



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107406847 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201680015280.0

(22)申请日 2016.03.18

(30)优先权数据

2015-057760 2015.03.20 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/058658 2016.03.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/152763 JA 2016.09.29

(71)申请人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 关口翔太 泽田慎二郎

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄媛 段承恩

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

(54)发明名称

核酸的回收方法

(57)摘要

本发明提供使用了表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体的核酸的回收方法、该方法所使用的水溶性的中性聚合物吸附于表面的氧化铝的核酸回收用载体以及核酸回收用试剂盒。

1. 一种核酸的回收方法,其特征在于,是从生物学试样回收核酸的方法,包括以下工序:

工序a) 将表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体与包含核酸的溶液进行混合,使核酸吸附于载体的工序,

工序b) 从工序a) 中混合后的溶液,分离出吸附有所述核酸的载体的工序,

工序c) 向工序b) 中分离出的吸附有所述核酸的载体添加溶出液来回收核酸的工序。

2. 根据权利要求1所述的核酸的回收方法,其特征在于,所述水溶性的中性聚合物是在pH7的溶液中具有-10mV以上且+10mV以下的 ζ 电位的聚合物。

3. 根据权利要求1或2所述的核酸的回收方法,其特征在于,所述聚合物为聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚(2-乙基-2-噁唑啉)或羟基丙基甲基纤维素。

4. 根据权利要求1~3中的任一项所述的核酸的回收方法,其特征在于,所述溶出液为缓冲液。

5. 根据权利要求1~4中的任一项所述的核酸的回收方法,其特征在于,所述生物学试样为血液、尿、唾液、粘膜、汗、培养细胞、培养细胞的培养液、组织试样或标本。

6. 一种核酸回收用的载体,其在氧化铝的表面吸附有水溶性的中性聚合物。

7. 根据权利要求6所述的载体,其特征在于,所述水溶性的中性聚合物是在pH7的溶液中具有-10mV以上且+10mV以下的 ζ 电位的聚合物。

8. 根据权利要求6或7所述的载体,其特征在于,所述水溶性的中性聚合物为聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚(2-乙基-2-噁唑啉)或羟基丙基甲基纤维素。

9. 根据权利要求6~8中的任一项所述的载体,其特征在于,所述水溶性的中性聚合物以被覆氧化铝的载体的表面中的7%以上的方式吸附着。

10. 一种核酸回收用的试剂盒,其特征在于,具备权利要求6~9中的任一项所述的载体和缓冲液。

核酸的回收方法

技术领域

[0001] 本发明涉及回收核酸的方法、表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体以及核酸回收用的试剂盒。

背景技术

[0002] 随着使用了核酸的实验技术的发展,新基因探索、其解析成为可能。为了特定癌症等疾病而解析人的基因组,为了特定病原体的感染而解析它们的基因组等,即使在医疗现场也进行着利用了基因解析的筛选检查、临床检查等。

[0003] 此外,作为基因解析的目标,不仅是基因组那样的长链核酸,而且短链核酸也备受关注。近年来发现的miRNA是18个碱基以上且25个碱基以下的单链RNA,由60个碱基以上且90个碱基以下的pre-miRNA来生物合成。它们具有调节蛋白质的合成、基因的表达的功能,因此认为与疾病有关系,作为基因解析的目标而备受关注。此外,还有如宏基因组(metagenomic)诊断法那样将临床检体中的病原体来源的数百碱基对的核酸片段用新一代测序仪包罗地解析的方法,作为新的基因解析法而备受关注。可以说现在的基因解析的目标随着基因探索的发展而多样化了。因此,伴随着基因解析的目标的多样化,核酸的回收方法也需要可以回收从miRNA那样的数十碱基的核酸直至基因组那样的长链的核酸的方法。

[0004] 在进行基因解析方面,首先需要的是从生物学试样回收核酸的工序。如果能够高纯度、高收率地回收核酸,则在之后的检测反应中进行高灵敏度的基因检测成为可能。作为核酸的回收方法,可举出苯酚/氯仿提取、乙醇沉淀和核酸向二氧化硅的吸附等作为代表性的方法。

[0005] 其中最通用的方法是记载于专利文献1的、使核酸吸附于包含二氧化硅的金属氧化物,使其溶出并回收的Boom法。该方法具有下述特征:可以通过离心操作从吸附了核酸的二氧化硅回收核酸,同时进行核酸的浓缩。然而,Boom法中在核酸的吸附过程中醇等有机溶剂的使用是不可或缺的,具有回收操作的复杂化、溶剂废弃等问题。此外,还具有在离析了的核酸中混入这些有机溶剂,对之后的检测反应带来影响的问题。

[0006] 此外,专利文献2中记载了具有300碱基对以上且1000碱基对以下的长度的核酸对二氧化硅的吸附性不及具有更长长度的核酸,进而预想回收短的pre-miRNA、miRNA是困难的。由于基因解析在医疗现场也可利用,因此优选为不使用复杂的操作、有机溶剂,就可以回收核酸的方法。

[0007] 作为Boom法以外的核酸的回收方法,专利文献3和4中记载了不利用有机溶剂的核酸的回收方法。专利文献3中记载了使核酸吸附于 α 氧化铝粒子、氧化锆粒子、二氧化钛粒子等,进行有效率地回收的方法。此外,专利文献4中记载了使用离子交换色谱的原理,使核酸吸附,进行回收的方法,示出可以利用氧化铝作为阴离子交换材料。

[0008] 另一方面,专利文献5中记载了依赖于使核酸溶解的溶液,可以使核酸牢固地结合于 α 氧化铝和 γ 氧化铝,或者相反地阻止结合。此外记载了结合的核酸即使反复洗涤也几乎不溶出。

- [0009] 现有技术文献
[0010] 专利文献
[0011] 专利文献1:美国专利第5234809号说明书
[0012] 专利文献2:日本特表2011-522529号公报
[0013] 专利文献3:国际公开第92/18514号
[0014] 专利文献4:日本特表2013-505719号公报
[0015] 专利文献5:日本特表2005-505269号公报

发明内容

[0016] 发明所要解决的课题

[0017] 如上述那样,专利文献3或4中示出了可以使用氧化铝来有效率地回收核酸,但专利文献5中记载了结合的核酸未溶出。因此,发明人等研究了使用专利文献3所记载的氧化铝的核酸的回收方法。

[0018] 在后述的比较例1中,研究了能否准备与专利文献3的实施例4的组成尽量接近的氧化铝,参考专利文献3的条件来使核酸吸附,然后,使吸附的核酸溶出来进行回收。然而,虽然核酸吸附于氧化铝,但核酸的溶出率低,不能高收率地回收核酸。

[0019] 本发明人等基于这些结果,认为如果能够提高结合于氧化铝的核酸的溶出率,则可以利用不使用有机溶剂的简便的方法来有效率地回收核酸。

[0020] 用于解决课题的方法

[0021] 本发明人等发现通过使水溶性的中性聚合物吸附于氧化铝的表面,从而可以降低核酸的吸附率,而改善核酸的溶出率。

[0022] 进一步,发现通过使用本发明,从而miRNA那样的非常短的核酸也可以效率良好地回收,从而完成本发明。

[0023] 本发明如下。

[0024] (1) 一种核酸的回收方法,其特征在于,是从生物学试样回收核酸的方法,包括以下工序:

[0025] 工序a) 将表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体与包含核酸的溶液进行混合,使核酸吸附于载体的工序,

[0026] 工序b) 从工序a) 中混合后的溶液,分离出吸附有上述核酸的载体的工序,

[0027] 工序c) 向工序b) 中分离出的吸附有上述核酸的载体添加溶出液来回收核酸的工序。

[0028] (2) 根据(1)所述的核酸的回收方法,其特征在于,上述水溶性的中性聚合物是在pH7的溶液中具有-10mV以上且+10mV以下的 ζ 电位的聚合物。

[0029] (3) 根据(1)或(2)所述的核酸的回收方法,其特征在于,上述聚合物为聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚(2-乙基-2-噁唑啉)或羟基丙基甲基纤维素。

[0030] (4) 根据(1)~(3)中的任一项所述的核酸的回收方法,其特征在于,上述溶出液为缓冲液。

[0031] (5) 根据(1)~(4)中的任一项所述的核酸的回收方法,其特征在于,上述生物学试样为血液、尿、唾液、粘膜、汗、培养细胞、培养细胞的培养液、组织试样或标本。

[0032] (6) 一种核酸回收用的载体,其在氧化铝的载体的表面吸附有水溶性的中性聚合物。

[0033] (7) 根据(6)所述的载体,其特征在于,上述水溶性的中性聚合物是在pH7的溶液中具有-10mV以上且+10mV以下的 ζ 电位的聚合物。

[0034] (8) 根据(6)或(7)所述的载体,其特征在于,上述水溶性的中性聚合物为聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚(2-乙基-2-噁唑啉)或羟基丙基甲基纤维素。

[0035] (9) 根据(6)~(8)中的任一项所述的载体,其特征在于,上述水溶性的中性聚合物以被覆氧化铝的载体的表面中的7%以上的方式吸附着。

[0036] (10) 一种核酸回收用的试剂盒,其特征在于,具备(6)~(9)中的任一项所述的载体和缓冲液。

[0037] 发明的效果

[0038] 通过本发明,即使使用氧化铝作为载体,也能够不使用有机溶剂,而以简便的方法高收率地回收核酸;进一步也能够以高收率回收迄今为止难以有效率地回收的pre-miRNA、miRNA等非常短的核酸。

具体实施方式

[0039] 本发明所使用的生物学试样可以使用包含核酸的任意的试样。核酸中,可举出例如,RNA、DNA、RNA/DNA(嵌合体)和人工核酸等。DNA中,可举出cDNA、基因组DNA和合成DNA等。此外,RNA中,可举出总RNA、mRNA、rRNA、miRNA、siRNA、snoRNA、snRNA或非编码RNA、它们的前体或合成RNA等。合成DNA和合成RNA可以基于规定的碱基序列(天然型序列或非天然型序列的任一种都可以),使用例如自动核酸合成机,人工地制作。

[0040] 作为生物学试样,可以利用例如,培养细胞、培养细胞的培养液、组织试样、标本等细胞来源试样,细菌、病毒等微生物来源试样,体液、大小便等包含人的动物来源试样,除了核酸以外还包含蛋白质、糖、脂质等具有生物学功能的化合物的溶液等,不限于于此。上述生物学试样优选为培养细胞、体液,进一步优选为血液。血液包括全血、血浆、血清、血细胞等。

[0041] 在这些生物学试样为体液等液体试样的情况下,可以在采集后直接适用本发明,也可以在采集后添加溶液进行稀释。在生物学试样为细胞团块、组织切片等固体试样的情况下,可以在采集后用水、缓冲液进行稀释后用于本发明。

[0042] 生物学试样可以根据需要进行以下那样的处理。这是因为通常核酸在生物学试样中内包于细胞膜、细胞壁、小泡、脂质体、微团(micelle)、核糖体、组蛋白、核膜、线粒体、病毒的壳体、包膜(envelope)、核内体或外来体那样的化合物,或它们之间发生相互作用。为了更高收率地回收核酸,可以进行以使核酸从它们之中游离出来为目的的处理。

[0043] 具体而言,为了提高核酸从包含大肠杆菌的生物学试样的回收效率,可以进行以下那样的处理。例如,可以对包含大肠杆菌的生物学试样添加0.2M的氢氧化钠和1%的SDS的混合液(碱变性法),此外,还可以添加10%的十二烷基肌氨酸钠溶液(利用十二烷基肌氨酸钠进行的非变性法)。此外,可以向这些溶液中添加溶菌酶。此外,还可以利用蛋白酶K在37℃进行1小时处理。作为其它方法,还可以进行超声波处理。

[0044] 对于生物学试样,为了提高核酸从包含酵母的生物学试样的回收效率,可以进行

以下那样的处理。例如,还可以用由生化学工业株式会社市售的酵母裂解酶(Zymolyase)进行了处理之后添加10%的SDS。

[0045] 对于生物学试样,为了提高核酸从包含细胞的生物学试样的回收效率,可以进行以下那样的处理。例如,可以添加1%的SDS。作为其它方法,可以添加4M以上的盐酸胍、硫氰酸胍和尿素等。也可以对该溶液,添加十二烷基肌氨酸钠使其为0.5%以上。此外,也可以添加巯基乙醇使其为50mM以上的浓度。

[0046] 在上述操作中,为了抑制生物学试样所包含的核酸的分解,可以添加核酸的分解酶的抑制剂。作为DNA分解酶的抑制剂,可以以1mM以下的浓度添加EDTA。此外,可以使用作为RNA分解酶的抑制剂被市售的RNasin Plus Ribonuclease Inhibitor(プロメガ株式会社)、Ribonuclease Inhibitor(タカラバイオ株式会社)、RNase inhibitor(东洋纺株式会社)等。

[0047] 在生物学试样中混合存在有DNA和RNA的情况下,也可以通过苯酚/氯仿提取进行分离。例如,如果在酸性条件下进行苯酚/氯仿提取,则RNA分离至水层,DNA分离至氯仿层,如果在中性条件下进行苯酚/氯仿提取,则RNA和DNA分配于水相。可以利用该性质,根据要取得的核酸的种类来选择条件。上述氯仿还可以置换成对溴茴香醚。

[0048] 苯酚/氯仿提取还可以利用作为市售试剂的ISOGEN(注册商标:株式会社ニッポンジーン)、TRIzol(注册商标:ライフテクノロジーズジャパン株式会社)、RNAiso(タカラバイオ株式会社)、3D-Gene(注册商标)RNA extraction reagent from liquid sample kit(东レ株式会社)。以上的处理可以仅进行其一个工序,还可以与其它操作中的工序进行组合。此外,它们所使用的溶液的浓度还可以根据需要进行改变。

[0049] 在本发明中,作为包含核酸的溶液,可以使用溶解有核酸、人工核酸、实施了色素、磷酸基等修饰的核酸的溶液;在使用生物体试样的情况下,可以使用体液等液体试样、其稀释液、细胞团块、组织切片等固体试样的稀释液。此外,可以直接使用对包含液体试样、固体试样的生物学试样,进行上述任一处理之后获得的溶液,可以根据需要进行稀释。稀释的溶液不受特别限定,优选使用水、Tris-盐酸缓冲液等包含核酸的溶液所通用的溶液。包含核酸的溶液优选为例如,添加了4M以上的盐酸胍、硫氰酸胍、尿素的生物学试样。

[0050] 在本发明中,回收的核酸的长度不受特别限定,优选为1000碱基对以下。此外,在本发明中,现有技术难以回收的300碱基对以下的核酸也可以以高收率回收,100碱基对以下的pre-miRNA、miRNA也可以以高收率回收。

[0051] 本发明通过使用表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体,从而实现高收率的核酸的回收。本发明的载体是表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体。以下,记载为本发明的载体。

[0052] 吸附于本发明的载体的核酸的吸附率可以如下求出。首先,算出包含核酸的溶液中的核酸量。接下来,将本发明的载体与包含核酸的溶液进行混合,算出核酸吸附于本发明的载体后的混合液中的核酸量,求出与包含核酸的溶液中的核酸量之差。将获得的值设为吸附于本发明的载体的核酸量,将吸附于本发明的载体的核酸量除以包含核酸的溶液中的核酸量,从而可以算出核酸的吸附率。

[0053] 本发明的核酸的溶出率可以如下求出。对吸附有核酸的本发明的载体添加溶出液,算出溶出后的溶液中的核酸量,算出核酸的溶出量。可以将该核酸的溶出量除以由上述

算出的吸附于本发明的载体的核酸量,算出溶出率。

[0054] 本发明中的核酸的回收率由通过上述方法算出的吸附率与溶出率之积来算出。

[0055] 作为核酸量的定量的方法,可举出吸光度测定、荧光测定、发光测定、电泳、PCR、RT-PCR、使用了微阵列的解析、使用了测序仪的解析等。如果是非修饰的核酸,则可以通过测定260nm时的吸光度来定量核酸量。此外,如果是被荧光色素修饰了的核酸,则可以通过将该荧光色素来源的荧光强度与浓度已知的溶液的荧光强度进行比较来定量核酸量。此外,可以通过电泳来进行。利用电泳进行的回收率的算出方法可以通过将浓度已知的样品与进行了回收操作的样品同时泳动,将凝胶染色,通过图像解析来比较谱带的浓度从而确定。

[0056] 在本发明中,聚合物是作为基本单元的被称为单体(单量体)、单体(モノマー)的重复单元多个连接了的化合物的总称。本发明的载体所使用的聚合物包含由1种单体形成的均聚物和由2种以上单体形成的共聚物的任一种,还包含任意聚合度的聚合物。此外,包含天然聚合物和合成聚合物中的任一种。

[0057] 本发明的载体所使用的水溶性的中性聚合物是具有能够溶解于水的性质,在水中的溶解度为至少0.0001wt%以上、优选为0.001wt%以上、更优选为0.01wt%以上、进一步优选为0.1wt%以上的聚合物。

[0058] 本发明的载体所使用的水溶性的中性聚合物优选为在pH7的溶液中的 ζ 电位为-10mV以上且+10mV以下的聚合物。更优选为-8mV以上且+8mV以下,进一步优选为-6mV以上且+6mV以下,特别优选为-4.0mV以上且+1.1mV以下的聚合物。

[0059] 所谓 ζ 电位,是表示溶液中的胶体的界面的电性质的值之一。如果带电的胶体分散于溶液中,则在胶体的表面,通过相对于胶体的表面电荷的抗衡离子而形成双电层。将此时的胶体表面的电位称为表面电位。双电层通过胶体的表面电荷的静电相互作用而形成,因此离子牢固地固定于胶体侧附近。将在双电层中通过静电相互作用而抗衡离子牢固地固定于胶体表面的层称为固定层,将固定层的电位称为固定电位。如果使胶体相对于溶液进行移动,则固定层与胶体一起移动。此时,从胶体来看在与固定层相比靠外侧,由于溶液所具有的粘性,因此具有与胶体一起移动的边界面。将其称为滑动面、或滑面。将充分远离胶体的地点的电位设为零点时的、该滑动面的电位定义为 ζ 电位。这样, ζ 电位依赖于胶体的表面电荷而发生变化,表面电荷根据依赖于pH的质子分离结合而发生变化,因此在本发明中,将pH7的溶液中的值设为基准。此外,一般而言与胶体的尺寸相比,直至滑动面的距离小,因此还可以将胶体的表面近似地表示为滑动面。本发明所使用的水溶性的中性聚合物的情况也同样地,可以将分散于溶液中的胶体的表面电位看作 ζ 电位。

[0060] ζ 电位可以利用电泳、电渗、逆流电位、沉淀电位等界面动电现象来求出,可以通过显微镜电泳法、基于旋转衍射光栅法的电泳法、激光-多普勒电泳法、超声波振动电位法、动电音响法(動電音響法)等方法来测定。这些测定可以通过使用 ζ 电位测定装置来进行。 ζ 电位测定装置由大塚电子株式会社、Malvern Instruments Ltd.、Ranku Brother Ltd.、PenKem Inc.等市售。

[0061] 使用上述任一装置都可以测定 ζ 电位,但通常为激光-多普勒电泳法。激光-多普勒电泳法是利用了光、声波接触通过电泳而运动的物体,如果发生散射或反射则其频率发生变化的多普勒效果的测定方法。

[0062] 在测定聚合物的 ζ 电位的情况下,可以调制聚合物溶液作为胶体分散溶液,测定 ζ 电位。使聚合物溶解于例如磷酸缓冲液、氯化钠溶液、柠檬酸缓冲液等电解质来调制聚合物溶液,检测溶液中分散的聚合物的散射光、反射光来进行测定。胶体的尺寸越大,则能够以越低浓度检测散射光、反射光。

[0063] 利用激光-多普勒法测定聚合物的 ζ 电位的具体条件不受特别限定,例如,可以使聚合物的浓度成为1wt%以上且10wt%以下的方式溶解于磷酸缓冲液(10mM, pH7),将该溶液放入测定用单元(cell),设置于将激光-多普勒电泳法作为原理的 ζ 电位测定装置,在室温下进行测定。 ζ 电位测定装置可以利用例如,大塚电子株式会社的ELS-Z等。

[0064] 作为本发明的载体所使用的水溶性的中性聚合物,具体而言,可举出以下物质。可以使用例如,聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮等聚乙烯基系聚合物、聚丙烯酰胺、聚(N-异丙基丙烯酰胺)或聚(N-(羟基甲基)丙烯酰胺)等聚丙烯酰胺系聚合物、聚乙二醇、聚丙二醇或聚四亚甲基醚二醇等聚亚烷基二醇系的聚合物、聚(2-乙基-2-噁唑啉)、(羟基丙基)甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、2-羟基乙基纤维素或羟基丙基纤维素等纤维素等。此外,还可以使用包含上述聚合物的共聚物。

[0065] 此外,Ficoll、琼脂糖、壳多糖和葡聚糖等多糖或多糖类似物、以及白蛋白等蛋白质、肽也包含于本发明的载体所使用的水溶性的中性聚合物中。

[0066] 可以使水溶性的中性聚合物的官能团的一部分离子化,或置换成显示阳性、阴性的官能团,或在侧链导入乙酰基等表现水溶性的官能团。

[0067] 作为水溶性的中性聚合物的分子量,可以优选使用例如,0.4kD以上的聚合物,更优选为6kD以上。

[0068] 本发明的载体所使用的氧化铝(Aluminium oxide)是 Al_2O_3 的组成式所示的两性氧化物,也被称为氧化铝(Alumina)。

[0069] 氧化铝可以使用天然产出的氧化铝,也可以使用工业上制作的氧化铝。作为制作氧化铝的方法,可举出例如,将三水铝石作为起始原料的拜耳法、经由勃姆石形态的氢氧化物的醇盐法(也被称为溶胶-凝胶法)/中和法/油滴法、铝盐热分解法、阳极氧化法等。

[0070] 工业上制作的氧化铝可以由试剂制造商、催化剂化学制造商、一般社团法人催化剂学会的参照催化剂部会等来获得。

[0071] 氧化铝根据它们所具有的晶体结构分类为 α 氧化铝、 ρ 氧化铝、 χ 氧化铝、 κ 氧化铝、 η 氧化铝、 γ 氧化铝、 δ 氧化铝、 θ 氧化铝等。在本发明中,优选为具有高比表面积的 γ 氧化铝。

[0072] 氧化铝根据制作时的烧成温度,酸部位(Al^+ 、 $Al-OH_2^+$)与碱部位($Al-O^-$)发生变化。氧化铝根据该酸部位和碱部位的数目,如果酸部位多则分类为酸性氧化铝,如果碱部位多则分类为碱性氧化铝,如果酸部位与碱部位同等程度则分类为中性氧化铝。该特性的差异可以通过添加作为pH指示剂的BTB溶液来确认。添加BTB溶液,如果氧化铝呈现黄色则可以确认为酸性氧化铝,如果呈现绿色则可以确认为中性氧化铝,如果呈现蓝色则可以确认为碱性氧化铝。虽然具有这样的特性上的差异,但在本发明中,任一氧化铝都可以使用。

[0073] 氧化铝优选为粒状的氧化铝。粒径可以是一致的,也可以将不同粒径进行混合来利用。可以优选使用粒径例如小于 $212\mu m$ 的氧化铝,更优选可以使用粒径小于 $100\mu m$ 的氧化铝。

[0074] 关于粒径,在本发明中,以基于日本工业规格所规定的JISZ-8801-1:2006的筛子

筛孔的尺寸来定义。例如,采用基于上述JIS标准的筛孔,通过40 μm 的筛子但不能通过32 μm 的筛子的粒子设为32 μm 以上且小于40 μm 的粒径。

[0075] 本发明所使用的溶出液只要可以使吸附于本发明的载体的核酸溶出,就不受特别限定,优选为缓冲液,缓冲液中可以包含螯合剂。具体而言,可举出包含柠檬酸和柠檬酸钠的柠檬酸缓冲液、包含磷酸和磷酸钠的磷酸缓冲液、在包含三羟基氨基甲烷和盐酸的Tris-盐酸缓冲液中添加有EDTA的Tris-EDTA缓冲液等。

[0076] 缓冲液的pH优选为pH4以上且pH9以下,更优选为pH5以上且pH8以下。

[0077] 本发明所使用的缓冲液可以如下调制。例如,0.5M的磷酸缓冲液(pH7)的调制如下。调制0.5M的磷酸氢二钠水溶液和0.5M的磷酸二氢钠。对于0.5M的磷酸氢二钠水溶液,一边测定pH一边添加磷酸二氢钠溶液,变成pH7时停止添加。也可以利用同样的方法,调制其它pH的缓冲液。

[0078] 缓冲液所包含的螯合剂可以使用具有带有多个配位座的配位体,对金属离子结合,形成配位化合物的物质。

[0079] 作为具体的螯合剂,可举出乙二胺四乙酸(EDTA)、氮川三乙酸(NTA)、二醇醚二胺四乙酸(EGTA)、多磷酸、偏磷酸和/或它们的盐等。螯合剂的终浓度不受特别限定,只要为50mM以上即可,优选为100mM以上,进一步优选为500mM以上。

[0080] 此外,作为成为上述以外的螯合剂的化合物,可举出阴离子性的聚合物。侧链具有羧酸的聚合物由于将金属离子进行配位,因此它们也可以包含于缓冲液中。作为具有这样的功能的聚合物,可举出聚乙烯基磺酸和/或它们的盐。其终浓度不受特别限定,只要为1wt%以上即可,优选为10wt%以上。

[0081] 本发明是从生物学试样回收核酸的方法,其包括下述工序:工序a)将表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体与包含核酸的溶液进行混合,使核酸吸附于载体的工序,工序b)从工序a)中混合后的溶液,分离出吸附有上述核酸的载体的工序,工序c)向工序b)中吸附有上述核酸的载体添加溶出液来回收核酸的工序。以下,对各个工序进行详细地说明。

[0082] 本发明的载体通过使水溶性的中性聚合物吸附于氧化铝的表面来制作。聚合物对表面的被覆率优选为7%以上,更优选为10%以上,进一步优选为20%以上,特别优选为30%以上,最优选为40%以上。此外,水溶性的中性聚合物可以不以均匀的厚度来吸附。

[0083] 在本发明中,聚合物对氧化铝的被覆率通过解析利用表面电位显微镜(别名开尔文探针力显微镜;KFM)而取得的电位分布图来算出。表面电位显微镜可以利用例如,Bruker AXS社的Digital Instruments制的NanoScope Iva AFM Dimension 3100工作台AFM系统等。

[0084] 在由表面电位显微镜算出表面被覆率时,测定的视场比例尺在0.5 μm \times 1 μm 的范围内进行。表面被覆率的算出方法如下,首先取得氧化铝的表面电位图像,求出视场内的平均电位。接下来,取得水溶性的中性聚合物的表面电位图像,求出视场内的平均电位。然后,取得吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的表面电位图像,求出视场内的平均电位。将仅氧化铝的被覆率设为0%,仅水溶性的中性聚合物的被覆率设为100%,取吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的平均电位与水溶性的中性聚合物的平均电位之比,从而算出吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的表面被覆率。在求出表面被覆率时,所使用的视场内的平均

电位为随机地选择3个本发明的单独粒子,使用各个测定值的平均值。

[0085] 此外,在本发明中,作为算出表面被覆率时的图像解析软件,可以使用Adobe社的Photoshop。在该情况下,在图像解析时,将氧化铝的表面电位的平均值设为比例尺下端,将水溶性的中性聚合物的表面电位的平均值设为比例尺上端,将下端的颜色设定为黑(8bit, RGB值0),上端的颜色设定为红(R值255)、或绿(G值255)、或青(B值255)等。在设定的比例尺内显示吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的表面电位图像,将R值、或G值、或B值的任一值除以255,将其比设为表面被覆率。

[0086] 作为使水溶性的中性聚合物吸附于表面的前阶段,可以预先将氧化铝用水、乙醇等溶液进行洗涤,除去吸附于表面的杂质,也可以省略本洗涤操作。

[0087] 使水溶性的中性聚合物吸附于氧化铝的表面的方法可举出例如,使水溶性的中性聚合物溶解来调制水溶性的中性聚合物溶液,与氧化铝接触的方法。具体而言,可以为使氧化铝浸渍于水溶性的中性聚合物溶液,或将水溶性的中性聚合物溶液滴加至氧化铝中,或将水溶性的中性聚合物溶液涂布于氧化铝,或使水溶性的中性聚合物溶液成为雾状以喷射于氧化铝。

[0088] 使氧化铝浸渍于水溶性的中性聚合物溶液的方法不受特别限定。例如,可以利用吸移、颠倒混合、搅拌器、混合机、涡旋混合机、磨机等分散机、超声波处理装置等进行搅拌。

[0089] 水溶性的中性聚合物浓度不受特别限定,优选为0.01wt%以上,更优选为0.1wt%以上。

[0090] 关于搅拌时的混合时间,只要水溶性的中性聚合物与氧化铝被均匀地混合,则混合时间不受特别限定,优选在涡旋混合机的情况下搅拌1分钟以上,优选为5分钟以上。

[0091] 此外,还可以使用筛子、筐箩等来将水溶性的中性聚合物浸渍涂布于氧化铝。关于浸渍于溶液时的混合时间,只要为0.1wt%以上的聚合物浓度,则只要为5分钟以上即可,优选为30分钟以上。

[0092] 在滴加水溶性的中性聚合物溶液的情况下,可以使用滴管、滴液漏斗等。在滴加聚合物溶液时,可以使氧化铝振动,或使其旋转,可以使用旋转涂布机等。

[0093] 在涂布水溶性的中性聚合物溶液的情况下,可以使用毛刷、辊、线棒。

[0094] 在使水溶性的中性聚合物溶液成为雾状来进行喷射的情况下,可以使用空气喷涂、气刷等。

[0095] 采用上述所例示的方法,使水溶性的中性聚合物吸附于氧化铝之后,可以进行离心分离操作来除去成为上清液的聚合物溶液,可以不进行离心分离操作而直接用于核酸的回收。此外,在使聚合物溶液溶解于溶剂的情况下,在使水溶性的中性聚合物吸附于氧化铝,并除去溶剂之后,可以使其干燥,也可以不使其干燥而用于核酸的回收。

[0096] 所得的本发明的载体可以使用预先制作而保存的载体,也可以用时调制来使用。

[0097] 关于水溶性的中性聚合物溶液,如果获得的水溶性的中性聚合物为固体,则可以通过溶解于水、有机溶剂来调制,如果为溶液,则可以通过进行稀释来调制。在聚合物难以溶解的情况下、在溶液的粘度高而难以混合的情况下,可以进行加热处理、超声波处理。有机溶剂优选使用例如,乙醇、乙腈、甲醇、丙醇、叔丁醇、DMF、DMSO、丙酮、乙二醇、甘油等与水具有双溶性的有机溶剂。此外,在水中难以溶解的情况下,可以添加上述有机溶剂。

[0098] 使氧化铝与水溶性的中性聚合物通过连接分子等来共价结合而制作的载体并不

相当于本发明的载体。具体的连接分子中可举出硅烷偶联剂等。

[0099] 工序a) 是将通过上述制作方法来制作的本发明的载体与包含核酸的溶液进行混合,使核酸吸附于本发明的载体的工序。本发明的载体和包含核酸的溶液的混合方法不受特别限定,可以通过例如吸移、颠倒混合来进行,可以使用混合机、涡旋混合机等装置。混合时间不受特别限定,只要为5分钟左右即可,可以混合5分钟以上的时间。此外,可以将本发明的载体填充至柱,使包含核酸的溶液通过。

[0100] 工序b) 是从工序a) 中混合后的混合物,分离出吸附有上述核酸的载体的工序。作为分离的方法,可举出将由工序a) 获得的混合物离心分离,使吸附有核酸的载体沉淀,除去上清液的方法。由于吸附有核酸的载体的比重比水重,因此可以通过离心操作而使其容易地沉淀。离心分离的条件只要以6000G处理1分钟即可,更优选以10000G处理1分钟。作为其它分离方法,可举出使用超滤膜的方法。使由工序a) 获得的混合物通过具有比吸附有核酸的载体的粒径小的孔径的超滤膜,将吸附有核酸的载体进行分离。这样的超滤膜被试剂盒化,可以获得以メルク株式会社のウルトラフリー(注册商标)、Pall Corporationのナノセップ(注册商标)为代表的离心过滤试剂盒来利用。

[0101] 此外,可以在工序b) 的操作之后,根据需要进行以下那样的处理。这是因为在工序a) 之后,有可能目标核酸以外的生物学试样来源物吸附于本发明的载体的表面。例如,为了更高纯度地离析核酸,可以进行洗涤、分解的处理。具体而言,可以进行下述各种处理:为了除去非特异性地吸附的化合物而用水进行洗涤;为了除去非特异性地吸附的蛋白质而用表面活性剂进行洗涤;为了除去离子、低分子化合物而用包含表面活性剂的溶液进行洗涤;为了除去非特异性地吸附的疏水性化合物而用有机溶剂进行洗涤;为了分解非特异性地吸附的蛋白质而添加蛋白质分解酶;为了仅离析DNA而添加RNA分解酶以及为了仅离析RNA而添加DNA分解酶;等。

[0102] 工序c) 是向工序b) 中分离出的吸附有上述核酸的本发明的载体添加溶出液来回回收核酸的工序。

[0103] 在添加上述溶出液来回回收核酸时,在要将本发明的载体与使核酸溶出的溶液进行分离的情况下,可举出在工序c) 中,将向吸附有核酸的载体添加溶出液而获得的混合物进行离心分离,使本发明的载体沉淀,取得核酸溶出了的上清液的方法。由于本发明的载体的比重比水重,因此可以通过离心操作而使其容易地沉淀。离心分离的条件是只要以6000G处理1分钟即可,优选以10000G处理1分钟。

[0104] 作为其它分离方法,可举出使用超滤膜的方法。使工序c) 中获得的混合物通过具有比本发明的载体的粒径小的孔径的超滤膜,将本发明的载体进行分离。这样的超滤膜被试剂盒化,可以获得以メルク株式会社のウルトラフリー(注册商标)、Pall Corporationのナノセップ(注册商标)为代表的离心过滤试剂盒来利用。

[0105] 回收的核酸可以根据需要进行化学修饰。化学修饰中可举出对核酸的末端的荧光色素修饰、消光剂修饰、生物素修饰、氨基化、羧基化、马来酰亚胺化、琥珀酰亚胺化、磷酸化和脱磷酸化等,此外可举出利用嵌入剂进行的染色。这些修饰可以通过化学反应被导入,可以通过酶反应被导入。可以在上述定量之前导入这些修饰基团,不将回收的核酸本身进行定量,而将经过化学修饰而导入的修饰基团进行定量,从而间接地定量核酸。由于通过本发明来回回收核酸,特别是高收率地回收短链核酸,因此在上述定量时能够高灵敏度地定量。

[0106] 本发明的核酸回收用的试剂盒可以用于从生物学试样有效率地回收核酸。本发明的核酸回收用的试剂盒包含本发明的载体和缓冲液作为其构成成分。试剂盒除了这些以外,可以包含说明书等。

[0107] 本发明的核酸回收用的试剂盒所包含的本发明的载体可以为干燥了的状态,也可以为浸渍于水溶性的中性聚合物的溶液中的状态。

[0108] 本发明的核酸回收用的试剂盒所包含的缓冲液可以利用可以用于上述工序c)的溶出液的缓冲液。

[0109] 实施例

[0110] 通过以下实施例来进一步具体地说明本发明。

[0111] <材料和方法>

[0112] 聚乙二醇由メルク株式会社购入,聚(2-乙基-2-噁唑啉)由Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company购入,碱性的 γ 氧化铝(N613N)由日挥触媒化成株式会社购入, α 氧化铝(CAS.No1344-28-1,Cat.013-23115)、酸性的 γ 氧化铝(CAS.No1344-28-1,Cat.590-13685)、中性的 γ 氧化铝(CAS.No1344-28-1,Cat.013-590-13715)由和光纯药株式会社购入。实施例中使用的聚合物水溶液用水溶解至各个浓度。此外,实施例中,只要没有特别指明, γ 氧化铝使用碱性的 γ 氧化铝。此外,只要没有特别指明,氧化铝未进行筛分等而以购入的状态用于实验。

[0113] 此外,100bp DNA ladder(梯)(片段;200bp,300bp,1000bp)由タカラバイオ株式会社购入,溴化乙锭由ナカライテスク株式会社购入。此外,由ユーロフィンジェノミクス株式会社购入将作为let7a的序列已知的22个碱基的核酸转换成DNA序列而合成的物质和作为RNA序列合成的物质。以下对于RNA序列的合成核酸,记载为RNA22,对于DNA序列的合成核酸,记载为DNA22。这些核酸未进行特别地精制而直接使用。

[0114] 关于其它试剂,由和光纯药株式会社、东京化成株式会社、シグマアールドリツチジャパン合同会社购入,未进行特别地精制而直接使用。

[0115] 混合机使用东京理化器械株式会社的CUTE MIXER CM-1000,荧光计使用Thermo Fisher Scientific株式会社的Nanodrop3300和株式会社堀场制作所的FLUOROMAX-3, ζ 电位的测定使用大塚电子株式会社的ELS-Z,电泳使用株式会社アドバンス的Mupid-eXU。筛子使用アズワン株式会社的MVS-1。染色了的琼脂糖凝胶使用GEヘルスケア・ジャパン株式会社的Typhoon9410来解析。琼脂糖凝胶的图像解析使用Molecular Dynamics社的ImageQuant(注册商标)。表面电位显微镜使用Bruker AXS社的Digital Instruments制的NanoScope Iva AFM Dimension 3100工作台AFM系统。

[0116] 此外,作为算出表面被覆率时的图像解析软件,使用Adobe社的Photoshop。在图像解析时,将氧化铝的表面电位的平均值设为比例尺下端,将水溶性的中性聚合物的表面电位的平均值设为比例尺上端,将下端的颜色设定为黑(8bit,RGB值0),上端的颜色设定为红(R值255)、或绿(G值255)、或青(B值255)。在设定的比例尺内显示吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的表面电位图像,将R值、或G值、或B值的任一值除以255,将其比设为表面被覆率。

[0117] 在由表面电位显微镜算出表面被覆率时,测定的视场比例尺在 $0.5\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$ 的范围内进行。表面被覆率的算出方法如下,首先取得氧化铝的表面电位图像,求出视场内的平均

电位。接下来,取得水溶性的中性聚合物的表面电位图像,求出视场内的平均电位。然后,取得吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的表面电位图像,求出视场内的平均电位。将仅氧化铝的被覆率设为0%,仅水溶性的中性聚合物的被覆率设为100%,取吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的平均电位与水溶性的中性聚合物的平均电位之比,从而算出吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的表面被覆率。在求出表面被覆率时,所使用的视场内的平均电位为随机地选择3个本发明的单独粒子,使用各个测定值的平均值。

[0118] <比较例1>使用了表面未吸附有水溶性的中性聚合物的载体的核酸回收

[0119] 使用与专利文献3(实施例4,表2)中记载的氧化铝A组成相近的碱性的 γ 氧化铝(N613N,日挥触媒化成株式会社)、与氧化铝D组成相近的 α 氧化铝(和光纯药株式会社),研究是否可以有效率地回收核酸。作为使吸附于氧化铝的核酸溶出的溶出液,专利文献3、4中记载了可以利用磷酸缓冲液、或Tris-EDTA缓冲液作为溶出液,专利文献5中记载了磷酸溶液阻碍核酸与氧化铝的结合的情况,因此将磷酸缓冲液(0.5M,pH8)或Tris-EDTA缓冲液(0.5M Tris,0.5M EDTA,pH8)作为溶出液,进行以下实验。

[0120] 最初在1.5ml管中,量取0.5mg的 α 氧化铝或 γ 氧化铝。分别添加200 μ l的乙醇,涡旋后,利用离心机离心1分钟来除去上清液。将该操作进一步进行2次并洗涤。

[0121] 接着,对它们添加溶解有100pmol的DNA22的6M硫氰酸胍水溶液100 μ l,用混合机搅拌5分钟。进行离心(10000G,1min)并丢弃上清液,添加100 μ l的0.05%Tween水,进行涡旋。该操作进一步进行2次。然后,添加50 μ l的磷酸缓冲液(0.5M,pH8)或Tris-EDTA缓冲液(0.5M Tris,0.5M EDTA,pH8),利用混合机搅拌5分钟。利用离心机进行离心(10000G,1min),回收核酸溶液。

[0122] 吸附率通过Cy3的荧光测定如下算出。首先,测定添加 α 氧化铝和 γ 氧化铝之前的100pmol的DNA22溶解了的6M硫氰酸胍水溶液100 μ l的荧光强度,接下来,测定添加 α 氧化铝和 γ 氧化铝并进行了混合之后的荧光强度。将添加氧化铝之后的荧光强度除以添加之前的荧光强度,取添加之前的核酸量(100pmol)的积,算出溶液中的核酸量。取添加之前的核酸量(100pmol)与该值的差,算出吸附了的核酸量。将吸附的核酸量除以添加氧化铝之前的核酸量(100pmol),算出吸附率。

[0123] 溶出率通过Cy3的荧光测定如下算出。对于吸附有核酸的氧化铝,分别添加50 μ l的磷酸缓冲液或Tris-EDTA缓冲液,对于溶出之后的溶出液进行荧光测定。接下来,调制出100pmol的DNA22溶解了的50 μ l的磷酸缓冲液、和Tris-EDTA缓冲液,对于该溶液分别进行荧光测定。将溶出液的荧光强度除以该溶液的荧光强度,算出溶出的核酸量。将溶出的核酸量除以吸附的核酸量,算出溶出率。回收率取算出的吸附率与溶出率的积来算出。将结果示于表1中。

[0124] 由这些结果可知,将聚合物未吸附于表面的 γ 氧化铝、或 α 氧化铝用作载体的核酸的回收方法中,溶出率低,核酸的回收率低。

[0125] [表1]

[0126] 【表1】

[0127]

聚合物未附着的氧化铝	溶出液	吸附率 [%]	溶出率 [%]	回收率 [%]
γ 氧化铝	磷酸缓冲液	92	4.1	3.8
	Tris-EDTA 缓冲液	97	5.5	5.4
α 氧化铝	磷酸缓冲液	23	15	3.5
	Tris-EDTA 缓冲液	22	21	4.7

[0128] <比较例2>表面吸附有水溶性的中性聚合物以外的水溶性的聚合物的氧化铝的载体的制作

[0129] 在1.5ml管中,量取各0.5mg的 γ 氧化铝。在其中作为聚合物溶液,分别添加各50 μ l的聚丙烯酸(PAcA,5.1kD,10wt%)、葡聚糖硫酸(DS,4kD,10wt%)、聚乙烯基磺酸(PVSA,10wt%)、聚烯丙基胺(PAA,17kD,10wt%)、聚-L-赖氨酸(PLL,150kD,1wt%),利用混合机搅拌10分钟。利用离心机进行离心(10000G,1min)而除去上清液,获得了表面吸附有各个聚合物的 γ 氧化铝。

[0130] <比较例3>使用表面吸附有水溶性的中性聚合物以外的水溶性的各聚合物的氧化铝作为载体的核酸回收

[0131] 在1.5ml的管中,量取各0.5mg的由比较例2制作的表面吸附有作为水溶性的中性聚合物以外的水溶性的聚合物的、聚丙烯酸(PAcA,5.1kD,10wt%)、葡聚糖硫酸(DS,4kD,10wt%)、聚乙烯基磺酸(PVSA,10wt%)、聚烯丙基胺(PAA,17kD,10wt%)、聚-L-赖氨酸(PLL,150kD,1wt%)的 γ 氧化铝,作为载体使用。溶出液采用Tris-EDTA缓冲液(0.5M Tris,0.5M EDTA,pH8),其它条件、操作与比较例1同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率。将结果示于表2中。

[0132] 由这些结果可知,在将表面吸附有聚丙烯酸、聚乙烯基磺酸和葡聚糖硫酸的 γ 氧化铝用作载体的情况下,核酸的吸附率低,溶出率也低,核酸的回收率也低。此外,在将表面吸附有聚烯丙基胺和聚-L-赖氨酸的 γ 氧化铝用作载体的情况下,获得了虽然核酸的吸附率保持得高,但溶出率降低,回收率也低的结果。

[0133] <实施例1>表面吸附有水溶性的中性聚合物的氧化铝的载体的制作

[0134] 在1.5ml管中,量取各0.5mg的 γ 氧化铝。在其中,作为聚合物水溶液,分别添加各50 μ l的作为水溶性的中性聚合物的聚乙烯醇(11%乙酰化,PVA,18kD,10wt%)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOz,5kD,10wt%)、聚乙二醇(PEG,10kD,10wt%)、羟基丙基甲基纤维素(HPMC,10kD,10wt%)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP,10kD,10wt%)。其它条件、操作与比较例2同样地进行,获得了表面吸附有各个聚合物的 γ 氧化铝的载体。

[0135] <实施例2>使用表面吸附有水溶性的中性聚合物的 γ 氧化铝作为载体的核酸回收

[0136] 在1.5ml的管中,量取各0.5mg的由实施例1制作的表面吸附有作为各水溶性的中性聚合物的聚乙烯醇(11%乙酰化,PVA,18kD,10wt%)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOz,5kD,10wt%)、聚乙二醇(PEG,10kD,10wt%)、羟基丙基甲基纤维素(HPMC,10kD,10wt%)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP,10kD,10wt%)的 γ 氧化铝,作为载体使用。其它条件、操作与比较例3同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率。将结果示于表2中。

[0137] 由这些结果可知,与比较例3相比,在使用表面吸附有水溶性的中性聚合物的 γ 氧化铝作为载体的情况下,在核酸的吸附率保持得高的状态下,溶出率和回收率提高。

[0138] [表2]

[0139] 【表2】

[0140]

附着于 γ 氧化铝的聚合物	吸附率 [%]	溶出率 [%]	回收率 [%]	
PAcA	11	14	1.5	比较例 3
DS	74	7.5	5.6	比较例 3
PVSA	12	22	2.7	比较例 3
PVA	81	78	63	实施例 2
PEOz	91	90	82	实施例 2
PEG	98	86	84	实施例 2
HPMC	77	88	68	实施例 2
PVP	76	92	70	实施例 2
PAA	95	12	11	比较例 3
PLL	85	1.6	1.4	比较例 3

[0141] <比较例4>水溶性的中性聚合物以外的水溶性的聚合物的 ζ 电位的测定

[0142] 将比较例3中使用的作为水溶性的中性聚合物以外的水溶性的聚合物的聚丙烯酸(PAcA,5.1kD)、葡聚糖硫酸(DS,4kD)、聚乙烯基磺酸(PVSA)、聚烯丙基胺(PAA,17kD)、聚-L-赖氨酸(PLL,150kD))以终浓度成为1wt%以上且10wt%以下的方式溶解于磷酸缓冲液(10mM,pH7)中,使用大塚电子株式会社的ELS-Z来测定 ζ 电位。将结果示于表3中。表3中,获得通过本测定获得的 ζ 电位、与使用表面吸附有各个聚合物的 γ 氧化铝作为载体的DNA22的回收率(比较例3的结果)的相互关系,依 ζ 电位的值从低到高的顺序排列。

[0143] 由这些结果可知,比较例3中使用的水溶性的中性聚合物以外的水溶性聚合物的 ζ 电位为-17mV以下,或+11mV以上。

[0144] <实施例3>水溶性的中性聚合物的 ζ 电位测定

[0145] 以终浓度成为1wt%以上且10wt%以下的方式,将实施例2中使用的作为水溶性的中性聚合物的聚乙烯醇(11%乙酰化,PVA,18kD)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOz,5kD)、聚乙二醇(PEG,10kD)、羟基丙基甲基纤维素(HPMC,10kD)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP,10kD)溶解于磷酸缓冲液(10mM,pH7)中,采用与比较例4同样的方法测定 ζ 电位。

[0146] 表3中,获得通过本测定获得的 ζ 电位、与使用表面吸附有各个聚合物的 γ 氧化铝作为载体的DNA22的回收率(实施例2的结果)的相互关系,依 ζ 电位的值从低到高的顺序排列。

[0147] 由这些结果可知,实施例2中核酸的回收率提高了的水溶性的中性聚合物的 ζ 电位在pH7的溶液中为-4mV以上且+1.1mV以下,与具有-17mV以下和+11mV以上的 ζ 电位的水溶性的聚合物相比,回收率提高。

[0148] [表3]

[0149] 【表3】

[0150]

附着于 γ 氧化铝的聚合物	ζ 电位 [mV]	回收率 [%]	
PAA	-37	1.5	比较例 4
DS	-18	5.6	比较例 4
PVSA	-17	2.7	比较例 4
PVA	-4.0	63	实施例 3
PEOz	-2.7	82	实施例 3
PEG	-1.2	84	实施例 3
HPMC	-0.89	68	实施例 3
PVP	+1.1	70	实施例 3
PAA	+11	11	比较例 4
PLL	+14	1.4	比较例 4

[0151] <实施例4>表面吸附有水溶性的中性聚合物的 γ 氧化铝的载体所吸附的核酸的溶出

[0152] 按照实施例1制作表面吸附有聚乙二醇的 γ 氧化铝,在1.5ml管中量取各0.5mg。作为溶出液,分别使用0.5M柠檬酸缓冲液(pH 5、6)、0.5M磷酸缓冲液(pH6、7、8)、0.5M Tris-EDTA缓冲液(pH8)、以成为10wt%的终浓度的方式添加有PVSA的0.5M Tris缓冲液(pH8)。其它条件、操作与比较例1同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率。将结果示于表4中。

[0153] 由这些结果可知,使用任一缓冲液作为溶出液都可以高收率地回收核酸。

[0154] [表4]

[0155] 【表4】

[0156]

溶出液	吸附率[%]	溶出率[%]	回收率[%]
柠檬酸缓冲液(0.5M,pH5)	99	97	96
柠檬酸缓冲液(0.5M,pH6)	99	99	98
磷酸缓冲液(0.5M,pH6)	98	98	96

磷酸缓冲液 (0.5M,pH7)	97	99	96
磷酸缓冲液 (0.5M,pH8)	97	100	97
Tris-EDTA缓冲液 (0.5M,pH8)	98	86	84
添加有PVSA的Tris缓冲液 (0.5M,pH8)	96	83	80

[0157] <实施例5>使用表面吸附有水溶性的中性聚合物的 γ 氧化铝作为载体的核酸的回收率与核酸的长度的关系

[0158] 按照实施例1制作表面吸附有聚乙二醇的 γ 氧化铝,在1.5ml管中量取各0.5mg。作为包含核酸的溶液,使用了100 μ l分别溶解有7.5 μ g的100bp DNA ladder的200bp、300bp、1000bp的6M硫氰酸胍水溶液。其它条件、操作与比较例3同样地进行,算出核酸的回收率。将结果示于表5中。

[0159] 由这些结果可知,通过使用表面吸附有作为水溶性的中性聚合物的聚乙二醇的 γ 氧化铝,从而具有任一长度的核酸都可以有效率地回收。

[0160] [表5]

[0161] 【表5】

[0162]

碱基长度	回收率[%]
200	60
300	42
1000	51

[0163] <实施例6>由胎牛血清的核酸回收

[0164] 按照实施例1制作表面吸附有聚乙二醇的 γ 氧化铝,在1.5ml管中量取各1.5mg。作为包含核酸的溶液,使用了溶解有100pmol的DNA22的6M硫氰酸胍水溶液100 μ l与具有30mg/ml的蛋白质浓度的胎牛血清100 μ l的混合溶液。其它条件、操作与比较例3同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率。对于RNA22也进行同样的实验。将结果示于表6中。另外,回收液中的蛋白质浓度为Bradford试验的检测限度以下(0.25mg/ml以下)。

[0165] 由这些结果可知,通过使用表面吸附有聚乙二醇的氧化铝作为载体,从而可以由血清效率良好地回收DNA22、RNA22。

[0166] [表6]

[0167] 【表6】

[0168]

核酸	回收率[%]
DNA22	63
RNA22	63

[0169] <实施例7>核酸回收中的氧化铝的粒径的效果

[0170] 基于日本工业规格所规定的JIS Z-8801-1:2006,使用筛子,将 γ 氧化铝按粒径进行了分级(100 μ m以上且小于212 μ m、40 μ m以上且小于100 μ m、32 μ m以上且小于40 μ m、20 μ m以上且小于32 μ m)。关于载体,与实施例1同样地操作,调制出按各粒径的表面吸附有聚乙二醇的 γ 氧化铝,使用它们。其它条件、操作与比较例3同样地进行,算出核酸的回收率。将结果示于表7中。

[0171] 由这些结果可知,粒径小于212 μm 的任一分级中,都可以回收核酸。

[0172] [表7]

[0173] 【表7】

[0174]

粒径[μm]	吸附率[%]	溶出率[%]	回收率[%]
100-212	70	74	52
40-100	87	88	76
32-40	97	77	74
20-32	99	76	75

[0175] <实施例8>核酸回收中的 γ 氧化铝的特性的差异

[0176] 使用酸性的 γ 氧化铝、中性的 γ 氧化铝、碱性的 γ 氧化铝。关于载体,与实施例1同样地操作,调制出表面吸附有聚乙二醇的各个氧化铝,使用它们。其它条件、操作与比较例3同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率。将结果示于表8中。

[0177] 由这些结果可知,在使用酸性氧化铝、中性氧化铝、碱性氧化铝的任一种情况下,都可以高收率地回收核酸。

[0178] [表8]

[0179] 【表8】

[0180]

氧化铝的物性	吸附率[%]	溶出率[%]	回收率[%]
酸性	76	75	57
碱性	98	86	84
中性	90	66	60

[0181] <实施例9>氧化铝的表面所吸附的聚合物的分子量的效果

[0182] 以使分子量为6kD、10kD、500kD的聚乙二醇与分子量为18kD、40kD、150kD(都11%乙酰化)的聚乙烯醇分别成为10wt%的方式进行调制,作为聚合物溶液使用。关于载体,与实施例1同样地进行,调制出表面吸附有各分子量的聚乙二醇的 γ 氧化铝,使用它们。其它条件、操作与比较例3同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率。将结果示于表9中。

[0183] 由这些结果可知,具有任一分子量的聚合物都可以回收核酸。

[0184] [表9]

[0185] 【表9】

[0186]

附着的聚合物	分子量[kD]	吸附率[%]	溶出率[%]	回收率[%]
PEG	6	98	62	61
PEG	10	98	86	84
PEG	500	94	49	46
PVA	18	92	59	54
PVA	40	88	67	59
PVA	150	94	47	45

[0187] <实施例10>本发明的载体的制作方法中的水溶性的中性聚合物的浓度与搅拌时

间的关系

[0188] 在1.5ml管中,量取氧化铝各0.5mg。在其中,作为聚合物水溶液,分别以0.1wt%、1wt%、10wt%的浓度添加各50 μ l的作为水溶性的中性聚合物的聚乙二醇(PEG,10kD)。对于各浓度利用混合机分别搅拌1分钟、5分钟、30分钟。利用离心机进行离心(10000G,1min),除去上清液,获得了氧化铝的表面吸附有聚乙二醇的载体。此外,与比较例3同样地进行,算出核酸的回收率。将结果示于表10中。

[0189] 由这些结果可知,利用任一条件制作的载体都可以有效率地回收核酸。

[0190] [表10]

[0191] 【表10】

[0192]

混合时间	PEG浓度	回收率[%]
1分钟	0.1wt%	51
	1wt%	55
	10wt%	95
5分钟	0.1wt%	67
	1wt%	76
	10wt%	88
30分钟	0.1wt%	70
	1wt%	84
	10wt%	90

[0193] <实施例11>本发明的载体的制作方法中的水溶性的中性聚合物的浓度与浸渍时间的关系

[0194] 在1.5ml管中,量取氧化铝各0.5mg。在其中,作为聚合物水溶液,分别以0.1wt%、1wt%、10wt%的浓度添加各50 μ l的作为水溶性的中性聚合物的聚乙二醇(PEG,10kD),分别静置5分钟、30分钟。利用离心机进行离心(10000G,1min),除去上清液,获得了氧化铝的表面吸附有聚乙二醇的载体。此外,与比较例3同样地进行,算出核酸的回收率。将结果示于表11中。

[0195] 由这些结果可知,利用任一条件制作的载体都可以有效率地回收核酸。

[0196] [表11]

[0197] 【表11】

[0198]

混合时间	PEG浓度	回收率[%]
5分钟	0.1wt%	29
	1wt%	31
	10wt%	61
30分钟	0.1wt%	48
	1wt%	53
	10wt%	75

[0199] <实施例12>本发明的载体的制作中的离心分离操作的有无与核酸的回收率的关系

系

[0200] 在1.5ml管中,量取氧化铝各0.5mg。在其中,作为聚合物水溶液,以10wt%的浓度添加50 μ l作为水溶性的中性聚合物的聚乙二醇(PEG,10kD),利用混合机搅拌10分钟。作为之后的操作,在实施例2中,进行利用离心机的离心分离操作和除去上清液的操作,但在实施例12中,不进行这些操作。使用这样制作的载体,除此以外,与比较例3同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率,将结果示于表12中。

[0201] 由这些结果可知,使用由实施例1制作的载体而进行了核酸的回收的实施例2的结果之中,如果与使用了聚乙二醇作为水溶性的中性聚合物的情况下的核酸的回收率的结果相比较,则利用哪种方法制作的本发明的载体都可以有效率地回收核酸。

[0202] [表12]

[0203] 【表12】

[0204]

离心分离操作	吸附率[%]	溶出率[%]	回收率[%]	
有	98	86	84	实施例2
无	98	91	89	实施例12

[0205] <实施例13>本发明的载体的制作方法中的水溶性的中性聚合物利用水洗进行的除去与回收率的关系

[0206] 按照实施例1制作表面吸附有聚乙二醇的氧化铝。作为之后的操作,向该载体添加水200 μ l,利用混合机搅拌1分钟,利用离心机进行离心(10000G,1min)以除去上清液。分别调制出将该水洗操作进行了1次、3次的载体。使用如上述那样操作而制作的载体,除此以外,与比较例3同样地进行,算出核酸的吸附率、溶出率、回收率,将结果示于表13中。

[0207] 由这些结果可知,使用由实施例1制作的载体而进行了核酸的回收的实施例2的结果之中,如果与使用了聚乙二醇作为水溶性的中性聚合物的情况下的核酸的回收率的结果相比较,则利用哪种方法制作本发明的载体都可以有效率地回收核酸。

[0208] [表13]

[0209] 【表13】

[0210]

水洗次数	吸附率[%]	溶出率[%]	回收率[%]	
无水洗	98	86	84	实施例2
1次	91	48	43	实施例13
3次	91	30	27	实施例13

[0211] <实施例14>本发明的载体中的聚合物对氧化铝的表面被覆率与回收率的关系

[0212] 通过表面电位显微镜来分析由实施例13制作的载体、由实施例2制作的表面吸附有聚乙二醇的氧化铝(未水洗)、未吸附聚合物的氧化铝、聚乙二醇,取得电位分布图,算出平均电位。在测定时,将载体试样散布于碳带,将CoCr涂布硅悬臂用作探针,以非接触模式,在0.5 μ m \times 1 μ m的视场范围内,在室温下、大气中进行了测定。测定值使用了随机地选择3粒表面吸附有聚乙二醇的载体的粒子而假定的值的平均值。将未吸附聚合物的仅氧化铝的被覆率设为0%,仅聚乙二醇的被覆率设为100%,取得吸附有聚乙二醇的氧化铝的平均电位与聚乙二醇的平均电位之比,从而算出表面被覆率。将表面被覆率与使用了各载体时的核

酸的回收率的关系示于表14中。

[0213] 由这些结果可知,如果使用表面被覆率为7%以上的载体,则可以有效率地回收核酸。

[0214] [表14]

[0215] 【表14】

[0216]

载体	表面被覆率[%]	回收率[%]	
无水洗	100	84	实施例2
水洗1次	40	43	实施例13
水洗3次	7	27	实施例13

[0217] 产业可利用性

[0218] 通过本发明,能够不使用有机溶剂,利用简便的方法从生物学试样效率良好地回收从pre-miRNA、miRNA那样的非常短的核酸直至1000个碱基以上的长的核酸。