

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6544860号
(P6544860)

(45) 発行日 令和1年7月17日 (2019.7.17)

(24) 登録日 令和1年6月28日 (2019.6.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 Q 1/68

請求項の数 23 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2015-549377 (P2015-549377)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月21日 (2013.10.21)
 (65) 公表番号 特表2016-505262 (P2016-505262A)
 (43) 公表日 平成28年2月25日 (2016.2.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/065821
 (87) 国際公開番号 W02014/099121
 (87) 国際公開日 平成26年6月26日 (2014.6.26)
 審査請求日 平成28年10月14日 (2016.10.14)
 (31) 優先権主張番号 13/721, 948
 (32) 優先日 平成24年12月20日 (2012.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 390041542
 ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
 アメリカ合衆国 02210 マサチュー
 セッツ州 ボストン フェーンズワース
 ストリート 41
 (74) 代理人 100188558
 弁理士 飯田 雅人
 (74) 代理人 100154922
 弁理士 崔 允辰
 (74) 代理人 100207158
 弁理士 田中 研二
 (74) 代理人 100137545
 弁理士 荒川 聡志
 (74) 代理人 100105588
 弁理士 小倉 博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体基材上での核酸安定化のための配合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料から核酸を抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスであって、
 前記乾燥固体マトリックスは、乾燥形態で第1族又は第2族の金属カチオンを含む金属チ
 オシアン酸塩と、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)である還元剤
 と、緩衝液とを含むpH域が4~7.4の組成物を含む固体マトリックスであり、該固体
 マトリックスが、セルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維又はそれらの組合せを含む多
 孔質マトリックスである、乾燥固体マトリックス。

【請求項 2】

第1族又は第2族の金属カチオンが、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 及び
 Ba^{2+} からなる群から選択される、請求項1記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 3】

固体マトリックスに存在する組成物が、UV保護剤、ラジカル捕捉剤、キレート剤又は
 それらの組合せをさらに含む、請求項1記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 4】

乾燥固体マトリックスに導入された組成物がさらにRNアーゼ阻害剤を含む、請求項1
 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 5】

乾燥固体マトリックスにより、周囲条件下で乾燥形態の核酸の長期保存が可能となる、
 請求項1記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 6】

核酸が、RNA、DNA又はその組合せである、請求項 5 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 7】

核酸がRNAである、請求項 6 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 8】

多孔質マトリックスがセルロース紙である、請求項 1 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 9】

金属チオシアン酸塩が、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウム、チオシアン酸リチウム、チオシアン酸マグネシウム、チオシアン酸カルシウム、チオシアン酸バリウム、チオシアン酸亜鉛及びその組合せからなる群から選択される、請求項 1 記載の乾燥固体マトリックス。

10

【請求項 10】

緩衝液が、2 - アミノ - 2 - ヒドロキシメチル - プロパン - 1, 3 - ジオール (Tris)、2 - (N - モルフォリノ) エタンスルホン酸 (MES)、3 - (N - モルフォリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS)、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES)、クエン酸緩衝液及びリン酸緩衝液からなる群から選択される、請求項 1 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 11】

UV 保護剤又はラジカル捕捉剤が、ヒドロキノンモノメチルエーテル (MEHQ)、ヒドロキノン (HQ)、トルヒドロキノン (THQ) 及びアスコルビン酸からなる群から選択される、請求項 3 記載の乾燥固体マトリックス。

20

【請求項 12】

RNアーゼ阻害剤が、パナジリボヌクレオシド錯体 (VRC) 又はヌクレオチドアナログである、請求項 4 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 13】

固体マトリックスが多孔質セルロース系マトリックスであり、
a) 金属チオシアン酸塩が第 1 族又は第 2 族の金属カチオンで構成され、
b) 還元剤が TCEP であり、
c) 緩衝液が MOPS である、
請求項 1 記載の乾燥固体マトリックス。

30

【請求項 14】

ラジカル捕捉剤をさらに含んでいて、ラジカル捕捉剤が MEHQ 又は THQ を含む、請求項 13 記載の乾燥固体マトリックス。

【請求項 15】

生体試料から核酸を抽出し、保存する方法であって、
a) 第 1 族又は第 2 族の金属カチオンを含む金属チオシアン酸塩と、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) である還元剤と、緩衝液とを含む pH 域が 4 ~ 7.4 である組成物を、セルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維又はそれらの組合せを含む多孔質マトリックスである乾燥固体マトリックスに導入して、生体試料から核酸を抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスを供給すること、
b) 乾燥固体マトリックスに組成物に導入した後に固体マトリックスを乾燥すること、
c) 核酸を収集するために乾燥固体マトリックスに試料を適用すること、
d) 核酸を含む固体マトリックスを乾燥すること、及び
e) 周囲条件下で乾燥状態の固体マトリックスで核酸を保存することを含む、方法。

40

【請求項 16】

金属カチオンが、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 及び Ba^{2+} からなる群から選択される、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

50

固体マトリックスから核酸を回収することをさらに含む、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 8】

生体試料が、血液、血清、組織、唾液、鼻の粘液又は細胞である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 9】

生体試料が、精製核酸試料又は組織培養細胞調製物である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 0】

生体試料からの核酸の精製は、核酸を抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスに試料を適用する前に不必要である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 1】

当該方法によって周囲条件下で乾燥形態の R N A の長期保存が可能となる、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 2】

水溶液、緩衝液又は有機溶液でマトリックスを再水和することにより、乾燥固体マトリックスから核酸を回収し、核酸をさらなる分析に供する、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 3】

電気溶出により乾燥固体マトリックスから核酸を回収する、請求項 1 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、一般に、乾燥固体基材及び乾燥形態の生体試料から、核酸、特に R N A を周囲抽出、安定化及び保存するために乾燥固体基材を使用する方法に関する。乾燥固体基材から核酸を抽出、収集、保存及び回収する方法も記載する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

R N A は、化学物質の自己加水分解及び酵素媒介分解の双方の結果として、安定化するのが最も困難な生体分子のうちの 1 つである。従って、生体試料に由来する R N A の抽出及び保存は、R N A の抽出及び回収に使用する緩衝液、p H、温度、特に、丈夫なりボヌクレアーゼ (R N アーゼ) の遍在性などの多くの環境因子の影響を受けやすいが、これらに限定されない。その結果、精製及び未精製の双方の状態の R N A は、加水分解及び酵素的分解を防ぎ、かつ R N A 試料の完全性を保存するために、通常 - 8 0 での保存を必要とする。 - 8 0 での試料の保冷又は冷凍に関するコスト及び空間要求を避けるため、周囲条件下で R N A を抽出、収集及び保存する能力が経済的に望まれている。

【0 0 0 3】

液体状で周囲条件下で R N A を保存するための現在の方法論は、例えば、界面活性剤、カオトロピック化合物、還元剤、遷移金属、有機溶媒、キレート剤、プロテアーゼ、R N アーゼペプチド阻害剤及び抗 R N アーゼ抗体を使用した R N アーゼの非活性化に注目してきた。トランスエステル化及び自己加水分解を防ぐために、R N A を化学的に修飾するというさらなる試みが行われている。しかし、最も入手しやすい R N A 保存物は、室温で数日間又は数週間、液体状の R N A しか保存できない。乾燥形態の R N A の収集及び保存を成功させる現在の技術では、通常、R N A が、保存される前に、生体物質 (例えば、血液、血清、組織、唾液などなどの生体試料) からまず「予備精製」され濃縮されることが必要となる。

【0 0 0 4】

乾燥形態の R N A を保存する現在の技術はさらに乾燥設備を必要とする。従って、これらの方法は、著しい試料の加工なしでは試料 (例えば、生体試料) から R N A を直接収集できない。

【0 0 0 5】

従って、1 つの工程で試料 (例えば、生体試料) からの R N A の抽出、安定化及び保管 / 保存をまとめて行える組成物及び方法が望まれており、当該技術分野で必要とされてい

10

20

30

40

50

る。このような組成物及び方法により、周囲条件下でのRNAの長期保存が可能になり、インタクトなRNAがさらなる分析のために回収できるようになる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第2012/0052572号明細書

【発明の概要】

【0007】

本明細書において下記で定義する生体試料のような試料から核酸を抽出及び保存するための固体マトリックスであって、タンパク質変性剤、還元剤、緩衝液及び必要に応じてラジカル捕捉剤又はRNAアーゼ阻害剤を含有する組成物が乾燥形態の固体マトリックスに存在する、固体マトリックスが記載されている。一実施形態では、本願の乾燥固体マトリックスにより、周囲条件下で乾燥形態の核酸（例えば、RNA、DNA）を含む生体試料の長期保存が可能となる。本発明のさらなる態様では、試料から核酸（例えば、RNA、DNA）を周囲抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスには、チオシアン酸塩、還元剤、緩衝液及び必要に応じて乾燥形態の固体マトリックスに存在するラジカル捕捉剤又はRNAアーゼ阻害剤が含まれる。別の実施形態では、試料から核酸（例えば、RNA、DNA）を抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスには、1種以上の金属チオシアン酸塩（1種以上の金属チオシアン酸塩は、チオシアン酸グアニジン（GUSCN）ではない）、還元剤、緩衝液及び必要に応じてラジカル捕捉剤又はRNAアーゼ阻害剤が含まれる。

【0008】

乾燥固体マトリックスに周囲状態で保存した核酸（例えば、RNA、DNA）は、収集した核酸試料のさらなる分析に適したインタクトな形態の固体マトリックスから核酸を解放する工程を行ってもよい。生体試料から核酸を抽出及び保存するために本発明の固体マトリックスを使用する方法も提供される。

【0009】

化学的に修飾した多孔質膜のこれら及び他の特徴、態様及び利点は、添付の図面を参照して以下の詳細な説明を読むことでより一層理解され、図面全体にわたり、同じ符号は同じ部分を表す。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】異なる組成物の固体マトリックスに培養細胞をスポットした後、電気溶出によりセルロースから回収した核酸の代表的な電気泳動図を表す。高分子量ゲノムDNA及び28S/18S rRNAバンドを示す。Image Jを用いてDNA及びRNAをさらに定量化する。パネルAにおいて各ゲルレーンの上から下に垂線を引き、Plot Profile機能を用いて線の距離（cm）の関数としてピクセル強度（濃淡値任意単位）をプロットした。ゲノムDNA及び28S/18S rRNAに対応するピークをボックス内に示す。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図2】表示した各組成物の28S rRNA及び18S rRNAについての濃淡値任意単位として示すゲルピクセル強度を表す。セルロース試料は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で10日間保管した。18S rRNAに対する28S rRNAの比率をグラフの各棒の上に記載する。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図3】表示した各組成物の28S rRNA及び18S rRNAについてのゲルピクセル強度を表す。セルロース基材は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で13日間保管した。各実験条件の18S rRNAに対する28S rRNAの比率をグラフの各棒の上に示す。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図4】表示した各組成物の28S rRNA及び18S rRNAについてのゲルピクセル強度を表す。セルロース試料は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で10日間保管した。各実験条件の18S rRNAに対する28S rRNAの比率をグラフ

の各棒の上に表示する。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図5】表示した各組成物の28S rRNA及び18S rRNAのバンドについてのゲルピクセル強度を表す。セルロース試料は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で30日間保管した。各実験条件の18S rRNAに対する28S rRNAの比率をグラフの各棒の上に表示する。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図6】記載した各条件で、RNA 6000 Pico Lab Chipを用いてAgilent 2100 バイオアナライザで求めた、セルロース基材上の乾燥血斑から測定したRNA Integrity Number (RIN)を表す。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

10

【図7】日光によるセルロース基材の損傷からのmRNAの保護を証明する。グラフの各棒は、図で示した組成物を含むUV処理試料とUV未処理試料の間のqRT-PCRサイクル閾値の差異を表す。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図8】4週間にわたる異なる温度で異なる緩衝液の存在下でのセルロースベース紙に対するTCEPの活性を表す。その他の詳細については実施例の項に記載する。

【図9】化学的含浸セルロース基材にスポットした培養ヒト細胞のRNA Integrity Number (RIN)を表す。試料は、Agilent 2100 バイオアナライザでのRNA分析前の少なくとも1週間は周囲温度で保存した。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

【図10】化学的含浸セルロース基材上の乾燥血斑のRNA Integrity Number (RIN)を表す。乾燥血斑は、Agilent 2100 バイオアナライザでのRNA分析前の19日間、周囲温度で保存した。その他の実験の詳細については下記の実施例の項に記載する。

20

【発明を実施するための形態】

【0011】

試料（例えば、生体試料）から核酸（例えば、RNA、DNA又はその組み合わせ）を周囲抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスであって、タンパク質変性剤、還元剤、緩衝液及び必要に応じてラジカル捕捉剤又はRNAアーゼ阻害剤を含む組成物が乾燥状態の固体マトリックスに導入される、乾燥固体マトリックスが本明細書に記載されている。本明細書に記載のさらなる実施形態では、周囲条件下で核酸（例えば、RNA、DNA又はその組み合わせ）を抽出及び乾燥保存するための固体基材には、1種以上のチオシアン酸塩（1種以上のチオシアン酸塩は、チオシアン酸グアニジン（GUSCN）ではない）、還元剤、緩衝液及び乾燥形態の固体マトリックスに必要に応じて存在するラジカル捕捉剤又はRNAアーゼ阻害剤が含まれる。上記の組成物の「組み込み」には、下記の「浸漬」法が含まれるが、これに限定されない。当業者であれば、乾燥固体マトリックスへの組成物の組み込みを行うために多くのそのような方法が存在することを理解するであろう。乾燥固体マトリックスに組成物に導入した後、任意の適切な方法に従って固体マトリックスを乾燥する。

30

【0012】

本発明の組成物により、周囲保存条件下で試料からの核酸の長期乾燥保存が可能となる。この知見は、周囲条件下で不安定であることが広く知られているRNAに関して特に重要である。本明細書で使用される用語「固体マトリックス」には、セルロースベースの物、セルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維又はそれらのあらゆる組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。本願の固体マトリックスは多孔質でもよい。特定の実施形態では、固体マトリックスは、903、31-ETF、FTA（商標）又はFTA（商標）EluteなどのWhatman（商標）製の多孔質セルロース紙である。膜、紙、セルロース紙、固体マトリックス及び基材という用語は、本開示全体にわたり交換可能に使用され得る。当業者であれば、これらが当該技術分野で使用され、同じ種類の組成物を意味することを直ぐに認識するであろう。

40

【0013】

50

用語「抽出」は、試料、より詳細には生体試料から核酸を分離及び単離する任意の方法を意味する。RNA及びDNAなどの核酸は、例えば、空気中の蒸発性試料の細胞溶解の間又は試料と接触すると細胞溶解及び核酸の解放が生じる化学的修飾固体マトリックス（例えば、FTA（商標）Eliteセルロース紙）中の化合物の存在により解放可能である。当業者であれば、核酸を安定化及び保存するために固体マトリックスに核酸を捕捉できるように、試料（例えば、未精製の生体試料）から核酸、特にRNAを抽出する任意の方法が本開示の組成物及び方法に使用され得ることを理解するであろう。試料からの核酸を抽出する方法の上記の実施例は、例示目的のみに提供される。用語「保存（storage）」又は「保存（preservation）」は、さらなる分析に適した形態の抽出核酸の維持に関して本明細書に交換可能に使用され得る。

10

【0014】

核酸、特にRNAの分野の当業者は、従来から、（１）mRNAターゲットの定量RT-PCR増幅、（２）Agilent 2100 バイオアナライザでのRNA Integrity Number（RIN）分析及び（３）全細胞RNAの大半を占める28s：18sリボソームRNA（rRNA）の比率に基づき、RNAの安定性及び品質を評価してきた。高品質の細胞RNAは、一般に、1より大きい28s：18s rRNA比率と10に近いRINスコアを示す。実際、所望のRINスコアは一般に5より大きい。さらに、高品質の細胞RNAは、低存在率のmRNAと大きな（例えば、1kB超）mRNAの双方の効率的な増幅を支持する。便宜上、rRNAシグナル強度及び28s：18s rRNA比率は、ゲル電気泳動によって高いRNA保存性を有する試料を迅速にスクリーニングし特定するために使用することが多い。

20

【0015】

本明細書で定義するように、「生体試料」には、ヒトなどの任意の生物から得られた血液、血清、組織、鼻の粘液及び唾液が含まれるが、これらに限定されない。生体試料は、自己診断検査（例えば、血糖モニタリング）を受ける個体により又は訓練を受けた医療専門家により、例えば、針を用いて血液を吸引するか、患者の皮膚の病変などの特定の部位を傷つけるか綿棒で擦過（swab）するかなどの様々な技術によって得ることができる。種々の生体試料を収集する方法が当該技術分野においてよく知られている。用語「試料」には、上記で定義される生体試料だけでなく、例えば、組織培養細胞及び精製核酸も含まれる。

30

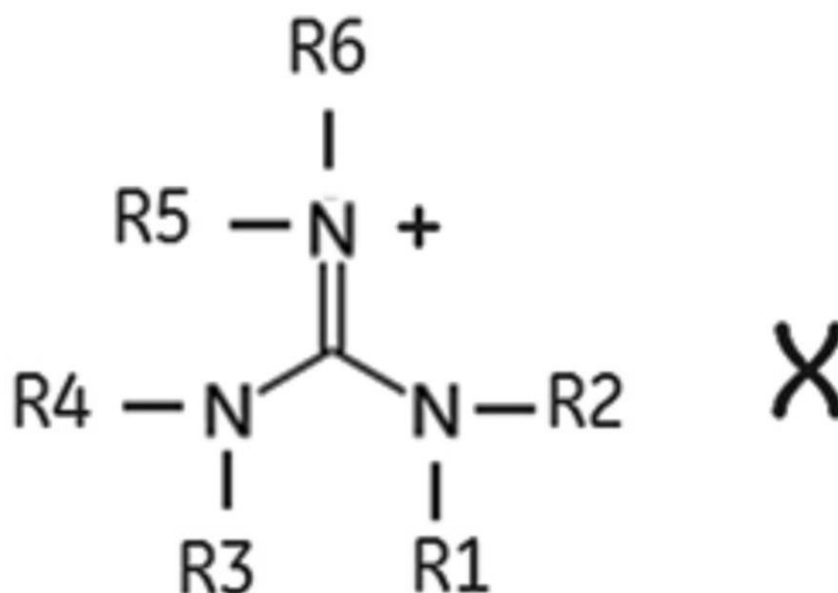
【0016】

タンパク質変性剤、還元剤及び緩衝液を含む組成物は、本開示の乾燥固体マトリックスに存在する。組成物は、1種以上の上記各成分を含んでもよい。組成物は、必要に応じてさらに、紫外線（UV）阻害剤（以下、「UV保護剤」ともいう。）、ラジカル捕捉剤、RNAアーゼ阻害剤、キレート剤又はそれらの任意の組合せを含んでもよい。当業者であれば、多くのタンパク質変性剤が当該技術分野において知られており、本明細書に記載した組成物及び方法で使用するために経験的に選択され得ることを理解するであろう。特定のタンパク質変性剤に限定することなく、タンパク質変性剤の例として、チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、アルギニン、硫酸ドデシルナトリウム（SDS）、尿素又はそれらの任意の組合せが挙げられる。タンパク質変性剤の例の式を以下に示す：

40

【0017】

【化 1】



10

式中、Rはそれぞれ独立して、水素、ヘテロ原子含有基又は炭化水素基からなる群から選択されるメンバーであり得る。

20

【0018】

ヘテロ原子含有基は、窒素、酸素、硫黄、リン、シリコン及びホウ素から選択されるメンバーを含む基である。反応性官能基を用いてグアニジン含有化合物を結合することが目的である。ヘテロ原子を保有する典型的な反応性基として、エポキシ、アクリラート、マレイミド、ハロゲン化アシル、ハロゲン化アルキル、アジド、シアン酸エステル、イソシアナート、ハロゲン化アリール、アルデヒド、アミン、オキシム、チオール、アルコール、酸、アジリジン、アゾ、イソチオシアナート、無水物、混合無水物、ラクトン、スルトン及びケトンが挙げられる。

【0019】

30

炭化水素基は炭素と水素の双方を含有する基であるが、親水性を高めるためにヘテロ原子を含有してもよい。反応性官能基を用いてグアニジン含有化合物を結合することが目的である。炭化水素を保有する典型的な反応性基として、アリル、スチリル、ビニル及びアルキンが挙げられる。ヘテロ原子含有炭化水素基として、2 - オキシスチリル、3 - オキシスチリル又は4 - オキシスチリル、アミノアリル、オキシアリル、オキシビニル、アミノビニルが挙げられる。

【0020】

Xは、1個以上の形式負電荷を含む基である、アニオンである。メンバーは、塩化物イオン、チオシアン酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、臭化物イオン、亜塩素酸イオン、塩素酸イオン、チオ硫酸イオン、炭酸イオン、炭酸水素イオン、酢酸イオン、蟻酸イオン、リン酸水素イオン、二水素リン酸イオンからなる群から選択される。1種以上のアニオンを併用してもよく、形式電荷のレベル（二価、一価、三価）が異なるアニオンを組み合わせ使用してもよいと考えられる。アニオンの分子量は10～100，000まで様々であり得る。

40

【0021】

用語「還元剤」は、別の化学種に電子を供給する化学種を意味する。さらに、様々な還元剤が当該技術分野において知られており、下記及び特許請求の範囲に例示のリストは、本開示の組成物及び方法に使用できる還元剤を限定するものではない。還元剤の例として、ジチオトレイトール（DTT）、2 - メルカプトエタノール（2 - ME）及びトリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）、並びにこれらの関連した塩（例えば、

50

TCEP塩酸塩)が挙げられる。さらに、これら又は他の還元剤を併用して本発明を実施してもよい。特定の実施形態では、還元剤はTCEPである。特定の実施形態では、TCEPは、その塩酸塩であるTCEP-HClとして添加できる。

【0022】

本明細書に使用される「緩衝液」として、例えば、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1,3-ジオール(Tris)緩衝液、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸(MES)緩衝液、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)緩衝液、クエン酸緩衝液、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)緩衝液及びリン酸緩衝液が挙げられる。可能な緩衝液の本リストは単に例示目的である。当業者であれば、本明細書に開示の組成物及び方法で使用するために選択された緩衝液のpHが適切であることを認識するであろう。緩衝液のpHは通常3~8の範囲である。

10

【0023】

上述するように、固体マトリックスに存在する組成物は必要に応じてUV保護剤又はラジカル捕捉剤を含んでもよい。本発明のある態様では、UV保護剤又はラジカル捕捉剤は、核酸を抽出及び保存するための乾燥固体マトリックスに導入された組成物に必要とされる。特定のUV保護剤に限定することなく、保護剤の例として、例えば、ヒドロキノンモノメチルエーテル(MEHQ)、ヒドロキノン(HQ)、トルヒドロキノン(THQ)及びアスコルビン酸又はビタミンCが挙げられる。ある態様では、ラジカル捕捉剤はMEHQ又はTHQである。用語「UV保護剤」又は「ラジカル捕捉剤」は、さらなる分析のために未修飾状態の抽出核酸の保持に関して交換可能に本明細書に使用され得る。固体マトリックス中の組成物はまた、バナジリリボヌクレオシド錯体(VRC)又は市販のRNアーゼ阻害剤(例えば、SUPERase-In(商標))のいずれかのようなRNアーゼ阻害剤を含んでもよい。他のRNアーゼ阻害剤の例は、Kumar et al. (2003) Biochemical and Biophysical Research Communications 300: 81-86に記載されており、その開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。

20

【0024】

本明細書に記載の組成物を用いる方法がさらに提供される。一実施形態では、核酸(例えば、RNA、DNA又はその組み合わせ)を抽出し、保存する方法は、a) 1種以上のタンパク質変性剤、1種以上の還元剤、生物学的緩衝液及び必要に応じてラジカル捕捉剤又はRNアーゼ阻害剤を含む組成物が、乾燥形態の固体マトリックスに導入された固体マトリックスを提供する工程、b) 固体マトリックスに試料(例えば、生体試料)を適用し、核酸を抽出する工程、c) 固体マトリックスを乾燥する工程及びd) 周囲条件下で乾燥状態の固体マトリックスで核酸を保存する工程を含む。方法のある態様では、固体マトリックスは、市販の903、31-ETF又はFTA Elute(商標)などの多孔質のセルロースベース紙である。本方法の性能により、周囲温度下で、乾燥形態(例えば、固体マトリックス上)の核酸、特にRNA(保存するには不安定な生体分子であることが広く知られている)の保存が可能となる。この方法で利用する試料として、ヒトなどの任意の生物から得られた血液、血清、組織、鼻の粘液及び唾液が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0025】

上述の方法は、必要に応じて、さらなる分析のために固体マトリックスから核酸を回収する工程を含んでもよい。例えば、核酸は、上記で定義したような、水溶液、緩衝溶液又は有機溶液で固体マトリックス(例えば、セルロース紙)を再水和することにより回収できる。あるいは、核酸は、電気溶出によって固体マトリックスから回収できる。当業者であれば、固体マトリックスから核酸を回収できる任意の方法を用いて開示の方法を実施し得ることを理解するであろう。

【0026】

本発明のさらなる態様では、試料から核酸を抽出し、保存する方法は、a) 1種以上の

50

金属チオシアン酸塩（１種以上のチオシアン酸塩は、チオシアン酸グアニジン（ GuSCN ）ではない）、１種以上の還元剤、緩衝液及び必要に応じてラジカル捕捉剤又はRNアーゼ阻害剤を含む組成物を固体マトリックスに導入し、固体マトリックスを乾燥する、乾燥固体マトリックスを提供する工程、b) 固体マトリックスに試料（例えば、生体試料）を適用し、核酸を抽出する工程、c) 固体マトリックスを乾燥する工程及びd) 周囲条件下で乾燥状態の固体マトリックスで核酸を保存する工程を含む。本発明の別の実施形態は、a) １種以上のチオシアン酸塩、１種以上の還元剤、緩衝液及び必要に応じてラジカル捕捉剤又はRNアーゼ阻害剤を含む組成物（組成物はチオシアン酸グアニジン（ GuSCN ）を含有しない）を固体マトリックスに導入し、固体マトリックスを乾燥する、乾燥固体マトリックスを提供する工程、b) 固体マトリックスに試料（例えば、生体試料）を適用し、核酸を抽出する工程、c) 固体マトリックスを乾燥する工程及びd) 周囲条件下で乾燥状態の固体マトリックスで核酸を保存する工程を含む、試料から核酸を抽出し、保存する方法である。ある態様では、金属チオシアン酸塩は、第１族又は第２族の金属カチオンを含み、金属チオシアン酸塩として、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウム、チオシアン酸マグネシウム、チオシアン酸カルシウム、チオシアン酸バリウム及びチオシアン酸亜鉛が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２７】

方法のある態様では、固体マトリックスは、市販の903、31-ETF又はFTAE1ute（商標）などの多孔質のセルロースベース紙である。本方法の性能により、周囲温度下で、乾燥形態（例えば、固体マトリックス上）の核酸、特にRNA（保存するには不安定な生体分子であることが広く知られている）の保存が可能となる。この方法で利用する試料として、ヒトなどの任意の生物から得られた血液、血清、組織、鼻の粘液及び唾液が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２８】

用語「核酸」は、あらゆる形態のRNA（例えば、mRNA、miRNA、rRNA、tRNA、piRNA、ncRNA）、DNA（例えば、ゲノムDNA、mtDNA）、並びに組換えRNA分子及び組換えDNA分子又はヌクレオチドアナログを用いて生成されたDNA若しくはRNAのアナログを意味する。核酸分子は一本鎖であっても二本鎖であってもよい。鎖にはコード鎖又は非コード鎖があり得る。天然のRNA分子又はDNA分子の核酸のフラグメントは、本発明に包含され、開示の組成物及び方法を用いて回収される。「フラグメント」は、核酸（例えば、RNA又はDNA）の一部を意味する。

【００２９】

下記の実施例は、例示として提供するものであり、限定を目的としていない。

【実施例】

【００３０】

実施例１：一般的なRNA分析

培養したヒトリンパ球細胞株（すなわち、Jurkat細胞）を、全細胞RNA源として利用した。細胞は、表示の試薬を含浸させた7mmのセルロースディスク上で乾燥し、デシケーターキャビネットに室温で10日間保存し、標準プロトコールに従って細胞核酸を電気溶出した。簡潔に言えば、2mg/mLのプロテインアーゼKを含むヌクレアーゼフリー水（15µL）でディスクを再水和して余分なタンパク質を除去し、約30分間乾燥した。パンチ片を、1%Trisホウ酸-EDTA（TBE）アガロースゲルの各ウェルに入れ、ホルムアミド（Ambion）を含む1×Gel Loading Buffer IIに懸濁させた。細胞核酸を110ボルトで1～2時間電気泳動にかけ、RNA及びDNAをSYBR Gold（Invitrogen）で後染色し、Typhoon Imager（GE Healthcare）を用いて検出した。セルロースからの電気溶出中及びその後の細胞RNAの完全性を保存するために、全て装置及び表面をRNA Zap（Ambion）で処理した。RNA 6000 Nano Ladder（Agilent Technologies）及び筋肉由来の精製ヒト全RNA（Origene）などの内標準をアガロースゲルに含有させて、RNアーゼの混入を観察し、コントロ

ール rRNA バンドを特定する。

【0031】

電気泳動図は、Image J ソフトウェアを用いてデジタルで定量化した。簡潔に言えば、各ゲルレーンの上から下に垂線を引き、Plot Profile 機能を用いて線の距離 (cm) の関数としてピクセル強度 (濃淡値任意単位) をプロットした。ゲノム DNA 及び 28 s / 18 s rRNA に対応するピークを特定し、28 s : 18 s rRNA の比率の計算に用いた。

【0032】

図 1 は、電気溶出を用いてセルロースから回収した核酸の代表的な電気泳動図を表す。高分子量ゲノム DNA 及び 28 s / 18 s rRNA バンドを示す。

10

【0033】

図 1 は、さらに、Image J を用いた DNA 及び RNA の定量化を提供する。パネル A において各レーンの上から下に垂線を引き、Plot Profile 機能を用いて線の距離 (cm) の関数としてピクセル強度 (濃淡値任意単位) をプロットした。ゲノム DNA 及び 28 s / 18 s rRNA に対応するピークは「ボックスで囲む」。

【0034】

実施例 2 : RNA の抽出及び保存に好適な条件の経験的判定

本実施例の主な目的は、セルロース紙での RNA の保存に対する各単一要素の効果及び試験要素 (例えば、キレート剤、緩衝液、pH、タンパク質変性剤、還元剤及びペプチド RNアーゼ阻害剤) の組み合わせの効果を評価することであった。本実施例のさらなる態様は、タンパク質変性剤の効果を高める可能性のある還元剤 (DTT) の存在を評価することであった。

20

【0035】

また、Jurkat 細胞は、全細胞 RNA 源として利用し、セルロース紙試料に細胞を直接適用し、風乾し、典型的なエンドユーザアプリケーションを模倣した。全細胞 RNA は、実施例 1 で上述したプロトコールに従い、1 % のアガロースゲルへの電気溶出により回収し、既知の基準に基づいて、28 s : 18 s rRNA の量を分析した。図 2 のグラフの各棒の下に列挙した成分を含む試料を、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で 10 日間保管した。

【0036】

30

実施例 2 の結果を図 2 に示す。各棒の上の数字は 18 s rRNA に対する 28 s rRNA の比率に対応する。1 より大きい 28 s : 18 s 比率は一般にインタクトな RNA を示す。例えば、RNアーゼを不活性化する還元剤 (DTT) 又は SUPERase-In を含まない試料又はアルカリ性 pH を有する試料など、いくつかの組成物は rRNA を安定化できなかった。GITC、DTT 及び中性緩衝液を含む試料は、他のあらゆる供試試薬の組み合わせより優れた性能を示した。

【0037】

実施例 3 : RNA の抽出及び保存に好適な条件の継続的経験的判定

RNA を保存するための重要な成分を実施例 2 で特定した後、実施例 3 は、RNA 保存能力に対する DTT 及び SDS の単一の効果又は組み合わせの効果及び実施例 2 で好適な RNA 安定性を示した GITC / DTT の組み合わせの性能に対するラジカル捕捉剤及びキレート剤の効果を研究するよう設計した。

40

【0038】

Jurkat 細胞をセルロース紙試料に直接適用し、風乾し、典型的なエンドユーザアプリケーションを模倣した。全細胞 RNA は、実施例 1 で上述したプロトコールに従い、1 % のアガロースゲルへの電気溶出により回収し、既知の基準に基づいて、28 s : 18 s rRNA の量を分析した。

【0039】

セルロース試料は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で 13 日間保管した。各棒の上の数字は 18 s rRNA に対する 28 s rRNA の比率に対応する。1 より

50

大きい28s : 18s比率は一般にインタクトなRNAを示す。実施例3の結果を図3に示す。GITC / DTTの組み合わせは一般にSDS / DTT組み合わせより良好なRNA安定性を示した。キレート剤(EDTA)とのいずれかの組み合わせを添加すると、RNAの品質が比較的低くなった。

【0040】

実施例4 : RNAの抽出及び保存に好適な条件の継続的経験的判定

RNAを保存するための他の重要な成分を実施例3で特定した後、実施例4は、安定性に優れ、臭いの少ない代替の還元剤(TCEP)がDTTの代わりに使用できるかどうかを調べるよう設計した。本実施例に導入した別の要素は、低分子のRNAアーゼ阻害剤であるバナジリリボヌクレオシド錯体(VRC)であった。これらの代用を、rRNAを安定化

10

【0041】

Jurkat細胞をセルロース紙試料に直接適用し、風乾し、典型的なエンドユーザアプリケーションを模倣した。全細胞RNAは、実施例1で上述したプロトコルに従い、1%のアガロースゲルへの電気溶出により回収し、既知の基準に基づいて、28s : 18s rRNAの量を分析した。セルロース試料は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で10日間保管した。各棒の上の数字は18s rRNAに対する28s rRNAの比率に対応する。1より大きい28s : 18s比率は一般にインタクトなRNAを示す。実施例4の結果を図4に示す。TCEPとDTTは、複数の基材組成物中でRNAを安定化するために交換可能に使用できる。

20

【0042】

実施例5 : セルロースでRNAを保存するための選択組成物の長期性能

実施例5は、選択組成物を室温で30日間保存した後の選択組成物の長期性能を評価するよう設計した。Jurkat細胞をセルロース紙試料に直接適用し、風乾し、典型的なエンドユーザアプリケーションを模倣した。全細胞RNAは、実施例1で上述したプロトコルに従い、1%のアガロースゲルへの電気溶出により回収し、既知の基準に基づいて、28s : 18s rRNAの量を分析した。セルロース試料は、分析前にデシケーターキャビネット内に室温で30日間保管した。各棒の上の数字は18s rRNAに対する28s rRNAの比率に対応する。1より大きい28s : 18s比率は一般にインタクトなRNAを示す。実施例5の結果を図5に示す。

30

【0043】

実施例6 : 乾燥血斑中のRNAの安定性の分析

実施例6は、様々な緩衝液条件で新鮮な全血により選択RNA安定化紙組成物(GITC / TCEP / MEHQ)の性能を評価するように設計した。約50µLのラット全血を被験体の尾静脈から採取し、表示の緩衝液成分で調製したFTA紙又はRNA安定化紙にスポットした。カードを乾燥し、周囲温度であるが、調整した湿度(相対湿度約20%)で5~22日間保管した。RNAは、7mmの中央パンチ片から溶解緩衝液に抽出し、当該技術分野において公知のプロトコルに従い、シリカ膜スピンカラムを通して精製した。精製及び溶出の後、RNA 6000 Pico Lab Chipを用いて、Agilent 2100 バイオアナライザでRNA Integrity Number (RIN) を測定した。従来、RT-PCR又はマイクロアレイの応用などの下流の定量分析には、RIN > 5 が好適であるが、RIN > 6 が最も好適である。実施例6の結果を図6に示す。全ての試験緩衝液組成物のうちこの選択紙組成物(GITC / TCEP / MEHQ)からの全体的なRNAの品質がFTA紙の性能を超えていた。

40

【0044】

実施例7 : RNA安定性に対するUV保護の影響

実施例7は、選択乾燥マトリックス(GITC / TCEP / Tris)に存在するUV阻害剤及びラジカル捕捉剤によるmRNA保護を調べるよう設計した。DNAフリー全Jurkat RNA (1µg)を、表示の成分を含有するRNA安定化紙に二反復でスポットした。各カードを分割し、半分を35 °Cで20時間暗所で保存し、残りは、日光の全

50

エネルギースペクトル（全エネルギー 21.7 kJ/m^2 ）を再現するための Q - SUN Xe - 1 Xenon 試験機で 20 時間（ $35.0.3 \text{ W/cm}^2$ 、 340 nm ）処理した。各試料から 1.2 mm のパンチ片を採取し、逆転写酵素反応に直接供し、cDNA ライブラリーを作製した。その後、cDNA ライブラリーは、qPCR により、HPR T 1 及びクラスリン mRNA に特異的なプライマーに対するプローブとした。UV に暴露した試料のサイクル閾値（ C_T ）を、暗所で保存した未処理のメイトペアの C_T から差し引いた。実施例 7 の結果を図 7 に示す。ビタミン C は、図ではアスコルビン酸の同義語として使用する。

【0045】

実施例 8：周囲条件下の紙での還元剤の安定性

Whatman（商標）製の 31 E T F セルロースベース紙を、Tris 緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ）中の G I T C の存在下で、高濃度の T C E P 又は D T T に浸した。セルロースベース紙は、湿度を調節せずに室温で保存した。5 日目、19 日目及び 105 日目、5, 5'-ジチオ-ビス（2-ニトロ安息香酸）（「D T N B」）を各紙試料に置いた。活性還元剤の存在下で、黄色への急な変色が確認された。周囲条件下で保存してから 105 日目までは、あらゆる濃度の T C E P 溶液でコーティングされたセルロース紙はまだ活性があり、白から黄色まで紙の色の明らかな変化によって示されるように D T N B を還元できた。D T T に浸した紙試料は D T N B を還元でなかったため、紙の色は白のままであった。これらの図は白黒では意味を成さないため、本明細書に含まれていないが、検査官の要請で提供可能である。D T N B の還元に関する化学反応は、Cline et al. (2004) Biochemistry 43:15195-15203 に提供されている。

【0046】

実施例 9：還元剤の劣化の定性分析

31 - E T F セルロース紙試料は、異なる濃度の還元剤 T C E P 又は D T T と共に、Tris 緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ）中の G I T C を含有していた。紙試料を、次の異なる条件下で保存した：1) 21°C 、相対湿度 10%；2) 21°C 、相対湿度 80%；及び 3) 41°C 、相対湿度 10%。

【0047】

0 日目、1 日目、6 日目及び 25 日目、各条件下のセルロース紙の試料（ 10 mg ）を D T N B 溶液に入れ、軽く振り、カラー画像を撮影した。1 日目、各環境条件下の T C E P 試料は全て、D T N B 溶液の色を黄色に変えることができ、還元剤としてまだ機能することを示した。一方、D T T は、 21°C かつ相対湿度 10% でさえ、D T N B の存在下で試料を黄色にできなかった。25 日目、 21°C かつ相対湿度 10% で保存した T C E P 紙は機能的な還元活性を示し続けた。しかしながら、湿度又は温度のいずれかが増加すると、還元剤としての T C E P の活性が著しく減少するため、温度及び湿度の双方が還元剤としての T C E P 機能の関連因子であることが分かった。

【0048】

実施例 10：セルロースベース紙に対する T C E P 活性の定性分析

異なる緩衝液（Tris、 $\text{pH } 7.4$ ；MES、 $\text{pH } 6.2$ ；及び M O P S、 $\text{pH } 7.0$ ）中の G I T C 及び M E H Q をさらに含む T C E P 組成物及び緩衝液を含まないコントロール試料を調製した。その後、セルロースベース紙をそれぞれ別の上記溶液でコーティングし、エアブローによりオープン内で 50 で迅速に乾燥し、湿度を低く維持するためにアルミホイル袋に乾燥剤で密閉し、その後、 4°C 、室温又は 41°C で保存した。

【0049】

図に示した週（0 週、1 週及び 4 週）に、D T N B 比色アッセイを用いて T C E P 活性を分析し、アッセイでは、 3.6 mm の紙パンチ片それぞれに D T N B を加え、30 分間攪拌し、その後、 412 nm で液体の吸収度を測定した。

【0050】

全ての試料は 4°C で安定しており、1 か月で活性が約 100% であった。室温で 1 か月後、T C E P 活性は、利用した緩衝液によってばらつきが生じた（例えば、M O P S（1

10

20

30

40

50

00%) > 緩衝液なし (90%) > MES (86%) > Tris (81%)。41 で 1 か月後、さらに TCEP 活性のばらつきが確認された (例えば、MOPS (67%) > MES (63%) > Tris (48%) > 緩衝液なし (39%)。全体として、セルロースに対する TCEP の還元力は、試験環境条件下において MOPS 緩衝液の存在下で最も高かった。

【0051】

実施例 11：丈夫な基材の調製、周囲温度で乾燥保存及び RNA 抽出及び分析の条件

培養ヒトリンパ球細胞株、より詳細には、Jurkat 細胞株を利用し、全細胞 RNA の試料を得た。下記の表に示す試薬を所定濃度で含浸させた 7 mm のセルロースディスクに細胞をスポットした。下記試薬を含有するディスクは、表 1 に列挙した量の試薬を含有する浸漬溶液のペトリ皿に Whatman (商標) 31-ETF 紙を置くことにより、複数 (1 m² 中約 4 枚) のセルロース紙 (Whatman (商標) 31-ETF 紙) を飽和させる「浸漬」プロトコールによって調製した。浸漬溶液は、浸漬溶液においてこれらの各試薬が所望の濃度となるように、表示のチオシアン酸塩 (例えば、NaSCN、KSCN、NH₄SCN、Ca(SCN)₂、Mg(SCN)₂、Ba(SCN)₂、Co(SCN)₂、Zn(SCN)₂ 又は NaClO₄) MOPS、TCEP-HCl 及び MEHQ 又は THQ に脱イオン水を加えることにより調製した。浸漬溶液をボルテックスで攪拌して固体試薬を完全に溶解し、各最終浸漬溶液の pH を当該技術分野において公知の方法に従って測定した。

【0052】

【表 1】

表 1：浸漬被覆溶液中の試薬の濃度

塩	[SCN] (mM)	[TCEP-HCl] (mM)	[MOPS] (mM)	[MEHQ] (mM)	[THQ] (mM)	pH
NaSCN	420	35	96	40	0	2.0
NaSCN	420	35	88	40	0	4.5
NaSCN	420	35	88	40	0	7.0
NaSCN	308	35	88	40	0	4.6
NaSCN	208	35	88	40	0	4.3
NaSCN	104	35	88	40	0	5.0
KSCN	420	35	88	40	0	4.5
NH ₄ SCN	420	35	88	40	0	4.5
Ca(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3.3
Mg(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3.3
Ba(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3.3
Co(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3.2
Zn(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3.2
NaClO ₄	424	35	96	0	40	3.2

セルロース紙を飽和させてから、余分な溶液をニップローラーで取り除き、N₂ 気流下で紙を 50 で乾燥した。Jurkat 細胞 (例えば、全細胞 RNA 源) を、表 1 に記載の試薬の組み合わせを含む乾燥紙基材に適用した。上記表の試薬と共に、Jurkat 細胞由来の全細胞 RNA を含むセルロース基材を乾燥し、相対湿度 (RH) を約 20% に維持したデシケーターキャビネット内で、室温で 7 ~ 17 日間保管した。

【0053】

細胞RNAを各セルロース試料から抽出し、標準プロトコールに従って測定した。簡潔に言えば、セルロース試料を4mg/mLのプロテイナーゼK(15μL)で再水和し、細胞RNAをセルロースマトリックスから溶解緩衝液に抽出し、当該技術分野において公知のプロトコールに従い、シリカ膜スピンカラムで精製した。精製及びヌクレアーゼフリー水への溶出後、RNA 6000 Pico LabChipを用いて、Agilent 2100 バイオアナライザでRNA Integrity Number (RIN)を測定した。従来、RT-PCR又はマイクロアレイの応用などの下流の定量分析には、RIN>5が好適であると考えられ、RIN>6が最も好適であると考えられる。

【0054】

実施例11の結果を図9に示す。周囲温度で細胞RNAを抽出し安定させるには、Na SCNが直接Gu SCNの代わりに使用できることが確認された。Gu SCNの場合とは異なり、本現象は、セルロース紙(pH4又はpH7)に含浸させるために使用する最終溶液のpHとは無関係である。Gu SCNは中性のpHで弱塩基として働くグアニジンカチオンを含むため、Gu SCNがpH7でRNAのアルカリ加水分解を誘発し得ることが想定される。高いRNA安定性は、金属カチオン又はアンモニウムカチオンを含む関連チオシアン酸塩にも確認されたが、核酸を抽出するために一般的に使用される過塩素酸塩では確認されなかった。これらの関連無機塩のうち、第1族又は第2族の金属カチオン(例えば、Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺)とのチオシアン酸塩は、RNAの安定化に最も有効であることが分かった(RIN>5)。当業者であれば、金属カチオン、特に二価カチオンが、RNAアーゼ酵素及び触媒RNA(例えば、リボザイム)の刺激補助因子であることを理解するであろう。従って、Mg²⁺又はCa²⁺系のチオシアン酸塩のRNA保存への応用性は、当業者でさえ予想しなかったであろう。

【0055】

実施例12：乾燥血斑のRNA安定性の分析

実施例12は、全血由来の全細胞RNAを安定化するために3種の異なる無機塩の性能を評価するように設計した。約50μLのラット全血を被験体の尾静脈から採取し、乾燥形態で還元剤(例えば、TCEP)、緩衝液(例えば、Tris)及び酸化防止剤(例えば、THQ)と組み合わせて等モル濃度で表示の塩を含む化学的処理紙にスポットした。化学的に処理した乾燥セルロース紙を本質的に実施例11に上述するように調製した。化学的に含浸したセルロース紙の血斑を乾燥し、相対湿度約20%の調整湿度かつ周囲温度で19日間保存した。7mmの中央パンチ片から溶解緩衝液にRNAを抽出し、当該技術分野において公知のプロトコールに従い、シリカ膜スピンカラムを通して精製した。精製及び溶出の後、RNA 6000 Pico LabChipを用いて、Agilent 2100 バイオアナライザで、各試料のRNA Integrity Number (RIN)を測定した。また、RT-PCR又はマイクロアレイの応用などの下流の定量分析には、RIN>5が好適であると考えられ、RIN>6が最も好適であると考えられる。

【0056】

実施例12の結果を図10に示す。実施例11におけるセルロース紙基材に含浸させた表示のチオシアン酸塩は、周囲温度でラット血液からのRNAを抽出し安定させるのに本質的に同等の効果を示した。これらの結果に基づいて、当業者であれば、開示の方法の実施にはいずれの関連チオシアン酸塩も使用できることを理解するであろう。

【0057】

全ての刊行物、特許公報及び特許は、各個別の刊行物又は特許が具体的かつ個別に参照により導入されることが示されるのと同様に、本明細書に参照により導入される。単数形で記載したものであっても、文脈から明らかにそうでないことが示されていなければ、複数のものを含むものとする。明細書及び特許請求の範囲を通じて、本明細書に使用される概略を表す言葉(approximating language)は、関連する基本的な機能を変えずに許容範囲内で変化できる任意の量的表現を修飾するために適用され得る。従って、「約」などの用語により修飾される値は、特定の厳密な値に限定されるものではない。場合によっては、概略を表す言葉は、値を測定する機器の精度に相当する

ことがある。必要に応じて範囲が与えられ、それらの範囲は間の部分範囲を含む。

【図 1】

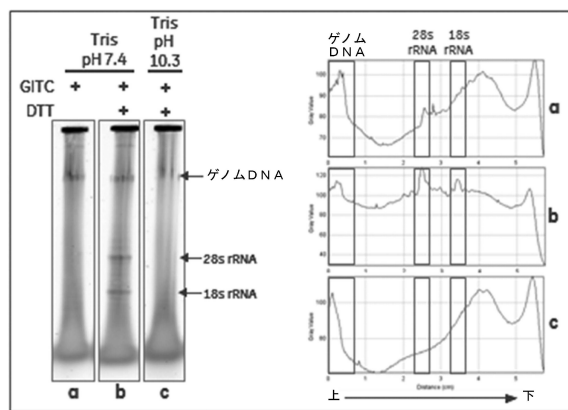


Fig. 1

【図 2】

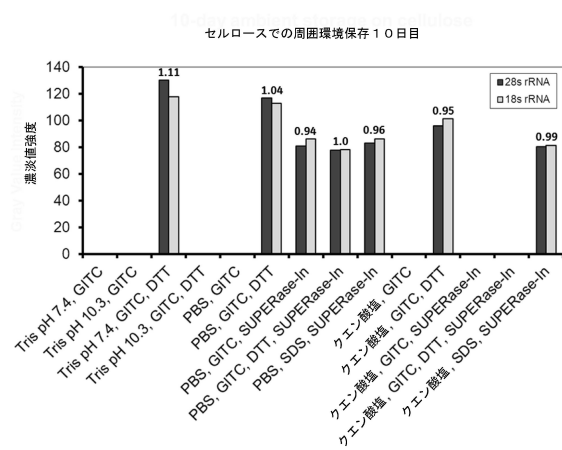


Fig. 2

【図 3】

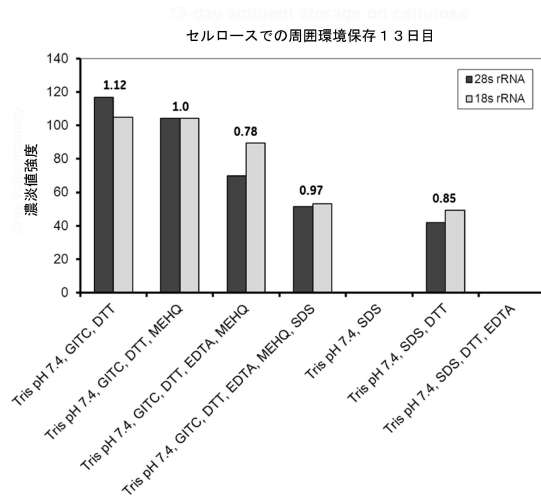


Fig. 3

【図 4】

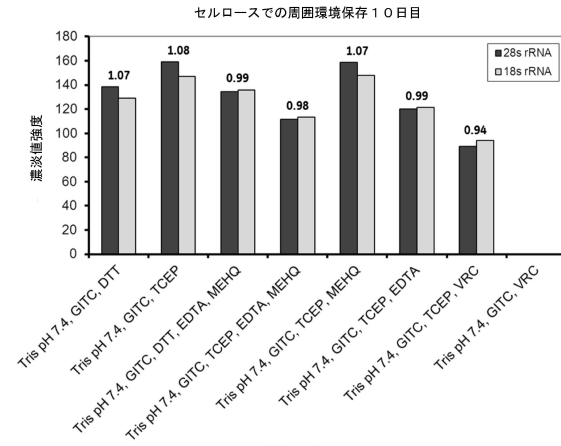


Fig. 4

【図 5】

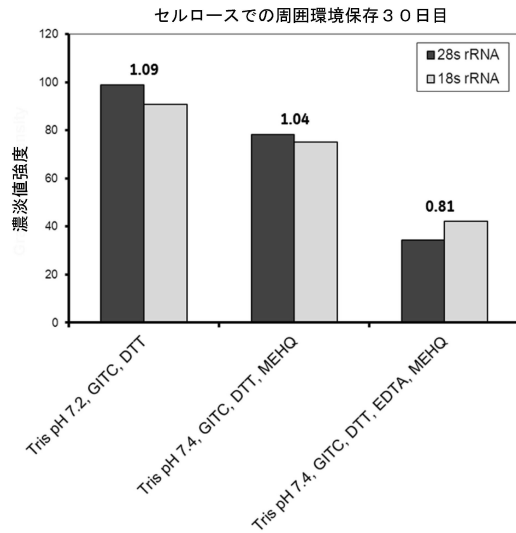


Fig. 5

【図 6】

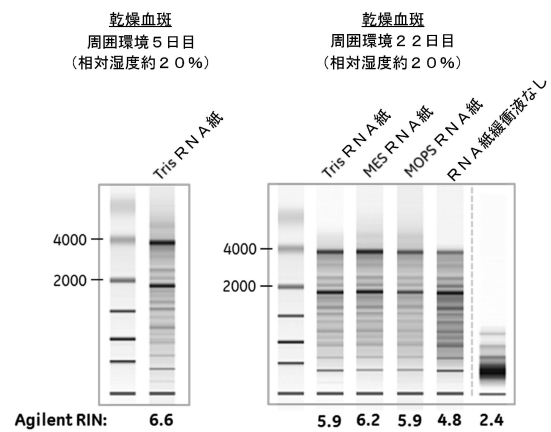


Fig. 6

【図 7】

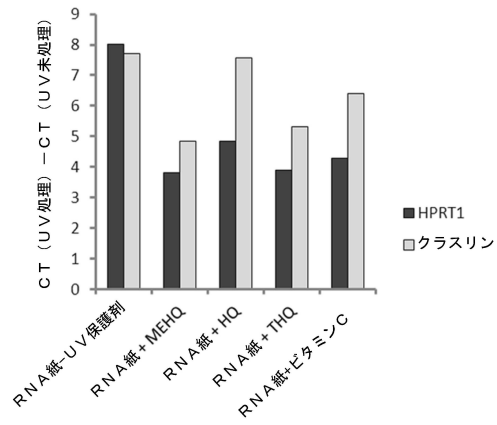


Fig. 7

【図 8】

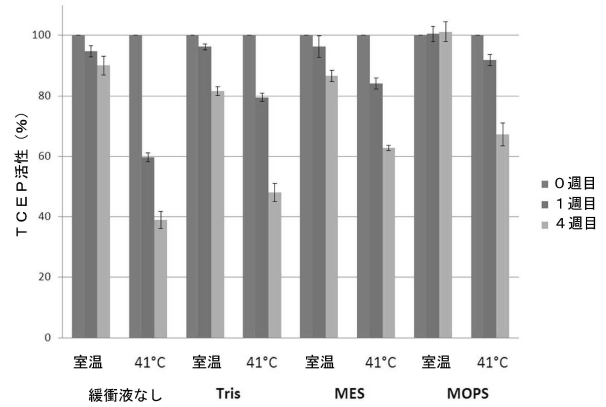


Fig. 8

【図 9】

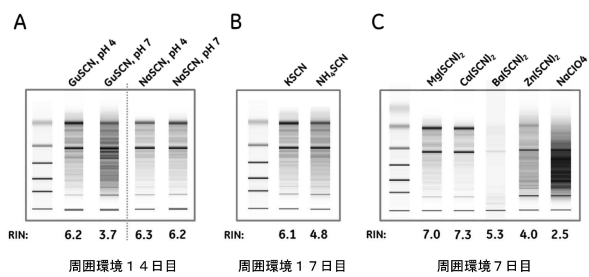


Fig. 9

【図 10】

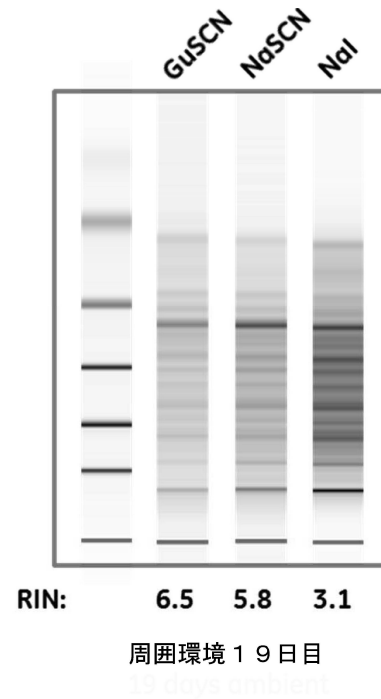


Fig. 10

フロントページの続き

(74)代理人 100129779

弁理士 黒川 俊久

(74)代理人 100113974

弁理士 田中 拓人

(72)発明者 ベイルズ, ブライアン・クリストファー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニー・グローバル・リサーチ

(72)発明者 クヴァム, エリック・リーミング

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニー・グローバル・リサーチ

(72)発明者 デイヴィス, ジェイソン・ルイス

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニー・グローバル・リサーチ

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 欧州特許第01484111(EP, B1)

特開2005-137295(JP, A)

国際公開第2012/018638(WO, A1)

特開2005-296013(JP, A)

特開2009-261405(JP, A)

特表2012-524074(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10

C12Q 1/00-3/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)