

(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2007-516723

(P2007-516723A)

(43) 公表日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A 4 B O 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

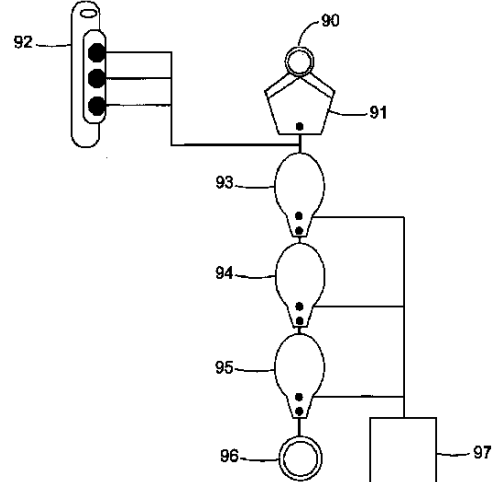
<p>(21) 出願番号 特願2006-546979 (P2006-546979)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成16年10月25日 (2004.10.25)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成18年8月22日 (2006.8.22)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2004/035366</p> <p>(87) 国際公開番号 W02005/068627</p> <p>(87) 国際公開日 平成17年7月28日 (2005.7.28)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/532, 523</p> <p>(32) 優先日 平成15年12月24日 (2003.12.24)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 10/852, 085</p> <p>(32) 優先日 平成16年5月24日 (2004.5.24)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 599056437 スリーエム イノベイティブ プロパティ ズ カンパニー アメリカ合衆国, ミネソタ 55144- 1000, セント ポール, スリーエム センター</p> <p>(74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤</p> <p>(74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬</p> <p>(74) 代理人 100087871 弁理士 福本 積</p> <p>(74) 代理人 100087413 弁理士 古賀 哲次</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体装置および濃縮ステップを用いて核酸を単離する方法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、マイクロ流体装置および濃縮ステップを用いて、サンプル、好ましくは生物学的サンプルから核酸を単離するための方法およびキットを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルから核酸を単離する方法であって、以下のステップ：

装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび混合用チャンバを含んでなるマイクロ流体装置を提供すること；

核酸と阻害物質を含んでなるサンプルを提供すること；

前記装填用チャンバに前記サンプルを導入すること；

前記バルブ付処理用チャンバに前記サンプルを移すこと；

前記バルブ付処理用チャンバ内に前記サンプルの濃縮領域を形成すること、ここで前記サンプルの濃縮領域は、大部分の前記核酸含有材料を含んでなり、濃縮度の低い領域は、前記阻害物質の少なくとも一部を含んでなり； 10

前記バルブ付処理用チャンバ内の第 1 のバルブを作動させて、前記サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、前記サンプルの濃縮度の低い領域から前記濃縮領域を実質的に分離し、それによって前記サンプルから前記阻害物質の少なくとも一部を除去すること；

前記バルブ付処理用チャンバ内の第 2 のバルブを作動させて、前記サンプルの分離された濃縮領域を前記混合用チャンバに移すこと；

前記サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液で任意に希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域を任意にさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を任意に分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと 20
考えられる濃度まで前記阻害物質の濃度を減少させること；

存在する場合、任意の加熱により核酸含有材料を任意に溶解して、核酸を放出させること；および

放出された核酸を含んでなる前記サンプルの pH を任意に調整すること、
を含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

前記マイクロ流体装置が、固相材料を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記固相材料が、病原体捕捉材料を含んでなり、前記サンプルが 1 種以上の病原体を含んでなる請求項 2 に記載の方法。 30

【請求項 4】

前記サンプルの濃縮領域の形成が、前記サンプルと前記病原体捕捉材料とを接触させることを含んでなる請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルが、血清または血漿および 1 種以上の病原体を含んでなり；

前記方法が、前記サンプルを前記装填用チャンバに導入する前に 1 種以上の病原体を濃縮することをさらに含んでなり；

前記装填用チャンバへの前記サンプルの導入が、濃縮された 1 種以上の病原体を前記装填用チャンバに導入することを含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 40

サンプルから核酸を単離する方法であって、以下のステップ：

装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび混合用チャンバを含んでなるマイクロ流体装置を提供すること；

核酸含有材料、阻害物質含有細胞、任意に細胞外阻害物質を含んでなるサンプルを提供すること；

前記装填用チャンバに前記サンプルを導入すること；

細胞膜を破壊し、阻害物質を放出し、核酸含有材料と阻害物質とを含んでなる溶解サンプルを形成するのに有効な条件下で、前記サンプルを第 1 の溶解試薬と接触させること；

前記バルブ付処理用チャンバに前記溶解サンプルを移すこと；

前記バルブ付処理用チャンバ内に前記溶解サンプルの濃縮領域を形成すること、ここで 50

、前記溶解サンプルの濃縮領域は、大部分の前記核酸含有材料を含んでなり、濃縮度の低い領域は、前記阻害物質の少なくとも一部を含んでなり；

前記バルブ付処理用チャンバ内の第1のバルブを作動させて、前記サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、前記溶解サンプルの濃縮度の低い領域から前記濃縮領域を実質的に分離し、それによって前記溶解サンプルから前記阻害物質の少なくとも一部を除去すること；

前記バルブ付処理用チャンバ内の第2のバルブを作動させて、前記溶解サンプルの分離された濃縮領域を前記混合用チャンバに移すこと；

前記溶解サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液で希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域をさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を分離し、希釈、
10 続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで前記阻害物質の濃度を減少させること；

前記核酸含有材料をさらに溶解して、核酸を放出させること；および

放出された核酸を含んでなる前記サンプルのpHを任意に調整すること、
を含んでなる、前記方法。

【請求項7】

核酸を放出させるための前記核酸含有材料のさらなる溶解が、前記核酸含有材料を加熱/冷却処理に供することを含んでなる請求項6に記載の方法。

【請求項8】

核酸を放出させるための前記核酸含有材料のさらなる溶解が、前記核酸含有材料を任意
20 の加熱と共に強塩基に供することを含んでなる請求項6に記載の方法。

【請求項9】

前記放出核酸を含んでなる前記サンプルのpHを、7.5~9の範囲内になるように調整することをさらに含んでなる請求項8に記載の方法。

【請求項10】

ヘムの濃度を2マイクロモル未満に減少させるために前記溶解サンプルの分離された濃縮領域を水で希釈することを含んでなる請求項7に記載の方法。

【請求項11】

前記水が、RNAseのない滅菌水である請求項7に記載の方法。

【請求項12】

前記バルブ付処理用チャンバにおいて第1のバルブを作動させて前記サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去することが、バルブを作動させて前記サンプルの上部
95容量%を除去することを含んでなる請求項7に記載の方法。

【請求項13】

前記核酸含有材料が、核を含んでなる請求項7に記載の方法。

【請求項14】

前記放出核酸を含んでなるサンプルを、増幅反応用チャンバに移すことをさらに含んでなる請求項7に記載の方法。

【請求項15】

前記放出核酸を増幅させることをさらに含んでなる請求項14に記載の方法。
40

【請求項16】

前記装填用チャンバへの前記サンプルの導入が、前記サンプルを第1の溶解試薬と接触させる前に生じる請求項7に記載の方法。

【請求項17】

前記装填用チャンバが前記第1の溶解試薬を含んでなり、前記サンプルと第1の溶解試薬との接触が、生物学的サンプルを前記装填用チャンバに導入する際に生じる請求項7に記載の方法。

【請求項18】

前記装填用チャンバへの前記サンプルの導入が、前記サンプルを第1の溶解試薬と接触させた後に生じる請求項7に記載の方法。
50

【請求項 19】

前記バルブ付処理用チャンバにおける前記サンプルの濃縮領域の形成が、前記処理用チャンバ内で前記サンプルを遠心分離することを含んでなる請求項 7 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 の溶解試薬が、非イオン界面活性剤である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 21】

前記サンプルが、核酸含有材料、阻害物質含有細胞、および細胞外阻害物質を含んでなる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 22】

サンプルから核酸を単離する方法であって、以下のステップ：

装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび混合用チャンバを含んでなるマイクロ流体装置を提供すること；

核酸含有材料、阻害物質含有細胞、及び任意に細胞外阻害物質を含んでなるサンプルを提供すること；

前記装填用チャンバに前記サンプルを導入すること；

細胞膜を破壊し、阻害物質を放出し、核酸含有材料と阻害物質とを含んでなる溶解サンプルを形成するのに有効な条件下で、前記サンプルを第 1 の溶解試薬と接触させること；

前記バルブ付処理用チャンバに前記溶解サンプルを移すこと；

前記バルブ付処理用チャンバ内に前記溶解サンプルの濃縮領域を形成すること、ここで、前記溶解サンプルの濃縮領域は、大部分の前記核酸含有材料を含んでなり、濃縮度の低い領域は、前記阻害物質の少なくとも一部を含んでなり；

前記バルブ付処理用チャンバ内の第 1 のバルブを作動させて、前記サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、前記溶解サンプルの濃縮度の低い領域から前記濃縮領域を実質的に分離し、それによって前記溶解サンプルから前記阻害物質の少なくとも一部を除去すること；

前記バルブ付処理用チャンバ内の第 2 のバルブを作動させて、前記溶解サンプルの分離された濃縮領域を前記混合用チャンバに移すこと；

前記溶解サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液で希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域をさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで前記阻害物質の濃度を減少させること；

前記核酸含有材料を強塩基と加熱によりさらに溶解して、核酸を放出させること；および

放出された核酸を含んでなる前記サンプルの pH を調整すること、を含んでなる、前記方法。

【請求項 23】

放出核酸を含んでなる前記サンプルの pH を、7.5 ~ 9 の範囲内になるように調整することをさらに含んでなる請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去するために、前記バルブ付処理用チャンバにおける第 1 のバルブの作動が、バルブを作動させて前記サンプルの上部 95 容量 % を除去することを含んでなる請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記核酸含有材料が、核を含んでなる請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

放出核酸を含んでなる前記サンプルを増幅反应用チャンバに移すことをさらに含んでなる請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記放出核酸を増幅することをさらに含んでなる請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記装填用チャンバへの前記サンプルの導入が、前記サンプルを第1の溶解試薬と接触させる前に生じる請求項22に記載の方法。

【請求項29】

前記装填用チャンバが前記第1の溶解試薬を含んでなり、前記サンプルと第1の溶解試薬との接触が、前記生物学的サンプルを前記装填用チャンバに導入する際に生じる請求項22に記載の方法。

【請求項30】

前記装填用チャンバへの前記サンプルの導入が、前記サンプルを第1の溶解試薬と接触させた後に生じる請求項22に記載の方法。

【請求項31】

前記バルブ付処理用チャンバにおける前記サンプルの濃縮領域の形成が、前記処理用チャンバ内で前記サンプルを遠心分離することを含んでなる請求項22に記載の方法。

【請求項32】

前記第1の溶解試薬が、非イオン界面活性剤である請求項22に記載の方法。

【請求項33】

前記装填用チャンバへの前記サンプルの導入が、前記サンプルを第1の溶解試薬と接触させる前に生じる請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記核酸含有材料が、核を含んでなる請求項33に記載の方法。

【請求項35】

水または緩衝液により前記溶解サンプルの分離された濃縮領域の10倍希釈物を形成することをさらに含んでなる請求項22に記載の方法。

【請求項36】

サンプルから核酸を単離するキットであって、以下の：

第1の溶解試薬；

装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび混合用チャンバを含んでなるマイクロ流体装置；

請求項6の方法に従って、サンプルを溶解し、前記阻害物質の少なくとも一部から前記核酸含有材料および/または核酸の少なくとも一部を分離するための使用説明書、を含んでなる、前記キット。

【請求項37】

サンプルから核酸を単離するキットであって、以下の：

第1の溶解試薬；

装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび混合用チャンバを含んでなるマイクロ流体装置；

請求項22の方法に従って、サンプルを溶解し、前記阻害物質の少なくとも一部から前記核酸含有材料および/または核酸の少なくとも一部を分離するための使用説明書、を含んでなる、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

血液サンプル、組織サンプル、細菌細胞培養培地、および法医学サンプルなどの複雑なマトリックスから核酸（例えば、DNAおよびRNA）の単離および精製は、遺伝子研究、核酸プローブ診断、法医学DNA試験、および核酸の増幅を必要とする他の領域において重要な過程である。増幅法に関して核酸を調製する種々の方法が、当業界に公知であるが、その各々には限界がある。

【0002】

全血からDNAを単離するための最も一般的な方法は、密度勾配を用いた末梢血単核細胞（PBMC）類の単離を含む。この方法は、研究適用に有効であるが、従来の統合的ハイスループットマイクロ流体装置の使用には一般に適切ではない。

10

20

30

40

50

【0003】

非イオン性界面活性剤を含有する低張性緩衝液は、核を非損傷状態のまま赤血球（RBC）類ならびに白血球（WBC）類を溶解するのに用いることができる。別の方法では、全血が凍結と解凍に供される場合、RBCだけが溶解される。非損傷状態のWBC類またはそれらの核は、遠心分離により回収できる。WBC類を破壊しないRBC類の溶解に関する方法として、水希釈も使用できる。RBC類の選択的溶解に関する他の方法としては、塩化アンモニウムまたは四級アンモニウム塩類の使用、ならびに低張性緩衝液の存在下、RBC類を低張性ショックに供することが挙げられる。しかしながら、これらのアプローチのうちの1つを用いる従来の方法においては、PCRを阻害する物質（例えば、酵素類の阻害剤）を、核および/または核酸と共に共沈殿させる。これらの阻害剤は、従来の

10

【0004】

煮沸、プロテイナーゼによる加水分解、超音波への曝露などの処理、または強塩基類がDNA抽出に使用されているが、これらの方法の中でアルカリ抽出が最も簡便である。例えば、米国特許第5,620,852号明細書（リン（Lin）ら）は、1分という短い時間枠内で室温、アルカリ（例えば、NaOH）処理により実施された全血からのDNAの効率的な抽出を記載している。しかしながら、純粋なDNAを得るためには、ヘモグロビンならびに血漿蛋白質の除去が必要となる。これは、短時間の洗浄ステップの使用により、例えば、水中に血液を懸濁させ、次いで遠心分離し、上澄液を廃棄してからNaOHによるペレットの抽出により達成されている（例えば、Biotechniques、第25巻、第4号（1998年）588頁を参照）。細胞を溶解するために大容量の水が用いられるため、この方法は、標準的なマイクロ流体装置における使用によって不適切となる。

20

【0005】

米国特許第5,010,183号明細書（ケログ（Kellogg）ら）は、血液からのDNA抽出のためにアルカリ性溶解を用いる遠心分離マイクロ流体ベースのプラットフォームを記載している。この方法は、生サンプル（例えば、5マイクロリットル（ μL ）の全血または大腸菌（E. coli）懸濁液）を、5 μL の10ミリモル（mM）NaOHと混合すること、95 $^{\circ}\text{C}$ で1~2分間加熱して細胞を溶解すること、DNAを放出させて、PCRを抑制する蛋白質類を変性させること、5 μL の16mM トリス-HCl（pH 7.5）と混合することにより溶解産物を中和すること、該中和溶解産物と、8~10 μL の液体PCR試薬およびプライマー類とを混合すること、次いで熱サイクリングを含む。あいにく、試薬容量が少なく、マイクロ流体装置に適してはいるが、マイクロ流体装置におけるDNAの下流処理が困難である。

30

【0006】

別の従来の方法では、フェノールクロロホルム抽出が用いられる。しかしながら、これは、毒性で腐食性の試薬の使用を必要とし、自動化するのは容易ではない。

【0007】

固相抽出は、核酸単離にも用いられている。例えば、核酸源から核酸を単離する一方法は、シリカ粒子の懸濁液と、反応容器内でグアニジニウムチオシアネートなどの緩衝力オトロピック剤との混合、次いでサンプルの添加を含む。カオトロプの存在下、核酸類をシリカ上に吸着させ、遠心分離により液相から分離し、アルコール水混液で洗浄し、最後に希釈水性緩衝液を用いて溶出する。シリカ固相抽出は、核酸を溶出することなく残留カオトロプを除去するためにはアルコール洗浄ステップの使用を必要とするが；引き続くステップにおける核酸を増幅、または修飾するために用いられる感応性酵素の阻害を防止するために、微量アルコールの全てを除去する（加熱蒸発または別の極めて揮発性で可燃性の溶媒を用いる洗浄によって）ために大いに注意を払わなければならない。次に核酸を、水または溶出緩衝液で溶出する。この結合、すすぎ、および溶出操作は、Qiagen（バレンシア、カリフォルニア州）などの多くの市販キットの基本である；しかしながら、この操作は極めてやかかいで、複数の洗浄ステップを含むため、マイクロ流体設定への

40

50

適合が困難である。

【0008】

イオン交換法により、高品質の核酸類が製造される。しかしながら、イオン交換法によって、該核酸類をさらに利用し得る前に典型的に除去しなければならない高濃度の塩類が存在することとなる。

【0009】

国際公開第01/37291A1号パンフレット(マグナピュア(MagNA Pure))は、磁気ガラス粒子の使用、およびサンプルを、カオトロピック塩およびプロテイナーゼKを含有する特定の緩衝液とインキュベートすることにより溶解する単離方法を記載している。ガラス磁気粒子を添加し、サンプル中に含まれた全核酸類を、それらの表面に結合させる。未結合物質は、幾つかの洗浄ステップにより除去される。最後に純粋な全核酸を、高温で低塩緩衝液により溶出する。

10

【0010】

さらに別の従来法は、生物学的サンプルを疎水性有機ポリマー固相に適用して、選択的に核酸を捕捉し、引き続き非イオン性界面活性剤により捕捉された核酸を取り出すことを含む。別の方法は、疎水性有機ポリマーを非イオン性界面活性剤により処理し、表面を洗浄し、引き続き処理された固相ポリマー材料を生物学的サンプルと接触させて、有機ポリマー固相に結合する核酸量を減少させることを含む。これらの固相法は、生物学的サンプルから核酸を単離する目的の有効な方法であるが、他の方法、特にマイクロ流体装置の使用に適した方法が必要とされている。

20

【0011】

先行刊行物および他の先行知識を検討したが、このような材料が、公表され、公知であり、通常の一般的知識の一部であったということは認めているわけではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、核酸類を単離する方法、好ましくは精製および回収する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明により単離された核酸類は、例えば、サンプル中に特定される核酸の存在の検出に関するアッセイにおいて有用となる。このようなアッセイは、疾患の予測および診断、法医学、疫学、および公衆衛生学において重要である。例えば、単離されたDNAを、ハイブリダイゼーションおよび/または増幅に供して、個体における感染性ウイルスまたは突然変異遺伝子の存在を検出でき、該個体が、感染源または遺伝子源の疾患を患う確率の判定を可能にする。スクリーンされる数百または数千のサンプルの中で一サンプルにおける感染性ウイルスまたは突然変異遺伝子を検出する能力は、疾患の危険状態にある集団の早期検出または疫学、例えば、HIV感染、癌または癌に対する感受性の早期検出において、または新生児疾患のスクリーニングにおいて、実質的に重要なものであり、早期検出は診断および治療に役立ち得る。さらに、本発明の方法は、培養細胞または生化学的反応物から核酸を単離するための、基礎研究の実験室においても使用できる。核酸は、制限酵素消化などの酵素修飾、配列決定、および増幅に使用できる。

30

40

【0014】

本発明は、核含有細胞(例えば、白血球細胞)中に含まれていても、含まれていなくてもよい核酸(例えば、DNA、RNA、PNA)を含むサンプルから核酸を単離する方法およびキットを提供する。これらの方法は、増幅反応(例えば、PCR反応に使用される)を阻害し得ることにより望ましくないヘムおよびその分解産物(例えば、鉄イオン類またはそれらの塩類)などの阻害物質から核酸を最終的に分離することを含む。

【0015】

一実施形態において、本発明は、サンプルから核酸を単離する方法を提供するものであり、該方法は、装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび固相材料を含む分離用チ

50

チャンバを含むマイクロ流体装置を提供すること；核酸含有材料と阻害物質を含むサンプルを提供すること；該装填用チャンバに該サンプルを導入すること；該バルブ付処理用チャンバに該サンプルを移すこと；該バルブ付処理用チャンバ内に該サンプルの濃縮領域を形成すること、ここで、サンプルの濃縮領域は、大部分の核酸含有材料を含み、濃縮度の低い領域は、阻害物質の少なくとも一部を含み；該サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、該サンプルの濃縮度の低い領域から濃縮領域を実質的に分離するために、バルブ付処理用チャンバ内の第1のバルブを作動させ、それによって該サンプルから阻害物質の少なくとも一部を除去すること；該サンプルの分離された濃縮領域を該混合用チャンバに移すために、該バルブ付処理用チャンバ内の第2のバルブを作動させること；該サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液で任意に希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域を任意にさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を任意に分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで該阻害物質の濃度を減少させること；存在する場合、（任意の加熱により）核酸含有材料を任意に溶解して、核酸を放出させること；および放出された核酸を含む該サンプルのpHを任意に調整すること、を含む。

10

20

30

40

50

【0016】

一実施形態において、本発明は、サンプルから核酸を単離する方法を提供するものであり、該方法は、装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび固相材料を含む分離用チャンバを含むマイクロ流体装置を提供すること；核酸含有材料、阻害物質含有細胞、任意に細胞外阻害物質（このような核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、同じものであってもよいし、異なってもよい）を含むサンプルを提供すること；該装填用チャンバに該サンプルを導入すること；細胞膜を破壊し、阻害物質を放出し、核酸含有材料と阻害物質とを含む溶解サンプルを形成するのに有効な条件下で、該サンプルを第1の溶解試薬と接触させること；該バルブ付処理用チャンバに該溶解サンプルを移すこと；該バルブ付処理用チャンバ内に該サンプルの濃縮領域を形成すること、ここで、該溶解サンプルの濃縮領域は、大部分の核酸含有材料を含み、濃縮度の低い領域は、阻害物質の少なくとも一部を含み；該サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、該溶解サンプルの濃縮度の低い領域から濃縮領域を実質的に分離するために、バルブ付処理用チャンバ内の第1のバルブを作動させ、それによって該溶解サンプルから阻害物質の少なくとも一部を除去すること；該溶解サンプルの分離された濃縮領域を該混合用チャンバに移すために該バルブ付処理用チャンバ内の第2のバルブを作動させること；該溶解サンプルの分離された濃縮領域を水（好ましくは、RNAseのない滅菌水）または緩衝液で希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域をさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで該阻害物質の濃度を減少させること；該核酸含有材料をさらに溶解して、（蛋白質を変性させるために任意の加熱により）核酸を放出させること；および放出された核酸を含む該サンプルのpHを任意に調整すること（およびPCRなどの増幅を任意に実施すること）、を含む。

【0017】

別の実施形態において、本発明は、サンプルから核酸を単離する方法を提供するものであり、該方法は、装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび固相材料を含む分離用チャンバを含むマイクロ流体装置を提供すること；核酸含有材料、阻害物質含有細胞、任意に細胞外阻害物質（このような核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、同じものであってもよいし、異なってもよい）を含むサンプルを提供すること；該装填用チャンバに該サンプルを導入すること；細胞膜を破壊し、阻害物質を放出し、核酸含有材料と阻害物質とを含む溶解サンプルを形成するのに有効な条件下で、該サンプルを第1の溶解試薬と接触させること；該バルブ付処理用チャンバに該溶解サンプルを移すこと；該バルブ付処理用チャンバ内に該サンプルの濃縮領域を形成することであって、該溶解サンプルの濃縮領域は、大部分の核酸含有材料を含み、濃縮度の低い領域は、阻害物質の少なくとも一部を含むこと；該サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、該溶解サン

ルの濃縮度の低い領域から濃縮領域を実質的に分離するためにバルブ付処理用チャンバ内の第1のバルブを作動させ、それによって該溶解サンプルから阻害物質の少なくとも一部を除去すること；該溶解サンプルの分離された濃縮領域を該混合用チャンバに移すために該バルブ付処理用チャンバ内の第2のバルブを作動させること；該溶解サンプルの分離された濃縮領域を水（好ましくは、RNAseのない滅菌水）または緩衝液で希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域をさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで該阻害物質の濃度を減少させること；強塩基と加熱により該核酸含有材料をさらに溶解して、核酸を放出させること；および放出された核酸を含む該サンプルのpHを調整すること、を含む。

10

【0018】

本発明は、本発明の種々の方法を実施するためのキットもまた提供する。

【0019】

定義

「核酸」は、当業界に公知の意味を有し、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA、またはプラスミドDNA）、RNA（例えば、mRNA、tRNA、またはrRNA）、およびPNAを称す。核酸は、限定はしないが、二本鎖または一本鎖構造、環状形態、プラスミド類、比較的短いオリゴヌクレオチド類、PNA類とも呼ばれるペプチド核酸類（ニールセン（Nielsen）など、Chem. Soc. Rev.、26、73-78頁（1997年））など、多種多様の形態であり得る。核酸は、全染色体または染色体の一部を含むことができるゲノムDNAであり得る。DNAとしては、コード化（例えば、mRNA、tRNA、および/またはrRNAのコード化に関して）および/または非コード化配列（例えば、セントロメア類、テロマー類、遺伝子間領域、イントロン類、トランスポゾン類、および/またはマイクロサテライト配列）を挙げることができる。核酸としては、任意の天然ヌクレオチド類ならびに人工または化学修飾のヌクレオチド類、突然変異ヌクレオチド類などを挙げることができる。核酸には、非核酸成分、例えば、ペプチド類（PNA類におけるものとして）、標識（放射性同位元素または蛍光マーカークラス）などを挙げることができる。

20

【0020】

「核酸含有材料」とは、細胞（例えば、白血球細胞、除核赤血球細胞）、核、またはウイルス、あるいは核酸を含む構造（例えば、プラスミド、コスミド、またはウィロイド、原始細菌）などの核酸源を称す。細胞は、原核生物（例えば、グラム陽性またはグラム陰性細菌）または真核細胞（例えば、血液細胞または組織細胞）であり得る。核酸含有材料がウイルスである場合、それは、RNAまたはDNAゲノムを含み得；毒性、弱毒性、または非感染性であり得；原核細胞または真核細胞を感染させることができる。核酸含有材料は、天然、人工修飾、または人工創製したものであり得る。

30

【0021】

「単離された」とは、サンプル中の阻害物質の一部（例えば、少なくとも一種類の阻害物質の少なくとも一部）から分離された核酸（または核酸含有材料）を称す。これには、他の材料、例えば、蛋白質類、脂質類、塩類、および他の阻害剤などの細胞成分から所望の核酸を分離することが含まれる。単離された核酸は、実質的に純粋であることがより好ましい。「実質的に純粋である」とは、元のサンプルから少なくとも20%まで、好ましくは少なくとも80%まで、より好ましくは少なくとも99%まで阻害物質を減じる一方、1マイクロリットル当たり少なくとも3ピコグラム（pg/μL）、好ましくは2ナノグラム/マイクロリットル（ng/μL）、より好ましくは少なくとも15ng/μLの核酸を単離することを称す。不純物は、典型的に細胞成分ならびにヘムおよび関連産物（ヘミン、ヘマチン）などの核成分、および金属イオン類、蛋白質類、脂質類、塩類など、サンプル中の溶媒以外の他の成分である。したがって、用語の「実質的に純粋である」とは、単離された核酸の引き続く使用を妨害し得る化合物が、少なくとも部分的に除去されるように、サンプルから大部分の阻害物質（例えば、ヘムおよびその分解産物）を分離す

40

50

ることを一般に称す。

【0022】

「に付着する」または「付着」または「結合」とは、ファンデルワールス相互作用、静電的相互作用、アフィニティー結合、または物理的捕捉などの弱い力など、多種多様の機構を介して任意の固相材料に対する阻害物質の可逆的保持を称す。この用語の使用には作用機序は関係せず、吸着機構および吸収機構を含む。

【0023】

(本発明の方法におけるマイクロ流体装置内に任意に含むことができる)「固相材料」とは、無機および/または有機材料、好ましくは、同じものであってもよいし、異なってもよい繰り返し単位、天然起源および/または合成起源の有機および/または無機化合物から作製されたポリマーを称す。これには、ホモポリマー類およびヘテロポリマー類(例えば、ランダムであっても、ブロックであってもよく、例えば、コポリマー類、ターポリマー類、テトラポリマー類など)が挙げられる。この用語は、このような材料は、一般に多孔性マトリックスを形成するが、ある一定の実施形態では、固相はまた、ポリマー材料の非多孔性シートなどの固体表面を称す。

10

【0024】

任意の固相材料としては、捕捉部位を挙げるができる。「捕捉部位」とは、材料が付着する固相材料上の部位を称す。一般に、捕捉部位としては、固相材料に共有結合または別の結合(例えば、疎水的結合)している官能基または分子が挙げられる。

【0025】

語句の「固相材料上を被覆しているコーティング試薬」とは、固相材料の少なくとも一部、例えば、フィブリルマトリックスおよび/または吸着性粒子上を被覆している材料を称す。

20

【0026】

「界面活性剤」とは、溶解される媒体の表面張力または界面張力を低下させる物質を称す。

【0027】

「強塩基」とは、水中で完全に解離されている塩基、例えばNaOHを称す。

【0028】

「高分子電解質」とは、一般的には比較的高分子量の荷電ポリマー、例えば、ポリスチレンスルホン酸を称す。

30

【0029】

「選択的透過性ポリマーバリアー」とは、サイズおよび荷電に基づいて流体の選択的輸送を可能にするポリマーバリアーを称す。

【0030】

「濃縮領域」とは、ペレット形態であり得、濃縮度の低い領域に比して核酸含有材料、核、および/または核酸のより高い濃度を有するサンプルの領域を称す。

【0031】

本明細書、特にサンプルの濃縮度の低い領域からサンプルの濃縮領域を分離する文脈で用いられる「実質的分離」とは、サンプルの全容量の25%未満において、核酸の全量(核内、または他の核酸含有材料内で遊離状態であろうとなかろうと)の少なくとも40%を除去することを意味する。好ましくは、サンプルの全容量の10%未満において、核酸の全量の少なくとも75%が、サンプルの残部から分離される。より好ましくは、サンプルの全容量の5%未満において、核酸の全量の少なくとも95%が、サンプルの残部から分離される。

40

【0032】

「阻害物質」とは、例えば、増幅反応に用いられる酵素の阻害物質を称す。このような阻害物質の例としては、一般的に鉄イオン類またはそれらの塩類(例えば、Fe²⁺またはその塩類)および他の金属塩類(例えば、アルカリ金属イオン類、遷移金属イオン類)が挙げられる。他の阻害物質としては、蛋白質類、ペプチド類、脂質類、炭水化物類、ヘム

50

およびその分解産物、尿素、胆汁酸、フミン酸、多糖類、細胞膜、および細胞基質成分を挙げることができる。PCRに関してヒト血液の主要阻害物質は、それぞれ赤血球、白血球、および血漿に存在するヘモグロビン、ラクトフェリン、およびIgGである。本発明の方法では、核酸含有材料から阻害物質の少なくとも一部（すなわち、少なくとも1種の阻害物質の少なくとも一部）が分離される。本明細書に考察されたように、阻害物質を含有する細胞は、核または他の核酸含有材料を含有する細胞と同じものであり得る。阻害物質は、細胞内に含まれ得るか、または細胞外にあり得る。細胞外阻害物質としては、例えば、血清またはウイルスに存在するこれらの阻害物質を含む、細胞内に含有されない全ての阻害物質が挙げられる。

【0033】

「阻害物質の少なくとも一部を前記固相材料に優先的に付着する」とは、一般的には、核酸含有材料および/または核の実質的な部分を前記固相材料に付着させることなく、1種以上の阻害物質が核酸含有材料（例えば、核）および/または核酸よりも高い程度で前記任意の固相材料に付着することを意味する。

【0034】

「マイクロ流体」とは、1つ以上の流体流路、チャンバ、または少なくとも1つの内部横断面寸法、例えば、深さ、幅、長さ、500 μ m未満、一般的には0.1 μ mと500 μ mとの間にある直径などを有する導管を備えた装置を称す。本発明に用いられる装置において、マイクロスケールチャンネルまたはチャンバは、好ましくは0.1 μ mと200 μ mとの間、より好ましくは0.1 μ mと100 μ mとの間、しばしば1 μ mと20 μ mとの間にある少なくとも1つの横断面寸法を有する。一般的には、マイクロ流体装置は、複数のチャンバ類（処理用チャンバ、分離用チャンバ、混合用チャンバ、廃棄用チャンバ、希釈剤用チャンバ、増幅反応用チャンバ、装填用チャンバなど）を含み、各々のチャンバは、サンプルを含有する容量を規定しており；少なくとも1つの分配チャンネルは複数の配列チャンバに接続し；配列内のチャンバのうちの少なくとも1つが、溶解試薬を含むことができる（そのことからしばしば混合チャンバと称される）。

【0035】

用語の「含んでなる」およびその変形用語は、これらの用語が説明および特許請求の範囲に現れる場合、限定的意味を有するものではない。

【0036】

本明細書に用いられる「1つの」、「該」、「少なくとも1つ」、および「1つ以上」は、交換可能に用いられ、1つ以上を意味する。

【0037】

また本明細書において、終点による数値範囲の列挙は、その範囲内に包含された全ての数を含む（例えば、1から5までは、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む）。

【0038】

本発明の上記の概要は、本発明の開示された各々の実施形態または本発明の各実施を説明することを意図していない。以下の説明は、より具体的に例証となる実施形態を例示している。本出願を通して幾つかの箇所において、実施例のリストを通して手引きが提供され、それらの実施例は種々の組合せで使用できる。各々の場合、列挙されたリストは、代表的な群としてのみ役立つものであって、排他的なリストとして解釈すべきでない。さらにたとえ具体的に記載されていなくても、各実施形態の種々の要素が、他の実施形態に利用できる種々の実施形態が記載されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

本発明は、種々の方法を提供し、サンプル、一般的には生物学的サンプル、好ましくは実質的には純粋な形態で核酸を単離するキットを提供する。本発明は、核含有細胞（例えば、白血球細胞）内に含んでいても、含んでいなくてもよい核酸（例えば、DNA、RNA、PNA）を含むサンプルから核酸を単離する方法およびキットを提供する。

10

20

30

40

50

【0040】

該方法は、サンプルから核酸を単離することに関するが、該方法は、核酸含有材料（例えば、核）から必ずしも核酸を除去するものではないことを理解すべきである。すなわち、核から核酸をさらに分離するために、例えばさらなるステップを必要とし得る。

【0041】

本発明の方法は、阻害物質が増幅反応（例えば、PCR反応に用いられる）を阻害する恐れがあることから、望ましくないヘムおよびその分解産物（例えば、鉄イオン類）などの阻害産物から核酸を最終的に分離することを含む。より具体的には、本発明の方法は、少なくとも1種の阻害物質の少なくとも1部からサンプルにおける、核酸の少なくとも一部を分離することを含む。好ましい方法は、核酸が実質的に純粋であるように、核酸含有サンプル中の全ての阻害物質を実質的に除去することを含む。例えば、鉄含有阻害物質の最終濃度は、従来のPCRシステムにおいて認められる当座の濃度である約0.8マイクロモル(μM)以下である。

10

【0042】

全血から純粋なDNAを得るために、ヘモグロビンならびに血漿蛋白質の除去が、一般的に望ましい。赤血球が溶解すると、Taqポリメラーゼを阻害するヘムおよび関連化合物を放出する。全血中の通常のヘモグロビン濃度は、溶血した全血中のヘムの濃度が約10ミリモル(mM)を基準にして、100ミリリットル(mL)当り15グラム(g)である。PCRが満足できる働きを示すために、ヘムの濃度は、マイクロモル(μM)レベルに減じるべきである。これは、例えば、希釈または阻害物質に結合する材料を用いた阻害物質の除去によって達成できる。

20

【0043】

典型的に、核酸含有サンプルは、流動受け器内で処理されるが、この受け器は、本発明の必要な要件ではない。本発明のある一定の方法では、処理装置はマイクロ流体様式であることが好ましい。

【0044】

サンプル

本発明の方法は、多種多様のサンプル、体液（例えば、全血、血清、尿、唾液、脳脊髄液、精液、または関節リンパ液）、種々の組織（例えば、皮膚、毛髪、毛皮、大便、腫瘍、あるいは肝臓または脾臓などの臓器）、細胞培養物または細胞培養上澄液などの生物学的サンプルから核酸を単離するために使用できる。該サンプルは、食物サンプル、飲料サンプル、発酵ブロス、診断、治療、モニター、または疾患または障害を治療するために用いられる臨床サンプル、法医学サンプル、農学サンプル（例えば、植物または動物からの）、または環境サンプル（例えば、土壌、汚物または生ごみ）であり得る。

30

【0045】

生物学的サンプルは、生物学的または生化学的起源のものである。本発明の方法を使用するために好適なものは、哺乳動物源、植物源、細菌源、または酵母源から由来し得る。生物学的サンプルは、単一細胞の形態、または組織の形態であり得る。細胞または組織は、インビトロ培養物に由来し得る。意義深いことには、本発明のある実施形態では、対象のサンプルとしていずれの前処理（例えば、溶解、ろ過など）もなく全血を使用する。

40

【0046】

ある実施形態では、全血などのサンプルは、遠心分離により前処理して白血球細胞（すなわち、白血球層）を血液から分離し、本発明の方法にサンプルとして使用できる。

【0047】

ある一定実施形態では、サンプルを、本発明の処理に供する前（すなわち、該サンプルをマイクロ流体装置に添加する前）にサンプルを濃縮するために超遠心分離に供することができる。これは、ウィルス含有サンプルに特に望ましい。

【0048】

該サンプルは、水または有機媒体に溶解または分散させる固体サンプル（例えば、固体組織）であり得、それから核酸を、水または有機媒体に抽出している。例えば、該サン

50

ルは、臓器ホモジネート（例えば、肝臓、脾臓）であり得る。したがって、該サンプル（特に固体サンプルである場合）は、予め抽出された核酸を含むことができる。

【0049】

この種のサンプルは、本発明を限定するものではない。しかしながら、該サンプルは、一般に核酸含有材料および阻害物質を含み、それらから核酸を分離する必要がある。この文脈において、核酸含有材料は、細胞（例えば、白血球細胞、細菌細胞）、核、ウィルス、または核酸を含む構造を収容する任意の他の組成物（例えば、プラスミド、コスミド、またはウィロイド、原始細菌）を言う。このような方法のある好ましい実施形態において、核酸含有材料は、核を含む。ある一定の実施形態において、このような核は、非損傷状態である（すなわち、実質的に溶解されない）。

10

【0050】

ある一定の実施形態において、該サンプルは、部分的に溶解され（例えば、阻害物質を放出させるために予め溶解する）、その場合、溶解は、本発明の処理において必要とされ得る。ある一定の実施形態において、該サンプルは完全に溶解でき、その場合、溶解試薬は、本発明の処理において必ずしも必要としない。したがって、サンプルは、遊離（例えば、細胞内にはない）核酸と遊離（例えば、細胞内にはない）阻害物質とを含むことができる。

【0051】

単離された（すなわち、阻害物質から分離された）核酸は、多種多様の適用のために（例えば、増幅、配列決定、標識化、アニーリング、制限消化、連結、逆転写酵素、ハイブリダイゼーション、サザンプロット、ノーザンプロットなど）、好ましくはさらなる精製または洗浄せずに使用できる。特に、それは、対象のゲノムを決定するために使用できる。それは、サンプル中の微生物（例えば、細菌、ウィルス）の存在診断のために使用でき、引き続きサンプル源に対し、微生物により引き起こされた損傷のモニタリングおよび/または治療のために使用できる。本発明の方法、材料、システム、およびキットは、ハイスループットまたは自動化法、特にマイクロ流体システムに用いられる増幅法（例えば、PCR、LCR、MASBA、SDA、およびbDNA）に使用するための核酸抽出の調製に特によく適合する。したがって、本発明のある一定の実施形態では、単離された核酸は、増幅反応チャンバ（マイクロ流体装置内のPCRサンプルチャンバなど）に移される。

20

30

【0052】

核酸類は、不純サンプル、部分的純粋サンプル、または純粋サンプルから本発明に従って単離（すなわち、阻害物質から分離）できる。核酸は、極めて不純なサンプルからも単離できるので、元のサンプルの純度は重要ではない。例えば、核酸は、血液、唾液、または組織などの生物学的体液の不純サンプルから得ることができる。より高い純度の元のサンプルが望ましい場合、該サンプルは、本発明の方法が供される前に、当業者に公知の任意の従来手段に従って処理できる。例えば、該サンプルを本発明の方法に供する前に、不溶性材料などのある一定の不純物を除去するために該サンプルを処理できる。

【0053】

本明細書に記載されたように単離された核酸は、一本鎖形態、二本鎖形態、円形、プラスミドなどで任意の分子量であり得る。種々のタイプの核酸は、互いに（例えば、DNAからRNA、二本鎖DNAから一本鎖DNA）分離できる。例えば、小型のオリゴヌクレオチド類または長さが約10塩基から約50塩基の核酸分子、長さが約1000塩基から約10,000塩基の大いにより長い分子、約50kbから約500kbの高分子量核酸でさえも、本発明の方法を用いて単離できる。幾つかの態様において、本発明により単離された核酸は、約10塩基から約100キロベースの範囲にあり得ることが好ましい。

40

【0054】

核酸含有サンプルは、多種多様の容量であり得る。例えば、マイクロ流体様式について、一般的に極めて少量、例えば、10 μ L（好ましくは100 μ L以下）が好ましい。より大量のサンプルは、前処理される場合、濃縮などによって使用できることを理解すべき

50

である。

【0055】

低コピー数の遺伝子では、関心対象の配列がサンプルに存在することを確認するために、より大きなサンプルサイズが一般に必要となる。しかしながら、より大きなサンプルサイズは、より大きな阻害物質を有し、一般にそれらは、マイクロ流体様式に適さない。したがって、低コピー数の状況では、再現性のある結果を得るためには100 μ L以上の容量を使用する必要があると思われる；マイクロ流体装置1台当りで処理されるサンプル数は、より高いサンプル容量のために減じてよい。

【0056】

本発明の方法において、核酸含有材料を濃縮する遠心分離ステップは、低コピー数のサンプルにとって有用である。しかしながら、核酸濃度は、処理用チャンバの底部において実質的に増加するが、例えば、依然として阻害物質の濃度は高い。大部分の阻害物質、すなわち血清中の蛋白質および破壊RBC類（例えば、ヘムおよびヘム関連産物）は、濃厚性の低い領域で除かれるが、サンプルの核酸含有濃縮領域は、依然として有意な量の阻害物質が存在する；しかし、核酸対阻害物質の比率が極めて高く、核酸に富むサンプルとなる。所望ならば、次にサンプルのこの濃縮領域を、本明細書に記載されたとおり固相材料と接触させて残留阻害物質を除去できる。

10

【0057】

高コピー数の遺伝子では、2 μ Lほどの少量サイズを使用できるが、再現性は、より大きな容量（例えば、20 μ L）がより良好である。より少量の場合、よりハイスループット（すなわち、マイクロ流体装置1台当りで処理されるサンプル数）を得ることができる。より大きな容量（例えば、20 μ L）の場合、核酸含有細胞の濃縮のための前スピンステップを通す必要はないと考えられる。

20

【0058】

固相材料が、本明細書に記載された濃縮/分離処理に加えて用いられるこれらの実施形態では、固相材料に適用された核酸含有サンプルは、任意の量であってもよく、その量は、固相材料の量によって決定される。固相材料に適用されたサンプル中の核酸量は、固相材料の乾燥重量未満であることが好ましく、一般に約1/10,000から約1/100（核酸/固相重量）までである。任意の固相材料に適用されたサンプル中の核酸量は、例えば、100グラムという大量または1ピコグラムほどの少量であり得る。

30

【0059】

本発明の方法から単離された所望の核酸は、元来適用されたサンプル中の全核酸量のうち、好ましくは少なくとも20%の量、より好ましくは少なくとも30%の量、より好ましくは少なくとも70%の量、最も好ましくは少なくとも90%の量である。したがって、本発明のある一定の好ましい方法は、サンプルから高回収の所望の核酸を提供する。さらに、極めて少量の核酸分子は、本発明により定量的に回収できる。回収または収率は、方法それ自体よりもサンプルの性質に主として依存する。本発明のある一定の実施形態は、大容量からの濃度を必要としない核酸調製を提供することから、本発明により、核酸損失の危険性が避けられる。

【0060】

PCRサンプルにおいて過多のDNAを有することは、誤ってプライムされた部位が多く存在するのでDNAの増幅に対して不利益となる恐れがある。これにより、多数の直線的または指数関数的に増幅された非標的配列が生じる。非標的DNA量が増加すると増幅の特異性が失われることから、対象の標的配列の指数関数的蓄積は、有意な程度まで生じない。したがって、各PCRサンプルに入っているDNA量をコントロールすることが望ましい。DNA量は、一般的に1マイクログラム/反応以下であり、また一般的に少なくとも1ピコグラム/反応である。PCR混合物中の典型的な最終DNA濃度は、0.15ナノグラム/マイクロリットルから1.5ナノグラム/マイクロリットルまでの範囲である。マイクロ流体装置の場合、各サンプルが適切なDNA量を有するように、サンプルをクリーンアップ後、PCR前に分割することができる。あるいは、適切な量のDNAが各

40

50

PCR混合物に存在するように、下記により詳細に説明されている可変性バルブ付処理用チャンバを含むサンプル処理装置（特にマイクロ流体装置）内で十分にサンプルを希釈することができる。診断設定において、白血球細胞量は、かなり変わり得ることから、単離されるDNA量を経験的に予測することは困難である。しかしながら、有用な範囲は、血液200 μ L当り3マイクログラム（ μ g）から12 μ gのDNAである。白血球層については、白血球層200 μ L当り25 μ gから50 μ gが有用な範囲である。

【0061】

溶解試薬および条件

本発明のある一定の実施形態では、処理中のある時点で、サンプル内の細胞、特に核酸含有細胞（例えば、白血球細胞、細菌細胞、ウイルス細胞）を溶解し、細胞の内容物を放出させてサンプル（すなわち、溶解物）を形成する。ここでの細胞溶解は、外細胞膜と称される細胞膜、および存在する場合は、角膜の物理的破壊である。これは、プロテイナーゼによる加水分解、次いでプロテイナーゼの加熱不活化、界面活性剤（例えば、非イオン界面活性剤またはドデシル硫酸ナトリウム）、グアニジニウム塩類、または強塩基類（例えば、NaOH）による処理、物理的破壊（例えば、超音波による）、煮沸、または凍結/解凍過程を含み得る、加熱/冷却（例えば、少なくとも55（一般的に95）までの加熱および室温以下（一般的には8）までの冷却）などの標準的方法を用いて行うことができる。溶解試薬が用いられる場合、所望ならば有機溶媒を使用できるが、一般的には水性媒体中である。

10

【0062】

全血中の白血球細胞（WBC）類を破壊しないで赤血球（RBC）類の溶解を起こし、溶解剤（すなわち、溶解試薬）として水の使用（すなわち、水希釈）により阻害物質を放出することができる。あるいは、塩化アンモニウムまたは第四級アンモニウム塩類もまた、RBC類を破壊するために使用することができる。RBC類は、低張緩衝液の使用により低張ショックにより溶解することもできる。非損傷（例えば、未破壊）WBC類またはそれらの核は、例えば遠心分離により回収できる。

20

【0063】

一般に、RBC類ならびに核酸含有細胞（例えば、白血球細胞（WBC）類、細菌細胞、ウイルス細胞）を溶解するために界面活性剤などのより強力な溶解試薬を用いて、阻害物質、核および/または核酸を放出することができる。例えば、非イオン界面活性剤は、核を非損傷状態のままRBC類ならびにWBC類を溶解するために使用できる。非イオン界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、両性イオン界面活性剤を、細胞を溶解するために使用できる。非イオン界面活性剤は特に有用である。所望ならば、界面活性剤の組合せを使用できる。トリトン（TRITON）X-100などの非イオン界面活性剤を、核の単離のためにショ糖およびマグネシウム塩類を含有するトリス緩衝液に添加できる。

30

【0064】

溶解に用いられる界面活性剤の量は、例えば、サンプルを有効に溶解するほど十分に多く、さらに沈殿を避けるほど十分に少ない。溶解操作に用いられる界面活性剤の濃度は一般に、サンプルの全量を基準にして少なくとも0.1重量%である。溶解方法に用いられる界面活性剤の濃度は一般に、サンプルの全量を基準にして少なくとも4.0重量%以下であり、好ましくは1.0重量%である。できるだけ最短時間で完全細胞溶解を得、生じた混合物をPCRに適合性であるようにこの濃度を通常最適化する。実際、PCRカクテルに添加された製剤中の核酸は、リアルタイムのPCRの阻害が殆どないか、または全くないことを可能にするべきである。

40

【0065】

所望ならば、緩衝液を界面活性剤と混合して使用することができる。一般的には、このような緩衝液は、少なくとも7、典型的には9以下のpHのサンプルを提供する。

【0066】

一般に、核酸含有細胞（白血球細胞における）に含まれる核を溶解するために強塩基な

50

どのさらに強力な溶解試薬を使用して核酸を放出させる。例えば、米国特許第5,620,852号明細書(リン(Lin)ら)に記載されている方法は、1分間の短い時間枠内の室温で、アルカリ処理(例えば、NaOH)による全血からのDNA抽出を含んでおり、本発明のある一定の方法に適合させることができる。一般に、多種多様の強塩基は、アルカリ性細胞溶解方法における有効なpH(例えば、8~13、好ましくは13)を作出するために使用できる。強塩基は、一般にNaOH、LiOH、KOHなどの水酸化物；第四級窒素含有カチオン類との水酸化物(例えば、第四級アンモニウム)ならびに第三級、第二級または第一級アミン類である。一般に強塩基の濃度は、少なくとも0.01規定(N)、一般に1N以下である。次いで一般に、特に核酸がPCRに供される場合、混合物を中和できる。別の方法において、さらに蛋白質を変性させるために塩基との溶解後に加熱を用い、次いでサンプルを中和できる。 10

【0067】

また、加熱によるプロテイナーゼKに次いで、核またはWBCから核酸類単離のために、より高い温度でプロテイナーゼKの加熱不活化を用いることができる。

【0068】

また、マイクロ流体装置用にスケールダウンされたSigmaのExtract-N-Amp Blood PCRキットなどの市販の溶解剤および中和剤を使用できる。ブドウ球菌(Staphylococcus)、連鎖球菌(Streptococcus)などの種々の細菌を溶解するためにGenPoint(オスロ、ノルウェー国)からのPOWERLYSEなどのより強力な溶解溶液を、本発明のある一定の方法を利用するために使用できる。 20

【0069】

別の方法において、煮沸法は、細胞および核を溶解し、DNAを放出し、同時にヘモグロビンを沈殿させるために使用できる。上澄液中のDNAは、濃縮ステップなしでPCRに直接使用できるため、低コピー数のサンプルにとってこの方法は有用になる。

【0070】

別の方法において、加熱は、塩基による溶解に続いて使用でき、次いでサンプルを中和することによりさらに蛋白質類を変性させる。

【0071】

感染性疾患では、全血から細菌またはウイルス類を分析する必要があると考えられる。例えば、細菌の場合、白血球細胞は、細菌細胞と関連して存在し得る。マイクロ流体装置において、赤血球細胞を溶解して阻害物質を放出させてから、例えば、さらなる溶解前に遠心分離により細菌細胞および白血球細胞を分離することが可能になると考えられる。核酸含有細胞(細菌および白血球細胞/核)のこの濃厚スラッグを、阻害物質の除去のためにチャンバ内にさらに移動することができる。次に例えば、細菌細胞を溶解することができる。 30

【0072】

種類に依っては細菌細胞の溶解は、加熱を用いて達成できる。あるいは、細菌細胞溶解は、酵素法(例えば、リゾチーム、ミュータノリジン(mutanolysin))または化学法を用いて生じ得る。細菌細胞は、アルカリ性細胞溶解により溶解することが好ましい。 40

【0073】

プラスミド類の増殖のために細菌の使用は、ゲノム解析、分析的分子生物学、予備的分子生物学の研究に一般的である。プラスミドを含有する細菌の場合、細菌およびプラスミド双方からの遺伝子材料が存在する。細胞蛋白質およびゲノムDNAからの細胞断片を分離するためのクリーンアップ法を、本発明の方法を用いて実施できる。このようにして得られたプラスミドDNAを含む上澄液は、「クリアな溶解物」と呼ばれる。このクリアな溶解物を、アニオン交換クロマトグラフィ、ゲルろ過、またはアルコールによる沈殿などの種々の手段を用いてさらに精製できる。

【0074】

マイクロ流体装置に組み込むことのできる細菌培養に関するプロトコルの具体例において、大腸菌（*E. coli*）培養物を遠心分離し、TE緩衝液（10 mM トリス、1 mM EDTA、pH 7.5）に再懸濁し、0.1 M NaOH / 1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の添加により溶解した。細胞溶解は、1容量の3 M（3モル）酢酸カリウム（pH 4.8）の添加により中止し、上澄液を遠心分離する。細胞溶解物をさらに精製して純粋なプラスミドDNAを得る。

【0075】

血漿および血清は、ウイルス類を含む分子試験に供される標本の大部分となっている。全血の分画後、血漿または血清サンプルを、ウイルス類（すなわち、ウイルス粒子）の抽出のために使用できる。例えば、ウイルス類からDNAを単離するために、血液をスピニングすることにより最初に血清を分離することは可能である。下記により詳細に記載されている可変バルブの使用により、血清だけを、別のチャンバ内に空けることができる。次いで血清を遠心分離して、ウイルスを濃縮できるか、または本明細書に記載されているように、例えば、任意の固相材料を用いて障害物質の除去後、引き続き溶解ステップに血清を直接使用できる。該固相材料は、ウイルス粒子が該材料を通過しないように、溶液を吸収し得る。次にウイルス粒子は、少量の溶出液で溶出できる。ウイルスを、加熱または酵素的または化学的手段、例えば、界面活性剤の使用により溶解でき、PCRまたはリアルタイムPCRなどの下流適用に使用できる。ウイルスRNAを必要とする場合、RNAの分解を防ぐためにRNAse阻害剤を溶液に添加する必要があるとあり得る。

10

【0076】

任意の固相材料

本発明のある一定の実施形態について、障害物質は、好ましくは固相材料に付着した捕捉部位（例えば、キレート性官能基）、固相材料（すなわち、その少なくとも一部）上を被覆しているコーティング試薬（好ましくは、界面活性剤）、または双方により、任意の形態（例えば、粒子、フィブリル、膜）で固相マトリックスを含む固相（好ましくは、ポリマー）材料に付着することが判明している。該コーティング試薬は、カチオン性、アニオン性、非イオン、または両性イオン性界面活性剤であり得る。あるいは、該コーティング試薬は、高分子電解質または強塩基であり得る。所望ならば、コーティング試薬の種々の組合せを使用できる。

20

【0077】

本発明の方法に有用な固相材料は、例えば、ヘムおよびヘム分解産物、特に鉄イオン類などの障害物質を保持する多種多様の有機および/または無機材料を含むことができる。このような材料は、捕捉部位（好ましくは、キレート基）で機能化されるか、1つ以上のコーティング試薬（例えば、界面活性剤、高分子電解質、または強塩基類）で被覆されるか、または双方である。一般に、固相材料は、有機ポリマーマトリックスを含む。

30

【0078】

一般に好適な材料は、化学的に不活性であり、物理化学的に安定であり、種々の生物学的サンプルに適合する。固相材料の例としては、シリカ、ジルコニア、アルミナビーズ、金などの金属コロイド、例えば、捕捉部位を生成するためにメルカプト化学を介して機能化された金被覆シートが挙げられる。好適なポリマー類の例としては、例えば、ポリオレフィン類およびフッ素化ポリマー類が挙げられる。固相材料は、一般に洗浄して使用前に塩類および他の不純物を除去する。それは、ドライ貯蔵できるか、または即時使用のために水性懸濁液で貯蔵できる。固相材料は、例えば、ピペット、シリンジ、またはより大きなカラム、マイクロタイプレート、またはマイクロ流体装置など、流動受け器内で使用されることが好ましいが、このような受け器を含まない懸濁方法もまた使用し得る。

40

【0079】

本発明の方法に有用な固相材料は、多種多様の形態における多種多様の材料を含むことができる。例えば、それは、緩いか、または固定された粒子またはビーズ、繊維、フォーム、フリット、微孔質フィルム、膜、またはマイクロ反復表面（1つまたは複数）を有する基材の形態であり得る。固相材料が粒子を含む場合、良好な液体流動特性を確保するた

50

めに、粒子は、均一、球状で硬質であることが好ましい。

【0080】

本発明の流動適用では、このような材料は、一般に緩い多孔性ネットワークの形態であり、大型分子の均一で障害のない流入および流出を可能にし、広い表面積を提供する。このような適用では、固相材料は、例えば、1グラム当たり1平方メートル(m^2/g)以上など、比較的高い表面積を有することが好ましい。流動装置の使用を含まない適用では、固相材料は、多孔性マトリックスであってもよいし、そうでなくてもよい。したがって、膜は、本発明のある一定の方法においても有用となり得る。

【0081】

粒子またはビーズを用いる適用では、それらを、サンプルに導入するか、またはサンプルを粒子/ビーズ床に導入でき、例えば、遠心分離することによりそれらから除去できる。あるいは、粒子/ビーズを、不活性基材(例えば、ポリカーボネートまたはポリエチレン)上に被覆(例えば、模様塗り)でき、種々の方法(例えば、スプレー乾燥)により接着剤で任意に被覆できる。所望ならば、基材は、表面積を増加させ、クリーンアップを増強させるためにマイクロ反復することができる。また、それは、酸素プラズマ法、電子ビーム法または紫外線照射法、加熱法、またはコロナ放電処理法により前処理することができる。この基材は、例えば、マイクロ流体装置内のリザーバ上にカバーフィルムとして使用するか、またはカバーフィルムに積層させることができる。

10

【0082】

一実施形態において、固相材料は、フィブリルマトリックス内からませた粒子を有しても、または有さなくてもよいフィブリルマトリックスを含む。フィブリルマトリックスとしては、任意の多種多様の繊維を挙げることができる。一般に、繊維は水性環境に不溶性である。例としては、ガラス繊維、ポリオレフィン繊維、特にポリプロピレンおよびポリエチレンマイクロ繊維、アラミド繊維、フッ素化ポリマー、特にポリテトラフルオロエチレン繊維、および天然セルロース繊維が挙げられる。核酸の結合に対して活性であっても、不活性であってもよい繊維の混合物を使用できる。好ましくは、フィブリルマトリックスは、少なくとも約15ミクロン、1ミリメートル以下、より好ましくは、約500ミクロン以下の厚さであるウェブを形成する。

20

【0083】

粒子を使用する場合、粒子は一般に水性環境に不溶性である。粒子は、1種の材料または被覆された粒子におけるような材料の組合せから作製できる。粒子は、膨潤性であっても非膨潤性であってもよいが、水および有機液体中で非膨潤性であることが好ましい。粒子は付着を行う場合、非膨潤の疎水性材料から作製されることが好ましい。粒子は、核酸に対するアフィニティーに関して選択できる。幾つかの水膨潤性粒子の例は、米国特許第4,565,663号明細書(エレード(Errede)ら)、米国特許第4,460,642号明細書(エレード(Errede)ら)、および米国特許第4,373,519号明細書(エレード(Errede)ら)に記載されている。水に非膨潤性である粒子は、米国特許第4,810,381号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)、米国特許第4,906,378号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)、米国特許第4,971,736号明細書(ハーゲン(Hagen)ら);および米国特許第5,279,742号明細書(マーケル(Markell)ら)に記載されている。好ましい粒子は、ポリプロピレン粒子などのポリオレフィン粒子(例えば、粉末)である。核酸の結合に対して活性であっても、不活性であってもよい粒子の混合物を使用できる。

30

40

【0084】

被覆された粒子を用いる場合、コーティング試薬は、水性または有機体に不溶性の非膨潤性材料であることが好ましい。コーティング試薬は、核酸が付着するものであっても、なくてもよい。したがって、被覆されるベース粒子は、無機または有機であり得る。ベース粒子としては、有機基と共有結合するシリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニアなどの無機酸化物を挙げることができる。例えば、鎖長を変えた脂肪族基(C2、C4、C8、またはC18基)などの共有結合された有機基を使用できる。

50

【0085】

フィブリルマトリックスを含む好適な固相材料の例は、米国特許第5,279,742号明細書(マーケル(Markell)ら)、米国特許第4,906,378号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)、米国特許第4,153,661号明細書(リー(Ree)ら)、米国特許第5,071,610号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)、米国特許第5,147,539号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)、米国特許第5,207,915号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)、および米国特許第5,238,621号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)に記載されている。このような材料は、登録商標SDB-RPS(スチレン-ジビニルベンゼン逆相スルホネート、3Mパート番号2241)、カチオン-SR膜(3Mパート番号2251)、C-8膜(3Mパート番号2241)、およびアニオン-SR膜(3Mパート番号2252)で3M社(セントポール、ミネソタ州)から市販されている。

【0086】

ポリテトラフルオロエチレンマトリックス(PTFE)を含むものが特に好ましい。例えば、米国特許第4,810,381号明細書(ハーゲン(Hagen)ら)は、ポリテトラフルオロエチレンフィブリルマトリックス、および該マトリックスにからませた非膨潤性の収着性粒子を含む固相材料を開示しており、非膨潤性の収着性粒子対ポリテトラフルオロエチレンの比は、重量で19:1から4:1の範囲であり、さらに該複合固相材料は、1メートル当たり20から300ミリニュートンの範囲のネット表面エネルギーを有する。米国再発行特許発明第36,811号明細書(マーケル(Markell)ら)は、PTFEフィブリルマトリックス、該マトリックスにからませた収着性粒子を含む固相抽出媒体を開示しており、該粒子は、多孔性有機粒子の30重量パーセント以上100重量パーセントまでを含み、70重量パーセント未満から0重量パーセントの多孔性(有機体被覆または非被覆)無機粒子を含み、収着性粒子対PTFE比は、重量で40:1から1:4の範囲にある。

【0087】

特に好ましい固相材料は、ミネソタ州セントポール所在の3M社から登録商標EMPOREで入手できる。EMPOREテクノロジーの重要な基礎は、任意の収着性粒子を用いて粒子装填膜、またはディスクを創製する能力である。該粒子は、ポリテトラフルオロエチレンの不活性マトリックス(90重量%収着剤:10重量%PTFE)内で共に密接に保持されている。PTFEフィブリルは、いずれの方法においても粒子の活性を妨害しない。EMPORE膜製法によって、同一サイズの粒子で作製された伝統的な固相抽出(SPE)カラムまたはカートリッジで達成し得るものよりも高密度で、より均一な抽出媒体が生じる。

【0088】

他の好ましい実施形態において、固相(例えば、微孔性の熱可塑性ポリマー支持体)は、フィブリルによって接続された熱可塑性ポリマーの空隙性の無作為分散、非均一形状、等軸粒子の複合性を特徴とする微孔性構造を有する。粒子は互いに離れていて、それらの間に微細孔のネットワークを提供する。粒子は、各粒子から隣接粒子へと放射状にあるフィブリルにより互いに接続している。粒子またはフィブリルのいずれか、または双方が疎水性であり得る。このような好ましい材料の例としては、Hg表面積法により測定して、しばしば $40\text{ m}^2/\text{グラム}$ という高さの高い表面積を有し、約5ミクロンまでの粒径を有する。

【0089】

このタイプの繊維材料は、誘導相分離の使用を含む好ましい技法により作製できる。この方法は、均質混合物を形成するのに十分な温度で熱可塑性ポリマーと不混和性液体とを溶融混合すること、溶液から製品を所望の形状に形成すること、液体およびポリマーの相分離を誘導するために、形状品を冷却すること、およびポリマーを最終的に固化させ、液体の大部分を除いて微孔性ポリマーマトリックスを残すことを含む。この方法および好ましい材料は、米国特許第4,726,989号明細書(ムロジンスキイ(Mrozins

k i)、米国特許第 4, 957, 943 号明細書 (マクアリスト (McAllister) ら)、および米国特許第 4, 539, 256 号明細書 (シップマン (Shipman)) に詳細に開示されている。このような材料は、熱的誘導相分離膜 (TIPS 膜) と称され、特に好ましい。

【0090】

他の好適な固相材料としては、米国特許第 5, 328, 758 号明細書 (マーケル (Markell) ら) に記載されている不織布が挙げられる。この材料は、高収着効率クロマトグラフィグレード用粒子を含む圧縮または融合微粒子含有不織布ウェブ (好ましくは、ブローされたマイクロ繊維) を含む。

【0091】

他の好適な固相材料としては、例えば、米国特許公開第 2003/0011092 号明細書 (タン (Tan) ら) に記載されている HIPE フォームとして公知のものが挙げられる。「HIPE」または「高内部相乳剤」とは、連続反応相、一般的には油相、および油相、一般的には水相と不混合性の不連続相または共連続相を含む乳剤を意味し、該不混和性相は、少なくとも 74 容量パーセントの乳剤を含む。HIPE 類から作製された多くのポリマーフォームは、一般に比較的オープンセル化されている。これは、セルの大部分または全てが、隣接セルと妨害なく連絡していることを意味する。このようなオープンセル化されたフォーム構造内のセルは、一般にフォーム構造内で 1 つのセルから別のセルへの流体移動を可能にするほど十分に大きいセル間ウィンドウを有している。

【0092】

固相材料は、阻害物質のための捕捉部位を含むことができる。本明細書における「捕捉部位」とは、固相材料に共有結合している基 (例えば、官能基) または非共有結合 (例えば、疎水的) に結合している分子を称す。

【0093】

固相材料は、阻害物質を捕捉する官能基を含むことが好ましい。例えば、固相材料は、キレート基を含むことができる。この文脈において、「キレート基」は、多座であり、金属原子またはイオンとキレート化複合体を形成できるものである (阻害物質が、キレート化機構を介して固相材料上に保持されてもよく、または保持されていなくてもよい)。キレート基の組み込みは、種々の技法により達成できる。例えば、不織布材料は、キレート基で官能化されたビーズを保持できる。あるいは、不織布材料の繊維は、キレート基で

【0094】

キレート基の例としては、例えば、 $-(CH_2-C(O)OH)_2$ 、トリス (2-アミノエチル) アミン基、イミノジ酢酸基、ニトリロトリ酢酸基が挙げられる。キレート基は、種々の技法により固相材料に組み込むことができる。それらは、該材料を化学的に合成することにより組み込むことができる。あるいは、所望のキレート基を含有するポリマーは、不活性基材 (例えば、ポリカーボネートまたはポリエチレン) 上に被覆 (例えば、模様塗り) できる。所望ならば、基材は、表面積を増加させ、クリーンアップを高めるためにマイクロ反復できる。また、それは、酸素プラズマ法、電子ビーム法または紫外線照射法、加熱法、またはコロナ放電処理法により前処理することができる。この基材は、例えば、マイクロ流体装置内のリザーバ上にカバーフィルムとして使用するか、またはカバーフィルムに積層させることができる。

【0095】

キレート化固相材料は商品として入手でき、本発明における固相材料として使用し得る。例えば、本発明のある一定の実施形態では、イミノジ酢酸 (例えば、ナトリウム塩の形態) などのキレート基を含む EMPORE 膜が好ましい。このような膜の例は、米国特許第 5, 147, 539 号明細書 (ハーゲン (Hagen) ら) に記載されており、3M 社から EMPORE 抽出ディスク類 (47mm、第 2271 号、または 90mm、第 2371 号) として市販されている。本発明のある一定の実施形態では、キレート基を含むアンモニウム誘導 EMPORE 膜が好ましい。このディスクをアンモニウム形態にするため

10

20

30

40

50

に、pH 5.3で50 mLの0.1 M酢酸アンモニウム、次いで数種の試薬水の洗浄剤で洗浄できる。

【0096】

他のキレート材料の例としては、限定はしないが、Bio-Rad Laboratories社（ヘルクレス、カリフォルニア州）から登録商標CHELEXで入手できる架橋ポリスチレンビーズ、トリス（2-アミノエチル）アミンによる架橋アガロースビーズ、イミノジ酢酸、ニトリロトリ酢酸、ポリアミン類およびポリイミン類ならびにRohm and Haas（フィラデルフィア、ペンシルバニア州）の登録商標DUOLITE C-467およびDUOLITE GT73で市販されているキレートイオン交換樹脂、AMBERLITE IRC-748、DIAION CR11、DUOLITE C 647が挙げられる。

【0097】

一般に、固相材料上のキレート基の所望の濃厚密度は、1平方ミリメートル当り約0.02ナノモルであるが、濃厚密度のより広い範囲が可能であると考えられる。

【0098】

他のタイプの捕捉材料としては、アニオン交換材料、カチオン交換材料、活性炭、逆相、順相、スチレン-ジビニルベンゼン、アルミナ、シリカ、ジルコニア、および金属コロイドが挙げられる。好適なアニオン交換材料の例としては、通常塩素化形態での第四級アンモニウム、ジメチルエタノールアミン、第四級アルキルアミン、トリメチルベンジルアンモニウム、およびジメチルエタノールベンジルアンモニウムなどの強いアニオン交換体、およびポリアミンなどの弱いアニオン交換体が挙げられる。好適なカチオン交換材料の例としては、通常ナトリウム形態でのスルホン酸などの強いカチオン交換体、および通常水素形態でのカルボン酸などの弱いカチオン交換体が挙げられる。好適な炭素ベース材料の例としては、EMPORE炭素材料、炭素ビーズが挙げられる。好適な逆相C8およびC18材料の例としては、オクタデシル基またはオクチル基で末端キャップ化されているシリカビーズ、ならびにC8およびC18シリカビーズを有するEMPORE材料（EMPORE材料は、ミネソタ州セントポール所在の3M社から入手できる）が挙げられる。順相材料の例としては、ヒドロキシ基およびジヒドロキシ基が挙げられる。

【0099】

商品として入手できる材料はまた、本発明の方法において修飾または直接使用できる。例えば、登録商標LYSE AND GO（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）、RELEASE-IT（CPG、ニュージャージー州）、GENEFIZZ（Eurobio、仏国）、GENE RELEASER（Bioventures社、Murreesboro、テネシー州）、およびBUGS N BEADS（GenPoint、オスロ、ノルウェー国）ならびにZymoのビーズ（Zymo Research、カリフォルニア州オレンジ）およびDynalのビーズ（Dynal、オスロ、ノルウェー国）で入手できる固相材料を、本発明の方法、特に固相捕捉材料としてのマイクロ流体装置に組み込むことができる。

【0100】

このような方法のある一定の実施形態において、固相材料としては、コーティング試薬が挙げられる。コーティング試薬は、界面活性剤、強塩基、高分子電解質、選択的透過性ポリマーバリアー、およびそれらの組合せからなる群から選択されるのが好ましい。このような方法のある一定の実施形態において、固相材料としては、ポリテトラフルオロエチレンフィブリル・マトリックス、該マトリックス内からませた収着性粒子、および該固相材料上に被覆されたコーティング試薬が挙げられ、該コーティング試薬は、界面活性剤、強塩基、高分子電解質、選択的透過性ポリマーバリアー、およびそれらの組合せからなる群から選択される。ここで語句「該固相材料上に被覆しているコーティング試薬」とは、固相材料の少なくとも一部、例えば、フィブリル・マトリックスおよび/または収着性粒子の少なくとも一部を被覆している材料を称す。

【0101】

好適な界面活性剤の例は、下記に列挙される。

【0102】

好適な強塩基の例としては、NaOH、KOH、LiOH、NH₄OH、ならびに一級、二級、または三級アミン類が挙げられる。

【0103】

好適な高分子電解質の例としては、ポリスチレンスルホン酸（例えば、ポリ（4-スチレンスルホン酸ナトリウム）またはPSSA）、ポリビニルホスホン酸、ポリビニルホウ酸、ポリビニルスルホン酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンホスホン酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、リグノスルホネート、カラゲナン、ヘパリン、硫酸コンドリチン、およびそれらの塩類または他の誘導体が挙げられる。

10

【0104】

好適な選択的透過性ポリマーバリアーの例としては、アクリレート類、アクリルアミド類、アズラクトン類、ポリビニルアルコール、ポリエチレンイミン、多糖類などのポリマー類が挙げられる。このようなポリマー類は、種々の形態であり得る。それらは、水溶性、水膨潤性、水不溶性、ヒドロゲル類などであり得る。例えば、白血球細胞、核、ウィルス類、細菌類、ならびにヒトゲノムDNAなどの核酸類および蛋白質類などのより大きな粒子用のフィルタとして働くようにポリマーバリアーを調製できる。これらの表面は、サイズおよび/または架橋などによる官能基の適切な選択による荷電に基づいて分離するために、当業者により製造できるであろう。このような材料は、当業者により容易に利用されるか、または調製されるであろう。

20

【0105】

該固相材料は、過剰な界面活性剤の洗い出しをすることなく界面活性剤により被覆されることが好ましいが、所望ならば、他のコーティング試薬はすすぐことができる。一般に、コーティングは、浸漬、ロール塗り、スプレーなどの種々の方法を用いて実施できる。次に一般に、コーティング試薬-装填固相材料を、例えば、使用前に風乾する。

【0106】

界面活性剤、好ましくは、非イオン界面活性剤で被覆される固相材料が特に望ましい。これは、実施例の節に記載された方法に従って達成できる。理論によって限定される意図はないが、界面活性剤の添加により、固相材料の湿潤性が増加し、阻害物質を固相材料に浸漬し、それに結合させることが可能になると考えられる。

30

【0107】

固相材料用のコーティング試薬は、水性ベースの溶液であることが好ましいが、所望ならば、有機溶媒類（アルコール類など）を使用できる。サンプルが、固相材料を湿潤化できるようにコーティング試薬の装填は十分に高くするべきである。しかしながら、コーティング試薬それ自体のかなりの溶出があるほど高くすべきではない。コーティング試薬を核酸で溶出する場合、溶出サンプル中のコーティング試薬が約2重量%以下であることが好ましい。一般に、コーティング溶液濃度は、溶液中のコーティング試薬が0.1重量%の低さから、溶液中のコーティング試薬が10重量%もの高さであり得る。

【0108】

界面活性剤

40

非イオン界面活性剤。溶解試薬（上記に検討された）、溶出試薬（下記に検討される）、および/または任意の固相材料のコーティング試薬として使用できる多種多様の好適な非イオン界面活性剤が公知である。それらには、例えば、ポリオキシエチレン界面活性剤、カルボン酸エステル界面活性剤、カルボン酸アミド界面活性剤などが挙げられる。市販の非イオン界面活性剤としては、n-ドデカノイルスクロース、n-ドデシル-D-グルコピラノシド、n-オクチル-D-マルトピラノシド、n-オクチル-D-チオグルコピラノシド、n-デカノイルスクロース、n-デシル-D-マルトピラノシド、n-デシル-D-チオマルトピラノシド、n-ヘプチル-D-グルコピラノシド、n-ヘプチル-D-チオグルコピラノシド、n-ヘキシル-D-グルコピラノシド、n-ノニル-D-グルコピラノシド、n-オクタノイルスクロース、n

50

- オクチル - D - グルコピラノシド、シクロヘキシル - n - ヘキシル - D - マルトシド、シクロヘキシル - n - メチル - D - マルトシド、ジギトニン、登録商標 PLURONIC、TRITON、TWEENで入手できるもの、ならびに Kirk Othmer Technical Encyclopediaに掲載され、市販されている他の多くのものが挙げられる。例は、下表1に掲載されている。好ましい界面活性剤は、ポリオキシエチレン界面活性剤である。より好ましい界面活性剤としては、オクチルフェノキシポリエトキシエタノールが挙げられる。

【0109】

【表1】

表1

界面活性剤 商品名	非イオン性界面活性剤	供給元
PLURONIC F127	修飾オキシエチル化アルコールおよび/ またはオキシプロピル化直鎖アルコール類	Sigma ミズーリ州 セントルイス
TWEEN 20	ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート	Sigma ミズーリ州 セントルイス
TRITON X-100	t-オクチルフェノキシポリエトキシ エタノール	Sigma ミズーリ州 セントルイス
BRIJ 97	ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル	Sigma ミズーリ州 セントルイス
IGEPAL CA-630	オクチルフェノキシポリ (エチレンオキシ) エタノール	Sigma ミズーリ州 セントルイス
TOMADOL 1-7	エトキシ化アルコール	Tomah Products ウィスコンシン州 ミルトン
Vitamin E TPGS	d-アルファトコフェリルポリエチレン グリコール1000	Eastman テネシー州 キングスポート

【0110】

米国特許出願公開第2003/0139550号明細書(サブ(Savu)ら)および米国特許出願公開第2003/0139549号明細書(サブ(Savu)ら)に開示されているタイプのフッ素化非イオン界面活性剤もまた好適である。他の非イオンフッ素化界面活性剤としては、DuPont(ウィルミントン、デラウェア州)の登録商標ZONYLで入手できるものが挙げられる。

【0111】

両性イオン性界面活性剤。溶解試薬、溶出試薬、および/または任意の固相材料のコーティング試薬として使用できる多種多様な好適な両性イオン性界面活性剤が公知である。それらには、例えば、アルキルアミドベタイン類およびそれらのアミノオキシド類、アルキルベタイン類およびそれらのアミノオキシド類、スルホベタイン類、ヒドロキシルホ

10

20

30

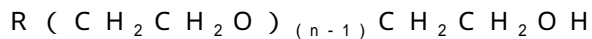
40

50

ベタイン類、アンホグリシネート類、アンホプロピオネート類、平衡アンホポリカルボキシグリシネート類、およびアルキルポリアミノグリシネート類が挙げられる。蛋白質類は、pHに依って荷電または非荷電される能力を有し；したがって、修飾ウシ血清アルブミンまたはキモトリプシノーゲンなどの蛋白質は、適切なpH、好ましくは約8~9のpIで両性イオン性界面活性剤として機能し得る。両性イオン性界面活性剤の具体例は、Sigmaの登録商標CHAPSで入手できるコールアミドプロピルジメチルアンモニウムプロパンスルホネートである。より好ましい界面活性剤としては、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニア-1-プロパンスルホネートが挙げられる。

【0112】

カチオン性界面活性剤。溶解試薬、溶出試薬、および/または任意の固相材料のコーティング試薬として使用できる多種多様の好適なカチオン性界面活性剤が公知である。それらには、例えば、第四級アンモニウム塩類、ポリオキシエチレンアルキルアミン類、およびアルキルアミノオキシド類が挙げられる。一般に、好適な第四級アンモニウム塩類としては、少なくとも1つの高級分子量基が挙げられ、2つまたは3つの低級分子量基が、共通の窒素原子に結合してカチオンを生成し、ここでの電氣的平衡アニオンは、ハロゲン化物（臭化物、塩化物など）、酢酸塩、亜硝酸塩、および低級アルコスルフェート（メトスルフェートなど）からなる群から選択される。窒素上の高級分子量置換基（1つまたは複数）は、しばしば約10個から約20個の炭素原子を含有する高級アルキル基（1つまたは複数）であり、幾つかの場合において、低級分子量基は、ヒドロキシで置換され得るメチル、エチルなどの約1個から約4個までの炭素原子の低級アルキルであり得る。1つ以上の置換基が、アリアル部分を含み得るか、またはベンジルまたはフェニルなどのアリアルにより置換され得る。また可能な低級分子量置換基の中には、ヒドロキシ末端基を有し、一般式：



に分類され、

（式中、Rは、窒素に結合している（C1~C4）二価アルキル基であり、nは、約1から約15までの整数を表す）ポリオキシエチレン部分などの低級ポリアルコキシ部分により置換されているメチルおよびエチルなどの約1個から約4個までの炭素原子の低級アルキル類がある。あるいは、末端ヒドロキシルを有する1つまたは2つのこのような低級ポリアルコキシ部分は、前述の低級アルキルを介して結合される代わりに第四級窒素に直接結合できる。本発明の使用に有用な第四級アンモニウムハロゲン化界面活性剤の例としては、限定はしないが、Akzo Chemical社のメチル-ビス（2-ヒドロキシエチル）ココ-アンモニウムクロリドまたはオレイル-アンモニウムクロリド（それぞれETHOQUAD C/12およびO/12）およびメチルポリオキシエチレン（15）オクタデシルアンモニウムクロリド（ETHOQUAD 18/25）が挙げられる。

【0113】

アニオン性界面活性剤。溶解試薬、溶出試薬、および/または任意の固相材料のコーティング試薬として使用できる多種多様の好適なアニオン性界面活性剤が公知である。有用なアニオン性タイプの界面活性剤としては、アルキルスルフェート類、アルキルエーテルスルフェート類、アルキルスルホネート類、アルキルエーテルスルホネート類、アルキルベンゼンスルホネート類、アルキルベンゼンエーテルスルフェート類、アルキルスルホアセテート類、第二級アルカンスルホネート類、第二級アルキルスルフェート類などのスルホネート類およびスルフェート類が挙げられる。これらの多くは、ポリアルコキシレート基（例えば、無作為配置、連続配置、またはブロック配置であり得るエチレンオキシド基および/またはプロピレンオキシド基）および/またはNa、K、Li、アンモニウムなどのカチオン性対イオン、トリエタノールアミンまたは第四級アンモニウム基などのプロトン化第三級アミンを含むことができる。例としては、イリノイ州ノースフィールド所在のStepan社の登録商標POLYSTEP B12およびB22で入手できるラウリルエーテルスルフェート類、日本国東京所在のNikkō Chemicalsの登録商標NIKKOL CMT30で入手できるナトリウムメチルタウレート；ノースカロライ

ナ州チャーロットテ所在のClariant社の、ナトリウム(C14~C17)第二級アルカンシルホネート類(アルファ-オレフィンシルホネート類)である登録商標HOSTAPUR SASのもとで入手できる第二級アルカンシルホネート類;登録商標ALPHA STE PC-48でStepan社から入手できるナトリウムメチル-2-スルホ(C12~C16)エステルおよびジナトリウム2-スルホ(C12~C16)脂肪酸などのメチル-2-スルホアルキルエステル類;双方Stepan社のナトリウムラウリルシルホアセテート(登録商標LANTHANOL LAL)およびジナトリウムラウレチシルホスクシネート(登録商標STEPANMILD SL3)として入手できるアルキルシルホアセテート類およびアルキルシルホスクシネート類;およびStepan社の登録商標STEPANOL AMで商品として入手できるアンモニウムラウリルシルフェートなどのアルキルシルフェート類が挙げられる。

10

【0114】

有用なアニオン性界面活性剤の別のクラスとしては、アルキルホスフェート類、アルキルエーテルホスフェート類、アラルキルホスフェート類、およびアラルキルエーテルホスフェート類などのホスフェート類が挙げられる。これらの多くは、ポリアルコキシレート基(例えば、無作為配置、連続配置、またはブロック配置であり得るエチレンオキシド基および/またはプロピレンオキシド基)を含むことができる。例としては、Clariant社の登録商標HOSTAPHAT 340KLで商品として入手できるトリラウレチ-4-ホスフェートと一般に称されるモノ-、ジ-およびトリ-(アルキルテトラグリコールエーテル)-o-リン酸エステル類の混合物、およびニュージャージー州Parsippany所在のCroda社の登録商標CRODAPHOS SGで入手できるPPG-5セテチ10ホスフェートならびにアルキルおよびアルキルアミドアルキルジアルキルアミンオキシドが挙げられる。アミンオキシド界面活性剤の例としては、全てStepan社のラウリルジメチルアミンオキシド、ラウリルアミドプロピルジメチルアミンオキシド、およびセチルアミンオキシドである登録商標AMMONYX LO、LMDO、およびCOで商品として入手できるものが挙げられる。

20

【0115】

溶出法

阻害物質を保持する固相材料を使用する実施形態では、核酸含有材料(例えば、核)および/または放出核酸を含むサンプルのより濃縮された領域を、種々の溶出試薬を用いて溶出できる。このような溶出試薬としては、水(好ましくはRNAseのない水)、緩衝液、カチオン性、アニオン性、非イオン性、または両性イオン性であり得る界面活性剤、または強塩基が挙げられる。

30

【0116】

溶出試薬は、塩基性(すなわち、7以上)であることが好ましい。ある一定の実施形態について、溶出試薬のpHは少なくとも8である。ある一定の実施形態について、溶出試薬のpHは10までである。ある一定の実施形態について、溶出試薬のpHは13までである。溶出された核酸が、PCRなどの増幅過程で直接用いられる場合、成分濃度が酵素(例えば、Taqポリメラーゼ)を阻害しないか、あるいは他に増幅反応を妨げないように、溶出試薬を製剤化すべきである。

40

【0117】

好適な界面活性剤の例としては、上記に掲げたもの、特にSDS、TRITON X-100、TWEEN、フッ素化界面活性剤、およびPLURONICSが挙げられる。一般に、界面活性剤は、水性ベース溶液で提供されるが、所望ならば、有機溶媒(アルコール類など)を使用できる。溶出試薬中の界面活性剤の濃度は、溶出試薬の全重量を基準にして少なくとも0.1重量/容量パーセント(w/v%)であることが好ましい。溶出試薬中の界面活性剤の濃度は、溶出試薬の全重量を基準にして少なくとも1w/v%以下であることが好ましい。ポリエチレングリコールなどの安定化剤を、任意に界面活性剤と共に使用できる。

【0118】

50

好適な溶出緩衝液の例としては、トリス - H C l、N - [2 - ヒドロキシエチル] ピペラジン - N ' - [2 - エタンスルホン酸] (H E P E S)、3 - [N - モルホリノ] プロパンスルホン酸 (M O P S)、ピペラジン - N , N ' - ビス [2 - エタンスルホン酸] (P I P E S)、2 - [N - モルホリノ] エタンスルホン酸 (M E S)、トリス - E D T A (T E) 緩衝液、クエン酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、炭酸塩類、および重炭酸塩類などが挙げられる。

【 0 1 1 9 】

溶出試薬中の溶出緩衝液の濃度は、少なくとも 1 0 ミリモル (m M) であることが好ましい。溶出試薬中の界面活性剤の濃度は、2 重量パーセント (重量 %) 以下であることが好ましい。

10

【 0 1 2 0 】

一般に、核酸含有材料および / または放出核酸の溶出は、アルカリ性溶液を用いて達成されることが好ましい。理論に拘束される意図はないが、アルカリ性溶液は、水による溶出と比較して、阻害物質の結合を改善させると考えられる。アルカリ性溶液はまた、核酸含有材料の溶解を促進する。アルカリ性溶液は、好ましくは p H 8 から 1 3、より好ましくは 1 3 を有する。高い p H 源の例としては、N a O H、K O H、L i O H、水酸化第四級窒素塩基、第三級、第二級または第一級アミン類などの水溶液が挙げられる。アルカリ性溶液が溶出に用いられる場合、P C R に備えたサンプルを形成するために、例えば、トリス緩衝液により、一般に引き続くステップにおいて中和される。

【 0 1 2 1 】

アルカリ性溶液の使用により、R N A を選択的に破壊でき、D N A の分析が可能になる。さもなければ、R N A s e を製剤に加えて R N A を不活化し、次いで R N A s e を加熱不活化できる。同様に D N A s e を加えて選択的に破壊でき、D N A の分析が可能になるが ; R N A を破壊しない他の溶解用緩衝液 (例えば、T E) も、このような方法に使用されることが考えられる。R N A s i n などの R N A s e 阻害剤の添加はまた、リアルタイムの P C R に供される R N A 調製用製剤にも使用できる。

20

【 0 1 2 2 】

一般に溶出は、室温で実施されるが、より高い温度により、より高い収率を生じ得る。例えば、溶出試薬の温度は、所望ならば 9 5 までであり得る。一般に溶出は、1 0 分以内で実施されるが、1 ~ 3 分の溶出時間が好ましい。

30

【 0 1 2 3 】

装置およびキット

マイクロ流体装置の種々の例証となる実施形態は、米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 4 7 0 0 3 号明細書 (2 0 0 3 年 4 月 2 5 日に公開、ベディングハム (B e d i n g h a m) ら) に記載されている。一般にこれらは、その中で処理された統合的マイクロ流体チャネルネットワークを有するボディ構造を使用する。好ましい態様において、マイクロ流体装置のボディ構造は、適切に組み合わせられるか、または一緒に接合され場合、例えば、本明細書に記載されたチャネルおよび / またはチャンバを含有する本発明のマイクロ流体装置を形成する、2 つ以上の分離層の集合を含む。一般に、有用なマイクロ流体装置としては、上部、底部、および内部が挙げられ、該内部は、装置のチャネルおよびチャンバを実質的に規定している。一般に、チャンバはバルブ (例えば、バルブセプタム) を含み、バルブ付チャンバと称される。

40

【 0 1 2 4 】

本明細書のある一定の実施形態に特に好ましい装置は、可変バルブ付装置と称され、標題が V a r i a b l e V a l v e A p p a r a t u s a n d M e t h o d で、2 0 0 3 年 1 2 月 1 2 日に出版され、出願者の譲受人の同時係属米国特許出願第 1 0 / 7 3 4 , 7 1 7 号明細書に開示されている。この可変バルブ付装置において、バルブ構造は、処理用チャンバ (すなわち、可変バルブ付処理用チャンバ) 内に配置されたサンプル材料の選択部分の除去を可能にしている。選択部分の除去は、所望の位置でバルブセプタムにおける開口部を形成することにより達成される。

50

【0125】

バルブセプタムは、処理用チャンバ内のサンプル材料の特性に基づいて開口部の位置の調整を可能にするため十分に大きいことが好ましい。サンプル処理装置は、開口部が形成された後に回転される場合、回転軸のより近接して配置されている材料の選択部分は、開口部を通して処理用チャンバを抜け出る。サンプル材料の残りは、それが開口部よりも回転軸から離れて配置されているため、開口部を通して抜け出ることができない。

【0126】

バルブセプタムにおける開口部は、処理用チャンバ内で検出されるサンプル材料の1つ以上の特性に基づいた位置で形成できる。処理用チャンバは、処理用チャンバ内に、および/またはそれから光を透過させる検出ウィンドウを含むことが好ましいと考えられる。サンプル材料の検出特性としては、例えば、サンプル材料の遊離表面（処理チャンバ内のチャンバ材料の容量を示して）を挙げることができる。バルブセプタムにおける開口部を、該遊離表面の外向きに選択された距離で放射状の形成は、処理用チャンバからサンプル材料の選択された容量を取り出す能力を提供できる。

10

【0127】

幾つかの実施形態において、1つ以上のバルブセプタムにおける選択された位置で開口部を形成することにより、サンプル材料の選択された分割量を取り出すことが可能と考えられる。選択された分割容量は、開口部（回転軸に関連して測定された）と、開口部間の処理用チャンバの断面積との間の放射状距離に基づいて決めることができる。

【0128】

バルブセプタムにおける開口部は、物理的接触、例えば、レーザーアブレーション、集束光学的な加熱のない状態で形成されることが好ましい。その結果、開口部は、サンプル処理装置の最外層を貫通することなく形成できることが好ましく、したがってサンプル処理装置からサンプル材料漏出の可能性を制限する。

20

【0129】

一態様において、本発明は、サンプル処理装置（例えば、マイクロ流体装置）内のバルブ付処理用チャンバを用い、該バルブ付処理用チャンバは、サンプル処理装置の対向する第1と第2の主要側面間に配置される処理用チャンバ容積を有する処理用チャンバを含み、該処理用チャンバは、サンプル処理装置内の処理用チャンバ領域を占有しており、該処理用チャンバ領域は、長さと同様に横行する幅を有しており、さらに長さは幅よりも大きい。可変バルブ付処理用チャンバとしてはまた、処理用チャンバ領域内に配置されたバルブ付チャンバ、処理用チャンバ容積とサンプル処理装置の第2の主要側面間に配置されるバルブ付チャンバが挙げられ、該バルブ付処理用チャンバは、バルブ付処理用チャンバと処置用チャンバとを分離するバルブセプタムにより処理用チャンバから隔離されており、処理用チャンバ領域の一部は、バルブセプタムとサンプル処理装置の第1の主要側面との間にある。検出ウィンドウは、処理用チャンバ領域内に配置されており、該検出ウィンドウは、処理用チャンバ容積に向けて、および/またはそれから選択された電磁気エネルギーに透過させる。

30

【0130】

別の態様において、本発明は、可変バルブ付処理用チャンバからサンプルの一部の選択的取り出しを可能にする方法を提供する。この方法としては、上記のサンプル処理装置（例えば、マイクロ流体装置）を提供すること、処理用チャンバにサンプル材料を提供すること；検出ウィンドウを介して処理用チャンバ内でサンプル材料の特性を検出すること；選択された位置が、サンプル材料の検出特性に関連する、処理用チャンバの長さに沿って選択された位置でバルブセプタムにおける開口部を形成すること、が挙げられる。この方法はまた、サンプル材料の一部だけを、処理用チャンバからバルブセプタムに形成された開口部を通してバルブ付チャンバ内に移動させることを含む。

40

【0131】

本発明はまた、マイクロ流体装置、溶解試薬（特に、ニートまたは溶液中で、非イオン界面活性剤などの界面活性剤）、および阻害物質を核酸から分離するための使用説明書を

50

含むことができるキットを提供する。

【0132】

本発明のキット内に含まれ得る他の構成要素としては、洗浄用溶液、カップリング用緩衝液、クエンチング用緩衝液、ブロッキング用緩衝液、溶出用緩衝液など、従来の試薬が挙げられる。本発明のキット内に含まれ得る他の構成要素としては、スピンカラム、カートリッジ、96ウェルフィルタプレート、シリンジフィルタ、採取用ユニット、シリンジなど、従来の装置が挙げられる。

【0133】

一般にキットは、キットの内容物を入れるために用いられる1つ以上の物理的構造に適用されるパッケージング材料を含む。パッケージング材料は、好ましくは、無菌の不純物のない環境を提供するために周知の方法により構築できる。パッケージング材料は、キットの内容物を示すラベルを有することができる。さらに、キットは、キット内の材料の使用法を示す使用説明書を含んでいる。本明細書に用いられる用語の「パッケージ」は、ガラス、プラスチック、紙、フォイルなどの固体マトリックスまたは材料を称す。

【0134】

一般に「使用説明書」は、溶解条件（例えば、溶解試薬のタイプおよび濃度）、混合される試薬とサンプルとの相対量、試薬/サンプル混合物の維持時間、温度、緩衝液条件など、本発明の種々の方法を説明する有形の表現を含む。

【0135】

例証法1

一実施形態において、本発明は、サンプルから核酸を単離する方法を提供するものであり、該方法は、装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび混合用チャンバを含むマイクロ流体装置を提供すること；核酸含有材料および阻害物質含有細胞（このような核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、同じものであってもよいし、異なってもよい）を含むサンプルを提供すること；該装填用チャンバに該サンプルを導入すること；細胞膜を破壊し、阻害物質を放出し、核酸含有材料と阻害物質とを含む溶解サンプルを形成するのに有効な条件下で、該サンプルを第1の溶解試薬と接触させること；該バルブ付処理用チャンバに該溶解サンプルを移すこと；該バルブ付処理用チャンバ内に該サンプルの濃縮領域を形成することであって、該溶解サンプルの濃縮領域は、大部分の核酸含有材料を含み、濃縮度の低い領域は、阻害物質の少なくとも一部を含むこと；バルブ付処理用チャンバ内の第1のバルブを作動させて、該サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、該溶解サンプルの濃縮度の低い領域から濃縮領域を実質的に分離し、それによって該溶解サンプルから阻害物質の少なくとも一部を除去すること；該バルブ付処理用チャンバ内の第2のバルブを作動させて、該溶解サンプルの分離された濃縮領域を該混合用チャンバに移すこと；該溶解サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液で任意に希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域を任意にさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を任意に分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで該阻害物質の濃度を減少させること；該核酸含有材料をさらに溶解して、核酸を放出させること；および放出された核酸を含む該サンプルのpHを任意に調整すること、を含む。

【0136】

核酸含有材料および阻害物質を含有する細胞は、同じものであってもよいし、異なってもよいが、一般には異なる。すなわち、核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、潜在的には同じであり得るであろう。例えば、サンプルが白血球層である場合、核酸含有材料は、核および阻害物質の双方を含有する白血球細胞であり得る。白血球細胞に含まれる核ではなくて白血球細胞の細胞膜を溶解する溶解試薬（例えば、非イオン界面活性剤）が用いられると、次にはまた、本明細書に定義される核酸含有材料であると考えられる、核が非損傷状態の阻害物質が放出される。

【0137】

TRITON X-100などの非イオン界面活性剤は、サンプル（例えば、血液）が

10

20

30

40

50

、該界面活性剤と2、3分間混合される場合に溶解が生じるように混合用チャンバ内で均一に予め堆積できる。他の場合、界面活性剤の希釈液を、混合用チャンバに導入前にサンプル（例えば、血液）と予め混合できる。混合後、該溶液は、例えば、核を単離するために遠心分離する。2分間400rcfなどのスピニング速度は、マイクロ流体装置を用いる場合に一般に望ましいが、より高いスピニング速度および/またはより長いスピニング時間を用いることができる。

【0138】

他の場合において、非イオン界面活性剤が使用されない場合、水または塩化アンモニウムが、赤血球細胞の溶解のために使用できる。溶解が混合用チャンバ内で生じた後、白血球細胞は、比較的低速で遠心分離できる。

10

【0139】

このような方法のある一定の実施形態において、サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去するためにバルブ付処理用チャンバ内の第1のバルブの作動としては、サンプルの上部95容量%を除去するためにバルブを作動させることが挙げられる。

【0140】

このような方法のある一定の実施形態において、ヘムなどの阻害物質の濃度を2マイクロモル未満に減じるために、溶解サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液による希釈を実施できる。これは、10倍希釈物および水または緩衝液による濃縮の連続ステップにより達成できる。この希釈および濃縮（例えば、遠心分離による）の処理は、核酸含有材料の所望の純度レベルが得られるまで、2、3回反復することができる。この核酸含有材料を保持しながら阻害物質濃度を希釈する処理は、可変バルブまたは個々に作動される複数の希釈ウェルの使用により達成される。

20

【0141】

このような方法のある一定の実施形態において、希釈/濃縮の処理後、クリーンな核またはWBCは、水酸化ナトリウムなどの強塩基を用いて溶解でき、次に加熱に次いでトリス-HClによる塩基の中和によって蛋白質を変性できる。所望ならば、該塩基および中和剤（一般的には乾燥した）は、マイクロ流体装置内に予め堆積できる。

【0142】

他の場合、核酸を放出させるための該核酸含有材料のさらなる溶解は、該核酸含有材料を凍結および解凍を含むことができる加熱/冷却処理に供することを含む。このような溶解処理の1回以上のサイクルは、望ましいものとして使用できる。典型的な加熱温度および時間としては、少なくとも55（より一般的には、95）で典型的には1分から5分間が挙げられ、典型的な冷却温度としては、室温以下が挙げられる。プロテイナーゼKおよび加熱に次いでプロテイナーゼKの加熱不活化は、溶解にも使用できる。これらの場合、プロテイナーゼKは予め堆積できる。

30

【0143】

幾つかの実施形態において、溶解後、例えば、ある一定の疾患に関する種々のSNP類を見るので、サンプルは、複数の増幅反応を実施するために幾つかのウェルに分割できる。

【0144】

上記に考察された幾つかの場合、マイクロ流体装置のスペースを省くために、PCRを受けるサンプルに存在する阻害物質と一緒に増幅が進行するように、PCR促進剤、緩衝液、および/またはrTthポリメラーゼなどの代替酵素を添加できる。

40

【0145】

このような方法のある一定の実施形態において、水は、RNAseのない滅菌水である。

【0146】

図1に示された装置は、方法1のある一定の実施形態を実施するために使用できる。図1を参照すると、これらの実施形態の使用に好適なマイクロ流体装置の好ましい実施形態は、装填用チャンバ90、任意の混合用チャンバ91、バルブ付処理用チャンバ93、9

50

4 および 9 5、希釈剤用チャンバ 9 2、廃棄用チャンバ 9 7 および任意の増幅反応用チャンバ 9 6 を含む。一般に、混合用チャンバは、予め堆積された界面活性剤を有することができ、希釈剤用チャンバ 9 2 は、希釈用の水または緩衝液を含み、増幅反応用チャンバは、溶解および増幅に使用し得る。

【0147】

例証法 2

別の実施形態において、本発明は、サンプルから核酸を単離する方法を提供するものであり、該方法は、装填用チャンバ、バルブ付処理用チャンバおよび固相材料を含む分離用チャンバを含むマイクロ流体装置を提供すること；核酸含有材料、阻害物質含有細胞、任意に細胞外阻害物質（このような核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、同じものであってもよいし、異なってもよい）を含むサンプルを提供すること；該装填用チャンバに該サンプルを導入すること；細胞膜を破壊し、阻害物質を放出し、核酸含有材料と阻害物質とを含む溶解サンプルを形成するのに有効な条件下で、該サンプルを第 1 の溶解試薬と接触させること；該バルブ付処理用チャンバに該溶解サンプルを移すこと；該バルブ付処理用チャンバ内に該サンプルの濃縮領域を形成すること、ここで該溶解サンプルの濃縮領域は、大部分の核酸含有材料を含み、濃縮度の低い領域は、阻害物質の少なくとも一部を含み；バルブ付処理用チャンバ内の第 1 のバルブを作動させて、該サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去し、該溶解サンプルの濃縮度の低い領域から濃縮領域を実質的に分離し、それによって該溶解サンプルから阻害物質の少なくとも一部を除去すること；該バルブ付処理用チャンバ内の第 2 のバルブを作動させて、該溶解サンプルの分離された濃縮領域を該混合用チャンバに移すこと；該溶解サンプルの分離された濃縮領域を水または緩衝液で希釈し、核酸材料の濃度を増加させるために該希釈領域をさらに濃縮し、該さらに濃縮された領域を分離し、希釈、続く濃縮および分離のこの処理を任意に反復して増幅処理を妨害しないと考えられる濃度まで該阻害物質の濃度を減少させること；強塩基と加熱により該核酸含有材料をさらに溶解して、核酸を放出させること；および放出された核酸を含む該サンプルの pH を任意に調整すること、を含む。

【0148】

例証法 1 に関して上記に考察されたように、例証法 2 の実施形態の核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、同じものであってもよいし、異なってもよいが、一般的には異なっている。すなわち、核酸含有材料および阻害物質含有細胞は、可能性として同じであり得る。

【0149】

このような方法のある一定の実施形態において、サンプルの濃縮度の低い領域の少なくとも一部を除去するためにバルブ付処理用チャンバ内の第 1 のバルブの作動としては、サンプルの上部 9 5 容量 % を除去するためにバルブを作動させることが挙げられる。

【0150】

図 1 に示された装置は、方法 2 のある一定の実施形態を実施するために使用できる。一般的に、増幅反応用チャンバ 9 6 は、例えば、予め堆積された（および、一般に乾燥された）形態で溶解剤（例えば、強塩基）を含み得る。

【0151】

また、上記に考察された幾つの場合、マイクロ流体装置のスペースを省くために、PCR を受けるサンプルに存在する阻害物質と一緒に増幅が進行するように、PCR 促進剤、緩衝液、および / または r T t h ポリメラーゼなどの代替酵素を添加できる。

【0152】

追加の実施形態

濃縮 / 分離 / 任意の希釈ステップを用いて阻害物質量を減少させることに加えて、阻害物質は、例えば、標題 METHODS FOR NUCLEIC ACID ISOLATION AND KITS USING SOLID PHASE MATERIAL (代理人整理番号 5 9 0 7 3 U S 0 0 3) で、___に出願された米国特許出願第 ___ 号明細書に開示される固相材料を用いて任意に除去できる。

10

20

30

40

50

【0153】

ある一定の実施形態において、サンプルのマイクロ流体装置の装填チャンバへの導入は、サンプルを第1の溶解試薬と接触させる前に生じる。あるいは、サンプルの装填チャンバへの導入は、サンプルを第1の溶解試薬と接触させた後に生じる。第1の溶解試薬は、例えば、水または非イオン界面活性剤であり得る。

【0154】

さらなる溶解が、核酸含有材料（例えば、核）から核酸を放出させるために必要な場合、他の溶解条件を使用できる。例えば、これは、核酸含有材料を任意の加熱と共に強塩基に供することを含む。強塩基は、一般にNaOHであるが、KOH、LiOH、NH₄OH、ならびに第一級、第二級、または第三級アミンであり得る。一般に、温度は室温である。塩基が用いられる場合、放出された核酸を含有するサンプルは、特に核酸が、引き続き増幅処理に供されるような場合、そのpHを調整する必要がある場合もある。したがって、本発明のある一定の実施形態は、一般にサンプルのpHを、少なくとも7.5、一般に9以下に調整することを含む。

10

【0155】

ある一定の実施形態において、第1の溶解試薬は、非イオン界面活性剤である。このような方法のある一定の実施形態において、装填チャンバは、第1の溶解試薬（例えば、予め堆積された（および一般に乾燥された）非イオン界面活性剤）を含み、サンプルと第1の溶解試薬との接触は、サンプルを装填チャンバに導入する際に生じる。

【0156】

あるいは、サンプルを、第1の溶解試薬（好ましくは、非イオン界面活性剤）と共に引き続き処理チャンバ内に移すことができるであろう。例えば、細胞膜を破壊し、核および阻害物質を放出して、溶解サンプルを形成するために、サンプルと第1の溶解試薬（好ましくは、非イオン界面活性剤）との接触を混合用チャンバ内で十分に混合する。「第1の」溶解試薬を用いる場合、該方法は、「第2の」溶解試薬の使用を必ずしも必要とせず；むしろ、用語の「第1の溶解試薬」は、使用される場合の任意の追加の溶解試薬と区別するために本明細書に用いられることを解すべきである。

20

【0157】

上記のように、緩衝液（特に、トリス緩衝液）中のショ糖の添加は、核の単離に役立つ。また、該緩衝液は、マグネシウム塩類およびTRITON X-100などの界面活性剤を含み得る。これはまた、白血球細胞の溶解に良好な媒体を提供できる。さらに、ある一定の場合、特にマイクロ流体装置内で核を保管する必要がある場合、核保存用緩衝液を用いることは有用であり得る。核貯蔵用緩衝液は、例えば、緩衝液（例えば、トリス緩衝液）中、ショ糖、マグネシウム塩類、EDTA、ジチオトリエトール、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド(AESF)、および/またはグリセロールを含むことができ、核の安定貯蔵が可能であろう。

30

【0158】

ある一定の実施形態に加えて、バルブ付処理用チャンバにおいてサンプルの濃縮領域の形成は、処理用チャンバ内でサンプルを遠心分離することを含む。一般に、濃縮度の低いサンプルから濃縮領域の形成は、濃縮度の低い領域のサンプルをバルブを通して廃棄箱に移すことを含む。

40

【0159】

上記の固相材料に加えて、他のタイプの固相材料、特にビーズを、本発明の種々の実施形態でマイクロ流体装置に導入できる。例えば、ビーズは、適切な基で官能化して、特定の細胞、ウイルス、細菌、蛋白質、核酸などを単離できる。ビーズは、遠心分離、引き続き分離によりサンプルから分離できる。ビーズは、分離のために適切な密度とサイズ（ナノメートルからミクロンまで）を有するようにデザインし得る。例えば、ウイルス捕捉の場合、ウイルスの蛋白質コートを認識するビーズは、血清サンプルから少量残存の阻害物質の除去前または除去後に捕捉および濃縮するために使用できる。

【0160】

50

阻害物質は、一連の希釈および遠心分離ステップ（および任意に、標題METHODS FOR NUCLEIC ACID ISOLATION AND KITS USING SOLID PHASE MATERIAL（代理人整理番号59073US003）で、___に出願された米国特許出願第___号明細書に開示される固相材料を用いて）によりウィルス捕捉後除去できる。このような固相材料は、本明細書に記載された種々の方法およびサンプルにより使用できる。

【0161】

核酸は、分離されたウィルス粒子から溶解により抽出できる。したがって、ビーズは、マイクロ流体装置内の特定の領域で関連材料を濃縮する方法を提供でき、また、捕捉粒子からの関連材料の洗浄および関連材料の溶出が可能である。

10

【0162】

このようなビーズの例としては、限定はしないが、Bio-Rad Laboratories社（ヘルクレス、カリフォルニア州）の登録商標CHELEXで入手できる架橋ポリスチレンビーズ、Rohm and Haas（フィラデルフィア、ペンシルバニア州）の登録商標DUOLITE C-467およびDUOLITE GT73、AMBERLITE IRC-748、DIAION CR11、DUOLITE C647で商品として入手できる、トリス（2-アミノエチル）アミン、イミノジ酢酸、ニトリロトリ酢酸、ポリアミン類およびポリイミン類による架橋アガロースビーズならびにキレートイオン交換樹脂が挙げられる。これらのビーズは、上記に検討された固相材料としての使用にも好適である。

20

【0163】

ビーズの他の例としては、登録商標GENE FIZZ（Eurobio、仏国）、GENE RELEASER（Bioventures社、Murfreesboro、テネシー州）、およびBUGS N BEADS（GenPoint、オスロ、ノルウェー国）ならびにZymoのビーズ（Zymo Research、オレンジ、カリフォルニア州）およびDyna1のビーズ（Dyna1、オスロ、ノルウェー国）で入手できるものが挙げられる。

【0164】

他の材料は、病原体捕捉のためにも利用できる。例えば、ポリマーコーティング試薬は、本発明のある一定の実施形態において、特定の細胞、ウィルス、細菌、蛋白質、核酸などを単離するためにも使用できる。これらのポリマーコーティング試薬は、例えば、マイクロ流体装置のカバーフィルム上に直接スプレー噴射し得る。

30

【0165】

ビーズ表面上に抗体を共有結合することによりウィルス粒子をビーズ上に捕捉できる。ウィルスコート蛋白質に対する抗体を生じさせることができる。例えば、DYNALビーズが、抗体を共有結合するために使用できる。あるいは、合成ポリマー類、例えば、アニオン交換ポリマー類がウィルス粒子を濃縮するために使用できる。ピラフィニティー（Viraffinity）（Biotech Support Group、イーストブランズウィック、ニュージャージー州）などの商品として入手できる樹脂は、ビーズを被覆するために使用できるか、またはウィルス粒子を濃縮するために、マイクロ流体装置内の選択位置をポリマーコーティング試薬として適用できる。BUGS N BEADS（GenPoint、オスロ、ノルウェー国）は、例えば、細菌の抽出のために使用できる。ここでこれらのビーズは、ブドウ球菌（Staphylococcus）、連鎖球菌（Streptococcus）、大腸菌（E coli）、サルモネラ菌（Salmonella）、およびクラミジア（Chlamydia）基本小体などの細菌を捕捉するために使用できる。

40

【0166】

したがって、サンプルがウィルス粒子または他の病原体（例えば、細菌）を含む場合の本発明の一実施形態において、マイクロ流体装置は、ウィルス捕捉ビーズの形態または他の病原体捕捉材料の形態で固相材料を含むことができる。この方法において、サンプルは

50

、濃縮ステップ前にウイルス捕捉ビーズに接触させる。より具体的には、ある場合において、ウイルス捕捉ビーズは、ウイルスまたは細菌の濃縮にのみ使用でき、次いで例えば、別のチャンバでビーズを分離し、ウイルスまたは細菌の溶解により終了する。別の場合において、ビーズは、ウイルスまたは細菌の濃縮次いで溶解に使用でき、および同じビーズ上で核酸を捕捉し、ビーズの希釈、ビーズの濃縮、ビーズの分離、捕捉された核酸の溶出前に複数回この処理を繰り返し行う。

【0167】

あるいは、ビーズ（または他のウイルス捕捉材料）が、ウイルス捕捉（または他の病原体捕捉）の選択方法でない場合、超遠心分離を用いて血清または血漿からウイルス粒子をペレット化（すなわち、濃縮）するために選択できる。ウイルスRNAを単離し、次いで増幅反応（RT-PCR）をする必要がある場合、これらの濃縮ウイルス粒子は、溶解（例えば、RNase阻害剤と界面活性剤の添加）のためにマイクロ流体装置に移すことができる。

10

【0168】

所望ならば、ビーズは、PCR反応チャンバにおいて直接使用できる。あるいは、ビーズが用いられる場合、溶出試薬を使用できる。このような溶出試薬としては、水（好ましくはRNaseのない滅菌水）、緩衝液、カチオン性、アニオン性、非イオン、あるいは両性イオン性であり得る界面活性剤、または強塩基を挙げることができる。

【0169】

溶出試薬は、塩基であることが好ましい（すなわち、7以上）。ある一定の実施形態について、溶出試薬のpHは少なくとも8である。ある一定の実施形態について、溶出試薬のpHは10までである。ある一定の実施形態について、溶出試薬のpHは13までである。溶出された核酸が、PCRなどの増幅過程で直接用いられる場合、成分濃度が酵素（例えば、Taqポリメラーゼ）を阻害しないか、あるいは他に増幅反応を妨げないように、溶出試薬を製剤化すべきである。

20

【0170】

好適な界面活性剤の例としては、上記に掲げたもの、特にSDS、TRITON X-100、TWEEN、フッ素化界面活性剤、およびPLURONICSが挙げられる。一般に、界面活性剤は、水性ベース溶液で提供されるが、所望ならば、有機溶媒（アルコール類など）を使用できる。溶出試薬中の界面活性剤の濃度は、溶出試薬の全重量を基準にして少なくとも0.1重量/容量パーセント（w/v%）であることが好ましい。溶出試薬中の界面活性剤の濃度は、溶出試薬の全重量を基準にして少なくとも1w/v%以下であることが好ましい。ポリエチレングリコールなどの安定化剤は、任意に界面活性剤と共に使用できる。

30

【0171】

好適な溶出緩衝液の例としては、トリス-HCl、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸]（HEPES）、3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン-N,N'-ビス[2-エタンスルホン酸]（PIPES）、2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸（MES）、トリス-EDTA（TE）緩衝液、クエン酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、炭酸塩類、および重炭酸塩類などが挙げられる。

40

【0172】

溶出試薬中の溶出緩衝液の濃度は、少なくとも10ミリモル（mM）であることが好ましい。溶出試薬中の界面活性剤の濃度は、2重量パーセント（重量%）以下であることが好ましい。

【0173】

一般に、核酸含有材料および/または放出核酸の溶出は、アルカリ性溶液を用いて達成されることが好ましい。理論に拘束される意図はないが、アルカリ性溶液は、水による溶出と比較して、阻害物質の結合を改善させると考えられる。アルカリ性溶液はまた、核酸含有材料の溶解を促進する。アルカリ性溶液は、好ましくはpH8~13、より好ましく

50

は13を有する。高いpH源の例としては、NaOH、KOH、LiOH、水酸化第四級窒素塩基、第三級、第二級または第一級アミン類などの水溶液が挙げられる。アルカリ性溶液が溶出に用いられる場合、PCR準備サンプルを形成するために、例えば、一般にトリス緩衝液により、引き続くステップで中和される。

【0174】

アルカリ性溶液の使用は、RNAを選択的に破壊でき、DNAの分析を可能にする。さもなければ、RNaseを製剤に加えてRNAを不活化し、次いでRNaseを加熱不活化できる。同様にDNaseを加えてDNAを選択的に破壊でき、RNAの分析を可能にしているが；RNAを破壊しない他の溶解用緩衝液（例えば、TE）は、このような方法に使用されるであろう。RNasinなどのRNase阻害剤の添加はまた、リアルタイムのPCRに供されるRNA調製用製剤にも使用できる。

10

【0175】

一般に溶出は、室温で実施されるが、より高い温度は、より高い収率を生じ得る。例えば、溶出試薬の温度は、所望ならば95℃まであり得る。一般に溶出は、10分以内で実施されるが、1～3分の溶出時間が好ましい。

【0176】

核酸の下流適用が、PCRなどの増幅処理に供される場合、該方法に用いられる全ての試薬は、このような処理と適合する（例えば、PCR適合性）ことが好ましい。さらに、PCR促進剤の添加は、診断目的用に特に有用であり得る。また、増幅前に増幅を受ける材料の加熱は、有利であり得る。

20

【0177】

阻害物質が完全に除去されない実施形態においては、阻害物質存在下での増幅処理に役立つ得、緩衝液、酵素、およびPCR促進剤の使用を加えることができる。例えば、阻害物質により抵抗性のあるrTthなどのTaqポリメラーゼ以外の酵素を使用でき、それによってPCR増幅にとって大きな利益が提供される。ウシ血清アルブミン、ベタイン、プロテイナーゼ阻害物質、ウシトランスフェリンなど、さらに増幅処理においても役立つことが知られているため使用できる。あるいは、大規模な精製を必要としない全血から直接的増幅のために、Novagenの血液直接のPCR緩衝液用キット（EMD Biosciences、ダルムシュット、独国）などの市販品を使用できる。

【0178】

本発明の目的および利点は、以下の実施例によりさらに説明されるが、これらの実施例に列挙された特定の材料およびそれらの量、ならびに他の条件および詳細は、本発明を過度に限定するものとして解釈してはならない。

30

【実施例】

【0179】

実施例1：キレート化固相材料を用いないで全血からゲノムDNAの単離方法

1μLのニートTRITON X-100を、100μLの全血に加えた。この溶液を、断続的（20秒ごとに約5秒間）にボルテックスしながら、室温（約21℃）で約5分間インキュベートした。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた。該溶液を、Eppendorf Model 5415D遠心分離機（Brinkmann、ウェストベリー、ニューヨーク州）において400rcfで約10分間回転させた。上澄液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約2μLの濃縮物質が残った。この濃縮物質を新しい遠心管に移した。10μLの0.1M NaOHを加え、混合し、室温（約21℃）で約5分間インキュベートした。2μLの分割量を取り出し、10μLの40mM トリス-HCl（pH 7.4）に加えた。

40

【0180】

実施例2A：PCRに及ぼす阻害物質/DNAの影響：DNA濃度を固定しての阻害物質濃度の変動

PCRに及ぼす阻害物質の影響を調べるために、一連の希釈阻害物質を、クリーンなヒトゲノムDNAによるスパイキング前に作製した。10μLの1マイクロリットル当たり1

50

5 ナノグラム ($\text{ng} / \mu\text{L}$) のヒトゲノム DNA に、 $1 \mu\text{L}$ の種々の混合液 I (ニートまたはその希釈液) を加えて (サンプル 2 - 阻害物質の添加なし、2 D - ニート、7 E - 1 : 10、2 F - 1 : 30、2 G - 1 : 100、2 H - 1 : 300)、ボルテックスした。各サンプルの $2 \mu\text{L}$ 分割量を、 $20 \mu\text{L}$ PCR 用に採取した。この結果は表 2 に示している。

【0181】

混合液 I : $100 \mu\text{L}$ の全血を $1 \mu\text{L}$ のニート TRITON X - 100 に加えた。溶液は、断続的 (20 秒ごとに約 5 秒間) にボルテックスしながら、室温 (約 21) で約 5 分間インキュベートした。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた。該溶液を、Eppendorf Model 5415 D 遠心分離機において 400rcf で約 10 分間回転させた。遠心管の上部から約 $80 \mu\text{L}$ を取り出し、混合液 I と名付けた。

10

【0182】

実施例 2 B : PCR に対する阻害物質 / DNA の影響 : 阻害物質濃度を固定しての DNA 濃度の変動

$10 \mu\text{L}$ のヒトゲノム DNA に、 $1 \mu\text{L}$ の 1 : 3 希釈混合液 I (上記) を加えた。調べた DNA 濃度は、以下のとおりであった : サンプル 2 J - $15 \text{ng} / \mu\text{L}$ 、2 K - $7.5 \text{ng} / \mu\text{L}$ 、2 L - $3.75 \text{ng} / \mu\text{L}$ 、2 M - $1.5 \text{ng} / \mu\text{L}$ 。各サンプルの $2 \mu\text{L}$ 分割量を、 $20 \mu\text{L}$ PCR 用に採取した。この結果は表 2 に示している。

【0183】

実施例 2 C : PCR に及ぼす阻害物質 / DNA の影響 : 阻害物質を添加しない DNA

以下のサンプルは、阻害物質の代わりに各 DNA サンプルに $1 \mu\text{L}$ の水を添加して調製された : サンプル 2 N - $15 \text{ng} / \mu\text{L}$ 、2 P - $7.5 \text{ng} / \mu\text{L}$ 、2 Q - $3.75 \text{ng} / \mu\text{L}$ 、2 R - $1.5 \text{ng} / \mu\text{L}$ 。各サンプルの $2 \mu\text{L}$ 分割量を、 $20 \mu\text{L}$ PCR 用に採取した。この結果は表 2 に示している。

20

【0184】

【表 2】

表 2

サンプル番号	Ct (二重反復 試験サンプル)	サンプル番号	Ct (二重反復 試験サンプル)
2	19.10	2K	29.16
	19.06		30.22
2D	13.94	2L	30.47
	29.50		29.96
2E	27.39	2M	28.43
	26.22		26.16
2F	21.44	2N	20.05
	20.66		19.80
2G	19.90	2P	20.74
	19.30		20.54
2H	19.90	2Q	21.95
	20.08		21.88
2J	28.45	2R	22.67
	28.61		23.10

10

20

【0185】

実施例 3：加熱を用いて全血からゲノム DNA の単離方法

1 μ L のニート TRITON X - 100 を、100 μ L の全血に加えた。溶液を、断 30
 続的 (20 秒ごとに約 5 秒間) にボルテックスしながら、室温 (約 21) で約 5 分間イ
 ンキュベートした。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた
 。該溶液を、Eppendorf Model 5415 D 遠心分離機において 400 r
 cf で約 10 分間回転させた。上澄液を分離し、廃棄して、遠心管の底に約 2 μ L の濃縮
 物質が残った。この濃縮物質を、新しい遠心管に移した。10 μ L の 0.1 M NaOH
 を加え、混合し、室温 (約 21) で約 5 分間インキュベートした。この溶液を 95 で
 3 分間加熱した。2 μ L の分割量を取り出し、10 μ L の 40 mM トリス - HCl (p
 H 7.4) に加えた。

30

【0186】

実施例 4：RNAse のない水希釈液を用いて全血からゲノム DNA の単離方法

2 μ L のニート TRITON X - 100 を、100 μ L の全血に加えた。溶液を、断 40
 続的 (20 秒ごとに約 5 秒間) にボルテックスしながら、室温 (約 21) で約 5 分間イ
 ンキュベートした。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた
 。該溶液を、Eppendorf Model 5415 D 遠心分離機において 400 r
 cf で約 2 分間回転させた。上澄液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約 5 μ L の濃縮
 物質が残った。最後の 5 μ L の濃縮物質に、95 μ L の RNAse のない滅菌水を加えた
 。着色が均一になるまで、サンプルを混合した。この溶液を、Eppendorf Mo
 del 5415 D 遠心分離機において 400 rcf で約 2 分間回転させた。上部の 95
 μ L の溶液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約 5 μ L の濃縮物質が残った。最後の 5
 μ L の濃縮物質に、95 μ L の RNAse のない滅菌水を加えた。着色が均一になるまで 50

40

50

、サンプルを混合した。この溶液を、Eppendorf Model 5415 D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。最後の5 µLの濃縮物質に、1 µLの0.5 M NaOHを加えた。1分間インキュベート後、このサンプルを95 で3分間加熱した。1.5 µLの1 M トリス - HCl (pH 7.4)を、6 µLのサンプルに加えた。

【0187】

実施例5：RNAseのない水希釈液を用いた全血からゲノムDNAの単離方法：マイクロ流体装置の分離用チャンバにおけるサンプルの分離

2 µLのニートTRITON X-100を、100 µLの全血に加えた。溶液は、断続的(20秒ごとに約5秒間)にボルテックスしながら、室温(約21)で約5分間インキュベートした。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた。2003年12月12日に出願され、出願者の譲受人の同時係属米国特許出願第10/734,682号明細書に記載されるマイクロ流体装置上の分離用チャンバに入れ、(図1)、4000 rpmで4分間回転させた。95 µl分割量の上部の溶液を取り出し、廃棄した。濃縮物質を含有する最後の5 µLを、別のクリーンな分離用チャンバに移した。95 µlのRNAseのない滅菌水を5 µLに加えた。この溶液を、ピペットチップで2~3回上下に混合した。サンプルは、4000で4分間回転させた。95 µl分割量の上部の溶液を取り出し、廃棄した。濃縮物質を含有する最後の5 µLを、別のクリーンな分離用チャンバに移した。95 µlのRNAseのない滅菌水を5 µLに加えた。この溶液を、ピペットチップで2~3回上下に混合した。サンプルは、4000で4分間回転させた。95 µl分割量の上部の溶液を取り出し、廃棄した。濃縮物質を含有する最後の5 µLを、別のクリーンなマイクロ遠心管に移した。5 µLの濃縮物質に、1 µLの0.5 M NaOHを加えた。1分間インキュベート後、このサンプルを95 で3分間加熱した。1.5 µLの1 M トリス - HCl (pH 7.4)を、6 µLのサンプルに加えた。

10

20

【0188】

実施例6：RNAseのない水希釈液を用いて全血からゲノムDNAの単離方法：マイクロ流体装置の混合用チャンバ内のTRITON X-100との混合

10 µLの10% TRITON X-100溶液を、2003年12月12日に出願され、出願者の譲受人の同時係属米国特許出願第10/734,682号明細書に記載されるマイクロ流体装置の混合用チャンバのカバーフィルム上で一晚乾燥した(図1)。100 µLの全血を、混合用チャンバに加えた。この溶液を約5分間混合した。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた。該溶液を、クリーンなマイクロ遠心管に写し、Eppendorf Model 5415 D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。上部の95 µlの溶液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約5 µLの濃縮物質が残った。最後の5 µLの濃縮物質に、95 µlのRNAseのない滅菌水を加えた。着色が均一になるまで、サンプルを混合した。この溶液を、Eppendorf Model 5415 D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。上部の95 µlの溶液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約5 µLの濃縮物質が残った。最後の5 µLの濃縮物質に、95 µlのRNAseのない滅菌水を加えた。着色が均一になるまで、サンプルを混合した。この溶液を、Eppendorf Model 5415 D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。上部の95 µlの溶液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約5 µLの濃縮物質が残った。最後の5 µLの濃縮物質に、1 µLの0.5 M NaOHを加えた。1分間インキュベート後、このサンプルを95 で3分間加熱した。1.5 µLの1 M トリス - HCl (pH 7.4)を、6 µLのサンプルに加えた。

30

40

【0189】

実施例7：全血からのゲノムDNAの単離方法

5 µLの全血を10 µLの10 mM NaOHに加えた。1分間のインキュベート後、このサンプルを95 で3分間加熱した。16 mM トリス - HCl (pH 7.4)の5 µL分割量を10 µLのサンプルに加えた。

50

【0190】

実施例8：RNAseのない水希釈液を用いて全血からゲノムDNAの単離方法

100 μ Lの1% IGE PAL CA-630 (Sigma、セントルイス)を、100 μ Lの全血に加えた。この溶液を断続的(20秒ごとに約5秒間)にボルテックスした。次のステップに進む前にこの溶液を調べて透明であることを確かめた。該溶液を、Eppendorf Model 5415D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。上部の195 μ Lの溶液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約5 μ Lの濃縮物質が残った。最後の5 μ Lの濃縮物質に、45 μ LのRNAseのない滅菌水を加えた。着色が均一になるまで、サンプルを混合した。この溶液を、Eppendorf Model 5415D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。上部の45 μ Lの溶液を分離し、廃棄すると、遠心管の底に約5 μ Lの濃縮物質が残った。最後の5 μ Lの濃縮物質に、45 μ LのRNAseのない滅菌水を加えた。着色が均一になるまで、サンプルを混合した。この溶液を、Eppendorf Model 5415D遠心分離機において400 rcfで約2分間回転させた。最後の5 μ Lの濃縮物質に、1 μ Lの0.5 M NaOHを加えた。1分間インキュベート後、このサンプルを95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱した。1.5 μ Lの1 M トリス-HCl (pH 7.4)を、6 μ Lのサンプルに加えた。42.5 μ L分割量の水をサンプルに加えた。

10

【0191】

結果

表3は、実施例1~3に関して10 μ LのPCRサンプルの調製(10 μ L SYBR Green Master Mix中2 μ Lのサンプル、4 μ Lの β -アクチン、4 μ Lの水)のためにQuantitech SYBR Green PCR Handbookの10-12頁の使用説明書に従って、ABI 7700 QPCR Machine (Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州)で得られ；実施例4~7に関する結果は、10 μ LのPCRサンプルの調製(5.5 μ LのRNAseのない滅菌水中2.5 μ Lのサンプル、1 μ Lの10x Factor V Leiden Reaction Mixおよび1 μ Lの10x Factor V Leiden Mutation Detection Mix)のためにLightCycler Factor V Leiden Mutation Kitの添付文書の2-3頁の使用説明書に従ってLightCycler 2.0 (Roche Applied Science、インディアナポリス、インディアナ州)で得られ；実施例8の結果は、10 μ LのPCRサンプルの調製(5.8 μ LのRNAseのない滅菌水中1 μ LのサンプルおよびLightCycler Control DNAキットから1 μ Lの β -グロブリンプライマーミックス、および1.2 μ LのMgCl₂およびLightCycler DNA Master SYBR Green I)のためにLightCycler Control DNAキットパッケージの添付文書8-10頁の使用説明書に従ってLightCycler 2.0 (Roche Applied Science、インディアナポリス、インディアナ州)で得られた結果を報告している。1%アガロースゲル(バンドの輝度 - + 不鮮明、+++ 明るい)は、Horizon 11-14 Electrophoresis Machine (Gibco BRL、ガイセルスバーグ、メリーランド州)で操作した。スペクトル測定は、405 nmでSpectraMax Plus³⁸⁴分光光度計(Molecular Devices社、サニイバール、カリフォルニア州)で操作した。各サンプルにつき2つ、3つまたは4つの値は、二重反復試験、三重反復試験、または四重反復試験を表している。

20

30

40

【0192】

【表 3】

表 3

サンプル	Ct	バンド	405 nm (平均)
0.1 M NaOH/40mM トリス-HCl緩衝液中、1.5 ng/ μ LヒトゲノムDNA	16.92	+++	-
	20.67	+++	
水中、1.5 ng/ μ LヒトゲノムDNA	19.01	+++	0
	18.67	+++	
水中、1.5 ng/ μ LヒトゲノムDNA	16.18	+++	-
	16.28	+++	
実施例 1	26.64	++	1.3
	26.18	++	
1:36に希釈された実施例 2A および 2Bの混合液 I	-	-	2.63
1:360に希釈された実施例 2A および 2Bの混合液 I	-	-	0.38
1:3600に希釈された実施例 2A および 2Bの混合液 I	-	-	0.036
1:36000に希釈された実施例 2A および 2B の混合液I	-	-	0
実施例3		+++	-
実施例4	21.40, 21.31	-	-
実施例5	25.83	-	-
実施例6	21.89	-	-
実施例7*	30.35, 30.56	-	-
実施例8*	20.02, 19.96, 19.63, 19.82_	-	-

*実施例7および8に関する陽性コントロールは、200 μ Lの水で溶出する、QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook 27ページに記載される「Blood and Body Fluid Spin Protocol」に従って200 μ Lの全血から抽出されたDNAであり、20~21のCt値を有した。陰性コントロール（NTCまたは鑄型を含まないコントロール）は、これらの実験において増幅しなかった。

【0193】

本発明の範囲から逸脱することない本発明に対する種々の修飾および変更は、当業者にとって明白となる。本発明は、例証的实施例および本明細書に記載された実施例によって過度に限定される意図がないこと、このような実施例および実施形態は単に例として提供されており、本発明の範囲は、本明細書に記載された以下の特許請求の範囲によってのみ限定される意図があることを理解するべきである。

【図面の簡単な説明】

【0194】

【図1】本発明のある一定の方法に用いられる代表的なマイクロ流体装置を示す。

【図1】

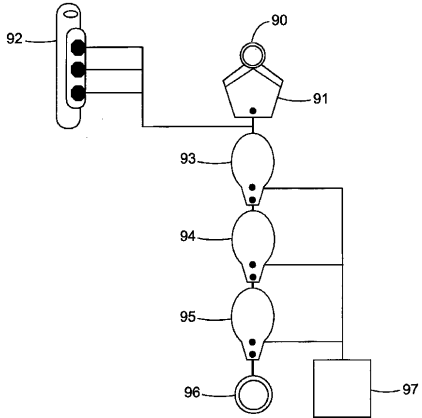


FIG. 1

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2004/035366
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	C12N15/10 G01N30/30	C12Q1/68 B01L3/00 C12M1/12 C07H21/00		
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) IPC 7 C12N C12Q				
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	US 6 344 326 B1 (NELSON ROBERT J ET AL) 5 February 2002 (2002-02-05) abstract column 2, line 53 - column 3, line 5 column 4, line 3 - column 6, line 59 column 7, line 1 - column 8, line 15 column 9, line 52 - column 10, line 20 column 12, lines 4-27 column 14, lines 36-59 column 16, lines 5-45 column 17, line 35 - column 18, line 21 column 19, line 15 - column 21, line 61 column 23, line 60 - column 24, line 23 ----- -/-	1-4,6,7, 9,12, 14-18, 36,37		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/>		
<table border="0"> <tr> <td> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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 </td> <td> *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 </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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 28 January 2005		Date of mailing of the international search report 04/02/2005		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montrone, M		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/035366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/138779 A1 (PARTHASARATHY RANJANI V ET AL) 24 July 2003 (2003-07-24) abstract paragraphs '0002!, '0003! paragraphs '0013! - '0021! paragraphs '0029! - '0033! paragraphs '0042! - '0046!, '0048! paragraphs '0052! - '0074! paragraphs '0075!, '0083! - '0087! paragraphs '0091!, '0095! -----	1-37
X	US 5 691 208 A (MILTENYI ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) abstract column 1, lines 18-28 column 2, lines 36-56 column 3, line 10 - column 5, line 20 column 10, line 66 - column 11, line 11 -----	1,2,36, 37
A	US 5 786 208 A (CLARK ET AL) 28 July 1998 (1998-07-28) abstract -----	1-37
Y	WO 03/058224 A1 (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 17 July 2003 (2003-07-17) abstract page 1, paragraph 3 page 2, paragraph 3 page 3, paragraph 2 page 16, paragraph 1 - page 17, paragraph 2 page 18, paragraph 3 - page 19, paragraph 1 -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No
 PCT/US2004/035366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
US 6344326	B1	05-02-2002	US 6074827 A 13-06-2000			
			US 6032694 A 07-03-2000			
			US 5770029 A 23-06-1998			
			US 2002119482 A1 29-08-2002			
			US 2003224436 A1 04-12-2003			
			AU 758140 B2 13-03-2003			
			AU 2488799 A 23-08-1999			
			CA 2320362 A1 12-08-1999			
			EP 1053298 A1 22-11-2000			
			JP 2002502597 T 29-01-2002			
			WO 9940174 A1 12-08-1999			
			AU 744264 B2 21-02-2002			
			AU 3968097 A 20-02-1998			
			CA 2261869 A1 05-02-1998			
			EP 1007953 A1 14-06-2000			
			JP 2000515978 T 28-11-2000			
			US 2002053399 A1 09-05-2002			
			WO 9804909 A1 05-02-1998			
			US 6176962 B1 23-01-2001			
US 6007690 A 28-12-1999						
US 2003138779	A1	24-07-2003	CA 2469980 A1 03-07-2003			
			EP 1461155 A2 29-09-2004			
			WO 03054509 A2 03-07-2003			
US 5691208	A	25-11-1997	US 5705059 A 06-01-1998			
			AU 4766396 A 18-09-1996			
			DE 69628584 D1 10-07-2003			
			DE 69628584 T2 13-05-2004			
			EP 1308211 A2 07-05-2003			
			EP 0869838 A1 14-10-1998			
			ES 2202427 T3 01-04-2004			
			IL 116914 A 06-12-2000			
			WO 9626782 A1 06-09-1996			
			US 5711871 A 27-01-1998			
			US 5786208	A	28-07-1998	US 5837452 A 17-11-1998
AT 234352 T 15-03-2003						
AU 693836 B2 09-07-1998						
AU 1183795 A 13-06-1995						
CA 2176496 A1 01-06-1995						
DE 69432242 D1 17-04-2003						
DE 69432242 T2 28-08-2003						
DK 657530 T3 10-06-2003						
EP 0657530 A2 14-06-1995						
ES 2194022 T3 16-11-2003						
JP 9505479 T 03-06-1997						
KR 230909 B1 01-12-1999						
WO 9514768 A2 01-06-1995						
WO 03058224	A1	17-07-2003				US 6532997 B1 18-03-2003
						CA 2470852 A1 17-07-2003
			EP 1459057 A1 22-09-2004			
			US 2003127152 A1 10-07-2003			

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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 100127085

弁理士 越阪部 倫子

(72) 発明者 パルササラシー, ランジャニ ブイ.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 3 3 4 2 7, スリーエム センター

(72) 発明者 エリクソン, カトヤ ケー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 3 3 4 2 7, スリーエム センター

(72) 発明者 ベディンガム, ウィリアム

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 3 3 4 2 7, スリーエム センター

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 HA17