニジニウムイソシアナート、0.5%のサルコシン、25mMのクエン酸ナトリウム、0.1Mの2-メルカプトエタノールから成る10倍量のグアニジニウムイソシアナート溶解液にホモジェナイズした。等量のフェノール:クロロホルム(1:1)により抽出しタンパク質を除去し、続いて遠心分離により水相と有機相を単離する。水相を回収し、pH4.7のフェノールで2回目の抽出を行う。この2回目の抽出により有機相に残りのタンパク質全てが分配され、低pHにより全てのDNAが有機相に移る。RNAが水相に残る。水相を遠心分離により回収する。0.3Mの酢酸ナトリウムと2.5倍量のエタノールを用いる沈殿により水相からRNAが回収される。結果を図9に示す。

【0082】

#### 具体例23

Ambion RNAaqueous™キットを用いるRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液の中に保存された試料からの細胞RNAの単離方法

AmbionのRNAaqueous™キットは、有機溶媒を必要としないRNAを単離するためのグアニジニウム溶解法である。その代わりに、ガラスファイバーフィルターへのRNAの選択的吸着を利用している。

【0083】

AmbionのRNAaqueous™キットとRNAlater™またはその他の発明のRNA保存液を組み合わせることの有用性を証明するために、RNAlater™の保存液から組織試料を取り出し、RNAaqueou

10

20

30

40

50

s<sup>TM</sup>に供給されているグアニジニウムイソシアナートに直接移し、ホモジェナイズした。ホモジェネートをガラスファイバーフィルターにのせ、数種類の緩衝液で洗浄した。これによってタンパク質とDNAが除去される。次に、純粋RNAを水でフィルターから溶出した。RNAlater<sup>TM</sup>またはその他の発明のRNA保存液とRNAaqueous<sup>TM</sup>の組み合わせは、腐食性または発癌性有機試薬(フェノール、クロロホルム、エタノール、酢酸、その他)が方法全体を通して使用されないという利点がある。新鮮試料またはRNAlater<sup>TM</sup>に保存された試料を、4Mのグアニジニウム塩酸、1%のサルコシン、25mMのクエン酸ナトリウム、0.1Mの2-メルカプトエタノール、2%のトリトンX-100から成る10倍量の溶液にホモジェネートする。ホモジェネートを2倍に希釈し、ガラスファイバーフィルターの上を通過させる。これらの条件において、核酸はフィルターに結合し、タンパク質は洗い流される。高濃度塩とエタノールにおいて数回連続洗浄することにより、DNAが選別的に洗い流され、フィルターに結合されたRNAだけが残る。続いて、このRNAを熱水で溶出して回収する。結果を図9に示す。

10

【0084】

#### 具体例24

##### 液体試料中の核酸を保存するための固体RNAlaterの使用

好ましいRNA保存組成物の固体成分は、安定化させるべき液体試料に直接溶解でき、試料/液体混合物に添加でき、液体に入れておいた試料に添加でき、ある試料または試料/液体混合物の収集前に収集容器に入れておくことができる。

【0085】

固体成分は、水性試料に加え、溶解した時、好ましい塩、緩衝液およびキレート剤濃度の溶液が得られるように、適正な組成にドライミキサーでブレンドすることができる。粉末乾燥成分の予め測定された部分標本を試料収集容器に入れることができ、適正容量の試料が添加される。次に、収集容器を激しく振って、RNAlater成分を溶液中に溶解する。これによって操作者が試料に接触するのを最小限にとどめることができ、血液または尿の様な生物学的検体中の核酸を安定化するための好ましい方法である。あるいは、乾燥成分を錠剤形態に圧縮し、大量に保存することができる。錠剤は保存に便利な形態で、あらゆるタイプの容器のあらゆるサイズの試料に適正な量を加えることができる。これは、貯水池、下水処理場、または酪農産業から生じる試料の野外収集に使用するために好ましい方法である。乾燥RNA保存試薬を使用する主な利点は、保存および輸送時の重量が少なく、済み

20

30

【0086】

本明細書に開示および請求されている組成物および方法の全ては、本発明の開示に照らし、過度の実験を実施せずに作製および実行できる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施例の観点から説明されてきたが、本技術に精通する者にとって、本発明の概念、精神および範囲を逸脱しなければ、本明細書に記載されている組成物および方法、方法のステップまたはステップの順序に変更を加えることが可能であることは明白である。より具体的には、化学的にも物理的にも関係のある特定の試薬を、本明細書に記載されている試薬と置き換え、同一または類似の結果が達成されることは明らかである。本技術に精通する者にとって明らかなこの様な同様の代替物および変更の全ては、添付請求項により定義される本発明の精神、範囲および概念の範囲内であると考えられる。

40

【0087】

#### 参考文献

次の文献は、ここに示した例示的な手順やその他の詳細を補完する範囲において、引用することにより本明細書の一部をなすものとするものである。

米国特許第5,922,591号

米国特許第5,921,396号

米国特許第5,726,012号

米国特許第5,090,420号

50

【 0 0 8 8 】

【 表 1 】

- Allewell, N.M., Sama, A., "The effect of ammonium sulfate on the activity of ribonuclease A." *Biochemica et Biophysica Acta* 341:484-488 (1974).
- Auffray, C., Rougeon, F., "Purification of mouse immunoglobulin heavy chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA." *Eur. J. Biochemistry* Jun;107(2):303-314 (1980).
- Boom, W.R., Adriaanse, H., Kievits, T., Lens, P.F., US Patent No. 5,234,809 entitled: Process for Isolating Nucleic Acid. 10
- Bugos R.C., Chiang, V.L., Zhang, X.H., Campbell, E.R., Podila G.K., Campbell W.H., "RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction by guanidine." *Biotechniques* Nov;19(5):734-7 (1995).
- Cairns, M.T., Church, S., Johnston, P.G., Phenix, K.V., Marley, J.J., "Paraffin-embedded tissues as a source of RNA for gene expression analysis in oral malignancy." *Oral Diseases* Sep;3(3):157-161 (1997).
- Chomczynski, P., US Patent No. 5,346,994 entitled: Shelf Stable Product and Process for Isolating RNA, DNA, and Proteins. 20
- Dimulescu *et al.*, "Characterization of RNA in Cytologic Samples Preserved in a Methanol-Based Collection Solution," *Molecular Diagnosis* 3(2):67-72 (1998).
- Esser, *et al.*, "Isolation of full-sized mRNA from ethanol-fixed cells after cellular immunofluorescence staining and fluorescence-activated cell sorting." (FACS). *Cytometry* 1995 Dec 1;21(4):382-386.
- Foss, R.D., Guha-Thakurta, N., Conran, R.M., Gutman, P., "Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue." Comparison of two housekeeping mRNA controls. *Diagn Mol Pathol* Sep;3(3):148-155 (1994). 30
- Houze, T.A., Gustavsson, B., "Sonification as a means of enhancing the detection of gene expression levels from formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies." *Biotechniques* Dec;21(6):1074-1078 (1996).
- Hurley *et al.*, US Patent No. 5,256,571 entitled Cell Preservation Solution (1993)
- Koopmans, M., Monroe S.S., Coffield, L.M., and Zaki, S.R., "Optimization of extraction and PCR amplification of RNA extracts from paraffin-embedded tissue in different fixatives." *J. Virol Methods* Jul; 43(2):189-204 (1993). 40

【 0 0 8 9 】

【 表 2 】

Lin L.-N., Brandts, J.F., "Refolding of ribonuclease in the presence and absence of ammonium sulfate pulses." Comparison between experiments and simulations. *Biochemistry* 26:1826-1830 (1987)

Macfarlane, D.E., US Patent No. 5,010,183 entitled: Process for Purifying DNA and RNA using Cationic Detergents.

Stanta G., Schneider, C., "RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification." *Biotechniques* Sep;11(3):304 (1991).

10

#### 【図面の簡単な説明】

本明細書の一部を形成する以下の図は、本発明の特定の側面を更に明らかにするために含めた。本発明は、本明細書に提示されている具体例の詳細な説明と組み合わせて、1つ以上のこれらの図を参照することにより、理解を深めることができる。

図1--アルコールとアセトンは、細胞試料の保存には適していない。

4 のパネルA(レーン1~5:エタノール、酢酸エタノール、アセトン、酢酸アセトン、RNA later™)。パネルBは、37 °Cにおける同じレーンを示す。マウス肝臓から単離されたRNAは4 (レーン1~5)または37 °C(レーン6~10)で一晩保存した。レーン1および6、エタノール中で保存。レーン2および7、pH4.0の酸性化エタノール中で保存。レーン3および8、アセトン中で保存。レーン4および9、pH4.0の酸性化アセトン中で保存。レーン5および10、RNA later™中で保存。

20

図2--新鮮組織試料中のRNAは不安定である。

新鮮マウス肝臓(レーン1および2)、精巢(レーン3および4)および脾臓(レーン5および6)試料を、RNA later™(レーン2、4、6)(25mMクエン酸ナトリウム、10mM EDTA、70g硫酸アンモニウム/100ml溶液、pH5.0)または4Mグアニジニウムイソシアナート(GITC)を基剤とするRNA抽出液(レーン1、3、5)の中に4 °Cで12時間入れた。RNAを抽出し、ゲル電気泳動により分析した。無傷RNAは、RNA later™に対応するレーン(レーン2、4、6)においてのみ観察された。

30

図3--組織中のRNAを保護する硫酸アンモニウムの有効濃度範囲の決定。

新鮮に単離されたマウス肝臓の断片を、種々の濃度の硫酸アンモニウムを含むRNA later™の中に入れた。試料は、0、10%、20%、30%、40%、50%または70%硫酸アンモニウム(それぞれレーン1~7)を含んでいた。4 °Cで24時間インキュベーション後、RNAを試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。

図4--pHと硫酸アンモニウム濃度を至適化することによる極温におけるRNA later™の効力の増強。

極温におけるpHと硫酸アンモニウムの影響を評価した。新鮮マウス肝臓を室温または37 °Cで24時間、4種類の処方RNA later™の中で保存した。レーン1はpH7.0、70g/100ml硫酸アンモニウムであり、レーン2はpH5.0、55g/100ml硫酸アンモニウムであり、レーン3は本来のRNA later™処方(pH7.0で55g/100ml硫酸アンモニウムを含む)であり、レーン4はpH5.0、70g/100ml硫酸アンモニウムである。

40

図5--RNA later™の有効性に対する硫酸アンモニウムの特異性。

パネルAおよびBは新鮮肝臓試料を25 °C(パネルA)および37 °C(パネルB)で3日間5種類の緩液の中でインキュベーションしたものである。レーン1はRNA later™、炭酸アンモニウムを含む。レーン2は塩化アンモニウムを含む。レーン3は硫酸カリウムを含む。レーン4は硫酸マグネシウムを含む。レーン5は硫酸アンモニウムを含む。パネルCは新鮮肝臓を以下を含むRNA later™の中で4 °Cで一晩インキュベーションしたものである。レーン1は塩化セシウムであり、レーン2は硫酸セシウムであり、レーン3は硫酸アンモニウムである。

50

図6--RNAlater™の中で4℃で保存された哺乳動物から単離されたRNA。

新鮮マウス脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓(レーン1~5)をRNAlater™溶液の中に入れ、4℃で保存した。1週間(パネルA)、2週間(パネルB)、4週間(パネルC)のインキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。

図7--RNAlater™の中で環境温度(25℃)で保存された哺乳動物から単離されたRNA。

新鮮マウス脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓(レーン1~5)をRNAlater™溶液の中に入れ、25℃(環境温度)で保存した。2週間(パネルA)または4週間(パネルB)のインキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。

図8--RNAlater™の中で極温(37℃)で保存された哺乳動物から単離されたRNA。

新鮮マウス肝臓、腎臓、脾臓(レーン1~3)をRNAlater™溶液の中に入れ、37℃で保存した。3日間のインキュベーション後、RNAを組織試料から抽出し、変性アガロースゲル電気泳動により分析した。

10

図9--RNAlater™中で保存された組織からRNAを作製するためにAmbionを使用する。

レーン1~3は、肝臓、心臓、腎臓、ToTally RNA™、レーン4-6は、RNAaqueous™である。

新鮮マウス肝臓(レーン1および4)、心臓(レーン2および5)、腎臓(レーン3および6)試料をRNAlater™の中に入れ、4℃で一晩保存した。RNAをAmbion ToTally RNA™キット(レーン1~3)またはAmbion RNAaqueous™キット(レーン4~6)を用いてサイズが同一の試料から単離した。レーン1は、分子量マーカーである。

【図1】

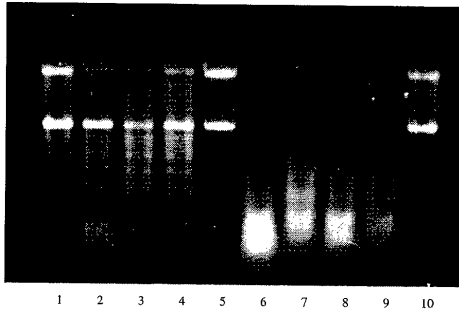


FIG. 1

【図2】

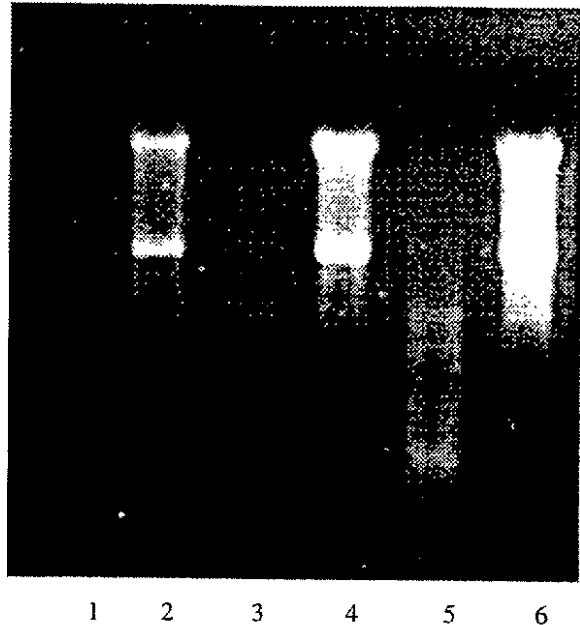


FIG. 2

【 図 3 】

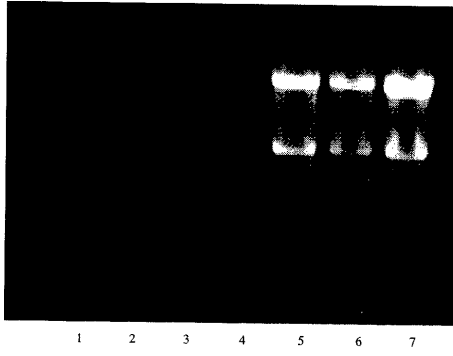


FIG. 3

【 図 4 】

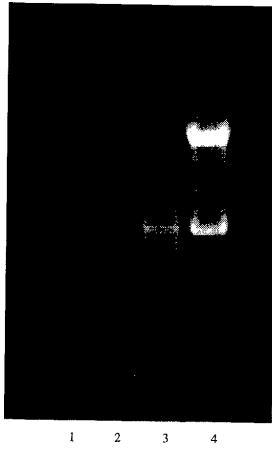


FIG. 4

【 図 9 】

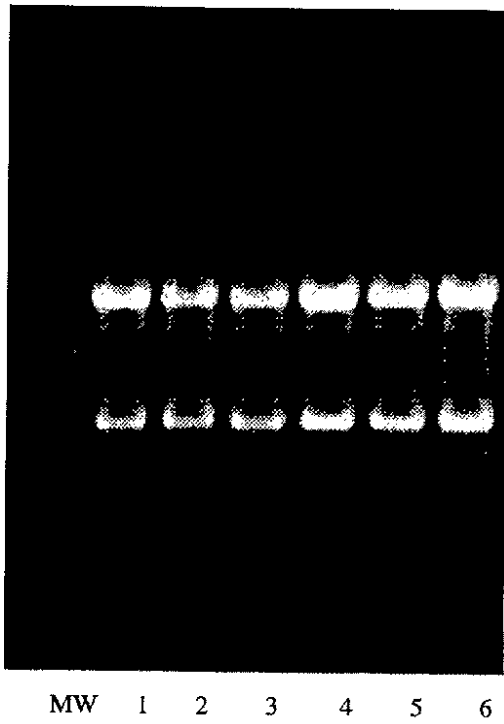


FIG. 9

【 図 5 】

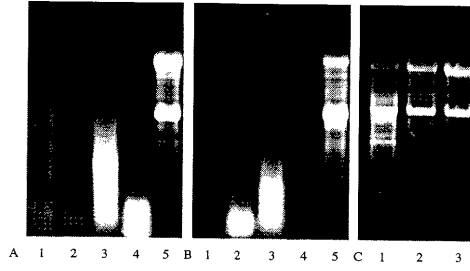


FIG. 5

【 図 6 】

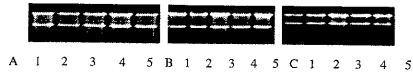


FIG. 6

【 図 7 】

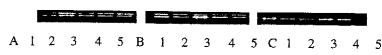


FIG. 7

【 図 8 】

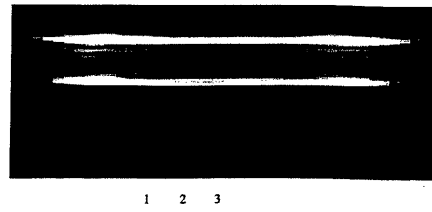


FIG. 8

---

フロントページの続き

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特開平08-506340(JP,A)

特開平08-112089(JP,A)

特開平05-023179(JP,A)

CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N., "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1987年4月, Vol.162, No.1, P.156-159

CHOMCZYNSKI, P., "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.", BIOTECHNIQUES, 1993年9月, Vol.15, No.3, P.532-536

CATHALA, G. et al., "A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid.", DNA, 1983年4月1日, Vol.2, No.4, P.329-335

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

PubMed

Science Direct

WPI