

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7557930号
(P7557930)

(45)発行日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(24)登録日 令和6年9月19日(2024.9.19)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	1/06 (2006.01)	C 1 2 N	1/06
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686 Z
C 1 2 Q	1/6874(2018.01)	C 1 2 Q	1/6874 Z
C 1 2 Q	1/689(2018.01)	C 1 2 Q	1/689 Z
		請求項の数	10 (全44頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2018-539395(P2018-539395)	(73)特許権者	518213606
(86)(22)出願日	平成29年1月30日(2017.1.30)		セイフガード バイオシステムズ ホール
(65)公表番号	特表2019-503193(P2019-503193 A)		ディングズ リミテッド
(43)公表日	平成31年2月7日(2019.2.7)		Safeguard Biosyste
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/051902		ms Holdings Ltd.
(87)国際公開番号	WO2017/129814		イギリス国 E1W 1YW ロンドン ト
(87)国際公開日	平成29年8月3日(2017.8.3)		マス・モア・スクエア 4 フロア 6 ク
審査請求日	令和1年11月25日(2019.11.25)		ワドラント・ハウス
審査番号	不服2021-16705(P2021-16705/J 1)		Quadrant House, Flo
審査請求日	令和3年12月3日(2021.12.3)		or 6, 4 Thomas More
(31)優先権主張番号	16153540.6	(74)代理人	Square, London E1W
(32)優先日	平成28年1月30日(2016.1.30)		1YW, United Kingdom
(33)優先権主張国・地域又は機関			100114890
最終頁に続く			弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラ
			インハルト
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ビーズ破砕用チューブならびに微生物からデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を抽出する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

真菌性の病原体および／または細菌性の病原体が存在する疑いのある血液試料中に含まれる病原体の細胞の溶解物を生成し、回収し、かつ、該溶解物からの核酸の1種以上を分析する方法であって、

- a) 病原体の細胞の溶解物を生成する工程であって、血液試料をビーズ破砕用システム内で、バッファの不存在下で、かつ、界面活性剤の不存在下で攪拌することを含み、攪拌は真菌性の病原体および細菌性の病原体双方の細胞を溶解させて、細胞からのDNAのPCR増幅に適した溶解物を提供するのに十分な条件であり、ここで、前記ビーズ破砕用システムは、ビーズ破砕用チューブおよびビーズを含み、
- b) 前記ビーズ破砕用チューブから溶解物を回収する工程、および、
- c) 溶解物からの核酸の1種以上において、真菌性の病原体および細菌性の病原体の存在を分析する工程であって、前記分析はPCRにより行われ、真菌性の病原体および／または細菌性の病原体が存在する場合には、真菌性の病原体および／または細菌性の病原体からのDNAを増幅させることを含む、方法。

【請求項2】

前記攪拌は、あらゆる添加剤の不存在下に行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ビーズは、

- a) 酵母または糸状菌を溶解するように適合されており、

b) 以下の i、i i

i. 鋳物ビーズ、セラミックビーズ、ガラスビーズ、金属ビーズ、もしくはそれらの組み合わせ、

i i. ジルコニウムビーズ、ジルコンビーズ、ジルコニアビーズ、石英ビーズ、酸化アルミニウムビーズ、炭化ケイ素ビーズ、セラミックビーズ、二酸化ケイ素ガラスビーズ、ステンレス鋼ビーズ、クロム鋼ビーズ、もしくはそれらの組み合わせを含み、

c) 50 μm～3 mmの範囲の直径を有し、または

d) 前記の a)～c) の任意の組み合わせを有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記血液試料を攪拌する前に、該血液試料を前記ビーズ破碎用チューブ内に入れる工程をさらに含む、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記攪拌は、前記ビーズ破碎用システムを振動動作に供することを含む、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記血液試料は、1 種以上の病原体を含む、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 1 種以上の病原体は、

a) 1 種以上の細菌性病原体、ウイルス性病原体、真菌性病原体、もしくはそれらの組み合わせ、または

b) マイコバクテリウム・ツベルクロシス、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクロシス、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (MRSA)、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・アガラクチア、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ、モラキセラ・カタラーリス、クレブシエラ・ニューモニエ、エシェリキア・コリ、シュードモナス・アエルギノーサ、アシネトバクター属種、ボルデテラ・ペルツシス、ネイセリア・メニンジチディス、バシラス・アントラシス、ノカルディア属種、アクチノマイセス属種、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア・ニューモニア、レジオネラ属種、ニューモシスティス・イロベチイ、インフルエンザ A 型ウイルス、サイトメガロウイルス、リノウイルス、エンテロコッカス・ファエシウム、アシネトバクター・バウマンニイ、コリネバクテリウム・アミコラツム、エンテロバクター・アエロゲネス、エンテロコッカス・ファエカリス C I 4 4 1 3、セラチア・マルセッセンス、ストレプトコッカス・エクイおよびカンジダ・アルビカンスの 1 種以上

を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記血液試料は、多数の種からの細胞を含む、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記溶解物から、PCR の前に核酸を精製することをさらに含む、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記核酸の 1 種以上を、マイクロアレイを使用して分析するか、あるいは PCR の後にシーケンシングすることをさらに含む、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016 年 1 月 30 日に出願された欧州特許出願番号 EP 1 6 1 5 3 5 4 0 の優先権の利益を主張し、その内容全体は参照により援用される。

10

20

30

40

50

【0002】

1. 背景

感染性疾患の遺伝子検査および診断は、臨床微生物学の分野において重要な役割を担っている。培養ベースの方法論に固有の偏りおよび制限を克服するために、試料に含まれる微生物を検出するために遺伝子検査がますます使用されるようになってきている。そのような遺伝子検査を実施し得るためには、微生物からDNAおよび／またはRNAをできる限り高い濃度で抽出することを可能にするために細胞を溶解する必要がある。

【0003】

Zhongtang Yu et al., 2004, “Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples”, BioTechniques, Vol. 36 (5): 808–812は、消化器内容物および糞便試料からDNAを単離する方法を記載している。その方法においては、微生物、つまりは細菌を含むと推定されるウシの胃腸系から採取された0.25gの試料流体が、まず最初に500mMの塩化ナトリウム、50mMのトリス塩酸(pH 8.0)、50mMのエチレンジアミン四酢酸、および4%のドデシル硫酸ナトリウムを含む1mLのバッファーと混合される。さらに、0.4gの滅菌ジルコニアビーズが、その試料流体中に導入される。引き続き、こうして得られた混合物は、該ビーズが微生物の細胞壁を破壊するようにMini-Bead Beater (商標)により試料チューブ中で3分間にわたり振動される。この過程において、細胞内に含まれるDNAが放出される。前記バッファーは、試料流体中に含まれるDNAアーゼによる分解からDNAを保護する役割も果たす。ビーズ破碎を実施した後に、酢酸アンモニウムによる沈殿によって試料から不純物が除去される。核酸はイソプロパノールでの沈殿により得られる。さらなる方法工程において、該DNAは、RNAアーゼおよびプロテイナーゼKで順次に消化され、引き続きカラムにより精製される。

【0004】

該方法は、それが比較的複雑であるという欠点を有する。試料流体はバッファーの添加により希釈されるので、試料中のDNA濃度は低下する。したがって、該方法は、限られた検出精度および感度しか可能にしない。

【0005】

このように、細胞を溶解し、試料流体中に含まれる微生物から核酸を抽出するための改善された装置および方法が求められている。

【0006】

2. 概要

本開示は、改善されたビーズ破碎用チューブ、ならびにビーズ破碎用システムおよびビーズ破碎方法に関する。理論により縛られるものではないが、本発明者等は、ビーズ破碎が、核酸を溶液へと溶解することを可能にするものと考えている。本開示は、部分的に、核酸抽出法におけるビーズ破碎の使用が、ビーズへの吸収のため核酸の損失をもたらすとともに、そのような損失が、該ビーズ上の結合部位をブロッキングする適切な量のブロッキング剤により妨げられ得るという知見に基づくものである。また本開示は、ビーズ破碎において今までに使用されてきた幾つかの溶解バッファーがブロッキング剤として作用する試薬を含有し得るものの、そのような試薬は一般的に使用されるよりも大幅に少ない量で使用され得るという認識に基づいている。さらに、また本開示は、幾つかの生物学的試料、例えば血液が固有にブロッキング剤を含有するため、そのような溶解バッファー等の添加剤の不存在下でビーズ破碎が行われ得るという認識に基づいている。

【0007】

特定の態様においては、本開示は、固有にブロッキング剤を含有しないビーズ破碎用試料、またはビーズによる核酸の吸収の効果的なブロッキングのために適切な量を下回る量でブロッキング剤を含有するビーズ破碎用試料の場合に使用するために適したビーズ破碎システムを提供する。本開示のビーズ破碎用システムは、乾燥したブロッキング剤を含む。驚くべきことに、本開示のビーズ破碎用システムを微生物の溶解ならびに液体試料中に

含まれる微生物からのデオキシリボ核酸（DNA）および／またはリボ核酸（RNA）の抽出のために使用した場合に、ブロッキング剤を含まない相応のビーズ破碎用チューブを使用した場合よりも大きいDNAおよび／またはRNAの抽出率を達成することができることが判明した。

【0008】

本開示のビーズ破碎用システムは、ビーズ破碎の前に試料と溶解溶液とを合する必要性を回避することもできるため、試料希釈が無いことでより多くの核酸量の回収が可能となる。

【0009】

さらに他の態様においては、本開示は、ビーズ破碎を行うことで、細胞を溶解し、生物学的試料から核酸を抽出する方法を提供する。該方法は、溶解バッファの不存在下で生物学的試料に対してビーズ破碎を行うことを含む。該ビーズ破碎法は、本開示のビーズ破碎用システムまたは標準的なビーズ破碎用システムを利用することができる。標準的なビーズ破碎用システムを使用する場合に、幾つかの実施形態においては、1種以上のブロッキング剤が、該ビーズ破碎用システムに添加される。その他の実施形態においては、特に生物学的試料が本来1種以上のブロッキング剤を含む場合には、ビーズ破碎の前にブロッキング剤は添加されない。

【0010】

特定の実施形態においては、本開示のビーズ破碎用システムは、内部空洞を有する容器メンバと、該内部空洞中に微生物を含む試料流体を充填するための開口部と、該開口部を閉じるための付属のまたは非付属のクロージャとを備える試料チューブから構成され、該内部空洞中に複数の巨視的な粒子が配置されており、該粒子は、試料流体が前記内部空洞中に充填されて、ビーズ破碎用チューブが機械的振動にかけられたときに該試料流体中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊するように適合されている。例示的なビーズ破碎用システムは、セクション4.1ならびに以下の番号付けされた実施形態1～24および67～75に記載されている。前記ビーズ破碎用システムにおいて使用することができる例示的な試料チューブは、セクション4.1.1に記載されており、前記ビーズ破碎用システムにおいて使用することができる例示的なブロッキング剤は、セクション4.1.2に記載されており、かつ前記ビーズ破碎用システムにおいて使用することができる例示的なビーズは、セクション4.1.3に記載されている。

【0011】

本開示はさらに、微生物を溶解して、該微生物からデオキシリボ核酸（DNA）および／またはリボ核酸（RNA）を抽出する方法であって、前記微生物を含むと推定される試料流体を準備し、互いに相対的に移動可能な複数の粒子を該試料流体中に導入し、そして該粒子を含んだ試料流体を、該粒子が試料流体中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊することが可能であるように振動させる、方法に関する。DNAが抽出され得る例示的な試料は、セクション4.2に記載されており、かつ核酸抽出前に試料を調製するために使用され得る例示的な試料前処理工程は、セクション4.3に記載されている。試料、例えばセクション4.2に記載される試料またはセクション4.3に記載されるように前処理された試料から核酸を抽出するための例示的な方法は、セクション4.4ならびに以下の番号付けされた実施形態25～58および76～81に記載されている。本開示の核酸抽出法を実施するために有用なキットは、セクション4.7および以下の番号付けされた実施形態59～66に記載されている。

【0012】

3. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】試料チューブ（2）およびクロージャキャップ（6）を含む例示的なビーズ破碎用システム（1）の側面図である。

【図2】図1に示されるビーズ破碎用システムの平面図である。

【図 3】図 1 に示されるビーズ破碎用システムの下面図である。

【図 4】図 1 に示されるビーズ破碎用システムの中心面を通じた縦断面であり、その試料チューブからクロージャキャップが外されており、開口部（４）を通じて該試料チューブの内部空洞（３）に到達可能であることは明らかである。ビーズ（７）および凍結乾燥されたブロッキング剤（８）が該内部空洞中に示されている。

【図 5】試料流体（５）が充填された図 1 に示されるビーズ破碎用システムの中心面を通じた縦断面である。

【図 6】ビーズ破碎後に *C. アルビカンス* から回収された DNA を鋳型として使用した PCR 増幅産物の強度を示す。Calbi144 および Calbi54 は、２種の異なる *C. アルビカンス* の標的遺伝子であり、かつ HCO1-Rat87 は、ネガティブコントロール遺伝子である。この研究は、尿素がビーズ破碎においてブロッキング効果を有し、PD 流体からの *C. アルビカンス* の DNA の回収を容易にすることを示している。

10

【図 7】ビーズ破碎後に *C. アルビカンス* から回収された DNA を鋳型として使用した PCR 増幅産物の強度を示す。Calbi144 および Calbi54 は、２種の異なる *C. アルビカンス* の標的遺伝子であり、かつ HCO1-Rat87 は、ネガティブコントロール遺伝子である。この研究は、RNA がビーズ破碎においてブロッキング効果を有し、PD 流体からの *C. アルビカンス* の DNA の回収を容易にすることを示している。

【図 8】ビーズ破碎後に *C. アルビカンス* から回収された DNA を鋳型として使用した PCR 増幅産物の強度を示す。Calbi144 および Calbi54 は、２種の異なる *C. アルビカンス* の標的遺伝子であり、かつ HCO1-Rat87 は、ネガティブコントロール遺伝子である。抽出の最大理論収率に相当する *C. アルビカンス* の DNA の量が、鋳型として含まれていた。この研究は、*C. アルビカンス* の DNA が、添加剤の不存在下で血液をビーズ破碎することにより回収され得ることを示している。

20

【図 9】ビーズ破碎後に *C. アルビカンス* から回収された DNA を鋳型として使用した PCR 増幅産物の強度を示す。調査された遺伝子は、真正細菌（Eub）、グラム陰性細菌（Gng）、グラム陽性細菌（Gpo）、*E. コリ*（Eco）、ブドウ球菌（ALLStaph）、腸内細菌科（Ent）、*S. アウレウス*（Sau）、マイコバクテリア（Myc）の検出用である。N03 Rat87 は、ネガティブコントロールであり、かつ CC は、内部コントロールである。抽出の最大理論収率に相当する *S. アウレウス* の DNA の量が、鋳型として含まれていた。この研究は、*S. アウレウス* の DNA が、添加剤の不存在下で血液をビーズ破碎することにより回収され得ることを示している。

30

【図 10】ビーズ破碎後に *C. アルビカンス* から回収された DNA を鋳型として使用した PCR 増幅産物の強度を示す。調査された遺伝子は、真正細菌（Eub）、グラム陰性細菌（Gng）、グラム陽性細菌（Gpo）、*E. コリ*（Eco）、ブドウ球菌（ALLStaph）、腸内細菌科（Ent）、*S. アウレウス*（Sau）、マイコバクテリア（Myc）の検出用である。N03 Rat87 は、ネガティブコントロールであり、かつ CC は、内部コントロールである。抽出の最大理論収率に相当する *E. コリ* の DNA の量が、鋳型として含まれていた。この研究は、*E. コリ* の DNA が、添加剤の不存在下で血液をビーズ破碎することにより回収され得ることを示している。

【0014】

40

４．詳細な説明

ビーズ破碎は、細胞を溶解して、その核酸（DNA および RNA）を含む内容物を放出させるために使用される均質化過程である。試料は、適切な粉碎用ビーズと一緒にチューブに入れられ、高エネルギー混合に供される。次いでその試料は、一般的に遠心分離され、溶解物は該ビーズの上部に回収される。一般的に、ビーズ破碎に供された試料は、細胞からの DNA の放出を容易にするために溶解バッファーで処理される。

【0015】

本開示は、改善されたビーズ破碎方法およびビーズ破碎用システムに関する。該ビーズ破碎方法は、溶解バッファーを使用せずに行うことができるので、細胞溶解および核酸抽出の過程を簡易化し、そして試料の希釈が回避されるか、ビーズ上への吸収による損失は

50

最小限となる。

【0016】

本開示の方法は、適切な量のブロッキング剤を使用したビーズ破碎の実施に関する。ブロッキング剤は、試料に対して外因性または内因性であってよい。例えば、血液は尿素を含有し、それはビーズ破碎用ビーズに生物学的試料中の核酸が結合することをブロッキングすることが分かった。したがって、本開示は、外因性のブロッキング剤を添加せずにそのような試料をビーズ破碎する方法を提供するが、内因性のブロッキング剤に外因性のブロッキング剤を補うことも検討される。内因性のブロッキング剤を含まないか、または該ブロッキング剤を少量しか含まない生物学的試料に関しては、外因性のブロッキング剤を使用することができる。本開示はさらに、乾燥したブロッキング剤が導入されるビーズ破碎用システムであって、試料希釈をもたらす試薬を添加せずに生物学的試料のビーズ破碎を可能にする、システムを提供する。

10

【0017】

したがって、本開示は、乾燥したブロッキング剤を含むビーズ破碎用システムを提供する。本開示はさらに、ビーズ破碎を行うことで、生物学的試料中の細胞を溶解し、生物学的試料から核酸を抽出する方法を提供する。該方法は、溶解バッファの不存在下で生物学的試料に対してビーズ破碎を行うことを含む。該ビーズ破碎法は、本開示のビーズ破碎用システムまたは標準的なビーズ破碎用システムを利用することができる。標準的なビーズ破碎用システムを使用する場合に、幾つかの実施形態においては、1種以上のブロッキング剤が、該ビーズ破碎用システムに添加される。その他の実施形態においては、特に生物学的試料が本来1種以上のブロッキング剤を含む場合には、ビーズ破碎の前にブロッキング剤は添加されない。

20

【0018】

本開示のビーズ破碎用システムを含む（または該システムを得るために適した）キットも本明細書で提供される。

【0019】

4.1 ビーズ破碎用システム

本開示は、細胞溶解、ならびに液体試料中に含まれる細胞（例えば微生物）からのデオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）の抽出のために有用なビーズ破碎用システムを提供する。本開示のビーズ破碎用システムは、試料チューブ、ならびに該試料チューブ内に位置するビーズおよび乾燥したブロッキング剤を含む。本開示のビーズ破碎用システムにおいて使用することができるブロッキング剤には、尿素、グアニジン塩、界面活性剤、ヌクレオチド類、およびオリゴヌクレオチド類が含まれる。ブロッキング剤は、セクション4.1.2に詳細に記載されている。本開示のビーズ破碎用システムにおいて使用することができるビーズには、鉍物および／または金属を含むビーズが含まれる。本開示のビーズ破碎用システムで使用するのに適したビーズは、セクション4.1.3に記載されている。

30

【0020】

4.1.1 試料チューブ

本開示のビーズ破碎用システムは、開口部により到達可能な内部空洞を有するとともに、ビーズ、ブロッキング剤、および液体試料を収容することができる試料チューブを含む。該試料チューブは、任意の生物学的に不活性な材料（例えば、プラスチックまたはホウケイ酸塩）で作られていてよく、好ましくはプラスチック（例えば、ポリプロピレン、ポリプロピレンコポリマー、またはポリカーボネート）で作られている。本明細書で使用される場合に、用語「チューブ」は、バイアル（例えば粉砕バイアル）およびチューブ（例えばコニカルチューブ）を含む。

40

【0021】

前記ビーズ破碎用システムは、前記開口部に被せて該試料チューブを密閉するためのクロージャを含み得る。該クロージャは、試料チューブに固定することができ（例えばヒンジにより試料チューブに固定されるキャップ）、または試料チューブから分離可能であっ

50

てよい（すなわち、取り外し可能なキャップ）。該試料チューブは、ねじ込みキャップと噛み合うように適合されているねじ切り領域を含み得る。ねじ山は、該試料チューブの内側表面または外側表面にあってよい（例えば、図4～5に示されるように）。

【0022】

本開示のビーズ破碎用システムにおいて使用することができる試料チューブは、市販されており、例えばスクリュウキャップポリプロピレンチューブまたはマイクロチューブである。標準的なチューブサイズ、例えば0.5 mL、1.7 mL、2 mL、4.5 mL、7 mL、15 mL、50 mLまたは250 mLを、本開示のビーズ破碎用チューブおよびビーズ破碎用システムを作るために使用することができる。

【0023】

4.1.2 ブロッキング剤

本開示のビーズ破碎用システムは、乾燥したブロッキング剤を含む。本明細書で使用される場合に、「乾燥した」または「乾燥された」ブロッキング剤は、20%未満の水分を含むブロッキング剤である。幾つかの実施形態においては、該乾燥したブロッキング剤は、15%未満の、10%未満の、5%未満の、4%未満の、3%未満の、2%未満の、または1%未満の水分を含有する。

【0024】

該乾燥したブロッキング剤は、好ましくは長期安定性であり、すなわち該ビーズ破碎用システムは、該ブロッキング剤のブロッキング効果を大幅に減少させることなく、より長期間にわたって問題なく輸送および貯蔵することができる。前記乾燥したブロッキング剤は、容器メンバの内部空洞中に緩く配置されていてよく、かつ／または試料の内部空洞の一部もしくは内部空洞全体は、ブロッキング剤の層もしくは被膜で被覆されていてよい。該ブロッキング剤は、好ましくは凍結乾燥されている。該ブロッキング剤は、ビーズをチューブに添加する前にまたはその後に凍結乾燥されてよい。

【0025】

ブロッキング剤の例には、1種以上のカオトロピック剤（例えば尿素、グアニジン塩）、1種以上の界面活性剤、1種以上のヌクレオチド類、1種以上のオリゴヌクレオチド類、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。そのような例示的なブロッキング剤の詳細は、以下のセクション4.1.2.1～4.1.2.5に示されている。微生物細胞壁の溶解に寄与するブロッキング剤（例えば界面活性剤）を含むことで、本開示のビーズ破碎用システムを使用して調製される核酸の収率が改善され得、そしてビーズ破碎の前に試料と溶解溶液とを合する必要性が避けられ得る。一般的に、本開示のビーズ破碎用システムにおいて使用されるブロッキング剤の量は、溶解溶液において使用されるよりも少ない。

【0026】

ビーズ破碎用システムは、ビーズ破碎用チューブ中で溶解溶液（抽出バッファーまたは溶解バッファーとも呼ばれる）を凍結乾燥させることにより製造され得る。ブロッキング剤を含有する溶解溶液は、当該技術分野で公知であるか、または商業的に購入することができる。

【0027】

幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上の界面活性剤を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤および1種以上の界面活性剤を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤および1種以上のヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤および1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上の界面活性剤および1種以上のヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上の界面活性剤および1種以上のオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のヌクレオチド類および1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤、1種以上の界面活性剤、および1種以上のヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤、1種以上の界面活性剤、および1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤、1種以上のヌクレオチド類、および1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上の界面活性剤、1種以上のヌクレオチド類、および1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、1種以上のカオトロピック剤、1種以上の界面活性剤、1種以上のヌクレオチド類、および1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む。

10

【0028】

前記ブロッキング剤はさらに、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）および／またはそのナトリウム塩を含み得る。EDTAは、カルシウム、マグネシウムおよび鉄を結合するため、デオキシリボヌクレアーゼおよびリボヌクレアーゼを失活させる。この措置は、ビーズ破碎用システムを使用して処理される試料流体中に含まれるDNAおよびRNAの分解を妨げる。こうして、より高い検出感度および測定結果のより高い再現性が、本開示のビーズ破碎用システムを使用して細胞（例えば微生物）から抽出されたDNAおよび／またはRNAの調査の間に可能となる。

【0029】

20

該ブロッキング剤は、容器メンバの内部空洞中に、例えば粉末化された形で緩く配置され得る。該粉末は、例えば試料中でビーズと混合され得るか、または該ビーズの上部および／もしくは下部の層として試料チューブ中に配置され得る。それに代えて、またはそれに加えて、試料チューブの内壁は、ブロッキング剤の層または被膜で少なくとも部分的に被覆されていてよい。前記層または被膜は、試料チューブに添加されたブロッキング剤を含む水性混合物から液体を蒸発させることにより製造することができる。もう1つの実施形態においては、前記ビーズ破碎用システムにおけるビーズの幾つかまたはすべては、ブロッキング剤で被覆されていてよい。

【0030】

4. 1. 2. 1 カオトロピック剤

30

カオトロピック剤は、タンパク質および核酸等の巨大分子の構造を破壊し、該巨大分子を変性する。カオトロピック溶質は、タンパク質に近接した水分子の無秩序化のため、疎水性領域の正味の疎水性効果を低下させる。これは、溶液における疎水性領域を可溶化し、それによりタンパク質が変性される。これはまた脂質二重層における疎水性領域にもまさに当てはまる。カオトロピック溶質の臨界濃度に達すると（該二重層の疎水性領域において）膜完全性が損なわれることとなり、細胞は溶解することとなる。

【0031】

ブロッキング剤として使用することができる例示的なカオトロピック剤を以下に示す。

【0032】

尿素：前記ブロッキング剤が尿素（またはチオ尿素；本明細書で使用される場合に、文脈で特に規定されていない限りは、尿素という用語はチオ尿素を含む）を含む場合に、尿素有量は、ビーズ破碎用システムで使用されることが意図される試料流体の量と、試料チューブに試料流体を添加した後に試料流体中に溶解される尿素有濃度が10グラム／リットルから100グラム／リットルの間、50グラム／リットルから100グラム／リットルの間、20グラム／リットルから50グラム／リットルの間、または25グラム／リットルから35グラム／リットルの間の範囲になるように合わされ得る。このように、上述の実施形態に関しては、2 mLのチューブに1 mLの試料が添加されるべき場合において、ブロッキング剤において使用される尿素有量は、それぞれ10 mgから100 mgの間、50 mgから100 mgの間、20 mgから50 mgの間、または25 mgから35 mgの間であり、そして2 mLのチューブに0.8 mLの試料が添加されるべき場合におい

40

50

て、ブロッキング剤において使用される尿素の量は、それぞれ 8 mg から 80 mg の間、40 mg から 80 mg の間、16 mg から 40 mg の間、または 20 mg から 28 mg の間であることとなる。

【0033】

塩：特定の塩は、カオトロピック剤として働き得る。電荷を遮蔽し、塩橋の安定化を妨げることにより、塩はカオトロピック特性を有し得る。カオトロピック塩には、グアニジン、リチウムおよびマグネシウムの様々な塩が含まれる。

【0034】

グアニジン塩：本開示のビーズ破砕用システムにおいてブロッキング剤として使用することができるグアニジン塩には、イソシアン酸グアニジン、塩化グアニジン、およびそれらの組み合わせが含まれる。

10

【0035】

リチウム塩：本開示のビーズ破砕用システムにおいてブロッキング剤として使用することができるリチウム塩には、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、およびそれらの組み合わせが含まれる。

【0036】

マグネシウム塩：本開示のビーズ破砕用システムにおいてブロッキング剤として使用することができるマグネシウム塩には、塩化マグネシウムが含まれる。

【0037】

界面活性剤：特定の界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム（「SDS」）は、カオトロピック剤として作用し得る。界面活性剤のブロッキング剤としての使用は、セクション 4.1.2.3 に記載されている。

20

【0038】

4.1.2.2 クレアチニン

前記ブロッキング剤がクレアチニンを含む場合には、試料チューブの内部空洞におけるクレアチニンの存在は、ビーズ破砕用システムを使用して処理される試料に含まれる DNA および／または RNA の分解を妨げ得る。さらに、クレアチニンは、DNA および／または RNA が、ビーズおよび／または試料チューブの内壁に非特異的に結合することを防ぐ。これは、ビーズ破砕用チューブシステムを使用して処理された細胞（例えば微生物）から DNA および／または RNA を抽出する場合に、より高い収率を可能にする。

30

【0039】

4.1.2.3 界面活性剤

本開示のビーズ破砕用システムにおいてブロッキング剤として使用することができる界面活性剤には、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウロイル硫酸サルコシン酸ナトリウム（sodium lauroylsulfate sarcosinate）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、およびそれらの組み合わせが含まれる。ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートは、ポリソルベート 20 としても知られている。

【0040】

前記ブロッキング剤において使用される界面活性剤の量は、ビーズ破砕用システムで使用されることが意図される試料流体の量と合わせられ得る。特定の実施形態においては、試料チューブに試料流体を添加した後に試料流体中に溶解される界面活性剤の濃度は、1 mg/mL ~ 50 mg/mL の、1 mg/mL ~ 25 mg/mL の、または 25 mg/mL ~ 50 mg/mL の範囲である。このように、上述の実施形態に関しては、2 mL のチューブに 1 mL の試料が添加されるべき場合において、ブロッキング剤において使用される界面活性剤の量は、それぞれ 1 mg ~ 50 mg の、1 mg ~ 25 mg の、または 25 mg ~ 50 mg の範囲であり、そして 2 mL のチューブに 0.8 mL の試料が添加されるべき場合において、ブロッキング剤において使用される界面活性剤の量は、それぞれ 0.8 mg ~ 40 mg の、0.8 mg ~ 20 mg の、または 20 mg ~ 40 mg の範囲であることとなる。

40

【0041】

50

4. 1. 2. 4 ヌクレオチド類

本開示のビーズ破砕用システムにおいて使用することができるヌクレオチド類には、リボヌクレオチド類、デオキシリボヌクレオチド類、およびそれらの組み合わせが含まれる。
【0042】

該ヌクレオチド類は、天然に存在するものであってよい。天然に存在するリボヌクレオチドは、アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、シトシンーリン酸、およびチミジンーリン酸である。ブロッキング剤として使用することができる天然に存在するデオキシリボヌクレオチド類は、デオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシシトシンーリン酸、およびデオキシチミジンーリン酸である。

【0043】

該ヌクレオチド類は、天然に存在するヌクレオチド類の天然に存在しない類似体であってよい。天然に存在しない類似体の例には、制限されるものではないが、ペプチドヌクレオチド類、ロックド核酸（「LNA」）ヌクレオチド類（デオキシリボースまたはリボース糖類の代わりに二環式糖部を含む）、非荷電の架橋（例えばメチルホスホン酸エステル、ホスホトリエステル、アミド亜リン酸エステル、カルバミン酸エステル等）、および荷電した架橋（例えば、チオリン酸エステル、ジチオリン酸エステル等）を有するヌクレオチド類、ならびにペダント部を含むヌクレオチド類が含まれる。具体的な実施形態においては、前記類似体は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、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-プロモウラシル、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-メチルシュードウラシル、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-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルケオシン、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-N6-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、シュードウラシル、ケオシン、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、シュードウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリン、または7-デアザグアノシンである。

【0044】

幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、少なくとも2種の、少なくとも3種の、または4種の天然に存在するリボヌクレオチド類の混合物を含む。その他の実施形態においては、前記ブロッキング剤は、少なくとも2種の、少なくとも3種の、または4種の天然に存在するデオキシリボヌクレオチド類の混合物を含む。さらに他の実施形態においては、前記ブロッキング剤は、少なくとも2種の、少なくとも3種の、4種の、またはさらに4種より多くのヌクレオチド類似体の混合物を含む。さらに他の実施形態においては、前記ブロッキング剤は、（a）天然に存在するリボヌクレオチド類および天然に存在するデオキシリボヌクレオチド類の混合物、（b）天然に存在するリボヌクレオチド類およびヌクレオチド類似体の混合物、（c）天然に存在するデオキシリボヌクレオチド類およびヌクレオチド類似体の混合物、または（d）天然に存在するリボヌクレオチド類、天然に存在するデオキシリボヌクレオチド類およびヌクレオチド類似体の混合物を含む。

【0045】

前記ブロッキング剤において使用されるリボヌクレオチド類の量は、ビーズ破砕用システムで使用されることが意図される試料流体の量と合わせられ得る。特定の実施形態においては、試料チューブに試料流体を添加した後に試料流体中に溶解されるリボヌクレオチド類の濃度は、200 pg/mL~20 μg/mLの、1 ng/mL~15 μg/mLの

10

20

30

40

50

、または $1\mu\text{g}/\text{mL}\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲である。このように、上述の実施形態に関しては、 2mL のチューブに 1mL の試料が添加されるべき場合において、ブロッキング剤において使用されるリボヌクレオチド類の量は、それぞれ $200\text{pg}\sim 20\mu\text{g}$ の、 $1\text{ng}\sim 15\mu\text{g}$ の、または $1\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}$ の範囲であり、そして 2mL のチューブに 0.8mL の試料が添加されるべき場合において、ブロッキング剤において使用されるリボヌクレオチド類の量は、それぞれ $160\text{pg}\sim 16\mu\text{g}$ の、 $0.8\text{ng}\sim 12\mu\text{g}$ の、または $0.8\mu\text{g}\sim 8\mu\text{g}$ の範囲であることとなる。

【0046】

4. 1. 2. 5 オリゴヌクレオチド類

ブロッキング剤として有用なオリゴヌクレオチド類は、合成することができるか、または天然に存在する起源から生成され得る。

【0047】

本明細書で参照される「オリゴヌクレオチド」は、該分子のサイズを意味せず、任意の長さのヌクレオチド類の重合形を意味する。しかしながら、一般的にオリゴマーは、 2000 ヌクレオチド以下、 1000 ヌクレオチド以下であり、より一般的には、 500 ヌクレオチド以下、さらにより一般的には 250 ヌクレオチド以下である。オリゴヌクレオチドという用語には、二本鎖および一本鎖のDNAおよびRNAが含まれる（しかしながら、好ましくは少なくとも部分的に一本鎖である）。それにはまた、公知の種類の修飾物、例えば当該技術分野で公知の標識、メチル化、「キャップ」、例えば天然に存在するヌクレオチド類の1種以上の類似体（例えば、セクション4. 1. 2. 4に記載される類似体）による置換が含まれる。

【0048】

前記オリゴヌクレオチド類は、種々のサイズの混合物であってよく、かつ／またはリボヌクレオチド類、デオキシリボヌクレオチド類、ヌクレオチド類似体、もしくは前記の2種以上の組み合わせ（例えば、リボヌクレオチド類およびデオキシリボヌクレオチド類の混合物、リボヌクレオチド類およびヌクレオチド類似体の混合物、デオキシリボヌクレオチド類およびヌクレオチド類似体の混合物、またはリボヌクレオチド類、デオキシリボヌクレオチド類、およびヌクレオチド類似体の混合物）を含み得る。幾つかの実施形態においては、前記ブロッキング剤は、RNAを含む。

【0049】

本開示のビーズ破碎用システムにおいて使用することができる合成オリゴヌクレオチド類は、一般的に $2\sim 120$ ヌクレオチド長である。様々な実施形態においては、前記オリゴヌクレオチド類は、 2 、 5 、 8 、 10 、 15 、 18 、 25 、 40 、 50 、 80 、 100 もしくは 120 ヌクレオチド長であり、または上述の値の任意の組の間の範囲の長さ、例えば $2\sim 100$ ヌクレオチド長、 $2\sim 50$ ヌクレオチド長、 $2\sim 25$ ヌクレオチド長、 $5\sim 40$ ヌクレオチド長、 $2\sim 15$ ヌクレオチド長、 $8\sim 120$ ヌクレオチド長、 $8\sim 80$ ヌクレオチド長、 $10\sim 100$ ヌクレオチド長、 $15\sim 50$ ヌクレオチド長、 $50\sim 100$ ヌクレオチド長、 $100\sim 120$ ヌクレオチド長等々を有するオリゴヌクレオチド類である。

【0050】

天然に存在するオリゴヌクレオチド類は、1種以上の天然に存在する起源、例えばサケ精子DNA、仔ウシ胸腺DNA、ニシン精子DNA、またはそれらの組み合わせからDNAを断片化することにより調製され得る。

【0051】

前記ブロッキング剤において使用されるオリゴヌクレオチド類の量は、ビーズ破碎用システムで使用されることが意図される試料流体の量と合わせられ得る。特定の実施形態においては、試料チューブに試料流体を添加した後に試料流体中に溶解されるオリゴヌクレオチド類の濃度は、 $200\text{pg}/\text{mL}\sim 20\mu\text{g}/\text{mL}$ の、 $1\text{ng}/\text{mL}\sim 15\mu\text{g}/\text{mL}$ の、または $1\mu\text{g}/\text{mL}\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲である。このように、上述の実施形態に関しては、 2mL のチューブに 1mL の試料が添加されるべき場合において、ブロッキ

10

20

30

40

50

ング剤において使用されるオリゴヌクレオチド類の量は、それぞれ200 pg～20 µgの、1 ng～15 µgの、または1 µg～10 µgの範囲であり、そして2 mLのチューブに0.8 mLの試料が添加されるべき場合において、ブロッキング剤において使用されるリボヌクレオチド類の量は、それぞれ160 pg～16 µgの、0.8 ng～12 µgの、または0.8 µg～8 µgの範囲であることとなる。

【0052】

4.1.3 ビーズ

本開示のビーズ破砕用システムは、試料流体中に配置されたときに互いに相対的に移動可能なビーズを含む。本明細書で使用される場合に、用語「ビーズ」は、球状粒子および非球状粒子の両方を含む。前記ビーズは、鉱物ビーズ、例えば結晶性粒子（例えばジルコニウム、ジルコン（ケイ酸ジルコニウム）およびジルコニア（二酸化ジルコニウム））、石英、酸化アルミニウム、炭化ケイ素（カーボランダムとしても知られる）、セラミック粒子、ガラス（例えば二酸化ケイ素ガラスまたはシリカ）、または上述の1種以上を含む組み合わせ（例えばジルコニア／シリカビーズまたはジルコニア／イットリウムビーズ）で作られるビーズであってよい。該ビーズは、金属ビーズ、例えばステンレス鋼ビーズまたはクロム鋼ビーズであってよい。

【0053】

細菌性DNAの回収のためには、該ビーズは、好ましくは石英粒子および／またはジルコニウム粒子を含む。そのようなビーズは、大量に市販されており、DNAおよびRNAに対して化学的に不活性である。石英粒子および／またはジルコニウム粒子は、比較的高い比重を有し、硬質であり、かつ鋭利なエッジを有し得る。したがって、それらは、機械的振動にさらされたときに細胞膜を開くために非常に適している。

【0054】

所定のビーズ破砕用システムのためのビーズの材料およびサイズは、処理されるべき流体試料中の細胞型の個性に応じて当業者により選択され得る。一般的に、該ビーズは、50 µm～3 mmの範囲の直径であることとなる。細菌細胞から核酸を抽出するためには、ガラスまたはジルコニウムで一般的に作られた50 µm～0.5 mmの範囲の直径の小さいサイズないし中程度のサイズのビーズを使用することができる。酵母等のより大きな微生物細胞から核酸を抽出するためには、中程度のサイズのまたは大きなビーズ（例えば、0.5 mm、1 mm、または1.5 mmの直径を有するガラスまたはジルコニウムで一般的に作られるビーズ）を使用することができる。種々のサイズのビーズおよび種々の細胞型を処理するための組成物は、市販されている。例えば、www.denvillescientific.com/sites/default/files/Bead_Blasting_Notes.pdfで入手可能なBenchmark Scientific, Product Note: Benchmark Bead Beating Guideを参照のこと。

【0055】

本開示のビーズ破砕用システムは、特に多数の起源から核酸を回収することが望まれる場合（例えば、細菌性および真菌性DNA）に、多数の種類のビーズおよび／または同じ種類の多数のサイズのビーズを含み得る。多数の種類のビーズを有するビーズ破砕用システムの例には、酸化アルミニウムビーズおよび炭化ケイ素ビーズの組み合わせ、セラミックビーズおよびシリカビーズの組み合わせ、ガラスビーズおよび酸化ジルコニウムビーズの組み合わせ、ジルコニアビーズおよび酸化アルミニウムビーズの組み合わせ、または炭化ケイ素ビーズおよびガラスビーズの組み合わせを有するシステムが含まれる。それらの様々な種類のビーズは、同じサイズまたは異なるサイズであってよい。

【0056】

4.2 試料

本開示のビーズ破砕方法を使用して核酸が抽出され得る試料の例には、様々な流体試料が含まれる。幾つかの事例においては、試料は、被験体からの体液試料であってよい。試料には、被験体から採取された組織が含まれ得る。試料には、被験体の体液、分泌物、お

10

20

30

40

50

よび／または組織が含まれ得る。試料は生物学的試料であってよい。該生物学的試料は、体液試料、分泌物試料、および／または組織試料であってよい。生物学的試料の例には、限定されるものではないが、血液、血清、唾液、尿、胃液および消化液、涙液、糞便、精液、膿液、腫瘍組織由来の間質液、眼液、汗、粘液、耳垢、油、腺分泌物、息、髄液、毛髪、爪、皮膚細胞、血漿、鼻腔スワブまたは鼻咽喉洗浄液、髄液、脳脊髄液、組織、咽喉スワブ、創傷スワブ、生検、胎盤液、羊水、臍帯血、リンパ液、体腔液、喀痰、膿またはその他の創傷滲出液、創面切除または切除により試料採取された感染組織、脳脊髄液、洗浄液、白血球生成標本、腹膜透析液、乳汁および／またはその他の排泄物が含まれ得る。

【0057】

前記試料は、被験体から採取したままでビーズ破碎用チューブ中に入れてもよく、またはビーズ破碎用チューブに入れる前に、幾つかの形態の前処理（例えば以下のセクション4.3に記載される）、貯蔵、または輸送に供されてもよい。該試料は、介入または多くの時間をかけずにビーズ破碎用システムに加えられ得る。

【0058】

被験体は試料を提供することができ、かつ／または試料は、被験体から採集され得る。被験体は、ヒトまたは非ヒト動物であってよい。試料は、生きている被験体または死んだ被験体から採集され得る。動物は、哺乳動物、例えば家畜（例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ）、競技用動物（例えば、ウマ）またはペット（例えば、イヌまたはネコ）であってよい。被験体は、患者、臨床的被験体、または前臨床的被験体であってよい。被験体は、診断、治療、および／または疾患管理もしくは生活様式ケアまたは予防的ケアを受けていてよい。被験体は、ヘルスケアの専門家のケア下にあってもよく、ケア下になくてもよい。

【0059】

幾つかの実施形態においては、該試料は、環境試料であってよい。環境試料の例には、空気試料、水試料（例えば地下水、地表水、または廃水）、土壌試料、または植物試料が含まれ得る。

【0060】

さらなる試料には、食料品、飲料、製造材料、テキスタイル、化学薬品、治療剤またはあらゆるその他の試料が含まれ得る。

【0061】

4.3 試料前処理

幾つかの事例においては、本開示のビーズ破碎用システムにおける処理の前に試料を前処理することが有利である場合がある。ビーズ破碎用チューブ中に試料を入れる前に使用され得る前処理の例には、本明細書で述べられるような、またはその他に当該技術分野で公知のような濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、妨害成分の不活性化、試薬の添加等が含まれる。

【0062】

対象の細胞型からのDNAの回収を最大にするために、本開示のビーズ破碎用チューブ中に入れる前に、不所望な細胞型および粒状物を生物学的試料から除去することが特に有利であると思われる。

【0063】

生物学的試料中の細菌を検出することが意図される場合に、生物学的試料をフィルターを通して前処理して、粒状物および非微生物細胞をフィルターに保持させる一方で、細菌細胞（所望であればその胞子を含む）を通過させることが望ましい。本明細書で使用される「フィルター」は、粒子および分子のサイズに基づく差別的通過を可能にする膜または装置である。一般的に、これは特定の標準サイズのフィルター中の細孔を有することにより達成される。例えば、細菌検出用途に特に該当するフィルターは、細菌の通過を可能にするのに十分な大きさであるが、対象の試料中に存在する真核細胞の通過を妨げるのに十分に小さい細孔を有する。一般的に、細菌細胞は、 $0.2\ \mu\text{m}$ ～ $2\ \mu\text{m}$ （マイクロメートルまたはミクロン）の範囲の直径であり、ほとんどの真菌細胞は、 $1\ \mu\text{m}$ ～ $10\ \mu\text{m}$ の範囲の直径であり、血小板は、約 $3\ \mu\text{m}$ の直径であり、かつほとんどの有核哺乳動物細胞は

10

20

30

40

50

、一般的に10 μm～200 μmの直径である。したがって、細菌の検出が意図される場合に、微生物学的試料から非微生物細胞を除去するためには、2 μm未満または1 μm未満のフィルター孔径が特に適している。

【0064】

濾過工程に加えて、または濾過工程の代わりに、微生物学的試料は、ビーズ破碎の前に試料から細胞および破片を除去するために遠心分離にかけられ得る。真核生物を沈降するが、細菌細胞を沈降しない遠心分離パラメータは、当該技術分野で公知である。上清は、所望であればその後ろに濾過され得る。

【0065】

濾過工程により生成された濾液は「試料」であってよく、本開示によるビーズ破碎用チューブ中に入れられるか、またはさらなる前処理工程（例えば濃縮または希釈）に供され得る。

【0066】

4.4 ビーズ破碎

核酸調製の初期工程として、試料は、ビーズ破碎のためにビーズ破碎用チューブ中に入れられる。該ビーズ破碎工程は、本開示のビーズ破碎用システムまたは標準的なビーズ破碎用システムを利用することができる。幾つかの事例においては、標準的なビーズ破碎用システムを使用する場合には1種以上の外因性のブロッキング剤が添加され得るが、内因性のブロッキング剤を含む生物学的試料の場合には、外因性のブロッキング剤の添加は必要とされない。1種以上のブロッキング剤が添加される場合に、試料の添加前に、試料の添加後にビーズ破碎用チューブに添加され得るか、または試料および1種以上のブロッキング剤の両方は、同時に添加され得る（例えば、試料および1種以上のブロッキング剤が混合された後に、ビーズ破碎用チューブに移送され得る）。

【0067】

試料をビーズ破碎用チューブ中に入れた後に、該チューブを攪拌して、細胞を機械的に溶解させる。溶解は、通常の研究室用のボルテックス装置またはホモジナイザーにより達成され得る。ボルテックス装置における処理時間は、専門のホモジナイザー中での時間よりも3倍～10倍長い、ボルテックス操作は、細胞を容易に破壊する働きがあり、廉価である。

【0068】

ビーズ破碎のために適した多くのホモジナイザーは市販されており、本開示のビーズ破碎用システムで利用することができる。例示的なホモジナイザーは、Bead BugおよびBead Blaster 24 (Benchmark Scientific社)、Power Lyzer 24 (MO Bio Laboratories Inc.社)、Fast Prep-24、Fast Prep-24 5GおよびSuperFast Prep-1 (MP Biomedicals社)、ならびにMini-Beadbeater-16 (BioSpec Products社)である。

【0069】

均質化パラメータは、製造業者の推奨に従って選択され得る。一般的に、機械的破壊（例えばビーズ破碎）の時間は、1秒間未満、1秒間～5秒間、5秒間～10秒間、10秒間～25秒間、25秒間～60秒間、1分間～2分間、2分間～5分間、5分間またはそれより長くてもよい。機械的破壊の反復回数（例えばビーズ破碎作業の回数）は、2回、3回、4回、5回、6回、7回、7回～10回、10回またはそれより多くの反復であってよい。破壊の速度（例えばビーズ破碎の速度または設定）は、1分間あたりに50回転未満、50回転～100回転、100回転～250回転、250回転～500回転、500回転～750回転、750回転～1000回転、1000回転～1500回転、1500回転～2000回転、2000回転またはそれより多くの回転（振動）であってよい。

【0070】

4.5 核酸精製

細胞溶解後に、流体試料はビーズから、例えば液体試料を試料チューブから試料チュー

10

20

30

40

50

ブの底に沈殿しているビーズを残してピペット等で除去することにより分離される。

【0071】

抽出されたDNAの分析を妨害し得る不純物は、例えば酢酸アンモニウムを用いるような公知法による不純物の沈殿により、または市販のキットを使用して除去され得る。

【0072】

核酸が回収され、洗浄され、任意にさらに精製され得る。核酸の回収および／または精製は、通常の方法を使用して、例えばイソプロパノールでの沈殿により、または市販のキットもしくは自動化された機器を使用して実施され得る。

【0073】

4.6 核酸分析

対象の核酸（例えば細菌性または真菌性DNA）の存在に関する試料の分析は、任意の核酸分析法、例えば、増幅技術に限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、等温増幅、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Q-PCR）、ディジタルPCR、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、質量分析法、蛍光検出、紫外分光測定、ハイブリダイゼーションアッセイ、DNAまたはRNAシーケンシング、制限分析、逆転写、NASBA、アレル特異的ポリメラーゼ連鎖反応、ポリメラーゼサイクリングアセンブリ（PCA）、非対称ポリメラーゼ連鎖反応、指数後線形的ポリメラーゼ連鎖反応（LATE-PCR）、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、ホットスタート型ポリメラーゼ連鎖反応、配列間特異的ポリメラーゼ連鎖反応（ISSR）、逆ポリメラーゼ連鎖反応、ライゲーション媒介ポリメラーゼ連鎖反応、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応（MSP）、多重ポリメラーゼ連鎖反応、ネステッドポリメラーゼ連鎖反応、固相ポリメラーゼ連鎖反応またはそれらの任意の組み合わせを使用して実施することができる。そのような技術は、当業者によく知られている。標的核酸の配列を知ること、科学者は、標的の増幅および／または検出を可能にするプライマーおよび／またはプローブを構築することが可能となる。PCRアンプリコンは、その同一性の確認のためにシーケンシングされ得る。

【0074】

本開示によるビーズ破碎用システムにより、試料流体中に含まれる微生物から、DNAおよび／またはRNAを自体公知の方法で微生物学的に直接的に調査するのに十分な濃度でDNAおよび／またはRNAを抽出することが可能である。これは、特に、試料流体を、DNAおよび／もしくはRNAならびに／またはそこに含まれるDNAおよび／もしくはRNA成分に特異的に結合する、表面上に固定された受容体と接触させることにより行うことができる。DNAおよび／もしくはRNAならびに／またはDNAおよび／もしくはRNA成分の該受容体への結合は、自体公知の様式で、マーカー、特に光学的マーカー、例えば蛍光色素により検出し、必要に応じて定量することができる。あるいは試料流体中に含まれる微生物からのDNAおよび／またはRNAは、試験前に、例えばPCRにより増幅され得る。

【0075】

4.7 キット

本開示はさらに、本開示のビーズ破碎用システムを含む（または該システムを得るために適した）キットを提供する。該キットは、試料チューブ、例えばセクション4.1.1に記載される試料チューブ、1種以上のブロッキング剤、例えばセクション4.1.2に記載されるブロッキング剤、および／または1種以上のビーズ、例えばセクション4.1.3に記載されるビーズを含み得る。上記1種以上のブロッキング剤のそれぞれは、凍結乾燥され、該チューブ内にまたは該チューブとは別に含まれていてよい。同様に、前記ビーズは、該チューブ内にまたは該チューブとは別に含まれていてよい。

【0076】

幾つかの実施形態においては、前記キットは、試料チューブおよび1種以上のブロッキング剤を含む。さらなる実施形態においては、上記キットはさらに、1種以上の種類のビーズを含む。

10

20

30

40

50

【0077】

本開示のキットは、試料前処理のための1種以上の構成要素、例えば生理食塩水、1種以上のバッファー溶液、セクション4.3に記載されるフィルター等を含み得る。

【0078】

前記キットは、対象の1種以上の病原体（マイコバクテリウム・ツベルクロシス（*Mycobacterium tuberculosis*）、マイコバクテリウム・アビウム（*Mycobacterium avium*）亜種パラツベルクロシス（*paratuberculosis*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）、ストレプトコッカス・アガラクチア（*Streptococcus agalactiae*）、ヘモフィルス・インフルエンザ（*Haemophilus influenzae*）、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ（*Haemophilus parainfluenzae*）、モラキセラ・カタラーリス（*Moraxella catarrhalis*）、クレブシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）、エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）、シュードモナス・アエルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、アシネトバクテリウム属種（*Acinetobacter* sp.）、ボルデテラ・ペルツシス（*Bordetella pertussis*）、ネイセリア・メニンジチディス（*Neisseria meningitidis*）、バシラス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）、ノカルディア属種（*Nocardia* sp.）、アクチノマイセス属種（*Actinomyces* sp.）、マイコプラズマ・ニューモニエ（*Mycoplasma pneumoniae*）、クラミジア・ニューモニア（*Chlamydia pneumoniae*）、レジオネラ属種（*Legionella* species）、ニューモシスティス・イロベチイ（*Pneumocystis jirovecii*）、インフルエンザA型ウイルス、サイトメガロウイルス、リノウイルス、エンテロコッカス・ファエシウム（*Enterococcus faecium*）、アシネトバクテリウム・バウマンニイ（*Acinetobacter baumannii*）、コリネバクテリウム・アミコラツム（*Corynebacterium amycolatum*）、エンテロバクテリウム・アエロゲネス（*Enterobacter aerogenes*）、エンテロコッカス・ファエカリス（*Enterococcus faecalis*）CI4413、セラチア・マルセッセンス（*Serratia marcescens*）、ストレプトコッカス・エクイ（*Streptococcus equi*）およびカンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）の1種以上）からDNAおよび／またはRNAを増幅するための1種以上のオリゴヌクレオチド類を含み得る。

【0079】

前記キットは、対象の1種以上の病原体（マイコバクテリウム・ツベルクロシス、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクロシス、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・アガラクチア、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ、モラキセラ・カタラーリス、クレブシエラ・ニューモニエ、エシェリキア・コリ、シュードモナス・アエルギノーサ、アシネトバクテリウム属種、ボルデテラ・ペルツシス、ネイセリア・メニンジチディス、バシラス・アントラシス、ノカルディア属種、アクチノマイセス属種、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア・ニューモニア、レジオネラ属種、ニューモシスティス・イロベチイ、インフルエンザA型ウイルス、サイトメガロウイルス、リノウイルス、エンテロコッカス・ファエシウム、アシネトバクテリウム・バウマンニイ、コリネバクテリウム・アミコラツム、エンテロバクテリウム・アエロゲネス、エンテロコッカス・ファエカリスCI4413、セラチア・マルセッセンス、ストレプトコッカス・エクイおよびカンジダ・アルビカンスの1種以上）からDNAおよび／またはRNAを検出するための1種以上のプローブを含み得る。1つの実施形態においては、前記1種以上のプローブは、蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチド類を含む。種々のプローブは、対象の多数の病原体を同時に検出するために種々の色素で標識されている。

【0080】

5. 例示的なビーズ破碎用システム

例示的なビーズ破碎用システムは、図面に示されている。図1～3における参照符号（

10

20

30

40

50

1) で示されるビーズ破碎用システムは、内部空洞 (3) および閉鎖可能な開口部 (4) を有する試料チューブ (2) を含む。試料チューブは、好ましくはプラスチックで作られているが、それ以外の生物学的に不活性な材料で作られてもよい。

【0081】

微生物を含むと推定される試料流体 (5) は、開口部 (4) を通じて試料チューブ (2) の内部空洞 (3) 中に充填され、そこから取り出され得る。開口部 (4) を閉じるために、試料チューブは、開放位置および閉鎖位置に送られるように適合されたクロージャ (6) を有し、それは開口部 (4) の境界となる試料チューブ (2) の外壁の縁部領域に設けられた外側ねじ山と螺合されるように適合された内側ねじ山を含むクロージャキャップとして設計されている。

【0082】

内部空洞 (3) において、最大寸法が平均で約 $100\text{ }\mu\text{m}$ であるビーズ (7) (例えば、2グラムの二酸化ケイ素および／またはジルコニウムビーズ) がさらに配置されている。該ビーズ (7) は、互いに相対的に移動可能である緩いバルクの形態で入手できる。凍結乾燥されたブロッキング剤 (8) もその内部空洞 (3) 中に配置されている。

【0083】

該ビーズ (7) は、試料流体 (5) が内部空洞 (3) 中に充填され、該ビーズ破碎用チューブが機械的振動、例えば超音波振動にかけられたときに試料流体 (5) 中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊する働きがある。それらの振動は、図面に詳細に図解されていない振動発生器で発生され得、ビーズ破碎用システム (1) に伝えられ得る。そのような振動発生器は、MP Biomedicals 社から MP Bio bead beater の名称で市販されている。細胞壁の破壊のため、微生物中に含まれる核酸 (例えば DNA) は、試料流体 (5) 中に放出および溶解される。

【0084】

6. 事例研究

6.1 喀痰から病原体 DNA を回収するためのビーズ破碎の使用

マイコバクテリウム・ツベルクロシス (「MTB」) は、マイコバクテリウム科における偏性病原性細菌種であり、結核のほとんどの事例の原因因子である。主として哺乳動物の呼吸器系の病原体であり、それは肺に感染する。マイコバクテリアが栄養欠乏または低酸素のようなストレスのさなかに非複製または休眠 (孢子形成) の状態に移行し得ることを示す証拠がある。孢子の形成は、細菌細胞を溶解して、細菌性 DNA を抽出することを困難にする。

【0085】

マイコバクテリア DNA の回収をさらに複雑にするのは、マイコバクテリア株が一般的に感染された患者の喀痰から単離されることである。喀痰は、濃厚で粘性であり、処理しづらい。分析のためのほとんどの喀痰標本は、様々な量の有機的破片と、多岐にわたる混入細菌叢、通常の細菌叢または一過的な細菌叢とを含む。化学的浄化／処理は一般的に、粘度を減少させ、マイコバクテリアの回収を可能にしつつ混入菌を死滅させるために使用される。

【0086】

MTB を含むと疑われる試料は、利用者に潜在的な危険性を引き起こす。したがって、この危険性を緩和するために、喀痰試料は、加熱および／または試料中に存在する微生物の不活性化に適した試薬を添加することにより前処理され得る。MTB 等の微生物の不活性化は、活性なタンパク質の変性のための加熱 (例えば 90°C で 5 分)、細胞壁構造の酵素的消化、細胞の物理的破壊もしくは細胞の不活性化のための機械的破壊、化学的処理、またはそれらの組み合わせにより行われ得る。

【0087】

喀痰試料 (一般的に、 $1\text{ mL} \sim 10\text{ mL}$ の間、 $5\text{ mL} \sim 10\text{ mL}$ の間またはそれより多くの容量で収集される) は、まず最初にその粘度および不均質性を減らして一貫して試料を処理するために液化され得る。喀痰試料は、特に問題を引き起こす。喀痰中の MTB は

10

20

30

40

50

、抗酸桿菌の脂質が豊富な疎水性細胞壁および喀痰の粘性の不均質な性質のため最も処理しづらい細胞および試料の型の1つである。喀痰のための標準的な抽出方法は一般的に、しばしばN-アセチル-L-システイン（NALC）、ゼフィラン-リン酸三ナトリウム（Z-TSP）またはベンザルコニウムのような粘液溶解剤での処理を含む沈降のプロセスから始まり、引き続き遠心分離、傾瀉、および再懸濁が行われる。

【0088】

したがって、高度に粘性の試料、例えば喀痰を処理する場合に、該試料は、その粘度を下げるために化学的処理に供され得るため、後続の1つ以上の処理工程は妨げられない。1つの実施形態においては、粘液溶解剤での化学処理による喀痰試料の液化は、60℃で20分間にわたり行われる。喀痰は90 s⁻¹のせん断速度で約100 cP~6000 cP（mPa s）の範囲の粘度を有する。mPa sで測定される粘度は、せん断強さをせん断速度で割ることにより測定される。好ましくは、前記試料を液化させることで、喀痰の粘度は少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%だけ低減される。

【0089】

再懸濁の後に、該試料は、セクション4.4に記載されるように細胞溶解のために本開示のビーズ破碎用システム（セクション4.1に記載される）に添加される。溶解および核酸抽出（セクション4.5を参照）の後に、MTBのDNAは、MTB配列のPCR増幅により分析することができ、MTB薬剤耐性は、薬剤耐性遺伝子の増幅により分析することができる。喀痰試料は、その他の細菌性およびウイルス性病原体、例えば限定されるものではないが、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・アガラクチア、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ、モラキセラ・カタラーリス、クレブシエラ・ニューモニエ、エシェリキア・コリ、シュドモナス・アエルギノーサ、アシネトバクター属種、ボルデテラ・ペルツシス、ネイセリア・メニンジチディス、バシラス・アントラシス、ノカルディア属種、アクチノマイセス属種、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア・ニューモニア、レジオネラ属種、ニューモシスティス・イロベチイ、インフルエンザA型ウイルス、サイトメガロウイルス、およびリノウイルスについて分析することができる。

【0090】

6.2 獣医学的病原体からDNAを回収するためのビーズ破碎の使用

マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクロシス（MAP）は、パラ結核またはヨーネ病（JD）、家畜および野生の反芻動物における慢性肉芽腫性胃腸炎の原因となる獣医学的病原体である。MAPは、群れにおいて精液、乳汁、初乳經由および子宮内で直接的に伝播するとともに、汚染した餌、飼料、牧草、水等を通じた経口経路（糞口経路）により間接的に伝播する。JDは、家畜の生産性に甚大な影響を及ぼし（早期淘汰および乳生産の低下）、家畜産業は多大な経済的損失を受ける。JD防除の努力は、土壌および水内のMAPの残存ならびに不顕性および臨床的なウシによる落ち毛により妨害されている。

【0091】

先のセクションで述べられるように、胞子の形成は、マイコバクテリア細胞を溶解して、細菌性DNAを抽出することを困難にする。したがって、本開示のビーズ破碎用システムは、MAP回収を改善するために使用することができる。例えば、該ビーズ破碎用システムは、乳汁、土壌、糞便、精液等に存在するMAPからDNAを回収するために使用することができる。

【0092】

乳汁試料は、本開示のビーズ破碎用システムを使用して直接的に処理することができ、または試料中に存在するのであれば、例えばMAPの濃度の増加のために前処理することができる。例示的な前処理法は、乳汁の飼料を遠心分離することで、乳脂分画、乳清分画、およびペレットを得ることを含む。乳脂分画および該ペレットはプールされ、細胞溶解

のために本開示のビーズ破碎用システムに添加され得る。

【0093】

糞便飼料は、例えば糞便懸濁液を調製し、それを次いで細胞溶解のために本開示のビーズ破碎用システムに添加することにより前処理することができる。例示的な糞便懸濁液は、糞便試料を水、生理食塩水またはバッファー（例えばリン酸ナトリウム、リン酸緩衝生理食塩水、トリス等）と混合し、その混合物を沈殿させ、分離させた後に、上清を遠心分離し、最後にペレットを適切な液体、例えば水、生理食塩水またはバッファー中に再懸濁することにより調製することができる。

【0094】

土壌試料は、液体（例えば水、生理食塩水またはバッファー）中に懸濁し、その後に溶解のために本開示のビーズ破碎用システムに添加することができる。精液試料は、精液試料をビーズ破碎前に一定量の水、生理食塩水またはバッファーと合することにより同様に前処理することができる。

【0095】

6.3 創傷から病原体DNAを回収するためのビーズ破碎の使用

創傷感染の検出のために、創傷スワブは、生理食塩溶液、細胞培養培地、または市販のキットからの試料調製溶液中でインキュベートされ得る。該スワブは、一般的に約5分間～1時間の期間にわたり、より好ましくは0.25時間～1時間（例えば、0.25時間、0.5時間または0.75時間）にわたりインキュベートされる。溶液の適切な容量は、200 μ L～10 mLであり、特定の実施形態においては、500 μ L、1 mL、2 mL、5 mL、8 mLであり、または上記実施形態のいずれか2つを境界とする範囲、例えば1 mL～5 mL、500 μ L～10 mL、200 μ L～8 mL等々から選択される。該溶液を、定期的に振り混ぜまたは攪拌することで、スワブからの病原体細胞の放出を促進することができる。インキュベーション期間が終わったら、該スワブを絞り、破棄してよい。

【0096】

その後に該溶液を、本開示のビーズ破碎用システムに入れることができる。任意に、その溶液はビーズ破碎前に濾過および／または濃縮される。

【0097】

通常創傷に感染する病原体には、限定されるものではないが、E. コリ、P. アエルギノーサ、E. ファエシウム、S. アウレウス（MRSAを含む）、K. ニューモニエ、A. バウマンニイ、C. アミコラツム、E. アエロゲネス、E. ファエカリスCI4413、S. マルセッセンス、S. エクイおよびC. アルビカンスが含まれる。したがって、創傷スワブ試料は、上記の生物のいずれについても、単独でもまたは組み合わせでも分析することができる。

【0098】

6.4 腹膜透析液から病原体DNAを回収するためのビーズ破碎の使用

腹膜透析は、重症の慢性腎臓病を伴う患者のための治療である。この種の透析は、患者の腹部の腹膜を、流体および溶解された物質を血液から交換させるための膜として使用する。流体は、腹部に常設されたチューブを通して導入され、その後に流し出すことで、過剰の塩、尿酸およびその他の老廃物が浄化される。腹膜を介した浸透により、溶質は血液および透析液の間で交換される。適切な時間後に、透析液は腹膜から除去され、破棄される。このようにして血液は平衡状態になり、終端代謝産物、例えば尿酸は、血液中で無期限の蓄積が妨げられる。

【0099】

腹膜透析の一次合併症は、腹部にある常設のチューブの存在による感染症である。少なくとも1つの感染部位は腹腔内であり、それにより腹痛、濁った透析溶出液、およびグラム染色での病原体の発見またはカテーテル内からの培養における病原体の発見がもたらされる。さらに、組織トンネルまたはカテーテルの外部表面は、接触汚染からの一般的な感染箇所である。組織トンネルでの感染は、最も一般的には皮膚部位からの移入によるものである。感染症は腹膜炎を引き起こすことがあり、幾つかの事例では死を引き起こすこと

10

20

30

40

50

がある。

【0100】

腹膜感染症は、腹膜透析を受けている個人から取り出された腹膜透析液において検知され得る。S. アウレウスおよびP. アエルギノースが大部分の感染症の原因であるが、その他の細菌（類ジフテリア菌、嫌気性生物、非発酵性細菌、連鎖球菌、非結核性マイコバクテリア、レジオネラ、酵母および真菌）も関与することがある。したがって、腹膜透析液試料は、上記の生物のいずれについても、単独でもまたは組み合わせでも分析することができる。

【0101】

腹膜透析液は、セクション4.3に記載されるように濾過および任意に濃縮により前処理され得る。

【0102】

6.5 廃水汚染物からDNAを回収するためのビーズ破碎の使用

生物学的廃水処理法における問題となる泡だつて嵩が増す細菌種の検出に関する米国特許第9,290,796号明細書の実施例1は、廃水処理プラントから回収された廃水からビーズ破碎プロトコルを使用してDNAを抽出することを記載している。該ビーズ破碎プロトコルは、本開示のビーズ破碎用システムを導入するように適合され得る。

【0103】

6.6 食品病原体からDNAを回収するためのビーズ破碎の使用

液状食品試料は、ビーズ破碎の前にセクション4.3で先に記載されたように濾過および／または遠心分離により前処理され得る。例えば、飲料は、好ましくは濾過により前処理することで、存在し得る微生物を回収することができる。濾過により回収された微生物は、ビーズ破碎の前に任意に洗浄され、そして遠心分離に供され得る。固形食品、例えば肉または魚から病原体を検出するためには、食品の試料をスワブで拭うことで、その食品の表面から微生物を回収することができる。その後に該微生物をスワブから洗い出し、その後にビーズ破碎に供することができる。

【0104】

幾つかの場合に、ビーズ破碎の前に、食品試料を一定期間にわたり前培養し、試料上または試料中に存在し得る病原体（例えばサルモネラ）の増殖を促すことが望ましい場合がある。例えば、固形食品試料は、研究室用ブレンダー（例えばStomacher（登録商標）サーキュレーター、Seward Limited社、英国）を使用して破碎し、次いで培養することで微生物の増殖を促す（例えば8時間～12時間）ことができる。その後に培養の試料を、ビーズ破碎に供することができる。

【0105】

6.7 血液から病原体DNAを回収するためのビーズ破碎の使用

ヒト感染症のための迅速分子診断試験の開発は、世界人口の健康改善のために世界保健機構の最も高い優先順位にあることである（Daar et al., 2002, Nat. Genet. 32:229-232）。重症の血液感染症は、世界的に入院患者における罹患率および死亡の重大な原因であり、集中治療における最も重要な課題の1つである。例えば、敗血症発生率の最近の概算は、米国内で100000事例につき240事例である。敗血症の人的負担および経済的負担は相当のものである（Grossi et al., 2006, Surg. Infect. (Larchmt) 7:S87-S91）。感染性疾患および集中治療管理における進歩ならびに新たな治療を開発するための多くの試みにもかかわらず、敗血症の罹患率は、20%から50%までの範囲という許容できない高さに留まっている。重症の血液感染症および／または重症の敗血症の徴候の確認ならびに早期かつ正確な診断を行うことは、治療の改善と生存率の増加に重要である。実際に、迅速診断により、血液試料の採取と抗微生物療法の適用との間の時間間隔を減らすことにより患者の生存は高められ得た。

【0106】

病原体の検出の分子的技術（例えばPCRおよびDNA配列解析）のために、病原体の

10

20

30

40

50

DNAの適切な単離が、検出の成功を保証するために重要である。様々な方法は、血液からの病原体DNAの回収を改善するために溶解バッファーを使用するが、時々ビーズ破碎等の物理的破壊法を伴う。

【0107】

本開示は、血液中に天然に存在するブロッキング剤の存在を利用し、血液から病原体DNAを単離するための単純化された方法を提供する。その血液は、バッファーまたはその他の添加剤で一切希釈することなく、本開示のビーズ破碎用システム（ブロッキング剤を含む）または従来のビーズ破碎用システム（ブロッキング剤を含まない）を使用したビーズ破碎に供することができる。ビーズ破碎後に、病原体DNAを回収するために、標準的な方法、例えばセクション4.5に記載される方法を使用することができる。任意に、回収された病原体DNAはその後に、例えばセクション4.6に記載される方法により分析される。

10

【0108】

敗血症を引き起こす病原体は、一般的には細菌性または真菌性の病原体である。敗血症の通常の細菌性の原因は、グラム陰性桿菌（例えば、E. コリ、P. アエルギノーサ、E. コロデンス、およびH. インフルエンザ）である。同様に敗血症を引き起こすその他の細菌は、S. アウレウス、ストレプトコッカス属種、エンテロコッカス属種、およびナイセリアである。カンジダ属種は、敗血症を引き起こす最も多い真菌の一部である。したがって、血液試料は、上記の生物のいずれについても、単独でもまたは組み合わせでも分析することができる。

20

【0109】

7. 実施例

7.1 実施例1： ビーズ破碎用システムは、DNA損失をもたらす。

【0110】

7.1.1 材料

この研究で使用される材料は以下の通りである：

ビーズ破碎用チューブ：品番：ARY0007 OPS Diagnostics、2.0

グラムの100 μm SiO_2 ビーズを有する4.5mLのクライオバイアル

PD流体：グルコースと残部の Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} とを含有する腹膜透析液

BEバッファー：Taigen Bioscience社、1 μL あたりに1 μg のRNAを含有する

30

尿素：ACSグレード。

【0111】

7.1.2 方法

2mLのPD流体にEDTAを10mMの濃度でスパイクし、C. アルビカンスを5000 CFU/mLでスパイクしたものが標準マトリックスであった。尿素およびBEバッファーの12種の異なる組み合わせを、以下の第1表に示されるように試料に添加した：

40

50

【表 1】

第1表：試料			
試料番号	試料	BE バッファー	尿素
1	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	0	0
2	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	30 µl	0
3	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	75 µl	0
4	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	0	23.3 g/L
5	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	30 µl	23.3 g/L
6	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	0	2.3 g/L
7	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	30 µl	2.3 g/L
8	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	0	0.23 g/L
9	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	30 µl	0.23 g/L
10	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	0	23.3 g/L
11	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	30 µl	23.3 g/L
12	PD 流体 + EDTA+5000 CFU/mL C.アルビカンス	0	2.3 g/L

【0112】

すべての試料を、45秒間にわたりビーズ破碎した。ビーズ破碎の後に、DNAを、試料からLab Turbo（登録商標）48核酸抽出システム（Taigen Bioscience Corporation社、台湾、台北）を使用して製造業者の試薬およびプロトコールを使用して単離した。2.0mLのそれぞれのビーズ破碎試料から単離されたDNAを、100µLのTE（トリスEDTA）バッファー中で希釈した。単離されたDNAを、リアルタイムPCR増幅および定量に供して、それぞれの試料中の標的DNAの量を測定した。

【0113】

7.1.3 結果

それぞれの試料に関する光学密度比（単離されたDNAの純度の尺度である）および相応のDNA濃度を、以下の第2表に示す：

10

20

30

40

50

【表 2】

第2表 : DNA回収				
試料番号	BE バッファー	尿素	A260/A280	DNA 濃度 (ng/μL)
1	0	0	1.97	5.5
2	30 μl	0	3.02	54
3	75 μl	0	3.16	125
4	0	23.3 g/L	2.45	18.7
5	30 μl	23.3 g/L	3.09	53
6	0	2.3 g/L	2.53	22
7	30 μl	2.3 g/L	2.97	48.7
8	0	0.23 g/L	2.81	22.2
9	30 μl	0.23 g/L	3.05	51
10	0	23.3 g/L	2.95	14.4
11	30 μl	23.3 g/L	3.01	56
12	0	2.3 g/L	2.93	22

【0114】

PCR増幅およびハイブリダイゼーション後のアレイからのシグナルのイメージングにより得られたシグナルの強度により表されるDNAの収率は、図6および図7に図示されている。

【0115】

7.1.4 まとめ

ブロッキング剤を含まない試料1においては、C. アルビカンスのDNAの回収は、たった5.5 ng/mLであった。ブロッキング剤として尿素を含むと、回収が3～4倍増加し、ブロッキング剤としてRNAを含むと、回収が約10～20倍増加し、収率は、理論上の最大に達した。この回収の増加は、C. アルビカンスのPCR遺伝子増幅に改善をもたらす。

【0116】

7.2 実施例2： 本開示のビーズ破碎用システムを使用したDNAの抽出

7.2.1 本開示のビーズ破碎用システムの製造

250 mg/mLの尿素、25 mg/mLのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)の四ナトリウム塩、125 mg/mLのアデノシンーリン酸、125 mg/mLのグアノシンーリン酸、125 mg/mLのシトシンーリン酸、125 mg/mLのチミジンーリン酸、および75 mg/mLのラウロイルサルコシン酸ナトリウムを含むブロッキング剤のストック溶液は、TE(トリス/EDTA)バッファー中で調製した。

【0117】

200マイクロリットルの前記ストック溶液を、4.5 mL～5 mLの試料チューブに加え、真空により乾燥させることで、試料チューブの内壁の下部領域に沈積した乾燥されたブロッキング剤が得られた。乾燥されたブロッキング剤は、少なくとも1年間にわたり安定であると予想される。

【0118】

次いで2.0グラムの100マイクロメートルの二酸化ケイ素ビーズを、その試料チューブに加えた。

【0119】

7.2.2 本開示のビーズ破碎用システムの使用

6 mL の尿および 6 mL の腹膜透析液を 0.4 マイクロメートルの滅菌フィルターを通して濾過し、次いで培養室において増殖された 1 ミリリットル当たり 10000 コロニー形成単位のスタフィロコッカス・アウレウスを、その尿および腹膜透析液の濾液に添加した。

【0120】

2.9 mL のスパイクされた尿および 2.9 mL のスパイクされた腹膜透析液を、セクション 7.2.1 に記載されるように製造された試料チューブ、または 2.0 グラムの 100 マイクロメートルの二酸化ケイ素ビーズを含むが、ブロッキング剤を含まない試料チューブに移した。

【0121】

それらのチューブにキャップをし、MP Bio bead beater 中に取り付け、全出力で 30 秒間にわたり作動させた。キャップを取り外し、市販の DNA 単離装置の試料ラックに設置した。2 mL のそれぞれの試料を、それぞれのチューブから取り出し、次いで DNA 抽出剤を添加した (Lab Turbo (登録商標))。次いで DNA 抽出を実施した。100 マイクロリットルの DNA 抽出物が、それぞれの試料から得られた。

【0122】

それぞれの試料中の抽出された S. アウレウスの DNA の量を、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応により Gillespie, et al., 2005, "Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, and Streptococcus agalactiae by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction", J. Dairy Sci. 88:3510-3518 に従って測定した。1 マイクロリットルのそれぞれの DNA 抽出物を、20 マイクロリットルの反応において増幅させた。

【0123】

ブロッキング剤を含まない試料チューブを使用して処理された試料は、尿に関して 32 のサイクル閾値を有し、腹膜透析液に関して 38 のサイクル閾値を有し、低い DNA 回収が示された。

【0124】

ブロッキング剤を有する試料チューブを使用して処理された試料は、尿に関して 31 のサイクル閾値を有し、腹膜透析液に関して 32 のサイクル閾値を有し、これらの条件下では腹膜透析液に関して改善された回収が示された。

【0125】

7.3 実施例 3: ブロッキング剤としての血液

7.3.1 概略

この研究は、血液試料のために最適なビーズ破碎条件を特定するために行った。培養陰性の血液試料に、病原性 S. アウレウス、E. コリおよび C. アルビカンスをスパイクした。陽性 PCR コントロールを実行した。このコントロールの濃度 (ゲノムコピー) を、導入された病原体の理論上 100% の回収として定めた。この研究は、バッファー、界面活性剤等の添加剤の不存在下でビーズ破碎を使用して血中病原体から DNA を抽出することが可能であることを裏付けた。

【0126】

7.3.2 材料

該研究で具体的に使用される材料は以下の通りである：

ビーズ破碎用チューブ：品番：ARY0007 OPS Diagnostics、2.0 グラムの 100 μm SiO₂ ビーズを有する 4.5 mL のクライオバイアル

血液：健康なドナーからの培養陰性の血液

S. アウレウス、E. コリ、および C. アルビカンスの培養：すべて ATCC 起源。

【0127】

7.3.3 方法

3. 0 mL の血液および培養された病原体を含む 15 μ L の生理食塩水培養物からなる一連の 38 種のスパイクされた血液試料を調製した。それぞれの血液試料には、培養された病原体を含む生理食塩水培養物以外は何も添加しなかった。破碎用チューブを、Fast Prep（登録商標）24 ホモジナイザー（MP Biomedicals 社）を使用して 6.5 m/s の速度で処理した。次いで、DNA を、試料から Lab Turbo（登録商標）48 核酸抽出システム（Taigen Bioscience Corporation 社）を使用して製造業者の試薬およびプロトコールを使用して単離した。DNA を 55 サイクルの PCR で増幅させ、アレイにハイブリダイズさせた後に、洗浄し、イメージングした。病原体の量およびビーズ破碎回数を以下の第 3 表に示す：

【表 3】

第3表：試料			
試料番号	試料	ビーズ / チューブ	時間
1	血液 / スパイクなし	OPS/OPS	45
2			
3	血液 + 5000 CFU/mL C. アルビカンス	OPS/OPS	45
4			
5	血液 + 5000 CFU/mL C. アルビカンス	OPS/OPS	50
6			
7	血液 + 5000 CFU/mL C. アルビカンス	OPS/OPS	55
8			
9	血液 + 5000 CFU/mL C. アルビカンス	OPS/OPS	60
10			
11	血液 + 5000 CFU/mL C. アルビカンス	OPS/OPS	65
12			
13	血液 + 5000 CFU/mL S. アウレウス	OPS/OPS	45
14			
15	血液 + 5000 CFU/mL S. アウレウス	OPS/OPS	50
16			
17	血液 + 5000 CFU/mL S. アウレウス	OPS/OPS	55
18			
19	血液 + 5000 CFU/mL S. アウレウス	OPS/OPS	60
20			
21	血液 + 5000 CFU/mL S. アウレウス	OPS/OPS	65
22			
23	血液 + 100000 CFU/mL E. コリ	OPS/OPS	45
24			
25	血液 + 100000 CFU/mL E. コリ	OPS/OPS	50
26			
27	血液 + 100000 CFU/mL E. コリ	OPS/OPS	55
28			

10

20

30

40

50

【 0 1 2 8 】

【表 4】

29	血液 + 100000 CFU/mL <i>E. コリ</i>	OPS/OPS	60
30			
31	血液 + 100000 CFU/mL <i>E. コリ</i>	OPS/OPS	65
32			
33	血液 + 5000 CFU/mL <i>C. アルビカンス</i>	MPBio/MPBio	60
34			
35	血液 + 5000 CFU/mL <i>S. アウレウス</i>	MPBio/MPBio	60
36			
37	血液 + 100000 CFU/mL <i>E. コリ</i>	MPBio/MPBio	60
38			

10

【 0 1 2 9 】

所定のスパイク濃度での 3 種の異なる病原体について、DNA 単離からの 1 μ l 当たりのゲノム出力を計算した。このゲノムコピー値を 100 % 効率の目標として使用した。

20

【 0 1 3 0 】

7. 3. 4 結果

結果は図 8 ~ 10 に図示されており、それらは、PCR 増幅およびハイブリダイゼーション後のアレイからのシグナルのイメージングにより得られたシグナルの強度により表される DNA の収率を示している。図 8 は、*C. アルビカンス* の時系列と一緒に前記の 100 % 目標を表している。図 9 は、*S. アウレウス* の時系列と一緒に前記の 100 % 目標を表している。図 10 は、*E. コリ* の時系列と一緒に前記の 100 % 目標を表している。

【 0 1 3 1 】

7. 3. 5 まとめ

3 種の異なる病原体に関して、病原体 DNA がビーズに結合することによるシグナル損失の証拠はなかった。すべての事例において、理論値の少なくとも 100 % が裏付けられた。2 つの事例においては、恐らくスパイク中に死んだ細菌からの DNA が存在したため、100 % より多くの回収がなされた。

30

【 0 1 3 2 】

8. 具体的な実施形態

本開示を、以下で具体的な実施形態により例示する。

【 0 1 3 3 】

1. 開口部により到達可能な内部空洞を有する試料チューブ (i) と、ビーズ (i i) と、乾燥したブロッキング剤 (i i i) とを含むビーズ破碎用システムであって、前記ビーズおよび乾燥したブロッキング剤は、前記試料チューブの内部空洞内に位置している、ビーズ破碎用システム。

40

【 0 1 3 4 】

2. 前記ブロッキング剤は、1 種以上のカオトロピック剤、クレアチニン、1 種以上のヌクレオチド類、1 種以上のオリゴヌクレオチド類、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態 1 に記載のビーズ破碎用システム。

【 0 1 3 5 】

3. 前記ブロッキング剤は、1 種以上のカオトロピック剤を含み、該カオトロピック剤は、尿素、1 種以上のグアニジン塩、1 種以上のリチウム塩、1 種以上のマグネシウム塩、1 種以上の界面活性剤、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態 2 に記載のビー

50

ズ破碎用システム。

【0136】

4. 前記ブロッキング剤は、1種以上のグアニジン塩を含み、該グアニジン塩は、イソシアヌ酸グアニジン、塩化グアニジン、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態3に記載のビーズ破碎用システム。

【0137】

5. 前記ブロッキング剤は、1種以上のリチウム塩を含み、該リチウム塩は、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態3または4に記載のビーズ破碎用システム。

【0138】

6. 前記ブロッキング剤は、塩化マグネシウムを含む、実施形態3から5までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0139】

7. 前記ブロッキング剤は、1種以上の界面活性剤を含み、該界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウロイル硫酸サルコシン酸ナトリウム、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態3から6までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0140】

8. 前記ブロッキング剤は、1種以上のヌクレオチド類を含み、該ヌクレオチド類は、天然に存在するヌクレオチド類、天然に存在しないヌクレオチド類、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態2から7までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0141】

9. 前記1種以上のヌクレオチド類は、1種以上の天然に存在するデオキシリボヌクレオチド類、1種以上の天然に存在するリボヌクレオチド類、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態8に記載のビーズ破碎用システム。

【0142】

10. 前記ブロッキング剤は、1種以上のデオキシリボヌクレオチド類を含み、該デオキシリボヌクレオチド類は、デオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシシトシンーリン酸、デオキシチミジンーリン酸、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態9に記載のビーズ破碎用システム。

【0143】

11. 前記ブロッキング剤は、1種以上のリボヌクレオチド類を含み、該リボヌクレオチド類は、アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、シトシンーリン酸、チミジンーリン酸、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態9または10に記載のビーズ破碎用システム。

【0144】

12. 前記ブロッキング剤は、1種以上のオリゴヌクレオチド類を含み、該オリゴヌクレオチド類は、リボヌクレオチド類、デオキシリボヌクレオチド類、ヌクレオチド類似体、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態2から11までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0145】

13. 前記ブロッキング剤は、1種以上のオリゴヌクレオチド類を含み、そのそれぞれは、独立して、2~120ヌクレオチド長、2~100ヌクレオチド長、2~50ヌクレオチド長、2~25ヌクレオチド長、5~40ヌクレオチド長、2~15ヌクレオチド長、8~120ヌクレオチド長、8~80ヌクレオチド長、10~100ヌクレオチド長、15~50ヌクレオチド長、50~100ヌクレオチド長、または100~120ヌクレオチド長である、実施形態12に記載のビーズ破碎用システム。

【0146】

14. 前記オリゴヌクレオチド類は、DNAおよび／またはRNAを含む、実施形態12または13に記載のビーズ破碎用システム。

10

20

30

40

50

【0147】

15. 前記試料チューブの内部空洞は、ブロッキング剤の層または被膜で少なくとも部分的に被覆されている、実施形態1から14までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0148】

16. 前記ビーズの幾らかまたはすべては、ブロッキング剤の層または被膜で部分的にまたは完全に被覆されている、実施形態1から15までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0149】

17. 前記ブロッキング剤を含有する粉末を含む、実施形態1から16までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

10

【0150】

18. 前記粉末は、前記ブロッキング剤を含有する凍結乾燥された粉末である、実施形態17に記載のビーズ破碎用システム。

【0151】

19. 前記ビーズは、細菌、酵母、糸状菌、孢子、植物細胞、または動物細胞を溶解するように適合されている、実施形態1から18までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0152】

20. 前記ビーズは、鉱物ビーズ、セラミックビーズ、ガラスビーズ、金属ビーズ、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態1から19までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

20

【0153】

21. 前記ビーズは、ジルコニウムビーズ、ジルコンビーズ、ジルコニアビーズ、石英ビーズ、酸化アルミニウムビーズ、炭化ケイ素ビーズ、セラミックビーズ、二酸化ケイ素ガラスビーズ、ステンレス鋼ビーズ、クロム鋼ビーズ、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態20に記載のビーズ破碎用システム。

【0154】

22. 前記ビーズは、50 μm ～3 mmの範囲の直径を有する、実施形態1から21までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

30

【0155】

23. 前記試料チューブの内部空洞内に位置するエチレンジアミン四酢酸（EDTA）および／またはそのナトリウム塩をさらに含む、実施形態1から22までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0156】

24. 前記試料チューブの内部空洞内に位置するクレアチニンをさらに含む、実施形態1から22までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システム。

【0157】

25. 液体試料中に含まれる細胞を溶解する（例えば、該細胞から核酸を抽出するための）方法であって、該液体試料を、実施形態1から24までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システムの試料チューブ内で、細胞を溶解させるのに十分な条件下で攪拌することを含む、方法。

40

【0158】

26. 外因性ブロッキング剤を含有する液体試料中に含まれる細胞を溶解する（例えば、該細胞から核酸を抽出するための）方法であって、該液体試料を、ビーズ破碎用チューブおよびビーズを含むビーズ破碎用システム内で、溶解バッファーおよび／または添加剤の不存在下に攪拌することを含む、方法。

【0159】

27. 溶解バッファーと一緒にインキュベートされていない液体試料中に含まれる細胞を溶解する（例えば、該細胞から核酸を抽出するための）方法であって、該液体試料お

50

よび1種以上のブロッキング剤を、ビーズ破碎用チューブおよびビーズを含むビーズ破碎用システム内で攪拌することを含み、任意に、前記1種以上のブロッキング剤は、実施形態1から24までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ中に存在する、方法。

【0160】

28. 前記ビーズは、細菌、酵母、糸状菌、孢子、植物細胞、または動物細胞を溶解するように適合されている、実施形態26または27に記載の方法。

【0161】

29. 前記ビーズは、鉍物ビーズ、セラミックビーズ、ガラスビーズ、金属ビーズ、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態26から28までのいずれか1つに記載の方法。

【0162】

30. 前記ビーズは、ジルコニウムビーズ、ジルコンビーズ、ジルコニアビーズ、石英ビーズ、酸化アルミニウムビーズ、炭化ケイ素ビーズ、セラミックビーズ、二酸化ケイ素ガラスビーズ、ステンレス鋼ビーズ、クロム鋼ビーズ、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態29に記載の方法。

【0163】

31. 前記ビーズは、50 μm ~3 mmの範囲の直径を有する、実施形態26から30までのいずれか1つに記載の方法。

【0164】

32. 前記液体試料を攪拌する前に、該液体試料を前記試料チューブ内に入れる工程をさらに含む、実施形態25または26に記載の方法。

【0165】

33. 前記攪拌は、前記ビーズ破碎用システムを振動動作に供することを含む、実施形態25または32に記載の方法。

【0166】

34. 前記試料は、生物学的試料、環境試料、または食料品である、実施形態25から33までのいずれか1つに記載の方法。

【0167】

35. 前記試料は、血液、血清、唾液、尿、胃液、消化液、涙液、糞便、精液、膿液、間質液、腫瘍組織由来の流体、眼液、汗、粘液、耳垢、油、腺分泌物、息、髄液、毛髪、爪、皮膚細胞、血漿、鼻腔スワブから得られた流体、鼻咽喉洗浄から得られた流体、脳脊髄液、組織試料、咽喉スワブから得られた流体もしくは組織、創傷スワブから得られた流体もしくは組織、生検組織、胎盤液、羊水、腹膜透析液、臍帯血、リンパ液、体腔液、喀痰、膿、微生物叢、胎便、乳汁、または前記のいずれかから処理、抽出もしくは分別された試料から選択される生物学的試料である、実施形態34に記載の方法。

【0168】

36. 前記生物学的試料は、尿、喀痰、または尿から処理、抽出もしくは分別された試料である、実施形態35に記載の方法。

【0169】

37. 前記生物学的試料は、喀痰、または喀痰から処理、抽出もしくは分別された試料である、実施形態35に記載の方法。

【0170】

38. 前記生物学的試料は、創傷スワブ、または創傷スワブから処理、抽出もしくは分別された試料である、実施形態35に記載の方法。

【0171】

39. 前記生物学的試料は、血液、または血液から処理、抽出もしくは分別された試料である、実施形態35に記載の方法。

【0172】

40. 前記生物学的試料は、腹膜透析液、または腹膜透析液から処理、抽出もしくは分別された試料である、実施形態35に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0173】

41. 前記試料は、土壌、地下水、地表水、廃水、または前記のいずれかから処理、抽出もしくは分別された試料である、実施形態34に記載の方法。

【0174】

42. 前記細胞は、1種以上の病原体を含む、実施形態25から41までのいずれか1つに記載の方法。

【0175】

43. 前記1種以上の病原体は、1種以上の細菌性病原体、ウイルス性病原体、真菌性病原体、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態42に記載の方法。

【0176】

44. 前記1種以上の病原体は、マイコバクテリウム・ツベルクロシス、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクロシス、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・アガラクチア、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ、モラキセラ・カタラーリス、クレブシエラ・ニューモニエ、エシェリキア・コリ、シュードモナス・アエルギノーサ、アシネトバクター属種、ボルデテラ・ペルツシス、ネイセリア・メニンジチディス、バシラス・アントラシス、ノカルディア属種、アクチノマイセス属種、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア・ニューモニア、レジオネラ属種、ニューモシスティス・イロベチイ、インフルエンザA型ウイルス、サイトメガロウイルス、リノウイルス、エンテロコッカス・ファエシウム、アシネトバクター・バウマンニイ、コリネバクテリウム・アミコラツム、エンテロバクター・アエロゲネス、エンテロコッカス・ファエカリスC I 4413、セラチア・マルセッセンス、ストレプトコッカス・エクイおよびカンジダ・アルビカンスの1種以上を含む、実施形態42または43に記載の方法。

【0177】

45. 前記試料は、喀痰、または喀痰から処理、抽出もしくは分別された試料であり、かつ前記1種以上の病原体は、マイコバクテリウム・ツベルクロシス、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・アガラクチア、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ、モラキセラ・カタラーリス、クレブシエラ・ニューモニエ、エシェリキア・コリ、シュードモナス・アエルギノーサ、アシネトバクター属種、ボルデテラ・ペルツシス、ネイセリア・メニンジチディス、バシラス・アントラシス、ノカルディア属種、アクチノマイセス属種、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア・ニューモニア、レジオネラ属種、ニューモシスティス・イロベチイ、インフルエンザA型ウイルス、サイトメガロウイルス、およびリノウイルスの1種以上を含む、実施形態42に記載の方法。

【0178】

46. 前記1種以上の病原体は、マイコバクテリウム・ツベルクロシスを含む、実施形態45に記載の方法。

【0179】

47. 前記試料は、乳汁もしくは精液、または乳汁、土壌、糞便もしくは精液から処理、抽出もしくは分別された試料であり、かつ前記1種以上の病原体は、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクロシスを含む、実施形態42に記載の方法。

【0180】

48. 前記試料は、創傷スワブ、または創傷スワブから処理、抽出もしくは分別された試料であり、かつ前記1種以上の病原体は、E. コリ、P. アエルギノーサ、E. ファエシウム、S. アウレウス、K. ニューモニエ、A. バウマンニイ、C. アミコラツム、E. アエロゲネス、E. ファエカリスC I 4413、S. マルセッセンス、S. エクイ、およびC. アルビカンスの1種以上を含む、実施形態42に記載の方法。

【0181】

49. 前記試料は、腹膜透析液、または腹膜透析液から処理、抽出もしくは分別された試料であり、かつ前記1種以上の病原体は、S. アウレウスおよび／またはP. アエルギノーサを含む、実施形態42に記載の方法。

【0182】

50. 前記液体試料は、多数の種からの細胞を含む、実施形態25から49までのいずれか1つに記載の方法。

【0183】

51. 前記液体試料を、細胞溶解後に試料チューブから回収することをさらに含む、実施形態25から50までのいずれか1つに記載の方法。

【0184】

52. 前記核酸を、その回収された液体試料から精製することをさらに含む、実施形態51に記載の方法。

【0185】

53. 前記核酸の1種以上を分析することをさらに含む、実施形態25から52までのいずれか1つに記載の方法。

【0186】

54. 前記分析は、マイクロアレイを使用するか、または前記1種以上の核酸をシーケンシングすることにより行われる、実施形態53に記載の方法。

【0187】

55. 標的配列は、前記分析の実施前に増幅される、実施形態53または54に記載の方法。

【0188】

56. 前記標的配列はPCRにより増幅される、実施形態55に記載の方法。

【0189】

57. 前記核酸はDNAを含む、実施形態25から56までのいずれか1つに記載の方法。

【0190】

58. 前記核酸はRNAを含む、実施形態25から57までのいずれか1つに記載の方法。

【0191】

59. 液体試料中に含まれる細胞を溶解する（例えば、該細胞から核酸を抽出するための）キットであって、実施形態1から24までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システムと、任意に（i）液体試料を調製するための1種以上の構成要素、（ii）前記核酸の1種以上を増幅するための1種以上のオリゴヌクレオチド類、（iii）前記核酸の1種以上を検出するための1種以上のプローブ、または（iv）（i）～（iii）の任意の組み合わせを含む、キット。

【0192】

60. 前記液体試料を調製するための1種以上の構成要素を含み、かつ該液体試料を調製するための1種以上の構成要素は、水、生理食塩水、バッファー、フィルター、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態59に記載のキット。

【0193】

61. 前記核酸の1種以上を増幅するための1種以上のオリゴヌクレオチド類を含む、実施形態59または60に記載のキット。

【0194】

62. 前記核酸の1種以上を検出するための1種以上のプローブを含む、実施形態59から61までのいずれか1つに記載のキット。

【0195】

63. 試料チューブ、ビーズ、および乾燥したブロッキング試薬を含む、実施形態1から24までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用システムを得るためのキット。

【0196】

10

20

30

40

50

64. 前記ビーズおよび／または乾燥したブロッキング試薬は、試料チューブとは別にキット中に含まれている、実施形態63に記載のキット。

【0197】

65. 前記ビーズおよび／または乾燥したブロッキング試薬は、試料チューブ内でキット中に含まれている、実施形態63に記載のキット。

【0198】

66. 前記ビーズ破砕用システムを使用して核酸抽出のための細胞を含む試料を調製するための1種以上の構成要素、1種以上の核酸を増幅するための1種以上のオリゴヌクレオチド類、1種以上の核酸を検出するための1種以上のプローブ、またはそれらの組み合わせをさらに含む、実施形態63から65までのいずれか1つに記載のキット。

10

【0199】

67. ビーズ破砕用チューブ(1)であって、内部空洞(3)を有する容器メンバ(2)と、該内部空洞(3)中に微生物を含む可能性がある試料流体(5)を充填するための開口部(4)と、該開口部(4)を閉じるためのクロージャ(6)とを備え、該内部空洞(3)中に複数の巨視的な鉋物粒子(7)が配置されており、該粒子(7)は、前記試料流体(5)が前記内部空洞(3)中に充填されて、ビーズ破砕用チューブ(1)が機械的振動にかけられたときに該試料流体(5)中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊するように適合されている試料チューブを含むビーズ破砕用チューブ(1)において、尿素および／または少なくとも1種のグアニジン塩および／または少なくとも1種の界面活性剤を含むブロッキング剤(8)は、前記試料チューブの内部空洞(3)中に乾燥された形で配置されていることを特徴とするビーズ破砕用チューブ(1)。

20

【0200】

68. 前記ブロッキング剤(8)は、デオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシシトシンーリン酸、デオキシチミジンーリン酸、またはこれらのーリン酸エステル of の少なくとも2種の混合物を含む、実施形態67に記載のビーズ破砕用チューブ(1)。

【0201】

69. 前記ブロッキング剤(8)は、アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、シトシンーリン酸、チミジンーリン酸、またはこれらのーリン酸エステルの少なくとも2種の混合物を含む、実施形態67または68に記載のビーズ破砕用チューブ(1)。

30

【0202】

70. 前記ブロッキング剤(8)中に含まれる前記少なくとも1種のーリン酸エステルは、少なくとも2個から多くても120個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、実施形態67から69までのいずれか1つに記載のビーズ破砕用チューブ(1)。

【0203】

71. 前記少なくとも1種の界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウロイル硫酸サルコシン酸ナトリウム、および／またはポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含むことを特徴とする、実施形態67から70までのいずれか1つに記載のビーズ破砕用チューブ(1)。

40

【0204】

72. 前記乾燥されたブロッキング剤は、前記容器メンバ(2)の内部空洞(3)中に、好ましくは粉末化された形で緩く配置されていることを特徴とする、実施形態67から71までのいずれか1つに記載のビーズ破砕用チューブ(1)。

【0205】

73. 前記容器メンバ(2)の内壁は、ブロッキング剤の層または被膜で少なくとも部分的に被覆されていることを特徴とする、実施形態67から72までのいずれか1つに記載のビーズ破砕用チューブ(1)。

【0206】

74. 前記試料チューブの内部空洞(3)中にエチレンジアミン四酢酸(EDTA)

50

および／またはそのナトリウム塩が配置されていることを特徴とする、実施形態 67 から 73 までのいずれか 1 つに記載のビーズ破碎用チューブ (1)。

【0207】

75. 前記試料チューブの内部空洞 (3) 中にクレアチニンが配置されていることを特徴とする、実施形態 67 から 74 までのいずれか 1 つに記載のビーズ破碎用チューブ (1)。

【0208】

76. 微生物からデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を抽出するための、実施形態 67 から 75 までのいずれか 1 つに記載のビーズ破碎用チューブ (1) の使用。

【0209】

77. 微生物からデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を抽出するための方法であって、前記微生物を含むと推定される試料流体 (5) を準備し、互いに相対的に移動可能な複数の鉋物粒子 (7) を該試料流体 (5) 中に導入し、そして該粒子 (7) を含んだ試料流体 (5) を、該粒子 (7) が該試料流体 (5) 中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊することが可能であるように振動させる前記方法において、尿素および／または少なくとも 1 種のグアニジン塩および／または少なくとも 1 種の界面活性剤を含むブロッキング剤 (8) は、前記試料流体 (5) 中に、前記粒子 (7) が振動される前に、および／またはその間に導入されることを特徴とする、方法。

【0210】

78. 尿素の量は、前記試料流体 (5) 中に溶解される尿素の濃度が 10 グラム／リットルから 100 グラム／リットルの間の、特に 20 グラム／リットルから 50 グラム／リットルの間の、好ましくは 25 グラム／リットルから 35 グラム／リットルの間の範囲であるように、前記試料流体 (5) の量と合わされることを特徴とする、実施形態 77 に記載の方法。

【0211】

79. 前記粒子 (7) が振動される前に、および／またはその間に、以下の一リン酸エステル：デオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシシトシンーリン酸、デオキシチミジンーリン酸の少なくとも 1 種が前記試料流体 (5) 中に導入されることを特徴とする、実施形態 77 または 78 に記載の方法。

【0212】

80. 前記粒子 (7) が振動される前に、および／またはその間に、以下の一リン酸エステル：アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、シトシンーリン酸、チミジンーリン酸の少なくとも 1 種が前記試料流体 (5) 中に導入されることを特徴とする、実施形態 77 から 79 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0213】

81. 前記粒子 (7) が振動される前に、および／またはその間に、クレアチニンならびに／またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) および／もしくはそのナトリウム塩が前記試料流体 (5) 中に導入されることを特徴とする、実施形態 77 から 80 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0214】

9. 参考文献の引用

本出願で引用されるすべての刊行物、特許、特許出願、およびその他の文献は、それぞれの個々の刊行物、特許、特許出願、またはその他の文献が、すべての目的のために参照により援用されると個々に示されているのと同じ程度で、参照によりその全体がすべての目的のために援用される。援用された参考文献の 1 つ以上の教示と本開示との間に不一致がある場合においては、本明細書の教示が意図される。

【0215】

9.1 欧州特許第 16153540 号明細書の援用

本発明は、内部空洞を有する容器メンバと、該内部空洞中に微生物を含む試料流体を充填するための開口部と、該開口部を閉じるためのクロージャとを備える試料チューブを含

10

20

30

40

50

むビーズ破碎用チューブであって、該内部空洞中に複数の巨視的な鉋物粒子が配置されており、該粒子は、試料流体が前記内部空洞中に充填されて、ビーズ破碎用チューブが機械的振動にかけられたときに該試料流体中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊するように適合されている、ビーズ破碎用チューブに関する。本発明はさらに、微生物からデオキシリボ核酸（DNA）および／またはリボ核酸（RNA）を抽出するための方法であって、前記微生物を含むと推定される試料流体を準備し、互いに相対的に移動可能な複数の鉋物粒子を該試料流体中に導入し、そして該粒子を含んだ試料流体を、該粒子が試料流体中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊することが可能であるように振動させる、方法に関する。

【0216】

感染性疾患の遺伝子検査および診断は、臨床微生物学の分野において重要な役割を果たす。培養ベースの方法論に固有の偏りおよび制限を克服するために、試料に含まれる微生物を検出するために遺伝子検査がますます使用されるようになってきている。そのような遺伝子検査を実施し得るためには、前記DNAおよび／またはRNAは、まず最初に微生物からできる限り高い濃度で抽出する必要がある。Zhongtang Yuらにより“Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples”, BioTechniques, Vol. 36, No. 5, p. 808-812 (May 2004)において提案された方法においては、ウシの胃腸系から採取された、微生物、すなわち細菌を含むと推定される0.25gの試料流体が準備される。前記試料流体は、まず最初に500mMの塩化ナトリウム、50mMのトリス塩酸（pH8.0）、50mMのエチレンジアミン四酢酸、および4%のドデシル硫酸ナトリウムを含む1mLのバッファーと混合される。さらに、0.4gの滅菌ジルコンビーズが、その試料流体中に導入される。引き続き、こうして得られた混合物は、該ビーズが微生物の細胞壁を破壊するようにMini-Bead Beater（商標）により試料チューブ中で3分間にわたり振動される。この過程において、細胞内に含まれるDNAが放出される。前記バッファーは、試料流体中に含まれるDNAアーゼによる分解からDNAを保護する役割も果たす。

【0217】

ビーズ破碎を実施した後に、酢酸アンモニウムによる沈殿によって試料から不純物が除去される。核酸はイソプロパノールでの沈殿により得られる。さらなる方法工程において、該DNAは、RNAアーゼおよびプロテイナーゼKで順次に消化され、引き続きカラムにより精製される。

【0218】

該方法は、それが比較的複雑であるという欠点を有する。試料流体はバッファーの添加により希釈されるので、試料中のDNA濃度は低下する。したがって、該方法は、限られた検出精度および感度しか可能にしない。

【0219】

したがって、1つの課題は、試料流体中に含まれる微生物からデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を迅速に、かつ検出に十分な量で抽出可能にする最初に述べた種類のビーズ破碎用チューブおよび方法を提供することである。

【0220】

該ビーズ破碎用チューブに関しては、この課題は、以下に記載される実施形態1'の特徴により解決される。それらの特徴は、尿素および／または少なくとも1種のグアニジン塩および／または少なくとも1種の界面活性剤を含むブロッキング試薬が、乾燥された形で試料チューブの内部空洞中に配置されていることを提供する。

【0221】

驚くべきことに、そのようなビーズ破碎用チューブを試料流体中に含まれる微生物からのデオキシリボ核酸（DNA）および／またはリボ核酸（RNA）の抽出のために使用した場合に、ブロッキング試薬を含まない相応のビーズ破碎用チューブを使用した場合よりも大きいDNAおよび／またはRNAの抽出率を達成することができることが判明した。

該ブロッキング試薬は、試料チューブの内部空洞中に含まれる鉱物粒子の結合部位をブロッキングし、したがって微生物から抽出されるDNAおよび／またはRNAがこれらの結合部位に結合することを妨げると推定される。前記試料流体から粒子を除去した後に、それは、例えば該粒子が試料チューブの底部に沈殿し、かつその粒子の上に位置する試料流体がピペット等により試料チューブから取り出されることで行われ得るが、その際、該試料チューブ中に含まれる相応して高い割合のDNAおよび／またはRNAが試料流体中に生ずることとなる。前記少なくとも1種の界面活性剤は、該試料チューブの内壁にある結合部位をブロッキングし、そしてリボ核酸（RNA）および／またはデオキシリボ核酸（DNA）がこれらの結合部位に結合することを妨げる。これはまた、DNAおよび／またはRNAの高い抽出率を可能にすることとなる。

10

【0222】

前記ブロッキング試薬の存在のため、ビーズ破碎の前に試料流体を抽出バッファーで希釈することを省くことさえも可能である。該試料流体は、この場合に一般に抽出バッファーよりもかなり低い濃度で試料流体中に存在し得るブロッキング試薬でのみ希釈される。

【0223】

鉱物粒子は、結晶性粒子、セラミック粒子、および／またはガラスである。前記粒子は、試料流体中に配置されたときに互いに相対的に移動可能なビーズを含む。該粒子は、好ましくは石英粒子および／またはジルコン粒子を含む。そのような粒子は、大量に安く入手することができ、デオキシリボ核酸またはリボ核酸に対して化学的に不活性である。石英および／または粒子は、比較的高い比重を有し、硬質であり、かつ鋭利なエッジを有し得る。したがって、それらは、機械的振動にさらされたときに細胞膜を開くために非常に適している。

20

【0224】

該乾燥されたブロッキング試薬は、長期安定性であり、すなわち該ビーズ破碎用チューブは、該ブロッキング試薬のブロッキング効果を大幅に減少させることなく、より長期間にわたって問題なく輸送および貯蔵することができる。その乾燥されたブロッキング試薬は、容器メンバの内部空洞中に緩く配置されていてよく、かつ／または該容器メンバの内壁は、ブロッキング試薬の層もしくは被膜で被覆されていてよい。該ブロッキング試薬は、好ましくは凍結乾燥されている。

【0225】

本発明によるビーズ破碎用チューブにより、試料流体中に含まれる微生物から、DNAおよび／またはRNAを自体公知の方法で微生物学的に直接的に調査するのに十分な濃度でDNAおよび／またはRNAを抽出することが可能である。これは、特に、試料流体を、DNAおよび／もしくはRNAならびに／またはそこに含まれるDNAおよび／もしくはRNA成分に特異的に結合する、表面上に固定された受容体と接触させることにより行うことができる。DNAおよび／もしくはRNAならびに／またはDNAおよび／もしくはRNA成分の該受容体への結合は、自体公知の様式で、マーカー、特に光学的マーカー、例えば蛍光色素により検出し、必要に応じて定量することができる。

30

【0226】

前記少なくとも1種のグアニジン塩は、好ましくはイソシアン酸グアニジンおよび／または塩化グアニジンを含む。

40

【0227】

本発明の好ましい実施形態においては、前記ブロッキング試薬は、デオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシシトシンーリン酸、デオキシチミジンーリン酸、またはこれらの一リン酸エステルの少なくとも2種の混合物を含む。これらの一リン酸エステルは、デオキシリボ核酸（DNA）が結合し得る粒子の結合部位をブロッキングし得る。

【0228】

本発明の好ましい実施形態においては、前記ブロッキング試薬は、アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、シトシンーリン酸、チミジンーリン酸、またはこれらの一リン酸

50

エステル of 少なくとも 2 種の混合物を含む。これらの一リン酸エステルは、リボ核酸（RNA）が結合し得る粒子の結合部位をブロッキングし得る。リボ核酸は、デオキシリボ核酸よりも分解しやすく、したがって試料調製のためにはより高い適性を有する。

【0229】

前記ブロッキング試薬中に含まれる少なくとも 1 種の一リン酸エステルが、少なくとも 2 個から多くても 120 個のオリゴヌクレオチド、例えば RNA および／または DNA ヌクレオチドであることが有利である。前記少なくとも 1 種の一リン酸エステルは、その際、合成により製造することが容易である。

【0230】

本発明の適切な実施形態においては、前記少なくとも 1 種の界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウロイル硫酸サルコシン酸ナトリウム、および／またはポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含む。ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートは、ポリソルベート 20 としても知られている。これは、該試料チューブの内壁にある結合部位をブロッキングし、そしてリボ核酸および／またはデオキシリボ核酸がこれらの結合部位に結合することを妨げる。

10

【0231】

本発明の有利な実施形態においては、前記乾燥されたブロッキング試薬は、前記容器メンバの内部空洞中に、好ましくは粉末化された形で緩く配置されている。該粉末は、前記粒子と混合され得る。

【0232】

本発明の好ましい実施形態においては、前記容器メンバの内壁は、ブロッキング試薬の層または被膜で少なくとも部分的に被覆されている。該ブロッキング試薬は、その後に該容器メンバと係留結合される。

20

【0233】

クレアチニンが前記試料チューブの内部空洞中に配置されることが有利である。前記試料チューブの内部空洞中のクレアチニンの存在は、試料流体中に含まれるデオキシリボ核酸およびリボ核酸の分解を妨げる。さらに、クレアチニンは、DNA および／または RNA が、粒子および／または試料チューブの内壁に非特異的に結合することを防ぐ。これは、ビーズ破碎用チューブにより試料流体中に含まれる微生物から DNA および／または RNA を抽出する場合に、より高い収率を可能にする。

30

【0234】

本発明の適切な実施形態においては、エチレンジアミン四酢酸および／またはそのナトリウム塩は、前記試料チューブの内部空洞中に配置されている。

【0235】

エチレンジアミン四酢酸は、カルシウム、マグネシウムおよび鉄を結合するため、デオキシリボヌクレアーゼおよびリボヌクレアーゼを失活させる。この措置はまた、試料流体中に含まれるデオキシリボ核酸およびリボ核酸の分解を妨げる。こうして、より高い検出感度および測定結果のより高い再現性が、本発明によるビーズ破碎用チューブにより微生物から抽出されたデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸の調査の間に可能となる。

【0236】

前記方法に関しては、上述の課題は、実施形態 11' の特徴により解決される。それらの特徴は、尿素、少なくとも 1 種のグアニジン塩および／または少なくとも 1 種の界面活性剤を含むブロッキング試薬が、粒子が振動される前におよび／またはその間に試料流体中に導入されることを提供する。

40

【0237】

本発明の好ましい実施形態においては、尿素有量は、前記試料流体中に溶解される尿素有濃度が

- 10 グラム／リットルから 100 グラム／リットルの間の、特に
- 20 グラム／リットルから 50 グラム／リットルの間の、好ましくは
- 25 グラム／リットルから 35 グラム／リットルの間の

50

範囲であるように、前記試料流体の量と合わされる。

【0238】

これは、デオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を抽出する場合に高収率を可能にする。

【0239】

本発明の好ましい実施形態においては、界面活性剤の量は、前記試料流体中に溶解される界面活性剤の濃度が、1mg／リットルから50mg／リットルの間であるように、前記試料流体の量と合わされる。

【0240】

以下に、本発明の実施形態を、図面により詳細に説明する。

10

【0241】

図1～3における1で示されるビーズ破碎用チューブは、内部空洞3および閉鎖可能な開口部4を有する容器メンバ2を備える試料チューブを含む。試料チューブは、好ましくはプラスチックで作られているが、それ以外の生物学的に不活性な材料で作られてもよい。

【0242】

微生物を含むと推定される試料流体5は、開口部4を通じて容器メンバ2の内部空洞3中に充填され、そこから取り出され得る。開口部4を閉じるために、試料チューブは、開放位置および閉鎖位置に送られるように適合されたクロージャ6を有し、そのクロージャ6は、開口部4の境界となる容器メンバ2の外壁の縁部領域に設けられた外側ねじ山と螺合されるように適合された内側ねじ山を含むクロージャキャップとして設計されている。

20

【0243】

内部空洞3において、2グラムの二酸化ケイ素がさらに配置されており、それらは複数の粒子7を含み、その最大寸法は、平均で約100μmである。該粒子7は、互いに相対的に移動可能である緩いバルクの形態で利用可能である。二酸化ケイ素の粒子7の代わりに、またはそれに加えて、適切なサイズのジルコニウム粒子が内部空洞3中に含まれていてもよい。

【0244】

該粒子7は、試料流体5が内部空洞3中に充填され、該ビーズ破碎用チューブが機械的振動、例えば超音波振動にかけられたときに試料流体5中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊する働きがある。それらの振動は、図面に詳細に図解されていない振動発生器で発生され得、ビーズ破碎用チューブ1に伝えられ得る。そのような振動発生器は、MP Biomedicals社によりMP Bio bead beaterの名称で市販されている。細胞壁の破壊のため、微生物中に含まれるデオキシリボ核酸は、試料流体5中に放出および溶解される。

30

【0245】

前記チューブ1の内部空洞3において、凍結乾燥されたブロッキング試薬8も配置されており、その試薬は以下の通りに調製される：

5ミリグラムのエチレンジアミン四酢酸の四ナトリウム塩（Na₄-EDTA）、25ミリグラムのアデノシンーリン酸、25ミリグラムのグアノシンーリン酸、25ミリグラムのシトシンーリン酸、25ミリグラムのチミジンーリン酸、および15mgのラウロイルサルコシン酸ナトリウムが準備される。これらの試薬を安定にするために、それらは、TEバッファー中で5倍濃度で溶解される。可溶性の理由のため、エチレンジアミン四酢酸の四ナトリウム塩は、これが水中によく溶けるため使用される。その際、1ミリリットルは、250ミリグラムの尿素、25ミリグラムのエチレンジアミン四酢酸の四ナトリウム塩、125ミリグラムのアデノシンーリン酸、125ミリグラムのグアノシンーリン酸、125ミリグラムのシトシンーリン酸、125ミリグラムのチミジンーリン酸、および75mgのラウロイルサルコシン酸ナトリウムからなる。

40

【0246】

この溶液200マイクロリットルを容器メンバ2中に入れ、真空により乾燥させる。乾燥されたブロッキング試薬8は、少なくとも1年間にわたり安定である。図4に見られる

50

ように、ブロッキング試薬 8 は、容器メンバ 2 の内壁上に、開口部 4 から間隔が離れた内部空洞 3 の下方部分領域において薄層として適用される。

【0247】

実施形態：

6 ミリリットルの尿および腹膜透析液が 0.4 マイクロメートルの滅菌フィルターを通して濾過され、次いで培養室において増殖された 1 ミリリットル当たり 10000 コロニー形成単位のスタフィロコッカス・アウレウスが添加される。

【0248】

本発明の方法：

2.9 ミリリットルのスパイクされた尿およびスパイクされた腹膜透析液を、前記のチューブ 1 中に移す。該チューブをスクリュキャップ 6 により密閉し、MP Bio bead beater 中に取り付け、全出力で 30 秒間にわたり作動させる。クロージャ 6 を取り外し、市販の DNA 単離装置の試料ラックに設置する。2 ミリリットルのそれぞれの試料を取り出し、次いで DNA 抽出剤を添加し (lab turbo)、そして DNA 抽出を実施する。100 マイクロリットルの DNA 抽出物が生成された。

【0249】

標準的方法：

2.9 ミリリットルのスパイクされた尿およびスパイクされた腹膜透析液を、2.0 グラムの 100 マイクロメートルのシリカ (SiO₂) ビーズを有するビーズ破碎用のチューブ中に移す。そのチューブは、ブロッキング試薬 8 を含まず、さらなる試薬は添加されない。該チューブをクロージャにより密閉し、MP Bio bead beater 中に取り付け、全出力で 30 秒間にわたり作動させる。クロージャを取り外し、市販の DNA 単離装置の試料ラックに設置する。2 ミリリットルのそれぞれの試料を取り出し、次いで DNA 抽出剤を添加し (lab turbo)、そして DNA 抽出を実施する。100 マイクロリットルの DNA 抽出物が生成された。

【0250】

抽出された DNA の検出

抽出されたスタフィロコッカス・アウレウスの DNA の量を、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応により Gillespie, G. E. et al.: "Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, and Streptococcus agalactiae by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction", J. Dairy Sci. 88:3510-3518 (2005) に従って測定する。1 マイクロリットルの抽出された DNA を、20 マイクロリットルの反応において増幅させた。標準的な方法は、尿に関して 32 のサイクル閾値を生じ、腹膜透析液に関して 38 のサイクル閾値を生じ、悪い DNA 回収が示された。

【0251】

本発明の方法は、尿に関して 31 のサイクル閾値を生じ、腹膜透析液に関して 32 のサイクル閾値を生じ、これらの条件下では腹膜透析液に関して非常に良好な回収が示された。

【0252】

本開示を、以下で具体的な実施形態により例示する。

【0253】

1'. ビーズ破碎用チューブ (1) であって、内部空洞 (3) を有する容器メンバ (2) と、該内部空洞 (3) 中に微生物を含む可能性がある試料流体 (5) を充填するための開口部 (4) と、該開口部 (4) を閉じるためのクロージャ (6) とを備え、該内部空洞 (3) 中に複数の巨視的な鉤物粒子 (7) が配置されており、該粒子 (7) は、前記試料流体 (5) が前記内部空洞 (3) 中に充填されて、ビーズ破碎用チューブ (1) が機械的振動にかけられたときに該試料流体 (5) 中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊するように適合されている試料チューブを含むビーズ破碎用チューブ (1) において、

- － 尿素および／または
- － 少なくとも1種のグアニジン塩および／または
- － 少なくとも1種の界面活性剤

を含むブロッキング試薬（8）は、前記試料チューブの内部空洞（3）中に乾燥された形で配置されていることを特徴とするビーズ破碎用チューブ（1）。

【0254】

2'． 前記ブロッキング試薬（8）は、

- － デオキシアデノシンーリン酸、
- － デオキシグアノシンーリン酸、
- － デオキシシトシンーリン酸、
- － デオキシチミジンーリン酸、

またはこれらの一リン酸エステルの少なくとも2種の混合物を含む、実施形態1'に記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0255】

3'． 前記ブロッキング試薬（8）は、

- － アデノシンーリン酸、
- － グアノシンーリン酸、
- － シトシンーリン酸、
- － チミジンーリン酸、

またはこれらの一リン酸エステルの少なくとも2種の混合物を含む、実施形態1'または2'に記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0256】

4'． 前記ブロッキング試薬（8）中に含まれる前記少なくとも1種の一リン酸エステルは、少なくとも2個から多くても120個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、実施形態1'から3'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0257】

5'． 前記少なくとも1種の界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウロイル硫酸サルコシン酸ナトリウム、および／またはポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含むことを特徴とする、実施形態1'から4'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0258】

6'． 前記乾燥されたブロッキング試薬は、前記容器メンバ（2）の内部空洞（3）中に、好ましくは粉末化された形で緩く配置されていることを特徴とする、実施形態1'から5'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0259】

7'． 前記容器メンバ（2）の内壁は、ブロッキング試薬の層または被膜で少なくとも部分的に被覆されていることを特徴とする、実施形態1'から6'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0260】

8'． 前記試料チューブの内部空洞（3）中にエチレンジアミン四酢酸および／またはそのナトリウム塩が配置されていることを特徴とする、実施形態1'から7'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0261】

9'． 前記試料チューブの内部空洞（3）中にクレアチニンが配置されていることを特徴とする、実施形態1'から8'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）。

【0262】

10'． 微生物からデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を抽出するための、実施形態1'から9'までのいずれか1つに記載のビーズ破碎用チューブ（1）の使用。

【0263】

10

20

30

40

50

11' . 微生物からデオキシリボ核酸および／またはリボ核酸を抽出するための方法であって、前記微生物を含むと推定される試料流体(5)を準備し、互いに相対的に移動可能な複数の鉱物粒子(7)を該試料流体(5)中に導入し、そして該粒子(7)を含んだ試料流体(5)を、該粒子(7)が該試料流体(5)中に含まれる微生物の細胞壁を機械的に破壊することが可能であるように振動させる前記方法において、

- － 尿素および／または
- － 少なくとも1種のグアニジン塩および／または
- － 少なくとも1種の界面活性剤

を含むブロッキング試薬(8)は、前記試料流体(5)中に、前記粒子(7)が振動される前に、および／またはその間に導入されることを特徴とする、方法。

10

【0264】

12' . 尿素的量は、前記試料流体(5)中に溶解される尿素的の濃度が

- － 10グラム／リットルから100グラム／リットルの間の、特に
- － 20グラム／リットルから50グラム／リットルの間の、好ましくは
- － 25グラム／リットルから35グラム／リットルの間の

範囲であるように、前記試料流体(5)の量と合わされることを特徴とする、実施形態11'に記載の方法。

【0265】

13' . 前記粒子(7)が振動される前に、および／またはその間に、以下のーリン酸エステル：

20

- － デオキシアデノシンーリン酸、
- － デオキシグアノシンーリン酸、
- － デオキシシトシンーリン酸、
- － デオキシチミジンーリン酸

の少なくとも1種が前記試料流体(5)中に導入されることを特徴とする、実施形態11'または12'に記載の方法。

【0266】

14' . 前記粒子(7)が振動される前に、および／またはその間に、以下のーリン酸エステル：

30

- － アデノシンーリン酸、
- － グアノシンーリン酸、
- － シトシンーリン酸、
- － チミジンーリン酸

の少なくとも1種が前記試料流体(5)中に導入されることを特徴とする、実施形態11'から13'までのいずれか1つに記載の方法。

【0267】

15' . 前記粒子(7)が振動される前に、および／またはその間に、クレアチニンならびに／またはエチレンジアミン四酢酸および／もしくはそのナトリウム塩が前記試料流体(5)中に導入されることを特徴とする、実施形態11'から14'までのいずれか1つに記載の方法。

40

【符号の説明】

【0268】

1 ビーズ破碎用システム、 2 試料チューブ、 3 内部空洞、 4 開口部、 5 試料流体、 6 クロージャ、 7 ビーズ、 8 ブロッキング剤

50

【図面】

【図 1】

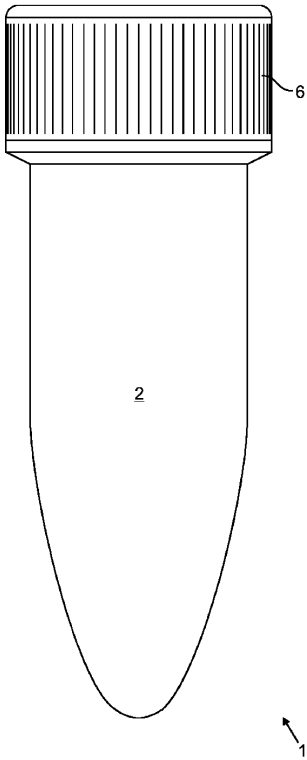


Fig. 1

【図 2】

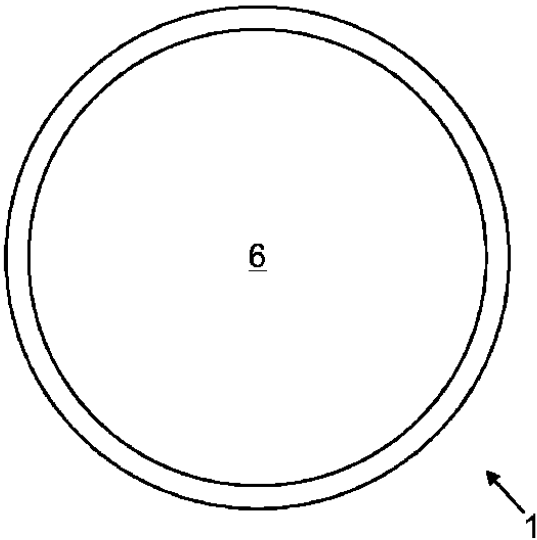


Fig. 2

【図 3】

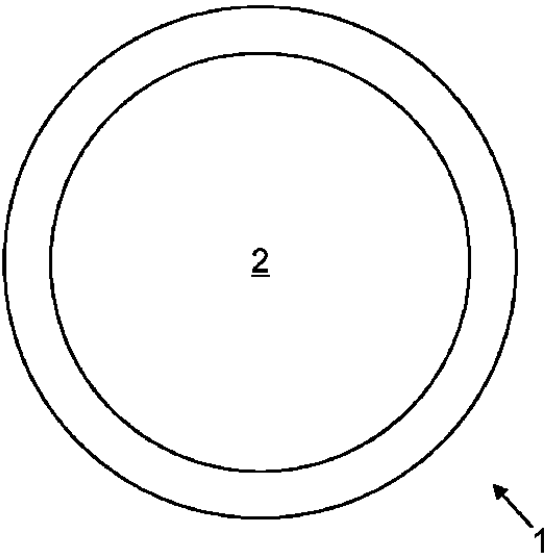


Fig. 3

【図 4】

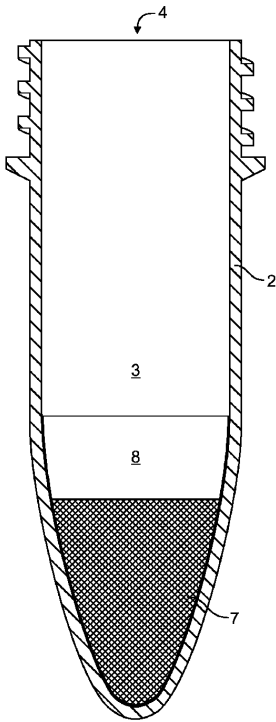


Fig. 4

【図 5】

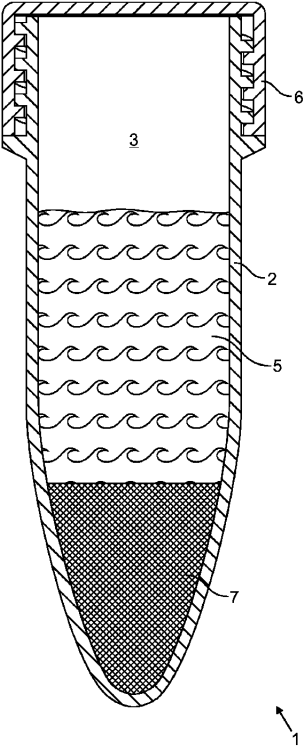
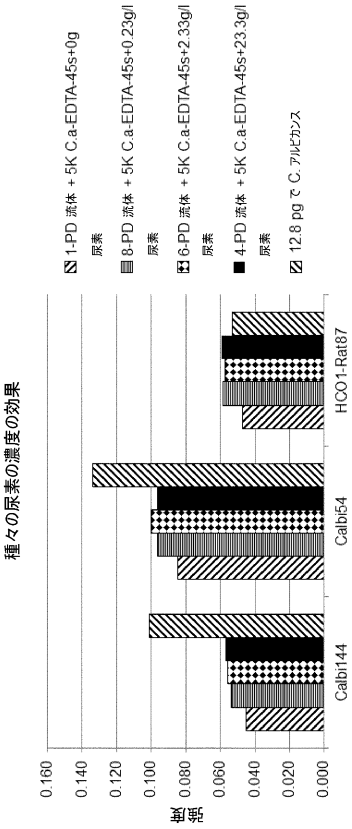
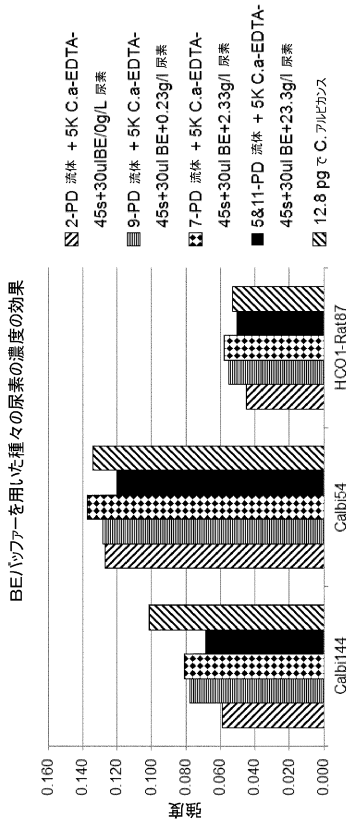


Fig. 5

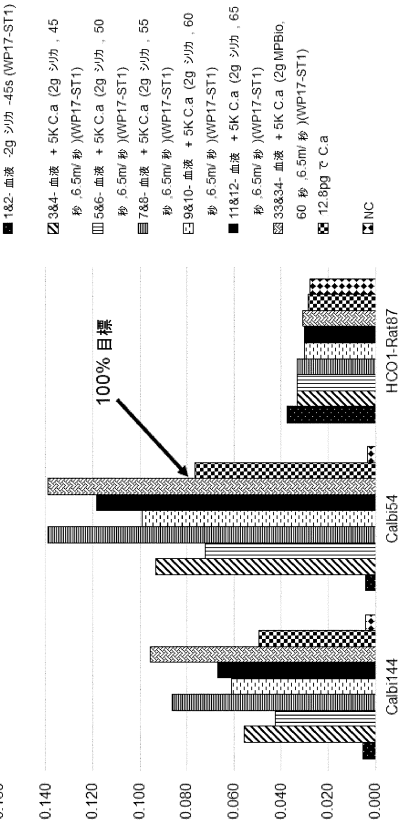
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

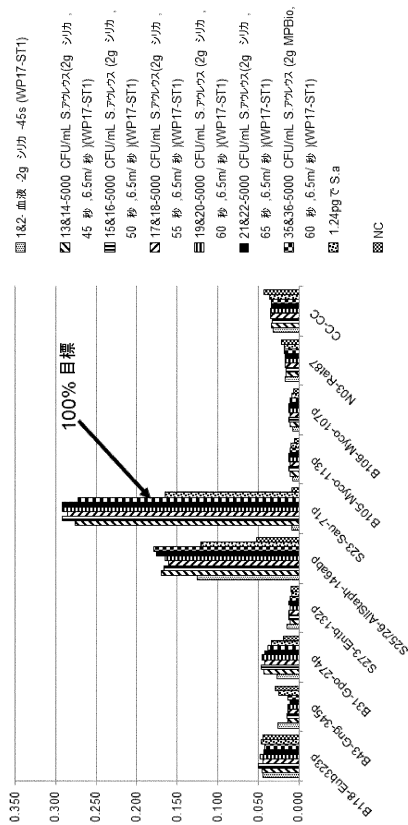
30

40

50

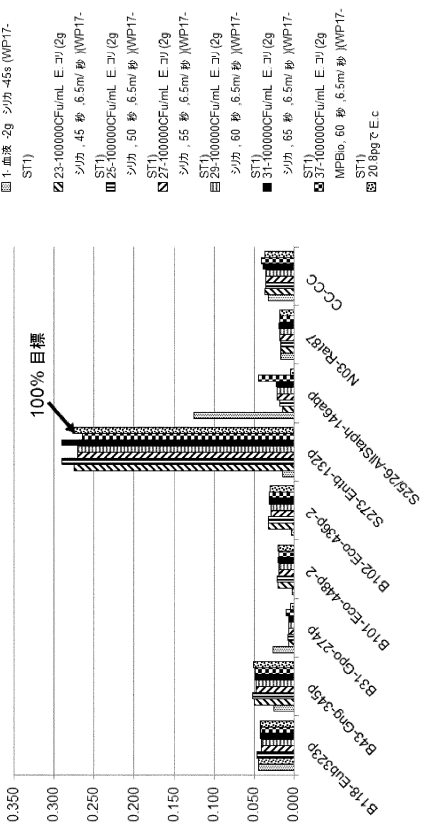
【図 9】

血液中のS. アウレウスについてのシリカビーズ破砕の時間推移



【図 10】

血液中のE. コリについてのシリカビーズ破砕の時間推移



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 Q

G 0 1 N

1/6895(2018.01)

33/48 (2006.01)

F I

C 1 2 Q

G 0 1 N

1/6895

33/48

Z

B

欧州特許庁(EP)

(74)代理人 100098501
弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403
弁理士 前川 純一

(74)代理人 100134315
弁理士 永島 秀郎

(74)代理人 100162880
弁理士 上島 類

(72)発明者 ホルガー クラップロート
ドイツ連邦共和国 バーデン・ヴュルテンベルク フライブルク・イム・ブライスガウ ケーラーシ
ュトラーセ 1 2

(72)発明者 ニコラス スミット
カナダ国 オンタリオ ウェランド マグノリア レーン 4 6

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 中村 浩

(56)参考文献 特開 2 0 0 8 - 2 9 8 6 1 5 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 2 / 0 5 0 7 8 7 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 3 0 6 0 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
C12M 1/00 - C12M 3/10
C12N 1/00 - C12N 7/08
CAP l u s / B I O S I S / E M B A S E / M E D L I N E / W P I D S (S T N)