(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3784829号
(P3784829)
(45)発行日　平成18年6月14日(2006.6.14)　(24)登録日　平成18年3月24日(2006.3.24)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 A

請求項の数 14 (全 16 頁)

(21)出願番号	特願平7-527093
(86)(22)出願日	平成7年4月13日(1995.4.13)
(65)公表番号	特表平10-501685
(43)公表日	平成10年2月17日(1998.2.17)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/004586
(87)国際公開番号	WO1995/028409
(87)国際公開日	平成7年10月26日(1995.10.26)
審査請求日	平成14年4月15日(2002.4.15)
(31)優先権主張番号	08/227,514
(32)優先日	平成6年4月14日(1994.4.14)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/227,516
(32)優先日	平成6年4月14日(1994.4.14)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ザ　ロックフェラー　ユニヴァーシティ
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　１００２１　ニューヨーク　ヨーク　アベニュー　１２３０
(74)代理人
弁理士　中村　稔
(74)代理人
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人
弁理士　宍戸　嘉一
(74)代理人
弁理士　竹内　英人
(74)代理人
弁理士　今城　俊夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞成分を単離する方法、装置及び試薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細胞成分の単離方法であって、カオトロピック剤と、複数のミクロンサイズ粒子またはサブミクロンサイズ粒子を含む容器内の液体媒体中の細胞懸濁液に往復機械的エネルギーを加えて細胞壁を破壊して、該細胞成分を該液体媒体中に遊離させることにより該成分を機械的に遊離させる工程、及び選択された該細胞成分を該媒体から単離する工程を含む方法。

【請求項２】

ＤＮＡ及びタンパク質と共にＲＮＡを含む細胞源から、そのＲＮＡを単離する方法であって、

ａ．複数のミクロンサイズ粒子またはサブミクロンサイズ粒子を含みかつ２Ｍのチオシアン酸グアニジニウム又は塩化グアニジニウムを含むｐＨ４～４．５の水性バッファー中に全重量に基づいて４０～６０重量％のフェノールを含む抽出溶媒の存在下に往復エネルギーを加えることにより該ＲＮＡをそれを含む細胞源から機械的に遊離させる工程；

ｂ．水不溶性有機溶媒を加えて水性抽出溶媒相及び有機相を含む２相混合液を形成し、該ＲＮＡが該水相に溶解すると共に該ＤＮＡ及びタンパク質が該有機相又は該相間の界面に集まる工程；及び

ｃ．水溶性低級アルカノールを添加することにより該水相から該ＲＮＡを沈殿させる工程：

を含む方法。

【請求項３】
該ＲＮＡが沈殿した該水相から、ろ過又は遠心分離により該ＲＮＡを分離しかつその上清の水相を除去することにより該ＲＮＡを回収する工程を更に含む請求項２記載の方法。
【請求項４】
該抽出が清浄剤又はその混合物の存在下に行われる請求項１記載の方法。
【請求項５】
該ミクロンサイズの粒子が、０．１～１．０ｍｍの直径を有する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項６】
該サブミクロンサイズの粒子が、０．１～１．０μｍの直径を有する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項７】
ＤＮＡ及びタンパク質と共にＲＮＡを含む細胞源から、そのＲＮＡを単離する方法であって、
ａ）複数のミクロンサイズ粒子またはサブミクロンサイズ粒子を含みかつｐＨ４～４．５の水性バッファー中に混合液の全重量に基づいて４０～６０重量％のフェノール及び０．１～１重量％の清浄剤を含む抽出溶媒の存在下に該ＲＮＡをそれを含む細胞源から機械的に遊離させる工程；
ｂ）水不溶性有機溶媒を加えて該水性抽出溶媒相及び有機相を含む２相混合液を形成し、該ＲＮＡが該水相に溶解すると共に該ＤＮＡ及びタンパク質が該有機相又は該相間の界面に集まる工程；及び
ｃ）水溶性低級アルカノールを添加することにより該水相から該ＲＮＡを沈殿させる工程：
を含む方法。
【請求項８】
該ＲＮＡが沈殿した該水相から、ろ過又は遠心分離により該ＲＮＡを分離しかつその上清の水相を除去することにより該ＲＮＡを回収する工程を更に含む請求項７記載の方法。
【請求項９】
該清浄剤がカチオン性である請求項７記載の方法。
【請求項１０】
該清浄剤が臭化セチルトリメチルアンモニウムである請求項９記載の方法。
【請求項１１】
該抽出が清浄剤又はその混合物の存在下に行われる請求項７記載の方法。
【請求項１２】
該ミクロンサイズの粒子が、０．１～１．０ｍｍの直径を有する、請求項７記載の方法。
【請求項１３】
該サブミクロンサイズの粒子が、０．１～１．０μｍの直径を有する、請求項７記載の方法。
【請求項１４】
ＲＮＡ及びタンパク質と共にＤＮＡを含む細胞源から、そのＤＮＡを単離する方法であって、
ａ）複数のミクロンサイズ粒子またはサブミクロンサイズ粒子を含みかつ２Ｍのチオシアン酸グアニジニウム又は塩化グアニジニウムを含むｐＨ４～４．５の水性バッファー中に全重量に基づいて４０～６０重量％のフェノールを含む抽出溶媒の存在下に往復エネルギーを加えることにより該ＲＮＡをそれを含む細胞源から機械的に遊離させる工程；
ｂ）水不溶性有機溶媒を加えて該水性抽出溶媒相及び有機相を含む２相混合液を形成し、該ＲＮＡが該水相に溶解すると共に該ＤＮＡ及びタンパク質が該有機相又は該相間の界面に集まる工程；
ｃ）該中間相をフェノール及びクロロホルムで抽出する工程；及び
ｄ）該ＤＮＡをエタノールで沈殿させる工程：

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、天然細胞源からリボ核酸（ＲＮＡ）のような細胞成分を単離する試薬、方法及び装置に関する。

関連技術の説明

細胞は、機能に適した広範囲の細胞成分を含んでいる。例えば、ＤＮＡ、リボ核酸（ＲＮＡ）及びタンパク質性物質の宿主を含むそれらの発現産物を含んでいる。本発明は、そのような細胞成分の単離に有効であるが、便宜上、主にＲＮＡの単離に適用するように記載される。

ＲＮＡは、ホルモン、酵素及び生命の全ての形態の存在に不可欠な構造組織を含む無数のタンパク質の発現を生じる連続の生物反応に重要な成分である。研究のために並びに診断及び治療上の使用に大量のＲＮＡが非常に求められている。

植物細胞及び寄生虫、酵母及び細菌を含む微生物は、潜在的なＲＮＡ源であるが、ＲＮＡ源の細胞壁は非常に強いので、ＲＮＡ源としてそれらを使用することは困難であり、時間を要しかつ高価な設備を必要とするものである。

細菌からのＲＮＡ単離は、細胞壁が溶解に容易に感受性でないので困難である。細菌からＲＮＡを単離する現在のプロトコールは、しばしば、細菌細胞を溶解するリゾスタフィン又はリゾチームのような酵素を使用するのに続いてリボヌクレアーゼを不活性化する変性剤を添加するものである。しかしながら、これらの方法は、大量の高純度ＲＮＡの単離に有効でないことがわかった。

米国特許第4,843,155号には、マウス下垂体前葉のような生物組織をまずフェノール、チオシアン酸グアニジニウムのようなグアニジニウム塩及びおそらく酸化防止剤を含むｐＨ４の水性緩衝培養液に“ガラス－テフロンホモジェナイザー”でホモジェナイズするＲＮＡ単離法が用いられている。そのホモジェネートは、次に、バッファーに不溶性の有機溶媒で抽出される。有効な溶媒としてクロロホルムが例示されている。ＲＮＡは、水性バッファーに溶解したままである。生物組織のＤＮＡとタンパク質は、有機相と無機相との間の界面に集まる。ＲＮＡは、イソプロパノールのような水溶性アルカノールで沈殿させることにより水相から分離される。ＲＮＡは、遠心し上清を除去することにより回収される。発明者は、その単離法が３時間で完了されると述べている。

この方法は、グアニジン塩が高価であり悪臭があるので都合がよくない。更に、記載されたように、この方法は、ＲＮＡ源として生物組織（即ち、真核細胞であり原核細胞でない）に制限され、完了するのに長時間が必要である。真核細胞である生物組織における細胞は、容易に破壊される脆い膜で封じられている。

更に、ガラスビーズがＲＮＡ単離の方法に用いられたが、ビーズがホモジェナイザーを塞ぐ原因になることからホモジェナイザー型装置と共にガラスビーズを用いて本発明の結果を得ることはできない。ガラスビーズは、細胞から核酸を単離するためにビーズビーターと共に用いられた。しかしながら、この方法に対する欠点は、この方法が細胞を粉砕して内容物を培養液中に遊離させ、ＲＮＡのような不安定な細胞成分が放出される酵素によって急速に分解されるという事実にある。

従って、細胞からＲＮＡのような細胞成分を単離する従来の方法に伴う上記の欠点を考慮すると、当該技術において真核細胞及び原核細胞の両方からそのような成分の効率のよい単離に適切な試薬、方法及び装置がなお求められていることは明らかである。

発明の要約及び目的

従って、本発明の主要な目的は、細胞成分の単離方法であって、複数のミクロンサイズ粒子を含む容器内の液体培養液中細胞の懸濁液に往復機械的エネルギーを加えることによりかかる成分を機械的に遊離させて細胞壁を破壊し該細胞成分を該液体培養液中に遊離させる工程及び該培養液から選択された該細胞成分を単離する工程を含む方法を提供することである。

本発明の他の目的は、ＲＮＡをＤＮＡ及びタンパク質と共にそれを含む細胞源から単離する方法であって、
ａ）複数のミクロンサイズ粒子を含みかつチオシアン酸グアニジニウム又は塩化グアニジニウムが２ＭであるｐＨ約４～4.5の水性バッファー中全重量に基づいて約４０～６０重量％のフェノールを含む抽出溶媒の存在下に往復エネルギーを加えることにより、該ＲＮＡをそれを含む細胞源から機械的に遊離させる工程；
ｂ）水不溶性有機溶媒を加えて該水性抽出溶媒相と有機相を含む２相混合液を形成し、該ＲＮＡが該水相に溶解されると共に該ＤＮＡ及びタンパク質が該有機相又は該相間の界面に集められる工程；及び
ｃ）水溶性低級アルカノールを添加することにより該水相から該ＲＮＡを沈殿させる工程：
を含む方法を提供することである。
また、本発明の別の目的は、ｐＨ約４～4.5を有する水性バッファー中混合液の全重量に基づいて約４０～６０重量％のフェノール及び約0.1～１重量％の清浄剤を含む混合液を含む、ＲＮＡをＤＮＡ及びタンパク質と共にそれを含む細胞源から抽出するのに有効な試薬を提供することである。
更に、本発明の別の目的は、ＲＮＡをＤＮＡ及びタンパク質と共にそれを含む細胞源から単離する方法であって、
ａ）複数のミクロンサイズ粒子を含みかつｐＨ約４～4.5の水性バッファー中全重量に基づいて約４０～６０重量％のフェノール及び約0.1～１重量％の清浄剤を含む抽出溶媒の存在下に該ＲＮＡをそれを含む細胞源から機械的に遊離させる工程；
ｂ）水不溶性有機溶媒を加えて該水性抽出溶媒相と有機相を含む２相混合液を形成し、該ＲＮＡが該水相に溶解されると共に該ＤＮＡ及びタンパク質が該有機相又は該相間の界面に集められる工程；及び
ｃ）水溶性低級アルカノールを添加することにより該水相から該ＲＮＡを沈殿させる工程：
を含む方法を提供することである。
本発明の別の目的は、リボ核酸（ＲＮＡ）を液体培養液中ＲＮＡ含有細胞から単離するための容器であって、
（ｉ）ＲＮＡ抽出溶媒、複数のミクロンサイズ粒子及び少なくとも１個の大きな粒子を有するホールダー；
（ii）該ホールダーに取りはずしできるように留められかつ該液体培養液及び該抽出溶媒を含むのに十分な容積のある空洞を有するカバー組み立て部分；及び
（iii）該容器の往復運動時に該大きな粒子によって破壊されるように適応された脆い密閉層であって、該密閉層が該大きな粒子によって破壊されるまで該液体培養液から該抽出溶媒を分離するように適応されている該密閉層：
を含む容器を提供することである。
更に、本発明の目的は、ＲＮＡの抽出及び回収を可能にするＲＮＡ含有細胞の抽出破壊に有効な往復振盪機内にしっかりと保持されるように適応された容器であって、
（ｉ）抽出溶媒及び該ＲＮＡが抽出される細胞の壁を破壊するのに適切な粒径を有する複数の粒子を含むホールダー；及び
（ii）該容器からの内容物の漏れを防止するために往復運動中に該容器を密閉するカバー組み立て部分：
を含み、該抽出溶媒の容量が該細胞壁の破壊の結果として放出された該ＲＮＡの実質的に全てを溶解するのに十分な容量である容器を提供することである。
また、本発明の目的は、往復振盪機にしっかりと保持されように適応されかつＲＮＡの回収を可能にするＲＮＡ含有細胞の抽出破壊に有効な容器であって、
（ｉ）抽出溶媒並びに該ＲＮＡが抽出される細胞の壁を破壊するのに適切な粒径を有する複数の粒子及び少なくとも１個の大きな粒子を含むホールダー；
（ii）該容器を密閉して往復運動中に該容器からの内容物の漏れを防止するカバー組み立

て部分であって、その中に液体培養液中にＲＮＡ細胞源を含む空洞があるカバー組み立て部分；及び
（iii）該抽出溶媒と該培養液との間に配置された脆いシールであって、該大きな粒子の衝撃によって往復運動中に破壊されるように適応されて該容器の内容物の混合を可能にするシール：
を含む容器を提供することである。
“ＲＮＡの改良された単離方法”と称する出願第08/227,514号には、チオシアン酸グアニジニウム又は塩化グアニジニウムが２ＭであるｐＨ４～4.5の水性バッファー中にフェノールを含む抽出溶媒中に往復機械的エネルギー及びミクロンサイズのビーズ（粒子）を用いてＲＮＡ含有天然源からＲＮＡを抽出する方法が記載され特許が請求されている。
“ＲＮＡを単離する試薬及び方法”と称する出願第08/227,516号に記載された発明は、緩衝抽出溶媒中に清浄剤を使用する以外は前の出願の新規な方法と同様である。
後者の出願の方法は、出願第08/227,514号の方法の利点の全てを有し、更に、高価ではなくかつ用いるのに都合のよい抽出剤を使用している。更に、この方法は、一般的には、グアニジニウム法より高い収量を与える。
上で確認した２件の特許出願の両方の方法の共通の特徴は、往復運動からの機械的エネルギーで細胞壁を破壊するほかに、細胞を壊し破裂する風船のように細胞壁を破壊する固体のミクロンサイズ小ビーズ（粒子）の使用である。これらの粒子は、ガラスビーズであることが好ましいが、金属、プラスチック又はプラスチック被覆金属粒子のような多くの他の粒子のいずれでもよい。
本方法の利点は、より多くの細胞が極めて短時間に破壊されるのでより多くのＲＮＡが抽出剤に放出されることである。実際に、本方法は、そのような短時間、まさに３０秒～５分で完了し、冷却を必要とせず、使用試薬がＲＮＡｓｅを含まないことが確実である特別の工程を用いる必要がない。ＲＮＡｓｅは、ＲＮＡを分解させる汚染酵素である。
本発明は、同様に、例外的な高純度のＲＮＡを高収量で分離及び単離することを可能にする手順を特徴とする。この手順は、非常に便利であり、非常に短時間、典型的には１／２時間未満で完了することができる。更に、本方法は、ＲＮＡ源として生物組織だけでなく細菌のような微生物及び植物細胞にも適用できる。かかるＲＮＡ源、特に細菌は、一様であり、所望量で容易に入手できかつ生物組織よりも使用するのが容易であることからＲＮＡ源として生物組織よりも非常に便利である。
他の態様においては、本発明は、ＲＮＡ又は他の細胞成分の単離方法を行うための新規な容器に関する。本容器は、カバー組み立て部分と以後“ホールダー”と呼ばれる抽出剤及び他の成分を含む下の方の部材から構成される。
前述の目的及び他の目的、以後明らかになるであろう本発明の利点及び特徴と共に、下記の本発明の好適実施態様の説明及び請求の範囲によって本発明の本質を明らかに理解することができる。

【図面の簡単な説明】

図１は、ホールダーとそのカバーを含む容器を示す本発明の１実施態様の側断面図である。
図２～図４は、本発明の容器の他の実施態様の側断面図である。
図５は、FastPrep™装置を用いて1.2%未変性アガロースゲルで行われＥｔＢｒで染色された種々のマウス組織から精製されたＲＮＡを示す図である。レーン１：肝臓；レーン２：腎臓；レーン３：脳；レーン４：脾臓；レーン５：筋肉。１８Ｓ及び２８ＳｒＲＮＡバンドだけが示されている。
図６は、Ｂ－アクチンプライマーを用いるマウス肝臓ＲＮＡに関するＲＴ－ＰＣＲの結果を示す図である。増幅する前に、試料をＤＮａｓｅＩで処理した。レーン１：１２３ｂｐラダー；レーン２：逆転写及び増幅；レーン３：逆転写のないときの増幅。
図７は、S.アウレウス（aureus）のｓａｒＡ転写物のプライマー拡張を示す図である。FastRNA™試薬及びFastPrep™機を用いてＲＮＡを精製した。そのＲＮＡを^{32}Ｐ放射能標識オリゴヌクレオチドプライマーに対してアニールし、逆転写酵素で拡張してプライマー拡

張産物を得た。ＤＮＡ鋳型（標識ＧＡＴＣ）及び同一プライマーとの配列決定反応を行うことにより、ｓａｒＡ転写物の転写開始部位がｓａｒＡクローンの１０１位にマッピングされた（矢印参照）。試料１及び試料２は、同一方法による２種類の異なるＲＮＡ標品を示す。

図８は、親株ＩＳＰ４７９Ｃ及びｃａｒ変異株１Ｅ３のα－溶血素転写物のノーザンブロットである。転写物のサイズは、約1.8ｋｂであった。OD_{650} 1.1及び1.7は、各々後期指数期相及び後指数期相に対応する。

図９は、親株ＩＳＰ４７９Ｃ、ｃａｒ変異株１Ｅ３及び導入体１Ｅ３－２のプロテインＡ転写物のノーザンブロットである。ＩＳＰ４７９Ｃのａｇｒ変異株、Ｂ２は、正の対照として含められる。プロテインＡ転写物は、約1.9ｋｂである。矢印は、ＲＮＡマーカーとして役立つ２３ＳリボソームＲＮＡバンドを示す。

発明の好適実施態様の詳細な説明

更に詳細には、本発明は、細胞壁を破壊しＲＮＡを放出するのに十分なエネルギーを特定の抽出剤中の使用ＲＮＡ源の細胞壁に加えることに関する。破壊的抽出法は、カオトロピック剤、即ち、細胞内で分子構造及び分子反応を無秩序にするか或いは破壊することができる物質の存在下に行われる。

下記のものは、本明細書及び請求の範囲全体に用いられる用語の定義である。

“重量”なる語は、特にことわらない限り全重量に対する重量を意味する。

“往復運動”、“往復エネルギー”、“往復機械的エネルギー”、“往復攪拌”、“往復振盪”及び“往復して運動する”は、同じ意味に用いられる。これらの語は、原核生物の細胞壁を破壊することができる急速に振動する不活性粒子の存在下に、回転運動とは反対に、振盪運動の使用を記載するものである。粒子は、液体培養液中に密閉容器内に含まれることが好ましい。粒子が細胞の存在下に“往復して攪拌”されると、対立する２種類の衝突する粒子は細胞を中央で圧縮し、細胞壁を破裂させＲＮＡを含む細胞成分を培養液に遊離させる。

“液体培養液”なる語は、増殖培養液、バッファー又は細胞を懸濁する他の液体を含む多くのいろいろな培養液を意味することができる。

“天然源”なる語は、植物細胞及び組織、真核細胞及び組織並びに原核細胞を含む細胞の生物試料を与える供給源を意味する。

本発明の破壊的抽出法は、フェノール約４０～６０重量％の存在下にカオトロピック剤として使用化合物が約２～５モルである組成物を与えるのに十分なチオシアン酸グアニジニウム又は塩化グアニジニウムのようなグアニジニウム化合物を含むｐＨ約４～4.5の水性バッファー中で行われる。また、抽出剤は、適切な界面活性剤を0.1～１重量％含んでもよい。細胞を抽出培養液の中に直接破壊することにより、ＲＮＡを分解するＲＮＡａｓｅのようなタンパク質からＲＮＡのような不安定な細胞成分が直ちに分離される。

本発明の方法においては、ＲＮＡ源、好ましくは細菌の細胞壁は、ＲＮＡを遊離させるために破壊される。破壊は、抽出溶媒中で行われる。次に、得られた混合液は、水不溶性有機溶媒で抽出される。ＲＮＡは有機溶媒に不溶性であるので、水相に残る。ＤＮＡ、タンパク質及び他の有機不純物は、有機相に溶解するか或いは層間の界面に集まる。分離したＲＮＡは水相に溶解したままであり、メタノール、エタノール又はイソプロパノールのような水溶性低級アルカノールを添加することにより沈殿させることができる。このようにして単離したＲＮＡは、ろ過、遠心分離又は他の便利な方法で回収される。回収されたＲＮＡは、例外的に高い純度を有し、ＤＮＡを実質的に含まない。本方法は、他の既知の方法に比べて得られる高収量のために特に有利である。

典型的には、有効な供給源としては、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Mycobacterium tuberculosis）、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）（酵母）及びクラミドロモナス・レインハルドチイ（Chlamydolomonas reinhardtii）（藻類）が挙げられる。

場合によっては、当業者に周知の常法によってＤＮＡを高収量及び高純度で回収することができる。
細胞壁が液体培養液に懸濁した密閉容器内で生存細胞と細胞壁破壊粒子の往復運動によって生じた力で破壊される細胞破壊方法の発見は本発明に特に重要である。
そこで、本発明の抽出溶媒として有効でありかつ非常に短時間、典型的には１／２時間未満で完了することができる非常に便利な手順により高収量で例外的に高純度のＲＮＡを分離及び単離することを可能にする新規な試薬が発見された。
本発明の新規な試薬は、フェノール約４０～６０重量％及び界面活性剤約0.1～１重量％及びｐＨ約４～4.5を有する水性バッファーを含む混合液である。このｐＨで、フェノールは水性培養液に不溶性である。結果として、この混合液は２相混合液である。
本発明の方法は、ＲＮＡ源として生物組織だけでなく細菌のような微生物及び植物細胞にも適用できる。そのような供給源、特に細菌は、一様であり、所望量で容易に入手できかつ生物組織より使用するのが容易であることからＲＮＡ源として生物組織より非常に便利である。
場合によっては、当業者に周知の常法により高収量及び高純度でＤＮＡを回収することができる。
特にＲＮＡの単離に行われる場合、本発明の方法に対して多くの利点がある。これらは、下記のことが含まれる。
１．これまで他のフェノール抽出培養液を用いた均質化法に対して処理しにくかった細菌細胞及び植物細胞のようなＲＮＡ源に対する適用性。
２．ＤＮＡで実質的に汚染されていない高収量産物としてＲＮＡの回収。
３．バッチ又は連続プロセスにおける少量及び大量のＲＮＡの両方の生産に対する適用性。
４．冷却せず、ＲＮＡｓｅを含まない試薬を用いずに及び長時間の細胞破壊法によって生じるＤＮＡ断片で汚染されることなくプロセスを行うことを可能にする非常に短時間での完了。
５．超遠心分離を必要としない。
６．本発明の新規な試薬は、実質的に臭いがなく、魅力のある市販価格で容易に入手できる。
本発明は、また、ＲＮＡ又は他の細胞成分の単離方法を行うための新規な容器に関する。
細胞増殖の過程において、ホルモン、酵素及び他のタンパク質のような種々のタンパク質の変換及び発現のために異なるいろいろなＲＮＡが生産される。そのようなタンパク質の必要量の発現に続いて、そのようなタンパク質をコードするＲＮＡを急速に分解することにより細胞はタンパク質産生を続けることが制限される。従って、増殖又は活性の異なる段階の成熟細胞は、同一ＲＮＡ分子の異なる量又は異なるＲＮＡ分子の異なる量を含んでいる。
従って、短命であるＲＮＡ種を単離及び同定するために細胞の増殖環中の異なる段階の生存細胞からＲＮＡを抽出することが重要となる。
本発明のある種の実施態様は、これらの目的に特に有効である。即ち、カバー組み立て部分は、細胞増殖に必要な栄養源を全て含む増殖培養液を含有するように適応できる。任意により、細胞は別個に増殖させることができ、細胞を含む増殖培養液の分割量をカバー組み立て部分に移した後に、増殖培養液及び細胞と抽出液との混合を可能にするためにシールを破壊することができる。また、細胞を別個の増殖培養液から単離し、バッファー溶液中添加物を存在させて又はさせずにカバー組み立て部分に添加して選択タンパク質の生産を停止又は誘導することができる。任意により、細胞を別個に増殖することができ、増殖細胞を含む増殖培養液の分割量をカバー組み立て部分に移した後に増殖培養液と抽出液の混合を行うためにシールを破壊することができる。
容器の１実施態様は、細胞発育の過程で生じた種々のタイプのＲＮＡを単離することにより細胞の増殖を続けるのに特に有効である。その実施態様では、問題の細胞はカバー組み立て部分に形成された空洞内の適切な培養液中で培養されるか又は別個に培養されその空

洞に入れられる。カバー組み立て部分又はホールダーは、抽出剤及び細胞を含む培養液を分離する脆い液体の通らないシールを有する。ホールダーは、抽出剤のほかに、ミクロン又はサブミクロンサイズ粒子及び少なくとも１個の大きな粒子の部材を含有する。ＲＮＡを抽出することが所望される場合、カバー組み立て部分はホールダーを密閉するために用いられ、容器は振盪機内に配置される。振盪機が回ると、大きな粒子の得られた往復運動がシールを破壊し、液体培養液と抽出剤を混合させる。ミクロンサイズ粒子の運動が、細胞壁を破裂させ、ＲＮＡを含む細胞成分を放出する。

他の実施態様では、容器は、抽出剤液中に抽出剤液、ミクロンサイズのビーズ及び少なくとも１個の大きなビーズを含むホールダー、脆いシール及び取りはずしできるカバー組み立て部分から構成される。カバー組み立て部分が取りはずされ、液体培養液中の細胞が脆いシール上に入れられ、カバーが密閉される。容器は、例えば振盪により往復して攪拌されるので大きなビーズがシールを破壊する。

本発明の容器は、高度に精製されたＲＮＡをＤＮＡ及び他の不純物、主にタンパク質と共にそれを含む天然源から得るために機械的エネルギーを加えることによる細胞破壊が可能である。本発明の細胞破壊に関係する機械的エネルギーの重要な１態様は、破裂風船の方法で細胞壁を粉砕するように好ましくはミクロン又はサブミクロンサイズのビーズ又は等価な発射物様物体の存在下に往復運動を加えるものである。ブレンダー又は他のホモジェナイザーで生じるような回転エネルギーは、細胞が単純に回転することから有効でなく、相互に及び細胞をビーズ間で粉砕させるビーズと効率よく衝突しない。

用いられる抽出溶媒は、上記のグアニジニウム塩含有液である。

使用範囲内のｐＨの調節を可能にする周知の種々のバッファーのいずれも用いることができる。酢酸ナトリウム又はクエン酸ナトリウムに基づくバッファーが、容易に入手できかつ優れた結果を得ることから現在好ましい。当業者に既知の他のバッファーも用いられる。

グアニジンタイプのカオトロピック剤を含む抽出試薬は、フェノールの自然酸化を制限しかつ抽出試薬の貯蔵寿命を向上させる酸化防止剤を任意に含めてもよい。典型的には、有効な酸化防止剤としては、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、２－ヒドロキシキノリン及びシステインのような有機酸化防止剤が挙げられる。

本発明の実施における第１工程は、細菌のような細胞ＲＮＡ源、生物組織の真核細胞又は植物細胞の細胞壁を機械的に破壊することである。これは、種々の市販の機器のいずれによっても達成され、オクラハマ州、バートルスビルのBioSpec Productsから市販されているミニビーズビーターのようなビーズビーターが現在好ましい。他の機器も用いうる。

ビーズビーターは、ＲＮＡ源を処理する好ましい機器である。典型的には、ビーズのサイズは、約0.1～1.0ミクロンであり、ＤＮＡキャリヤー細胞のサイズと共に変動する。Savant Instruments製（ニューヨーク州、ファーミングデイル）のFastPrep™機の使用が高速であることから更に好ましく、破壊を完了するのに必要とされる時間を短縮する。

選定振盪機の最も重要な特徴の１つは、細菌細胞の細胞壁を破壊しＲＮＡを放出する往復運動によって十分な機械的エネルギーを生じることができることである。これは、細菌又は他のＲＮＡ源の存在下に抽出試薬中でガラスビーズ又は他の不活性粒子を急速に振動することにより達成される。そのようなビーズは、いくつかの所から種々のサイズで市販されている。細胞壁を破壊するのに十分な機械的エネルギーを得る選定速度で振盪される。ＲＮＡの放出は、抽出溶媒中に懸濁した細菌細胞又は他のＲＮＡ源を用いて行われる。必要とされる時間は、細菌、酵母及び植物細胞のような種々のＲＮＡ源の細胞サイズがかなり異なるのでＲＮＡが抽出される供給源のサイズに主に左右される。細菌又は他の供給源の小さなバッチの場合には、３０秒が適当である。大きなバッチの場合には、２又は３分がしばしば必要とされる。ＲＮＡ種の半減期が非常に短いものがある（１～２分）ことから時間は重要な要因である。

ほとんどのＲＮＡが緩衝溶媒に放出される際の破壊工程の終わりに、溶媒は実質的に水不溶性である有機溶媒で抽出される。溶媒は、抽出手順の終わりに添加される。典型的に有効な溶媒としては、クロロホルムのような置換及び無置換低級炭化水素が含まれる。

抽出工程中に、ＤＮＡは有機溶媒に溶解し、当業者に既知の標準法で回収される。ＲＮＡは、水性バッファーに溶解したままであり、上記のように及び実施例に示されるようにイソプロパノールで沈殿させることができる。
本発明は、上述した新規な試薬で実施される場合に特に有効である。試薬は、ｐＨ約４の水性バッファー中に選ばれた量のフェノール及び少なくとも１種の清浄剤を含有する２相混合液である。水素イオン濃度がこのレベルである場合に、ＲＮＡが水に可溶性でありＤＮＡが不溶性であることからこのｐＨが選ばれる。好ましい試薬は、Bio 101製のFastRNA™試薬である。使用清浄剤は、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、非イオン界面活性剤及び両性界面活性剤を含む慣用の種々の界面活性剤のいずれでもよい。
典型的に有効なアニオン清浄剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、n-デシル硫酸ナトリウム及びドデシルベンゼンスルホン酸トリエタノールアミンが挙げられる。
本発明の実施に有効なカチオン清浄剤としては、例として臭化セチルトリメチルアンモニウム及び他のＮ－アルキル四級アンモニウムハロゲン化物並びにポリエトキシル化四級アンモニウム塩化物が挙げられる。
非イオン清浄剤の中では、獣脂肪アルコールエトキシレート、エトキシル化トリデシルアルコール、エトキシル化トリデカノール、ノニルフェノールエトキシレート及びオクチルフェノキシポリエトキシエタノールがある。
両性清浄剤としては、例えば、ココアミドプロピルベタイン、タロウイミノジプロピオン酸二ナトリウム及びココアミドベタインが挙げられる。
現在最も好ましい界面活性剤は、ＤＮＡを含まない産物の最良の収量を得ることから臭化セチルトリメチルアンモニウムである。
これらの清浄剤の全て及び他の多くの等価界面活性剤化合物は、販売元から容易に入手できる。
以前の手順と同様に、現在の多数のバッファー又は任意の酸化防止剤が用いられる。
新規な抽出溶媒を用いて行われる際の本発明の方法は、グアニジニウム塩を用いた上記の方法と実質的に同じである。
図１に示されるように、ＲＮＡ又は他の細胞成分を単離するために本発明に従って用いられる際に特に有効である新規な容器は、好ましくは共にガラスか又は不活性プラスチックのホールダー１０とカバー組み立て部分１１から構成される。ホールダーは、上記のような液体ＲＮＡ抽出剤１１を含む。
ホールダー１０は、図１に垂直な断面では円形であり、本発明の全ての実施態様のように往復振盪機内にしっかりと保持されるように適応される円筒形の側壁を有することが好ましい。多数のミクロンサイズ粒子、適切にはビーズ１２は液体抽出剤の中にある。ビーズはガラス又は金属であることが好ましく、直径が約0.1～1.0mmであることが好ましい。
そのようなビーズの都合のよい数又は重量が用いられる。
研究のために、ふつうは少量のＲＮＡだけを必要とする容器は非常に小さいものである。典型的には、全容量は約1.5～2.5mlである。多量のＲＮＡを得るために大きな容器が用いられる。
ホールダーは、ホールダー自体と同じ材料であってもよく、典型的にはホールダー壁の１／２より上に配置される脆いシール１４で密閉される。シール１４は、液体を通さないが容器内で往復して運動する粒子の重量又は好ましくはビーズ１３のような大きな粒子で破壊されるように十分軽いものである。大きなビーズは、シールを破壊するのに都合のよいサイズ及び重量を有するものである。
カバー組み立て部分１１は、容器１０の外側ねじ山と合う内側ねじ山１５を有する。
図２～図４に示される第２、第３及び第４実施態様において、ホールダー１０、抽出剤液１１、小さなサイズのビーズ１２及び大きなビーズ１３、直径約３～５mmは、図１に示される第１実施態様と同様である。更に、抽出剤液からＲＮＡを単離するために用いられるプロセス工程も同様である。
図２に示される第２実施態様では、カバー組み立て部分１１Ａは細胞を保存し成長させるために働く。カバー組み立て部分１１Ａは、環状側壁本体部材２０Ａ、空洞３０の底壁と

して働く脆い液体の通らない層２１Ａ、適切な培養液２２Ａ中の問題の細胞及び取りはずしできる上部カバー２３Ａを有する。容器は、ビーズ及び抽出剤液を含むホールダー１０及び容器本体にねじで締めるか別の方法で留められるカバー組み立て部分１１Ａからなる。

使用者が培養液２２Ａ中の細胞からＲＮＡを単離することを所望する際の使用では、カバー組み立て部分１１Ａはホールダー１０にねじで締められ、上部カバー２３Ａと共に適切な場所で容器が約３０秒から５分間激しく振盪されて大きなビーズ１３が脆い層２１Ａを破壊し、細胞を含有する培養液２２Ａ又は他の液体培養液が抽出剤液１１と他の成分とホールダー内で混合する。

図３の実施態様では、カバー組み立て部分１１Ａは、液体培養液２２Ｂ中に問題の細胞を有する。カバー組み立て部分は、環状側壁２０Ｂ、培養液２２Ｂ中問題の細胞、取りはずしできる固体の上部リッド２３Ｂ及び固体の底壁２４Ｂを有する。容器１０は、第１実施態様のように脆い液体の通らない層２１Ｂを有する。

操作では、使用者は、容器１０からカバー組み立て部分１１Ｂのねじを外し、上部リッド２３Ｂのねじをはずし、培養液２２Ｂを容器１０に注ぐか又はピペットで移し、ここで脆い層２１Ｂの上部に保持される。次に、カバー組み立て部分１１Ｂがホールダーに置き換えられ、ビーズ１３が脆い層２１Ｂを破壊するように容器が振盪され、成分ミックス及び細胞壁の全部がビーズの作用により破壊されてＲＮＡを放出する。

図４に示される第４実施態様においては、カバー組み立て部分１１Ｃは、環状側壁２０Ｃ、培養液又は他の培養液２２Ｃ中問題の細胞、固体の底壁２４Ｃ及び内側ねじ山２６を有する上部リム２５を有する。ホールダー１０は、脆い液体の通らない層２１Ｃを有する。

操作では、使用者は、ホールダー１０からカバー組み立て部分１１Ｃを取り外し、上部２３Ｃのねじをはずし、カバー組み立て部分をねじ山２６でホールダー１０にねじで締める。次に、ビーズ１３が脆い層２１Ｃを破壊するように容器を振盪する。

上で示したように、容器の全容積は、密閉されると全混合液が便利に及び効率よく振盪されるような条件下に抽出溶媒、液体培養液及び他の成分を保持するように十分でなければならない。この目的の通例は、密閉管の全容積の１／３がビーズで占められ、１／３が試薬／細胞及び１／３が空間である。

比較的少量のＲＮＡが要求される研究又は他の実験に使用する場合、容器は１つ又は複数の容器を含むキットに有機溶媒の容器及びプロセスの実施に適切な他の備品と共に包装される。キットは、ＲＮＡ源として用いられる種々のサイズの細胞を収容するために異なるサイズの小ビーズを含む容器の選択が含められる。そのような容器は、２０まで又はそれ以上の複数の容器でさえ保持することができる振盪機と共に特に有効である。そのような機械及び容器は、多数のＲＮＡ単離を同時に又は連続して行うことが所望される場合に特に有効である。

本発明の容器は、４種の特定の実施態様について及び単離されるべきＲＮＡを含む細胞における分子構造及び分子相互作用を破壊するために用いられる清浄剤或いはカオトロピック剤としてのグアニジニウム塩を含む抽出溶媒を用いてＲＮＡを単離することについて主に記載された。他のカオトロピック剤も用いられる。

容器の概念は、図示され述べられた構造と等価である他の構造を用いて実施することができることは当業者に明らかであろう。例えば、カバー組み立て部分が適切な場所にしっかりとねじで締められると破壊するように脆い密閉層がホールダーの上部に固定され、もって、大きなビーズの必要が排除される。カバー組み立て部分が適切な場所にしっかりとねじで締められると密閉層を破壊するように特定の寸法に作られたカバー組み立て部分の内側に鋭い部材を密閉することにより、同様の結果が達成される。

カバー組み立て部分を、示されたねじ山と等価な手段、例えば、圧力ばめによってホールダーに固定することができることは当然のことである。

細胞壁の破壊により細胞置換分の全てが放出されるので、本発明は、既知の単離法を用いて他の細胞成分を単離する上記のようなカオトロピック剤及び抽出溶媒を存在させて又はさせずに用いられる。例えば、タンパク質は、中性バッファー及びプロテアーゼインヒビ

ター反応混液を含む抽出溶媒を含む破壊混合液から単離される。
他の例として、本発明の方法及び容器は、皮膚、腸、胃、肝臓等の組織を特定の成分の単離のための成分の部分に効率よく及び急速に破砕するために用いられる。次に、個々の細胞成分、例えば、酵素が、標準クロマトグラフィー法を用いて単離される。同様に、構造成分、例えば、結合組織、膜、細胞壁成分等が分別遠心分離法によって分離される。
下記の実施例は、本発明を具体的に説明するために示されるものであり、限定するものとしてみなされるべきでなく、その真意又は範囲を逸脱することなく多くの態様が可能であることは明らかである。

実施例１～６

下記に記載されるプロトコールを用いて下記の微生物からＲＮＡ及びＤＮＡを単離した。
１．スタフィロコッカス・アウレウス
２．ストレプトコッカス・ピオゲネス
３．マイコバクテリウム・ツベルクローシス
４．ナイセリア・メニンギチジス
５．サッカロミセス・セレビシエ（酵母）
６．クラミドロモナス・レインハルドチイ（藻類）

工程：
１．処理されるべき１０mlの細胞を遠心する（約１～５×１０^{8}/ml）。
２．培養上清を吸引し捨てる。
３．細菌沈降物を１mlの抽出試薬に再懸濁する。
下記の成分を加えることにより５mlの抽出液を調製する。

フェノール	２ml（40%）
１０%ＣＴＡＢ*	0.5ml（1%）
２Ｍ ＮａＡｃｐＨ４	125μl（50mM）
１Ｍ ＤＴＴ	μl（1mM）
水	2.37ml

* 臭化セチルトリメチルアンモニウム

これにより、２相試薬が得られ、激しく攪拌した後、１mlの試薬をピペットで試験管に入れる。
４．試薬混合液を、約0.5ml（1.65gm）の0.1mmガラス／ジルコニアビーズ（酵母及び藻類に用いられる大きなビーズ）を含む滅菌ミクロフュージ管に移す。
５．６０００rpmで２０秒間往復運動で振盪する。パルス回転させて該管の底にガラス／ジルコニアビーズを沈降させる。
６．２００μlのクロロホルムを加える。２分間放置する。
７．２５秒間攪拌する。
８．１２，０００ｇ、４℃で１５分間遠心する。
９．上方の水相を吸引する。
10．0.5mlのイソプロパノールを加える。１０分間インキュベートする。
11．１２，０００ｇ、４℃で１０分間回転させる。
12．沈降物を７０%エタノールで洗浄し、５０００×ｇで５分間回転させる。
13．７０%エタノール洗浄液を捨て、５～１０分間風乾する。
14．保存用ＲＮＡを１００μlのピロ炭酸ジエチル処理水或いは0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに再懸濁する。
15．ＤＮＡを得るために、ＤＮＡを含む中間相をフェノール／クロロホルム（５０／５０ｖ）で2回再抽出する。上方の水相を貯蔵する。１／１０容量の酢酸ナトリウム（３Ｍ ｐＨ5.2）を加える。ＤＮＡを３容量の１００%エタノールで沈殿し、遠心し、７０%エタノールで洗浄し、再遠心する。ＤＮＡを含む沈降物をトリスＥＤＴＡバッファーに再懸濁し、制限消化又はクローニングに用いる。

実施例７

新しいマウス肝臓、腎臓、脳、脾臓及び骨格筋片（各約５０mg）をカオトロピックＲＮＡ

安定化試薬及び溶解マトリックスを含む２ml管に入れ、直ちにFastPrep™装置で３０～６０秒間処理する（予備均質化の必要はない）。遠心後、透明なＲＮＡ含有上清をエタノール沈殿するか又はマトリックス精製し、１００μl ＤＥＰＣH_2Oに溶離する。１０～２０μlを未変性アガロースゲルで実験する（図５）。図６は、肝臓ＲＮＡのＲＴ－ＰＣＲ分析を示す図である。

表１

種々の供給源からの典型的なＲＮＡ収量		
試料	量	ＲＮＡ全収量
筋組織	100 mg	100-150 μg
肝組織	100 mg	800 μg まで
線維芽細胞	10^7 細胞	50-80 μg
リンパ球	10^7 細胞	70-100 μg
若い植物の葉	250 mg	50-200 μg
成熟植物の葉	250 mg	25-150 μg
細菌細胞	10^9 細胞	50-100 μg
酵母細胞	10^9 細胞	50-100 μg

実施例８

高速で簡便で高価な設備を必要としないグラム陽性菌からＲＮＡを単離する方法は、Fast RNA™（BIO 101、カリフォルニア州、ビスタ）キットをFastPrep™機（Savant）と共に使用した。この方法は、以前にはＲＮＡ抽出が困難であることが既知であったスタフィロコッカス・アウレウス及びサッカロミセス・セレビシエに対して用いた。

本手順として、細菌を増殖培養液中で一晩培養し、１０mlの新しい培養液で１：１００に希釈し、OD_{650nm} 0.7、1.1及び1.7に対応する各々中間対数期相、後期対数期相及び後指数期相まで増殖した。次に、細菌を沈降させ（２，５００×ｇ、４℃で１０分間）、１mlの試薬に再懸濁した。細胞を２mlのミクロフュージ管に移し、これに５００μlのジルコニア／シリカビーズ（0.1mmサイズ）を加えた。

該管をサバント機内で６５００rpmで２０秒間振盪し、氷上に置いた。該管に２００μlのクロロホルムを添加した。１５秒管攪拌し室温で２分間インキュベートした後、混合液を１２，０００×ｇ、４℃で１５分間遠心した。ＲＮＡを水相（上層）から回収し、0.5mlのイソプロパノールで沈殿させ、沈降させた（１２，０００×ｇ、４℃で１０分間）。沈降物を７５％エタノールで洗浄し、風乾し、ＤＥＰＣ処理水中１００μlの0.5％ＳＤＳに再懸濁した。ＲＮＡ濃度を分光光度法で求めた。

５μgの各試料をＭＯＰＳランニングバッファー（２０mMＭＯＰＳ、１０mM酢酸ナトリウム、２mＭＥＤＴＡ、ｐＨ7.0）中1.5％アガロース～０．６６Ｍホルムアルデヒドゲルに電気泳動した。この方法により、A_{260}/A_{280}比で証明されるように良好な純度を有するＲＮＡの高収量を得ることができた（表１）。本抽出方法は、また、ＲＮＡ収量が細菌細胞数に比例することがわかるように非常に効率がよい（表１）。ＲＮＡ種の多能性もまた、ホルムアルデヒドゲルで確認された（図７）。

プライマー拡張は、ＤＥＰＣ処理水に再懸濁した３０μgのＲＮＡを用いて行った。ＲＮＡを末端標識した（5×10^4cpm）プライマーの存在下に沈殿させ、次に、３０℃で一晩前ハイブリッド形成した。次に、反応混合液を１０％酢酸の存在下に５容量のエタノール

で沈殿し、洗浄し、乾燥した。逆転写を行い、反応液を４２℃で９０分間インキュベートし、６５℃で０分間加熱し、次に、１μｌのＲＮａｓｅＡと５５℃で１５分間インキュベートした。反応液をＱＩＡ急速ヌクレオチド除去キット（Qiagen）で洗浄し、エタノール沈殿させ、乾燥し、１０μｌのＴＥ及び１０μｌのシークエナーゼ停止溶液に再懸濁した。反応液を９５℃まで５分間加熱し、氷上で冷却し、配列決定用ゲルに充填した。

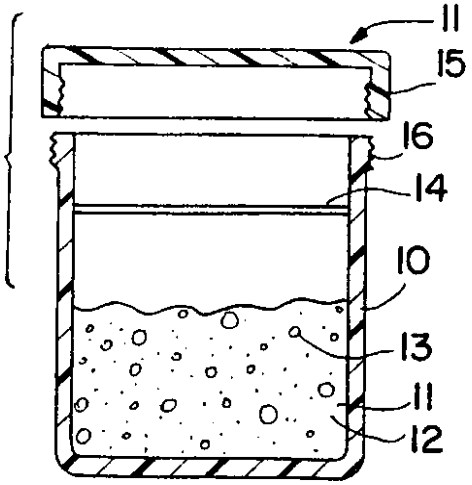
実施例９

スタフィロコッカスＲＮＡを、ＣＹＧＰ中で後期対数期相又は後指数期相まで増殖した１０mlの培養液から抽出し、沈降させ、１mlのFastRNA™試薬（BIO 101）及び0.5mlの0.1mmジルコニウム／シリカビーズに再懸濁し、高速往復ホモジェナイザー（FastPrep™機、Savant Instruments）で６，０００rpmで２０秒間振盪した。［この装置は、同時係属米国特許出願第08/294,544号の主題である。］２００μｌのクロロホルムを添加した後、混合液を１２，０００ｇで１０分間遠心した。上方の水相のＲＮＡをイソプロパノールで沈殿させ、ＤＥＰＣ処理水に再懸濁した。細胞ＲＮＡ全収量は、A_{260}/A_{280}比が2.0の約0.5～１mgであった。ＲＮＡ種の多能性は、ホルムアルデヒドゲルで証明された。

Cheungら（（1994）J. Bacteriol. 176:580-585）に記載されているように各細菌株からの５μｇのＲＮＡをＭＯＰＳランニングバッファー中1.5%アガロース～0.66Mホルムアルデヒドゲルに加えた。ＲＮＡを、ターボブロッターシステム（Schleicher & Schuell、ニューハンプシャー州、キーネ）を用いてナイトランナイロン膜に移した。膜上のＲＮＡを紫外線で架橋し、^{32}Ｐ標識ゲル精製プロテインＡ又はα溶血素プローブと５０％ホルムアミド中４２℃で一晩ハイブリッド形成し、洗浄し、Cheungら（1994）に記載されているようにオートラジオグラフィー処理した。

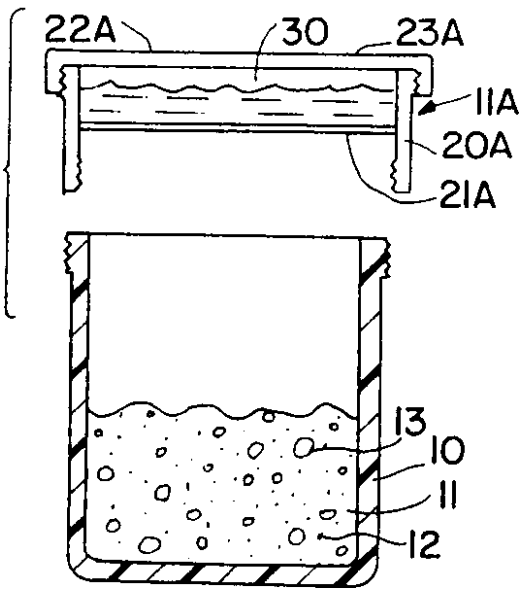
【図１】

FIG. 1



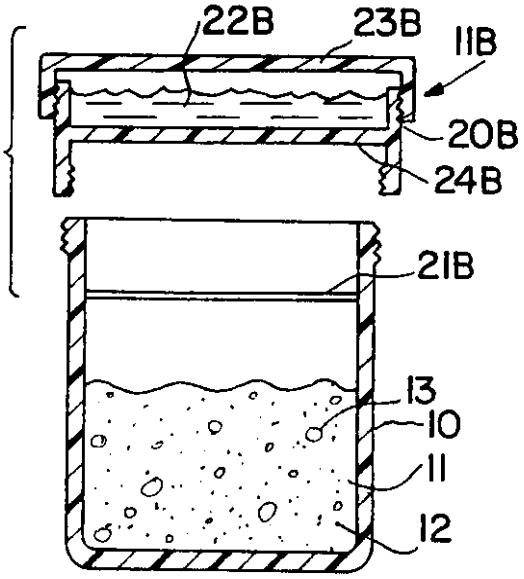
【図２】

FIG. 2



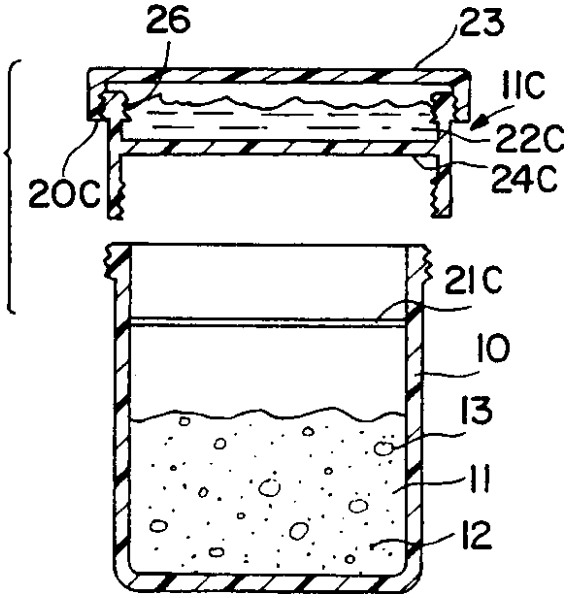
【図３】

FIG. 3



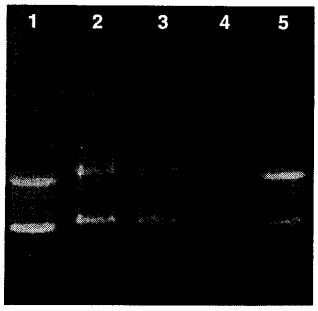
【図４】

FIG. 4



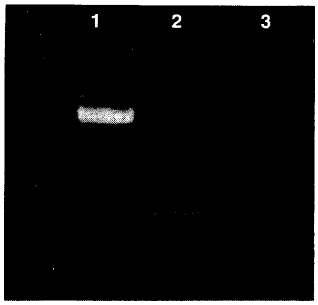
【図５】

FIG. 5



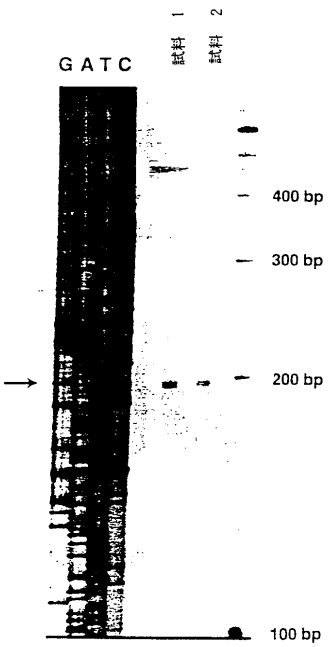
【図６】

FIG. 6

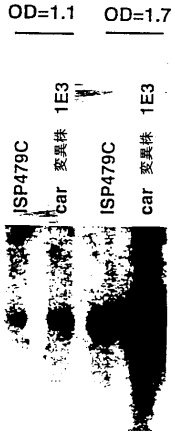


【図７】

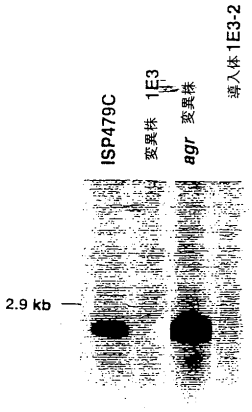
FIG. 7



【図８】
FIG. 8



【図９】
FIG. 9



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 08/236,536
(32)優先日 平成6年5月2日(1994.5.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 08/236,537
(32)優先日 平成6年5月2日(1994.5.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 08/412,383
(32)優先日 平成7年3月28日(1995.3.28)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人
弁理士 小川 信夫
(74)代理人
弁理士 村社 厚夫
(72)発明者 フィシェッティー ヴィンセント エイ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 １１５５２ ウェスト ヘンプスティード ジョアン コート ４４８
(72)発明者 チェーウン アンブローズ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 １００２１ ニューヨーク イースト シックスティサード ストリート ５００

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 米国特許第４２９５６１３（ＵＳ，Ａ）
米国特許第４８４３１５５（ＵＳ，Ａ）
米国特許第５０１０１８３（ＵＳ，Ａ）
独国特許発明第４２４３６９２（ＤＥ，Ｃ２）
J.Microbiol.Methods,Vol.15,No.2(1992)p.83-94
Methods Enzymol.,Vol.152,No.(1987)p.33-48
Austral.J.Exp.Biol.,Vol.31,No.6(1953)p.583-589

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
CA(STN)
REGISTRY(STN)