

(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2005-505269

(P2005-505269A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/543 5 6 5 W	
G O 1 N 33/543	G O 1 N 37/00 1 0 2	
G O 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00 Z N A A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-525681 (P2003-525681)	(71) 出願人	504076600 エクストラナ, インク. XTRANA, INC. アメリカ合衆国、コロラド 80020、 ブルームフィールド、スウィート 205 、バーバンク ストリート、590
(86) (22) 出願日	平成14年8月16日 (2002.8.16)		
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月27日 (2004.2.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/026108		
(87) 国際公開番号	W02003/020981		
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)		
(31) 優先権主張番号	09/944, 604	(74) 代理人	100066865 弁理士 小川 信一
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001.8.31)	(74) 代理人	100066854 弁理士 野口 賢照
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100068685 弁理士 斎下 和彦
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸のアーカイブ

(57) 【要約】

【課題】本発明は固相に核酸を強固に結合するステップ及びその利用に対応するステップ。

【解決手段】拡散を、サンプル由来の核酸を強固に結合するのに十分な親水性と電気陽性を有する固相マトリックスに結合する。これらステップは大容積および/又は低濃度検体からの核酸(二本鎖又は一本鎖のDNAおよびRNA)の捕捉、緩衝液の効果、洗浄及び容積の現象を包含し、固相に結合した核酸を酵素、ハイブリダイゼーション又は増幅処理と結びつけることができる。強固に結合した核酸は、例えば反復分析に使用して研究及び商業応用での結果の確認又は追加遺伝子の試験に使用できる。さらに大容積血漿検体からのウイルスの抽出、精製及び固相増幅の方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 前記核酸を含むサンプルを、前記核酸が固相マトリックスと強固に結合するようになる条件の下に前記固相マトリックスと接触させるステップであって、前記マトリックスが 1 又はそれ以上の親水性を付与された電気陽性物質を有する特異結合材料であり、前記電気陽性材料がアルミニウム、チタン、ジルコニウム、ハフニウム、スカンジウム、イットリウム、ランタン、バナジウム、タンタル、クロム、モリブデン、タングステン、ホウ素、ガリウム、インジウム、ゲルマニウム、錫及び鉛より成るグループから選択される元素を含むステップと； b) 前記固相マトリックス上に強固に結合した核酸を保存するステップと；を含む核酸をアーカイブする方法。

10

【請求項 2】

a) 前記 1 又はそれ以上の標的核酸を含むサンプルを前記固相マトリックス及び前記 1 又はそれ以上の標的核酸配列が一本鎖標的核酸として前記マトリックスに強固に結合する様にする緩衝液と接触させるステップであって、前記マトリックスが 1 又はそれ以上の親水性を付与する電気陽性材料を有する特定結合材料であるステップと； b) 前記マトリックスに結合した標的核酸をプライマ核酸配列のセット及び前記プライマ配列を前記マトリックス結合核酸にハイブリダイゼーションできるようにする緩衝液とを接触させるステップと； c) 前記 1 又はそれ以上の標的核酸を増幅して増幅反応混合物を生成するステップであって、前記標的核酸配列が前記マトリックスに強固に結合したままであるステップと；を含む 1 又はそれ以上の標的核酸を増幅する方法。

20

【請求項 3】

ステップ (b) の前記緩衝液が前記プライマの前記固相マトリックスへの結合を低減する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記電気陽性材料がアルミニウム、チタン、ジルコニウム、ハフニウム、スカンジウム、イットリウム、ランタン、バナジウム、タンタル、クロム、モリブデン、タングステン、ホウ素、ガリウム、インジウム、ゲルマニウム、錫及び鉛より成るグループから選択される元素を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

前記マトリックスが酸化アルミニウム、酸化チタン (Ti_2O_3) 及び変性二酸化ジルコニウム (ZrO_2) より成るグループから選択される、請求項 4 記載の方法。

30

【請求項 6】

前記マトリックスがアルファ酸化アルミニウム、ガンマ酸化アルミニウム及び混合組成物の酸化アルミニウム薄膜より成るグループから選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 7】

前記マトリックスが Ti_2O_3 である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】

前記マトリックスが変性 ZrO_2 である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 9】

前記ステップ (a) の前記緩衝液が、グアニジンチオシアネートをベースとする緩衝液、アルカリ緩衝液、塩化リチウム及び界面活性剤をベースとする緩衝液からなるグループより選択される、請求項 2 記載の方法。

40

【請求項 10】

前記ステップ (b) の前記緩衝液がリン酸緩衝液である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 11】

前記標的核酸が二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、RNA 又は PNA より成るグループから選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 12】

前記標的核酸が二本鎖 DNA であり、そしてステップ (a) の前記緩衝液が前記 DNA を一本鎖 DNA として前記マトリックスに結合できるようにする、請求項 2 記載の方法。

50

【請求項 13】

前記増幅方法がPCR、SDA、NASBA、IsoCR、CRCA、Qベータ、レプリカーゼ、分枝DNA、RT-PCR及び巻き戻しコイル増幅法より成るグループから選択される、請求項2記載の方法。

【請求項 14】

ステップ(b)及び(c)を1回又はそれ以上更に繰り返すことを含んで成る、請求項2の方法。

【請求項 15】

前記サンプルが2又はそれ以上の核酸を構成要素として含み、且つ前記2又はそれ以上の標的核酸を連続して増幅する、請求項2記載の方法。

10

【請求項 16】

前記標的核酸が複数の標的核酸配列を含み、前記方法がさらにステップ(b)の前記マトリックスに結合した標的核酸と複数のプライマセットとを接触して複数の標的配列を前増幅するステップを含み、前記複数の標的配列が同時に増幅される、請求項2記載の方法。

【請求項 17】

更に(d)、ステップ(c)の前記前増幅反応混合液を複数の小分け液に分割するステップと；(e)少なくとも1つの前記プライマセットを各前記小分け液に加えるステップと；(f)前記小分け液を増幅するステップと；を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

前記固相マトリックスが基材表面上にコーティングされている、請求項2の方法。

20

【請求項 19】

前記基材がガラス又はポリマ材である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

前記基材がチューブ、プレート、幕、毛细管、スライド、ビーズ、微粒子、ファイバ、マイクロチャネル及びマイクロアレイの形状である、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

前記マトリックスが親水性を付与された陽電気性材料を1又はそれ以上有する特異的結合材料であり、a)前記固相マトリックスを700から800の範囲の温度に加熱するステップと；b)前記プラスチック材料を0から10の範囲の温度に冷却するステップと；c)前記加熱された固相マトリックスを前記冷却プラスチック材料と接触させて、前記固相マトリックスを前記プラスチック材料の表面にコーティングするステップと；を含むプラスチック材料表面を固相マトリックスでコーティングする方法。

30

【請求項 22】

プラスチック材料の表面を固相マトリックスでコーティングする方法であって、前記マトリックスが1又はそれ以上の親水性付与電気陽性材料を有する特定結合材料であり、前記方法が前記マトリックス材料の薄膜を前記プラスチック材料の表面上に被覆するステップを含んで成る方法。

【請求項 23】

酸化物基材の表面を固相マトリックスでコーティングする方法であって、前記マトリックスが1又はそれ以上の親水性付与電気陽性材料を有する特異結合材料であり、前記方法が(a)前記マトリックスを前記マトリックスの加水分解を促進する酸性若しくは塩基性溶液と混合するステップと；(b)前記酸化物基材の表面をステップ(a)の前記混合物でコーティングするステップと；(c)前記コーティング表面を乾燥するステップと；を含んで成る方法。

40

【請求項 24】

前記マトリックスが1又はそれ以上の親水性付与電気陽性材料を有する特異結合材料であり、前記方法が(a)前記固相マトリックスとテトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン、チタンエトキシド及びアルミニウムs-ブトキシドより成るグループから選択された金属酸化物前駆物質を構成要素として含むゾルと混合するステップと；(b)ステップ(a)の前記混合物を前記酸化物基材の表面上に塗布するステップと；(d)前記溶着混

50

合物を前記酸化物基材の表面上でゲル化させるステップと；（e）前記ゲル化混合物を前記表面上で乾燥させるステップと；を含む酸化物基材の表面を固相マトリックスでコーティングする方法。

【請求項 25】

（a）固相マトリックスでコーティングされた表面を有する基材を含み；前記マトリックスが親水性を付与された電気陽性材料を 1 又はそれ以上有する特定結合材料である基材と；（b）前記核酸を操作するのに必要な緩衝液又は試薬を構成要素として含む 1 又はそれ以上の容器と；を含んで成る核酸操作用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は分子生物学、生化学、遺伝学及び生物学的研究の一般分野に関する。より詳細には、本発明はいかなる生物試料に由来した核酸をも固相マトリックス上に捕捉し、強固に結合する方法に関する。固相に結合した核酸は固相核酸酵素反応、オリゴヌクレオチド又はプローブハイブリダイゼーション、及び／又は信号増幅反応又は標的増幅反応を含む様々な操作に利用できる基質として、直接複数回利用することができる。本発明は、更に、核酸ハイブリダイゼーション及び／又は増幅と核酸捕捉とを結合させる商業上の用途に関する。

【背景技術】

【0002】

20

核酸の分子構造は、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマと特定の標的器官又は組織に固有の配列との相補的塩基対合手段により、特異的な検出を提供する。全ての生物体又は種は、特異的且つ特徴的な核酸配列を含んでいることから、核酸検出全般に共通なストラテジは、様々な研究・開発分野及び商工業に極めて広範囲な用途を有している。核酸検出の実用化の可能性は、低濃度で存在する核酸配列を高い信頼度で、正確且つより高いコピー数まで増幅又はコピーする方法が開発されたことで更に高められ、その結果核酸配列は検出法でより簡単に検出されるようになった。

【0003】

最初の核酸増幅法は Mullis が記載したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である（米国特許第 4,683,195 号、米国特許第 4,683,202 号及び米国特許第 4,965,188 号であり、これらの特許全ては、本願に参照によって具体的に組み込まれる）。PCR が紹介されてより、核酸配列ベース増幅法（NASBA）（Malek に付与された米国特許第 5,130,238 号）、等温法（Auerbach に付与された米国特許第 5,354,668 号）、リガーゼチェインリアクション法（Buirkenmey er に付与された米国特許第 5,427,930 号）及び鎖置換増幅法（SDA）（Walker に付与された米国特許第 5,455,166 号）といった増幅に関する様々なストラテジが報告されており、それらは全て参照によりここに組み込まれている。SDA 又は NASBA といった一部の増幅方法は、一本鎖標的核酸を必要とする。通常この標的は増幅前に高温を利用した溶融操作により一本鎖にされる。

30

【0004】

40

核酸の増幅及び検出前に、標的核酸を生物試料より抽出してから精製し、増幅反応酵素の阻害因子を取り除く。更に標的核酸を解離し、アニールするプライマを常に利用可能なように準備しなければならない。核酸の精製については様々な方式が知られている。

その中には、例えばフェノール-クロロホルム及び／又はエタノール沈殿（Sambrook ら、分子クローニング：A Laboratory Manual 第 2 版、コールド・スプリング・ハーバー研究所、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク（1989 年））、高塩析沈殿（Dykes、電気泳動 9：359～368 項（1988 年））、プロテイナー K 消化法（Grimberg ら、核酸研究、22：8390 項（1989 年））、キレックス（chelex）及びその他煮沸法（Walshe ら、バイオ/テクニーク 10：506～513 項（1991 年））並びに固相結合及び溶出法（Vogels

50

teinとGillespie、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、76：615～619項（1979年））が挙げられ、これらの特許全ては、本願に参照によって具体的に組み込まれる。

【0005】

従って標的核酸の分析は3ステップから構成される：即ち生物試料からの核酸の抽出／精製、特異標的配列の直接プローブハイブリダイゼーション及び／又は増幅、並びにその特異的検出である。これら3ステップの従来のプロトコルは別々に実施されるので、その結果核酸の分析は手間のかかるものになっている。さらに各ステップを実施するには、様々な操作、装置及び試薬が必要である。現状の方策に対するその他の懸念は、試料の2次汚染の可能性である。例えば同時に取り扱っている試料間或いは、前もって増幅されたサンプルからの2次汚染である。 10

【0006】

分析を目的とする場合、追加の確認用検体を入手することが、たとえ不可能ではないものの困難であるため、極少量の検体から核酸を抽出しなければならないということがたびたびある。例としては、犯罪現場証拠の分析や臨床試験向けの細針生検などがある。従ってこのような例では、核酸検体のサイズによって遺伝子鑑定やレプリカ試験による確認の程度が限定されている。この様な少量検体に従来の抽出プロトコルを用いると、核酸を失ってしまったり、1回或いは数回だけの増幅分析が可能であるような収量しかないということが起り得る。

【0007】

固相へDNAを結合させ、続いてそこからDNAを溶出する条件はBoom（米国特許第5,234,809号、これは参照によりここに組み込まれている）やWoodard（米国特許第5,405,951号、米国特許第5,438,129号、米国特許第5,438,127号、これらは全て参照によりここに組み込まれている）によって記載されている。具体的には、DNAは電気陽性又は親水性である固相に結合する。電気陽性元素はヒドロキシル（-OH）或いはその他の基により十分に親水性にすることができ、その結果DNAと強固に結合する固相マトリックスができるが、この固相マトリックスにはタンパク質或いは阻害物質とは結合しない。通常、精製方法は結合した核酸の溶出を必要とするため、核酸は結合するものの実質的に完全な溶出が不可能な固相マトリックスはDNA精製には不向きであると報告されている。実際、十分な親水性を有し、適度に核酸を結合しながら、それより核酸を溶出することができる固相マトリックスを得ようと多くの努力が払われてきた（例えばいずれもWoodardに付与され、この参照によりここに組み込まれている米国特許第5,523,392号、第5,525,319号及び第5,503,816号を参照）。 30

【0008】

上記のブームは、高カオトロピック塩を使用し、可逆的にシリカにDNAを結合する固相DNA増幅を記載している。しかし、核酸は実際にはシリカ結合DNAを増幅反応緩衝液中に加える時にシリカより溶出する。従ってこのブームの方法による増幅は溶液内で起こっており、固相上で起こるものではない。更に核酸は増幅前に固相から溶出されるため、増幅は1回しか行われない。 40

【0009】

Del Rioら、バイオ／テクニク20：970～974項（1996年）は、反復増幅を可能にする、核酸の取り込みフィルタについて記述している。

しかし彼らは不可逆的な結合の仕組みを記載しておらず、そのため高濃度の核酸分析にのみ推奨されるものであり、そして限られた分析回数にのみ推奨されるものである。

【0010】

核酸の精製及び／又は抽出とその他の核酸分析工程及び／又は操作とを直接統合し、分析手順及び方策を簡素化すること、並びに相互汚染のリスクを減らし、そして／又は取り除くことは有益だろう。更に、プローブハイブリダイゼーション又は増幅プライマをアニールするために、一本鎖核酸を生成するのに必要な融解ステップを除去することも有益であ 50

ろう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

このような背景より、本発明は核酸精製及び／又は抽出と、その他の核酸分析及び／又は操作に関する方策を相互作用させる方法を提供する。

【0012】

本発明は更に直接固相核酸操作法及び／又は分析法も提供するが、この方法では操作及び／又は分析は核酸を固相から溶出することなしに行われる。本発明は核酸が高親和性を有する固相材料を得るために、親水性が付与された１又はそれ以上の高電気陽性元素よりなる固相材料の仕様を包含する。

10

【0013】

本発明は更に試料から核酸を抽出して強固に結合させ、核酸を取り外せないようにアーカイブする方法も提供する。

【0014】

本発明の方法では、マトリックスに結合した核酸を繰り返し分析し、そして／又は操作することができ、この時結合した核酸が分析中に変化することも消耗することもない。

【0015】

本発明はまた生物試料中から低濃度で高流量の核酸を捕捉して強固に結合する方法も提供する。

20

【0016】

本発明は、いかなる溶融ステップを行うことなく、二本鎖核酸を一本鎖核酸に変換する新規な機構を提供する。

【0017】

従って、本発明の実施態様の１つは、酵素認識、ハイブリダイゼーション及びプライマの依存増幅を含むが、これらに限定されない直接固相操作及び分析をする核酸に、強固に結合する固相マトリックスを使用する方法であって、操作及び分析を繰り返す間、核酸を固相マトリックスから洗い流さない方法を提供する。

【0018】

本発明は更に各種基材の表面を本発明の固相マトリックスでコーティングする方法、及びその利用を提供する。

30

【0019】

本発明はまた、その表面を固相マトリックスで覆う基材からなる、少なくとも１種類の容器を含む、核酸分析又は操作用のキットを提供する。

【0020】

本発明のその他の特徴及び利点は、添付の図面と結びつけることで、本発明の原理を例示の形で説明している以下の詳細な説明より明らかになるであろう。

前記の概要説明及び以下の詳細な説明は典型的な例示と説明を目的とするにすぎず、請求する発明を制限するものではないと理解すべきである。

【課題を解決するための手段】

40

【0021】

本発明はRNA、DNA又はその他の核酸を固相マトリックスに強固に結合させる新規方法及びマトリックスに結合した核酸の使用に基づくものである。本明細書記載の方法により、固相マトリックスに直接結合した核酸をマトリックスから核酸を溶出せずに、核酸を長期間保存し、及び／又は繰り返し分析し、及び／又は拡大分析を行い、及び／又は複数操作を行うことができる。本明細書に開示された各方策は従来技術の持つ欠点を克服している。

【0022】

本発明のある実施態様は、固相材料に強固に結合した核酸の具体的な応用を示す。これら既知材料は、核酸がこの固相材料より溶出できないことから、従来当業者からは核酸分析

50

及び／又は操作には不向きであると考えられていた。更に、従来の方法に比べ、本発明のある実施態様での核酸の操作は、核酸が固相マトリックスにまだ結合した状態で行われる。

【0023】

より具体的には、本発明は水酸（OH）基又はそれ以外の基によって親水性を付与された1又はそれ以上の強い電気陽性元素を構成元素として含む固相マトリックスを使用し、結果として核酸に対し強い親和性を有する固相マトリックスを生成することを含んで成る。本明細書で用いる場合、用語「電気陽性」とは、電子を引きつける元素又は材料を意味する。本発明の目的に適した電気陽性材料の例としては、アルミニウム、チタン、ジルコニウム、ハフニウム、スカンジウム、イットリウム、ランタン、バナジウム、タンタル、クロム、モリブデン、タングステン、ホウ素、ガリウム、インジウム、ゲルマニウム、錫及び鉛から成るグループより選択された1又はそれ以上の元素を一般的に含む材料を挙げることができるが、もとよりこれに限定されるものではない。

10

【0024】

本発明の目的に好適な固相マトリックスとしては、上記電気陽性材料の酸化物を挙げることができるが、これに限定されるものではない。

例としては、アルファ酸化アルミニウム（ $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ）、ガンマ酸化アルミニウム（ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ）及び酸化アルミニウムの混合組成物（ Al_xO_y ）の薄膜を含む酸化アルミニウムを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。本明細書で用いる用語「混合組成物」とは、式 M_xO_y で表すことができ、式中の「x」及び「y」が化合物の元素組成を表し、「x」及び「y」は整数でも分数でもよい金属酸化物の各種組成物を構成要素として含む組成物を表す。例えば酸化アルミニウムの混合組成物は式 Al_xO_y で表される酸化アルミニウムの混合物を含んで成る。好ましいマトリックスの更なる例としては、酸化チタン（ Ti_2O_3 ）及び変性酸化ジルコニウム（ ZrO_2 ）が挙げられる。本明細書では用語「変性酸化ジルコニウム」は、塩酸や硝酸といった酸又は水酸化カリウムといった塩基にさらされ、加水分解表面組成を生成する酸化ジルコニウムを指す。

20

【0025】

本発明の固相マトリックスは核酸に対し高い親和性を有している。そのため適当な条件の下に本発明の固相マトリックスと接触した核酸は、このマトリックスと強固に結合するようになる。本明細書では用語「強固に結合」は、核酸が固相マトリックスに十分に結合し、結合した核酸の大部分が、結合した核酸の操作及び／又は分析中にもマトリックスに結合したままの状態を保つことを意味する。即ち、マトリックスに結合した核酸の極少量だけが、操作及び／分析中に、特定緩衝液条件下に固相マトリックスから遊離する。

30

【0026】

本発明は特定の応用を目的として、これら固相マトリックスへの核酸の不可逆的結合を活用する。強固に結合した核酸は、以下に詳しく説明し、実施例を示す様に、核酸操作及び／又は分析のために用意された反応混合物と直接接触させることができる。

【0027】

実施態様の1つでは、本発明は核酸を固相マトリックスに捕捉してから、結合核酸を繰り返し、及び／又は詳しく分析する方法を提供する（核酸アーカイブ）。本明細書に記載する強固に結合した核酸は室温に於いて、おそらくは無期限に安定している。従って本発明は、核酸保存の有益な方法を提供する。こうして保存した核酸は、その後必要に応じて分析し、又は操作することができる。このことは生物試料の量が限られている場合及び／又は代替が効かない場合、そして直後或いは元の試料の保管後のいずれにおいても再分析が有益な場合に役立つ。このような事態が発生する分野としては、例えば科学捜査、医学及び生物学的研究、家畜又はヒトの臨床診断、歯科学、環境、食品又は水中微生物学、並びに農業又はその他産業応用が挙げられる。

40

【0028】

別の実施態様では、本発明はDNAとRNAの両方を含むサンプルから、固相マトリックス

50

スにDNA又はRNAのみを結合する方法を提供する。例えば、DNAとRNAの両方を含むサンプルを、マトリックスがDNAのみ結合する条件下に固相マトリックスと接触させることを含んで成る、核酸をアーカイブする方法である。この実施態様では、上記の条件は、前記サンプルを固相マトリックスに接触させる前に、サンプル又はマトリックスに、グアニジンチオシアネートをベースとする緩衝液、アルカリ緩衝液、塩化リチウム、及びこれに限定されることはないがドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、Tween 20、Triton X-100、NP-40、N-ラウロイルサルコシン及びその他一般的な界面活性剤を含む界面活性剤をベースとする緩衝液、を含むグループから選択された緩衝液を加えることを含んで成る。

【0029】

或いは、本発明はまたDNAとRNAの両方を含むサンプルを、マトリックスがRNAのみを結合する条件の下に固相マトリックスと接触させることを含んで成る核酸のアーカイブ方法も提供する。この実施態様では、条件にはDNA分解試薬、例えばDNaseの様なDNA分解酵素を、緩衝液存在下にサンプルに加えて細胞を溶解すると同時にDNAを分解することを構成ステップとして含む。

【0030】

別の実施態様では、強固に結合した核酸により、結合核酸の手順操作の間に徹底的な水洗、緩衝液交換、容積の減少を可能にする。即ち、固相マトリックスは、水性緩衝液を用いて複数回洗浄した後でさえ大部分の核酸がマトリックスに強固に結合し続けるのに十分な強さで核酸を結合する。この様にして、本発明は緩衝液交換と容積の減少に好都合な手順を提供する。

【0031】

別の実施態様では、本発明は核酸の抽出と精製を核酸ハイブリダイゼーション及び/又は核酸増幅と直接結びつけるDNA及びRNAの新規の迅速捕捉法を提供する。

抽出は手法又は自動で実施できる。本明細書では「核酸ハイブリダイゼーション」には(a)マトリックスに結合した核酸プローブとサンプル中に存在する標的核酸とのハイブリダイゼーション、(b)マトリックスに結合した標的核酸とプライマ核酸とのハイブリダイゼーション、及び(c)マトリックスに結合した標的核酸とプローブ核酸とのハイブリダイゼーションが包含される。

【0032】

例えば、本発明の実施態様の1つは、(a)1又はそれ以上の標的核酸を含むサンプルを本発明の固相マトリックス及び標的核酸配列(1つ又は複数)を一本鎖の核酸の形でマトリックスと強固に結合するようにさせる緩衝液と接触させること；(b)マトリックスに結合した標的核酸をプライマ核酸配列の1セットと緩衝液とに接触させて、このプライマのセットをマトリックスに結合した標的核酸とハイブリダイゼーションさせること；及び(c)標的核酸(1つ又は複数)を増幅して、その中で標的核酸配列がマトリックスと強固に結合し続けている増幅反応混合物を生成すること含んで成る。

【0033】

固相増幅の実施態様の1つでは、標的核酸配列がマトリックスに強固に結合するようになる緩衝液が用いられる。この様な緩衝液の例としては、グアニジンチオシアネートをベースとする緩衝液、アルカリ緩衝液、塩化リチウム、及びこれに限定されることはないがTriton X-100、NP-40、NP-ラウロイルサクロシン、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、Tween 20及びその他一般的な界面活性剤を含む界面活性剤をベースとする緩衝液を挙げることができるが、これに限定されるものではない。また、リン酸緩衝液については、固相マトリックスへのプライマ配列の結合を減らし、その後の消失を効果的にすることが知られている。

【0034】

別の実施態様では、2又はそれ以上の種類の標的核酸を固相マトリックスに結合し、この標的核酸を連続して増幅する。

【0035】

10

20

30

40

50

本発明の方法による高親和性固相マトリックスを用いて二本鎖DNAを捕捉する場合には、核酸を二本鎖の核酸として水性の生物試料又は緩衝液から直接捕捉してもよい。或いは、場合によってはDNAを固相マトリックスに一本鎖DNAとして捕捉する必要がある。従って本発明は以下詳細に記載するように、緩衝液の状態を変更し、マトリックスに二本鎖DNAを一本鎖DNAとして結合させる方法を包含する。

【0036】

例えば一本鎖の形で核酸を結合することは、ハイブリダイゼーション法及び/又は等温増幅法と整合させるのに必要である。

即ち、標的核酸が二本鎖DNAの場合、サンプルをアルカリpH又は高カオトロピック塩濃度に調整すれば、二本鎖の核酸を一本鎖の核酸として固相マトリックスに結合することができる。 10

【0037】

様々な核酸増幅法が本発明の直接固相核酸増幅に好適である。そのような方法としては、PCR、SDA、NASBA、IsoCR、CRCA、Qベータレプリカーゼ、分枝鎖DNA及びRT-PCRが挙げられるが、これらに限定されない。この種の方法は当業者に周知であり、更に詳しい説明を要しない。更に本発明には「巻き戻しコイル(unwinding coil)増幅法」(又は「UNCA」)を応用してもよい。「巻き戻し増幅法」は2001年6月19日に出願され、「巻き戻しコイル増幅とその利用方法」と題された、参照によりここに組み込む係属出願中の米国特許仮出願番号60/299,410号に開示されている。簡単に説明すると、この方法は同一配列が多数繰り返し一列に並んだ環状の鋳型より長い増幅生成物を形成している点で、ローリングサークル型の増幅法に似ている。しかし巻き戻し増幅はローリングサークルと鋳型が環状ではなく直鎖状のDNAである点で異なっており、そのDNAがそれ自体の上に巻き戻って、その分子の両端同士がハイブリダイゼーションした時にだけ環状になる。 20

【0038】

固相マトリックス上にある標的核酸配列を増幅する本発明の方法には、更にマトリックスに結合したサンプルが複数の標的核酸配列を含んでいる方法もある。この方法では、標的核酸は、参照によりここに組み込む2000年6月6日出願の「マルチプレキシング(Multiplexing:多重)増幅反応法」と題するGerdesらによる係属出願中の米国特許出願番号09/589,560に記載の方法で前増幅される。ゲルデスらの方法では、2ステップの多重増幅が行われ、第1ステップでは標準的な第1多重増幅反応を行って、標的中のサンプルコピー数を「ブースト」して100から1000倍に増加させる。複数の標的配列を前増幅するこのステップは、本発明の方法による固相上で直接実施される。さらに、複数の標的配列を同時に増幅する。前増幅ステップ後、増幅生成物を分け、最適化された第2の単一固相増幅反応にかけられるが、各反応混合液は第1又は多重ブーストステップで以前に使用されたプライマセットの1つを含む。 30

【0039】

発明の別の実施態様は、固相に結合した、一本鎖又は二本鎖いずれかの標的核酸を直接分析するための新規の方法を提供する。この実施態様の例の1つとしては、サンプル中に存在する標的核酸の決定及び/又は定量化が挙げられる。より具体的には、本発明の別の実施態様は、(a)プローブが固相マトリックスに強固に結合できる条件下に標的核酸の特定配列に相補的である核酸配列を含んで成るプローブと固相マトリックスとを接触させること;及び(b)標的核酸がマトリックスに結合したプローブとハイブリダイゼーション可能な条件下でマトリックス結合プローブとサンプルとを接触させることにより標的核酸をプローブで捕捉することを含んで成る、サンプルから標的核酸を捕捉する方法を包含する。この捕捉法では、固相マトリックスへの標的核酸の結合を低下させるが、標的核酸とマトリックス結合プローブとの結合は可能であるリン酸緩衝液を用いてもよい。 40

【0040】

そうすると当業者周知の方法によりハイブリダイゼーションした標的を検出及び/又は定量化できる。検出及び/又は定量化後、複合体を解離し、マトリックスを洗浄して標的核 50

酸を取り除くことができる。この全ての操作の間も核酸プローブはマトリックスに強固に結合し続けており、従って繰り返し利用できる。この方法はマイクロアレイ、ラボオンチップ (l a b - o n - a - c h i p) システム及び自動ロボティクスへの応用に特に好適である。

【 0 0 4 1 】

血液の様な高レベルの内因性又はバックグランド核酸を含む検体では、低レベルの特定の存在を分析することは極めて難しい。それ故に、本発明の別の実施態様は固相マトリックスを利用してこの様な検体中の低濃度核酸を不可逆的に捕捉する方法を提供する。この方法は、緩衝液状態を変更して固相材料が高濃度のバックグランド核酸が存在する場合でも標的配列を選択的に捕捉できるようにすることを含んで成る。従ってこのプローブハイブリダイゼーションの実施態様は、高感度を得るために低いバックグランドを要求するマイクロアレイハイブリダイゼーションの様な商業応用に最適な高い厳密性を提供する。

10

【 0 0 4 2 】

更に別の実施態様では、本発明は大容積の検体から核酸を捕捉及び/又は濃縮する、又は水性緩衝液又は溶液より汚染核酸を除去する手段としての重力若しくは高流速固相クロマトグラフィを可能にする。より具体的には、本発明の実施態様の1つは、本発明の固相マトリックスの上にサンプルを流し込むか又はその上を通過させることにより、サンプルから低濃度且つ高流速で核酸を捕捉し強固に結合する方法を提供する。この方法では、核酸はマトリックス上に強固に結合し、その上に濃縮するが、サンプル中の不要成分はマトリックスから洗い流される。実施態様の1つでは、サンプルは約 0 . 5 m L / 分から 2 m L / 分の間の速度でマトリックス上を流れる。結合した核酸は、固相から溶出すること無しに水性緩衝液で徹底的に洗うことができ、精製核酸がもたらされる。

20

【 0 0 4 3 】

当分野ではこれまでRNAの高親和性固相マトリックスへの結合特性は研究されてこなかった。本発明の別の局面は、RNAが本明細書記載の固相マトリックスに強固に結合することを示す。本発明は更に、マトリックスに結合したRNAを増幅する方法及びマトリックスに結合したRNAの安定した保存を提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明の方法はまた核酸抽出の自動化、高容積検体からの低コピー核酸の濃縮、及び抽出と精製を増幅又はハイブリダイゼーション核酸捕捉と結びつけることを目的とする商業応用にも有益である。

30

商業的用途としては、ロボットによる自動化が効果的である高処理型核酸検査、又はプール検体を検査することで罹病率が低い標的を経済的にスクリーニングすること等が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

本発明は高流速で核酸を迅速に捕捉し、強固に結合する方法を記載する。結合は、たとえ大容積及び/又は低標的濃度でも、DNA及びRNAの両方で起こる。強固に結合した核酸は、固相マトリックスからの核酸の重大な遊離なしに、厳格な水洗浄にかけ、その後の分析用に保管し、繰り返し増幅又は分析し、或いは操作することができる。緩衝液での度重なる洗浄、ハイブリダイゼーション反応、増幅反応等の後でも核酸は固相に結合し続けることから、核酸は何度でも分析することができる。核酸の固相での繰り返し操作は、本発明の方法及び当業者周知のその他の核酸操作法により達成できるだろう。本発明の方法により同一核酸検体を繰り返し分析できる能力は、結果確認及び拡大分析の手段を提供する。

40

【 0 0 4 6 】

ハイブリダイゼーション及び増幅を含む操作に関する一般原理及び条件は当分野周知である。方法の細目は、本発明の特定の応用に影響されることなく、当業者周知の操作手順及び本明細書記載の手順に従い計画される。これら必要な計画を改良することは、特段の実験なしに当業者により日常行われている。

【 0 0 4 7 】

50

当業者は本明細書記載の様な、固相マトリックス上への核酸の強固な結合は、広範囲のサンプルに実施できることを理解するだろう。この様なサンプルとしては、農業、細菌及びウイルス、及びヒト若しくはその他動物からもたらされる生物サンプル、並びに廃水若しくは飲料水、農産物、加工食品及び空気等が挙げられるが、これらに限定されない。より具体的には、サンプルとしては、例えば血液、便、痰、粘膜、頸部又は膣検体、脳脊髄液、血清、尿、唾液、涙、生検サンプル、組織学組織サンプル、組織培養生成物、培養細菌、農産物、環境サンプル、廃水若しくは飲料水、加工食品、及び空気が挙げられる。本発明は、天然又は汚染物を問わず、核酸を含むサンプルより固相マトリックス上に核酸を不可逆的に結合するのに有用である。

【0048】

本発明は更に、基材表面を本発明の固相マトリックスでコーティングする方法を包含する。このような基材としては、ポリマ（例えばプラスチック）やガラスなどの酸化物材料が挙げられる。これら基材の形状としては、チューブ、プレート、膜、毛細管、スライド、ビーズ、微小粒子、ファイバ、マイクロチャネル及びマイクロアレイなどが挙げられるが、核酸アーカイブ、分析、及び／又は操作に好適であればいかなる形状でもよく、これらの形状に限定されない。従って、上記いずれの方法による核酸のアーカイブ、直接固相分析及び／又は操作は、本明細書記載のように調製されたコーティング表面及び基材を利用して実施できる。

【0049】

標準的なPCRチューブのようなポリマ基材に固相マトリックスをコーティングする方法の1つに、接着剤を使用する方法がある。しかし接着剤は、増幅反応、特に低コピー数を検出する必要があるアッセイでの増幅反応を阻害する場合がある。従って、本発明は接着剤中に存在しうる増幅阻害物質を排除しつつ、固相マトリックスをポリマ又はプラスチック表面に接着するための改良方法を提供する。プラスチック表面はポリマで形成されるいかなる表面でもよく、ポリマから作られたチューブ、プレート、膜、ビーズ、微小粒子、マイクロチャネル、マイクロアレイやその他の好適な形状を包含する。ポリマ基材のコーティングに関する本発明の方法は実施例13に詳しく記載されている。

【0050】

上記ポリマに加えて、本発明は更にガラス（二酸化ケイ素）又は酸化アルミニウム若しくは二酸化チタンなどの他の酸化物基材を、本明細書記載の固相マトリックスでコーティングする方法も提供する。核酸操作に使用するものは、ガラス又は酸化物基材のいかなる形状でも好適であり、ガラス毛細管、ガラスファイバーフィルタ、顕微鏡用スライド、多孔性ガラスウール及びアルミナフィルターなどが例として挙げられるが、これらに限定されるものではない。固相マトリックスのコーティングは、実施例14に詳述するいくつかの方法により、毛細管、スライド及びその他の形状をしたガラス表面、及びその他の酸化物表面上に付着できる。

【0051】

本発明は更に、本発明による核酸のアーカイブ、分析及び／又は操作するためのキットも提供する。キットは一般に、固相マトリックスで1つ又は複数の表面をコーティングしたポリマ又はガラスなどの基材を構成要素として含む。この基材は核酸操作に好適ないずれの形状でもよく、PCRチューブ、プレート、ビーズ、膜、ビーズ、マイクロチャネル、マイクロアレイ等が挙げられるが、これらに限定されない。好適な固相マトリックスとしては、本発明に従って親水性を得たいかなる電気陽性材料でもよく、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）、アルファ酸化アルミニウム、ガンマ酸化アルミニウム、薄膜酸化アルミニウム混合組成物（ Al_xO_y ）、酸化チタン（ Ti_2O_3 ）、修飾酸化ジルコニウム（ ZrO_2 ）等が包含されるが、これらに限定されない。固相マトリックスは実施例14記載の方法に従ってポリマ又はガラスの表面上にコーティングできる。

【0052】

キットは更に核酸操作及び／又は分析に必要な試薬の入った1つ又は複数の容器を構成要素として含んでも良い。

10

20

30

40

50

このような試薬の例としては、溶解緩衝液、洗浄緩衝液及び側法流動緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】

本発明のキットは手動操作に好適であるが、自動或いは半自動工程へも組込まれる。別のキット組立体は、ロボットを使った大量処理及び分析に好適である。

【0054】

実施態様の1つでは、キットは(a)その内面が酸化アルミニウムでコーティングされた1つ又は複数のPCRチューブ、並びに(b)溶解緩衝液及び洗浄緩衝液の入った1つ又は複数の容器を構成要素として含む。キットは更にキットの使用に関する取扱説明書を含んでも良い。本実施態様のキットは、核酸が抽出チューブ内に結合したまま残り、同一チューブ内でその核酸を直接増幅できる核酸抽出に関する革新的なシステムを提供する。

10

【0055】

プロトコルは、増大する様々な標的分子、及び全血、パフィーコート、尿、培養細胞、菌細胞、マウスの尾及び頬側スワブを含む様々なタイプのサンプルで評価されている。

【0056】

本明細書では様々な用語が使用されているが、それらを定義することは有用であろう。これらの用語については以下に定義するが、これらの用語が次の例や本明細書の中で使用される場合には、その定義を念頭に置く必要がある。

【0057】

本発明では用語「アーカイブ」は、核酸を本発明の固相マトリックスに強固に結合し、続いて結合した核酸を保存及び/又は操作する方法を意味する。「保存」は、同一の核酸を時間を置いて分析する場合と、繰返し分析する場合の双方の能力と、複数の標的核酸を同時に、又は連続的に拡大分析する能力を包含する。この場合の操作方法としては固相核酸酵素反応、オリゴヌクレオチドもしくはプローブのハイブリダイゼーション及び/又は核酸増幅反応が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0058】

本発明で使用する場合、「鋳型依存的工程」は特定プローブを利用した鋳型依存的認識、シグナル増幅反応を利用したコピー操作、又は鋳型依存的プライマ分子の伸長を利用する標的増幅を含む工程と定義される。鋳型依存的伸長とは核酸の合成及び標的のRNA又は、DNA配列のコピー伸長を意味するが、この場合新たに合成される核酸鎖の配列は標的核酸とプライマとの相補的な塩基対合の規則によって規定される。特定配列を持つオリゴヌクレオチド又はプローブを特異的に用いる、相補的塩基対合に基づく鋳型依存的工程は「ハイブリダイゼーション」検出として知られている。

30

【0059】

「プライマ」分子とは、標的配列/コントロール配列の既知部分に対し相補的であり、DNAポリメラーゼ又はその他のポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、又はその他の核酸依存酵素による合成開始に必要な核酸配列を意味する。

【0060】

「標的核酸配列」、「標的核酸」又は「標的」とは、捕捉、検出、増幅、操作及び/又は分析の対象となる核酸を意味する。標的核酸は精製した、或いは部分精製した状態、又は未精製の状態でサンプル中に存在しうる。

40

【0061】

「核酸」とは、分離した断片又はより大きな構造体の成分のいずれかの形状をとりうる、2個以上の修飾及び/又は未修飾デオキシリボヌクレオチド或いはリボヌクレオチドのポリマーである。ポリヌクレオチドの例としては、DNA、RNA又はPNA(ペプチド核酸)の様なDNA類似体、及びその化学的修飾物が挙げられるが、これらに限定されない。DNAは一本鎖又は二本鎖のDNA、cDNA、又は増幅技術により増幅されたDNAでもよい。RNAはmRNA、rRNA、tRNA、リボザイム、又はいずれかのRNAポリマーでよい。

【0062】

50

1つの実施態様においては、用語「捕捉」は、核酸分子の固相マトリックス上への直接結合を意味する。結合は適切な緩衝液の中で、核酸の持つ化学的及び/又は物理的特性に基づいて直接行うことができる。

或いは、用語「捕捉」はサンプル中に存在する標的核酸とマトリックスに結合した核酸プローブとのハイブリダイゼーションを意味する。

【0063】

本発明は、核酸を強固に結合する材料にDNA及びRNAを結合することと、固相に結合したDNA及びRNAの各種利用を目的としている。この中には、固相捕捉のために、強固に核酸を結合する酸化アルミニウム又はその他の材料の使用が含まれる。この方法は、固相捕捉と、水性緩衝液、単一増幅反応又はハイブリダイゼーションに基づく反応と、連続する多重増幅反応又はハイブリダイゼーションに基づく反応の使用を含む様々な操作とを直接結びつけるものである。さらに、核酸捕捉は汚染核酸の除去、或いは大容積検体又はプール検体分析のいずれかの検出を目的とした低コピー核酸の濃縮の用途に好適である。

10

酸化アルミニウムは、低濃度及び高流速、例えば5mL/分の核酸でも結合できる十分な親和性を示す。このように本発明は大容積の、重力を利用した又は高流速の捕捉、並びに増幅反応を妨害する可能性のある阻害物質を含まない、極めて清浄な核酸を得るための徹底した水洗に適合した形の核酸の捕捉に有用である。

【0064】

本明細書に開示するハイブリダイゼーション反応は、固相マトリックス上に捕捉されたオリゴヌクレオチドプローブへの標的核酸の直接ハイブリダイゼーションを包含するが、この場合マトリックスはビーズ又はプロット又は、マイクロアレイチップのような平坦な表面の形状でよい。ハイブリダイゼーションは更に最初に捕捉プローブ（例えばオリゴヌクレオチド、cDNA、クローン化プラスミド、転写又は、合成RNA、又はPNA）を固相マトリックスに強固に結合し、続いて検体から相補的な標的配列を捕捉することによる、特定標的配列の特異的捕捉も包含する。この方法は非特定核酸のバックグラウンドレベルが高い複合検体を分析する場合特に有用である。捕捉ビーズ法は、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）に結合したポリ-Tオリゴヌクレオチドを利用してポリAメッセンジャーRNAを精製するなどの特定標的配列の捕捉に有用である。適切な捕捉オリゴヌクレオチドを利用することにより、様々なタイプの検体からいかなる特定標的核酸も選択的に除去し、濃縮することができる。

20

30

【0065】

本発明により、固相に強固に結合した核酸を用いた酵素認識及び特定操作又は増幅反応が可能になる。これには、PCR、RT-PCR、SDA、NASBA、IsoCR又はCRC Aなどの標的増幅反応とQベータレプリカーゼ、又は分枝鎖DNA（本明細書に具体的に引用した、Urdea他に付与された米国特許第5,594,118を参照。）などのシグナル増幅反応の両方が包含される。本発明は更に標準的なPCRチューブの反応表面に付着した結合基材としての酸化アルミニウムを取り込む方法、及び同一のPCRチューブを用いてPCRのサーマルサイクル反応と直接且つ簡便に接続する高速核酸抽出プロトコルも提供する。ハイスループットロボット工学を利用することで、PCRチューブ又は容器は、自動化のプラットフォームを提供する。

40

【0066】

酸化アルミニウムを別の核酸応用で利用可能にする緩衝液システムも本発明の範囲内に含まれる。この種の緩衝液システムとしては、例えばクリプトスポラジウムパルヴム（*Cryptosporidium parvum*）のような極度に硬い検体を破壊する特定の還元剤も含むチオシアン酸グアニジンベースとする緩衝液が挙げられる。本発明の目的に適したその他の緩衝液システムには、迅速且つ経済的なDNA結合緩衝液を提供する、NaOHのようなアルカリ性緩衝液が挙げられる。NaOH緩衝液中で、RNAは破壊される。従ってNaOH緩衝液の使用は、DNAのみの選択的に結合する手段を提供する。本発明の目的に適した更に別のシステムには、リン酸緩衝液など、核酸の酸化アルミニウ

50

ムへの結合を低減する緩衝液がある。これらの緩衝液システムは、高感度で効率的なマイクロアレイ、ビーズ及びプロットハイブリダイゼーションに、シグナル対ノイズが低いバックグラウンドを提供する。

【0067】

本発明の固相マトリックスの強固な結合特性は、同一又は異なる遺伝子の連続的な繰返し分析を提供する。これにはDNAとRNA双方の同時分析、又はDNAとRNAの個別で連続的な分析が包含される。ハイブリダイゼーション捕捉は複数のプローブを結合することで、特定標的のために多重化される。即ち本発明はハイブリダイゼーション反応、又は増幅反応による核酸の繰返し又は連続分析に有用である。ひとたび強固に結合すると核酸は安定化し、室温、冷蔵又は冷凍して長期間保存できる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0068】

当業者は本発明が核酸抽出、精製及び検出に広範囲に応用可能であることは容易に認識できる。以下実施例は本発明を説明、例示するものであり、従って本発明にいかなる制限を加えるものではない。様々な変更が発明の範囲内に於いて可能である。

【実施例1】

【0069】

方法と材料

DNA結合は³²P放射能標識を使用して測定した。New England Biolabs社より得た4361塩基対長のPBR322プラスミドを、Prime-ItIIストラタジーンキットを使用してランダムプライム法により標識した。このプラスミドをHindIIIで切断し、未標識のヌクレオチドをBioRad Biospin6を使用して除去し、濃度を1ナノグラム/マイクロリットル(ng/μL)に調整した。より高いDNA濃度はサケ精子DNAを加えて調整した。放射能標識実験のデータは5回のレプリカデータの平均値を表している。

20

【0070】

Aldrich社より得た酸化アルミニウムビーズ(サイズ、74~149μmカタログ番号34、265-3)を室温で1時間0.1NのNaOHで処理し、水酸化アルミニウムビーズを生成した。水(ddH₂O)、0.1NのNaOH又は4Mのチオシアン酸グアニジン緩衝液(12gのGuSCN、277μLのTritonTMX-100、2.2mlの0.2MEDTApH8.0及び10mlの0.1MのTris-HClpH6.4)を含むDNA結合バッファーを用いた。結合は密封した微量遠心チューブ内での回転と、重力フロー濾過のいずれでも可能である。大型のビーズは遠心分離しなくてもチューブ底に容易に沈殿するので、洗浄が容易である。重力フロー実験ではSpectrum SpectraMesh 43μmフィルタ(Spectrum社、カタログ番号146530)をANSYS 4mMクロマトグラフィーカラム内に圧入した。水酸化アルミニウムビーズをこのカラム内にスラリー液の形で充填し、排水して、吸い取り紙で水を取り、1mlの70%のEtOHで1回洗浄し、乾燥させてから各種結合緩衝液に加えたDNAを添加した。

30

【0071】

XtraBindTM(Xtrana, Inc.、ブルームフィールド、コロラド)は、α-酸化アルミニウム(α-Al₂O₃)の固相マトリックスである。XtraBind AmpTM(Xtrana, Inc.、ブルームフィールド、コロラド)は内壁表面をXtraBindTMでコーティングしたPCRチューブである。

40

【0072】

固相増幅では、座に好適な特性を持たせるために、公開されている配列及び方法を使用した。以下記載の実験手順で使用している配列を表1に掲載した(配列番号1~10)。具体的には、HIVのPCRではSK38/SK39プライマセット(配列番号8~9; Kelllog and Kwok、PCRプロトコル内:方法及び応用ガイド、MA. Innis他 編集、Academic Press Inc. 337~347項(199

50

0 年)、これら具体的な本明細書への引用記載を参照)、Perkin Elmer 社より得たコントロール HIV DNA プラスミド (カタログ番号 N808-0016) 及び rtTH 逆転写酵素増幅を使用した。鎖置換増幅ではマイコバクテリウムプラスミドを標的とし、Walker 他、Clinical Chemistry、42 巻: 9~13 項 (1996 年) に記載 (具体的な本明細書への引用記載を参照) のプライマセット (配列番号 4~7) を用いた。ヒトのショートタンデムリピート (STR) プライマセットとプロトコルは Promega 社より市販されている CTT 及び FFV マルチプレックスである。

【0073】

【表 1】

ID	配列	配列番号
CPSR805F	GAGGATAGAGGCATTTGGTTG	1
CPSR948R	GTTTTGTAGGGGTCGCTCAT	2
CPSR100cap	CTATATCGTAATACGCTCTGATTACGT AGGGAGTGG TACTCCTAACAGTAGGCCTCTGATTTG TCAGTCGACA TACCGCTGCGCTCAAATCCTTTTAGAA	3
B1	CGATCGAGCAAGCCA	4
B2	CGAGCCGCTCGCTGA	5
S1	ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGTAA GGCGTACTC GACC	6
S2	CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGTGT ACTGAGATCC CCT	7
SK38	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAA T	8
SK39	TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATG C	9
HIVcap	ATCCTATTTGTTTCCTGAAGGGTACTAG TAGTTTCCTGC TATGTCACCTTCCCCTTGGTTCTCTCAT CTGGCCTGGT GCAATAGGCCCTGCATGCACTGGATG	10

【実施例 2】

【0074】

DNA が固相マトリックスに強固に結合することの確認

放射能標識 DNA (1 ng) は室温で 1 時間、水 (ddH₂O)、0.1 N の NaOH 又は 4 M のグアニジンチオシアネート緩衝液中で、回転しながら酸化アルミニウムと結合することができる。198 mg の酸化アルミニウムの結合能力を測定するために、1 ng の放射能標識 DNA を各種濃度のサケ精子 DNA に加えた (図 2)。サケ精子 DNA の量を増やしていくと、やがて DNA 結合は最大値に達し、液相の DNA はそれ以上結合できなくなるために、結合 DNA の割合は次第に減少する。この DNA 結合の不可逆性は、続く 10 回の洗浄後に除去された放射標識を測定することで示される (図 3)。図 3 に示すように、95 の PCR 緩衝液で 10 回洗浄した後でも、92% を越える DNA は強固に結合したまま保持される。溶出した数値の大部分 (6%) は最初の 4 回の洗浄中に生じたものであり、残り 6 回の洗浄で溶出された数値は 2% に過ぎなかった。従って、図 3 のデータより DNA が酸化アルミニウムに強固に結合し、95 での 70% エタノール、水又は

10

20

30

40

50

P C R 緩衝液による 10 回の洗浄でも 90 % を越える D N A が保持されることが示された。従って酸化アルミニウムに結合した D N A は遠心分離にかかることなく、また D N A を損失する恐れなしに、簡単に水洗浄及び緩衝液交換に従う。

大容積のサンプルから選別した固相に結合した核酸は、洗浄してから所望の容積に再懸濁することができる。例えばグアニジンチオシアネート緩衝液を含む 3 ミリリットル (m L) のサンプルから D N A を酸化アルミニウムに結合し、リン酸又は T r i s 緩衝液で洗浄してから少量 (50 μ L) の増幅反応混合液内にビーズを再懸濁することができる。この特性により、D N A の精製と増幅とを簡単に結びつける方法が導かれる。

【実施例 3】

【0075】

重力フロックロマトグラフ

大容積かつ低濃度の検体から D N A を検出する感度は、高速のフロックロマトグラフィーにおける酸化アルミニウムの効率的な D N A 結合能力を利用して、大幅に改善することができる。74 ~ 149 μ m の酸化アルミニウムビーズ (A l ₂ O ₃) 或いは 150 ~ 212 μ m の二酸化ケイ素ビーズ (S i O ₂) (シグマ社、カタログ番号 G 1 1 4 5) を使用した重力濾過にかけ、放射能標識 D N A を結合した。二酸化ケイ素又は酸化アルミニウムの量は、D N A 結合に利用可能な表面積が共に同じになるように調整した。1 m L のグアニジンチオシアネート結合緩衝液 (流れ時間、1.5 ~ 2 分、約 0.5 m L / 分) 又は 10 m L のグアニジンチオシアネート緩衝液 (流れ時間、5 ~ 8 分、約 2 m L / 分) に希釈して重力濾過中に D N A (50 n g) を結合した。図 4 は、二酸化ケイ素に結合する D N A と、二酸化アルミニウムに結合する D N A それぞれに及ぼす流速と濃度の影響を比較したものである。1 m L 容積の重力フロックロマトグラフィー中の D N A 結合には、酸化アルミニウムがより効果的であった。4 M グアニジンチオシアネート結合緩衝液中の二酸化ケイ素 (S i O ₂) の結合効率は 6 % であったのに対し、同一緩衝液中での酸化アルミニウム (A l ₂ O ₃) の効率は 52 % であった。

S i O ₂ と A l ₂ O ₃ の結合効率は共に 1 m l の N a O H 結合緩衝液で改善した (S i O ₂ の結合効率は 12.4 % であり、これに対し A l ₂ O ₃ の結合効率は 60 % であった) 。容積を 10 m L にして流速を 4 倍に上げ、同一の D N A 50 n g (即ち 1 m L 当たりの濃度は 1 m L 検体に比べ 10 分の 1 になる) を使用すると二酸化ケイ素の結合効率は大幅に低下し、2 % 未満となった。これに対し酸化アルミニウムの場合、測定総回収率中の低下は 10 % に過ぎなかった。他の実験方法では、大容積検体を 2 回又は 3 回通過させてクロマトグラフィを繰り返すと、酸化アルミニウムについては最高で 80 % の結合効率を得られることが示された。(データ非掲載)

これらの結果から、酸化アルミニウムが二酸化ケイ素に比べて D N A 結合固相として遙かに優れており、D N A は高流速、低濃度の D N A クロマトグラフィで捕捉できることがわかる。

このように酸化アルミニウムの特性を利用することで、プールされた、或いは大容積の検体から D N A を濃縮することができ、ミリリットル当たりの D N A 検出感度を大幅に上げることができる。また D N A に対する酸化アルミニウムの高親和力は、水、緩衝液又はその他の試薬からの低レベルの汚染 D N A の除去にも有効である。

【実施例 4】

【0076】

固相増幅

酸化アルミニウムは核酸を強固に結合するため、酸化アルミニウムは結合した D N A が固相上で直接増幅可能な場合にのみ有益である。様々な増幅法に適応することを例示するために、10⁶ コピーの H I V D N A と 1 μ L のマイコバクテリウム D N A 標本を同時に水中にて酸化アルミニウムと結合した。これら結合した標的 D N A を次に H I V の配列について、まず 35 サイクルのポリメラーゼチェーンリアクション (P C R) (図 5 のパネル (A) 参照) を用いて増幅し、次に鎖置換増幅 (S D A) を用いて標的マイコバクテリアの増幅 (図 5 パネル (B) 参照) を行った。図 5、パネル (A) に示す H I V P C R

10

20

30

40

50

のエチジウムブロマイド (E t B r) 染色アガロースゲルは良好な増幅産物を示している。図 5 のパネル (A) の中のウエル 1 は分子量ラダーであり、ウエル 2 及び 3 は陽性の 1000 コピー水を用いたコントロール増幅であり、ウエル 4、5、6 及び 7 は酸化アルミニウム固相 P C R 増幅であり、ウエル 8、9、10 及び 11 は酸化アルミニウム固相の陰性コントロールであり、ウエルの 12 及び 13 は陰性コントロールである。H I V の P C R 増幅に続いて、この酸化アルミニウムを 4 回 70 % E t O H で洗浄し、55℃で 10 分間乾燥してから標的マイコバクテリウムを S D A 増幅した。S D A 増幅の E t B r 染色アガロースゲルもまた、コントロール水に観察されたのと同レベルの増幅産物を示した (図 5、パネル (B))。図 5 のパネル (B) では、ウエル 1 及び 2 は陽性コントロール水であり、ウエル 3、4、5 及び 6 は酸化アルミニウム固相 D N A 増幅であり、ウエル 7、8、9 及び 10 は酸化アルミニウム固相の陰性コントロールであり、ウエルの 11 及び 12 は陰性コントロール水である。

10

【0077】

追加実験手順より (図示せず)、マイコバクテリウムプラスミド D N A は 4 M のグアニジンチオシアネート緩衝液、又は 0.1 N の N a O H 結合緩衝液を用いても結合すること、そしてこれら固相で S D A 増幅が起こることが示されている。

アルカリ条件は一本鎖を生成することが広く知られている。

D N A は 4 M グアニジンチオシアネート結合緩衝液中でも一本鎖である (トンプソンとギレスピー、分析生化学、163 巻: 281 ~ 291 項 (1987 年)、参照により本明細書への具体的記載に替える)。N a O H 又はグアニジンチオシアネート緩衝液中での酸化アルミニウムに結合した D N A の S D A 増幅は、溶解ステップなしに進む。これらのデータは、これら結合緩衝液中では D N A が一本鎖の形で結合しており、酸化アルミニウムを使った D N A 精製と一本鎖状の標的核酸を必要とする等、温増幅方法とを直接結びつける手段となることを確認するものである。

20

【0078】

酸化アルミニウムが R N A も効率よく結合できることを示すために、酸化アルミニウムと共に 4 M のグアニジンチオシアネート結合緩衝液を用いてエイズ患者の酸クエン酸塩デキストロース (A C D) 血漿検体から直接 H I V を精製した。この検体は既にウイルス負荷定量 P C R により 2×10^4 R N A コピー / ミリリットルの力価を持つことが分かっている。酸化アルミニウム抽出では、0.5 mL の血漿を 4 M のグアニジンチオシアネート結合緩衝液を用いて 5 mL に希釈してから、40 mg の酸化アルミニウムを用いて重力濾過した。

30

【0079】

図 6 は r t T H 逆転写酵素増幅後の E t B r 染色アガロースゲルで良好な P C R 産物形成が検出されたことを示している。図 6 ではウエル 1 は分子量ラダーであり、ウエル 2 は 1000 コピーの陽性 H I V D N A 水であり、ウエル 3、4 及び 5 は別々に行った 3 回のグアニジンチオシアネート緩衝液 / 酸化アルミニウム抽出後の r t T H 逆転写酵素増幅産物であり、ウエル 6 及び 7 は酸化アルミニウム陰性コントロールであり、ウエルの 8 は陰性コントロール水である。4 M グアニジンチオシアネート緩衝液プロトコルは血漿中に存在する H I V ウイルス粒子から R N A を放出させることが可能であり、その R N A は大容積 (5 mL) 重力濾過を利用して酸化アルミニウム上に増幅可能な状態で捕捉される。酸化アルミニウムは一般に核酸を結合する。

40

【実施例 5】

【0080】

D N A アーカイブ

本発明によれば、固相マトリックスに核酸を強固に結合する能力を直接固相増幅とを組み合わせることで、同一 D N A サンプルを回数に限りなく繰り返し分析できる。このことを例示するために、10 µL の酸クエン酸塩デキストロース (A C D) 血を 4 M グアニジンチオシアネート緩衝液中で酸化アルミニウムに結合した。次に結合した D N A を、5 種類の連続するショートタンデムリピート (S T R) 増幅と 5 種類のプライマセット (プロメ

50

ガ)とを用いて、次の順番で各30サイクルのPCR増幅に5回かけた：1) F13B、2) FESFPS、3) VWA、4) CCTマルチプレックス及び5) FFVマルチプレックス。最後の増幅セットの後、DNAサンプルをそのまま150回のPCRサイクルにかけた。

【0081】

図7は4番目の遺伝子セットの増幅であるプロメガSTE CCTマルチプレックスを用いた増幅と、5番目の遺伝子セット増幅であるプロメガFFVマルチプレックスを用いた増幅のパターンを示す銀染色ゲルである。図7ではレーン1、8、9及び16はアレラダーであり、レーン17はヒトゲノム陽性コントロール水であり、レーン2、3及び4は酸化アルミニウム結合DNAの4番目の増幅(CCTマルチプレックス)であり、レーン5、6及び7は酸化アルミニウムCCT陰性コントロールであり、レーン10、11及び12は酸化アルミニウム結合DNAの5番目の増幅(FFVマルチプレックス)であり、そしてレーン13、14及び15は酸化アルミニウムFFVマルチプレックス陰性コントロールである。図7の銀染色ゲルに示される結果からは、増幅が5種類全てのPCRで起こっていることが示された。これらデータから、DANのアーカイブと、4Mグアニジンチオシアネート緩衝液プロトコルとそれに続く5種類の連続ショートタンデムリピート(STM)増幅(合計150PCRサイクル)を利用したPCRによる増幅により、同一の結合DNAを反復して酸化アルミニウム増幅できることが確認された。

10

【0082】

まとめると、DNAは更なる増幅分析が可能な形で酸化アルミニウム上にアーカイブされている。そのような利用としては、同一遺伝子の反復分析、異なる遺伝子の連続増幅、例えば異なる感染性病原体の検出、又は拡大分析、例えばヒト識別分析を目的としたより高度な鑑別力が挙げられる。

20

【実施例6】

【0083】

酸化アルミニウムへの核酸の不可逆的結合を促進又は阻止する緩衝液

放射線標識DNA(50ng)を、198mgの酸化アルミニウム存在下に表2に掲載の各種緩衝水溶液500μLに加えた。酸化アルミニウムへの放射線標識DNAの排他的結合をより正確に測定するために、実施例1記載のBiospin6を使った精製後に残った遊離状態の取り込まれていないヌクレオチドをトリクロロ酢酸(TCA)沈殿にて判定した。表2に示すように、このより正確な手順を利用した場合、4Mグアニジンシアネート緩衝液又は水酸化ナトリウム中でDNAは酸化アルミニウムに100%の効率で結合する。

30

ブロッキング緩衝液の添加といった、その他特定の物質及び/又は条件は、DNAの結合を低下する。表2では、例えば、その様な例として10%ウシ血清アルブミン又はK₂HPO₄緩衝液を挙げている。

【0084】

【表2】

結合緩衝液	結合%	未結合%
ddH ₂ O	20	80
0.1 N NaOH	110	0
4 M GuSCN	104	0
10% BSA	5	95
1 M K ₂ HPO ₄	4	96
10% Triton™X-100	64	36
10% Tween™20	106	0
10% SDS	12	88
5X SSC	60	40

40

結合及びブロッキング条件は共に規定されているので、最初に特異的なオリゴヌクレオチ

50

ド又はプローブに固相マトリックスへ強固に結合し、次に固相に結合した核酸へのハイブリダイゼーションによる特異的標的捕捉が可能なブロッキング緩衝液を添加することで反応条件を変える、便利且つ特異的な方法を開発できる。例えば第1の核酸配列は、サンプルをこの第1核酸をマトリックスに強固に結合させる緩衝液中にマトリックスと接触させることで、本発明の固相マトリックスに強固に結合できる。次に、第2核酸配列を結合した第1核酸にハイブリダイズしたい場合には、緩衝液条件をリン酸緩衝液の様な、固相的マトリックスに結合する第2核酸の量を減らすと同時に、第1核酸への第2核酸のハイブリダイゼーションを可能にするブロッキング緩衝液に変える。この様にブロッキング緩衝液は、固相に結合した第1核酸への核酸配列ハイブリダイズに関し、バックグランド信号が低いハイブリダイゼーション緩衝液として機能する。所望の操作（例えば増幅、検出等）を実行した後、ハイブリダイズした第2核酸配列を取り除く。

10

【0085】

こうした後、固相に結合した第1核酸は複数回再使用することができる。RNAは0.1NのNaOH内で破壊されることは周知である。従ってこの結合緩衝液を利用することで、DNAだけが捕捉される。グアニジンチオシアネート緩衝液と水酸化ナトリウム緩衝液を用いた効果的な細胞の破壊と迅速な結合は、血液、髄液スワブ、尿、及び血漿又は血清内に飛散したHIVウイルス粒子に効果的である。しかし、ある種の感染菌、例えばクリプトスポリジウムパルバム（*Cryptosporidium parvum*）については、細胞を効果的に破壊するために検体を95℃に加熱し、ジチオスレイトール（DTT）の様なタンパク質還元剤を加える必要がある（配列番号1～3；表1）。

20

【実施例7】

【0086】

高流速での迅速結合とPCRチューブへの酸化アルミニウムの取込

酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）の高流速でのDNA結合能力を、同じ総cpmの放射線標識DNAを1mL、5mL又は10mLの4Mグアニジンチオシアネート緩衝液に顕濁し、その顕濁液を酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）又は二酸化ケイ素（ SiO_2 ）に一定速度で通した。図8に示すように、結果からは酸化アルミニウムが二酸化ケイ素に比べ遙かに優れていることが確認された。酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）は流し濃度で核酸を効率的に結合し、大容積（10mL）の検体を1mLまで、1mL当たり10倍の濃縮し、容積を1/10まで小さくした。DNAの結合は図9に示す実験結果より明らかなように迅速であった。ここでは50μLの酸クエン酸塩デキストロース（ACD）抗凝固血を、0.1NのNaOH結合緩衝液中に酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）に加えた。DNAが結合した直後、又は様々なインキュベーション時間後にこの固相に結合したDNAよりHLA DRベータ遺伝子をPCR増幅した。

30

図9では、増幅効率で表された結合は結合直後（レーン1～4）、1分後（レーン5～8）又は2分後（レーン14）で同一であった。レーン13は陰性コントロール水である。

【0087】

これら実験結果は、PCR増幅と直接結びつく自動化可能な核酸抽出に極めて簡単且つ迅速なプロトコルの基礎である。このために、酸化アルミニウムを、図10に示す様に、シリコン又はPCRを阻害しないことが分かっているその他接着物質を介してPCRチューブ内に接着した。或いは、より多数を処理するために、酸化アルミニウムを96PCRチューブプレートに取り込んでも良い。これら代替法はいずれも1）結合緩衝液を酸化アルミニウムPCRチューブに加えること、2）検体を各チューブに添加し、混合してから液体を吸引して捨てること、3）洗浄緩衝液を繰り返しピペットで吸引、排出して洗浄し（3回）、その後洗浄緩衝液を吸引して捨てること、4）PCR増幅マスターミックスを添加すること、及び5）サーマルサイクラーにて増幅することを含んで成るプロトコルによる単純な核酸抽出法を提供する。このプロトコルのピペット吸引ステップはロボットシステムを用いて行う多数処理のために簡単に自動化される。

40

【実施例8】

50

【0088】

酸化アルミニウム (Al_2O_3) への精製RNAの結合の確認

実施例4では、患者の血漿検体からHIVを検出したことに基づきRNAが酸化アルミニウムに強固に結合し、増幅できることを記載した。この結果は、血清中のプロウイルスDNAを汚染したことによるものである可能性がある。純粋な標的RNAを使ったRNA結合は、不可逆的な結合と固相増幅を確認した。図11は4Mグアニジンチオシアネート緩衝液中に結合したapAW109純粋標的RNAの増幅及び酸化アルミニウム (Al_2O_3) 固相上で増幅したrtPCRの結果を示している。IL-2 mRNA及びCryptosporidium parvum dsRNAが同様の様式で酸化アルミニウム上に結合及び増幅することが示された(図示せず)。

10

【実施例9】

【0089】

ハイブリダイゼーションによる特異標的捕捉を目的とする強固に結合した核酸プローブの利用

検出限界を判定するために実施した実験より、PCR増幅による酸化アルミニウム (Al_2O_3) に結合したDNAの検出では1000コピーが必要であり、結合RNAでは103コピーが必要であることが示された(図11)。検出感度は、核酸プローブを本発明の固相マトリックスに結合し、続いてこのプローブをサンプル中に存在する標的核酸とハイブリダイゼーションさせることでRNA又はDNAのいずれについても100コピー未満まで大きく向上した。検出を望む標的核酸に隣接する配列に相補的な20~100塩基対長の高コピー数核酸プローブを0.1NのNaOH緩衝液中で酸化アルミニウム (Al_2O_3) に強固に結合した。洗浄後このプローブを用い、高いレベルのバックグランド核酸を含む検体の中に標的核酸があるものについても、ハイブリダイゼーションで捕捉した。この方法では、検体はマトリックス結合プローブが存在する状態で、4Mグアニジンチオシアネート緩衝液で破壊され3倍に希釈された。ハイブリダイゼーションは起こった。洗浄ステップ後、標的を直接PCRで増幅した。図11に示すように、これにより約10から100コピー標的の検出限界を得た。

20

【実施例10】

【0090】

大容積又はプール検体中の低コピー標的の捕捉

酸化アルミニウムに強固に結合した核酸プローブによるハイブリダイゼーション捕捉は、初期検体容積が大きな場合での標的配列の特異的選別にも有効である。図12に示す様に、上記ハイブリダイゼーション固相捕捉法により、血漿で初期容積を5.5mLに希釈してもエイズ患者血漿検体由来の1000コピーが検出可能であった。血漿は希釈を最小限に抑えて抽出するために、乾燥グアニジンチオシアネート粉末に直接加えられた。

30

この調整により、捕捉ビーズへのハイブリダイゼーションの最終容積は30mLになった。更に、100µLのHIV陽性血漿は、追加された24の陰性血漿検体(100µL)と一緒にプールしても検出された。これらプール実験より、検出感度が48HIVウイルス粒子/ミリリットルであることが確認された。同様の方法から、30mLの水にプールされた100コピーのCryptosporidium parvumが検出されることが示された(図示せず)。従ってハイブリダイゼーション捕捉プローブプロトコルを利用することで、個別検体で行った場合とほぼ等しい感度でプール検体をスクリーニングでき、そのため高感度のプール検体検査を可能にするため大きな商業的可能性を持っており、大幅なコスト削減をもたらす。

40

【実施例11】

【0091】

酸化アルミニウムに強固に結合した核酸の保管

50µLの酸クエン酸塩デキストロース(ACD)血液由来の核酸を4Mグアニジンチオシアネート緩衝液又は0.1NのNaOH緩衝液を用いて酸化アルミニウムに結合した。次に結合した核酸を乾燥状態、又は70%EtOH中、若しくはTris EDTA緩衝

50

液中で、室温、4 又は - 20℃で保管した。核酸は一般にこれら条件では3ヶ月間安定であったが、本発明を利用すると更に長期間安定であり、おそらくは無期限に安定である。

【実施例12】

【0092】

核酸アーカイブの可能なその他材料の同定

本実施例は選択した材料が核酸アーカイブの一般的な目的に適うことが確認されたことを示している。これら材料は高結合定数でDNA及びRNAを結合すると同時に、標的の増幅を目的に結合した核酸にアクセスする酵素増幅法も可能である。核酸を強固に結合できる材料を同定するために、前記放射性同位元素実験の替わりとなるより便利な代替法として蛍光法を計画した。DNAの場合、5'末端にフルオロセインの様な標識蛍光色素を持つ合成オリゴヌクレオチドを用いた。RNAの場合、色素標識ヌクレオチド存在下に、RNAポリメラーゼを使ったランオフ転写を利用して標識鎖を生成した。

これら蛍光標識鎖を結合緩衝液と混合し、各種材料にさらし、所定時間放置した後洗浄した。結合有り無しでの材料からの蛍光発光及び各種溶液（標識核酸、洗浄液）からの発光が測定できた。マトリックスへの結合を確認した後、結合核酸の増幅能をDNA又はRNAを用いた抽出及び増幅法、精製核酸又は各種媒体（血液、細胞培養等）中の核酸、及びPCR、NASBA及びSDAといった各種増幅法について検討した。

【0093】

好ましい本発明の固相マトリックスの1つは、アルファ酸化アルミニウム (Al_2O_3) であり、これは商標名XtraBindTM（エクストラナインク、ブルームフィールド、コロラド）で核酸結合マトリックスとして販売されている。酸化アルミニウムはそれぞれ固有の特性を持つ様々な化学形状で存在することを記すことは重要である。記載の核酸アーカイブの場合には、標準的条件での結合及び増幅にはアルファ酸化アルミニウムが好適である。その他の形状の酸化アルミニウムはDNA又はRNAを結合するが、結合した核酸を増幅するには増幅反応を変更しなければならない。例えばガンマ酸化アルミニウムに結合したDNAのPCR増幅は、マグネシウムイオンの濃度を約50%以上に増加すれば上手くいく。ポリメラーゼの濃度を上げることも役立つだろう。アルファ酸化アルミニウムは時に溶融体又は焼体として参照されるが、これら用語は一般に明瞭ではなく、或いは用語「アルファ」で良く定義される。

【0094】

酸化アルミニウム、特にアルファ酸化アルミニウム以外にも、その他の材料が核酸アーカイブマトリックスとして有用であることが確認されている。

それら材料は酸化チタン (Ti_2O_3)、一般には $AlOy$ と呼ばれる酸化アルミニウム混合組成物の薄膜、及び変性二酸化ジルコニウム (ZrO_2) である。変性 ZrO_2 を調製するために、 ZrO_2 を酸性又は塩基性溶液にさらしてからDNAと混合し、洗浄後酵素増幅により結合DNAが増幅することが示された。これら各種材料の能力を図13～16に示した。

【0095】

図13は各種固相材料に結合した蛍光標識DNA及びRNAからの蛍光シグナルを表す棒グラフである。

本実施例で使用した固相材料は100～200メッシュのアルファ酸化アルミニウム（アルファ- Al_2O_3 ）、150メッシュのガンマ酸化アルミニウム、100～200メッシュの二酸化ジルコニウム、ガラスビーズ（150～212 μm ）、1000メッシュのアルファ Al_2O_3 でコーティングしたガラスビーズ、1000メッシュのアルファ Al_2O_3 の SiO_2 薄膜でコーティングしたガラスビーズ、その上に酸化アルミニウムの薄膜を有するガラスビーズである。ガラス（ SiO_2 ）ビーズも最小結合コントロールとして使用し、DNA及びRNAに関する結果をそれぞれに対応するガンマ Al_2O_3 シグナルで正規化されている。

【0096】

図 1 4 は各種材料に結合した DNA を PCR 増幅した後の、エチジウムブロマイド染色アガロースゲルである。示したゲルは増幅前に 4 回及び 8 回洗浄したが、洗浄回数が 5 回、6 回及び 7 回についても同様の結果を得た。標的 DNA は精製された胎盤 DNA であり、増幅域は Homo sapiens G タンパク質共役受容体 5 7 (G P R 5 7) である。本図では、試験材料は 1) 酸化アルミニウム (Al_2O_3) コーティング PCR チューブ; 2) アルファ - Al_2O_3 ; 3) Ti_2O_3 ; 4) 酸化アルミニウム薄膜コーティングガラスビーズである。各マトリックス及び洗浄回数について、2 回行った反応を示した。

【 0 0 9 7 】

図 1 5 は酸化アルミニウム薄膜でコーティングしたガラス毛細管内壁に結合した DNA の P R A 増幅後のエチジウムブロマイド染色アガロースゲルである。結合 DNA は総時間約 4 5 分の迅速サーマルサイクリングで増幅した。結合標的は精製胎盤 DNA で、増幅域は Homo sapiens G タンパク質共役受容体 5 7 遺伝子である。

10

【 0 0 9 8 】

図 1 6 は大腸菌由来の RNA を N A S B A 増幅して得た、顕著なバンドを示す側方流動ストリップである。 Al_2O_3 又は Ti_2O_3 スラリでコーティングされた PCR チューブを使用した大腸菌希釈物を処理し、その結果を示している。

【 実施例 1 3 】

【 0 0 9 9 】

プラスチック表面を固相マトリックスでコーティングする別の方法

20

材料 (A) 本発明のプラスチック表面コーティング法の 1 つは、加熱した固相マトリックスを冷却したプラスチックと接触させることを包含する。

これによりプラスチックは部分的に熔融し、固相マトリックスの埋込が起こる。固相マトリックスをるつぼの中で 7 0 0 から 8 0 0 に加熱してから、約 0 から 1 0 の間の温度に冷却されているプラスチック材料 (例えば PCR チューブ) の上又は中に注ぎ込んだ。例えばプラスチック材料は氷槽 (4) の中に入れることができる。過剰の固相マトリックスを払い落とし、チューブを包装した。マニフォールドを使用して複数のチューブを同時にコーティングするといった、この一般的な加熱・熔融法の代替法も開発されている。

【 0 1 0 0 】

30

(B) PCR チューブ又はその他プラスチック材料内に固相マトリックスを熔融すること以外に、プラスチック表面上に薄膜コーティングを溶着する方法もある。プラズマエッチング、化学蒸着法 (C V D) 及び加熱蒸発法といった通常の処理及び溶着法を用いて、金属酸化物の薄膜を下張りのプラスチック材料に溶着、結合することができる。溶着条件を調整することで、膜に核酸を結合させ、結合した DNA 又は RNA を増幅することができた。

【 0 1 0 1 】

(C) 代替法として、プラスチック表面を、例えばプラズマエッチング或いは強酸 / 塩基処理、及びアルミニウム s - ブトキシドといった液体の金属酸化物前駆物質を用いて化学的に活性化するか、又はその他のアルコキシ金属試薬を導入して活性化プラスチック表面と反応させる方法がある。プラスチック表面活性化の方法は当分野周知であり、更なる説明は必要ない。この方法でも所望する結合及び増幅コーティングを作ることができる。

40

【 実施例 1 4 】

【 0 1 0 2 】

酸化物表面への固相マトリックスコーティング法

固相マトリックスは以下の様な幾つかの方法により、毛細管、スライド及びその他形状のガラス表面、並びにその他の酸化物表面上に溶着できる。

【 0 1 0 3 】

(A) 実施態様の 1 つでは大小の酸化アルミニウム顆粒を、加水分解を促進する酸性又は塩基性条件を持つガラス表面に溶着し、続いて乾燥した。酸性液の例としては、容積で 9

50

5 % のエタノール、0 . 5 % の濃塩酸 (H C l) 及び 4 . 5 % の水を含む液がある。

【 0 1 0 4 】

(B) 別の実施態様では酸化アルミニウム顆粒を、酸性アルミニウムを二酸化ケイ素、酸化アルミニウム又はテトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン若しくはアルミニウム s - ブトキシドといった金属酸化物前駆物質を含むゾルと混合し、この混合物をガラス表面上でゲル化させてガラス表面上に溶着した。これにより金属酸化物結合剤の中に酸化アルミニウム顆粒のフィルムを得た。

【 0 1 0 5 】

(C) 別の実施態様では、 Ti_2O_3 顆粒を本実施例の A 及び B の方法でガラス表面に溶着した。

10

【 0 1 0 6 】

(D) 既存の酸化アルミニウム又は酸化チタンの顆粒を溶着することに加えて、アルミニウム s - ブトキシド若しくはチタンエトキシドといった金属酸化物前駆物質を、この前駆物質が加水分解して金属水酸化物を形成する液相反応液内で反応してガラス表面上に金属酸化物フィルムを溶着した。次に金属水酸化物同士を縮合して、ガラス又はその他の下張りしている金属酸化物基材に酸化層を共有結合した。例えば酸化アルミニウムゾルは、A . C . P i e r r e と D . R . U h l m a n n (J . A m . C e r a m . S o c . 7 0 : 2 8 ~ 3 2 項 (1 9 8 7 年)) に記載の手順に従ってアルミニウム s - ブトキシドを加水分解してペプチド化することで調製した。次にガラス表面をこの液体にさらしてから乾燥した。これによりアルミニウムと酸素の混合組成物を有する酸化アルミニウムのフィルムコーティングができた。例えば、このフィルムのある部分は Al_2O_3 を、別の部分は $Al_{2.3}O_{3.1}$ を含むといった具合になっている。

20

【 0 1 0 7 】

本実施例に記載のコーティングは、侵漬、液浸、スピンキャストリング又は基材を材料の懸濁液 / ゾルにさらす同様の方法を含む当分野周知のいずれの好適な方法でも溶着できるが、もとよりこれらの方法に限定されるものではない。

【 実施例 1 5 】

【 0 1 0 8 】

アーカイブした DNA 及び RNA の長期保管

(A) 実施例 1 1 では血液から抽出したゲノム DNA が 3 ヶ月間安定して保管できることが確認された。今回、本研究ではこの期間を 1 8 ヶ月に延長した。実施例 1 1 に記載のサンプルを 1 8 ヶ月間乾燥保管したでも、正確に増幅ができた (データ図示せず) 。

30

【 0 1 0 9 】

(B) 同様の実験を計画して、酸化アルミニウムが安定して RNA を保管できることを確認した。RNA は研究株である大腸菌 s i t 1 のみより得て、Q i a g e n R N e a s y M a x i キットで精製した。得た RNA 抽出物 (3 1 6 n g) を 1 : 2 、 1 : 4 及び 1 : 1 0 に希釈してから、 $MgCl_2$ を含まない 1 0 x P C R 緩衝液 5 0 m L と各 RNA 希釈液を 5 m l 加えて X t r a A m p^{T M} チューブに結合した。3 0 分インキュベーションした後、上清を取り除き、チューブを 5 ~ 1 0 分間風乾した。全てのチューブにキャップを付け、室温、4 又は - 2 0 で保管した。1 週間毎にチューブを取り出し、そして大腸菌 s z a n d s i t 1 マルチプレックス、N A S B A マスターミックスを加えた。以下の条件に従い、4 2 で 9 0 分間 N A S B A 反応を行った : 8 0 m M T r i s - H C l 、 (p H 8 . 5) 、 5 0 m M K C l 、 1 2 m M の $MgCl_2$ 、 1 0 m M の D T T 、 1 m M の d N T P ミックス、 2 m M の r N T P ミックス、 2 0 0 m M のプライマミックス、 1 5 % ソルビトール及び 1 5 % の D M S O 。結果は参照により本明細書への具体的記載に変える米国特許第 5 , 9 8 9 , 8 1 3 号に記載の方法を利用した側方流動検出法で視覚化した。精製 RNA は 4 及び - 2 0 で保管した場合には 8 週間安定であり、室温で保管した場合には、特により高い希釈率 1 ; 1 0 で若干の分解が認められた。

40

【 実施例 1 6 】

【 0 1 1 0 】

50

マトリックスからの外した核酸の液相増幅

遺伝子型判定といった幾つかの応用では、上記記載の本発明の方法による簡素化されたサンプル調製及び固相アーカイブが有益である。別の実施態様では、増幅は固相上ではなく液相で精製核酸を用いて行われる。本例では、本明細書記載の固相マトリックス材料を利用した方法を示す。標的核酸は固相に強固に結合しているが、マトリックスをTE緩衝液、水又はその他好適緩衝液で洗浄すると少量の核酸が精製核酸の形で溶液中に放出（解離）する。この溶液は標準的な増幅反応に使用できる。放出と増幅を複数回繰り返すことも可能であり、複数の増幅標的を個別に分析できる。

【0111】

標準的な置換法としては、溶解緩衝液と混合した血液を5から10 pLの Al_2O_3 、 Ti_2O_3 、又はコーティングガラスビーズを含むXtra AmpTMチューブに入れ、標準的なインキュベーションと洗浄を行うことを包含した。洗浄後、50から100 µLのTE緩衝液（TrisHCl/EDTA）をチューブに加えた。この溶液を約30分間インキュベーションした後、TE液を取り出した。取り出した解離DNAを含むTE溶液の一部（5～10 µL）を通常のPCRマスターミックス（プライマ、酵素、緩衝液等）と混合して、温度サイクルにかけた。TE緩衝液を加え得る操作と溶液の一部を取り出す操作を最低5回繰り返したところ、予想通りの正確な増幅を得た。図17は本実施例による解離核酸（「解離物」）PCR増幅及び以下の固相マトリックス材料に結合した固相核酸増幅後に得たエチジウムブロマイド染色アガロースゲルを示す；（1）Xtra AmpTM（XA）チューブ；（2）100～200メッシュのアルファ酸化アルミニウム（ $\alpha-Al_2O_3$ ）；（3） Ti_2O_3 、及び（4）酸化アルミニウム薄膜。図17に示す例では、結合標的は精製胎盤DNAであり、増幅域はHomo sapiens Gタンパク質共役受容体57遺伝子である。

【実施例17】

【0112】

同一アーカイブマトリックスを用いたマルチプレックスPCR増幅法

本発明によれば、アーカイブした核酸サンプルは、短時間又は長期間かけ同一サンプルを繰り返し処理する機会を提供する。更にアーカイブされたサンプルを利用すると、同一増幅域を何度も研究すること、及び/又は異なる標的のシリーズを研究することが可能である。

【0113】

（A）同一マトリックスに結合した標的を繰り返し増幅できるプロトコルを開発した。同一標的域を繰り返し増幅するために、精製核酸又は溶解した生物サンプルをXtra AmpTMチューブ又は酸化アルミニウム、酸化チタン若しくはその他顆粒のスラリーを含む別のチューブに加えた。標準的な結合及び洗浄操作を行った。次に標的アンプリコンに合ったプライマ及びPCRミックスをチューブに加え、標準的な32から40サイクルのPCR反応を行った。生成物溶液を取り出し、チューブを95℃で洗浄緩衝液にて洗った。同一標的を増幅する追加のラウンドでは、プライマとPCRミックスを加えるが必要な増幅サイクル数はより少なかった。

【0114】

図18と19は、マトリックスに結合したDNAの同一領域を繰り返し増幅したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲルを示している。ゲノムDNA（ヒト）は全血からXtra AmpTMチューブを使って抽出した。HLA-D Rベータ遺伝子に関し標準的なPCR条件を使って、HLA-D Rベータ遺伝子のPCR増幅（35サイクル）を行った（図18）。次にXtra Ampチューブを10分間、95℃で洗浄緩衝液（150 mMのLiCl、10 mMのTris-HCl、1 mMのEDTA及び0.10%のTween-20）とインキュベーションした。

洗浄緩衝液を取り出し、新しいPCR増幅試薬を加えてHLA-D R ssを再増幅した。2回目の増幅反応のPCR試薬濃度及びサイクルパラメータは、PCRサイクル数を減らした以外は、初回の反応と同じであった。図19は10及び15 PCRサイクル後の

10

20

30

40

50

ゲルを示している。

エチジウムブロマイド染色アガロースゲルで見た場合に鮮明に見え且つ比較的清浄であるアンプリコンを生成するには、約 10 回のサイクルで十分であった (図 18)。

【 0 1 1 5 】

(B) 異なる標的核酸のシリーズを増幅するために、標準的な操作による第一ラウンドを此方：サンプルを固相マトリックス (例えば酸化アルミニウム) でコーティングした P C R チューブの様な容器に入れた。

標準的な結合及び洗浄操作を行った。次に標的のアンプリコンに合ったプライマ及び P C R ミックスをチューブに加えて、標準的な 32 から 40 サイクルの P C R 反応を実施した。別の標的にあったプライマと使用すること以外はこれと同じ基本操作に従って続くラウンドを実施し、各ラウンドに先立って高温 (通常は 95) インキュベーションと洗浄を行い、前のラウンドでハイブリダイズしたプライマ及び生成物を除いた。この操作により複数の異なるアンプリコンが生成された。

10

【 0 1 1 6 】

図 20、21、22 及び 23 は、同一マトリックスに結合した D N A の異なる領域を連続的に P C R 増幅反応したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲルを示す。ゲノム D N A (ヒト) は全血から X t r a A m p^{T M} チューブを使って抽出した。P C R 増幅は対象となる遺伝子の増幅について標準的である P C R 反応条件を用い、1 種類の遺伝子を増幅した。次に p チューブを 10 分間、95 で洗浄緩衝液 (150 m M の L i C l 、10 m M の T r i s - H C l 、1 m M の E D T A 及び 0 . 1 0 % の T w e e n - 2 0) とインキュベーションした。洗浄緩衝液を取り出し、別の遺伝子について標準的である P C R 条件を用いて別の遺伝子を増幅した。マトリックスに結合した D N A の複数の異なる領域について、この洗浄緩衝液との加熱インキュベーションと標準的な P C R 反応条件を繰り返した。図 20、21、22 及び 23 に示す増幅した標的はそれぞれ H U G A L P C R 2、H G H P C R 5、H D Y S T 3 及び H L A A である。

20

【 実施例 18 】

【 0 1 1 7 】

ランダムプライマとマルチプレックス増幅初期ステップを利用した広範囲のゲノムのサンプルブースト

(A) 固相に結合した核酸は複数のプライマを同時に利用すること、及び単一のプライマセットを利用して増幅できる。複数のプライマを使って増幅することで、多数の異なるアンプリコンを同時に生成できる。各プライマセットの条件は必ずしも最適化されておらず得られる増幅は均一ではないが、得られた溶液を更に、特定の標的に関しより特異的な増幅に利用することができる。

30

【 0 1 1 8 】

(B) 複数のプライマが存在する状態で最初にサイクル数が限定された「ブースト」を行う方法はゲルデスらが 2000 年 6 月 6 日に出版し、参照により本明細書への具体的記述に替える、「マルチプレキシング増幅反応の方法」と題する係属中の米国特許出願、連続番号第 09 / 589,560 号に記載されている。この方法では、2 ステップのマルチプレックス増幅反応が実施されるが、この場合第一ステップは標準的な第一マルチプレックス増幅ラウンドを中断して、標的のサンプルコピー数を 100 ~ 1000 倍だけブーストする。この第 1 ステップ後に産物を分け、それぞれが第 1 又はマルチプレックスブースターステップで使用されたプライマセットの 1 組を含み且つ最適化されている、単一の第 2 増幅反応にかける。

40

【 0 1 1 9 】

かくして本発明の別の実施態様は、「ブースト」プライマの集合を一般化することである。即ち、本発明の方法は後のラウンドの標的アンプリコンに特異的なプライマセットの集合を、ランダムプライマの集合に置き換える。ランダムプライマを使って「ブースト」した後、この前増幅されたサンプルを小分けした。小分けされたものそれぞれを個々の標的に特異的なプライマのセット及び反応ミックスと混合した。本実施例では、ランダムな 9

50

-merの集合 (S t r a t a g e n e) を用いたが、熱安定性の様なハイブリダイゼーション及び増幅の基本法則に従うものである限りに於いて、別のランダムな9-merの集合或いはその他プライマ長の集合も機能するだろう。この応用に関して用語「ランダム」とは、「ブースト」ステップの間にゲノム全体又は少なくともその大きな画分が増幅されるように、十分に多様なプライマの大きな集合がグループ化されていることを意味する。

【0120】

図24、25及び26はランダム増幅プライマの集合を用いた第1「ブースター」ステップ後の特異的PCR増幅標的のエチジウムブロマイド染色アガロースゲルを示している。ゲノムDNAは全血(ヒト)からX t r a A m p^{T M}チューブを使って抽出した。PCR増幅は、PCR反応混合液中にランダム9merプライマを加え、プログラムの10サイクルについて適度の厳密度で増幅するPCRプログラムを用い実施した。この「ブースターPCR」後に、PCR反応混合液を5µLに小分けして、各PCR反応にかけた(「第2PCR反応」)。これら第2PCR反応は標準的なPCR反応で使用する各PCRプライマペアを含んでおり、そしてそれぞれが標準的なPCRサイクルプログラムにかけられた。図24に示した増幅された標的はHUGALPCR2及びGAPDH14であり、図25に示した増幅標的はHGH-PCR5であり、図26に示す増幅標的はHDYST3である。

10

【0121】

上記は多くの具体例を含むが、これら具体例は本発明の範囲を制限することを意図しておらず、その好適実施態様の例示を意図したものである。

20

換言すれば、本発明に関するこれまでの記述は描写及び説明を目的とした例示である。本発明の精神及び範囲から逸脱することなしに、当業者は様々な変更及び改良を発明に加え、様々な利用及び条件に発明を適合させることができる。この様な変更及び改良は、正当且つ当然に、以下に示す請求範囲の等価の範囲に入ると考えられるものである。即ち、本発明の範囲は添付の請求の範囲及びその合法的な等価物により決定されるものであり、本明細書に記載の実施例によるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】水中、0.1N水酸化ナトリウム(NaOH)結合緩衝液、又は4Mグアニジンチオシアネート(GuSCN)結合緩衝液中にて回転しながら1時間、室温でインキュベーションした後の酸化アルミニウム又は水酸化アルミニウムに結合した32p放射線標識DNAのパーセンテージを示す棒グラフ。

30

【図2】水中、0.1NのNaOH結合緩衝液、又は4MのGuSCN結合緩衝液中にて回転しながら1時間、室温でインキュベーションした後のナノグラム単位で示すDNAに対し、酸化アルミニウム又は水酸化アルミニウムに結合した32P放射線標識DNAのパーセンテージを示すグラフ。

【図3】酸化アルミニウムに結合した放射線標識DNA量を、結合DNAの洗浄回数に対する毎分当たりの残存カウント数(cpm)として表したグラフ。

【図4】酸化アルミニウム又は二酸化ケイ素に結合したDNAの割合を比較したグラフで、ここではDNAはグアニジンチオシアネート緩衝液又は水酸化ナトリウム緩衝液で希釈している。

40

【図5】パネルAとBは水中で酸化アルミニウムに10⁶コピーのHIV DNAとマイコバクテリウムDNAを結合させた後に、続けて直接固相増幅を行ったHIV DNA及びマイコバクテリウムのアガロースゲル。パネルAは固相HIV PCR増幅産物をエチジウムブロマイド染色したアガロースゲルである。パネルBは固相マイコバクテリウムDNA SDA増幅産物のエチジウムブロマイド染色アガロースゲルである。

【図6】グアニジンチオシアネート緩衝液内にて酸化アルミニウムに結合させ、続いて酸化アルミニウム上のHIV RNAを固相rtTH PCR増幅したHIV RNAのエチジウムブロマイド染色アガロースゲルである。

50

【図 7】ショートタンデムリピートマーカの C T T マルチプレックスとショートタンデムリピートマーカの F F V マルチプレックスを用いた、酸化アルミニウム上での D N A 固相増幅後の銀染色ゲル。

【図 8】各種始動ポリウム及び異なる流量での、酸化アルミニウム又は二酸化ケイ素に結合した放射線標識 D N A の割合。

【図 9】0 . 1 N の N a O H と酸化アルミニウム存在下に酸クエン酸デキストロース (A C D) で抗凝固処理した血液を加えた後、様々な捕捉時間で強く固相に捕捉してから H L A D R b c t a プライマを使って行い、エチジウムブロマイド染色ゲルにより確認した固相 P C R 増幅。

【図 1 0】自動核酸抽出を目的とする、固相マトリックスを組み入れた P C R 増幅チューブ。 10

【図 1 1】酸化アルミニウムに直接 R N A 標的 (p A W 1 0 9) を結合させるか、又は酸化アルミニウムに強く結合しているオリゴヌクレオチドプローブに純化 R N A 標的をハイブリダイゼーションしてから行った、純化 R N A 標的の固相 P C R 増幅後のアガロースゲル。

【図 1 2】血漿を希釈してから酸化アルミニウムビーズに強く結合しているオリゴヌクレオチド捕捉プローブとハイブリダイゼーションする、1 0 0 0 コピーの低コピー H I V の検出。

【図 1 3】各種固相材料に結合した蛍光標識 D N A 及び R N A からの蛍光シグナルを示す棒グラフ。材料は 1 0 0 ~ 2 0 0 メッシュのアルファ - 酸化アルミニウム (アルファ - A 20 $l_2 O_3$)、ガンマ - 酸化アルミニウム、二酸化ジルコニウム、コーティング又は処理加工された S i O $_2$ ビーズのシリーズ、及び未処理の d S i O $_2$ ビーズである。

【図 1 4】価格腫固相材料に結合した D N A を P C R 増幅したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。示したゲルは増幅前に 4 回から 8 回洗浄した。試験した材料は X t r a A m p $^{T M}$ チューブ (X A)、アルファ - A $l_2 O_3$ 、T i $_2 O_3$ 及び S i O $_2$ ビーズ上に酸化アルミニウムの薄層をコーティングしたものである。各マトリックス及び各線上回数について反応は 2 回繰り返し行った。

【図 1 5】ガラス製毛細管の内壁にコーティングされた酸化アルミニウムの薄層に結合した D N A を P C R 増幅したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。

【図 1 6】X t r a A m p $^{T M}$ チューブ又は T i $_2 O_3$ スラリを固相マトリックスに利用した大腸菌希釈液からの R N A の N S A B A 増幅で得られた明瞭なバンドを示す側方流動ストリップ。 30

【図 1 7】マトリックス結合 D N A (上のゲル) 及び表記のマトリックス表面から置換した D N A (下のゲル) を P C R 増幅したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。試験した材料は : X t r a A m p $^{T M}$ チューブ (X A)、アルファ A $l_2 O_3$ 、T i $_2 O_3$ 及び酸化アルミニウムが薄層コーティングされたガラスビーズ。

【図 1 8】同一マトリックスに結合した D N A から得た同一の標的領域 (H L A - D R) を P C R で初期増幅したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。

【図 1 9】図 1 8 記載と同一の標的領域 (H L A - D R (3)) を再増幅したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。 40

【図 2 0】マトリックスに結合した同一 D N A の各種領域を連続 P C R 増幅反応にかけたもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。増幅標的は H U G A L P C R 2。

【図 2 1】マトリックスに結合した同一 D N A の各種領域を連続 P C R 増幅反応にかけたもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。増幅標的は H G H P C R 5。

【図 2 2】マトリックスに結合した同一 D N A の各種領域を連続 P C R 増幅反応にかけたもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。増幅標的は H D Y S T 3。

【図 2 3】マトリックスに結合した同一 D N A の各種領域を連続 P C R 増幅反応にかけたもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。増幅標的は H L A A。

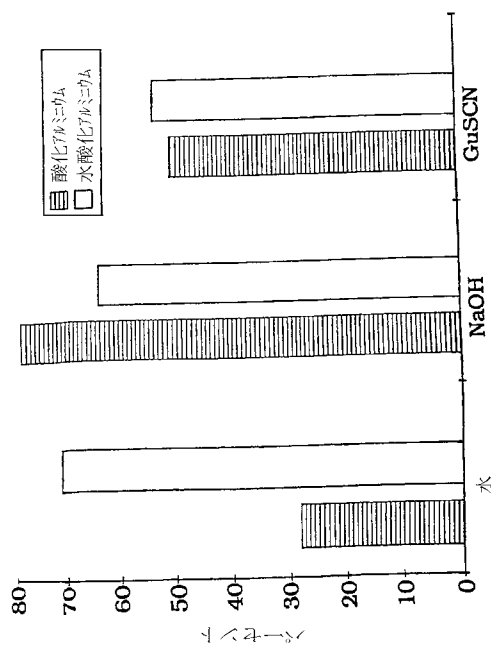
【図 2 4】ランダム増幅プライマの集合体を利用する初期「ブースト」ステップを行った後に特異的 P C R を実施したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。図 2 4 に 50

示す増幅標的はHUGALPCR2及びGAPDH14。

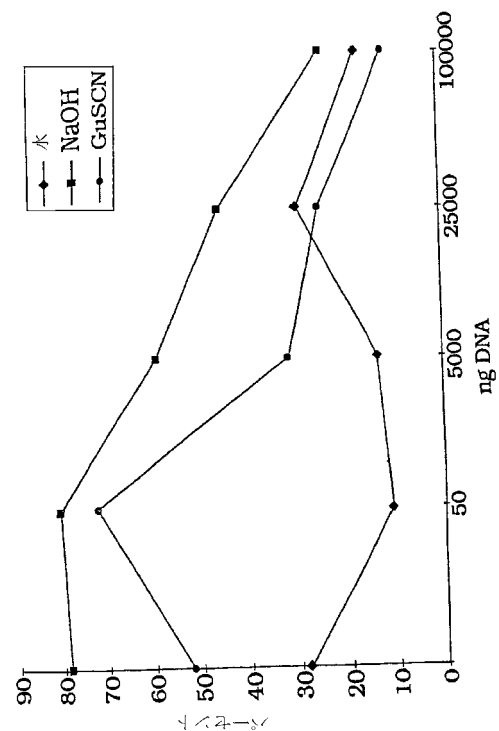
【図25】ランダム増幅プライマの集合体を利用する初期「ブースト」ステップを行った後に特異的PCRを実施したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。図25に示す増幅標的はHGH-PCR5。

【図26】ランダム増幅プライマの集合体を利用する初期「ブースト」ステップを行った後に特異的PCRを実施したもののエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。図26に示す増幅標的はH DYST3。

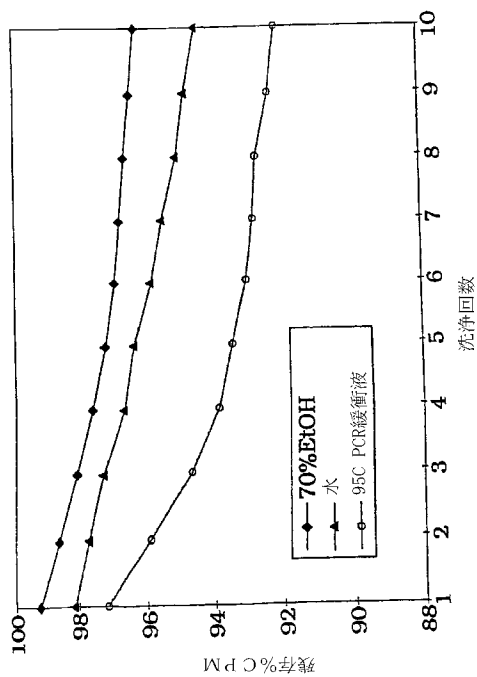
【図1】



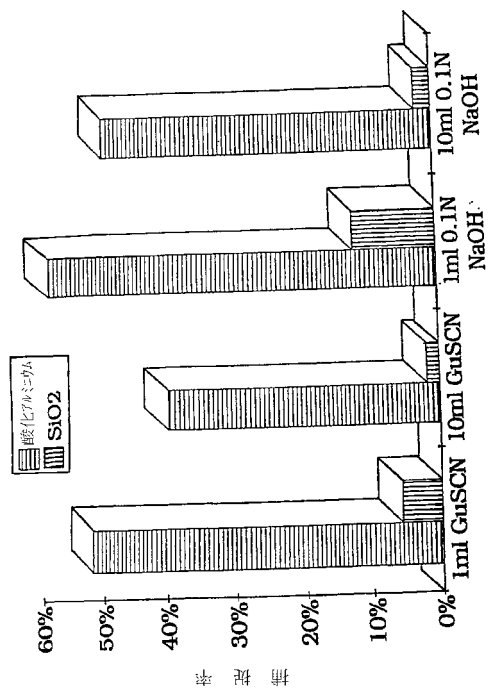
【図2】



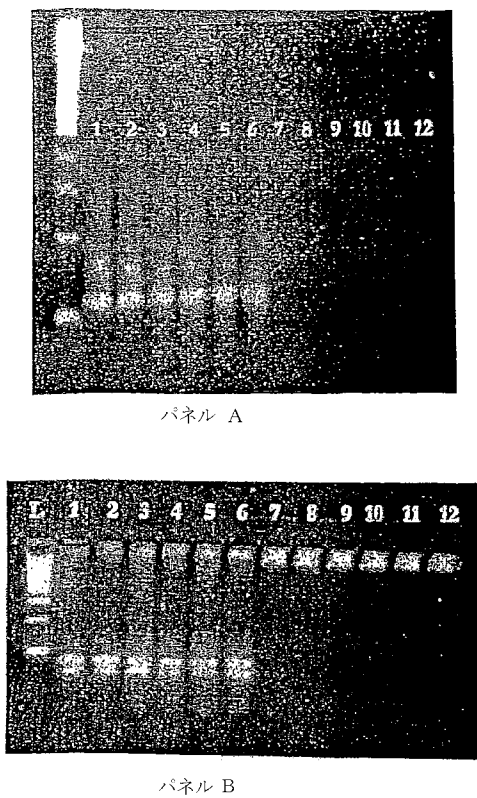
【 図 3 】



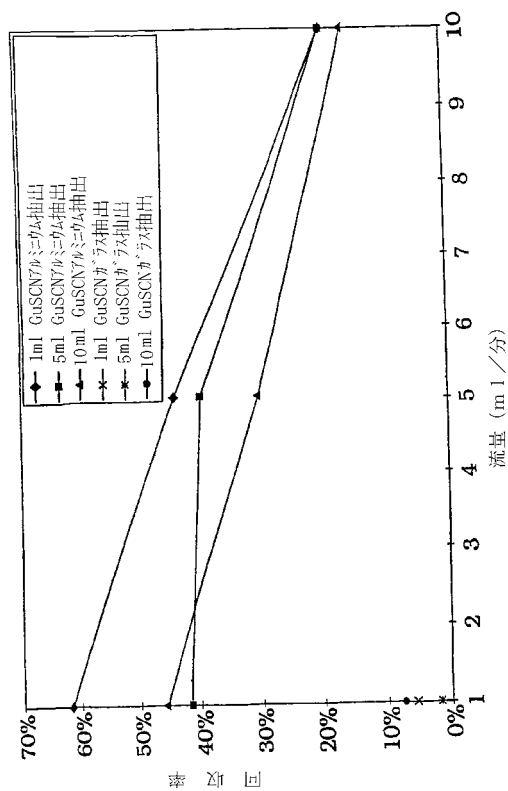
【 図 4 】



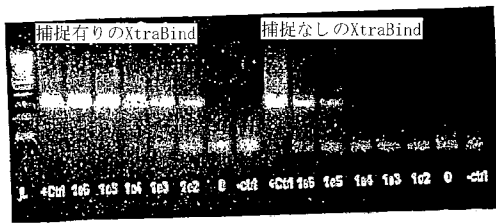
【 図 5 】



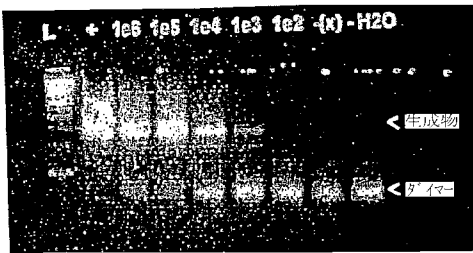
【 図 8 】



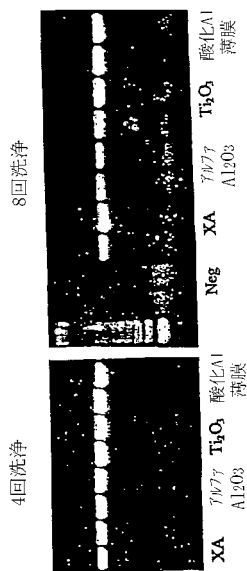
【 図 1 1 】



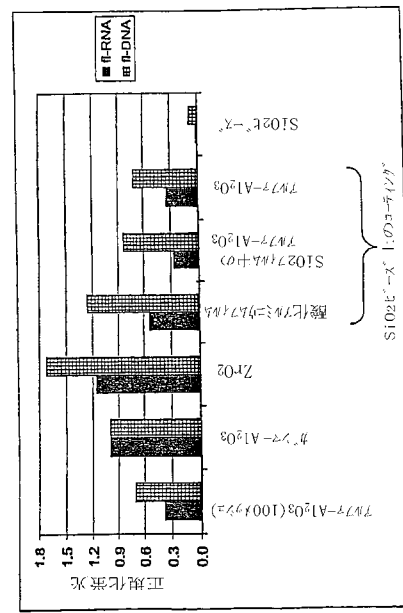
【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



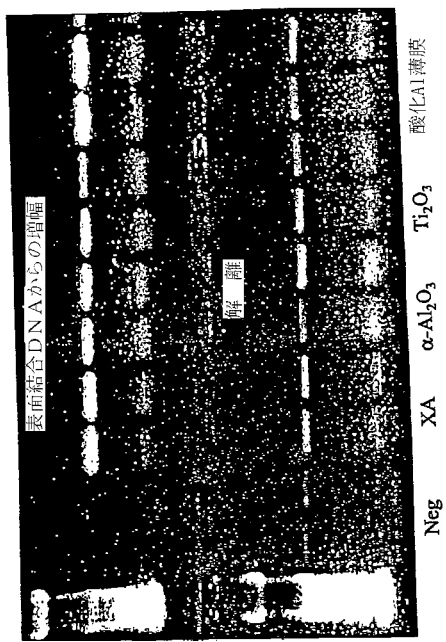
【 図 1 3 】



【 図 1 6 】

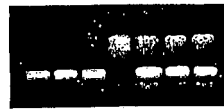
[illegible]

【図 17】



【図 18】

35 サイクル



【図 19】

15 サイクル 10 サイクル



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020981 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, C07H 21/02, 21/04
- (21) International Application Number: PCT/US02/26108
- (22) International Filing Date: 16 August 2002 (16.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/944,604 31 August 2001 (31.08.2001) US
- (71) Applicant: XTRANA, INC. [US/US]; 590 Burbank Street, Suite 205, Broomfield, CO 80020 (US).
- (72) Inventors: GERDES, John, C.; 375 Steele Street, Denver, CO 80206 (US). MARMARO, Jeffrey, M.; 15154 East Wusley Avenue, Aurora, CO 80014 (US). IVES, Jeffrey, T.; 13462 West 78th Place, Arvada, CO 80005 (US). ROEHL, Christopher, A.; 10139 Heather Sound Drive, Tampa, FL 33647 (US).
- (74) Agents: BURTON, Carol, W. et al.; Hogan & Hartson LLP, Suite 1500, 1200 17th Street, Denver, CO 80202 (US).
- (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/020981 A1

(54) Title: NUCLEIC ACID ARCHIVING

(57) Abstract: This invention is directed to a process for tightly binding nucleic acid to solid phase and corresponding processes for the utilization thereof. Nucleic acid is bound to solid phase matrices exhibiting sufficient hydrophilicity and electropositivity to tightly bind the nucleic acids from a sample. These processes include nucleic acid (double or single stranded DNA and RNA) capture from high volume and/or low concentration specimens, buffer changes, washes, and volume reductions, and enable the interface of solid phase bound nucleic acid with enzyme, hybridization or amplification strategies. The tightly bound nucleic acid may be used, for example, in repeated analyses to confirm results or test additional genes in both research and commercial applications. Further, a method is described for virus extraction, purification, and solid phase amplification from large volume plasma specimens.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

NUCLEIC ACID ARCHIVING

FIELD OF INVENTION

This invention relates to the general fields of molecular biology, biochemistry, genetics, and biological research. More specifically, the invention relates to methods for capturing and tightly binding nucleic acid from any biological specimen onto a solid phase matrix. The solid phase-bound nucleic acid can be directly utilized multiple times as an accessible substrate for a number of manipulations including solid phase nucleic acid enzyme reactions, oligonucleotide or probe hybridization, and/or signal or target amplification reactions. This invention further relates to commercial applications interfacing nucleic acid capture with nucleic acid hybridization and/or amplification.

BACKGROUND AND PRIOR ART

The molecular structure of nucleic acids provides for specific detection by means of complementary base pairing of oligonucleotide probes or primers to sequences that are unique to specific target organisms or tissues. Since all biological organisms or specimens contain nucleic acid of specific and defined sequences, a universal strategy for nucleic acid detection has extremely broad applications in a number of diverse research and development areas as well as commercial industries. The potential for practical uses of nucleic acid detection was greatly enhanced by the description of methods to amplify or copy, with fidelity, precise sequences of nucleic acid found at low concentration to much higher copy numbers, so that they are more readily observed by detection methods.

The original nucleic acid amplification method is the polymerase chain reaction (PCR) described by Mullis et al. (United States Patent No. 4,683,195, United States Patent No. 4,683,202, and United States Patent 4,965,188, all of which are specifically incorporated herein by reference). Subsequent to the introduction of PCR, a wide array of strategies for amplification have been described, such as nucleic acid sequence based amplification (NASBA)

WO 03/020981

PCT/US02/26108

(United States Patent No. 5,130,238 to Malek), isothermal methodology (United States Patent No. 5,354,668 to Auerbach), ligase chain reaction (United States Patent No. 5,427,930 to Buirkenmeyer), and strand displacement amplification (SDA), (United States Patent No. 5,455,166 to Walker), all of which are specifically incorporated herein by reference. Some of these amplification strategies, such as SDA or NASBA, require a single stranded nucleic acid target. The target is commonly rendered single stranded via a melting procedure using high temperature prior to amplification.

Prior to nucleic acid amplification and detection, the target nucleic acid must be extracted and purified from the biological specimen such that inhibitors of amplification reaction enzymes are removed. Further, a nucleic acid target that is freely and consistently available for primer annealing must be provided. Numerous strategies for nucleic acid purification are known. These include, for example, phenol-chloroform and/or ethanol precipitation (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), high salt precipitation (Dykes, *Electrophoresis* 9:359-368 (1988)), proteinase K digestion (Grimberg et al., *Nucleic Acids Res.*, 22:8390 (1989)), chelex and other boiling methods (Walsh et al., *Bio/techniques* 10:506-513 (1991)) and solid phase binding and elution (Vogelstein and Gillespie, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76:615-619 (1979)), all of which are specifically incorporated herein by reference.

The analysis of nucleic acid targets therefore consists of three steps: nucleic acid extraction/purification from biological specimens, direct probe hybridization and/or amplification of the specific target sequence, and specific detection thereof. In conventional protocols each of these three steps is performed separately, thus making nucleic acid analysis labor intensive. Further, numerous manipulations, instruments and reagents are necessary to perform each step of the analysis. Another concern with current methodologies is the significant chance of specimen cross-contamination, for example, between concurrently run specimens or from a previously amplified sample.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

For analysis purposes, nucleic acid must frequently be extracted from extremely small specimens from which it is difficult, if not impossible, to obtain a second confirmatory specimen. Examples include analysis of crime scene evidence or fine needle biopsies for clinical testing. In such examples, the extent of the genetic testing and confirmation through replica testing is thus limited by the nucleic acid specimen size. Using conventional extraction protocols for these small specimens, the nucleic acid is often lost or yields are such that only a single or few amplification analyses are possible.

The requirements for binding of DNA to solid phases and subsequently being able to elute the DNA therefrom have been described by Boom (United States Patent No. 5,234,809, which is specifically incorporated herein by reference) and Woodard (United States Patent No. 5,405,951, United States Patent No. 5,438,129, United States Patent No. 5,438,127, all of which are specifically incorporated herein by reference). Specifically, DNA binds to solid phases that are electropositive and hydrophilic. Electropositive elements can be rendered sufficiently hydrophilic by hydroxyl (-OH) or other groups, resulting in a solid phase matrix that tightly binds DNA, while proteins or inhibitors do not bind to the solid phase matrix. Since conventional purification methods require elution of the bound nucleic acid, solid phase matrices that bind nucleic acids but do not allow substantially complete elution have been described as being of no use for DNA purification. In fact, considerable effort has been expended to derive solid phase matrices sufficiently hydrophilic to adequately bind nucleic acid and yet allow for its elution therefrom (See, for example, United States Patent Nos. 5,523,392, 5,525,319 and 5,503,816, all to Woodard and all of which are specifically incorporated herein by reference).

Boom, *supra*, describes solid phase DNA amplification using high chaotropic salt to reversibly bind the DNA to silica. However, when the silica-bound DNA is placed in the amplification reaction buffer, the nucleic acid is actually eluted from the silica. Therefore, the amplification according to the method of Boom actually occurs in solution, not on solid phase. Furthermore,

WO 03/020981

PCT/US02/26108

since the nucleic acid is eluted from the solid phase prior to amplification, the amplification can only be performed once.

Del Rio et al., Bio/techniques 20:970-974 (1996)) describe filter entrapment of nucleic acid in a manner allowing for repeat amplification.

- 5 However, they do not describe a binding mechanism that is irreversible, and therefore the method is only recommended for analysis of higher nucleic acid concentrations, and then only for a limited number of analyses.

- 10 It would be advantageous to directly integrate nucleic acid purification and/or extraction with other nucleic acid analyses and/or manipulations so as to simplify the analysis procedure and methodologies, as well as reduce and/or remove the risk of cross-contamination. It further would be advantageous to eliminate the melt step necessary for generating single strand nucleic acid for probe hybridization or amplification primer annealing.

SUMMARY OF THE INVENTION

- 15 Accordingly, this invention provides methods for directly interfacing nucleic acid purification and/or extraction with other methodologies for nucleic acid analyses and/or manipulations.

- 20 This invention further provides methods for direct solid phase nucleic acid manipulation and/or analysis, wherein the manipulation and/or analysis is performed without elution of the nucleic acid from the solid phase. This invention comprises the use of solid phase materials comprising one or more highly electropositive elements which have been rendered hydrophilic, so as to result in solid phase materials having high affinity for nucleic acids.

- 25 This invention further provides methods for extracting and tightly binding nucleic acid from specimens, and thus permanently archiving the nucleic acid.

The methods of this invention allow for repeated analyses and/or manipulations of the matrix-bound nucleic acid, wherein the bound nucleic acid is neither altered nor exhausted during analysis.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

This invention further provides methods for capturing and tightly binding nucleic acid at low concentrations and at high flow rates from any biological specimen.

5 This invention further provides a novel mechanism for converting double stranded nucleic acid to single stranded nucleic acid without any melting step.

10 Accordingly, one embodiment of this invention provides a method that uses solid phase matrices to tightly bind nucleic acid for direct solid phase manipulation and analyses including, but not limited to, enzyme recognition, hybridization, and primer dependent amplification, wherein the nucleic acid is not washed off of the solid phase matrix during repeated manipulations and analyses.

This invention further provides methods of coating surfaces of various substrates with a solid phase matrix of this invention, and uses thereof.

15 This invention further provides kits for nucleic acid analysis or manipulation, comprising at least one container comprising a substrate having a solid phase matrix coated on its surface.

20 Other features and advantages of the instant invention will become apparent from the following detailed description which, taken in conjunction with the accompanying figures, illustrates by way of example, the principles of the instant invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

25 Figure 1 is a bar graph illustrating the percentage binding of ³²P radiolabeled DNA to either aluminum oxide or aluminum hydroxide following one hour room temperature incubation with rotation in water, 0.1 N sodium hydroxide (NaOH), or 4 M guanidine thiocyanate (GuSCN) binding buffers.

Figure 2 is a graph illustrating the percentage of DNA bound to aluminum oxide versus the amount of DNA in nanograms (ng) following one

WO 03/020981

PCT/US02/26108

hour room temperature incubation with rotation in either water, 0.1 N NaOH, or 4 M guanidine thiocyanate binding buffers.

Figure 3 is a graph illustrating the amount of radiolabeled DNA bound to aluminum oxide, shown as percent counts-per-minute (cpm) retained
5 versus the number of times the bound DNA was washed.

Figure 4 is a bar graph comparing the percent DNA bound to aluminum oxide or silicon dioxide, where the DNA is diluted with either guanidine thiocyanate binding buffer or sodium hydroxide buffer.

Figure 5, panels "a" and "b", are agarose gels of 10^5 copies of HIV
10 DNA and a plasmid prep of mycobacterium DNAs bound to aluminum oxide in water, followed by direct solid phase amplification of the HIV DNA and mycobacterium in series. Panel "a" depicts an ethidium bromide stained agarose gel of the solid phase HIV PCR amplification product. Panel "b" depicts an ethidium bromide stained agarose gel of the solid phase
15 mycobacterium DNA SDA amplification product.

Figure 6 is an ethidium bromide stained agarose gel of HIV RNA bound to aluminum oxide in guanidine thiocyanate buffer, followed by solid phase
rTH PCR amplification of the HIV RNA on the aluminum oxide.

Figure 7 is a silver stained gel after solid phase amplification of DNA on
20 aluminum oxide with the short tandem repeat marker CTT multiplex and with the short tandem repeat marker FFV multiplex.

Figure 8 depicts percent radiolabeled DNA bound to either aluminum oxide or silica dioxide for various starting volumes and at different flow rates.

Figure 9 depicts solid phase PCR amplification as confirmed by
25 ethidium bromide agarose gel using HLA DRbcta primers following tight solid phase capture for different capture times after addition of acid citrate dextrose (ACD) anticoagulated blood in the presence of 0.1 N NaOH and aluminum oxide.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

Figure 10 shows PCR amplification tubes incorporating solid phase matrix for automated nucleic acid extraction.

Figure 11 is an agarose gel after solid phase PCR amplification of a pure RNA target (pAW 109) after either direct binding of the RNA target onto aluminum oxide or after hybridization of the pure RNA target to an oligonucleotide capture probe that is tightly bound to aluminum oxide.

Figure 12 shows low copy detection of 1000 copies of HIV after dilution with plasma and hybridization to an oligonucleotide capture probe that is tightly bound to aluminum oxide beads.

Figure 13 is a bar graph presenting fluorescent signals from fluorescently labeled DNA and RNA bound to different solid phase materials. The materials were: 100-200 mesh alpha-aluminum oxide ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), gamma-aluminum oxide, zirconium dioxide, a series of SiO_2 beads that were either coated or treated, and untreated SiO_2 beads.

Figure 14 shows ethidium bromide-stained agarose gels after PCR amplification of DNA bound to different materials. The gels shown were washed four and eight times prior to amplification. The tested materials were Xtra Amp™ tubes (XA), $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, Ti_2O_3 , and a thin film coating of aluminum oxide on SiO_2 beads. Duplicate reactions are shown for each matrix and number of washes.

Figure 15 shows ethidium bromide-stained agarose gels after PCR amplification of DNA bound to a thin film of aluminum oxide coated on the inner walls of glass capillary tubes.

Figure 16 shows lateral flow strips with prominent bands obtained by NASBA amplification of RNA from *Escherichia coli* dilutions using either Xtra Amp™ tubes or a Ti_2O_3 slurry as the solid phase matrix.

Figure 17 shows ethidium bromide-stained agarose gels after PCR amplification of matrix-bound DNA (upper portion of gel) and DNA displaced from the surface of the indicated matrix (lower portion of gel). Tested

WO 03/020981

PCT/US02/26108

materials were: Xtra Amp™ tubes (XA), alpha-Al₂O₃, Ti₂O₃, and glass beads having a thin film coating of aluminum oxide.

Figure 18 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of an initial PCR amplification (35 cycles) of the same target region (HLA-DRβ) from the same matrix-bound DNA.

Figure 19 shows an ethidium bromide-stained agarose gel after re-amplification (10 and 15 cycles) of the same target region (HLA-DRβ) described in Figure 18.

Figure 20 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of serial PCR amplification reactions of different regions of the same matrix-bound DNA. The amplified target is HUGALPCR2.

Figure 21 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of serial PCR amplification reactions of different regions of the same matrix-bound DNA. The amplified target is HGH PCR5.

Figure 22 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of serial PCR amplification reactions of different regions of the same matrix-bound DNA. The amplified target is HDYST3.

Figure 23 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of serial PCR amplification reactions of different regions of the same matrix-bound DNA. The amplified target is HLA A.

Figure 24 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of specific PCR amplified targets after an initial "booster" step using a collection of random amplification primers. The amplified targets shown in Figure 24 are HUGALPCR 2 and GAPDH14.

Figure 25 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of a specific PCR amplified target after an initial "booster" step using a collection of random amplification primers. The amplified target shown in Figure 25 is HGH-PCR5.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

Figure 26 shows an ethidium bromide-stained agarose gel of a specific PCR amplified target after an initial "booster" step using a collection of random amplification primers. The amplified target shown in Figure 26 is HDYST3.

5 DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

It is understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention as claimed.

10 This invention is based on novel methods of tightly binding RNA, DNA or other nucleic acids to a solid phase matrix, and to uses of the matrix-bound nucleic acids. The methods described herein provide for long term storage of nucleic acid and/or repeat analysis and/or expanded analysis and/or multiple manipulations of the bound nucleic acid directly on the solid phase matrix without eluting the nucleic acid from the matrix. Each of the methodologies
15 disclosed herein overcomes the drawbacks of the prior art.

Certain embodiments of this invention provide specific applications of nucleic acids that have been tightly bound to solid phase materials. These known materials have previously been considered by the skilled artisan to be incompatible with nucleic acid analysis and/or manipulation since the nucleic
20 acid cannot be eluted from the solid phase materials. Furthermore, in contrast to conventional methods, the nucleic acid manipulations in certain embodiments of this invention occur while the nucleic acid is still bound to the solid phase matrix.

More specifically, this invention comprises the use of solid phase
25 matrices comprising one or more highly electropositive elements that have been rendered hydrophilic, for example, by hydroxyl (OH) groups or other groups, so as to result in a solid phase matrix having high affinity for nucleic acids. As used herein, the term "electropositive" refers to any element or material that attracts electrons. Examples of electropositive materials suitable
30 for purposes of this invention include, but are not limited to, materials

WO 03/020981

PCT/US02/26108

generally containing one or more elements selected from the group consisting of aluminum, titanium, zirconium, hafnium, scandium, yttrium, lanthanum, vanadium, tantalum, chromium, molybdenum, tungsten, boron, gallium, indium, germanium, tin, and lead.

- 5 Solid phase matrices suitable for purposes of this invention include, but are not limited to, oxides of the above-described electropositive materials. Examples include aluminum oxides including, but not limited to, alpha aluminum oxide ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), gamma aluminum oxide ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$), and thin films of aluminum oxide of mixed compositions (Al_xO_y). As used herein, the term
- 10 "mixed composition" refers to compositions comprising metal oxides of various compositions which can be represented by the formula M_xO_y , where the subscripts "x" and "y" indicate the elemental composition of the compound, and "x" and "y" can be integers or fractions. For example, an aluminum oxide of mixed composition comprises mixtures of aluminum oxides
- 15 having the formula Al_xO_y . Additional examples of suitable matrices include titanium oxide (Ti_2O_3), and modified zirconium oxide (ZrO_2). As used herein, the term "modified zirconium oxide" refers to zirconium oxide which has been exposed to an acid such as hydrochloric acid or nitric acid, or a base such as potassium hydroxide, resulting in a hydrolyzed surface composition.
- 20 The solid phase matrices of this invention have high affinities for nucleic acids. Therefore, nucleic acids that are contacted with a solid phase matrix of this invention under appropriate conditions become tightly bound to the matrix. As used herein, the term "tightly bound" means that the nucleic acid is sufficiently bound to the solid phase matrix such that the majority of the
- 25 nucleic acid remains bound to the matrix during manipulations and/or analyses of the bound nucleic acid. That is, only a minor amount of the matrix-bound nucleic acid is displaced from the solid phase matrix under certain buffer conditions during the manipulations and/or analyses.
- 30 This invention exploits the irreversible binding of nucleic acid to these solid phase matrices for specific applications. The tightly bound nucleic acid can be directly brought into contact with reaction mixtures that provide for

WO 03/020981

PCT/US02/26108

nucleic acid manipulation and/or analyses as discussed below in detail and in the Examples which follow.

In one embodiment, this invention provides for repeat and/or expanded analysis of the bound nucleic acid following its capture onto the solid phase matrix (nucleic acid archiving). The tightly bound nucleic acid described herein is stable at ambient room temperature, perhaps indefinitely. Thus, this invention provides a useful method of nucleic acid storage. The stored nucleic acid can then be analyzed or manipulated at a later point in time when needed. This is extremely useful in applications where a biological specimen is found in limited quantity and/or might be irreplaceable and where the reanalysis, either immediately or after storage of the original specimen, can be beneficial. Areas where this occurs include, for example, forensics, medical and biological research, veterinary or human clinical diagnostics, dentistry, environmental, food, or water microbiology, and agricultural or other industrial applications.

In another embodiment, this invention provides for a method of exclusively binding either DNA or RNA to a solid phase matrix from a sample containing both DNA and RNA. For example, one method for archiving nucleic acid comprising contacting a sample containing both DNA and RNA with a solid phase matrix under conditions wherein the matrix exclusively binds DNA. In this embodiment, such conditions comprise adding either to the sample or the matrix a buffer selected from the group consisting of guanidine thiocyanate-based buffers, alkaline buffers, lithium chloride, and detergent based buffers including, but not limited to, sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween 20, Triton X-100, NP-40, N-lauroylsarcosine, and other common detergents, prior to contacting said sample with the solid phase matrix.

Alternatively, this invention also provides a method for archiving nucleic acid comprising contacting a sample containing both DNA and RNA with a solid phase matrix under conditions wherein the matrix exclusively binds RNA. In this embodiment, such conditions comprise adding a DNA degrading reagent,

WO 03/020981

PCT/US02/26108

for example a DNA degrading enzyme such as DNase, to the sample in the presence of a buffer to lyse the cells and simultaneously degrade the DNA.

In another embodiment, the tightly bound nucleic acid allows for stringent aqueous washes, buffer changes and volume reductions during procedural manipulations of the bound nucleic acid. That is, the solid phase matrix sufficiently binds the nucleic acid such that the majority of the nucleic acid remains tightly bound to the matrix even after multiple washes with aqueous buffers. Thus, this invention provides a convenient mechanism for buffer changes and volume reduction.

10 In another embodiment, this invention provides novel methods for rapid DNA and RNA capture that directly interface nucleic acid extraction and purification with nucleic acid hybridization and/or nucleic acid amplification. The extractions can be performed manually or automated. As used herein, "nucleic acid hybridization" includes, but is not limited to, (a) hybridization of a
15 matrix-bound nucleic acid probe with a target nucleic acid present in a sample, (b) hybridization of a matrix-bound target nucleic acid with a primer nucleic acid, and (c) hybridization of a matrix-bound target nucleic acid with a probe nucleic acid.

For example, one embodiment of this invention comprises a method of
20 amplifying one or more target nucleic acids, comprising (a) contacting a sample containing one or more target nucleic acids with a solid phase matrix of this invention and a buffer that allows the target nucleic acid sequence(s) to become tightly bound to the matrix as single stranded nucleic acid; (b) contacting the matrix-bound target nucleic acid with a set of primer nucleic
25 acid sequences and a buffer, thereby allowing the primer set to hybridize to the matrix-bound target nucleic acid; and (c) amplifying the target nucleic acid(s) to produce an amplified reaction mixture, wherein the target nucleic acid sequence remains tightly bound to the matrix.

In one embodiment of solid phase amplification, a buffer is employed
30 that allows the target nucleic acid sequence(s) to become tightly bound to the matrix. Examples of such buffers include, but are not limited to, guanidine

WO 03/020981

PCT/US02/26108

thiocyanate-based buffers, alkaline buffers, lithium chloride, and detergent based buffers including, but not limited to, Triton X-100, NP-40, NP-lauroylsarcosine, sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween 20, and other common detergents. In addition, phosphate buffers have been identified that
5 reduce binding of the primer sequences to the solid phase matrix and the subsequent loss in efficiency.

In another embodiment, two or more different nucleic acid targets are bound to the solid phase matrix, and the target nucleic acids are amplified in series.

10 When employing a high affinity solid phase matrix according to the methods of this invention for capturing double-stranded DNA, the nucleic acid may be captured as double stranded nucleic acid directly from aqueous biological specimens or buffers. Alternatively, in some cases it is necessary to bind the DNA to the solid phase matrix as single-stranded DNA.
15 Accordingly, this invention includes methods of modifying buffer conditions to allow double-stranded DNA to be bound to the matrix as single-stranded DNA, as described below in detail.

For example, binding nucleic acid as a single strand is necessary in order to interface with hybridization and/or isothermal amplification methods.
20 Thus, when the target nucleic acid is double-stranded DNA, the sample is adjusted to an alkaline pH or a high chaotropic salt concentration to allow the double-stranded nucleic acid to become bound to the solid phase matrix as single-stranded nucleic acid.

Various nucleic acid amplification methodologies are suitable for the
25 direct solid phase nucleic acid amplifications of this invention. Such methodologies include, but are not limited to, PCR, SDA, NASBA, IsoCR, CRCA, Q beta replicase, branched chain DNA, and RT-PCR. Such methodologies are well known to those skilled in the art and need not be described in further detail. In addition, an amplification method referred to as
30 "unwinding coil amplification" (or "UNCA") may be applied to the methods of this invention. "Unwinding coil amplification" is disclosed in copending U.S.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

Patent Provisional Application Serial No. 60/299,410, filed June 19, 2001, and entitled "Unwinding Coil Amplification and Methods of Use Thereof," which is specifically incorporated herein by reference. Briefly, this method resembles Rolling Circle-type amplification technologies in that a long amplification
5 product is formed from many tandem repeats of a circular template. However, it differs from Rolling Circle in that the circular template is a linear DNA which coils back upon itself and is circular only by virtue of hybridization of the two ends of the molecule with each other.

The method of this invention for amplifying a target nucleic acid
10 sequence directly on the solid phase matrix also includes methods in which the matrix-bound sample contains multiple target nucleic acid sequences. In this method, the target nucleic acid is pre-amplified according to the method described in copending U.S. Patent Application Serial No. 09/589,560 to Gerdes, et al., filed June 6, 2000, entitled "Methods of Multiplexing
15 Amplification Reactions," which is specifically incorporated herein by reference. According to the Gerdes et al. method, a two-step multiplex amplification reaction is performed, where the first step truncates the standard initial multiplex amplification round to "boost" the sample copy number by only a 100 to 1000 fold increase in the target. This step of pre-amplifying multiple
20 target sequences is performed directly on the solid phase according to the methods of this invention. Further, the multiple target sequences are amplified simultaneously. Following the pre-amplification step, the product is divided into optimized secondary single, solid phase amplification reactions, each reaction mixture containing one of the primer sets that were used
25 previously in the first or multiplexed booster step.

Yet another embodiment of this invention provides novel methods for direct analysis of target nucleic acid bound to the solid phase as either single or double strands. One example of this embodiment includes the determination and/or quantitation of a target nucleic acid which may be
30 present in a sample. More specifically, another embodiment of this invention includes a method of capturing a target nucleic acid from a sample,

WO 03/020981

PCT/US02/26108

comprising: (a) contacting a probe comprising a nucleic acid sequence that is complementary to a specific sequence of the target nucleic acid with a solid phase matrix under conditions that allow the probe to become tightly bound to the solid phase matrix; and (b) contacting the matrix-bound probe with the
5 sample under conditions that allow the target nucleic acid to hybridize to the matrix-bound probe, whereby the target nucleic acid is captured by the probe. In this capture method, phosphate buffers may be utilized which reduce binding of the target nucleic acid to the solid phase matrix but which allow the target nucleic acid to bind to the matrix-bound probe.

10 The hybridized target can then be detected and/or quantitated according to methods well known to those skilled in the art. After detection and/or quantitation, the complex can be dissociated and the matrix washed to remove the target nucleic acid. The nucleic acid probe remains tightly bound to the matrix during all of the above manipulations, and therefore can be reused
15 multiple times. This methodology is particularly well suited for applications such as microarrays, lab-on-a-chip systems, and automated robotics.

Specimens that contain high levels of endogenous or background nucleic acid such as blood are extremely difficult to analyze for the presence of low level specific targets. Accordingly, another embodiment of this
20 invention provides a method that utilizes a solid phase matrix to irreversibly capture low level nucleic acids in such specimens. The method comprises changing buffer conditions such that the solid phase materials can selectively capture target sequences even in the presence of high levels of background nucleic acid. The embodiment of probe hybridization therefore provides high
25 stringency for commercial applications such as microarray hybridizations that demand low background in order to attain high sensitivity.

In yet another embodiment, this invention allows for gravity or high flow rate solid phase chromatography as a means of either capturing and/or concentrating nucleic acid from large volume specimens or removing
30 contaminant nucleic acid from aqueous buffers or solutions. More specifically, one embodiment of this invention provides methods for capturing and tightly

WO 03/020981

PCT/US02/26108

binding nucleic acid, at low concentrations and at high flow rates, from any sample by flowing the sample onto or over a solid phase matrix of this invention. In this manner, the nucleic acid becomes tightly bound to and concentrated on the matrix, while undesired components in the sample are washed off the matrix. In one embodiment, the sample is flowed over the matrix at a rate between about 0.5 mL/min and 2 mL/min. The bound nucleic acid can be washed extensively with aqueous buffers without elution from the solid phase to provide a purified nucleic acid.

The binding properties of RNA to a high affinity solid phase matrix have not been previously studied in the art. Another aspect of this invention demonstrates that RNA is tightly bound by the solid phase matrices described herein. This invention further provides methods of amplifying the matrix-bound RNA and the stable storage of the matrix-bound RNA.

The methods of this invention are also useful for commercial applications for automating nucleic acid extraction, concentrating low copy nucleic acid from high volume specimens, and interfacing extraction and purification with amplification or hybridization nucleic acid capture. Commercial applications include high throughput nucleic acid testing that would benefit from robotic automation, or economical screening of low prevalence targets by means of pooled specimen testing.

The instant invention describes methods for immediately capturing and tightly binding nucleic acid on a solid phase matrix at high flow rates. Binding occurs for both DNA and RNA even at high volumes and/or low target concentrations. Tightly bound nucleic acid can be subjected to stringent aqueous washes, stored for later analysis, and repeatedly amplified or otherwise analyzed or manipulated without significant displacement of the nucleic acid from the solid phase matrix. Since the nucleic acid remains bound to the solid phase even after multiple buffer washes, hybridization reactions, amplification reactions, etc., the nucleic acid can be reanalyzed an unlimited number of times. Repeated solid phase manipulation of any nucleic acid may be accomplished according to the methods of present invention, as

WO 03/020981

PCT/US02/26108

well as with other types of nucleic acid manipulations well known to those skilled in the art. The ability to reanalyze the same nucleic acid specimen according to the methods of this invention provides a means of result confirmation and/or expanded analysis.

- 5 The general principles and conditions for manipulations, including hybridization and amplification are well known in the art. Regardless of the specific application of the instant invention, the methodology details are calculated according to protocols well known in the art as well as those disclosed herein. Further, the refinements of these necessary calculations
10 are routinely made by those of ordinary skill in the art without undue experimentation.

- One skilled in the art will recognize that tight binding of nucleic acid onto a solid phase matrix, as disclosed herein, may be performed with a broad range of samples. Such samples include, but are not limited to,
15 biological samples derived from agriculture sources, bacterial and viral sources, and from human or other animal sources, as well as other samples such as waste or drinking water, agricultural products, processed foodstuff and air. More specifically, samples include, for example, blood, stool, sputum, mucus, cervical or vaginal specimens, cerebral spinal fluid, serum, urine,
20 saliva, teardrop, biopsy samples, histological tissue samples, tissue culture products, bacterial cultures, agricultural products, environmental samples, waste or drinking water, foodstuff and air. The present invention is useful for the irreversible binding of nucleic acid to a solid phase matrix from any sample containing nucleic acid, either naturally occurring or as a contaminant.

- 25 This invention further comprises methods of coating surfaces of substrates with the solid phase matrices of this invention. Such substrates include polymers (e.g., plastics) and oxide materials such as glass. These substrates can be of any shape suitable for nucleic acid archiving, analysis, and/or manipulations, including, but not limited to, tubes, plates, membranes,
30 capillaries, slides, beads, microparticles, fibers, microchannels, and microarrays. Accordingly, any of the above-described methods of nucleic acid

WO 03/020981

PCT/US02/26108

archiving and direct solid phase analysis and/or manipulation can be carried out using the coated surfaces and substrates prepared as described herein.

One method for coating polymer substrates such as standard PCR tubes with a solid phase matrix involves using adhesives. However, adhesives can be inhibitory to amplification reactions, especially in assays where detecting low copy number is necessary. Accordingly, this invention provides improved methods for attaching solid phase matrix to polymers or plastic surfaces in a manner that eliminates the amplification inhibitors that can be present in adhesives. The plastic surfaces include any surface formed from polymers and include tubes, plates, membranes, beads, microparticles, microchannels, microarrays, and any other suitable format fabricated from polymers. Methods of this invention for coating polymer substrates are described in detail in Example 13.

In addition to the above-described polymers, this invention further provides methods of coating glass (silicon dioxide) or other oxide substrates, such as aluminum oxide or titanium dioxide, with a solid phase matrix described herein. Any format of a glass or oxide substrate is suitable for use in nucleic acid manipulations. Examples include, but are not limited to, glass capillaries, glass fiber filters, microscope slides, porous glass wool, and alumina filters. Coatings of solid phase matrices can be deposited on glass surfaces in capillaries, slides, and other formats, as well as other oxide surfaces by several methods as described in detail in Example 14.

This invention further provides kits for nucleic acid archiving, analysis and/or manipulation according to this invention. The kit generally comprises a substrate such as polymers or glass coated on one or more surfaces with a solid phase matrix. The substrate can be of any form suitable for nucleic acid manipulations, including but not limited to, PCR tubes, plates, beads, membranes, beads, microchannels, microarrays, and the like. A suitable solid phase matrix includes any electropositive material that has been rendered hydrophilic according to this invention, including but not limited to, aluminum oxide (Al_2O_3), alpha aluminum oxide, gamma aluminum oxide, thin film

WO 03/020981

PCT/US02/26108

aluminum oxide of mixed composition (Al_xO_y), titanium oxide (Ti_2O_3), modified zirconium oxide (ZrO_2), and the like. The solid phase matrix can be coated on the surface of the polymers or glass according to the methods described in Example 14.

5 The kits may also comprise one or more containers containing reagents necessary for the nucleic acid manipulations and/or analyses. Examples of such reagents include, but are not limited to, lysis buffers, wash buffers, and lateral flow buffers.

10 The kits of this invention are suitable for manual procedures or integrated into automated or semi-automated processes. Different kit assemblies are suitable for high throughput robotics and analysis.

15 In one embodiment, the kit comprises (a) one or more PCR tubes coated on their inside surfaces with aluminum oxide, and (b) one or more containers comprising lysis and wash buffers. The kit may also contain instructions for using the kit. The kit of this embodiment provides an innovative system for nucleic acid extraction in which the nucleic acid remains bound in the extraction tube and can be directly amplified in this same tube.

20 Protocols have been validated for an increasing range of molecular targets and sample types, including whole blood, buffy coat, urine, cell culture, bacterial cells, mouse tails, and buccal swabs.

Various terms are used in this specification, for which it may be helpful to have definitions. These are provided herein, and should be borne in mind when these terms are used in the following examples and throughout the instant application.

25 As used herein, the term "archiving" refers to a method of tightly binding a nucleic acid to a solid phase matrix of this invention, followed by storage and/or manipulation of the bound nucleic acid. "Storage" encompasses both the capacity for delayed analysis and for repeated analysis of the same nucleic acid, as well as expanded analysis of multiple
30 nucleic acid targets, either simultaneously or in series. For this, procedural

WO 03/020981

PCT/US02/26108

manipulations include, but are not limited to, solid phase nucleic acid enzyme reactions, oligonucleotide or probe hybridization, and/or nucleic acid amplification reactions.

As used in this invention, a "template-dependent process" is defined as a process that involves either template-dependent recognition via a specific probe, copying procedure via signal amplification reaction, or target expansion via template dependent extension of a primer molecule. A template-dependent extension refers to nucleic acid synthesis and copy expansion of RNA or DNA target sequences, wherein the sequence of the newly synthesized strand of nucleic acid is dictated by the rules of complementary base pairing of the target nucleic acid and the primers. A template dependent process based upon complementary base pairing specifically using oligonucleotides or probes of specific sequence is known as "hybridization" detection.

A "primer" molecule refers to a nucleic acid sequence, complementary to a known portion of the target sequence/control sequence, necessary to initiate synthesis by DNA or other polymerases, RNA polymerases, reverse transcriptases, or other nucleic acid dependent enzymes.

"Target nucleic acid sequence" or "target nucleic acid" or "target" refers to the nucleic acid that is to be captured, detected, amplified, manipulated and/or analyzed. The target nucleic acid can be present in a purified, partially purified or unpurified state in the sample.

"Nucleic acid" refers to a polymer of two or more modified and/or unmodified deoxyribonucleotides or ribonucleotides, either in the form of a separate fragment or as a component of a larger construction. Examples of polynucleotides include, but are not limited to, DNA, RNA, or DNA analogs such as PNA (peptide nucleic acid), and any chemical modifications thereof. The DNA may be a single- or double-stranded DNA, cDNA, or a DNA amplified by any amplification technique. The RNA may be mRNA, rRNA, tRNA, a ribozyme, or any RNA polymer.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

In one embodiment, the term "capture" refers to the direct binding of nucleic acid onto a solid phase matrix. Binding can be direct in appropriate buffers based on the chemical and/or physical properties of nucleic acid. Alternatively, the term "capture" refers to the hybridization of a target nucleic acid present in a sample to a matrix-bound nucleic acid probe.

The present invention is directed to binding of DNA and RNA to materials that tightly bind nucleic acids, and various uses for solid phase bound DNA and RNA. This includes methods for using aluminum oxide or other materials that tightly bind nucleic acid for solid phase capture. The methods directly interface solid phase capture with various manipulations which include using aqueous buffers, single amplification or hybridization based reactions, and in-series multiplex amplification or hybridization based reactions. Further, nucleic acid capture is useful for the purpose of either removing contaminant nucleic acid, or concentrating low copy nucleic acid for the purpose of detection in either high volume or pooled specimen analysis. Aluminum oxide shows sufficient avidity for nucleic acid to bind it even at low concentrations and at high flow rates, for example, 5 mL/min. The instant invention is, thus, useful for large volume, gravity-based or high flow rate capture as well as the capture of nucleic acid in a manner compatible with extensive aqueous washes yielding extremely clean nucleic acid that is free from inhibitors that may interfere with amplification reactions.

The hybridization reactions disclosed herein include direct hybridization of a target nucleic acid to an oligonucleotide probe captured on a solid phase matrix, wherein the matrix may be in the form of beads or planar surfaces such as blots or microarray chips. Hybridization may also include the specific capture of a specific target sequence by first tightly binding capture probes (e.g., oligonucleotides, cDNA, cloned plasmid, transcribed or synthesized RNA, or PNA) to a solid phase matrix, followed by capturing the complementary target sequence(s) from a specimen. This is particularly useful for analyzing complex specimens having a high background level of non-specific nucleic acid. The capture bead methodology is useful for specific

WO 03/020981

PCT/US02/26108

target sequence capture such as by utilizing poly-T oligonucleotides bound to aluminum oxide (Al_2O_3) to purify poly A messenger RNA. By using the appropriate capture oligonucleotide, any specific target nucleic acid can be selectively removed and concentrated from a variety of specimen types.

5 This invention allows enzyme recognition and specific manipulation or amplification reactions with nucleic acid tightly bound to a solid phase. This includes both target amplification reactions such as PCR, RT-PCR, SDA, NASBA, IsoCR, or CRCA, as well as signal amplification reactions such as Q beta replicase or branched chain DNA (see U.S. Patent No. 5,594,118 to
10 Urdea et al., which is specifically incorporated herein by reference). This invention further provides the incorporation of aluminum oxide as a binding substance adhered to the reaction surface area of standard PCR tubes, as well as a protocol for rapid nucleic acid extraction that directly and conveniently interfaces with PCR thermal cycling reactions using the same
15 PCR tube. The PCR tubes or vessels provide a platform for automation using high throughput robotics.

Buffer systems that enable the utilization of aluminum oxide for alternative nucleic acid applications are included within the scope of this invention. Such buffer systems include, for example, guanidine thiocyanate-
20 based buffers which may also include a specific reducing agent that disrupts extremely hardy specimens, such as *Cryptosporidium parvum*. Other buffer systems suitable for purposes of this invention include alkaline buffers such as NaOH that provide a rapid and economical DNA binding buffer. In NaOH buffer, RNA is destroyed. Therefore, the use of a NaOH buffer provides a
25 means of selectively binding only DNA. Yet another system suitable for purposes of this invention includes buffers such as phosphate buffers that reduce binding of nucleic acid to aluminum oxide. These buffer systems provides for low background signal-to-noise for sensitive and efficient microarray, bead and blot hybridizations.

30 The tight binding characteristics of the solid phase matrices of this invention provide for repeated analysis of either the same or different genes in

WO 03/020981

PCT/US02/26108

series. This includes the analysis of both DNA and RNA simultaneously, or DNA and RNA independently but in series. By binding multiple probes, the hybridization capture can also be multiplexed for specific targets. Thus, the instant invention is useful for repeat or in-series analysis of any nucleic acid by either hybridization or amplification reactions. Once tightly bound, nucleic acid is stable and can be stored for prolonged periods at room temperature, refrigerated, or frozen.

Those skilled in the art readily recognize the present invention is broadly applicable to nucleic acid extraction, purification and detection. The following examples serve to explain and illustrate the present invention and therefore are not to be construed as limiting of the invention in anyway. Various modifications are possible within the scope of the invention.

Example 1

Methods and Materials

DNA binding is measured utilizing ^{32}P radiolabeling. The 4361 base pair PBR322 plasmid, obtained from New England Biolabs is randomly prime labeled using the Prime-It II Stratagene kit. The plasmid is cut with Hind III, unlabeled nucleotides are removed utilizing BioRad Biospin 6, and the concentration is adjusted to one nanogram per microliter (ng/ μL). Higher DNA concentrations are adjusted by the addition of salmon sperm DNA. The data for radiolabeling experiments represent the mean value of five replica data points.

Aluminum oxide beads (74-149 μm size) obtained from Aldrich (catalog No. 34,265-3) are treated with 0.1 N NaOH for 1 hour at room temperature to produce aluminum hydroxide beads. DNA binding buffers consisting of water (ddH₂O), 0.1 N NaOH, or a 4 M guanidine thiocyanate buffer (12 g GuSCN, 277 μL TritonTM X-100, 2.2 ml 0.2 M EDTA pH 8.0, and 10 ml 0.1 M Tris-HCl pH 6.4) are used. Binding is permitted either by rotation in a closed microfuge tube or by gravity flow filtration. Large beads readily settle to the bottom of the tube without centrifugation and therefore facilitate washing. For gravity

WO 03/020981

PCT/US02/26108

flow experiments a Spectrum SpectraMesh 43 μm filter (Spectrum, catalog No. 146530) is pressure fit into an ANSYS 4 mM chromatography column. The aluminum hydroxide beads are packed into this column as a liquid slurry, allowed to drain, blotted dry, washed once with 1 ml of 70% EtOH and dried prior to adding the DNA in the various binding buffers.

Xtra Bind™ (Xtrana, Inc., Broomfield, CO) is an alpha-alumina oxide ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) solid phase matrix. Xtra Amp™ (Xtrana, Inc., Broomfield, CO) is a PCR tube having a coating of Xtra Bind™ on the surface of the interior walls.

By way of illustration of solid phase amplification, published sequences and methods for well characterized loci are used. Sequences employed in the certain experimental procedures described below are listed in Table 1 (SEQ ID NOS: 1-10). Specifically, for PCR of HIV, the SK38/SK39 primer set (SEQ ID NOS: 8-9; Kellog and Kwok, In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, MA Innis et al., eds., Academic Press Inc., pp. 337-347 (1990), which is specifically incorporated herein by reference), the control HIV DNA plasmid obtained from Perkin Elmer (catalog No. N808-0016) and rTH reverse transcriptase amplification were used. Strand displacement amplification utilized the mycobacterium plasmid target and primer sets described by Walker, et al., Clinical Chemistry, 42:9-13 (1996), specifically incorporated herein by reference (SEQ ID NOS: 4-7). The human Short Tandem Repeat (STR) primer sets and protocols are the commercially available CTT and FFV multiplexes from Promega.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

TABLE 1

ID	SEQUENCE	SEQ ID NO:
CPSR805F	GAGGATAGAGGCATTGGTTG	1
CPSR948R	GTTTGTAGGGGTCGCTCAT	2
CPSR100cap	CTATATCGTAATACGCTCTGATTACGTAGGGAGTGG TACTCCTAACAGTAGGCCTCTGATTTGTCAGTCGACA TACCGCTGCGCTCAAATCCTTTAGAA	3
B1	CGATCGAGCAAGCCA	4
B2	CGAGCCGCTCGCTGA	5
S1	ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGTAAGGCGTACTC GACC	6
S2	CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGTGTACTGAGATCC CCT	7
SK38	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	8
SK39	TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC	9
HIV cap	ATCCTATTGTTCCTGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGC TATGTCACTTCCCCTTGGTTCTCTCATCTGGCCTGGT GCAATAGGCCCTGCATGCACTGGATG	10

Example 2Confirmation of Tight Binding of DNA to Solid Phase Matix

- Radiolabeled DNA (1 ng) is allowed to bind with aluminum oxide at room temperature, with rotation, for 1 hour in water (ddH₂O), 0.1 N NaOH, or 4 M guanidine thiocyanate buffer. In order to estimate binding capacity of 198 mg aluminum oxide, 1 ng of radiolabeled DNA was added to various concentrations of salmon sperm DNA (Figure 2). As the amount of salmon sperm DNA is increased, the percent of DNA bound gradually decreases as DNA binding reaches as maximum and additional solution phase DNA cannot bind. The irreversibility of DNA binding is shown by counting the radiolabel removed following 10 sequential washes (Figure 3). As illustrated in Figure 3, the DNA remains tightly bound with greater than 92% retention following 10 washes with 95°C PCR buffer. The majority of eluted counts (6%) occur

WO 03/020981

PCT/US02/26108

during the first four washes with only a 2% total elution during the last six washes. Therefore, the data in Figure 3 demonstrate that DNA is tightly bound to the aluminum oxide, with greater than 90% DNA retained even after 10 washes with either 70% ethanol, water or PCR buffer at 95°C. Aluminum oxide-bound DNA is, therefore, readily amenable to aqueous washes and buffer changes without centrifugation and without danger of losing the DNA. The solid phase bound nucleic acid selected from large volume samples can be washed and then resuspended at any desired volume. For example, DNA can be bound to aluminum oxide from a 3 milliliter (mL) sample containing 10 guanidine thiocyanate buffer, washed with phosphate or Tris buffer, then the beads resuspended in small volumes of amplification reaction mixtures (50 µL). These properties provide a method of simplifying the interface between DNA purification and amplification.

Example 3

Gravity Flow Chromatography

Significant improvement in the sensitivity of DNA detection from specimens of high volume and low concentration is derived based on the capability of aluminum oxide to efficiently bind DNA at high flow rate by chromatography. Radiolabeled DNA was allowed to bind during gravity 20 filtration of either 74-149 µm aluminum oxide beads (Al_2O_3) or 150-212 µm silicon dioxide beads (SiO_2) (Sigma, catalog No. GI 145). The amount of silicon dioxide or aluminum oxide was adjusted such that they both have equal surface area available for DNA binding. DNA (50 ng) bound during gravity filtration when diluted in either 1 mL guanidine thiocyanate binding 25 buffer (1.5-2 minutes flow time, approximately 0.5 mL/min) or 10 mL guanidine thiocyanate binding buffer (5-8 minute flow times, approximately 2 mL/min). Figure 4 compares the effect of flow rate and concentration on DNA binding to silicon dioxide versus DNA binding to aluminum oxide. Aluminum oxide was much more efficient at binding DNA during gravity flow 30 chromatography of the 1 mL volume. The binding efficiency of silicon dioxide (SiO_2) in 4 M guanidine thiocyanate binding buffer was 6% versus the binding

WO 03/020981

PCT/US02/26108

efficiency of aluminum oxide (Al_2O_3), which was 52% in the same buffer. Binding efficiency for both SiO_2 and Al_2O_3 improved with 1 ml NaOH binding buffer (the binding efficiency of SiO_2 was 12.4% versus the binding efficiency of Al_2O_3 , which was 60%). Increasing the flow rate four fold by using the 10 mL volume and starting with the same 50 ng DNA (i.e., 10 times lower per mL concentration than the 1 mL specimen) drastically reduced the binding efficiency of silicon dioxide to less than 2%. In contrast, aluminum oxide suffered only a 10% reduction in total count recovery. Additional experimental procedures indicated that by repeating the chromatography using a second or third pass of the high volume specimen, up to 80% efficiency of binding is obtained for aluminum oxide (data not shown).

These results show that aluminum oxide is vastly superior for solid phase DNA binding compared to silicon dioxide and is capable of chromatographic capture of DNA at high flow rates and low concentrations. The properties of aluminum oxide thus allow for DNA concentration from pooled or large volume specimens and provide greatly increased per-milliliter sensitivity of DNA detection. The high avidity of aluminum oxide for DNA is also useful for the removal of low level DNA contaminants from water, buffers, or other reagents.

Example 4

Solid Phase Amplification

Since aluminum oxide tightly binds nucleic acid, aluminum oxide is only useful if the bound DNA can be amplified directly on the solid phase. In order to illustrate compatibility with different amplification methods, 10^3 copies of HIV DNA and 1 μL of a plasmid prep of mycobacterium DNAs were simultaneously bound to aluminum oxide in water. These bound DNA targets were then amplified in sequence with HIV, initially amplified using 35 cycles of polymerase chain reaction (PCR) (see Figure 5, panel "a"), followed by amplification of the mycobacterium target via strand displacement amplification (SDA) (see Figure 5, panel "b"). An ethidium bromide (EtBr) stained agarose gel of the HIV PCR, shown in Figure 5, panel "a" exhibited

WO 03/020981

PCT/US02/26108

excellent amplification product. In Figure 5, panel "a", well 1 is a molecular weight ladder, wells 2 and 3 are positive aqueous 1000 copy control amplifications, wells 4, 5, 6 and 7 are aluminum oxide solid phase PCR amplifications, wells 8, 9, 10 and 11 are negative aluminum oxide solid phase controls, and wells 12 and 13 are aqueous negative controls. Following the HIV PCR amplification, the aluminum oxide is washed four times with 70% EtOH, dried at 55°C for 10 minutes, then an SDA amplification of the mycobacterium target is performed. An EtBr stained agarose gel of the SDA amplification also reveals amplification product at equivalent levels to those observed in the aqueous controls (Figure 5, panel "b"). In Figure 5, panel "b", wells 1 and 2 are aqueous positive controls, wells 3, 4, 5 and 6 are aluminum oxide solid phase DNA amplifications, wells 7, 8, 9 and 10 are negative aluminum oxide controls, and wells 11 and 12 are aqueous negative controls.

Additional experimental procedures (not shown) showed that the mycobacterium plasmid DNA is bound to aluminum oxide using either the 4 M guanidine thiocyanate buffer or 0.1 N NaOH binding buffers and that SDA amplification occurred on these solid phases.

Alkaline conditions are commonly known to produce single strands. DNA is also single stranded in 4 M guanidine thiocyanate buffer (Thompson and Gillespie, Analytical Biochemistry, 163:281-291 (1987), specifically incorporated herein by reference). SDA amplification of DNA bound to aluminum oxide in NaOH or guanidine thiocyanate buffer proceeds without a melt step. These data confirm that in these binding buffers the DNA is bound as single strands and provides for a direct interface between DNA purification with aluminum oxide and isothermal amplification methods requiring a single stranded target nucleic acid.

To illustrate that aluminum oxide is also capable of efficient binding of RNA, the 4 M guanidine binding buffer was used with aluminum oxide to purify HIV directly from an acid citrate dextrose (ACD) plasma specimen of an AIDS patient. This specimen had previously been determined by viral load quantitative PCR to have a titer of 2×10^4 RNA copies per milliliter. For

WO 03/020981

PCT/US02/26108

aluminum oxide extraction, 0.5 mL of plasma was diluted to 5 mL with 4 M guanidine thiocyanate binding buffer and then gravity filtered onto 40 mg aluminum oxide.

Figure 6 shows excellent PCR product formation detected on an EtBr stained agarose gel following rtTH reverse transcriptase amplification. In Figure 6, well 1 is a molecular weight ladder, well 2 is a 1000 copy positive aqueous HIV DNA, wells 3, 4 and 5 are rtTH reverse transcriptase amplification products following three separate guanidine thiocyanate buffer/aluminum oxide extractions, wells 6 and 7 are aluminum oxide negative controls, and well 8 is an aqueous negative control. The 4 M guanidine thiocyanate buffer protocol is capable of releasing RNA from HIV virions present in plasma, and these were captured via a high volume (5 mL) gravity filtration onto aluminum oxide in an amplifiable state. Aluminum oxide binds nucleic acids in general.

Example 5

DNA Archiving

According to this invention, combining the ability to tightly bind nucleic acid to solid phase matrices with direct solid phase amplification allows for repeated analyses of the same DNA sample an infinite number of times. To illustrate this point, 10 μ L of acid citrate dextrose (ACD) blood was bound to aluminum oxide in 4 M guanidine thiocyanate buffer. The bound DNA was then PCR amplified five times, 30 cycles each, using five sequential short tandem repeat (STR) amplifications and five different primer sets (Promega) in the following order: 1) F13B, 2) FESFPS, 3) VWA, 4) CTT multiplex, and 5) FFV multiplex. After the final amplification set, the DNA sample had undergone 150 PCR cycles, in toto.

Figure 7 is a silver stained gel depicting the patterns after amplifications with the Promega STE CTT multiplex, which was the fourth gene set amplified, and amplifications with the Promega FFV multiplex, which was the fifth gene set amplified. In Figure 7, lanes 1, 8, 9 and 16 are allelic ladders, lane 17 is human genomic aqueous positive control, lanes 2, 3 and 4

WO 03/020981

PCT/US02/26108

are the fourth amplification (CTT multiplex) of aluminum oxide-bound DNA, lanes 5, 6 and 7 are the aluminum oxide CTT negative controls, lanes 10, 11 and 12 are the fifth amplifications (FFV multiplex) of aluminum oxide-bound DNA, and lanes 13, 14 and 15 are the aluminum oxide FFV multiplex negative controls. The results, shown in the silver stained gel of Figure 7, demonstrate that amplification occurred for all five PCRs. These data confirm DNA archiving and repeated solid phase aluminum oxide amplification of the same bound DNA, following 4M guanidine thiocyanate buffer protocol and then amplification by PCR using five sequential short tandem repeat (STM) amplifications (150 total PCR cycles).

In summary, DNA is archived onto aluminum oxide so that it is available for additional amplification analysis. This includes repeat analysis of the same gene, serial amplification of different genes, for example, to detect different infectious agents, or expanded analysis, for example, higher discriminatory power for human identity analysis.

Example 6

Buffers That Either Promote or Block Irreversible Binding of Nucleic Acid to Aluminum Oxide

Radiolabeled DNA (50 ng) was added to 500 μ L aqueous solutions of the various binding buffers listed in Table 2 in the presence of 198 mg aluminum oxide. In order to more accurately measure the exclusive binding of radiolabeled DNA to aluminum oxide, free unincorporated nucleotides that remained following the Biospin 6 purification as described in Example 1 were determined via trichloroacetic acid (TCA) precipitation. As shown in Table 2, using this corrected procedure, DNA bound to aluminum oxide at 100% efficiency in either 4 M guanidine thiocyanate buffer or sodium hydroxide. Certain other substances and/or conditions, such as the addition of blocking buffers, reduce the binding of DNA. In Table 2, for example, these include 10% bovine serum albumin or K_2HPO_4 buffer.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

TABLE 2

Binding Buffer	Percent Bound	Percent Unbound
ddH ₂ O	20	80
0.1 N NaOH	110	0
4 M GuSCN	104	0
10% BSA	5	95
1 M K ₂ HPO ₄	4	96
10% Triton™ X-100	64	36
10% Tween™ 20	106	0
10% SDS	12	88
5X SSC	60	40

Since both binding and blocking conditions have been defined, it is therefore possible to develop a convenient and specific procedure for first tightly binding specific oligonucleotides or probes to the solid phase matrix, and then changing the reaction conditions by adding a blocking buffer that allows for capture of a specific target by hybridization to the solid phase bound nucleic acid. For example, a first nucleic acid sequence can be tightly bound to a solid phase matrix of this invention by contacting the sample with the matrix in a buffer that allows the first nucleic acid to tightly bind to the matrix. Then, when it is desired to hybridize a second nucleic acid sequence to the bound first nucleic acid sequence, the buffer conditions can be changed to a blocking buffer, such as a phosphate buffer, that allows hybridization of the second nucleic acid to the first nucleic acid while reducing the amount of second nucleic acid that becomes bound to the solid phase matrix. The blocking buffers therefore serve as hybridization buffers with low background signal for hybridizing nucleic acid sequences to the solid phase bound first nucleic acid. After performing the desired manipulation (e.g., amplification, detection, etc.) the hybridized second nucleic acid sequence is then removed. The solid phase bound first nucleic acid can then be reused multiple times.

It is well known that RNA is destroyed in 0.1 N NaOH. Therefore, by using this binding buffer DNA is exclusively captured. Efficient cell disruption

WO 03/020981

PCT/US02/26108

and rapid nucleic acid binding with both guanidine thiocyanate buffer and sodium hydroxide buffers is effective for blood, buccal swabs, urine, and HIV virions spiked into plasma or serum. However, for certain infectious organisms, such as *Cryptosporidium parvum*, it is necessary to heat the specimen to 95°C and include protein reducing agents such as dithiothreitol (DTT) in order to efficiently disrupt the cell (SEQ ID NOS: 1-3; Table 1).

Example 7

Immediate Binding at High Flow Rate and Incorporation of Aluminum Oxide into PCR Tubes

The capability of aluminum oxide (Al_2O_3) to bind DNA at high flow rates is measured using the same total cpm of radiolabeled DNA suspended in 1 mL, 5 mL, or 10 mL of 4 M guanidine thiocyanate buffer and passing these by either aluminum oxide (Al_2O_3) or silicon dioxide (SiO_2) at measured flow rates. The results, shown in Figure 8, confirm that aluminum oxide is vastly superior to silicon dioxide. Aluminum oxide (Al_2O_3) efficiently bound nucleic acid at flow concentration, high volume (10 mL) specimens to the 1 mL specimen with 10-fold higher per ml concentration and ten fold smaller volume. DNA binding is immediate, as illustrated by the experimental results depicted in Figure 9. Here, 50 μL of acid citrate dextrose (ACD) anticoagulated blood was added to aluminum oxide (Al_2O_3) in 0.1 N NaOH binding buffer. The HLA DR beta gene was PCR amplified from the solid phase bound DNA either immediately or after permitting various incubation times for the DNA to bind. In Figure 9, binding as indicated by the efficiency of amplification was identical for the immediate time point (lanes 1-4), the 1-minute time points (lanes 5-8) or the 2-minute time point (lane 14). Lane 13 is the aqueous negative control.

These experimental results are the basis of an extremely convenient and rapid protocol for automatable nucleic acid extraction that is directly interfaced with PCR amplification. For this, aluminum oxide is adhered, via a silicon or any other adhesive shown not to inhibit PCR, into PCR tubes as shown in Figure 10. Alternatively, it may be incorporated into a 96 PCR tube

WO 03/020981

PCT/US02/26108

plate for higher throughput. Either of these alternatives provides for simple nucleic acid extraction by a protocol comprising: 1) adding binding buffer to the aluminum oxide PCR tube, 2) adding specimen to each tube, mixing and then aspirating liquid to waste, 3) washing by repeat pipetting wash buffer (three times), then aspirating wash buffer to waste, 4) adding PCR amplification master mix, and 5) amplifying in a thermal cycler. The pipetting steps of this protocol are easily automated for high throughput using a robotic system.

Example 8

Confirmation of Binding of Pure RNA to Aluminum Oxide (Al_2O_3)

Example 4 described that RNA can be tightly bound to and is amplifiable on aluminum oxide based upon the detection of HIV from a patient plasma specimen. It is possible that this result is due to contaminating proviral DNA in the serum. RNA binding using a pure RNA target confirmed irreversible binding and solid phase amplification. Figure 11 depicts the results of amplification of a pAW109 pure RNA target bound in 4 M guanidine thiocyanate buffer and rtPCR amplified on the aluminum oxide (Al_2O_3) solid phase. Binding and amplification of IL-2 mRNA and *Cryptosporidium parvum* dsRNA on aluminum oxide (not shown) were demonstrated in a similar manner.

Example 9

Utilization of Tightly Bound Nucleic Acid Probes for Specific Target Capture by Hybridization

Experiments performed to determine the limits of detection indicated that detection of DNA bound to aluminum oxide (Al_2O_3) following PCR amplification requires 1000 copies, and bound RNA requires 103 copies (Figure 11). Sensitivity of detection was significantly improved to less than 100 copies for either RNA or DNA by binding a nucleic acid probe to a solid phase matrix according to this invention, followed by hybridization of the probe to a target nucleic acid present in a sample. High copy nucleic acid probe of 20-100 base pair length complementary to a sequence adjacent to the desired nucleic acid target was tightly bound to aluminum oxide (Al_2O_3) in

WO 03/020981

PCT/US02/26108

0.1 N NaOH buffer. After washing, this probe was used to capture the nucleic acid target via hybridization, even in specimens that contain high background levels of nucleic acid. For this procedure, the specimen was disrupted with 4 M guanidine thiocyanate buffer and diluted three fold in the presence of the matrix-bound probe. Hybridization was permitted to occur. Following a wash step, the target was directly PCR amplified. As shown in Figure 11, this results in limits of detection of between about 10 to 100 copies of the target.

Example 10

Capture of Low Copy Targets in High Volume or Pooled Specimens

Hybridization capture by a nucleic acid probe that is tightly bound to aluminum oxide is efficient for the specific selection of target sequences even at high initial specimen volumes. As shown in Figure 12, 1000 copies of HIV from an AIDS patient plasma specimen were detectable with the hybridization solid phase capture procedures described above, even when diluted to an initial volume of 5.5 mLs with plasma. The plasma was added directly to dry guanidine thiocyanate powder for the extraction in order to minimize dilution. With this adjustment, the final volume for hybridization to the capture bead was 30 mLs. Additionally, positive HIV plasma at 100 μ L volume was pooled with an additional 24 negative plasma specimens (100 μ L), and was still detected. These pooling experiments confirmed a detection sensitivity of 48 HIV virion copies per milliliter. Similar procedures demonstrated the detection of 100 copies of *Cryptosporidium parvum* pooled in 30 mLs of water (not shown). The hybridization capture probe protocol, therefore, can be used to screen pooled specimens at a sensitivity almost equivalent to that for an individual specimen, carrying tremendous commercial potential since it will allow highly sensitive pooled specimen testing and providing significant reduction of cost.

Example 11

Storage of Nucleic Acid Tightly Bound to Aluminum Oxide

The nucleic acid from 50 μ L of acid citrate dextrose (ACD) blood was bound onto aluminum oxide using either the 4 M guanidine thiocyanate buffer

WO 03/020981

PCT/US02/26108

or 0.1 N NaOH buffer. The bound nucleic acid was then stored either dry, in 70% EtOH, or in Tris EDTA buffer at room temperature, 4°C, or -20°C. Nucleic acid was generally stable for all of these conditions for three months, and potentially much longer utilizing the instant invention -- perhaps indefinitely.

5

Example 12Identification of Additional Materials Capable of Nucleic Acid Archiving

This Example illustrates that select materials have been identified that perform the generally stated purpose of nucleic acid archiving. These materials bind DNA and RNA with high binding constants, while also allowing enzymatic amplification methods to access the bound nucleic acids for target amplification. To identify materials that can tightly bind nucleic acids, a fluorescent method was designed as a more convenient alternative to the radioisotope experiments described previously. For DNA, synthetic oligonucleotides with a 5' end labeled fluorescent dye, such as fluorescein, were used. For RNA, run-off transcription in the presence of dye-labeled nucleotides with an RNA polymerase was used to generate labeled strands. These fluorescently-labeled strands were mixed with binding buffer, exposed to different materials, and then washed after designated times. Fluorescence emission of the materials with and without binding can be measured, as well as emission from the various solutions (labeled nucleic acids, washes). After confirming binding to a matrix, the capability of the bound nucleic acids to be amplified can be verified with extraction and amplification procedures using DNA or RNA, purified nucleic acids or nucleic acids in various media (blood, cell culture, etc.), and different amplification methods such as PCR, NASBA, and SDA.

One of the preferred solid phase matrices of this invention is alpha-aluminum oxide (Al_2O_3), which is sold as a nucleic acid binding matrix under the trademark Xtra Bind™ (Xtrana, Inc., Broomfield, CO). It is important to note that aluminum oxide exists in different chemical forms with unique properties associated with each. For the described nucleic acid archiving, alpha aluminum oxide is suitable for binding and amplification in standard

WO 03/020981

PCT/US02/26108

conditions. Other forms of aluminum oxide may bind DNA or RNA, but amplification of the bound nucleic acids requires changes in the amplification reaction. For example, PCR amplification of DNA bound to gamma aluminum oxide can be successful if the magnesium ion concentration is increased approximately 50% or more. Increasing the polymerase concentration can also help. Alpha aluminum oxide is sometimes referred to as fused or calcined, but these terms are generally not as specific or well defined as the term "alpha."

In addition to aluminum oxide, particularly alpha aluminum oxide, other materials have been identified as useful nucleic acid archiving matrices. These materials are titanium oxide (Ti_2O_3), a thin film aluminum oxide of mixed composition, generally referred to as Al_xO_y , and modified zirconium dioxide (ZrO_2). To prepare modified ZrO_2 , the ZrO_2 exposed to an acidic or a basic solution, then mixed with DNA and washed, followed by enzymatic amplification has demonstrated amplification of bound DNA. The capabilities of these various materials are demonstrated in Figures 13-16.

Figure 13 is a bar graph presenting fluorescent signals from fluorescently labeled DNA and RNA bound to different solid phase materials. The solid phase materials used in this Example were: 100-200 mesh alpha-aluminum oxide ($\alpha-Al_2O_3$), 150 mesh gamma-aluminum oxide, 100-200 mesh zirconium dioxide, glass beads (150-212 μm), glass beads coated with 1000 mesh $\alpha-Al_2O_3$, glass beads coated with 1000 mesh $\alpha-Al_2O_3$ in a SiO_2 thin film, and glass beads having a thin film of aluminum oxide deposited thereon. Glass (SiO_2) beads were also used as a minimally binding reference, and the results for DNA and RNA are normalized by their respective gamma- Al_2O_3 signals.

Figure 14 is ethidium bromide-stained, agarose gels after PCR amplification of DNA bound to different materials. The gels shown were washed four and eight times prior to amplification, and similar results were obtained after the fifth, sixth, and seventh washes. The target DNA was purified, placental DNA, and the amplified region was Homo sapiens G

WO 03/020981

PCT/US02/26108

protein-coupled receptor 57 (GPR57). For this figure, the tested materials were 1) PCR tubes coated with aluminum oxide (Al_2O_3); 2) alpha- Al_2O_3 ; 3) Ti_2O_3 ; and 4) a thin film coating of aluminum oxide on glass beads. Duplicate reactions are shown for each matrix and number of washes.

- 5 Figure 15 is ethidium bromide-stained, agarose gels after PCR amplification of DNA bound to the inner walls of glass capillary tubes that were coated with a thin aluminum oxide film. Bound DNA was amplified with rapid thermal cycling for approximately 45 minutes total time. The bound target was purified placental DNA, and the amplified region was the Homo
10 Sapiens G Protein-coupled receptor 57 gene.

Figure 16 shows lateral flow strips with prominent bands obtained by NASBA amplification of RNA from *Escherichia coli*. *E. coli* dilutions using either PCR tubes coated with Al_2O_3 or a Ti_2O_3 slurry were processed, and the results shown.

- 15 Example 13

Alternative Methods for Coating Plastic Surfaces with the Solid Phase Matrix

Materials

- (A) One method of coating plastic surfaces according to this invention involves bringing a heated solid phase matrix in contact with cooled plastic.
20 This permits the partial melting of the plastic and embedding of the solid phase matrix. The solid phase matrix is heated to from 700°C to 800°C in a crucible, then poured onto or into the plastic materials (e.g. PCR tubes) that have been cooled to a temperature between about 0°C and 10°C. For example, the plastic material can be placed in an ice bath (4°C). Excess solid
25 phase matrix is tapped out and the tubes packaged. Variations to this general heating and melting method, such as utilizing a manifold for coating multiple tubes simultaneously, have also been developed.

- (B) In addition to melting the solid phase matrix into the PCR tubes or other plastic materials, methods to deposit thin film coatings on the surface of
30 the plastic have been identified. Using conventional treatment and deposition

WO 03/020981

PCT/US02/26108

methods such as plasma etching, chemical vapor deposition (CVD), and thermal evaporation, metal oxide thin-films can be deposited and bound to the underlying plastic material. Adjusting the deposition conditions leads to films that bind nucleic acids and allow amplification of the bound DNA or RNA.

- 5 (C) As a variation, the plastic surfaces can be chemically activated, for example, by plasma etching or strong acid/base treatment and a liquid metal oxide precursor such as aluminum s-butoxide or another alkoxy metal reagent can be introduced to react with the activated plastic surface. Methods of activating plastic surfaces are known in the art and need not be described in
10 further detail. This approach can also create the desired binding and amplification coatings.

Example 14

Methods for Coating A Solid Phase Matrix onto an Oxide Surface

- 15 Solid phase matrices can be deposited on glass surfaces in capillaries, slides, and other formats, as well as other oxide surfaces by several methods as described below.

(A) In one embodiment, aluminum oxide granules of large or small dimensions were adhered to the glass surfaces with acidic or basic conditions that promote hydrolysis, followed by drying. An example of an acidic solution
20 includes a solution containing, by volume, 95% ethanol, 0.5% concentrated hydrochloric acid (HCl), and 4.5% water.

(B) In another embodiment, aluminum oxide granules were deposited on glass surfaces by mixing the aluminum oxide with a sol comprising silicon dioxide, aluminum oxide, or metal oxide precursors such as
25 tetramethoxysilane, tetraethoxysilane, or aluminum s-butoxide, allowing the mixture to gel on the glass surface, and drying the mixture. This provided a film of aluminum oxide granules in a metal oxide binder.

(C) In another embodiment, Ti_2O_3 granules were deposited on glass surfaces by Methods A and B of this Example.

- 30 (D) In addition to depositing existing aluminum or titanium oxide

WO 03/020981

PCT/US02/26108

granules, metal oxide films were deposited on glass substrates by reacting metal oxide precursors, such as aluminum s-butoxide or titanium ethoxide in a solution phase reaction in which the precursor hydrolyzed and forms metal hydroxides. The metal hydroxides are then condensed with each other ,
5 leading to covalent bonding to the oxide layer of the glass or other underlying metal oxide substrate. For example, an aluminum oxide sol was prepared by hydrolysis and peptidization of aluminum s-butoxide following the procedure described by A. C. Pierre and D. R. Uhlmann (J. Am. Ceram. Soc. 70:28-32 (1987)). The glass surface is then exposed to this solution, followed by
10 drying. This resulted in a thin film coating of aluminum oxide having a mixed aluminum and oxygen composition. For example, certain regions of the film may contain Al_2O_3 , other regions may comprise $Al_{2.3}O_{3.1}$, etc.

The coatings described in this example can be deposited by any number of suitable methods known in the art, including but not limited to,
15 dipping, immersing, spin casting, or by similar methods of exposing the substrate to the liquid suspension/sol of materials.

Example 15

Long term storage of archived DNA and RNA

(A) In Example 11, the storage of genomic DNA extracted from
20 blood was confirmed to be stable for three months. This study has now been extended to 18 months. Even after the sample described in Example 11 was stored dry for 18 months, robust amplification occurred (data not shown).

(B) A similar experiment was designed to determine the capability of aluminum oxide to permit stable storage of RNA. RNA was obtained from an
25 E. coli slt 1 only lab strain, and purified with the Qiagen RNeasy Maxi Kit™. 1:2, 1:4, and 1:10 dilutions of the starting RNA extract (316 ng) were made and then bound to Xtra Amp™ tubes by adding 50 mL of 10x PCR buffer without $MgCl_2$ and 5 ml of each RNA dilution. After a 30 minute incubation, the supernatant was removed, the tubes were allowed to air dry for 5-10
30 minutes. All tubes were capped and stored at either room temperature, 4°C,

WO 03/020981

PCT/US02/26108

or -20°C. Tubes were removed at 1 week intervals, and an E. coli sz and slt1 multiplex, NASBA master mix was added. A 90 minute NASBA reaction at 42°C followed, with the following conditions: 80 mM Tris-HCl, (pH 8.5), 50 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dNTP mix, 2 mM rNTP mix, 200 nM primer mix, 15% sorbitol, and 15% DMSO. The results were visualized by lateral flow detection using the methods described in U.S. Patent No. 5,989,813, which is specifically incorporated herein by reference. The purified RNA was stable for the 8 weeks when stored at 4°C and -20°C, and some degradation was apparent after 8 weeks when stored room temperature, particularly at the higher 1:10 dilution.

Example 16

Solution-phase Amplification of Nucleic Acids Displaced from the Matrix

Some applications such as genotyping can benefit from simplified sample preparation and solid phase archiving according to the methods of this invention described above. In another embodiment, amplification is performed in solution using a purified nucleic acid sample, rather than on the solid phase. This example provides such a method using the solid phase matrix materials described herein. Although the nucleic acid targets are tightly bound to the solid phase, a small percentage of the nucleic acids are released (displaced) into solution as purified nucleic acid when the matrix is washed with TE buffer, water, or other suitable buffers. This solution can then be used in a standard enzymatic amplification reaction. Multiple rounds of release and amplification are feasible, allowing multiple amplification targets to be analyzed individually.

The standard displacement procedure included placing a solution of blood mixed with lysis buffer in an Xtra Amp™ tube or a tube containing 5 to 10 µL of Al₂O₃, Ti₂O₃, or coated glass beads, and following standard procedures for incubation and washing. After washing, 50 to 100 µL of TE buffer (Tris HCl/EDTA) were added to the tube. The solution was incubated for about 30 minutes, and the TE solution was removed. Aliquots (5-10 µL) of the removed TE solution containing the displaced DNA were then mixed with

WO 03/020981

PCT/US02/26108

a conventional PCR master mix (primers, enzymes, buffers, etc.) and temperature cycled. The procedure of adding TE buffer and removing aliquots was repeated at least five times, resulting in consistent and accurate amplification. Figure 17 shows an ethidium bromide-stained agarose gel after

5 PCR amplification of the displaced nucleic acid ("Displacement") according to this Example, as well as solid phase amplification of nucleic acid bound to the following solid phase matrix materials: (1) Xtra Amp™ (XA) tubes; (2) 100 to 200 mesh alpha aluminum oxide (α - Al_2O_3); (3) Ti_2O_3 , and (4) aluminum oxide thin films. In the example shown in Figure 17, the bound target was purified

10 placental DNA, and the amplified region was the Homo Sapiens G Protein-coupled receptor 57 gene.

Example 17

Methods for Multiple PCR Amplifications using the Same Archived Matrix

According to the present invention, archived nucleic acid samples

15 present an opportunity to repeatedly process the same sample immediately or over an extended time period. The archived samples further allow for the investigation of the same amplified region multiple times and/or the investigation of a series of different targets.

(A) Protocols have been developed to allow repeated amplification of

20 the same matrix-bound target. To repeatedly amplify the same target region, purified nucleic acid or lysed biological samples are introduced to an Xtra Amp™ tube or an alternative tube containing a slurry of aluminum oxide, titanium oxide, or other granules. Standard binding and wash procedures are followed. Primers and PCR mix for the target amplicon are then added to the

25 tube, and a standard 32 to 40 cycle PCR reaction is performed. The product solution is removed, and the tube washed with a wash buffer at 95°C. For additional rounds to amplify the same target, primers and PCR mix are added, and a much smaller number of amplification cycles are necessary.

Figures 18 and 19 show ethidium bromide-stained agarose gels of

30 repeat amplification of the same region of matrix-bound DNA. Genomic DNA was extracted from whole blood (human) using Xtra Amp™ tubes. PCR

WO 03/020981

PCT/US02/26108

- amplification (35 cycles) was performed to amplify the HLA-DR beta gene using standard PCR conditions for amplification of this gene. (Figure 18) The Xtra Amp™ tubes were then incubated at 95°C for 10 minutes with a wash buffer (150 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 0.10% Tween-20).
- 5 The wash buffer was removed and fresh PCR amplification reagents were added to re-amplify HLA-DRβ. In the second amplification reaction, the PCR reagent concentrations and cycle parameters were the same as with the initial amplification reaction, with the exception that the number of PCR cycles was decreased. Figure 19 shows the gels after 10 and 15 PCR cycles.
- 10 Approximately ten cycles were sufficient to generate amplicons that were clearly visible and relatively clean when viewed on an ethidium bromide stained, agarose gel (Figure 18).

- (B) To amplify a series of different nucleic acid targets, the first round followed standard procedures: samples were introduced to a container such as a PCR tube coated with a solid phase matrix (e.g., aluminum oxide).
- 15 Standard binding and wash procedures were followed. Primers and PCR mix for the target amplicon were then added to the tube, and a standard 32 to 40 cycle PCR reaction was performed. Subsequent rounds followed the same basic procedure, except that new primers for different targets were used, and
- 20 each round was preceded by a high temperature (nominally 95°C) incubation and wash to remove older, hybridized primer and product. Several different amplicons have been generated with this procedure.

- Figures 20, 21, 22, and 23 show ethidium bromide-stained agarose gels of serial PCR amplification reactions of different regions of the same
- 25 matrix-bound DNA. Genomic DNA was extracted from whole blood (human) in Xtra Amp™ tubes. PCR amplification was performed to amplify one gene using standard PCR reaction conditions for amplifying the gene. The tubes were then incubated at 95°C for 10 minutes with a wash buffer (150 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 0.10% Tween-20). The wash buffer was
- 30 removed and fresh PCR amplification reagents were added to the tubes to amplify another gene using standard PCR reaction conditions for that gene.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

The heat incubation with wash buffer and standard PCR reaction conditions were repeated for amplification of several different regions of the matrix-bound DNA. The amplified targets shown in Figures 20, 21, 22 and 23 are HUGALPCR2, HGH PCR5, HDYST3, and HLA A, respectively.

5

Example 18Genome-wide Sample Boost using Random Primers and an Initial,
Multiplexed Amplification Step

- (A) The nucleic acids bound to the solid phase can be amplified with multiple primers simultaneously, as well as with a single primer set. By
10 amplifying with multiple primers, a number of different amplicons can be generated simultaneously. Although the conditions for each primer set are not necessarily optimal and result in uneven amplification, the resulting solution can then be used for further, more specific amplifications of a particular target.
- (B) A procedure that performs an initial, limited cycle number "boost" in
15 the presence of multiple primers has been described in copending U.S. Patent Application Serial No. 09/589,560 to Gerdes, et al., filed June 6, 2000, entitled "Methods of Multiplexing Amplification Reactions," which is specifically incorporated herein by reference. In this method, a two-step multiplex
20 amplification reaction is performed, where the first step truncates the standard initial multiplex amplification round to "boost" the sample copy number by only a 100-1000 fold increase in the target. Following the first step the product is divided into optimized secondary single amplification reactions, each containing one of the primer sets that were used previously in the first or
25 multiplexed booster step.

Thus, an alternative embodiment of the present invention generalizes the collection of "boost" primers. That is, the method of this invention replaces the collection of primer sets specific to the amplicon targets of later rounds with a collection of random primers. After the "boost" with random
30 primers, the pre-amplified sample was divided into aliquots. Each aliquot was

WO 03/020981

PCT/US02/26108

mixed with a primer set and reaction mix specific for an individual target. In this example, a collection of random 9-mers (Stratagene) was used, although other collections of random 9-mers or other primer lengths should also work given that basic rules of hybridization and amplification, such as thermal stability are followed. For this application, the term "random" means that a sufficiently large collection of diverse primers is grouped, so that the entire, or at least a large fraction of, the genome is amplified during the "booster" step.

Figures 24, 25, and 26 show ethidium bromide-stained agarose gels of specific PCR amplified targets after an initial "booster" step using a collection of random amplification primers. Genomic DNA was extracted from whole blood (human) in Xtra Amp™ tubes. PCR amplifications were performed using random 9-mer primers in the PCR reaction mixture and a moderately stringent PCR program that ran for 10 cycles of the program. Following this "booster PCR", 5 µL of the PCR reaction mixture was aliquoted into individual PCR reactions ("secondary PCR reactions"). Each of these secondary PCR reactions contained a PCR primer pair as would be used in a standard PCR reaction, and each was subjected to a standard PCR cycling program. The amplified targets shown in Figures 24 are HUGALPCR 2 and GAPDH14, the amplified target shown in Figure 25 is HGH-PCR5, and the amplified target shown in Figure 26 is HDYST3.

While the above description contains many specificities, these specificities should not be construed as limitations on the scope of the invention, but rather exemplification of the preferred embodiment thereof. That is to say, the foregoing description of the invention is exemplary for purposes of illustration and explanation. Without departing from the spirit and scope of this invention, one skilled in the art can make various changes and modifications to the invention to adapt it to various usages and conditions. As such, these changes and modifications are properly, equitably, and intended to be within the full range of equivalence of the following claims. Thus, the scope of the invention should be determined by the appended claims and their legal equivalents, rather than by the examples provided herein.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

CLAIMS

We claim

1. A method for archiving nucleic acid, comprising:
 - a) contacting a sample containing said nucleic acid with a solid phase
5 matrix under conditions that allow said nucleic acid to become tightly bound to said matrix, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic, said electropositive material comprising elements selected from the group consisting of aluminum, titanium, zirconium, hafnium, scandium, yttrium, lanthanum, vanadium,
10 tantalum, chromium, molybdenum, tungsten, boron, gallium, indium, germanium, tin, and lead; and
 - b) storing said tightly bound nucleic acid on said solid phase matrix.
2. A method of amplifying one or more target nucleic acids, comprising:
 - a) contacting a sample containing said one or more target nucleic
15 acids with a solid phase matrix and a buffer that allows said one or more target nucleic acid sequences to become tightly bound to said matrix as single-stranded target nucleic acid, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic;
 - 20 b) contacting said matrix-bound target nucleic acid with a set of primer nucleic acid sequences and a buffer that allows said primer sequences to hybridize to said matrix-bound target nucleic acid; and
 - c) amplifying said one or more target nucleic acid to produce an amplified reaction mixture, wherein said target nucleic acid sequence
25 remains tightly bound to said matrix.
3. The method of claim 2, wherein said buffer in step (b) reduces binding of said primer set to said solid phase matrix
4. The method of claim 2, wherein said electropositive material comprises elements selected from the group consisting of aluminum, titanium,

WO 03/020981

PCT/US02/26108

zirconium, hafnium, scandium, yttrium, lanthanum, vanadium, tantalum, chromium, molybdenum, tungsten, boron, gallium, indium, germanium, tin, and lead.

5 5. The method of claim 4, wherein said matrix is selected from the group consisting of aluminum oxide, titanium oxide (Ti_2O_3), and modified zirconium dioxide (ZrO_2).

6. The method of claim 2, wherein said matrix is selected from the group consisting of alpha aluminum oxide, gamma aluminum oxide and an aluminum oxide thin-film of mixed composition.

10 7. The method of claim 2, wherein said matrix is Ti_2O_3 .

8. The method of claim 2, wherein said matrix is modified ZrO_2

9. The method of claim 2, wherein said buffer in step (a) is selected from the group consisting of guanidine thiocyanate-based buffers, alkaline buffers, lithium chloride, and detergent based buffers.

15 10. The method of claim 2, wherein said buffer in step (b) is a phosphate buffer.

11. The method of claim 2, wherein said target nucleic acid is selected from the group consisting of double stranded DNA, single stranded DNA, RNA, or PNA.

20 12. The method of claim 2, wherein said target nucleic acid is double stranded DNA and said buffer in step (a) allows said DNA to be bound to said matrix as single stranded DNA.

25 13. The method of claim 2, wherein said amplification methodology is selected from the group consisting of PCR, SDA, NASBA, IsoCR, CRCA, Q beta replicase, branched chain DNA, RT-PCR, and unwinding coil amplification.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

14. The method of claim 2, further comprising repeating steps (b) and (c) one or more times.
15. The method of claim 2 wherein said sample comprises two or more target nucleic acids and said two or more target nucleic acids are amplified in series.
16. The method of claim 2, wherein said target nucleic acid contains multiple target nucleic acid sequences, said method further comprising contacting said matrix-bound target nucleic acid in step (b) with multiple primer sets to pre-amplify said multiple target sequences, wherein said multiple target sequences are amplified simultaneously.
17. The method of claim 16, further comprising:
 (d) dividing said pre-amplified reaction mixture of step (c) into a plurality of aliquots; and
 (e) adding at least one of said primer sets to each of said aliquots; and
 (f) amplifying said aliquots.
18. The method of claim 2, wherein said solid phase matrix is coated on the surface of a substrate.
19. The method of claim 18, wherein said substrate is a glass or polymeric material.
20. The method of claim 18, wherein said substrate is in the shape of tubes, plates, membranes, capillaries, slides, beads, microparticles, fibers, microchannels, and microarrays.
21. A method of coating a surface of a plastic material with a solid phase matrix, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic, said method comprising:
 a) heating said solid phase matrix to a temperature in the range of 700 to 800 degrees C;
 b) cooling said plastic material to a temperature in the range of zero to

WO 03/020981

PCT/US02/26108

- 10 degrees C; and
- c) contacting said heated solid phase matrix with said cooled plastic material, whereby said solid phase matrix coats a surface of said plastic material.
- 5 22. A method of coating a surface of a plastic material with a solid phase matrix, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic, said method comprising depositing a thin film of said matrix material on a surface of said plastic material.
- 10 23. A method of coating the surface of an oxide substrate with a solid phase matrix, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic, said method comprising:
- 15 (a) combining said matrix with an acidic or a basic solution that promotes hydrolysis of said matrix;
- (b) coating the surface of said oxide substrate with said mixture from step (a); and
- (c) drying said coated surface.
- 20 24. A method of coating the surface of an oxide substrate with a solid phase matrix, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic, said method comprising:
- 25 (a) mixing said solid phase matrix with a sol comprising a metal oxide precursor selected from the group consisting of tetramethoxysilane, tetraethoxysilane, titanium ethoxide, and aluminum s-butoxide;
- (b) depositing said mixture from step (a) onto the surface of said oxide substrate;
- (d) allowing said deposited mixture to gel on the surface of said oxide substrate; and
- 30 (e) allowing said gelled mixture to dry on said surface.

WO 03/020981

PCT/US02/26108

25. A kit for nucleic acid manipulation, comprising:
- (a) a substrate having a surface coated with a solid phase matrix, wherein said matrix is a specific binding material having one or more electropositive materials rendered hydrophilic; and
- 5 (b) one or more containers comprising buffers or reagents necessary for manipulating said nucleic acid.

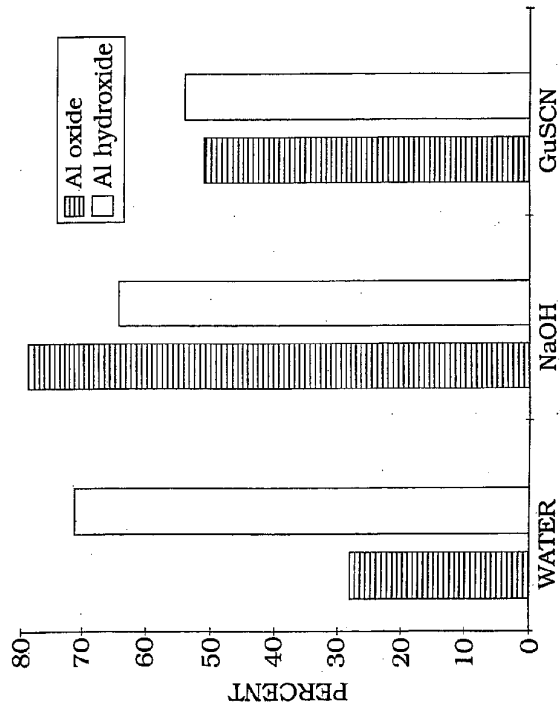


FIG. 1

WO 03/020981

2/21

PCT/US02/26108

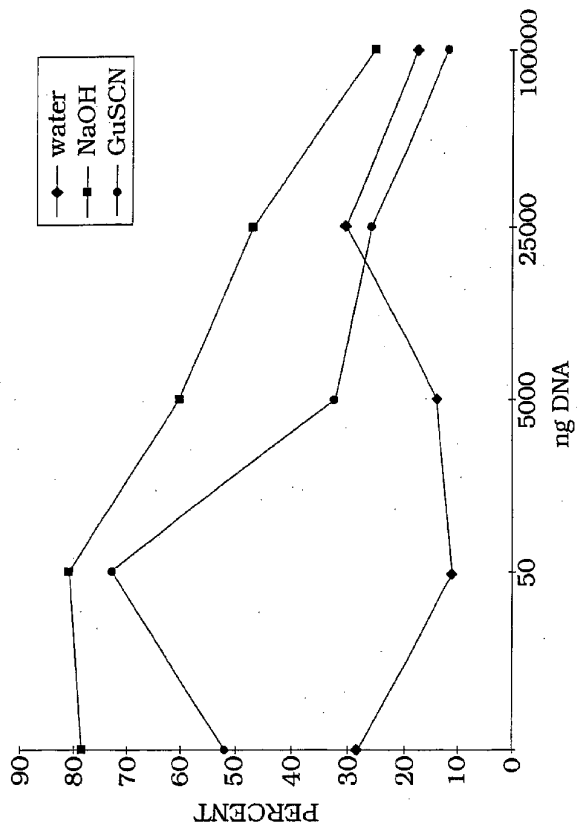


FIG. 2

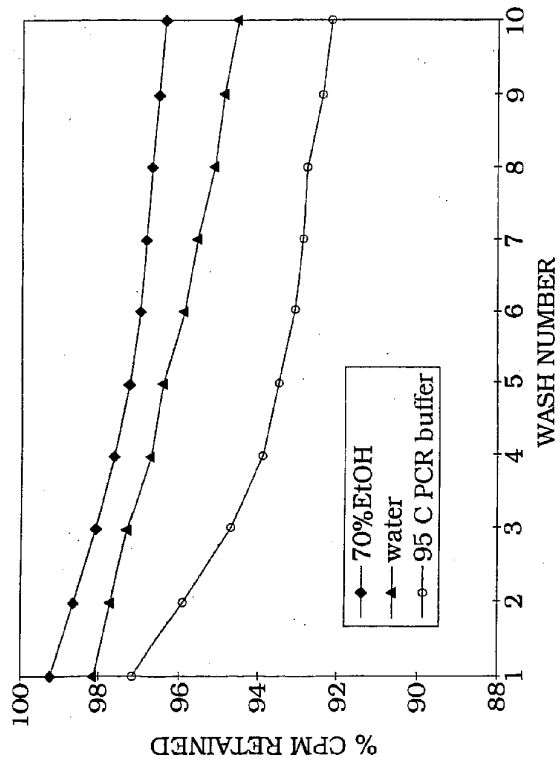


FIG. 3

WO 03/020981

4/21

PCT/US02/26108

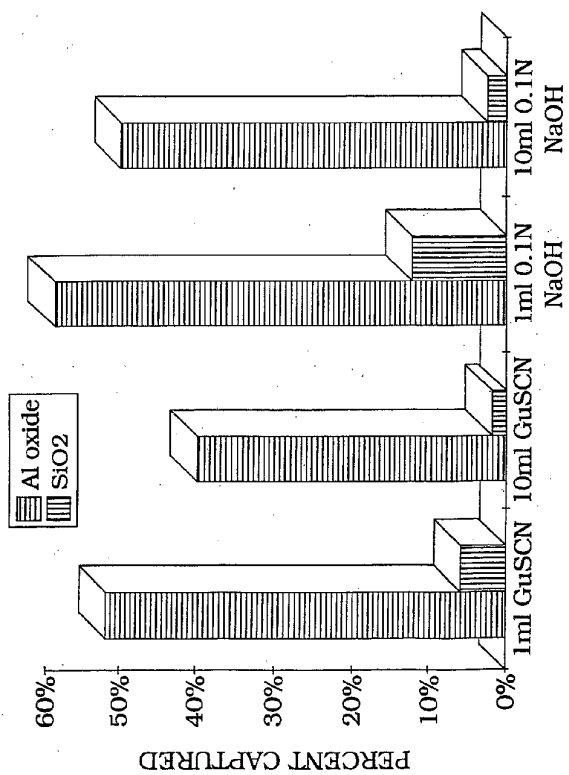
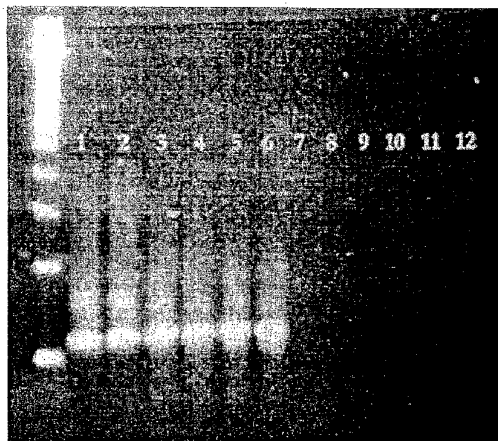
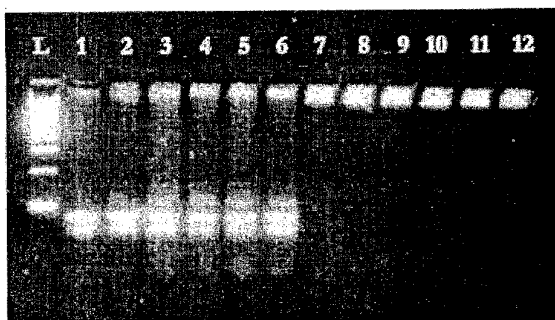


FIG. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

**FIG. 5**

Panel A

**FIG. 5**

Panel B

WO 03/020981

7/21

PCT/US02/26108

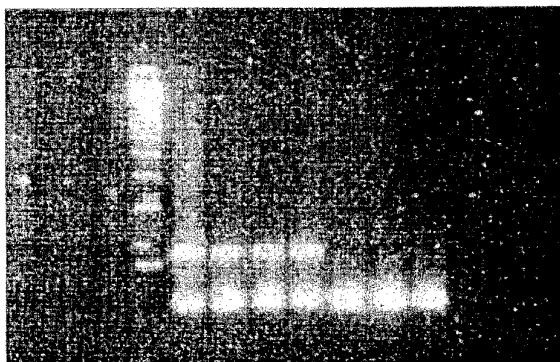


FIG. 6

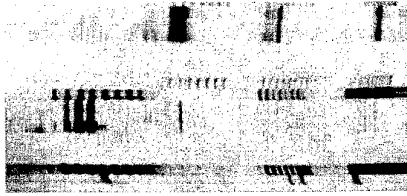
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/020981

8/21

PCT/US02/26108

FIG. 7



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/020981

9/21

PCT/US02/26108

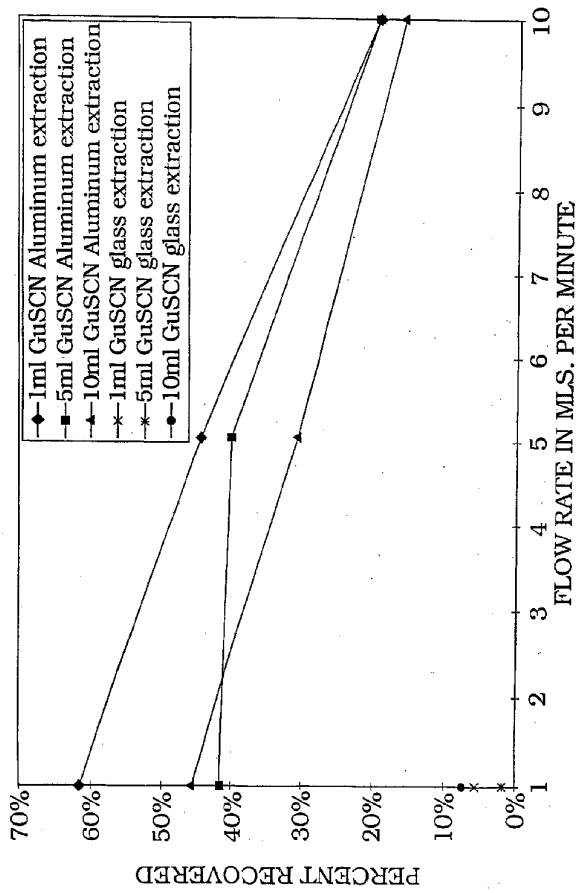


FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/020981

10/21

PCT/US02/26108



FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/020981

11/21

PCT/US02/26108

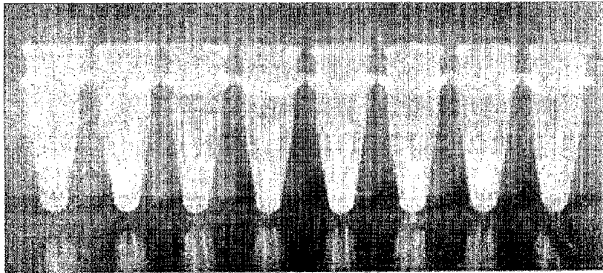


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/020981

12/21

PCT/US02/26108

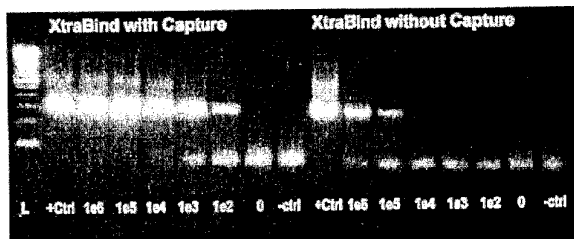
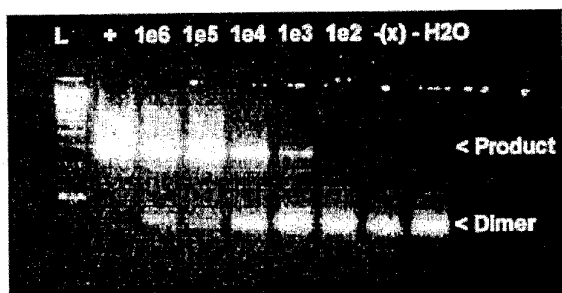


FIG. 11

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

**FIG. 12**

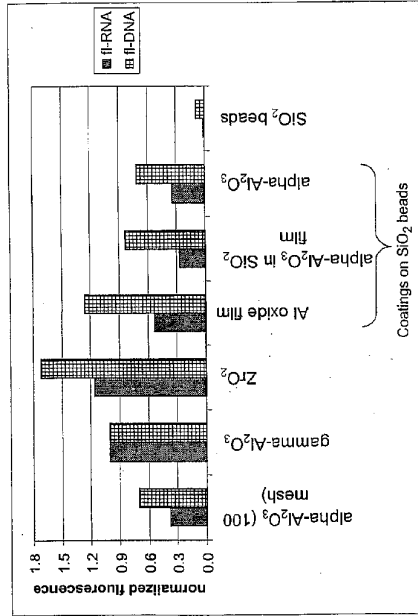


FIG. 13

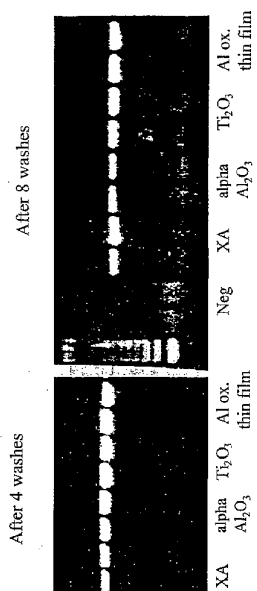


FIG. 14

WO 03/020981

16/21

PCT/US02/26108

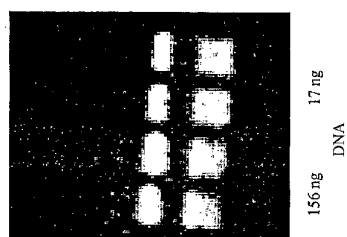


FIG. 15

WO 03/020981

17/21

PCT/US02/26108

1	XTRA AMP	1	Ti SLEBBY
2		4 2	1
3		4 3	1
4		4 4	10 ²
5		4 5	1
6		1 6	10 ¹
7		1 7	1
8		2x 10 ⁰	2x10 ⁰
9		1	1
10		10	
11		11	FILTER/Ti SLEBBY
12		4 12	10 ³
13		4 13	1
14		1 14	10 ²
15		3 15	1
16		1 16	10 ¹
17		2 17	1
18	*Note: All Signals Read	2 18	2x10 ⁰
19	at 20 minutes.	2 19	1

FIG. 16

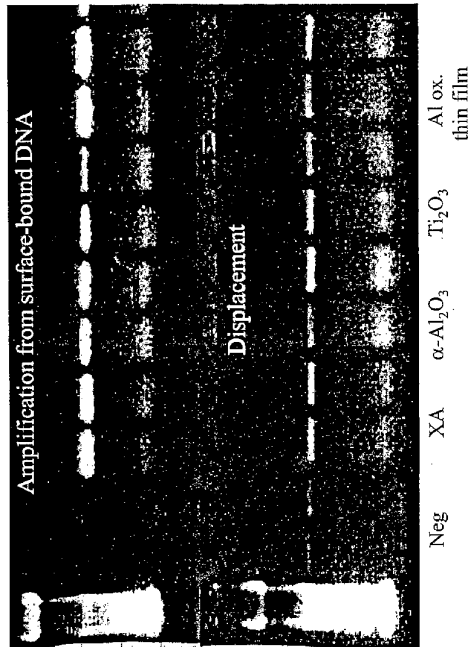


FIG. 17

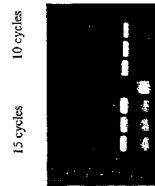


FIGURE 19

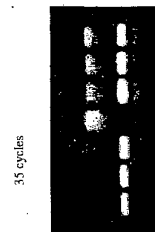


FIGURE 18

WO 03/020981

20/21

PCT/US02/26108



FIGURE 20



FIGURE 21



FIGURE 22



FIGURE 23

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/020981

21/21

PCT/US02/26108

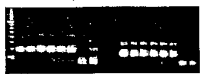


FIGURE 24



FIGURE 25



FIGURE 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/26108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/68; C07H 21/04
 US CL : 435/6, 536/23.1, 24.3

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. : 435/6, 536/23.1, 24.3

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)
 Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,939,259 A (HARVEY ET AL) 17 August 1999 (17.08.99), see entire document.	1-25
X, P	US 6,291,166 B1 (GERDES ET AL) 18 September 2001 (18.09.01), see entire document.	1-25
A	NEHLS et al. S-300 gel matrix irreversibly binds single-stranded nucleic acids. Trends in Genetics. October 1993, Vol. 9, No. 10, pages 336-337, see entire document.	1-25
A	POLSKY-CYNNIN et al. Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization. Clinical Chemistry, 1985, Vol. 31, No. 9, pages 1438-1443, see entire document.	1-25
A	HUDSON, J. The fixation and retention of viral and mammalian deoxyribonucleic acids on nitrocellulose filters. Canadian Journal of Biochemistry. 1971, Vol. 49, pages 631-636, see entire document.	1-25
A	HELMUTH, R. Nonisotopic detection of PCR products. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. 1990, pages 119-128, see entire document.	1-25

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	***	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	**X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	**Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" documents 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 oral disclosures, i.e., exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	**E"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2002 (29.10.2002)

Name and mailing address of the ISA/US

Consolidated of Patents and Trademarks
 Box PCT
 Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703)305-3230

Date of mailing of the international search report

11 DEC 2002

Authorized officer

Helena D. Roberts
 Helena D. Roberts, Ph.D.

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/26108

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

USPATFILL via EAST, EUROPATFILL via EAST, MEDLINE, and CApus

search terms: archiv\$ or stor\$ and nucleic or DNA or RNA, hydrophilic, members of the Markush group in Claim 1, amplification or PCR or SDA, or NASBA

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 15/00

A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ガーデス, ジョン, シー.

アメリカ合衆国、コロラド 80206、デンバー、スティーレ ストリート、375

(72)発明者 マルマロ, ジェフリー, エム.

アメリカ合衆国、コロラド 80014、オーローラ、イースト ウェスリー アベニュー、15154

(72)発明者 アイブス, ジェフリー, ティー.

アメリカ合衆国、コロラド 80005、アーベイダ、ウエスト 78ス プレイス、13462

(72)発明者 ロイール, クリストファー, エイ.

アメリカ合衆国、フロリダ 33647、タンパ、ヘザー サウンド ドライブ、10139

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 HA11

4B063 QA13 QQ43 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QR82 QS25 QS34

专利名称(译)	核酸档案		
公开(公告)号	JP2005505269A	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2003525681	申请日	2002-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	XTRANA		
申请(专利权)人(译)	艾克斯小城，油墨.		
[标]发明人	ガーデスジョンシー マルマロジェフリーエム アイブスジェフリーティー ロイールクリストファーエイ		
发明人	ガーデス,ジョン,シー. マルマロ,ジェフリー,エム. アイブス,ジェフリー,ティー. ロイール,クリストファー,エイ.		
IPC分类号	G01N33/53 C07H21/02 C07H21/04 C12M1/34 C12N15/00 C12N15/09 C12N15/10 C12P19/34 C12Q1/68 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6806 C07B2200/11 C12N15/1006 C12Q1/6834 C12Q1/6837 C12Q1/6848		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/543.565.W G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/HA11 4B063/QA13 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	小川真一		
优先权	09/944604 2001-08-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明要解决的问题本发明涉及将核酸紧密结合到固相的步骤和对应于其用途的步骤。 解决方案：扩散与具有足够亲水性和电活性的固相基质偶联，以紧密结合样品中的核酸。这些步骤包括从大体积和/或低浓度分析物中捕获核酸（双链或单链DNA和RNA）的现象，缓冲液的影响，洗涤和体积，与固相结合核酸可以与酶，杂交或扩增程序联系起来。可以使用紧密结合的核酸，例如，在重复分析中，以确认研究和商业应用中的结果或测试其他基因。还公开了从大体积血浆样品中提取，纯化和固相扩增病毒的方法。

ID	配列	配列番号
CPSR805F	GAGGATAGAGGCATTTGGTTG	1
CPSR948R	GTTTTGTAGGGGTCGCTCAT	2
CPSR100cap	CTATATCGTAATACGCTCTGATTACGT AGGGAGTGG TACTCCTAACAGTAGGCCTCTGATTG TCAGTCGACA TACCGCTGCGCTCAAATCCTTTTAGAA	3
B1	CGATCGAGCAAGCCA	4
B2	CGAGCCGCTCGCTGA	5
S1	ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGTAA GGCGTACTC GACC	6
S2	CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGTGT ACTGAGATCC CCT	7
SK38T	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAA	8
SK39C	TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATG	9
HIVcap	ATCCTATTTGTTCTGAAGGGTACTAG TAGTTCCTGC TATGTCACTTCCCCTTGTTCTCTCAT CTGGCCTGGT GCAATAGGCCCTGCATGCACTGGATG	10