

(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2006-517225

(P2006-517225A)

(43) 公表日 平成18年7月20日(2006.7.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7H 21/04 (2006.01)	CO7H 21/04 A	4B024
CO7H 21/02 (2006.01)	CO7H 21/02	4C057
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 541A	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2006-502991 (P2006-502991)
 (86) (22) 出願日 平成16年2月6日(2004.2.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年10月11日(2005.10.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/002010
 (87) 国際公開番号 W02004/072229
 (87) 国際公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)
 (31) 優先権主張番号 10/359,180
 (32) 優先日 平成15年2月6日(2003.2.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパ
 ニー
 BECTON, DICKINSON A
 ND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O
 7417-1880 フランクリン・レイ
 クス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRA
 NKLIN LAKES, NEW JE
 RSEY 07417-1880, UN
 ITED STATES OF AMER
 ICA
 (74) 代理人 100077481
 弁理士 谷 義一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸抽出のための生物学的試料の化学処理および該処理用のキット

(57) 【要約】

核酸の精製のための組成物および方法が開示されている。該組成物は、少なくとも1種のアリカリ剤と少なくとも1種の洗剤とを含む。また、該組成物は、好ましくは、常磁性粒子の懸濁液および酸性溶液も含む。該方法は、常磁性粒子とともに該組成物の使用を伴い、生物学的試料から核酸を抽出する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的試料から核酸を精製する方法であって：

- (a) 前記生物学的試料を、少なくとも 1 種のアルカリ剤および少なくとも 1 種の洗剤で処理する工程と；
 - (b) 少なくとも 1 種の常磁性粒子の懸濁液を提供する工程と；
 - (c) 酸性溶液を提供する工程と；
 - (d) 前記懸濁液および前記酸性溶液を、前記処理された生物学的試料と組み合わせて、前記生物学的試料中の少なくとも 1 種の核酸分子を前記少なくとも 1 種の常磁性粒子と可逆的に結合する工程と
- を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記少なくとも 1 種の常磁性粒子が鉄を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 種の常磁性粒子が鉄酸化物、鉄硫化物および鉄塩化物からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記鉄酸化物は、水酸化鉄(III)および酸化二鉄(III)-鉄(II)からなる群から選択されるを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

(e) 前記少なくとも 1 種の常磁性粒子から前記少なくとも 1 種の核酸分子を溶離する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記溶離工程が、前記可逆的に結合した核酸を、トリス、ピシン、CAPS、HEPES、水、リン酸カリウム、トリシン、および分析用緩衝液からなる群から選択される反応剤と接触させることを含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

(f) 前記少なくとも 1 種の核酸分子を検出する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

(f) 溶離後に前記少なくとも 1 種の核酸分子を増幅する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記アルカリ剤が、KOH、NaOH、NH₄OHおよびCa(OH)₂からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記洗剤がアニオン性洗剤、非イオン性洗剤および両性イオン性洗剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アニオン性洗剤がドデシル硫酸ナトリウムおよびドデシル硫酸リチウムからなる群から選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記非イオン性洗剤がポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート、ポリエチレングリコールソルビタンモノオレート、NP-40、ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテル、およびセチルトリメチルアンモニウムブロミドからなる群から選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記両性イオン性洗剤が3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナートおよび両性イオン性界面活性剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記アルカリ剤および前記洗剤を添加して、前記生物学的試料を約 7 ~ 約 12 の pH にすることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

リン酸、硝酸、塩酸、硫酸、酢酸およびクエン酸からなる群から選択される酸を用いて前記核酸を抽出する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

リン酸カリウムを用いることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記核酸が DNA および RNA からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 18】

前記生物学的試料が全血、血漿、血清、尿、精液、糞便、指爪、皮膚、痰、鼻咽頭吸引物、および頸管内、腔、眼、咽喉および口腔の綿棒採集標本を含む綿棒採集標本、毛髪、脳脊髄液、組織、細胞培養物、および細胞懸濁物からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

少なくとも 1 種のアルカリ剤と少なくとも 1 種の洗剤とを含むことを特徴とする、生物学的試料から核酸を精製するための組成物。

【請求項 20】

少なくとも 1 種の常磁性粒子の懸濁液をさらに含むことを特徴とする請求項 19 に記載の組成物。 20

【請求項 21】

酸性溶液をさらに含むことを特徴とする請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記アルカリ剤および前記洗剤は液体の溶液中にあることを特徴とする請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記アルカリ剤および前記洗剤は乾燥形態にあることを特徴とする請求項 19 に記載の組成物。 30

【請求項 24】

前記アルカリ剤が KOH であり、および前記洗剤がポリエチレングリコール tert-オクチルフェニルエーテルであることを特徴とする請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 25】

少なくとも 1 種のアルカリ剤と少なくとも 1 種の洗剤とを含むことを特徴とする、生物学的試料から核酸を精製するためのキット。

【請求項 26】

少なくとも 1 種の常磁性粒子の懸濁液をさらに含むことを特徴とする請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

酸性溶液をさらに含むことを特徴とする請求項 26 に記載のキット。 40

【請求項 28】

前記アルカリ剤が KOH であり、および前記洗剤がポリエチレングリコール tert-オクチルフェニルエーテルであることを特徴とする請求項 24 に記載のキット。

【請求項 29】

前記溶離工程は約 7 ~ 約 12 の pH において実施されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 30】

前記アルカリ剤および前記洗剤は、工程 (a) において前記生物学的試料を約 7 ~ 約 12 の pH にすることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 3 1】

前記酸性溶液は、工程(c)において前記生物学的試料/アルカリ剤/洗剤を約1~約7のpHにすることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記アルカリ剤が約10mMから約400mMまでの量で存在することを特徴とする請求項19に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記洗剤が約0.05体積%から約10.0体積%までの量で存在することを特徴とする請求項19に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記方法が単一の容器内で実施されることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記少なくとも1種の常磁性粒子の懸濁液を提供する工程は、前記単一の容器に前記生物学的試料を添加することを含むことを特徴とする請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、常磁性表面結合または他の核酸抽出方法による、血漿、全血および他の生物学的試料からの核酸(すなわちDNAまたはRNA)の抽出、単離または精製に関する。抽出された核酸は、核酸増幅および/または疾病の診断のための検出のような種々のDNA/RNA用途に用いることができる

【背景技術】

【0002】

核酸のような細胞成分へのアクセスは、核酸の配列決定、核酸ハイブリダイゼーションによる特定の核酸配列の直接的検出、および核酸配列増幅技術を含む種々の分子生物学的方法にとって不可避である。DNAまたはRNAの抽出、単離または精製は、多くの生化学的処置および診断処置における重要な工程である。たとえば、複雑な混合物(多くの場合に核酸が発見される)からの核酸の抽出および分離は、他の研究および処置(たとえばクローニング、配列決定、増幅、ハイブリダイゼーション、cDNA合成、検出など)に着手することができる前に、しばしば必要である。そのような複雑な混合物中の大量の細胞材料または他の汚染材料(たとえば、タンパク質または炭水化物)の存在は、分子生物学において用いられる反応および技術の多くを妨害する恐れがある。たとえば、血漿および全血は、核酸に基づく診断において一般的に用いられる臨床試料である。タンパク質の高い濃度およびRNAアーゼ/DNAアーゼの高い濃度は、大量のタンパク質および/またはRNAアーゼもしくはDNAアーゼを有する他の試料と同様に、そのような試料を処理するための主たる障害である。

【0003】

加えて、DNAはRNA調製を汚染する可能性があり、および逆も同様である。したがって、細胞、組織などのような複雑な混合物からの核酸の抽出、単離または精製のための方法は、調製の見地から望ましいのみならず、DNAまたはRNAの同定に依拠する今日用いられている多くの方法(たとえば臨床診断、法科学、組織および血液の型別、遺伝的変異の検出など)の一部として望ましい。

【0004】

核酸の抽出、単離または精製のために、多くの方法が知られている。一般的に、それら方法は、複雑な一連の抽出、単離または精製工程に依拠し、それら方法は実施するのに時間がかかり、かつ手間がかかる。さらに、そのような方法は、アルコールおよび他の有機溶媒、カオトロープ(chao trope)およびプロテイナーゼのような材料の使用を伴い、それらの材料は多くの酵素反応および他の下流の処理(processing)用途を阻害する傾向があるので、それら材料の使用は不都合である。

【0005】

10

20

30

40

50

複雑な出発物質（血液、血液製品、組織または他の生物学的試料のようなもの）からの核酸の抽出、単離または精製のための古典的方法は、おそらくはタンパク質分解酵素の存在下、洗剤またはカオトロープによる生物学的物質の溶解(lysis)、引き続いて有機溶剤（たとえばフェノールおよび/またはクロロホルム）を用いる数回の抽出、エタノール析出、遠心分離、および核酸の透析を行うことを伴う。DNAからのRNAの精製は、たとえば、LiClを用いる選択的析出、またはフェノール抽出およびエタノール析出と組み合わせられる酸性グアニジニウムチオシアネートを用いる選択的単離のような追加の工程（それらに限定することを意図しない）を伴う可能性がある。そのような方法は、面倒かつ実施するのに時間がかかるだけでなく、必要とされる比較的多数の工程が、分解、試料の喪失、いくつかの試料を同時に処理する場合の試料の相互汚染のリスクを増大させる。RNAの単離の場合、DNA汚染のリスクは比較的に高い。二本鎖のプラスミドDNA、一本鎖のファージDNA、染色体DNA、アガロースゲルDNAフラグメントおよびRNAの精製は、分子生物学において決定的な重要性を有する。理想的には、核酸を精製するための方法は、単純、迅速であるべきであり、かつ存在するとしても追加の試料操作をほとんど必要としないべきである。そのような方法によって得られる核酸は、直ちに、形質転換、制限分析、連結または配列決定に適用できるべきである。したがって、高純度のDNAまたはRNAを提供することができる方法は、高度に望ましい。

10

20

30

40

50

【0006】

粗アルコール析出物からのプラスミドDNAの調製のための別の精製方法は手間がかかり、最も多くの場合には、CsCl勾配、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、および反復されるアルコール析出工程を用いる。また、これらの方法は、CsClおよび他の塩、臭化エチジウムおよびアルコールを除去するために、相当の下流の試料調製を必要とする。これらの方法に関するさらなる問題点は、小さく、負に荷電した細胞成分がDNAとともに共精製される可能性があることである。したがって、DNAが望ましくないレベルの汚染を有する可能性がある。

【0007】

また、固相を用いて、核酸を精製することができる。慣用の固相抽出は、シリカ型表面を用い、該表面は（1）容易な回収を可能にするのに十分な量の核酸分子を吸着および保持することができない、あるいは（2）核酸分子に過度に付着し、それによってそれら分子の回収を妨げるかのいずれかであった。これらの問題を起こす慣用の表面は、ガラスおよびセライトのような表面を含む。この型の表面に対する核酸の適切な結合は、高濃度のカオトロープまたはアルコール類を用いることによってのみ達成することができるが、それらは一般的には毒性、焼灼性および/または高価である。たとえば、カオトロープの存在下で、DNAが破碎したガラス粉末およびガラス繊維フィルターに結合することが知られている。典型的には、カオトロピズムのイオンはアルコールで洗浄除去され、そしてDNAは低塩溶液または水で溶離される。破碎ガラス粉末の使用における深刻な欠点は、その結合容量が低いことである。加えて、ガラス粉末は、多くの場合に、一貫性のない回収、ホウ酸緩衝液との不適合性および長いDNAをニックする傾向という欠点を有する。同様に、ガラス繊維フィルターは、低いDNA結合容量を有する無孔性の表面を提供する。特許文献1～4に開示されるようなシリカゲルならびに水和およびヒドロキシル化シリカ表面のような他のシリカ型表面は、表面結合のためにカオトロピック剤を必要としない（特許文献1～4参照）。

【0008】

DNAを精製するためには多くのプロトコルが存在する。たとえば、特許文献5は、タンパク質およびDNAの溶液をヒドロキシル化された表面上を通過させ、タンパク質が結合され、DNAが溶離する、DNAを精製するための方法を開示している（特許文献5参照）。特許文献6は、アニオン交換体に対するDNAの選択的結合および引き続く溶離によるDNAの精製を開示している（特許文献6参照）。特許文献7は、水溶性ケトンを用いる析出によるDNAの単離を開示している（特許文献7参照）。カオトロープおよび透析されたDNAを用いるDNA精製手順が開示されている（特許文献8参照）

【0009】

同様に、特許文献9および10によって証明されているように、核酸の精製にケイ藻が用いられてきている（特許文献9および10参照）。特許文献9は、核酸が、グアニジニウム塩のようなカオトロピック剤の存在下でシリカ粒子の形態にある固相に結合し、それによって試料の残部から分離される方法を開示している（特許文献9参照）。

【0010】

そのような方法が核酸分離プロセスを加速するが、しかしながらアルコール、カオトロップおよび他の同様の剤に付随する不都合が存在する。カオトロップは一般に高いモル濃度において使用され、特にRNAを取り扱う際に、取り扱うのが困難である可能性がある粘稠な溶液をもたらす。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような増幅手順および他の酵素に基づく反応は、アルコールおよび他の剤の阻害または別の方法での妨害効果に対して非常に敏感である。さらに、アルコール析出に続いて必要とされる核酸ペレットの乾燥、および核酸を溶解させるのに付随する不都合もまた、PCRのような酵素に基づく手順において人工産物をもたらすことが知られている。核酸の精製のために用いられるさらなる技術は、特異的に適合させられる常磁性粒子に結合することである。そのような技術の例は特許文献11および12中に見いだされ、それら文献は、5%未満の粒径標準偏差を有する単分散の超常磁性粒子を記載している（特許文献11および12参照）。それぞれの粒子はオリゴヌクレオチドの複数の分子を運搬し、それぞれのオリゴヌクレオチドは、目的の標的核酸分子のプロブとして機能する部分を有する。

10

【0011】

特許文献13および14は、特定の分子を分離する系での使用のための磁気応答性粒子を記載している。それら粒子は、安定なシリコン被覆に取り囲まれた金属酸化物のコアを有し、該シリコン被覆に対して有機および/または生物学的分子が結合してもよい。

20

【0012】

特許文献15は、混合された細胞集団から選択される細胞集団を区分および分離する方法を記載している。該方法は、細胞集団を選択するために抗体で被覆された小さい磁性粒子を用いる。

【0013】

特許文献16は、流体試料を分析するための自動装置および方法を記載している。該装置は、そこに結合した反応剤を有する微粒子材料を利用する。該微粒子材料は磁性を有し、および該反応剤は、反応混合物中の反応に参加する物質である。

30

【0014】

特許文献17は、細胞の磁気分離のための方法を記載している。該方法は、それに対して抗体が結合するブドウ球菌タンパク質Aで被覆された磁気応答性微小球を利用する。

【0015】

特許文献18は、磁性ポリマー粒子を調製するための方法を記載している。該粒子は、鉄塩の溶液で処理される密集ポリマー粒子または多孔性ポリマー粒子である。

【0016】

特許文献19は、磁化可能な充填材のコアと、架橋した有機ポリシロキサンのシェルとを有する磁化可能な「コア-シェル型」微小球を記載している。

40

【0017】

特許文献20は、磁気応答性金属酸化物を含有するポリマーの層で均一に被覆されるポリマーのコアを有する磁気応答性蛍光性ポリマー粒子を記載している。

【0018】

特許文献21は、微粒子固体支持体およびアニオン性洗剤を用いて試料から核酸を単離するための方法を記載している。

【0019】

特許文献22は、官能基で覆われた表面を有する磁性粒子を用いるDNA精製および単離のための方法を記載している。

【0020】

50

特許文献23は、試験試料から核酸を分離するための方法を開示し、該方法は、金属酸化物支持体材料および結合性緩衝液に試料を接触させて、核酸/金属酸化物支持体材料複合体を形成する工程と、試験試料から該複合体を分離する工程と、金属酸化物支持体材料から核酸を溶離する工程とを含む。特許文献23は、緩衝液が一般的にカオトロピック剤および洗剤を含むことを開示している。

【0021】

特許文献24は、核酸分子と可逆的に結合する組成物を開示している（該文献の全開示は、参照により本明細書の一部をなすものとする）。該組成物は、酸性環境中の常磁性粒子を含む。

【0022】

核酸の酸化鉄による抽出は非特異的である。すなわち、酸化鉄は、その形態（RNAまたはDNA）あるいは配列に無関係に核酸と結合する。酸化鉄を用いる核酸の抽出は、血漿のような高タンパク質媒質において有効ではない。これは、（1）酸化鉄結合部位に関する核酸とタンパク質との間の競争、（2）高タンパク質溶液のより高い粘度に起因する減少した速度、（3）核酸上の内因性の試料ヌクレアーゼの効果、または（4）（1）～（3）の任意の組み合わせに起因する。

【0023】

核酸の抽出、単離または精製の改善された方法、特に、実施が迅速および単純であり、かつカオトロピック剤の使用およびアルコール析出を回避する方法に対する要求が存在する。また、同一の試料から両方の型の核酸の単離を可能にする方法に対する要求が存在する。

【0024】

【特許文献1】欧州特許第0512767号明細書

【特許文献2】米国特許第5,674,997号明細書

【特許文献3】米国特許第5,693,785号明細書

【特許文献4】米国特許第6,355,792号明細書

【特許文献5】米国特許第4,923,978号明細書

【特許文献6】米国特許第4,935,342号明細書

【特許文献7】米国特許第4,946,952号明細書

【特許文献8】米国特許第4,900,677号明細書

【特許文献9】米国特許第5,234,809号明細書

【特許文献10】米国特許第5,075,430号明細書

【特許文献11】欧州特許第0446260号明細書

【特許文献12】米国特許第5,512,439号明細書

【特許文献13】米国特許第4,672,040号明細書

【特許文献14】米国特許第4,695,393号明細書

【特許文献15】米国特許第3,970,518号明細書

【特許文献16】米国特許第4,141,687号明細書

【特許文献17】米国特許第4,230,685号明細書

【特許文献18】米国特許第4,774,265号明細書

【特許文献19】米国特許第5,232,782号明細書

【特許文献20】米国特許第5,395,688号明細書

【特許文献21】国際公開第96/18731号パンフレット

【特許文献22】米国特許第5,705,628号明細書

【特許文献23】国際公開第01/46404号パンフレット

【特許文献24】米国特許第5,973,138号明細書

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0025】

核酸の抽出、単離または精製のためのより効果的かつ効率的な技術を提供するために、

10

20

30

40

50

本発明は、核酸分子の抽出および可逆的結合に有用な組成物を提供する。該組成物は、少なくとも1つのアルカリ剤と少なくとも1つの洗剤とを組み合わせる。また、好ましい実施形態において、組成物は、常磁性粒子の懸濁液をも含む。より好ましい実施形態において、該組成物は、酸性溶液をさらに含む。

【0026】

また、本発明は、核酸分子に可逆的に結合する組成物を使用する方法に加えて、キットとして包装される組成物を含む。キットは、対象となる組成物の1つまたは複数の容器を有する包装単位を含む。いくつかの実施形態において、キットは、対象となる組成物とともに用いられて核酸を精製および検出する種々の反応剤の容器を含む。また、キットは1つまたは複数の以下の品目を収容してもよい：綿棒のような収集装置、生物学的試料の処理および分析のためのpH指示薬および対照標準。キットは、本発明にしたがう方法を実施するのに適当な比率で混合される反応剤の容器を含んでもよい。反応剤容器は、好ましくは、対象となる方法を実施する際に計量工程を不要にする単位容量の反応剤を収容する。

10

【0027】

本発明の方法は、生物学的試料から核酸を抽出および精製する工程を伴い、該工程は、少なくとも1つのアルカリ剤および少なくとも1つの洗剤と試料を接触させる工程と；少なくとも1つの常磁性粒子の懸濁液を提供する工程と；酸性溶液を提供する工程と；該懸濁液および該酸性溶液を処理された生物学的試料と組み合わせ、該生物学的試料中の少なくとも1つの核酸が該少なくとも1つの常磁性粒子と可逆的に結合するようにする工程とを含む。次いで、適切な緩衝液（たとえば、トリス(Tris)、ピシン(Bicine)、CAPS、HEPES、水、リン酸カリウム、トリシン(Tricine)、およびDMSOおよび/またはグリセロールを含有しても含有しなくてもよい分析用緩衝液)を用いて、所望されるDNAまたはRNAを少なくとも1つの常磁性粒子から溶離してもよい。本発明の方法は、カオトロープおよびアルコールのような焼灼剤の使用を必要としないという、従来の方法に優る利点を有する。

20

【0028】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0029】

本明細書で用いられる際に、術語「常磁性粒子」は、磁場中に配置される際に、それらに与えられる磁気モーメントを有することができる粒子を意味する。そのような磁場中にある際に、常磁性粒子は、そのような場の作用の下で移動可能である。そのような移動は、異なる態様の試料処理において、結合した核酸分子を移動させるのに有用である。したがって、常磁性粒子に結合した核酸分子を、磁力の適用により最小限の直接的接触によって、別個の反応剤および/または条件で、所望されるように処理することができる。

【0030】

本明細書で用いられる際に、術語「精製する」および「精製」は、抽出する/抽出および単離する/単離を含む。

40

【0031】

本発明者らは、常磁性粒子との組み合わせの前に、生物学的試料を少なくとも1つのアルカリ剤および少なくとも1つの洗剤によって処理することが、試料を常磁性粒子と接触させる前にタンパク質の変性が起こることを可能にすることを見いだした。

【0032】

本発明において有用な生物学的試料は、核酸を含有する任意の物質であってもよく、たとえば臨床試料、法医学(forensic)試料、および環境学的試料を含むが、それらに制限されるものではない。一般的に、試料は、原核細胞および真核細胞、ウィルス、バクテリオファージ、マイコプラズマ、プロトプラスト、およびオルガネラを含むウィルス性物質または細胞物質を含有してもよい生物学的試料である。したがって、そのような生物学的試

50

料は、哺乳類動物および非哺乳類動物の細胞、植物細胞、藍藻類を含む藻類、菌類、細菌類、原生動物の全ての種類を含んでもよい。代表的な例は、全血ならびに血漿および血清を含む血液製剤、尿、精液、糞便、指爪、皮膚、痰、鼻咽頭吸引物、および頸管内、膺、眼、咽喉および口腔の綿棒採集標本を含む綿棒採集標本、毛髪、脳脊髄液または他の体液を含み、組織、細胞培養物、細胞懸濁物を含む。

【0033】

本発明の組成物および方法は、より迅速かつより経済的な処理、および酵素的処理ではなく化学的処理の使用を含む、これまでに知られている組成物および方法を越える利点を提供する。また、本発明の組成物および方法は、より大きな試料体積の使用を可能にする。以前の方法は、酵素による消化の前に、血漿のような試料の50%程度までの希釈を必要とした。対照的に、本発明は、常磁性粒子を用いる100%血漿からの核酸の抽出を可能にする。また、本発明は、反応剤の乾燥を可能にし、該反応剤は管内で容易に保存することができる、かつ長期間にわたって安定なままであることができる。

10

【0034】

本発明の生成物は、核酸抽出中に、タンパク質を変性させ、かつウィルスおよび細菌のような感染因子を溶解させる。アルカリ剤および洗剤の組み合わせが、そうでなければ核酸の抽出を妨害するであろうRNアーゼ/DNアーゼを不活性化すると信じられる。したがって、本発明は、少なくとも1つのアルカリ剤および少なくとも1つの洗剤を含む組成物を指向する。本発明において有用である洗剤は、アニオン性洗剤、非イオン性洗剤、および両性イオン性洗剤を含む。適当なアニオン性洗剤は、ドデシル硫酸ナトリウムおよびドデシル硫酸リチウムを含むが、それらに限定されるものではない。適当な非イオン性洗剤は、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート（すなわちTween（登録商標）20）、ポリエチレングリコールソルビタンモノオレエート（すなわちTween（登録商標）80）、NP-40、ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテル（すなわち、Triton X-20およびTriton X-100のようなTriton X洗剤）、およびセチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）を含むが、それらに限定されるものではない。適当な両性イオン性洗剤は、3-[(3-コルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（CHAPS）および他の両性イオン性界面活性剤を含むが、それらに限定されるものではない。本発明に有用なアルカリ剤は、KOH、NaOH、NH₄OH、およびCa(OH)₂のような塩基およびアルカリ性緩衝液、リン酸緩衝液、食塩緩衝液（saline buffer）、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液などを含むが、それらに限定されるものではない。

20

30

【0035】

本発明にしたがう組成物は、約10mMから約400mMの量のアルカリ剤と、約0.05体積%から約10体積%の量の洗剤とを含む。好ましくは、組成物は、約100mMから約200mMのアルカリ剤と、約0.1体積%から約3.0体積%の洗剤とを含む。

【0036】

1つの実施形態によれば、組成物は、液体の溶液形態にあり、容器内に配置される。別の実施形態によれば、組成物の1つまたは複数の成分を、単独または組み合わせて、当該技術で知られている真空乾燥または凍結乾燥のような方法で乾燥してもよい。たとえば、溶液を凍結させ、そして次いで凍結後に、真空を適用しながらゆっくりと温めることにより、凍結乾燥された粉末が容器（たとえば、抽出管または血液収集管）内に残る。また、たとえばポリビニルピロリドン（PVP）またはトレハロースであるがそれらに限定されるものではない賦形剤のような添加剤を、乾燥前の溶液に対して安定化剤として添加して、得られる安定化剤を容器中で乾燥してもよい。別の態様において、組成物または組成物のサブセットを形成して液体または懸濁液とし、容器の内部の1つまたは複数の表面上に散布または吹き付けてもよい。

40

【0037】

好ましくは、組成物は常磁性粒子の懸濁液を含む。鉄粒子は、本発明における常磁性粒子として有用であり、および鉄は水酸化鉄(III)、酸化二鉄(III)-鉄(II)のような形態を有する鉄酸化物であってもよい。硫化鉄および塩化鉄のような他の鉄粒子もまた、本明

50

細書中に記載の条件を用いて核酸を結合および抽出するのに適当である可能性がある。

【0038】

常磁性粒子の形状は、本発明にとって決定的に重要ではない。常磁性粒子は、たとえば球、立方体、卵形、カプセル形状、タブレット形状、分類できない不定形などを含むがそれらに限定されるものではない種々の形状を有してもよく、および均一な形状を有しても不均一な形状を有してもよい。常磁性粒子の形状がどのようなものであると、その最も広い点における該粒子の直径は、一般的に約0.05~約20.0ミクロンの範囲内である。

【0039】

それら粒子の濃度は、生物学的試料に依存して変化する可能性がある。大抵の生物学的試料に対して、常磁性粒子の濃度は、約1mg/mL~約500mg/mLである。しかしながら、希釈された試料または濃縮された試料は、より少ないまたはより多い常磁性粒子を必要とする可能性がある。

10

【0040】

本発明の組成物は、酸および酸性緩衝溶液のような酸性溶液をさらに含んでもよい。次いで、常磁性粒子を組み合わせた酸性溶液を用いて、試料を凝固させることなしにタンパク質の試料から核酸を抽出することができる。任意の酸を使用してもよい。例示的な酸は、リン酸、硝酸、硫酸、酢酸、およびクエン酸を含むが、それらに限定されるものではない。

【0041】

常磁性粒子が有効かつ可逆的に核酸分子と結合する酸性環境は、種々の手段を用いて提供することが可能である。たとえば、酸性溶液に対して常磁性粒子を添加することができ、あるいは、粒子に対して酸性溶液を添加してもよい。あるいはまた、常磁性粒子が配置される環境を、酸性化剤の添加により酸性化することもできる。それら酸は、アルカリ剤/洗剤組成物のpHを酸性pH(すなわち約1~約7の間)にするのに十分である。

20

【0042】

前述のように、酸性環境において、陽性の常磁性粒子は陰性の核酸分子と結合する。したがって、核酸ハイブリダイゼーションおよび増幅の阻害剤のような該環境中の他の材料は、結合された核酸分子から分離される。そのような分離は、遠心分離、濾過または磁力の印加のような当業者に知られている手段によって達成することができる。

30

【0043】

次いで、ハイブリダイゼーションまたは増幅反応のようなさらなる操作のために、結合された核酸分子を適切な緩衝液中へと溶離することができる。そのような溶離は、結合された核酸を有する粒子を含有する環境を加熱すること、および/またはそのような環境のpHを上昇させることによって達成することができる。常磁性粒子からの核酸の溶離を援助するのに用いることができる剤は、水、緩衝液、KOH、NaOH、NH₄OHおよびCa(OH)₂のようなアルカリ剤、リン酸緩衝液、食塩緩衝液(saline buffers)、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液または陰性の核酸を粒子から除去するのに十分な程度まで環境のpHを上昇させる任意の化合物を含む。

【0044】

常磁性粒子上の核酸の可逆的結合および溶離は、主として、媒体のpHを変化させることによって達成され、ここで、結合および溶離手順は、アルカリ剤/洗剤の前処理に続いて実施される。核酸は、酸性pHにおいてこれら粒子の表面上に結合し、そして中性またはアルカリ性pHにおいて溶離する。しかしながら、同様に結合および溶離に影響を及ぼす他の要因が存在する。たとえば、低下した温度は、固体表面上への核酸の結合を増大させ、および上昇した温度は、溶離プロセスを向上させる。同様に、前処理に用いられる洗剤の濃度も核酸結合において役割を果たす。洗剤およびアルカリ剤処理の組み合わせは、おそらく(1)DNアーゼおよびRNアーゼのようなタンパク質を変性させ、および(2)ピリオンおよび/または細菌細胞のような細胞および/または微生物を溶解する。洗剤およびアルカリ剤の濃度は、細胞およびピリオンの壁または膜を破壊し、タンパク質材料

40

50

を変性させ、および標的とする核酸を可溶化させるのに十分に高くあるべきである。

【0045】

以下の実施例は、本発明の具体的な実施形態を例示する。当業者にとって自明であるように、種々の変更および修正が可能であり、およびそれらは本明細書に記載される発明の範囲内であると考えられる。

【実施例1】

【0046】

以下の実施例は、本発明にしたがう化学的処理の使用を例示し、および血漿からのHIVのRNAの抽出中の酵素的消化に対して前記処理を比較する。RNA抽出の効率は、HIV SDA分析を用いて評価した。

10

【0047】

(処理)

1. 50 mLチューブ中に、22 mLのヒト血漿および13.2 mLの30 mM KPO_4 (pH 7.6) を分注する。

2. 該チューブ中に、80 $\mu g / mL$ の酵母キャリアRNAを添加する。

3. ヒト血漿に、1000粒子/mLの濃度でHIV粒子を加える。

4. よく混合し、16 mLの血漿混合物を2つのチューブ(チューブAおよびチューブB)に分注する。

5a. チューブA中に1.1 mLのプロテイナーゼK(600単位/mL)を添加し、6回にわたってチューブを逆さにすることによって、よく混合する。

20

5b. チューブAを70 °Cの水浴中で30分間にわたってインキュベートする。

5c. 850 μL の血漿混合物を、40 mgの鉄酸化物を収容している2 mLの抽出チューブ中に移動する。

5d. 5分間の期間中、チューブを逆さにすることによって混合する。

6a. チューブBから800 μL の血漿混合物を16本の抽出チューブ(40 mgの鉄酸化物、100 μ モルのKOHおよび10 μL のトリトン(Triton)(これらの化学物質はチューブ中で乾燥されていた)を収容している)に分注する。

6b. 6回にわたってチューブを逆さにすることによって、よく混合する。

6c. 8本のチューブを70 °Cの水浴中で30分間にわたってインキュベートする。

6d. 他の8本のチューブを室温で30分間にわたってインキュベートする。

30

6e. 5分間の期間中、チューブを逆さにすることによって混合する。

7. 抽出の前に全てのチューブを、さらなる30分間にわたり室温にて冷却する。

【0048】

(結合および溶離)

1. チューブ中に270 μL の結合用酸(6 MのグリシンHClまたは6 Mの H_3PO_4 のいずれか)を分注し、25回混合する。

2. 鉄酸化物粒子をチューブ側面に磁氣的に固定する。

3. 結合していない試料を吸引する。

4. 1020 μL の1 mMのグリシン-HClまたは1 mMの H_3PO_4 で、鉄酸化物粒子を洗浄する。

40

5. 鉄酸化物粒子をチューブ側面に磁氣的に固定し、結合していない溶液を吸引する。

6. 1020 μL の1 mMのグリシン-HClまたは1 mMの H_3PO_4 で、鉄酸化物粒子を洗浄する。

7. 鉄酸化物粒子をチューブ側面に磁氣的に固定し、結合していない溶液を吸引する。

8. チューブ中に120 μL の溶離緩衝液(85 mM KOH / 75 mMピシン)を分注し、15回混合する。

9. 鉄酸化物粒子をチューブ側面に磁氣的に固定し、結合していない溶液を吸引する。

50

10. チューブ中に60 μ Lの中和緩衝液(460mMピシン)を分注し、試料を15回混合する。

11. 鉄酸化物粒子をチューブ側面に磁氣的に固定し、結合していない溶液を吸引する。

12. 溶離された試料は、SDA分析の準備ができています(分析あたり50 μ Lの試料)。

【0049】

【表1】

第1表

試料	血漿	血漿	血漿	血漿	分析緩衝液	分析緩衝液
標的	HIV粒子	HIV粒子	HIV粒子	HIV粒子	RNA転写物	RNA転写物
(コピー /反応)	200	200	200	200	50	0
処理	ProK	ProK	KOH/Triton	KOH/Triton	NA	NA
温度	70 $^{\circ}$ C	70 $^{\circ}$ C	70 $^{\circ}$ C	室温	NA	NA
結合剤	グリシン -HC1	H ₃ PO ₄	H ₃ PO ₄	H ₃ PO ₄	陽性の対照 標準	陰性の対照 標準
	16288	15082	21231	25877	54900	31
	15172	36351	22749	33803	34578	29
	14140	31430	21044	33007	47591	0
	18146	35206	24992	33360	60299	10
	18466	38333	37972	32719	62607	27
	7656	38215	35586	37108	61437	26
	19799	34641	33518	31997	49383	30
	8220	33189	27612	36132	60305	29
平均	14736	32806	28088	33000	53888	23
標準偏差	4282	7051	6308	3148	9008	11
CV%	29	21	22	10	17	47

10

20

30

【0050】

結果は、本発明にしたがってアルカリ剤および洗剤を用いて処理して血漿中のHIV粒子からRNAを抽出できることを示す。抽出されたRNAを、SDAのような核酸増幅分析に用いることができる。結晶の化学的処理および結合剤としてのリン酸の使用の組み合わせは、酵素消化法と同等以上の結果を示した。

40

【0051】

本発明の方法は、酵素の使用に依存しないという点において有利である。したがって、それほど高価ではなく、かつ一般的により頑強なプロセスであると期待される。また、室温において有用であることおよびインキュベーションのために長い時間を必要としないことの利点も有する。該プロセスは、多数の生物学的試料からのDNAおよびRNAの抽出に適用可能であると期待される。

【0052】

50

この実験が希釈された血漿（62.5%）を使用したことに注意されたい。プロテアーゼ法を用いて処理される100%血漿を使用する試みは、酵素処理中に試料の凝固を起こし、それによって核酸抽出を極度に困難かつ非効率にした。しかしながら、本発明の化学的「無プロテアーゼ」法の使用は、核酸抽出プロセス全体にわたる試料の可溶性を改善し、それによって試料のより大きなパーセンテージからの抽出を可能にし、それゆえにより高い検出感度を可能にする。

【0053】

本明細書にて議論されているように、試料の体積を変化させることが可能である。たとえば、処理の前または後で30mMのリン酸カリウムのような緩衝液で試料を希釈することができる。同様にインキュベーション時間および温度も変化させることができる。アルカリ剤および洗剤の濃度および種類を変化させることができる。そのプロトコルを手動式または自動化された核酸抽出方法とともに用いることができる。酸の種類および濃度を変化させることができる。抽出された核酸は、種々の下流の用途のために用いることができる。

10

【実施例2】

【0054】

以下の実施例は、本発明にしたがう化学的処理、具体的にはKOHおよびSDSによるクラミジアLGVの溶解の使用を例示する。

【0055】

チューブ中の尿試料に対して、洗剤（1%SDS）および塩基（100mMのKOH - 尿中の最終濃度）を添加した。該試料中にクラミジアを2667EB/mlで加え、以下の第2表に示す温度および時間において水浴または熱ブロック（114℃）中でインキュベートした。40mgの鉄酸化物を収容している抽出チューブに対して、950μlの尿を移した。次いで、そのチューブをBD VIPER（商標）自動試料処理装置（本願特許出願人から入手可能である）で処理し、そして、478EB/反応の送出量を用いてProbe Tec（商標）フォーマットで増幅した。

20

【0056】

【表 2】

第 2 表

時間／温度 (分／℃)	5/25	5/75	30/25	30/75	17.5/50	30/114
MOTA	3480	12	37480	17901	13252	7848
	18767	6	25995	24650	10988	18131
	17909	41	21610	25688	14511	6810
	19770	11	22803	21609	5300	982
	7676	0	38016	10757	6181	16296
	0	0	21910	16427	31885	15319
	16875	0	10218	5437	7767	68
	2177	0	27379	23783	21101	1682
	15004	7	26019	20626	29825	5857
	828	13	11878	32624	5668	6807
	24820	0	14689	11089	29688	11111
	35784	25	16772	5968	34347	11561
平均MOTA	13591	10	23064	18047	17540	8540

10

20

【0057】

結果は、本発明にしたがうアルカリ剤および洗剤を用いて処理された尿からクラミジアを抽出できることを例示する。本発明にしたがう条件で処理された試料は、CT溶解のための現行の時間および温度である、30分間にわたって114で溶解された試料に比べて、同等またはより良好なMOTA値を示す。

30

【実施例3】

【0058】

以下の実施例は、本発明にしたがう化学的処理、具体的にはKOHおよびSDSによるクラミジアLGVの溶解の使用を例示する。

【0059】

チューブ中の尿試料に対して、洗剤(1%SDS)および塩基(100mMのKOH-尿中の最終濃度)を添加した。該試料中にクラミジアを2000EB/mlで加え、以下の第3表に示す温度および時間において水浴または熱ブロック(114)中でインキュベートした。40mgの鉄酸化物を収容している抽出チューブに対して、950μlの尿を移した。次いで、そのチューブをBDVIPER(商標)自動試料処理装置(本願特許出願人から入手可能である)で処理し、そして、358EB/反応の送出量を用いてProbe Tec(商標)フォーマットで増幅した。

40

【0060】

【表 3】

第 3 表

時間／温度 (分／℃)	5/30	10/30	15/30	5/50	10/50	15/50	5/70	10/70	15/70
MOTA	3682	14357	14883	12443	30747	0	8342	27473	7839
	9851	4660	18550	15710	22666	29609	9582	30737	7188
	26898	18324	18094	24074	12651	25037	14456	22975	95
	22587	22438	29539	30759	24976	21083	30685	27304	21047
	15848	336	10989	27564	34503	15340	14101	28584	24125
	36182	26254	29370	17482	17657	5579	39100	34671	32621
	15342	19128	28862	27667	21017	21661	39507	19133	36856
	2898	13793	19665	22734	33163	13833	34642	2391	7383
平均MOTA	16661	14912	21244	22304	24673	16518	23802	24159	17144

10

【 0 0 6 1 】

結果は、本発明にしたがうアルカリ剤および洗剤を用いて処理された尿からクラミジアを抽出できることを例示する。

20

【 実施例 4 】

【 0 0 6 2 】

以下の実施例は、本発明にしたがう化学的処理、具体的には洗剤および酸もしくは塩基によるクラミジア L G V の溶解の使用を例示する。

【 0 0 6 3 】

以下の第 4 表に示される濃度の 40 本のチューブ中の尿試料に対して、洗剤と、酸もしくは塩基のいずれかとを添加した。該試料中にクラミジアを 2000 EB/ml で加え、以下の第 4 表に示す温度および時間においてインキュベートした。8 本のチューブ中の対照標準の尿試料には、クラミジアを 2000 EB/ml で加え、以下の第 4 表に示す温度および時間においてインキュベートした。次いで、化学的に溶解した試料および対照標準試料を、BD VIPER (商標) 自動試料処理装置 (本願特許出願人から入手可能である) で処理し、そして Probe Tec (商標) CT 系中で増幅した。

30

【 0 0 6 4 】

【表 4】

第 4 表

溶解条件	時間/温度 (分/°C)	MOTA	平均MOTA
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	11687	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	27231	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	679	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	55	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	4714	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	857	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	22019	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/30	3025	8060
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	858	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	19149	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	10784	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	14212	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	13844	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	14825	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	180	
135mM HCL /1.0% Tween (登録商標) 20	15/50	2981	9574
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	32190	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	21902	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	34822	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	14714	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	15380	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	26609	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	34832	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/50	17387	24738

10

20

30

40

【 0 0 6 5 】

【表 5】

第4表 (続き)

溶解条件	時間/温度 (分/°C)	MOTA	平均MOTA
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	34185	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	8272	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	27580	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	16139	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	15208	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	10894	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	7056	
100mM HCL /0.1% Triton (商標) X-100	15/70	31610	18843
0	30/114	1583	
0	30/114	20908	
0	30/114	37995	
0	30/114	19859	
0	30/114	20579	
0	30/114	20541	
0	30/114	6519	
0	30/114	28365	19541

10

20

【0066】

結果は、本発明にしたがって処理された尿からのクラミジアの抽出が、クラミジアを溶解するための対照として有効であることを例示する。

30

【0067】

本発明をいくつかの特定例に関して記載したが、本発明の範囲を逸脱することなしに、当業者にとって明白な修正を行うことができる。本発明の種々の特徴を添付の特許請求の範囲に記載する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/02010
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C07G 17/00; C12N 1/08 US CL : 435/6, 267, 270 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, 267, 270 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 document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,523,231 A (REEVE) 4 June 1996 (04.06.1996), column 2, lines 12-35, lines 58-60; column 2, line 24; column 2, lines 19-20; column 2, lines 20-21; column 10, lines 45-51; column 8, line 52; column 10, lines 63-65.	1-6, 9-12, 14, 15, 17-23, 25-27, and 29-35 ----- 7, 8, 13, 16, 24, and 28
X --- Y	US 5,625,053 A (KRESHECK et al.) 29 April 1997 (29.04.1997), column 2, lines 20-21; column 2, lines 62-67; column 3, lines 14-15 and 60; column 4, lines 14-15; column 4, line 32.	19, 21-23, 25, 27, and 32 ----- 13, 24, and 28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 "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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 September 2004 (07.09.2004)		Date of mailing of the international search report 05 NOV 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Young J. Kim <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/02010

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Patent Databases (USPT, USPGP, EPO, JPO, DERWENT, IBM-TDB)

NPL

search terms: nucleic acid/DNA purification/isolation, detergent, alkaline, iron oxide, ferric oxide, ferrosferric oxide, potassium phosphate, KOH, paramagnetic bead, tween, tritonX-100, zwitterionic detergent, sodium dodecyl sulfate, SDS, lithium dodecyl sulfate, polyethylene glycol tert-octylphenyl.

フロントページの続き

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

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(72)発明者 チアンロン ロウ

アメリカ合衆国 2 1 7 7 2 メリーランド州 マウント エアリー プロムナード レーン 9
0 4

(72)発明者 マシュー コリス

アメリカ合衆国 1 7 3 6 0 ペンシルベニア州 セブン パレーズ サウス ストリート 1 1
4 アールアール1 ボックス 9 - 3 8

(72)発明者 トーマス フォート

アメリカ合衆国 2 1 0 4 8 メリーランド州 フィンクスバーグ リッジロード 9 8 7

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 CA11 HA20

4C057 AA05 MM02 MM04 MM09

专利名称(译)	用于核酸提取的生物样品的化学处理和用于这种处理的试剂盒		
公开(公告)号	JP2006517225A	公开(公告)日	2006-07-20
申请号	JP2006502991	申请日	2004-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
[标]发明人	チアンロンロウ マシューコリス トーマスフォート		
发明人	チアンロン ロウ マシュー コリス トーマス フォート		
IPC分类号	C07H21/04 C07H21/02 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09 C07G99/00 C12N C12N1/08 C12N15/10 C12Q C12Q1/68		
CPC分类号	C12N15/1013 C07H21/04		
FI分类号	C07H21/04.A C07H21/02 G01N33/53.M G01N33/543.541.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA20 4C057/AA05 4C057/MM02 4C057/MM04 4C057/MM09		
代理人(译)	谷义 安倍晋三和夫		
优先权	10/359180 2003-02-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于纯化核酸的组合物和方法。该组合物包含至少一种碱性试剂和至少一种洗涤剂。该组合物还优选包含顺磁颗粒和酸性溶液的悬浮液。该方法涉及使用具有顺磁颗粒的组合物并从生物样品中提取核酸。

第1表

試料	血漿	血漿	血漿	血漿	分析緩衝液	分析緩衝液
標的 (コピー /反応)	HIV粒子 200	HIV粒子 200	HIV粒子 200	HIV粒子 200	RNA転写物 50	RNA転写物 0
処理	ProK	ProK	KOH/Triton	KOH/Triton	NA	NA
温度	70℃	70℃	70℃	室温	NA	NA
結合剤	グリシン -HC1	H ₂ PO ₄	H ₂ PO ₄	H ₂ PO ₄	陽性の対照 標準	陰性の対照 標準
	16288	15082	21231	25877	54900	31
	15172	36351	22749	33803	34578	29
	14140	31430	21044	33007	47591	0
	18146	35206	24992	33360	60299	10
	18466	38333	37972	32719	62607	27
	7656	38215	35586	37108	61437	26
	19799	34641	33518	31997	49383	30
	8220	33189	27612	36132	60305	29
平均	14736	32806	28088	33000	53888	23
標準偏差	4282	7051	6308	3148	9008	11
CV%	29	21	22	10	17	47