

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-541761
(P2008-541761A)

(43) 公表日 平成20年11月27日(2008.11.27)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00

テーマコード(参考)

A 4 B O 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2008-514787 (P2008-514787)
(86) (22) 出願日	平成18年5月31日 (2006.5.31)
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月28日 (2008.1.28)
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/021011
(87) 國際公開番号	W02006/130632
(87) 國際公開日	平成18年12月7日 (2006.12.7)
(31) 優先権主張番号	60/686,522
(32) 優先日	平成17年5月31日 (2005.5.31)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/773,027
(32) 優先日	平成18年2月13日 (2006.2.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	502221282 インヴィトロジェン コーポレーション アメリカ合衆国 カリフォルニア 920 08, カールスバッド, フアラディ アベ ニュー 1600
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(74) 代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
(74) 代理人	100130845 弁理士 渡邊 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】パラフィン含有試料からの核酸の分離及び精製

(57) 【要約】

パラフィン含有組織試料から核酸を分離し精製するための迅速かつ再現性のある方法を開示する。開示される方法は、界面活性剤の存在下でパラフィン含有組織試料を加温し、パラフィンを融解して組織試料セルを溶解する融解工程を含む。その結果得られた2相混合物(すなわちパラフィン相及び水相)から、核酸の精製のために水相を回収する。組織細胞を溶解させるため、および/または、核酸を分解するかもしくは後続の遺伝子操作もしくは分析の妨害になりうるタンパクを分解するために、分離プロセス中1つまたは複数の時点でプロテアーゼを用いることができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法であって、
(a)イオン性界面活性剤の存在下、試料を約50～85にて約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成する工程と、
(b)パラフィン相から水相を取り出す工程と、
(c)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約25～80にて約5～60分間インキュベートする工程
とを含む方法。

【請求項 2】

パラフィン含有試料がホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

加温が約64～85である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

加温が約60～75である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

加温が約72である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

加温が約1～30分間である、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

加温が約10分間である、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、又はサルコシンである、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

プロテアーゼがプロテイナーゼKである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

インキュベートが約35～70である、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

インキュベートが約55～65である、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

インキュベートが約56～58である、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

インキュベートが約5～30分間である、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

インキュベートが約10分間である、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

水相からリボ核酸を精製する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

精製工程が、TRIZOL沈殿、イソチオシアニン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法であって、

(a)イオン性界面活性剤の存在下、試料を約50～85にて約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成する工程と、

(b)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約25～80にて約5～60分間インキュベートする工程

とを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

パラフィン相から水相を取り出す工程をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

パラフィン含有試料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

加温が約64 ~ 約85 の間である、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

加温が約60 ~ 75 である、請求項18記載の方法。

【請求項 22】

加温が約72 である、請求項18記載の方法。

【請求項 23】

加温が約1 ~ 30分間である、請求項18記載の方法。

【請求項 24】

加温が約10分間である、請求項18記載の方法。

【請求項 25】

イオン性界面活性剤がSDS又はサルコシンである、請求項18記載の方法。

【請求項 26】

プロテアーゼがプロテイナーゼKである、請求項18記載の方法。

【請求項 27】

インキュベートが約35 ~ 70 である、請求項18記載の方法。

【請求項 28】

インキュベートが約55 ~ 65 である、請求項18記載の方法。

【請求項 29】

インキュベートが約56 ~ 58 である、請求項18記載の方法。

【請求項 30】

インキュベートが約5 ~ 30分間である、請求項18記載の方法。

【請求項 31】

インキュベートが約10分間である、請求項18記載の方法。

【請求項 32】

水相からリボ核酸を精製する工程をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項 33】

精製工程が、TRIZOL沈殿、イソチオシアニン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法であって、イオン性界面活性剤及びプロテアーゼの存在下で試料を約50 ~ 85 にて約1 ~ 60分間加温してパラフィン相及び水相を生成する工程を含む、方法。

【請求項 35】

パラフィン相から前記水相を取り出す工程をさらに含む、請求項34記載の方法。

【請求項 36】

パラフィン含有試料がホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である、請求項35記載の方法。

【請求項 37】

加温が約64 ~ 85 である、請求項35記載の方法。

【請求項 38】

加温が約60 ~ 75 である、請求項35記載の方法。

【請求項 39】

加温が約65 である、請求項35記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 0】

加温が約1分～約30分間である、請求項35記載の方法。

【請求項 4 1】

加温が約10分間である、請求項40記載の方法。

【請求項 4 2】

イオン性界面活性剤がSDS又はサルコシンである、請求項35記載の方法。

【請求項 4 3】

プロテアーゼがプロテイナーゼKである、請求項35記載の方法。

【請求項 4 4】

水相からリボ核酸を精製する工程をさらに含む、請求項35記載の方法。 10

【請求項 4 5】

精製工程が、TRIZOL沈殿、イソチオシアノ酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

パラフィン含有試料からデオキシリボ核酸を分離する方法であって、

(a)界面活性剤の存在下、試料を約75～100にて約1～60分間加温して、パラフィン相及び水相を生成する工程と、

(b)パラフィン相から水相を取り出す工程と、

(c)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約25～80にて約5～60分間インキュベートする工程 20

とを含む方法。

【請求項 4 7】

パラフィン含有試料がホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料である、請求項46記載の方法。

【請求項 4 8】

加温が約85～100である、請求項46記載の方法。

【請求項 4 9】

加温が約100である、請求項46記載の方法。

【請求項 5 0】

加温が約1～30分間である、請求項46記載の方法。 30

【請求項 5 1】

加温が約10分間である、請求項46記載の方法。

【請求項 5 2】

界面活性剤がイオン性界面活性剤である、請求項46記載の方法。

【請求項 5 3】

イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、又はサルコシンである、請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項46記載の方法。 40

【請求項 5 5】

非イオン性界面活性剤がTriton X-114、NP-40又はTween-20である、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

プロテアーゼがプロテイナーゼKである、請求項46記載の方法。

【請求項 5 7】

インキュベートが約35～70である、請求項46記載の方法。

【請求項 5 8】

インキュベートが約55～65である、請求項46記載の方法。

【請求項 5 9】

50

インキュベートが約62である、請求項46記載の方法。

【請求項60】

インキュベートが約5～30分間である、請求項46記載の方法。

【請求項61】

インキュベートが約10分間である、請求項46記載の方法。

【請求項62】

水相からデオキシリボ核酸を精製する工程をさらに含む、請求項46記載の方法。

【請求項63】

精製工程が、TRIZOL沈殿、イソチオシアニン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィー、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む、請求項62記載の方法。10

【請求項64】

パラフィン含有試料からデオキシリボ核酸を分離する方法であって、

(a)界面活性剤の存在下で試料を約75～100にて約1～60分間加温して、パラフィン相及び水相を生成する工程と、

(b)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約75～100で約5～60分間インキュベートする工程

とを含む方法。

【請求項65】

パラフィン含有試料がホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料である、請求項64記載の方法。20

【請求項66】

加温が約85～100である、請求項64記載の方法。

【請求項67】

加温が約100である、請求項64記載の方法。

【請求項68】

加温が約1～30分間である、請求項64記載の方法。

【請求項69】

加温が約10分間である、請求項64記載の方法。

【請求項70】

界面活性剤がイオン性界面活性剤である、請求項64記載の方法。30

【請求項71】

イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、又はサルコシンである、請求項70記載の方法。

【請求項72】

界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項64記載の方法。

【請求項73】

非イオン性界面活性剤がTriton X-114、NP-40又はTween-20である、請求項72記載の方法。

【請求項74】

プロテアーゼがプロテイナーゼKである、請求項64記載の方法。40

【請求項75】

インキュベートが約35～70である、請求項64記載の方法。

【請求項76】

インキュベートが約55～65である、請求項64記載の方法。

【請求項77】

インキュベートが約62である、請求項64記載の方法。

【請求項78】

インキュベートが約5～30分間である、請求項64記載の方法。

【請求項79】

50

インキュベートが約10分間である、請求項64記載の方法。

【請求項 8 0】

水相からデオキシリボ核酸を精製する工程をさらに含む、請求項64記載の方法。

【請求項 8 1】

精製工程が、TRIZOL沈殿、イソチオシアニン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む、請求項80記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

技術分野

本発明の開示は、パラフィン含有試料からの核酸分離精製に関する。より具体的には、本開示は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE、formalin-fixed paraffin-embedded)組織試料からの核酸の分離精製に関する。

【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

本特許出願は、Song-Hua Keによる「パラフィン含有試料からの核酸の分離精製(Separation and Purification of Nucleic Acid from Paraffin-containing Samples)」と題され、2005年5月31日に出願された米国特許仮出願第60/686,522号、及び2006年2月13日に出願された米国特許仮出願第_____号ドケット第IVGN 250 PRO 2号の恩典を主張する。これらの優先出願はいずれも参考として本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

組織試料の遺伝子型解析及び遺伝子発現解析は、疾患バイオマーカ(例えば遺伝子の決定基)の識別、正確な疾患診断、及び患者の治療経路決定のため極めて重要である。ゲノム製薬法は、特定の薬物に反応しそうな患者を特定して新たな治療手段へと導きうる。例えば、患者から切除される腫瘍組織は特定疾患のバイオマーカの発現が増加又は減少していることの分析に用いるので、これにより臨床医師が当該患者の治療に有効な治療薬を特定する助けになりうる。

30

【0 0 0 4】

組織試料の遺伝子型解析及び遺伝子発現研究(例えば、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)增幅)は、凍結組織試料を用いて実施されることがある。しかしながら、凍結組織として調製される病理組織は多くなく、むしろ履歴分析及び保存貯蔵のためにホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)される。従って、パラフィン含有試料から核酸を抽出するための迅速かつ信頼性のある方法は、疾患機構とバイオマーカの研究に非常に役立つと考えられる。本明細書に開示の発明は上記の需要を課題としている。

【発明の開示】

【0 0 0 5】

概要

パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法を提供することであって、前記方法は、(a)イオン性界面活性剤の存在下、前記試料を約50～85℃にて約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成すること、(b)パラフィン相から水相を取り出すこと、ならびに(c)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約25～80℃にて約5～60分間インキュベートすること、を含む。一部の態様において、前記パラフィン含有試料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である。一部の態様において、前記加温は約64～85℃の間である。一部の態様において、前記加温は約60～75℃の間である。一部の態様において、前記加温は約72℃である。一部の態様において、前記加温は約1～30分間である。一部の態様において、前記加温は約10分間である。一部の態様において、前記イオン性界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)又はサルコシンである。一部の態様において、前記プロテアーゼ

40

50

ゼはプロテイナーゼKである。一部の態様において、前記インキュベートは約35～70 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約55～65 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約56～58 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約5～30分間である。一部の態様において、前記インキュベートは約10分間である。一部の態様において、前記方法はさらに前記水相からリボ核酸を精製することを含む。一部の態様において、前記精製はTRIZOL沈殿、イソチオシアン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む。

【0006】

同様に、パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法を提供することであって、前記方法は、(a)イオン性界面活性剤の存在下、前記試料を約50～85 にて約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成すること、(b)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約25～80 にて約5～60分間インキュベートすること、を含む。一部の態様において、前記方法はさらに前記パラフィン相から前記水相を取り出すことを含む。一部の態様において、前記パラフィン含有試料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である。一部の態様において、前記加温は約64～約85 の間である。一部の態様において、前記加温は約60～75 の間である。一部の態様において、前記加温は約72 である。一部の態様において、前記加温は約1～30分間である。一部の態様において、前記加温は約10分間である。一部の態様において、前記イオン性界面活性剤はSDS又はサルコシンである。一部の態様において、前記プロテアーゼはプロテイナーゼKである。一部の態様において、前記インキュベートは約35～70 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約55～65 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約56～58 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約5～30分間である。一部の態様において、前記インキュベートは約10分間である。一部の態様において、前記水相からリボ核酸を精製することを含む。一部の態様において、前記精製はTRIZOL沈殿、イソチオシアン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、Charge Switch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む。

【0007】

同様に、パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法を提供することであって、前記方法は、イオン性界面活性剤及びプロテアーゼの存在下、前記試料を約50～85 に約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成することを含む。一部の態様において、前記方法はさらに前記パラフィン相から前記水相を取り出すことを含む。一部の態様において、前記パラフィン含有試料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である。一部の態様において、前記加温は約64～85 の間である。一部の態様において、前記加温は約60～75 の間である。一部の態様において、前記加温は約65 である。一部の態様において、前記加温は約1分～約30分間である。一部の態様において、前記加温は約10分間である。一部の態様において、前記イオン性界面活性剤はSDS又はサルコシンである。一部の態様において、前記プロテアーゼはプロテイナーゼKである。一部の態様において、前記方法はさらに前記水相からリボ核酸を精製することを含む。一部の態様において、前記精製はTRIZOL沈殿、イソチオシアン酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む。

【0008】

同様に、パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法を提供することであって、前記方法は、(a)界面活性剤の存在下、前記試料を約75～100 にて約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成すること、(b)パラフィン相から水相を取り出すこと、ならびに(c)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約25～80 にて約5～60分間インキュベートすること、を含む。一部の態様において、前記パラフィン含有試料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である。一部の態様において、前記加温は約85～100 の間である。一部の態様において、前記加温は約100 である。一部の態様において、前記加温は

10

20

30

40

50

約1～30分間である。一部の態様において、前記加温は約10分間である。一部の態様において、前記界面活性剤はイオン性界面活性剤である。一部の態様において、前記イオン性界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)又はサルコシンである。一部の態様において、前記界面活性剤は非イオン性界面活性剤である。一部の態様において、前記非イオン性界面活性剤はTriton X-114、NP-40又はTween-20である。一部の態様において、前記プロテアーゼはプロテイナーゼKである。一部の態様において、前記インキュベートは約35～70 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約55～65 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約62 である。一部の態様において、前記インキュベートは約5～30分間である。一部の態様において、前記インキュベートは約10分間である。一部の態様において、前記方法はさらに前記水相からリボ核酸を精製することを含む。一部の態様において、前記精製はTRIZOL沈殿、イソチオシアノ酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む。

【0009】

同様に、パラフィン含有試料からリボ核酸を分離する方法を提供することであって、前記方法は、(a)界面活性剤の存在下、前記試料を約75～100 に約1～60分間加温してパラフィン相及び水相を生成すること、(b)水相にプロテアーゼを添加し、水相を約75～100 にて約5～60分間インキュベートすること、を含む。一部の態様において、前記パラフィン含有試料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料である。一部の態様において、前記加温は約85～100 の間である。一部の態様において、前記加温は約100 である。一部の態様において、前記加温は約1～30分間である。一部の態様において、前記加温は約10分間である。一部の態様において、前記界面活性剤はイオン性界面活性剤である。一部の態様において、前記イオン性界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)又はサルコシンである。一部の態様において、前記界面活性剤は非イオン性界面活性剤である。一部の態様において、前記非イオン性界面活性剤はTriton X-114、NP-40又はTween-20である。一部の態様において、前記プロテアーゼはプロテイナーゼKである。一部の態様において、前記インキュベートは約35～70 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約55～65 の間である。一部の態様において、前記インキュベートは約62 である。一部の態様において、前記インキュベートは約5～30分間である。一部の態様において、前記インキュベートは約10分間である。一部の態様において、前記方法はさらに前記水相からリボ核酸を精製することを含む。一部の態様において、前記精製はTRIZOL沈殿、イソチオシアノ酸グアニジン、陰イオン交換クロマトグラフィ、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製、又は核酸ハイブリダイゼーションを含む。

【0010】

本発明の他の特徴及び利点は、後述の詳細な説明及び特許請求の範囲から明白になると思われる。開示される材料、方法、及び例は例示するためだけのものであり、限定することを意図するものではない。当業者であれば、本明細書に記載されているものと同様または等価な方法及び材料を、本発明の実施に用いうることを認識すると思われる。

【0011】

別途記載しない限り、本明細書に記載の全ての技術及び科学用語は、本発明の属する技術分野の技術者が通常理解している意味を有する。本明細書で言及する全ての出版物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、それらの全体を参照として組み込まれる。矛盾がある場合は、定義を含めて本明細書が優先する。

【0012】

発明の詳細な説明

パラフィン含有試料から核酸を迅速に分離及び精製するための方法を提供する。本発明の方法は、保存(例えばホルマリンによる)組織試料を含み、任意のパラフィン含有試料から核酸を分離精製するために用いてうる。パラフィン含有試料は、任意の生体器官、すなわち脊椎動物(例えば、ヒト、霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ及びウシ等の哺乳類、鳥、魚、両生類及びハ虫類等の非哺乳類)又は無脊椎動物(例えば昆虫)からの組織を含んで

10

20

30

40

50

もよい。正常又は疾患(例えば腫瘍)組織を、開示の方法を用いて処理してもよい。腫瘍のタイプには、皮膚、前立腺、子房、子宮、乳房、肺、脾臓、小腸、結腸、肝臓、腎臓及び脳に由来するものを含む。

【0013】

本発明の方法は任意の核酸の分離及び生成に用いてよく、その品質は遺伝子操作(例えば、クローニング、增幅、シークエンシング、RT-PCR及びcDNAライブラリ構築)、遺伝子型解析、及び遺伝子発現研究に好適である。1本鎖(ss)DNA、ssRNA(例えば、マイクロRNA)、2本鎖(ds)DNA、及びdsRNAを、開示の方法によりパラフィン含有試料から分離精製してもよい。標的の核酸は直鎖状でも環状でもよく、全RNA、mRNA、及び、染色体又はゲノムDNA(gDNA)でもよい。

10

【0014】

本発明の方法は一般的に融解工程を含み、ここで、パラフィン含有組織試料を界面活性剤存在下で加温することでパラフィンを融解し、組織試料の細胞を溶解する。生成する2相混合物(例えば、パラフィン相及び水相)から、核酸の精製のために水相を回収する。組織細胞の溶解を促進し及び/又は核酸を分解するかもしくは後続の遺伝子操作もしくは分析の妨害になりうるタンパク質を分解するために、分離プロセス中1つまたは複数の時点でプロテアーゼを用いる。例えば、プロテアーゼは、融解工程の前もしくは期間中に含まれ、及び/又は、パラフィン相からの回収の前もしくは後に2相混合物の水相に添加されうる。これらのプロセスは本明細書にさらに記載する。

20

【0015】

融解

融解工程において、パラフィン含有試料を界面活性剤の存在下で加温することにより、パラフィンを融解して組織試料の細胞を溶解させる。RNA(例えば、mRNA)を分離するため、パラフィン含有試料を約50～85にて加温する。RNA分離の一部の態様において、試料を約64～85にて、又は約60～75にて加温する。RNA分離の一部の態様において、試料を約72にて加温する。DNA(例えば、gDNA)を分離するため、パラフィン含有試料を約75～100にて加温する。DNA分離の一部の態様において、試料を約85～100にて加温する。DNA分離の一部の態様において、試料を約100にて加温する。

【0016】

融解工程は、一般的には1～60分間実施する。一部の態様において、パラフィン含有試料は1～30分間、又は5～20分間加温する。一つの態様において、融解工程は約10分間実施する。

30

【0017】

融解工程は、細胞の溶解を促進する界面活性剤含有バッファの存在下で実施する。界面活性剤含有バッファは、1以上のイオン性又は1以上の非イオン性界面活性剤を含んでもよい。好適なイオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ラウロイルサルコシン、Na⁺塩('サルコシン'又はSarcosyl)、胆汁酸塩界面活性剤(例えば、CHAPS、CHAPSO、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、グリコデオキシコール酸ナトリウム)及び臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)を含む。非イオン性界面活性剤は、サルコシン、Tween-20、NP-40、Triton X-100、NP-10、Triton X-114、Tween-80、及びn-オクタノイル-D-グリコシルアミン(NOGA)を含む。また、界面活性剤含有バッファは、Tris-HCl(pH7.5～8.5)、リン酸塩、HEPES、PIPES、MOPS、MES、TABS、TRICINE、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、キレート剤(例えばEDTA又はEGTA)及び/又は防腐剤等のバッファ塩を含んでもよい。

40

【0018】

イオン性及び/又は非イオン性界面活性剤はRNAの分離に用いる。一部の態様において、RNAの分離においてイオン性界面活性剤を用いる。イオン性及び/又は非イオン性界面活性剤はDNAの分離に用いる。一部の態様において、DNAの分離において非イオン性界面活性剤を用いる。

【0019】

50

水相回収

融解工程は、パラフィンを融解して組織試料の細胞を溶解させる。生成する2相混合物(例えば、パラフィン相及び水相)から、核酸の精製のために水相を回収する。パラフィン相及び水相の分離を促進するために遠心分離を用いる。例えば、核酸を含有する水相からパラフィン相の分離を容易にするために、好適な速度(例えば、ミクロ遠心分離機の最大速度)で室温(またはそれより低い温度)にて試料を遠心分離しうる。水相の上方にパラフィンを層状に固化させてもよい。水相を取り出すには、パラフィン相に貫通するピペットチップを用いる。

【0020】

核酸精製

核酸は、回収した水相から、TRIZOL沈殿、エタノール沈殿、イソチオシアニジン処理、フェノールクロロホルム処理、クロマトグラフィ(例えば陰イオン交換クロマトグラフィ)、シリカ法による精製、ChargeSwitch(登録商標)精製(PCT WO 99/29703及びPCT WO 02/48164を参照)核酸ハイブリダイゼーション、カラムクロマトグラフィ又は磁気ビーズ法による精製を含む周知の方法を用いて精製しうる。標的RNAは、夾雜するDNAを分解するためにDNase(例えばDNaseI)で処理してもよい。標的DNAは、夾雜するRNAを分解するためにRNase(例えばRNaseI)で処理してもよい。

【0021】

プロテアーゼの使用

組織細胞の溶解を促進し及び/又は標的の核酸を分解するかもしくは後続の遺伝子操作もしくは分析の妨害になりうるタンパク質を分解するために、分離プロセス中1つまたは複数の時点でプロテアーゼを用いる。例えば、プロテアーゼは、融解工程の前又は期間中に(例えば、界面活性剤含有バッファの成分として)含まれうる。また、プロテアーゼはパラフィン相からの水相回収の前又は後に、融解工程から生じる2相混合物の水相に添加されうる。水相の核酸は、基質(例えば、アフィニティカラム)に付着させ、基質との会合中にプロテアーゼ処理しうる。

【0022】

本明細書に記載の分離法のために、任意のプロテアーゼを用いる。一部の態様において、サーマス・アクアティカス(*Thermus Aquaticus*)、サーマス・フィリフォルミス(*Thermus filiformis*)、サーモトガ・ネアポリターナ(*Thermotoga neapolitana*)、サーモトガ・マルティメ(*Thermotoga maritime*)およびサーモコッカス・ジリギ(*Thermococcus zilli*gi)(例えば、サーマス種(*Thermus sp.*)、RT41a株熱安定性アルカリ・プロテアーゼ(Peekら、Eur. J. Biochem. 207巻、1035～1044頁、1992年)及びEA1プロテアーゼ(Mossら、Int. J. Legal Med. 117巻、340～349頁、2003年))等の好熱性細菌を用いる。一部の態様において、プロテイナーゼKを用いる。

【0023】

一態様において、融解工程から生じる水相にプロテアーゼを添加する際に、プロテアーゼを水相中(パラフィン相から回収する前又は後に)約25～80(例えば、35～70、50～70、55～65、55～60、60～65、56～58、又は62)にてインキュベートしうる。一般的に、上記のプロテアーゼ消化は約5～30分間(例えば、約10～20分間、又は約10分間)実施する。一部の態様において、プロテイナーゼKによる消化を56～58の間にて約10分間実施する。

【0024】

プロテアーゼ処理は、融解工程中、又は得られた水相の分離後のいずれにおいても、約1～500mM(例えば、約1～100mM)のキレート剤(例えば、EDTA又はEDTA)の存在下で実施してもよい。ほとんどのRNaseはマグネシウム依存性であるため、マグネシウム等の2価イオンをキレート化することでRNAの分解を抑制又は阻害しうる。好ましいことに、EDTAは本発明の方法におけるプロテイナーゼK活性を顕著に抑制するようには見えない。

【0025】

後続処理 - DNA修復

10

20

30

40

50

本明細書に記載の方法で得られるDNA(例えば、gDNA)は、DNA損傷(例えば、貯蔵及びパラフィン除去の期間中に継続した)を修復するためにトランスリージョン(translesion)DNAポリメラーゼで処理しうる。非トランスリージョンDNAポリメラーゼ(例えば、E.Coli(大腸菌)DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント類似の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する)をトランスリージョンDNAポリメラーゼ処理中に含んでもよい。

【0026】

損傷DNAの複製におけるトランスリージョンDNAポリメラーゼ機能

トランスリージョンDNAポリメラーゼはDNAポリメラーゼの「UmuC/DinB/Rad30/Rev1」スーパーファミリーに属し、これはトランスリージョンDNAポリメラーゼ・スーパーファミリーのサブファミリーを定義する4つのプロトタイプ遺伝子から名付けられたものである。トランスリージョンDNAポリメラーゼには、大腸菌pol IV及びpol V、及び真核polゼータ、イータ、イオタ、カッパ及びシータを含む。トランスリージョンDNAポリメラーゼによっては中温性(例えば、大腸菌由来Pol IV及びPol V；出芽酵母(*S.cerevisiae*)、分裂酵母(*S.pombe*)、ヒト、マウス、ショウジョウバエ由来Polカッパ；出芽酵母、ヒト、マウス由来Polゼータ；出芽酵母、ヒト、マウス由来Polイータ；マウス、ヒト由来Polイオタ)のものもあり、高温性/熱安定性(例えば、*B.*ステアロサーモフィラス(*B.stearothermophilus*)、*S.*ソファタリカス(*S.sofataricus*)由来Pol IV)のものもある。

10

【0027】

実施例

実施例1：FFPE組織試料における熱処理と化学処理

20

FFPEマウス脳、腎臓又は心臓組織試料の5~10ミクロン切片の3から8断片を1.5mlエッペンドルフ・チューブに入れた。300 μLのプロテイナーゼK消化バッファ(100mM塩化ナトリウム、10mM トリス塩酸、pH8.0；25mM EDTA、pH8.0及び0.2~0.8% SDS)を添加し、チューブをミクロ遠心分離機中、最大速度で10~20秒間回転した。試料を断続的(2~3分ごとに2~3回)に穏やかに混合しながら72にて10分間インキュベートした。次いで、核酸含有水相からパラフィン相の分離を促進するために、試料を1分間最大速度(13000~16000 xg)で遠心分離した。清浄なピペットチップを用いてパラフィン相を貫通し、水相を回収した。

【0028】

比較のために、有機溶媒であるcitrosolを用いてFFPEマウス脳及び心臓組織試料を処理した。脱パラフィンは、FFPE組織切片を1mlのcitrosolを2回交換して30分間、次いで100%及び75%エタノールを2回交換して30分間加えて実施した。PBSで15分間2回交換して洗浄する工程の後に、500 μlの溶解(lysis)バッファ(100mM塩化ナトリウム、10mM トリス塩酸、pH8.0；25mM EDTA、pH8.0及び0.2~0.8% SDS)を加え、全ての組織断片が完全に溶けるまで試料を52にて一晩インキュベートした(Shiら、J.Histochem Cytochem、第50巻、1005-1011頁、2002年)。

30

【0029】

10 μlのプロテイナーゼK(20mg/ml)又は20 μlのProtein Degrader(Invitrogen Corporation、米国カリフォルニア州カールスバッド、カタログ番号R57001)を、上記のように生成した核酸含有溶液に加え、試料をよく混合し、58にて10~15分間時々混ぜながらインキュベートした。次いで試料を遠心機内にて最大速度で短時間遠心分離した。

40

【0030】

核酸結合バッファ(50mM トリス塩酸、pH7.5、25mM EDTA、pH8.0、4mMグアニジン・イソチオシアネート)(400 μl)及び100%エタノール(800 μl)を試料に加え、次いで短時間振り混ぜた(全量 = 1200~1500 μl)。試料700 μlをGF(F又はG)RNAカートリッジカラム(RNAカートリッジ)に装填し、最大速度で1分間遠心分離した。濾過物を廃棄した。約700 μlの残液を同一カラムに移して前回の工程を繰り返した。カラムを500 μlの水バッファII(Invitrogen、カタログ番号12183018)で洗浄し、濾過物を廃棄した。RNAカートリッジカラムを新しい回収チューブ内に入れた。カラムを500 μlの水バッファIIで洗浄し、濾過物を廃棄した。洗浄工程をもう1回繰り返した。次いで、カートリッジから全ての溶液を分離するためにカラムを1分間遠心分離した。RNAカートリッジカラムを新しい2mlの回収チューブ

50

内に入れ、40 μlのRNase非含有の水又はトリスEDTA(TE)バッファを加えた。カラムを室温にて1分間インキュベートし、RNAを溶出するために最大速度(12000～14000rpm)で遠心分離した。40 μlの水又はTEバッファで2回目の溶出も実施しうる。

【0031】

一部の態様において、夾雜するゲノムDNAを分解するために製造業者取扱説明書の記載のようにDNase I(Invitrogen、カタログ番号18068-015)を用いて全RNAを消化した。全RNAを等分し、直ちに又は-80 ℃にて貯蔵後に、PCR又は逆転写に用いた。RT-PCRは、SuperScript(登録商標)III(Invitrogen、カタログ番号180800511)又はThermoX RT(カタログ番号11150-025)を用いて実行した。PCRは、白金Taq DNAポリメラーゼ(Invitrogen、カタログ番号10966018)を用いて実行した。

10

【0032】

加温処理試料に対するRNAの全収量は、化学処理した試料と等しいかより多かった。抽出した全RNAは、無処理又は比較用にDNase Iで処理した。gDNAの観測量は化学処理した試料よりも加温処理試料の方が少なかった。

【0033】

上述のようにDNase I処理したマウス脳由来RNA試料を用いるRT-PCR反応を、以下のパラメータを用いて25 μl容積中、35サイクル実施した。94 ℃ 30秒間、56 ℃ 30秒間、及び72 ℃ 40秒間。増幅した標的遺伝子はマウスβ-アクチンであった。PCR産物8 μlを等分し、2%アガロースEゲル(Invitrogen)電気泳動にて分析した。加温処理試料を用いるRT-PCRからは、化学処理した試料を用いるRT-PCRよりも長く増幅された産物を得られた。

20

【0034】

実施例2：RNA分離における界面活性剤の効果

SDS含有溶解バッファと、SDSが補足的であるか又は他の界面活性剤に置き換えられた溶解バッファと比較した。上述のようにしてマウス腎臓FFPE組織の6切片から全RNAを分離した。二重化した試料をテストした。表1に、6つの異なる溶解バッファに用いた界面活性剤を示す。

【0035】

【表1】

バッファ番号	界面活性剤
1	0.5% SDS
2	0.5% SDS+1%サルコシン
3	0.5% Triton X-114
4	0.5% NP-40
5	0.5% Tween-20
6	1% サルコシン

30

【0036】

全RNA収量を見積るためにQuant-iT RNAアッセイキット(Molecular Probes、米国オレゴン州ユージン、カタログ番号Q33140)を用いた。試料は、2 μlのDNase I溶液(1ユニット/μl、増幅グレード)を25 μlの精製RNA及び3 μlの10x反応バッファに加えることにより適宜DNase I処理し、次いで室温にて10分間インキュベートした。全RNA量を調べるために2%Eゲル(Invitrogen、カタログ番号G6018-02)を用いた。

40

【0037】

溶解バッファ中に用いられる界面活性剤のRNA収量への影響を調べた。非イオン性界面活性剤であるTriton X-114、NP-40又はTween-20を含む溶解バッファが用いられると、観測されるRNAはより少なかった。イオン性界面活性剤であるSDS、サルコシン又は両者の組

50

合せを含む溶解バッファが用いられると、観測されるRNAはより多かった。DNase I処理及びDNase I未処理試料の比較により、分離した核酸はRNAであること、及びDNAの夾雜はほとんど見られないことを確認した。

【0038】

上記のようにDNアーゼI処理RNAをRT-PCR用のテンプレートとして用いた。PCRサイクル条件は次の通りである：94にて30秒間変性、56にて30秒間アニーリング、72にて40秒間伸長。-アクチンA311bpフラグメントが増幅された。各RT-PCR反応物の5~7μlをゲル電気泳動により分析した。

【0039】

実施例3：ゲノムDNA分離への界面活性剤の効果

マウス肝臓FFPE組織の5切片からゲノムDNAを分離した。FFPE組織からgDNAを分離するために編集した加温プロトコルは以下のようであった。短時間、300μlの融解バッファをFFPE組織切片を含む各チューブに加えた。各グループごとに2つの試料を処理した。溶解バッファ中に用いた界面活性剤は表1に示したものと同一であり、1%臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)を含む別のバッファ(バッファ7)を追加した。試料を100にて10分間インキュベートし、次いで1分間12000rpmで遠心分離した。ワックス層の下方の水相を新しいチューブに移し、プロテイナーゼK(20mg/ml)を用い、時々混ぜながら62にて10分間消化した。グアニジン塩酸塩(7.5Mの300μl)を各チューブに加え、試料を100で10分間加温した。試料を100%エタノール200μlと混ぜ、次いでGF RNAカラムに装填して上記のように洗浄した。試料を40μlのddH₂O(二重蒸留水)で溶出した。260nmにおける吸光度を用い、分離した拡散の全量を見積もった。製造業者(Invitrogen)のプロトコルに従い、RNase A処理を実施した。RNase消化の前及び後において2%アガロースゲル及び核酸試料上でgDNAを調べた。

【0040】

表2に、バッファ1~7を用い、260nmにおける吸光度(OD260)から計測したgDNA抽出物の核酸濃度を示す。OD260/OD280比により、試料中にほとんどタンパクが見られないことを確認した。

【0041】

【表2】

試料	濃度	OD260／OD280
バッファ番号1	103.269	1.973
バッファ番号2	63.769	1.838
バッファ番号3	74.259	1.951
バッファ番号4	56.799	1.852
バッファ番号5	59.404	1.953
バッファ番号6	62.323	1.830
バッファ番号7	4.883	1.291

【0042】

抽出したgDNAの等分(1.2μl)を、次のサイクリング条件を用いて全反応量25μlの30サイクルPCR増幅に供した：94にて30秒間変性、56にて30秒間アニーリング、白金Taq DNAポリメラーゼ(Invitrogen、カタログ番号11306-016)を用いて72にて40秒間伸長。マウスホスホリラ(phosphorylase)キナーゼ(PGK-1)遺伝子のA413bpフラグメントが増幅された。各PCR反応物の等分(7μl)を2%アガロースゲル上で電気泳動にて分析した。

【0043】

10

20

30

40

50

実施例4：シリカ膜におけるプロテイナーゼK消化

FFPEマウス肝臓組織試料の $10\mu\text{m}$ 分画7個を 1.5ml エッペンドルフ・チューブに入れた。 $300\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKバッファ(100mM塩化ナトリウム、10mMトリス塩酸、pH8.0；25mM EDTA、及び0.5% NP-40)を加え、チューブをミクロ遠心分離機内にて最大速度で10分間回した。試料を断続的に混ぜながら(2~3分ごとに2~3回)95°にて10分間インキュベートした。次いで、核酸含有水相からパラフィン相の分離を促進するために、試料を直ちに最大速度(13000~16000 xg)で1分間遠心分離した。清浄なピペットチップを用いてパラフィン相を貫通して水相を回収し、新しい 1.5ml チューブに移した。

【0044】

$20\mu\text{l}$ のプロテイナーゼK($20\text{mg}/\text{ml}$)を上記のように生成した核酸含有溶液に加え、試料をよく混合し、時々混ぜながら62°にて60分間インキュベートした。7.5Mグアニジン塩酸塩含有の核酸結合バッファ($500\mu\text{l}$)を加え、試料を72°にて30分間インキュベートした。100%エタノール($500\mu\text{l}$)を試料に加え、次いで短時間振り混ぜた。試料 $700\mu\text{l}$ をシリカスピニカラムに装填し、最大速度で1分間遠心分離した。濾過物を廃棄した。約 $700\mu\text{l}$ の残液を同一から無に装填し、前回の工程を繰り返して全試料をカラムに通過させた。カラムを $500\mu\text{l}$ の洗浄バッファで洗い、濾過物を廃棄した。洗浄工程を1回繰り返した。 $100\mu\text{l}$ のプロテイナーゼK溶液($2\text{mg}/\text{ml}$)をカラムに加え、次いで62°にて30分間インキュベートした。(参照グループに対してはこの2回目のプロテイナーゼKのカラム上消化は省いた。)カラムを $500\mu\text{l}$ の洗浄バッファで洗い、洗浄をもう2回繰り返した。カラムから $40\mu\text{l}$ の温水(72°)でgDNAを溶出し、 $40\mu\text{l}$ の温水で溶出を繰り返した。核酸試料のODを確認し、gDNAの品質及び収量をゲル上で調べた。

【0045】

2回目のプロテイナーゼKカラム上消化の有無による核酸試料の分離を、制限酵素Nsp IによるゲノムDNAの消化、及び、Nsp Iアダプタ(Affymetrix、パート番号900766.1)を用いるライゲーション(連結)と比較した。ライゲーション後、PCRを用いてDNAを増幅し、 $5\mu\text{l}$ のPCR産物を1%アガロースゲルに装填し、電気泳動してPCR産物を調べた。2回目のプロテイナーゼKカラム上消化を用いて分離したgDNAは、2回目の消化を行わずに単離されたgDNAよりも長いPCR産物を生じた。

【0046】

実施例5：FFPE組織からのミクロRNAの分離

FFPEマウス肝臓組織試料 $10\mu\text{m}$ 切片8個を 1.5ml のチューブに入れた。 $300\mu\text{l}$ のプロテイナーゼK消化バッファをチューブに加え、最高速度で10分間振り混ぜた。試料を断続的に(2~3分間ごとに2~3回)穏やかに混ぜながら72°にて10分間インキュベートした。次いで、核酸含有水相からパラフィン相の分離を促進するために、試料を直ちに最高速度(13000~16000 xg)で1分間遠心分離した。清浄なピペットチップを用いてパラフィン相を貫通して水相を回収し、新しい 1.5ml のチューブに移した。

【0047】

$10\mu\text{l}$ のプロテイナーゼK($20\text{mg}/\text{ml}$)を上記のように生成した核酸含有溶液に加え、試料をよく混合し、時々混ぜながら62°にて10分間インキュベートした。 $300\mu\text{l}$ の核酸結合バッファ及び $323\mu\text{l}$ の100%エタノールをチューブに加えた。次いで核酸含有混合物をシリカスピニカラムに装填し、最高速度で1分間遠心分離した。濾過物を集め、2つのチューブに等分割した。 $740\mu\text{l}$ の100%エタノールを各チューブに加えた。チューブを振り混ぜ、各試料をミニカラム(Invitrogen、カタログ番号K1550-05)に装填し、最高速度で1分間遠心分離した。濾過物を廃棄し、ミニカラムをピュアリンクFFPEキット(Invitrogen、カタログ番号K1560-02)由来の洗浄バッファ $500\mu\text{l}$ で洗い、さらに2回繰り返した。 $10\mu\text{l}$ のRNase-free水を用いてミニカラムからRNAを溶出した。 $10\mu\text{l}$ のRNase-free水を用いて2回目の溶出を実施した。

【0048】

分離したRNA試料の濃度をナノドロップ(登録商標)分光器で調べた。ミニカラムを用いて分離したRNAは、 $182\sim248\text{ng}/\mu\text{l}$ の範囲の濃度であり、OD260/OD280(1.89及び1.91であ

10

20

30

30

40

50

った)比によりほとんどタンパクが見られないことを確認した。

【0049】

分離したマウス肝臓RNA試料は、また15%TBE/尿素アクリルアミドゲルを用いて調べた。各ウェルに4μlのRNA試料を装填し、180ボルトの一一定電圧にて55分間電気泳動を実施した。結果から、ミニカラム法を用いて分離したミクロRNAは15~75塩基長の範囲であることが示された。

【0050】

実施例6：トランスリージョンDNAポリメラーゼによるプライマー伸長アッセイを用いるDNA修復

上述の実施例4のように、ゲノムDNAを精製した。プライマー伸長反応は、5μlの10xバッファII、1.25μlの10μM dNTP、2.5μlの0.25μM N6ランダムプライマー(Invitrogen、カタログ番号48190-011)、2.5μg gDNA、及び水を加えて最終的に液量を48.75μlとした組合せにより調製した。反応混合物を2分間94℃に加温し、直ちに氷に1分間移した。氷上でインキュベートしながら、KlenowエキソDNAポリメラーゼ及びRad30DNAポリメラーゼを1:100の割合で含む1.25μlの酵素混合液を反応チューブに加えた。反応混合物は氷上で5分間、室温にて10分間、37℃にて1時間、58℃にて20分間インキュベートし、次いで4℃に維持した。

【0051】

Invitrogen社のBioPrimeアレイCGH遺伝子ラベリングシステム(カタログ番号18095-011)を用い、製造業者のキット推奨プロトコルに従って、FFPE組織から分離したgDNAをラベル(トランスリージョンDNAポリメラーゼを用いるプライマー伸長を伴う場合と伴わない場合)した。短時間、500ngのgDNA及び30μl/mlランダムプライマーをCy3-dCTP及びCy5-dCTPと共に37℃にて2時間インキュベートし、次いでピュアリンク精製キット(Invitrogen、カタログ番号18095-013)でDNAを精製した。DNA試料をナノドロップ(登録商標)分光器で分析し、6%TBE尿素ゲルで電気泳動した。

【0052】

ラベル後に色素の取り込みを計算した結果、プライマー伸長によりCy3及びCy5ラベルしたgDNAの両者において色素取り込み効率の上昇が見られた。トランスリージョンDNAポリメラーゼ処理はFFPEから分離したgDNAの品質を改善し、下流アプリケーションの効率、すなわちこの場合にはCy3及びCy5ラベル効率の助力になる。

【0053】

本発明は詳細な説明と共に記載したが、前述の記載は本発明を示すものであり、本発明の範囲を制限するものではないことを理解すべきであり、本発明は添付の特許請求の範囲により定義されるものである。他の局面、利点、及び変更は添付の特許請求の範囲に含まれる。

10

20

30

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/21011																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07H 1/00 (2006.01)																				
USPC: 536/25.42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/25.42																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) medline biosis capsus scisearch embase wpids																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,672,696 A (WANG et al) 30 September 1997 (30.09.1997), entire document.</td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">46-63</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">1-45, 69-71, 80-81</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 6,469,159 B1 (BELLY et al) 22 October 2002 (11.10.2002), entire document.</td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">64-68, 72-79</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">SORG et al. Detection of Borna Virus RNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Brain Tissues by Nested PCR. Journal of Clinical Microbiology. April 1995, Vol. 33, No. 4, pages 821-823, especially page 821.</td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">1-45</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">STANTA et al. RNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Methods in Molecular Biology. Vol. 86, pages 23-26, especially pages 23 and 26.</td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">46-63</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,672,696 A (WANG et al) 30 September 1997 (30.09.1997), entire document.	46-63	Y		1-45, 69-71, 80-81	X	US 6,469,159 B1 (BELLY et al) 22 October 2002 (11.10.2002), entire document.	64-68, 72-79	Y	SORG et al. Detection of Borna Virus RNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Brain Tissues by Nested PCR. Journal of Clinical Microbiology. April 1995, Vol. 33, No. 4, pages 821-823, especially page 821.	1-45	A	STANTA et al. RNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Methods in Molecular Biology. Vol. 86, pages 23-26, especially pages 23 and 26.	46-63
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	US 5,672,696 A (WANG et al) 30 September 1997 (30.09.1997), entire document.	46-63																		
Y		1-45, 69-71, 80-81																		
X	US 6,469,159 B1 (BELLY et al) 22 October 2002 (11.10.2002), entire document.	64-68, 72-79																		
Y	SORG et al. Detection of Borna Virus RNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Brain Tissues by Nested PCR. Journal of Clinical Microbiology. April 1995, Vol. 33, No. 4, pages 821-823, especially page 821.	1-45																		
A	STANTA et al. RNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Methods in Molecular Biology. Vol. 86, pages 23-26, especially pages 23 and 26.	46-63																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 21 December 2006 (21.12.2006)		Date of mailing of the international search report 26 JAN 2007																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer <i>Telicia D. Roberts</i> Christopher M. Gross Telephone No. (571) 272-1600 <i>[Signature]</i>																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/21011

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/21011

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This International Search Authority has found 3 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-45, drawn to a method of separating RNA from a paraffin-containing sample.

Group II, claims 46-63, drawn to a method of separating DNA from a paraffin containing sample comprising removal of a paraffin phase from an aqueous phase.

Group III, claims, 64-81, drawn to a method of separating DNA from a paraffin containing sample.

The inventions listed as Groups do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding technical features for the following reasons.

The technical feature linking groups I-III appears to be that they all relate to method of separating a nucleic acid from a paraffin containing sample comprising heating the paraffin sample in a detergent followed by the introduction of a protease.

However, such a method has been described by Wang et al (US 5672696).

Therefore the technical feature linking the inventions of groups I-III does not constitute a special technical feature as defined by PCT rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

The technical feature of Group I is considered to be a method of extracting RNA from a paraffin containing sample.

The technical feature of Group II is considered to be a method of extracting DNA from a paraffin containing sample comprising the step of separating an aqueous phase from a paraffin containing organic phase.

The technical feature of Group III is considered to be a method of extracting DNA from a paraffin containing sample.

Accordingly, Groups I-III are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single inventive concept.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ケー ソン ファ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ パルミラ ドライブ # 2306 7693

(72)発明者 ブランチ クレイグ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オーシャンサイド

(72)発明者 リー ジュン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ ブリーザント リッジ 11442

(72)発明者 ピーターソン トッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 コロナド キャットポー ケープ 32

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 HA11