

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6691978号  
(P6691978)

(45) 発行日 令和2年5月13日(2020.5.13)

(24) 登録日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10 1 1 0 Z
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806 Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A

請求項の数 10 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2018-560639 (P2018-560639)	(73) 特許権者	509159333
(86) (22) 出願日	平成29年5月15日 (2017.5.15)		ユニヴァーシティ オブ ウルサン フ
(65) 公表番号	特表2019-516380 (P2019-516380A)		ァウンデーション フォー インダストリ
(43) 公表日	令和1年6月20日 (2019.6.20)		ー コーオペレーション
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/005019		大韓民国 ウルサン 680-749 ナ
(87) 国際公開番号	W02017/200249		ム-グ ダエハク-ロ 93
(87) 国際公開日	平成29年11月23日 (2017.11.23)	(73) 特許権者	515267910
審査請求日	平成31年1月17日 (2019.1.17)		ジ アサン ファウンデーション
(31) 優先権主張番号	10-2016-0060310		大韓民国 05505 ソウル ソンパー
(32) 優先日	平成28年5月17日 (2016.5.17)		グ オリピック-ロ 43-ギル 88
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)	(74) 代理人	100147485
			弁理士 杉村 憲司
(31) 優先権主張番号	10-2016-0175710	(74) 代理人	230118913
(32) 優先日	平成28年12月21日 (2016.12.21)		弁護士 杉村 光嗣
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相対象物を利用した核酸抽出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象物にアミン基を導入して改質する段階（第1段階）と、

前記改質された対象物上に  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3 \text{ cells/ml}$  の細胞数を含む試料と下記化学式 2 又は化学式 3 で表される化合物とを注入し、上記試料内 RNA と前記化合物との間の複合体を形成させる段階（第2段階）と、

前記複合体が形成された対象物に溶出緩衝液を処理して RNA を抽出する段階（第3段階）と、

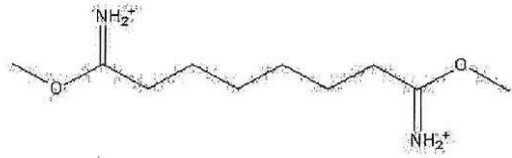
を含む RNA 抽出方法。

【化 1】



化学式 2

## 【化2】



化学式 3

## 【請求項2】

前記対象物は、薄膜装置、磁性ビーズまたはナノ粒子のうち何れか1つであることを特徴とする請求項1に記載のRNA抽出方法。

## 【請求項3】

前記改質は、対象物内にシラン化合物を流入させて改質することを特徴とする請求項1に記載のRNA抽出方法。

## 【請求項4】

前記シラン化合物は、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)であることを特徴とする請求項3に記載のRNA抽出方法。

## 【請求項5】

前記第1段階以前に対象物にプラズマ処理を通じて洗浄する段階をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載のRNA抽出方法。

## 【請求項6】

前記試料は、真核細胞、バクテリア細胞、ウイルス細胞、全血または尿由来の試料であることを特徴とする請求項1に記載のRNA抽出方法。

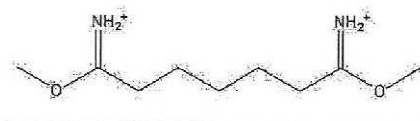
## 【請求項7】

前記第2段階で改質された対象物上にタンパク質分解酵素及び溶出緩衝液をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載のRNA抽出方法。

## 【請求項8】

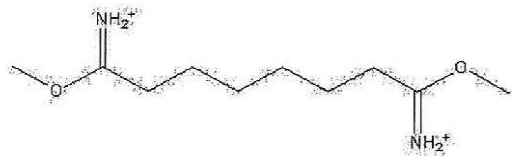
下記化学式2又は化学式3で表される化合物を有効成分として含む $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3$  cells/mlの細胞数を含む試料からのRNAの抽出効率増進用組成物。

## 【化3】



化学式 2

## 【化4】



化学式 3

## 【請求項9】

前記組成物は、タンパク質分解酵素及び溶出緩衝液をさらに含むことを特徴とする請求項8に記載のRNAの抽出効率増進用組成物。

## 【請求項10】

請求項8又は9に記載の組成物を含むRNAの抽出効率増進用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、固相対象物を利用した核酸抽出方法に係り、より詳細には、多様な真核細胞、バクテリア細胞、ウイルス細胞、または体液(body fluids)を含んだ核酸供給源から簡便な方法で核酸を抽出する方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

核酸は、疾病状態を確認するための重要な分析手段であり、DNA生体標識子 (biomarker)、例えば、一塩基多型 (SNP)、突然変異またはDNAメチル化は、研究者が癌の原因を探るように助け、疾病の初期段階の間の疾病の状態を診断し、観察することはもとより、予後と監視とに対する大きな機会の提供に重要な糸口を提供する。

## 【0003】

DNAのような核酸は、タンパク質のような他の成分に比べて、非常に低い生理的濃度で存在するために (例えば、全血マイクロリットル当たり数十ナノグラムのDNA対数十マイクログラムのタンパク質)、臨床試料からDNAを効果的に抽出し、予備濃縮することは、増幅及び検出のような以後の工程に非常に重要である。メチル化されたDNA (methylated DNA) の場合には、このような問題はさらに重要である。

10

## 【0004】

DNAメチル化 (DNA methylation) は、正常な真核細胞 (eukaryotic cells) 内で遺伝子発現及び染色質組織化の調節に決定的役割を果たす。DNAメチル化は、シトシン (cytosine) 環の5-炭素上にメチル基を共有添加することにより、発生し、5-メチルシトシンを生成する。このようなメチル基は、DNAの主溝 (major groove) に突出して転写を効果的に阻害する。

## 【0005】

哺乳動物DNAで、5-メチルシトシンは、ゲノムDNA (genomic DNA) の約4%で、主にシトシン-グアノシンジヌクレオチド (CpGs) から発見される。そのようなCpG部位は、ヒトゲノム全体において予想される頻度よりもさらに低く発生するが、CpG島と称される小さな長さのDNAでは、さらに頻繁に発見される。

20

## 【0006】

このような島は、転写が始まる所である、遺伝子のプロモーター部位内または付近で典型的に発見される。ほとんどCpG部位が多くメチル化されたゲノムDNAとは異なって、生殖細胞系列組織 (germ-line tissue) で、及び正常な体細胞のプロモーターでのCpG島は、非メチル化されたまま残っており、遺伝子発現を引き起こす。

## 【0007】

DNAメチル化は、非常に関連したDNAメチルトランスフェラーゼ酵素 (DNMT) 群によって仲介され、これらは、メチル基をS-アデノシル-L-メチオニンからCpGジヌクレオチド内のシトシンに伝達する。DNMTによって確立されたメチルシトシンは、メチル-CpG結合ドメイン (MBD) タンパク質MeCP2、MBDに対する結合部位として作用する。

30

## 【0008】

ヒストン脱アセチル化酵素、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、及びATP-依存性染色質リモデリング酵素 (chromatin remodeling enzyme) との相互作用を通じて、MBDは、転写に抑圧的なコンパクト化された染色質環境でメチル化されたDNAを翻訳する。特に、MBDは、MeCP2タンパク質のメチルCpG結合ドメインであり、これは、任意の配列にある対称的にメチル化されたCpGsに結合し、メチル化依存性転写抑制の仲介に参加する。たとえMeCP2が生体内で独占的にメチル化されたDNA断片物に結合するという強力な証拠があるとしても、試験管で、MeCP2のDNAメチル化-独立的結合活性が、また一致的に文書に説明されており、これは、一般的な試験管内のDNA分析に適切に使われる。

40

## 【0009】

最近、生命工学を含めた診断医学、薬物医学、代謝医学など多様な分野で高純度に精製された核酸の使用量が増えることによって、多様な生物試料からより迅速かつ純粋に核酸を分離しようとする努力が続いている。

## 【0010】

しかし、現在まで核酸の分離方法において、最も大きく発展した部分は、誘電体DNA

50

、プラスミドDNA、メッセンジャーRNA、タンパク質、細胞残骸粒子など細胞溶解溶液内に含まれた多種の物質から特異的に核酸のみを吸着させる担体に関する技術などほとんどの研究の焦点は、核酸を吸着させる物質に関する研究と開発とに集中されている限界があった。

【0011】

これにより、より迅速かつ純粋に核酸を分離するために、なによりも細胞残骸粒子とタンパク質変性凝集物、他の多様な細胞分解物質から迅速に所望の核酸のみを分離することができる技術の開発が切実な実情である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0012】

本発明の目的は、従来方式であるキアゲンを含んだ核酸抽出時に、大型装備（遠心分離機及び磁石など）が必要なあらゆる商用化キットを利用した核酸抽出方法に比べて、簡単でありながらも、低コストで多様な核酸供給源から多量と高純度との核酸を抽出することができる抽出方法及び装置を提供するところにその目的がある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

前記目的を果たすために、本発明は、対象物にアミン基を導入して改質する段階（第1段階）；前記改質された対象物上に核酸試料と下記化学式1で表される化合物とを注入し、核酸と前記化合物との間の複合体を形成させる段階（第2段階）；及び前記複合体が形成された対象物に溶出緩衝液を処理して核酸を抽出する段階（第3段階）；を含む核酸抽出方法を提供する。

20

【0014】

また、本発明は、入口ホールと出口ホールとがそれぞれ貫設された上部薄膜；前記上部薄膜から離隔配置された下部薄膜；その入口端及び出口端が、前記上部薄膜の入口ホール及び出口ホールにそれぞれ対応して連通するマイクロチャネルが内側にパターン形成され、前記マイクロチャネルの入口部と連通する注入路が、前記入口端に隣接して形成され、前記上部薄膜と下部薄膜との間に配されるマイクロチャネルチャンバ；及び前記上部薄膜及び下部薄膜の各側部を密封して、前記マイクロチャネルチャンバを密封させる密封手段；を含む核酸抽出用薄膜装置を提供する。

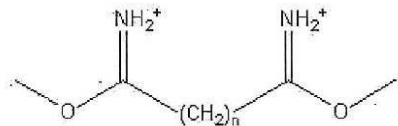
30

【0015】

また、本発明は、下記化学式1で表される化合物を有効成分として含む核酸抽出効率増進用組成物を提供する。

【0016】

【化1】



40

【0017】

前記式において、nは、5～7の整数である。

【発明の効果】

【0018】

本発明による核酸抽出方法を利用すれば、多様な真核細胞、バクテリア及びウイルス細胞、または体液を含んだ核酸供給源から簡便でありながらも、迅速に核酸を抽出するだけでなく、核酸抽出時に、薄膜装置を利用する場合、従来のシリコン基板に比べて、親水性が向上することにより、より効率的に核酸を抽出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

50

【図1】薄膜を利用した核酸抽出用同型二機能性イミドエステル [ H I N T ] システムの原理を示す模式図である。

【図2】薄膜装置の構成を示す分解図である。

【図3】ジメチルスベルイミデート ( D M S ) の濃度変化による D N A 抽出効率を示す図面である。

【図4】乳癌細胞を用いて、従来のキアゲンキットと本発明による D T S 分析、そして、D T S 分析時に使われる D M S と類似した化合物であるジメチルアジブイミデート ( D M A ) を利用した分析による D N A 抽出効率を示す図面である。

【図5】本発明による D T S 分析、D T S 分析時に使われる D M S と類似した D M A とを利用した分析によって抽出された D N A の P C R 増幅効率を示す図面である。

10

【図6】マイクロ流体チャンバを具体的に示す図面である。

【図7】H I N T システムに適用して R N A 及び D N A 抽出した結果を示す。H I s [ ジメチルスベルイミデート ( D M S ) 及びジメチルピメリミデート ( D M P ) ] の有無による注入 D N A ( 1  $\mu$  g のヒトゲノミクス D N A ) の回収率を測定結果 ( A )、D M S 濃度 ( 1 0 0、5 0、2 0、and 1 0 m g / m l ) を異ならせて、癌細胞から抽出した D N A の量 ( B ) 及び純度 ( C )、システムから抽出された 2 種の濃度 ( 1  $\times$  1 0 <sup>3</sup> 及び 1  $\times$  1 0 <sup>6</sup> ) の R N A で 1 8 S 遺伝子増幅を行った結果 ( D )、D M S 濃度 ( 5 0 ~ 2 5 0 m g / m l ) によって、システムから抽出された D N A で A c t i n 遺伝子増幅を行った結果 ( E )。L : D N A s i z e m a r k e r、Q : Q i a g e n k i t で抽出した R N A、N : 陰性対照群。

20

【図8】癌細胞の R N A 抽出に H I N T システムを適用した結果を示す。( A ) A G S ( 胃癌細胞株 )、( B ) H C T 1 1 6 ( 大腸癌細胞株 ) 及び ( C ) M C F 7 ( 乳癌細胞株 ) の結果である。( D ) 抽出された R N A から 1 8 S 遺伝子を P C R 増幅した結果である。( E ) 単一段階逆転写 R T - P C R において、H C T 1 1 6 細胞の濃度によるサイクル数 ( C <sub>T</sub> ) を確認した結果である。

【図9】癌細胞の D N A 抽出に H I N T システムを適用した結果を示す。( A ) A G S ( 胃癌細胞株 ) 及び ( B ) H C T 1 1 6 ( 大腸癌細胞株 ) の結果である。( C ) H C T 1 1 6 細胞の濃度によって、D M S を適用して H I N T システムから抽出された D N A の R T - P C R サイクル数を確認した結果である。( D ) E . c o l i 濃度を異ならせて、H I N T システムから抽出された D N A の R T - P C R 分析結果を示す。

30

【図10】H I N T システムに臨床サンプルを適用した結果を示す。( A ) 重症熱性血小板減少症候群 ( S F T S ) 患者の血しょうからウイルス R N A を抽出した結果である。( B ) ツツガムシ病 ( S T ) 患者の血清からバクテリア D N A を抽出した結果。

【図11】H I N T システムに D M A、D M P または D M S を適用時に、D N A 増幅効率を比較した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【0021】

本発明の発明者らは、核酸試料から核酸を分離及び抽出することができる抽出方法を開発して、核酸試料と下記化学式 1 で表される化合物との間の複合体を形成させることにより、従来の核酸抽出方法に比べて、より簡単でありながらも、低コストで多量と高純度との核酸を分離し、大型装置を使用せずとも、現場即時型診断が可能であることを明らかにして、本発明を完成した。

40

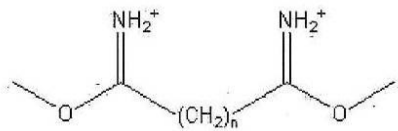
【0022】

本発明は、対象物にアミン基を導入して改質する段階 ( 第 1 段階 ) ; 前記改質された対象物上に核酸試料と下記化学式 1 で表される化合物とを注入し、核酸と前記化合物との間の複合体を形成させる段階 ( 第 2 段階 ) ; 及び前記複合体が形成された対象物に溶出緩衝液を処理して核酸を抽出する段階 ( 第 3 段階 ) ; を含む核酸抽出方法を提供する。

【0023】

50

## 【化2】



## 【0024】

前記式において、nは、5～10の整数である。

## 【0025】

望ましくは、前記化学式1で表される化合物で、nは、5～7の整数である。

## 【0026】

前記対象物は、薄膜装置、磁性ビーズ(magnetic bead)またはナノ粒子(nanoparticle)のうち何れか1つであり、これに制限されるものではない。

## 【0027】

前記核酸は、DNAまたはRNAのうち何れか1つを含み、これに制限されるものではない。

## 【0028】

前記核酸は、メチル化されたDNAを含み、これに制限されるものではない。

## 【0029】

前記改質は、対象物内にシラン化合物を流入させて改質し、これに制限されるものではない。

## 【0030】

前記シラン化合物は、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APTES)であり、これに制限されるものではない。

## 【0031】

前記第1段階以前に対象物にプラズマ処理を通じて洗浄する段階をさらに含み、これに制限されるものではない。

## 【0032】

前記第2段階及び第3段階の間に、前記複合体が形成された対象物を洗浄する段階をさらに含み、これに制限されるものではない。

## 【0033】

前記核酸試料は、真核細胞、バクテリア細胞、ウイルス細胞、全血または尿由来の試料であり、これに制限されるものではない。

## 【0034】

前記第2段階で改質された対象物上にタンパク質分解酵素及び溶出緩衝液をさらに含み、これに制限されるものではない。

## 【0035】

また、本発明は、入口ホールと出口ホールとがそれぞれ貫設された上部薄膜；前記上部薄膜から離隔配置された下部薄膜；その入口端及び出口端が、前記上部薄膜の入口ホール及び出口ホールにそれぞれ対応して連通するマイクロチャンネルが内側にパターン形成され、前記マイクロチャンネルの入口部と連通する注入路が、前記入口端に隣接して形成され、前記上部薄膜と下部薄膜との間に配されるマイクロチャンネルチャンバ；及び前記上部薄膜及び下部薄膜の各側部を密封して、前記マイクロチャンネルチャンバを密封させる密封手段；を含む核酸抽出用薄膜装置を提供する。

## 【0036】

前記上部薄膜の入口ホールと前記マイクロチャンネルの入口端とを連通する第1チュービングアダプタ；及び前記上部薄膜の出口ホールと前記マイクロチャンネルの出口端とを連通

10

20

30

40

50

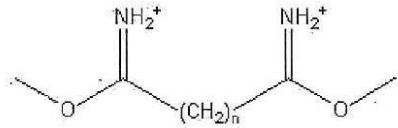
する第2チュービングアダプダ；をさらに含みうる。

【0037】

前記上部薄膜の入口ホールを通じて、前記マイクロチャネルの入口端には、下記化学式1で表される化合物を注入し、前記マイクロチャンバの注入路を通じて核酸サンプルを注入することができる。

【0038】

【化3】



10

【0039】

前記式において、nは、5～10の整数である。

【0040】

望ましくは、前記化学式1で表される化合物で、nは、5～7の整数である。

【0041】

前記マイクロチャネルは、複数回折り曲げられるようにパターンされうる。

【0042】

前記マイクロチャネルは、拡張された断面を有する複数の拡張部と、前記拡張部よりも縮小された断面を有する複数の縮小部と、を含むが、前記拡張部と縮小部は、交互に配置される。

20

【0043】

以下、本発明の図面を根拠にして、本発明をより詳細に説明する。

【0044】

本発明による核酸分析は、薄膜装置内でDMSを利用した核酸分析であるDTS(Dimethyl suberimidate/Thin film Sample)分析であって、試料溶出/培養、洗浄及び溶出の3つの段階を含んでおり、遠心分離せずに行う。例えば、シラン化合物として3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を通じて薄膜装置を改質し、このような改質によって、疎水性である薄膜装置を親水性に転換させる。

30

【0045】

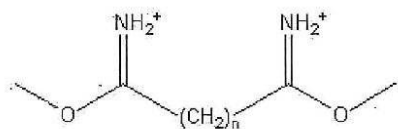
前記改質された薄膜装置上に核酸試料、及び溶出緩衝液とDMS溶液とを注入する。前記核酸のアミノ基とDMSの二機能性アミン反応基との相互作用による核酸とDMSとの間に架橋メカニズムを用いて、核酸とDMSとの間の複合体を形成させ、試料からDNAを抽出することができる。

【0046】

また、本発明は、下記化学式1で表される化合物を有効成分として含む核酸抽出効率増進用組成物を提供する。

【0047】

【化4】



40

【0048】

前記式において、nは、5～10の整数である。

【0049】

望ましくは、前記化学式1で表される化合物で、nは、5～7の整数である。

50

## 【0050】

前記組成物は、タンパク質分解酵素及び溶出緩衝液をさらに含み、前記核酸は、DNAまたはRNAであり得るが、これに制限されるものではない。

## 【0051】

また、本発明は、前記組成物を含む核酸抽出効率増進用キットを提供する。

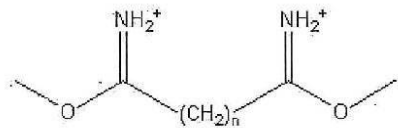
## 【0052】

一方、本発明で使われた化学式1で表される化合物は、二機能性イミドエステル(imidoesters)を含んでいるために、本明細書では、同型二機能性イミドエステル(homobifunctional imidoesters; HIs)とも名付け、前記HIsは、核酸と迅速かつ強く互いに結合して複合体を形成し、アミン反応性基に改質された対象物の表面に捕獲されて、高効率の核酸抽出が可能である。

10

## 【0053】

## 【化5】



## 【0054】

前記式において、nは、5～10の整数である。

20

## 【0055】

望ましくは、前記化学式1で表される化合物で、nは、5～7の整数である。

## 【0056】

本発明で使用したHIsは、ジメチルピメリミデート(dimethyl pimelimidate; DMP)及びジメチルスベリミデート(Dimethyl suberimidate; DMS)であり、これと化学構造が類似した化合物であるジメチルアジピミデート(dimethyl adipimidate; DMA)を使用して比較実験を行った。DMP(化学式2)、DMS(化学式3)及びDMA(化学式4)の化学構造は、次の通りである。

## 【0057】

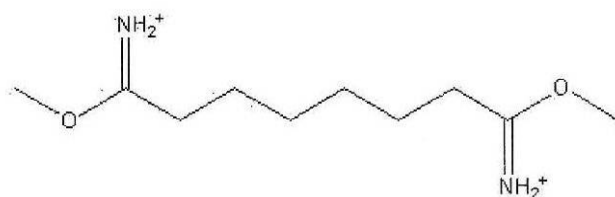
30

## 【化6】



## 【0058】

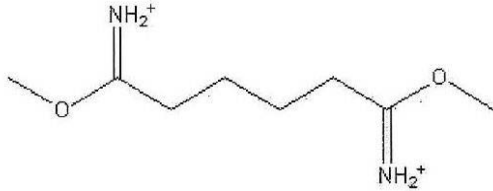
## 【化7】



40

## 【0059】

## 【化 8】



## 【 0 0 6 0 】

以下、本発明の理解を助けるために、実施例を挙げて詳細に説明する。但し、下記の実施例は、本発明の内容を例示するものであり、本発明の範囲が、下記の実施例に限定されるものではない。本発明の実施例は、当業者に本発明をより完全に説明するために提供されるものである。

10

## 【 0 0 6 1 】

<実施例 1> 薄膜装置製作及び前処理

## 【 0 0 6 2 】

## 1. 薄膜装置製作

## 【 0 0 6 3 】

レーザカットティング機器 (Universal Laser Systems, Scottsdale, USA) を用いて容易にかつ迅速に本発明の薄膜装置を製作した [ 図 2 参照 ]。まず、前記薄膜装置は、上部薄膜と下部薄膜、そして、上部薄膜と下部薄膜との間に挿入されたマイクロ流体チャンバで構成され、前記マイクロ流体チャンバは、核酸供給源から DNA を抽出するために、チャンバ内の流路によって互いに連結された多数の

20

## 【 0 0 6 4 】

前記マイクロ流体チャンバを製作するために、300 μm の厚さの両面テープ (100 μm の厚さの両面テープの間に挟持された 100 μm の厚さのポリエステル膜) にマイクロ流体チャンバデザインをレーザカットティング機器で切断してマイクロ流体チャンバを製作した。薄膜 (上部及び下部) は、レーザカットティング機器を用いてマイクロ流体チャンバと同じ寸法で切断した。

## 【 0 0 6 5 】

前記上部薄膜に貫通孔である入口 (inlet) と出口 (outlet) とを製作した。レーザカットティングマイクロ流体チャンバの上部及び下部の表面に永久接着剤を用いて、それぞれレーザカットティング薄膜 (上部及び下部) を接着させた。前記マイクロ流体チャンバの高さは、約 300 μm であり、総体積は、300 μl であった (300 μl の量、8.4 cm × 3.7 cm)。

30

## 【 0 0 6 6 】

核酸供給源を注入するためのチュービングアダプダは、3 mm の厚さを有するキャストアクリルシート (MARGA CIPTA, Indonesia) を両面テープの一面に付着し、レーザカットティング機器で切断及び穿孔して製造した。前記製造されたチュービングアダプダは、マイクロ流体チャンバの流入口と排出口とにそれぞれ付着した。以後、あらかじめ切断されたタイゴンチュービング (AAC02548; Cole-Palmer, Vernon Hills, USA) をアダプダの孔に位置させた後、エポキシを使用して密封した。

40

## 【 0 0 6 7 】

このように製作された薄膜装置は、多様な容量の核酸試料 (100 μl、300 μl、及び 500 μl) を処理することができるという長所がある。

## 【 0 0 6 8 】

## 2. 薄膜装置前処理

## 【 0 0 6 9 】

前記薄膜装置を利用した DNA 分析のために、薄膜装置内部を 10 分間酸素プラズマで

50

処理した後、前記プラズマ処理された薄膜装置を65℃で10~60分間2% 3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を含有した水溶液に浸漬させた後、脱イオン水で完全に洗浄した。洗浄後、薄膜装置を硬化(cure)させるために、前記洗浄された薄膜装置を迅速に窒素気流下で乾燥させて、薄膜装置をアミンで改質した。

【0070】

Drop Shape Analyzer(DSA100、KRUSS、Germany)を利用したアミン改質された薄膜装置の水接触角の測定を通じて温度及び培養時間によって薄膜装置の親水性が非常に変化したことが分かった。65℃で10分間前記薄膜装置をAPTESでシラン化(silanization)した後、前記薄膜表面の親水性は増加した(約30~40°)。

10

【0071】

<実施例2> DTS分析

【0072】

本発明では、予め製作された薄膜装置にジメチルスルホキシド(DMS)を適用した核酸分析法をDTSと名付け、以下、実験でDTS分析を行った。

【0073】

すなわち、前記アミンで改質された薄膜装置(300µlの量、8.4cm×3.7cm)を用いてDNAを抽出するために、先に最適化された分析溶液を準備した。前記最適化された分析溶液は、100mM トリス塩酸(pH8.0)を含有する溶出緩衝液、10mMのEDTA、1% SDS、10%のトリトンX-100をDMS(50mg/ml)と混合して準備した後、核酸分析試料として細胞、バクテリア、血液または尿由来の各試料100µlを前記分析溶液200µlと混合した。

20

【0074】

前記混合された核酸分析試料と分析溶液とが混合された混合液をアミンで改質された薄膜装置の上部基板入口に流入させ、マイクロ流体チャンバ内に前記混合液が移動しながら、DMSの2個のアミン基とDNAとが結合し、また、薄膜装置内の改質されたアミン基とDNAとが結合して複合体を形成してDNAを分離することができた。この際、薄膜装置は、核酸分析試料からDNAを十分に抽出するために、20分間恒温(56℃)を保持した培養器またはコントローラ(Alpha Omega Instruments)を含んだ熱電冷却器(thermoelectric cooler; TEC)のうち何れか1つに置いておいた。

30

【0075】

DMS-DNA複合体のうち、異物を除去するために、PBS緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液(10mMの重炭酸ナトリウム、pH10.6)を使用してDNAを抽出した。抽出されたDNAの量と純度とを測定した後、Enspire Multimode Plate Reader(PerkinElmer)を用いて260nm(DNA)及び280nm(タンパク質)での試料の光学密度の比率を決定した。従来のDNA抽出法と本発明のDTS分析とを比較するために、知られた方法(Qiagen、Hilden、Germany)によってQIAmp DNA mini kitを使用して分析した。

【0076】

図3のように、DMS濃度別にDNA結合力を確認した結果、DMS濃度が50~100mg/mlである時、DNA結合効率が最も高いと確認された。

40

【0077】

<実施例3> DTS分析を利用した真核細胞からのDNA抽出

【0078】

5% CO<sub>2</sub> 雰囲気、37℃の湿った培養器で10%ウシ胎児血清(fetal calf serum: FCS)を補充した高グルコースダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified eagle medium; DMEM、DMEM Life Technology)のプラスチック培養プレートで6個の真核細胞(MCF-7(乳房)、NCI-H1975(肺)、CaCo-2(大腸)、T24(膀胱))

50

、U937（リンパ球）及びJurkat（末梢血液）をそれぞれ培養した後、実施例2と同じ方法で真核細胞からDNAを抽出するが、ゲノムDNAを抽出するために、タンパク質分解酵素であるプロテイナーゼKを処理した。そして、比較のために、QIAmp DNAミニキットを用いて真核細胞からDNAを抽出した。

#### 【0079】

DNAの量と純度とを確認するために、End-point PCR及びリアルタイムPCR（real time-PCR）を行った。一部の遺伝子（HRAS、Actin及びRAR）の順方向及び逆方向プライマーを約24塩基対の正常長さで合成した。End-point PCRは、15分間95 で初期変性段階；95 、45秒、59、45秒（RAR）、及び72 、45秒の45サイクル；及び72 、10分間最終延長段階からなっている。5～10μlのDNAを1×PCR緩衝液（Qiagen）、2.5mM塩化マグネシウム（MgCl<sub>2</sub>）、0.25mMデオキシヌクレオチド三リン酸（deoxynucleotide triphosphate）、25pmolの各プライマー、及びTaq DNA重合酵素1ユニットを含む総体積25μlで増幅した。リアルタイムPCR分析のために、次の段階がLightCycler 2.0（ロシュ・ダイアグノスティックス）から提供された方法を下記のように変形した。5～10μlのDNAを4μlのLightCycler FastStart DNA Master ミックス、25pmolの各プライマー、1×PCR緩衝液2μl（キアゲン）、2.5mM塩化マグネシウム（MgCl<sub>2</sub>）、0.25mMデオキシヌクレオチド三リン酸、及び蒸留水を含む総体積20μlで増幅した。95 で10分間最初に予備処理した後、95 、10秒、58 、30秒（HRAS及びアクチン遺伝子に対して）、及び10秒間72 を50サイクルを行い、30秒間40 で冷却段階を経た。SYBR緑色信号を有した増幅された生成物は、LightCycler 2.0（Roche Diagnostics）で行った。

#### 【0080】

抽出されたDNAからRAR の後成学的変異を調査するために、前記DNAを単一反応チューブで20分間37 でMspIまたはHpaII溶液（150μl）のうち何れか1つと混合してDNAを分解した。前記分解工程後、制限酵素の不活性化のために、前記単一反応チューブを10分間80 で放置した。前記不活性化工程によって、前記分解されたDNAは、従来のPCRを使用して量分析で得たRAR 遺伝子の後成学的分析のために、鋳型（template）として使用した。

#### 【0081】

一方、乳癌細胞を用いて、従来のキアゲンキットと本発明によるDTS分析、そして、DTS分析時に使われるDMSと類似した化合物であるDMAを利用した分析によるDNA抽出効率を比較分析した結果、図4のように、DMSを利用した分析では、DNAと結合して乳癌細胞からDNAを抽出することができたが、一方、DMA（dimethyl adipimate）を利用した分析では、乳癌細胞からDNAを抽出することができなかった。

#### 【0082】

そして、図5のように、DMSを用いて抽出したDNAをPCR増幅した結果、DMAを利用した分析に比べて、増幅効率が25%向上した。

#### 【0083】

<実施例4> DTS分析を利用したバクテリア細胞からのDNA抽出

#### 【0084】

バクテリア細胞でDTS分析能を確認するために、DTS分析を用いて抽出されたDNAを使用して、PCR基盤のDNA増幅を実施した。あらゆるプライマーは、大腸菌（Escherichia coli）、マイコバクテリウムアブセサス（Mycobacterium abscessus）、マイコバクテリウムゴルドネ（Mycobacterium gordonae）及びサルモネラ菌株（Salmonella Strains）（サルモネラ・ティフィムリウム（Salmonella Typhimurium）

10

20

30

40

50

m)、サルモネラ・ニューポート (*Salmonella Newport*)、及びサルモネラ・セントポール (*Salmonella Saintpaul*) の常用プライマーを使用した。

#### 【0085】

最適化の反応のために、100mMトリス塩酸 (pH 8.0) を含有する溶出緩衝液、10mMのEDTA、1% SDS、10%のトリトンX-100及びリゾチーム20mg/mLをDMS (50mg/mL) と混合した。本発明のDTS方法の有効性を検証するために、一般的なPCRを行った。大腸菌 (*E. coli*) XL1ブルー菌株を50µl/mLのテトラサイクリン (*tetracycline*) とLuria-Bertani (LB) 培地に接種し、シェイキング状態 (*shaking condition*) で37℃で一日間培養し、 $10^3 \sim 10^7$  のコロニー形成単位 (*colony forming unit; CFU*) の試料を試験のために使用した。DTS分析及びキアゲンキット分析で使用するために、培養させた大腸菌、マイコバクテリウムアブセサス、マイコバクテリウムゴールドネ及びサルモネラ菌株 (サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・ニューポート、及びサルモネラ・セントポール) からバクテリアDNAを抽出した。

#### 【0086】

バクテリア遺伝子の遺伝学的分析のために、DTS分析及びキアゲンキット分析から抽出されたDNA 2µlを1×PCR緩衝液 (キアゲン、ヒルデン、ドイツ)、2.5mM塩化マグネシウム ( $MgCl_2$ )、0.25mMデオキシヌクレオチド三リン酸、各プライマー25pmol、及びTaq DNA重合酵素1ユニットを含む総体積25µlを使用して、15分間95℃で増幅した；95℃、30秒、60℃、30秒 (マイコバクテリウムアブセサス、マイコバクテリウムゴールドネ及びサルモネラ菌株) 及び72℃、30秒の45サイクル；及び72℃、7分間最終延長段階。PCR増幅物は、PCR生成物を臭化エチジウム (*EtBr*) (シグマアルドリッチ) を含有した2%アガロースゲル上から分離するゲル電気泳動法で可視化された。前記ゲルは、Gel Doc System (Bio-Rad) を使用して可視化された。DNA濃度及び純度の測定は、UV分光分析器 (Perkin-Elmer) で行われた。

#### 【0087】

<実施例5> DTS分析を利用したヒト体液からのDNA抽出

#### 【0088】

ヒトの体液でDTS分析能を検証するために、体液試料200µl (全血及び尿) を前記薄膜装置に流入してDNAを抽出した。まず、予め製作された薄膜装置内にプロテインゼKとDMSとを含んだ溶出緩衝液と体液試料とをそれぞれ流入した後、マイクロチャネルチャンバに移動させて、体液試料内のDNAとDMAとの間の複合体を形成させた後、実施例2と同じ方法でDNAを抽出した。この際、溶出緩衝液と体液試料は、シリンジポンプ (KD Scientific, MA) を使用して2個の他の入口にそれぞれ1.5ml/hrの流速で10分間流入させ、DNAの抽出及び精製のために、カートリッジを20分間56℃で培養した。そして、シリンジポンプによるPBS緩衝液流入のための入口の流速は、4ml/hrで10分間増加させた。最後に、抽出されたDNAを100µlの溶出緩衝液で溶出した。また、比較のために、QIAmp DNAミニキット (ヒルデン、ドイツ) を使用したゲノムDNAの抽出に200µlの全血または尿を使用した。あらゆる抽出されたDNAは、UV分光光度計 (Perkin-Elmer) によってDNA濃度及び純度が決定された。

#### 【0089】

<実施例6> 薄膜微細流体プラットフォームを利用した核酸抽出において、同型二機能性 (*homobifunctional*) イミドエステルの適用 (HINT戦略)

#### 【0090】

本発明者らは、以前実施例を通じて、薄膜装置内でDMSを利用した核酸分析であるDTS分析を通じて、真核細胞または原核細胞を含む多様な試料からDNAを抽出して分析した。

10

20

30

40

50

## 【0091】

また、本発明者らは、薄膜 - 基盤の微細流体プラットフォームを使用してRNA及びDNAをいずれも抽出することができる、薄膜を利用した核酸抽出用同型二機能性イミドエステル [homobifunctional imidoesters (HIS) for nucleic acids extraction using thin films; HINT] システムを開発した (図6)。同型二機能性イミドエステル (HIS) としては、ジメチルスベルイミデート (DMS) 及びジメチルピメリミデート (DMP) が使われ、メチルレン基及び二機能性イミドエステル基からなっている (図6A)。薄膜 - 基盤の微細流体プラットフォームでは、単一チャンネル上でサンプル溶解 (lysis)、洗淨及び溶出がなされた。HINTシステムを用いてサンプルからRNA及びDNAを抽出するために、サンプル混合液、溶解緩衝液及びHIS (DMSまたはDMP) をピペットでシステムに注入したが、前記システムは、核酸及びHIS複合体を捕獲するために、表面をアミン反応性基であらかじめ活性化させて使用した (図6B)。その後、RNA抽出のためには、常温で10~20分反応させ、DNA抽出のためには、56℃で20分間反応させた。反応後、洗淨及び溶出過程を通じて核酸 (RNAまたはDNA) を抽出することができた。

10

## 【0092】

一方、HINTシステムが、核酸 (RNA及びDNA) の抽出に有用に使われるか否かを確認するために、多様な癌細胞株及びバクテリア細胞株でシステムの基本的な特性を確認した。図7Aでは、HIS (DMS及びDMP) の有無による注入DNA (1µgのヒトゲノムDNA) の回収率を測定した。DMS (黒色) 及びDMP (灰色) が含まれた実験群いずれもでは、95%以上のDNAが回収され、HISが含まれていない実験群では、<50% DNAが回収された (図7A)。ヒトゲノムDNA及びRNA抽出のためのシステムプロトコルを最適化するために、癌細胞株 [ $1 \times 10^6$  cellsの乳癌細胞株 (MCF7) または大腸癌細胞株 (HCT116)] を使用した。ハイクオリティー及び高容量の核酸を抽出するための最適化方法で、DMS濃度 (100、50、20、and 10mg/ml) を異ならせて、癌細胞から抽出したDNAの量 (図7B) 及び純度 (図7C) を測定した。DNA抽出とは異なって、RNAは、分解が容易に起こるので、一般的にRNA抽出がさらに難しい。2種の濃度の癌細胞 ( $1 \times 10^3$  及び  $1 \times 10^6$ ) からRNAを抽出するために、DMSまたはDMPをHINTシステムに適用した。PCR比較実験のために、システムから抽出された2種の濃度のRNAで18S遺伝子増幅を行ったが、単一段階逆転写end-point PCR及び単一段階逆転写RT-PCRを進行した。18S遺伝子は、 $10^6$  ( $C_T: 18.42 \pm 0.46$  in DMS、 $C_T: 17.86 \pm 0.32$  in DMP) 及び  $10^3$  ( $C_T: 32.15 \pm 0.09$  in DMS、 $C_T: 31.60 \pm 0.2$  in DMP) 細胞濃度でいずれも強く増幅された (図7D)。また、HINTシステムを利用したDNA抽出のために、多様な濃度のDMS (50~250mg/ml) と共に、2種の濃度の癌細胞 ( $1 \times 10^3$  及び  $1 \times 10^6$ ) を使用した。PCR比較実験のために、システムから抽出された2種の濃度のDNAでActin遺伝子増幅を行ったが、end-point PCR及びRT-PCRを進行した (図7E)。Actin遺伝子は、 $1 \times 10^6$  cells ( $C_T: 22.11 \pm 0.31$ ; 図7E) 及び  $1 \times 10^3$  cells ( $C_T: 31.73 \pm 0.01$ ) でいずれも増幅され、あらゆる濃度のDMS条件でも、いずれも増幅された。

20

30

40

## 【0093】

RNA抽出分析において、HINTシステムをさらに検証するために、AGS (胃癌細胞株)、HCT116 (大腸癌細胞株) 及びMCF7 (乳癌細胞株) を含む3種の癌細胞株からRNAを抽出して分析したが、連続した希釈を通じて  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$  cells を使用した。HINTシステムを通じて抽出されたRNAの量は、細胞数に依存的事であることを確認することができた (図8Aから図8C)。抽出されたRNAから18S遺伝子をPCR増幅した結果、3種の癌細胞株から抽出されたRNAでいずれも強く増幅されることを確認した (図8D)。図8Eは、単一段階逆転写RT-PCRにおいて、

50

HCT116細胞の濃度によるサイクル数(cycle number;  $C_T$ )を確認した結果である。 $C_T$ 及び細胞濃度の間には、高い直線度( $R^2 = 0.9907$ )を示した。

【0094】

DNA抽出分析において、HINTシステムをさらに検証するために、MCF7、AGS及びHCT116細胞からDNAを抽出してPCR分析を行った。同じ濃度の細胞数( $1 \times 10^6$ )を使用してHINTシステムをQiagen kitと比較した。AGS及びHCT116細胞と、DMSまたはDMPを使用してHINTシステムから抽出されたDNAは、Qiagen kitから抽出されたDNAの増幅効率と同等なレベルであった(図9A及び図9B)。また、RT-PCRにおいて、DMSまたはDMPを使用してHINTシステムから抽出されたDNAは、細胞数に依存的であると表われた。DMSを使用して実験した結果は、図9Cに示した。一方、多様なサンプルで、本システムの適用可能性を確認するために、E. coliからバクテリアDNAを抽出して分析したが、細胞濃度範囲は、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  CFUsの範囲で使用した。連続して希釈されたサンプルから抽出されたDNAでは、E. coli遺伝子が強く増幅された。HINTシステムから抽出されたDNAは、Qiagen kitから抽出されたDNAの増幅効率と同等なレベルであった(図9D)。

10

【0095】

また、重症熱性血小板減少症候群(Severe fever with thrombocytopenia syndrome; SFTS)及びツツガムシ病(scrub typhus; ST)のようなダニ媒介疾病サンプルからウイルスまたはバクテリア核酸(DNA及びRNA)を抽出するに当たっても、HINTシステムを適用することができるか否かを確認した。Qiagen kit及びHINTシステム(DMS使用)を用いて、SFTS患者の血しょうからウイルスRNAを抽出した。HINTシステムのRT-PCR増幅効率は、Qiagen kitと大きく差が出なかった(図10A)。また、Qiagen kit及びHINTシステム(DMS及びDMP使用)を用いて、ST患者の血しょうからバクテリアDNAを抽出して分析した結果、HINTシステムのRT-PCR増幅効率は、Qiagen kitと同等なレベルであると表われた(図10B)。

20

【0096】

一方、本発明に使用したDMS及びDMPと類似した化合物であるDMAとの比較実験を行った。HCT116癌細胞株を用いて、DMA、DMS及びDMPをそれぞれ添加して、HINTシステムを通じてDNA抽出し、該抽出されたDNAの増幅効率を比較した。図11に示すように、DMAに比べて、DMS及びDMPの増幅効率が2 cyclesほど迅速に進められることを図11(A)で確認し、2 cycles差に対する効率を確認した時、PCRでは、理論上、増幅産物が1 cycleごとに2倍ずつ増加するので、発現量を比較する場合に、 $C_t$ 値の差を2の二乗を求めれば良いが、このように計算すれば、DMAに比べて、DMPとDMSとを使用する場合、約4倍ほど効率が高いということを確認した(図11B)。

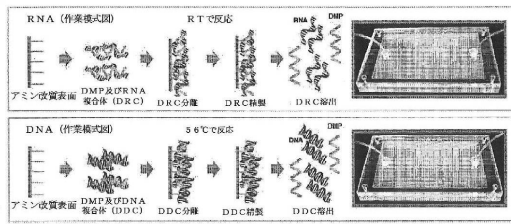
30

【0097】

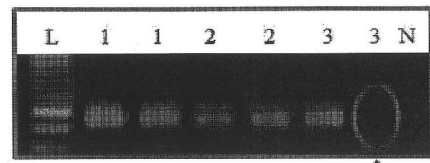
以上のように、本発明は、たとえ限定された実施例と図面とによって説明されたとしても、本発明は、これによって限定されず、当業者によって本発明の技術思想と下記に記載される請求範囲の均等範囲内とで多様な修正及び変形が可能であるということはいうまでもない。

40

【 図 1 】

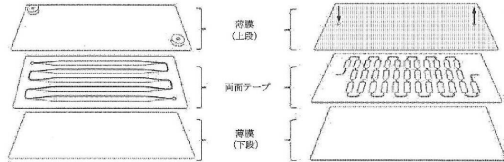


【 図 4 】



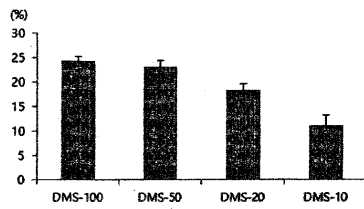
- 1: Qiagen kit #1 (ratio: 2.04)
- 1: Qiagen kit #2 (ratio: 1.94)
- 2: DMS #1 (ratio: 1.72)
- 2: DMS #2 (ratio: 1.76)
- 3: DMA #1 (ratio: 1.79)
- 3: DMA #2
- N: 陰性対照群

【 図 2 】



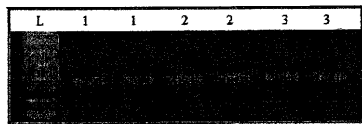
【 図 3 】

[ 図 3 ]

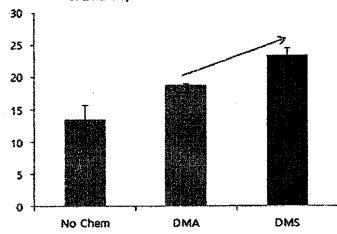


【 図 5 】

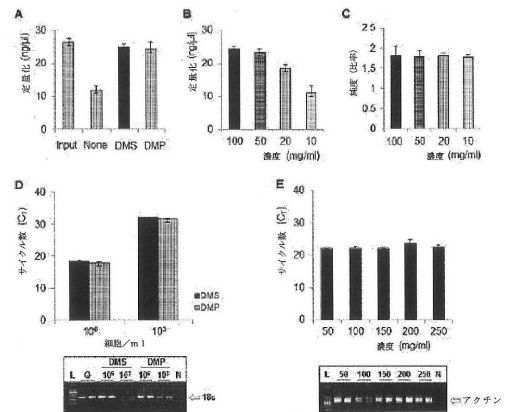
[ 図 5 ]



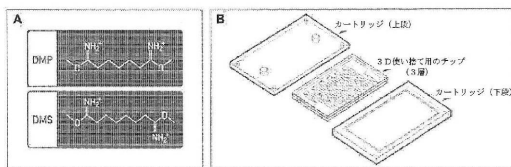
- 1: No Chem #1; 1: No Chem #2
- 2: DMA #1; 2: DMA #2
- 3: DMS #1; 3: DMS #2



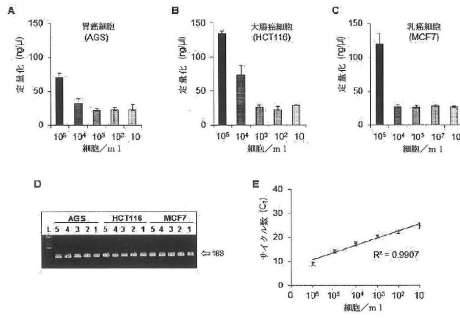
【 図 7 】



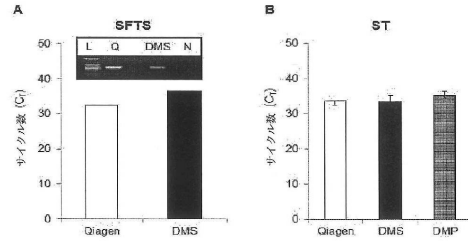
【 図 6 】



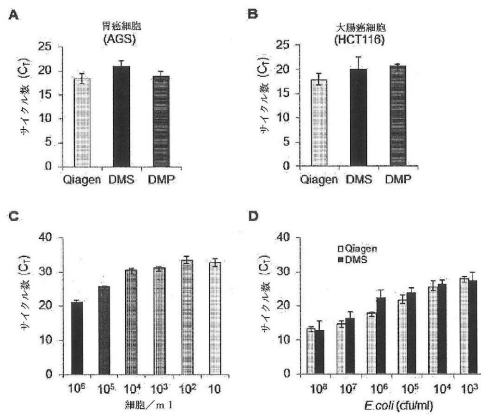
【 図 8 】



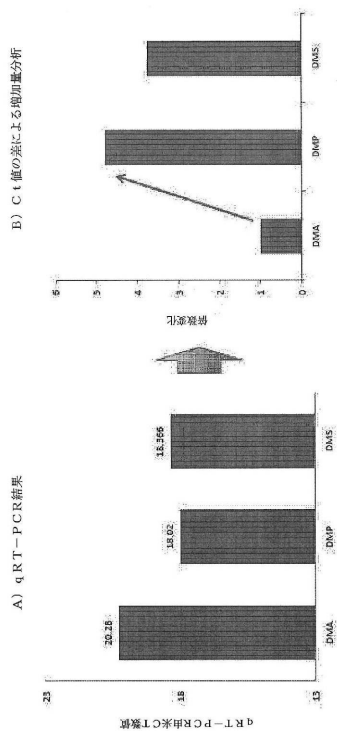
【 図 10 】



【 図 9 】



【 図 11 】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100196298

弁理士 井上 高雄

(72)発明者 ヨン シン

大韓民国 05505 ソウル ソンパ-グ オリンピック-ロ 43-ギル 88 アサン イ  
ンスティテュート フォー ライフ サイエンス ディパートメント オブ コンバージェンス  
メディシン 6 フロア

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 国際公開第2012/004790(WO, A1)

特表2000-502907(JP, A)

Sci. Rep., 2015年, Vol.5, 14127

Biosens. Bioelectron., 2010年, Vol.26, pp.1016-1020

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/

C12Q 1/

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