

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-532528

(P2008-532528A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2008-501124 (P2008-501124)	(71) 出願人	507306090 ディーエヌエー ジェノテック インク カナダ国 ケー2ジー 5ダブリュー6 オンタリオ オタワ キャメロット ドラ イブ 29 ユニット 200
(86) (22) 出願日	平成18年3月14日 (2006.3.14)	(74) 代理人	100105050 弁理士 鷲田 公一
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月6日 (2007.11.6)	(72) 発明者	バーンボイム チェイム エイチ. カナダ国 ケー1エイチ 6ピー2 オン タリオ オタワ フェザーストン ドライ ブ 1552
(86) 国際出願番号	PCT/CA2006/000380	(72) 発明者	ジャクソン アデレ カナダ国 ケー2エス 1エム3 オンタ リオ スティッツビル フォレスト クリ ーク ドライブ 85
(87) 国際公開番号	W02006/096973		
(87) 国際公開日	平成18年9月21日 (2006.9.21)		
(31) 優先権主張番号	60/662, 510		
(32) 優先日	平成17年3月16日 (2005.3.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液から得た核酸を保存するための組成物および方法

## (57) 【要約】

唾液などの体液サンプルから核酸を抽出するための、変性剤、キレート剤、緩衝剤およびプロテアーゼを含む含水組成物であり、これにより抽出された核酸は室温で少なくとも14日間安定であり、さらなる処理をしなくても増幅反応に直接利用することができる組成物。特に前記組成物は、SDS、シクロヘキサンジアミン・テトラ酢酸、トリスHClおよびプロテイナーゼKを含む。体液からDNAを直接増幅するための、前記組成物を含む方法およびキットがさらに提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

体液サンプルから核酸を抽出するための含水組成物であって、  
前記サンプル内の前記核酸は、前記含水組成物と混合された後、室温で少なくとも 1 4 日間安定であり、

増幅反応混合物に、前記増幅反応混合物の総体積に対して少なくとも 2 % の量の前記組成物が添加されても、前記核酸の増幅は阻害されない、含水組成物。

## 【請求項 2】

前記体液は唾液である、請求項 1 に記載の含水組成物。

## 【請求項 3】

( a ) 変性剤と、( b ) キレート剤と、( c ) 緩衝剤と、( d ) プロテアーゼとを含む、請求項 1 または 2 に記載の含水組成物。

## 【請求項 4】

前記変性剤は SDS であり、前記キレート剤は CDTA であり、前記緩衝剤はトリス HCl であり、前記プロテアーゼはプロテアーゼ K である、請求項 3 に記載の含水組成物。

## 【請求項 5】

0 . 0 5 % の SDS と、2 0 m M の CDTA と、2 0 0 m M のトリス HCl pH 8 . 0 と、4 0 0 m M の NaOAc と、1 0 μ g / m l のプロテアーゼ K とを含む、請求項 4 に記載の含水組成物。

## 【請求項 6】

塩基性物質を含む、請求項 1 または 2 に記載の含水組成物。

## 【請求項 7】

前記塩基性物質は、アルカリ金属水酸化物、可溶性アルカリ土類金属水酸化物、アルカリ金属酸化物または有機塩基である、請求項 6 に記載の含水組成物。

## 【請求項 8】

前記塩基性物質は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、および炭酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項 7 に記載の含水組成物。

## 【請求項 9】

前記塩基性物質は、5 0 m M ~ 4 0 0 m M の濃度で存在する水酸化ナトリウムである、請求項 8 に記載の含水組成物。

## 【請求項 1 0】

前記濃度は約 1 0 0 m M である、請求項 9 に記載の含水組成物。

## 【請求項 1 1】

前記塩基性物質は、約 1 0 0 m M の濃度で存在する水酸化カリウムである、請求項 8 に記載の含水組成物。

## 【請求項 1 2】

前記塩基性物質は、約 2 0 0 m M の濃度で存在する炭酸ナトリウムである、請求項 8 に記載の含水組成物。

## 【請求項 1 3】

前記組成物は、核酸増幅混合物に、前記増幅反応混合物の全体積に対して 2 % ~ 1 0 % の量を添加されたとき、核酸増幅を阻害しない、請求項 9 に記載の含水組成物。

## 【請求項 1 4】

前記核酸は、室温で少なくとも 3 6 5 日間安定である、請求項 2 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の含水組成物。

## 【請求項 1 5】

( a ) 体液サンプルを、それと等体積の請求項 1 に記載の含水組成物に混合すること、および

( b ) ステップ ( a ) で得られた混合物の一部を PCR 増幅処理することを含む、体液からの DNA を直接増幅するための方法。

## 【請求項 1 6】

10

20

30

40

50

前記体液は唾液である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ (a) で得られた混合物は、室温で少なくとも 14 日間にわたり安定である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (a) で得られた混合物は、室温で少なくとも 365 日間にわたり安定である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ (b) の前に、約 15 ~ 60 分間、約 45 ~ 80 の温度で混合物を加熱するステップをさらに含む、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 20】

(a) 請求項 1 に記載の含水組成物と、(b) それを使用するための指示事項とを含む、体液からの DNA を増幅するためのキット。

【請求項 21】

前記体液は唾液である、請求項 16 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、広義には、ヌクレオチド配列を検出する目的で、唾液などの体液から核酸を分離および保存するための組成物および方法に関する。より具体的には、核酸増幅反応に使用する前に核酸を抽出するための別途のステップを必要としない組成物および方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

核酸の増幅を含む分子技法は、科学捜査、法執行、軍隊、人間医学、獣医学、および研究においてますます利用されるようになってきている。科学捜査、軍隊、集団災害の状況においては、死者を特定する補助として、事故または犯罪行為の身元不明の犠牲者の血縁者と考えられる生存者から、例えば、DNA サンプルを採取することが今や当然になっている。生命の危険もあり得るような危険な状況に遭遇することが予想される軍人や兵士またはその他の個人には、そのような危険に自らをさらす前に DNA サンプルを保存しておくことを望む者もいる。法執行の分野では、カナダでも米国でも、現在、重罪犯人は DNA サンプルを提供するように求められる。DNA に基づいた試験の利用は、医学面で、いくつか例を挙げると、嚢胞性線維症、シトクロム P450 イソタイプ、伝染性の自己免疫疾患への感染しやすさに影響をもつ多型性、HLA タイピング、父子確定問題のための試験で増加が予想される。臨床研究での例は、結腸がん素因遺伝子を発見するために集団を検査したり、あるいは乳がん素因遺伝子を発見するために乳がん患者の家族を検査したりすることである。DNA の増幅のための一つの技法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。

30

【0003】

PCR は、多様な原物質から DNA 分子のコピーを増幅する、迅速で、安価で、比較的簡便な手段である。しかしながら PCR の限界は、DNA ソースが、概して増幅反応を阻害する色素、タンパク質、糖類および/またはその他の不純物などの、様々な阻害物質を含有することにある。例えば、Taq DNA ポリメラーゼ (サーマス・アクアチクス由来の典型的な熱安定性の DNA ポリメラーゼ) を含む種々の DNA ポリメラーゼは、PCR 混合物中の体液から由来の微量不純物によって、阻害されることが知られている。DNA ソースに含まれる阻害物質の問題を克服するには、増幅前に DNA ソースから DNA を精製することが通常要求される。しかしながら精製手順は、ほとんどの場合、時間がかかり、高コストな複数のステップを含む。

40

【0004】

DNA は人体中のほとんどあらゆる種類の細胞から、そして細胞を含む様々な体液から

50

抽出可能である。本明細書で使用される「体液」という用語は、唾液、痰、血清、血漿、血液、尿、粘液、胃液、腓液、精液、乳の分泌または生理の生成物、涙、またはリンパ液など、動物から自然に分泌される流動体を意味し得る。DNAの抽出のための典型的な体液源は、静脈血中の白血球である。しかし、DNAソースとして血液を使用することは多くの欠点がある。血液の収集はささいな処置とはいえない。静脈血の採血は、熟練者を必要とする。さらに、これは供血者にある程度の苦痛と痛みをしばしば引き起こす侵襲的な処置である。採血を行う人が血液感染性の病原菌にさらされることを最小限にするように注意を払う必要がある。いったん収集された血液サンプルは冷凍されるか、またはすぐにDNAの抽出を行う試験室へ輸送されなければならない。血液採取のためのより簡便な手順は、指先を針で刺した後、数滴の血液を収集し、それを一片の濾紙に吸い取らせること

10

20

30

40

50

#### 【0005】

ブラシ（口腔用綿棒）で頬の内側を擦り取ることは、DNAを含有する細胞を採取する別の方法である。この処置は、採血に比べてそれほど侵襲的ではなく、血液の収集に必要とされるほどの熟練者でなくても収集が可能である。いったん収集後、有用なDNAを回収できる時間は比較的短い。口中の細菌がDNAを分解する可能性はある。しかし、この時間は、綿棒を乾燥させるか、または綿棒を濾紙にこすりつけて乾燥させるかのいずれかによって延ばすことができる。

#### 【0006】

唾液は、大唾液腺（耳下腺、顎下腺、および舌下腺）により主に分泌される、かなり透明で無色な流動体である。その機能は、口腔内を潤滑にし浄化するとともに、消化プロセスを開始することである。耳下腺は、漿液性の（水っぽい）唾液を主に分泌するが、それ以外の腺は漿液性と粘液性（粘つく）唾液の混合物を分泌する。唾液の成分は、ムチンと消化酵素を含む。

#### 【0007】

ムチンは、上皮細胞の表面に保護生物膜の主要部分を形成する高分子量の糖化タンパク質であり、この膜形成によって粒状物質に対するバリアを設け、微生物を拘束する。これらの糖タンパク質は、唾液の粘性に大きく寄与する。

#### 【0008】

唾液には細胞DNAが存在し、このDNAは科学捜査の目的に適することは以前から知られている。科学捜査での利用は、犯罪現場で回収できるか、または切手の裏側から回収できる唾液から得た少量のDNAを用いて、犠牲者または被疑者の特定におおよそ限定される。唾液は確実なゲノムDNAソースであり得るとともに、この目的に用いられる静脈血サンプルに匹敵するという考えが、van Schie等によって研究された（van Schie等、(1997) J. Immunol. Methods. 208: 91-101）。van Schie等は、収集直後のまたは凍結した唾液サンプルを使用し、かなり複雑な抽出手順によってDNAを精製した。回収したDNAの量は、260nmでの光吸収に基づいて推定されたが、RNAなどのその他の一般的な生体高分子も同様の紫外線光吸収スペクトルを有することから、信頼性の劣る方法の手順による推定であった。それにもかかわらず上記の著者は、特定の対立遺伝子多型を分析するためのゲル電気泳動およびポリメラーゼ連鎖反応によって、質の高いゲノムDNAが確かに存在するとした。Terasaki等（Terasaki等（1998）Hum Immunol. 59: 597-598）は、ポリメラーゼ連鎖反応分析によって、HLAタイピングのためのDNAソースとして唾液が適切であるという同様の結果を報告した。回収されたDNAの量は報告されたが、DNAを測定するために用いた方法は報告されていない。上記の著者は、濾紙上で乾燥させた唾液が分析に適するDNAを生成したことを示す例を3つ提示した。

#### 【0009】

DNAソースとして血液サンプルよりむしろ唾液サンプルを提供すると、顕著な利点が

得られる。静脈切開つまり針穿刺による不快感、痛みまたは不安のために、提供者は、たいていの場合、血液よりもむしろ唾液を提供することを好む。唾液採取は専門家を必要としないというさらなる利点を有し、これにより大量のサンプル収集が実施される場合にコストを削減する。唾液は好ましいDNAソースであるが、しかしながら、血液を含むその他の体液も使用できることは当業者には明白であろう。

#### 【0010】

さらに最近になって、いかなるDNA精製手順もなしに唾液を直接リアルタイムPCRに使用できることが見出された。French等 (French等(2002) Molecular And Cellular Probes. 16: 319-326) は、採取直後の唾液全体を水で1:1に希釈し、この混合物をすぐに、または4で(2~3日)または-20で保存後に、ライトサイクラー装置(ロシュ・ダイアグノスティックス)によるリアルタイムPCRに使用した。PCR反応体積は、典型的には2 $\mu$ lの唾液(水で50%に希釈されている)を含む20 $\mu$ lであった。PCRに使用できるDNAの算出濃度は、異なる個人から得たサンプル間や、異なる日数により変わるが、0.1ng/ $\mu$ lから3.5ng/ $\mu$ lの間であることがわかった。著者は、未精製の唾液中の増幅に使用できるDNAの量は唾液サンプル中に存在するDNAのすべてではないと考えられること、全DNAのうち的一定量は口腔細胞内に残存している可能性があること、または所望の増幅ができないほど分解している可能性があることを、コメントした。4で(2~3日)または-20で保存したサンプルについて、分析効率の著しい減少は見られなかった。

10

#### 【0011】

科学捜査、法執行、軍隊、人間医学、獣医学および研究におけるDNAに基づいた分析の利用の増加に伴い、唾液などの体液を、(現在の標準である血液に代わって)標準的かつ信頼できる個人からのDNAソースとさせる組成物および方法が必要になっている。好ましくは、DNAを検出するためのこのような組成物および方法を、唾液からのDNAの抽出と精製のための別途のステップを必要とさせることなく適用できることが好ましい。さらに、体液を周囲温度で数日間保存できるようにすることが好ましい。このことは、唾液サンプルの輸送が必要である場合および/または冷却源が得られない場合に、特に有利になる。さらに、唾液サンプル中のゲノムDNAの濃度を、付加ステップを必要とせずに、従来のPCRとリアルタイムPCRのどちらにとっても十分高くすることが好ましい。従来のPCRは、通常、10ngを超える量ではDNAテンプレートを必要とする。ロシュ・モールキュラー・バイオケミカルズ・PCRアプリケーション・マニュアル(第2版、1999、ロシュ・ダイアグノスティックス)によれば、低量のテンプレート(10ng未満のヒトゲノムDNA)を使用する従来のPCRは、サイクル数の変更、プライマーの再設計、「ホット・スタート」の使用など、反応を適宜変更する必要がある。対照的に、リアルタイムPCRは、従来のPCRよりはるかに感度がよい。例えば、ライトサイクラー・リアルタイムPCR装置(ロシュ・ダイアグノスティックス)は、30pgの対照ヒトゲノムDNAの検出において100%の感度を有する(ライトサイクラー・コントロール・キットDNAマニュアル、バージョン3、2003)。

20

30

#### 【0012】

ここに記載された背景情報は、出願人が本発明に関係する可能性があると考えられる情報を開示するために記載された。上記の情報のいずれかが本発明に対する先行技術を構成することを認める意味は必ずしもなく、またそう解釈すべきでない。

40

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0013】

本発明の目的は、核酸増幅反応にDNAサンプルを直接使用することを可能にする、唾液などの体液から得たDNAを保存するための組成物および方法を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

本発明の一つの態様によれば、体液サンプルから核酸を抽出するための含水組成物が提

50

供されるが、前記サンプル内の前記核酸は室温で少なくとも14日間安定である。ここで前記組成物は、増幅反応混合物に、前記増幅反応混合物の総体積に対して少なくとも2%の量を添加されても、核酸の増幅を阻害しない。

【0015】

本発明の別の態様によれば、(a)体液サンプルを、等体積の本発明の含水組成物に混合することと、(b)ステップ(a)で調整された混合物の一部を、PCR増幅処理することを含む、体液からのDNAを直接増幅するための方法が提供される。

【0016】

本発明の別の態様によれば、(a)本発明の含水組成物と、(b)それを使用するための指示事項を含む、体液からのDNAを増幅するためのキットが提供される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下にさらに詳細に説明するように、本発明は唾液などの体液からDNAを抽出し保存するための含水組成物および方法に関し、これにより生成された組成物中のDNAは室温で少なくとも14日間安定である。本発明の組成物は、何らかの追加的処理ステップをすることなく、唾液またはその他の体液からDNAを分離し、核酸増幅反応に直接使用できるようにする。

【0018】

本明細書で使用される「約」という用語は、化学物質の表示値またはその明白な等価量の+/-10%を意味する。

20

【0019】

本明細書で使用される「体液」という用語は、唾液、痰、血清、血漿、血液、尿、粘液、胃液、腓液、精液、乳の分泌または生理の生成物、涙、またはリンパ液など、動物から自然に分泌する流動体を意味する。

【0020】

本明細書で使用される「ムチン」という用語は、それを分泌する細胞の周囲の媒質の粘性を上げる何らかの粘性タンパク質(ムコタンパク質)を意味する。本明細書で使用される「ムコイド」という用語は、ムチンを含有する何らかの体液を意味する。

【0021】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)を含むヌクレオチド鎖を意味する。核酸は、自然界で典型的に、染色体、クロマチン、ミトコンドリア、細胞質、リボソーム、バクテリア、菌類および/またはウイルスに見られる。

30

【0022】

本明細書で使用される「DNAポリメラーゼ」という用語は、プライマー結合とその後のヌクレオチドの取り込みを介して、デオキシリボ核酸合成を触媒する酵素を意味する。適当なポリメラーゼは、これらに限定されないが、エシェリヒア・コリ由来のDNAポリメラーゼI、エシェリヒア・コリ由来のDNAポリメラーゼのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、T. litoralis DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼおよびPfu DNAポリメラーゼが挙げられる。

40

【0023】

本明細書で使用される「プライマー」という用語は、DNAテンプレート、重合のための試薬などの存在下で合成が開始する起点として作用するオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーは好ましくは一本鎖であるが、二本鎖のプライマーも使用できる。二本鎖のプライマーを使用する場合、増幅反応に使用する前に一本鎖に変換することが望ましい。プライマーは、周知の方法により合成してもよいし、または生物から単離してもよい。

【0024】

本明細書で使用される「唾液」という用語は、耳下腺、顎下腺、および舌下腺を含む唾液腺のいずれかからの分泌物またはそれらの混合物を意味し、状況に応じて、口の内側を覆う多数の小さな口唇腺、頬腺、および口蓋腺からの分泌物と混合される。

50

## 【0025】

本明細書で使用される「痰」という用語は、哺乳類の鼻腔または口腔に含まれたまたは吐き出された粘液物質を意味し、唾液や肺を含む気道からの排出物を含む。

## 【0026】

唾液サンプル内の核酸を表現するのに、本明細書で使用される「安定」という用語は、検出可能な生成物中でのPCR増幅をサポートする核酸の能力を意味する。例えば、本発明の含水組成物と混合後少なくとも14日経ってもPCR生成物が得られるとすれば、唾液サンプル内の核酸は少なくとも14日間安定である、という。

## 【0027】

本明細書で使用される「被検者(体)」という用語は、動物またはヒトを意味する。望ましくは被検体は、核酸を検出するための唾液を分泌する哺乳類である。最も望ましくは、被検者はヒトである。

10

## 【0028】

## 組成物

本発明の組成物は、体液から核酸を抽出するための組成物であって、当該組成物に含有した核酸を室温で少なくとも14日間安定に維持する組成物である。好適な実施形態では、体液は唾液である。本発明の組成物は、核酸を含有する組成物を付加的に処理することなく、抽出した核酸を増幅反応に直接使用することを可能にする。特に、組成物の成分の濃度は、全反応体積の少なくとも2%が増幅反応系に添加されても、核酸増幅が可能になる程度に十分に低い。本明細書で使用される「処理」という用語は、保存組成物から核酸

20

## 【0029】

組成物の特定の成分は、例えば、コスト、利用可能性、下流の用途、および安全を含む様々な基準に基づいて選択される。当業者には容易に理解されようが、成分の濃度は、体液から抽出した核酸を室温で少なくとも14日間安定させる程度に十分に高いが、核酸含有組成物の一部を増幅反応に直接使用することを妨げない。例えば、唾液サンプルを本発明の組成物と1:1(v/v)で混合するとき、組成物が100mMのNaOHを含む水溶液であれば核酸増幅の阻害は観察されず、かつある量の組成物/体液が反応系に添加されて、反応系の全体積の20%からをなす(すなわち、本発明の組成物は、反応系の全体積の2%から20%である)。

30

## 【0030】

生体サンプル中で核酸の安定性が低い主要原因は、デオキシリボヌクレアーゼとリボヌクレアーゼの存在にある。デオキシリボヌクレアーゼとリボヌクレアーゼは、それぞれ、DNAまたはRNAを分解する酵素である。消化管中でのこれらの主なソースは、膵臓の分泌物であるが、唾液中および唾液腺や頬粘膜の細胞にも、より低いレベルで存在し得る。さらに口内の寄生微生物または摂取直後の食物からの微生物が、デオキシリボヌクレアーゼまたはリボヌクレアーゼを放出する可能性がある。時間の経過とともに、水中に保存した唾液サンプル内の核酸は、より小さな断片へ退化または分解すると予想される。

## 【0031】

望ましくは組成物は、デオキシリボヌクレアーゼを含むヌクレアーゼの阻害と、核酸の化学的安定性をもたらす。ヌクレアーゼの阻害は、変性剤、プロテアーゼおよび/または加熱によって達成される。唾液サンプル中の核酸の化学的安定性は、適切なpHを維持するpH緩衝剤の使用、および/または金属酸化還元サイクリング現象の抑制、または核酸のリン酸骨格に金属イオンが結合することを抑制するキレート剤によって達成される。

40

## 【0032】

デオキシリボヌクレアーゼとリボヌクレアーゼの作用は、これらの酵素(タンパク質)の複雑な構造を破壊する変性剤によって抑制可能である。したがって、本発明の組成物は変性剤を含みうる。適当な変性剤の非制限的な例は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)である。

## 【0033】

50

プロテイナーゼKなどの特異性の低いプロテアーゼは、タンパク質を消化するためにしばしば使用される。本発明の一つの実施形態では、唾液との混合前、混合後または混合時に、プロテアーゼが組成物に添加される。プロテアーゼはそれ自体タンパク質であるので、その作用は変性剤によって抑制され得る。したがって、デオキシリボヌクレアーゼまたはリボヌクレアーゼを抑制し、かつ唾液中のその他のタンパク質を変性させる一方で、他方ではタンパク質分解酵素を著しく抑制しないように、変性剤の濃度のバランスをとらなければならない。

#### 【0034】

本発明の方法は、唾液含有混合物を加熱するステップを任意的に含む。唾液サンプルの加熱（45～90の範囲）は、特に変性剤と併用した場合、「可逆的」変性剤として作用しうる。すなわち、熱の変性作用と組み合わせれば、化学的変性剤の濃度をより低くできることがわかった。本発明の方法は、DNAをより放出し（release）、増幅反応の収率を向上させるために、増幅ステップの前に加熱ステップを選択的に含む。この付加的な加熱ステップは、サンプル中の核酸を単離または精製するための処理ステップには相当しないことを理解されたい。

10

#### 【0035】

DNAは金属イオンに強い親和性をもつ。金属イオンのうち、一般的な遷移金属、鉄または銅などの金属は、活性酸素種の形成を触媒することができる。したがって、本発明の一つの実施形態は、一つ以上のキレート剤を含む組成物を提供する。キレート剤は、金属イオンと複合体を形成するため、金属イオンがDNAに結合するのを抑制し、すでにDNAに結合した金属イオンを取り除き、または金属イオンどうしを十分に強く結合させてそれらの酸化還元サイクリングを抑制する。その結果、活性酸素種が形成される。キレート剤の量または濃度は、キレート剤の強度に依存し、実験により決定される必要がある。シクロヘキサジアン・テトラ酢酸（CDTA）が、一般に使用されるキレート剤である。具体的な例では、20mMのCDTAが使用されているが、当業者はCDTAの他の適当な濃度を認識し、容易に決定するであろう。

20

#### 【0036】

DNAの化学骨格とプリン塩基は、ややアルカリ性pHで最も安定すると理解されており、安定するpH範囲は約7～11であり、望ましくは約8であると一般に認識されている。約6のpH以下では、脱プリン反応（すなわち、デオキシリボシド・リン酸塩骨格からプリン塩基が自然消失する反応）が起こる可能性がある。約10のpH以上では、シトシンからアミノ基が自然消失し、シトシンをウラシルに変換する可能性がある。約12のpH以上では、DNAが変性され、DNAを二本鎖形から一本鎖形に変換する。対照的にRNAは、pH範囲が5.0～7.0、望ましくは6.5～6.8で最も安定する。したがって、本発明の一つの実施形態では、緩衝剤、望ましくはpHを約5～11の範囲内に制御する緩衝剤を含ませることによって、組成物のpHを維持する。pHを6.5～9.5の範囲とする適当な緩衝剤の非制限的な例の一つは、トリス塩酸塩である。

30

#### 【0037】

本発明の一つの実施形態によれば、組成物は、変性剤と、選択的にプロテイナーゼK、キレート剤およびpHを7～11の範囲内に維持するためのpH緩衝剤を含む。

40

本発明の代替的な実施形態によれば、組成物は、変性剤、プロテイナーゼK、キレート剤またはpH緩衝剤を含まない。そうせずむしろ、ヌクレアーゼの抑制とDNAの抽出と保存を、塩基性pHを維持することによって達成する。

#### 【0038】

例えば、アルカリ金属水酸化物、可溶性アルカリ土類金属水酸化物、アルカリ金属酸化物または有機塩基などの塩基性物質を含む含水組成物と、唾液などの体液との混合物は、意外なことに体液からDNAを放出でき、放出されたDNAがPCR反応においてテンプレートとして機能し得ることがわかった。理論的に限定されるわけではないが、組成物のpHを塩基性に維持することによって、タンパク質の変性、ヌクレアーゼの抑制およびDNAの抽出と保存が達成されると考えられる。適切な塩基を選択する上で、DNAと反応

50



しやすい金属を含む塩基や、増幅反応に採用されるDNAポリメラーゼを阻害する金属を含む塩基は、本発明の組成物中での使用に適さないことがわかる。

【0039】

本発明の具体的な実施形態によれば、唾液からDNAを抽出し保存するための組成物は、50mM～400mMの水酸化ナトリウム(NaOH)を含む溶液である。

【0040】

前述のように、増幅反応に直接使用されるようにするには、本発明の組成物の様々な成分が、確実に増幅反応を阻害しない程度の濃度とする必要がある。それらの成分が増幅反応へ阻害するかどうかを決定するための方法の一例は、反応を阻害することなく反応に添加できる組成物の最大量を決定するために、段階的に種々の濃度を有する組成物を加えることである。このような方法の第二の例は、まず組成物と唾液を混合し、次に反応を阻害することなく反応に添加できる唾液/組成物の混合物の最大量を決定するために、段階的に種々の体積の唾液/組成物の混合物をPCR増幅反応内に加えることを含む。

10

【0041】

PCRまたはその他の増幅反応で許容できる成分量がいったん決定されれば、この情報により、本発明の組成物に含まれるべき成分量を計算することができる。

【0042】

方法

本発明の別の態様によれば、唾液から得た核酸サンプルを保存し、増幅するための方法が提供される。当該方法は、唾液サンプルを本発明の組成物と混合するステップと、それにより得た唾液含有混合物の一定分量を増幅反応混合物に混合するステップと、唾液含有混合物の一定分量内の核酸を増幅するステップを含む。

20

【0043】

被検者から唾液を収集するために、サンプル採取の前に口をゆすぐことが好ましい。食物片は異質なDNAを取り込む可能性があり、キスにより転移された唾液は別人のDNAソースである。約50mlのぬるま湯で活発に口内をゆすぐか、または歯磨きを使わずに歯ブラシでブラッシングして口をゆすぐことができる。非刺激唾液は通常、粘度が高く、分泌速度が遅い。刺激唾液(おいしそうな食べ物、甘いまたは酸っぱいキャンディを期待して)は漿液(水っぽい)であり、分泌速度がより早い。2mlの非刺激唾液には、2mlの刺激唾液よりも、より多くのDNAが存在することがわかった。口をゆすいでから口から水がなくなるように約2、3分待った後、提供者はある量(例えば、1ml)の「非刺激」唾液を受けチューブに吐出すればよい。これが困難な場合は、DNAの安定性やその後の増幅を阻害しない、数粒のテーブル・シュガーまたはその他の同様の唾液刺激物質を使って、唾液流を適宜に活性化してもよい。

30

【0044】

本発明の方法は、唾液含有混合物を加熱するステップを選択的に含む。唾液サンプルの加熱(45～90の範囲)は、特に変性剤を併用した場合、「可逆的」変性剤として作用しうる。すなわち、熱による物理的な変性作用と組み合わせれば、化学的変性剤の濃度をより低くできることがわかった。したがって、本発明の方法の増幅ステップの前に含まれる選択的な加熱ステップは、DNAの放出を改良し、増幅反応の収率を向上させる。

40

【0045】

この方法に使用される組成物を、キットの形態で提供することによって、本発明の方法は都合よく実行される。このようなキットは好ましくは、適切な溶液、酵素、塩または浄化剤(またはこれらの相当物)を含む。少なくとも一種の標準が提供されてもよく、この標準は目的の遺伝子またはDNAの検出に有用な核酸(DNAまたはRNA)テンプレート、またはプライマーのどちらかを含みうる。

【0046】

選択的に、キットは国際出願番号WO03/104251に記載したような容器を含み、この容器は本発明の組成物を収容し、唾液の回収に適合する。

【0047】

50

本明細書に記載された発明のよりよい理解を得るために、以下に実施例を説明する。これらの実施例は、例示のためだけに示すものであることを理解されたい。したがって、これらは、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0048】

[実施例1] 指示事項に準じて被検者から唾液サンプルを採取するためのプロトコル

被検者は、最後の食事の前に30～60分間、待機するように指示される。被検者は、できるだけ歯磨きを使わずに歯をブラッシングする。被検者は、50mlの冷水またはぬるま湯で自分の口をゆすぐ。被検者は、口から水分がなくなるように2分間待つように求められ、その後、唾液量が1mlに達するまで、特別な回収チューブに唾液を吐出する。最後の食事の後に待機して口をゆすぐことが望ましいが、必ずしも必要ではない。唾液の回収は数分間かかってもよい。被検者が十分な唾液を吐出できないと感じたら、被験者は数粒の食用テーブル・シュガーを与えられ、少量の砂糖がチューブに吐出されても問題ないと告げられる。

10

【0049】

二つの組成物を比較する目的で提供者から2つ以上のサンプルを採取する場合、提供者は、2つ以上のチューブのそれぞれに、1mlになるまで交互に少量の唾液を吐出するように求められる。吐き出す過程を通じて唾液の組成が変化することがあり得るので、交互に吐出する必要がある。

20

【0050】

所定量の唾液が回収されると、唾液は1mlの含水組成物と混合される。含水組成物を正確に取り込む方法は容器の設計に依存する。含水組成物を取り込まれたらすぐに、容器の蓋で密閉する。DNA含有サンプルは、室温で少なくとも14日間保存することができる。14日間の間はいつでも、水溶液中のDNA含有サンプルの一部を、PCR反応系へ直接添加するためのDNAテンプレートとして使用できる。

【0051】

[実施例2] 唾液中のDNAの安定性、および加熱ステップを伴う唾液から抽出したDNAのPCR増幅

方法

実施例1で述べたプロトコルによって、1の提供者から唾液を回収し、唾液の個別サンプルを溶液と1:1で混合した。溶液は、20mMのCDTA、400mMのNaOAc(酢酸ナトリウム)、200mMのトリスHCl、0.05%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)からなり、pHを8.0に調整した。次に、この混合物に20μlのプロテイナーゼK(濃度1mg/ml)を添加した(最終濃度10μg/ml)。サンプルを攪拌混合して、その後室温(約24℃)にて放置した。1日経過時、14日経過時および365日経過時に、60℃で1時間インキュベーションした。その後、2μlの唾液/溶液サンプルを標準の50μlのPCR反応系に直接添加した。

30

【0052】

PCR条件

PCR反応は、Eppendorf Mastercycler<sup>TM</sup> グラディエントPCR装置で行った。全反応体積は50μlである。各反応は、Invitrogen PCR Mastermixに加えて、トリスHCl(pH8.0、最終濃度10mM)、MgCl<sub>2</sub>(最終濃度2mM)、4個のdNTPのそれぞれ1つ(最終濃度400μM)、チミジル酸生成酵素遺伝子の560bpの断片に対する10ピコモルの各PCRプライマー(順方向:5'-ATGCTTAGTAGGCAATTCTG-3'、逆方向:5'-TTTGGTTGTCAGCAGAGG-3')、および2ユニットのTaq DNAポリメラーゼを含む。

40

【0053】

熱サイクリング条件は、1分間94℃を1サイクル; 30秒間94℃、60秒間55℃、120秒間72℃を30サイクル; 4分間72℃を1サイクルで構成した。

【0054】

50

### アガロース・ゲル電気泳動

各PCR反応系からの8 $\mu$ lを、1%アガロース・ゲル上に載せた。100bpラダーをマーカーとした。電気泳動後、アガロース・ゲルを臭化エチジウム(1 $\mu$ g/ml、15min)で染色し、UVP Digi Doc-it<sup>TM</sup>システムを使用して、300nmの透照下で撮影した。

#### 【0055】

##### 概要

図1に示されるように、唾液からのDNAは、組成物と1:1で混合され、室温で1日、14日、および365日間保存されても安定していた。

#### 【0056】

[実施例3] 唾液中のDNAの安定性、および唾液から抽出したDNAのPCR増幅方法

実施例1で述べたプロトコルにより1の提供者から唾液を回収し、唾液サンプルのそれぞれを以下に示す各溶液と1:1で混合した。

#### 【0057】

- 水
- 100mM NaOH (水酸化ナトリウム)
- 100mM KOH (水酸化カリウム)
- 200mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (炭酸ナトリウム)

#### 【0058】

サンプルを攪拌混合して、その後室温(約24 $^{\circ}$ C)に放置した。1日経過時、7日経過時、14日経過時、21日経過時および365日経過時に、2 $\mu$ lの唾液/溶液サンプルを、50 $\mu$ lの標準PCR反応系に直接添加した。

#### 【0059】

##### PCR条件

PCR反応条件は実施例2と同じである。熱サイクリング条件は実施例2の場合と同じである。

#### 【0060】

##### アガロース・ゲル電気泳動

アガロース・ゲル電気泳動は、実施例2に示した通りに行った。

#### 【0061】

##### 概要

図2に示されたように、唾液からのDNAは、100mMのNaOH、100mMのKOHおよび200mMのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>と1:1で混合され、さらに室温で1日、7日、14日、21日、365日間保存されても、安定しており使用可能であった。

#### 【0062】

[実施例4] PCR反応を阻害しない水酸化ナトリウムの濃度の決定

##### 方法

それぞれ異なるNaOHの最終濃度となる、一連の9つの反応管を用意した。NaOHの最終濃度は、図3に示すように0~14mMまでの範囲にわたる。この範囲は、初期濃度50~400mMに相当する(すなわち、1mlの400mMのNaOHに、1mlの唾液を加え、次にこの混合物の2 $\mu$ lが50 $\mu$ lのPCR反応に使用される)。NaOHの影響だけを個別に観察するため、唾液を反応管に添加しなかった。

#### 【0063】

##### PCR条件

各反応系には、NaOHに加えて、KCl(最終濃度50mM)、トリスHCl(最終濃度30mM、pH8.4)、MgCl<sub>2</sub>(最終濃度2mM)、4個のdNTPのそれぞれ1つ(最終濃度400 $\mu$ M)、チミジル酸生成酵素遺伝子の560bpの断片に対する10ピコモルの各PCRプライマー(順方向:5'-ATGCTTAGTAGGCAATTCTG-3'、逆方向:5'-TTTGGTTGTCAGCAGAGG-3')、および2ユニットのTaq DNAポリメラーゼが含まれる

10

20

30

40

50

。50 ngの精製した対照ヒトDNA（採取した唾液から、Oragene<sup>TM</sup>を使用して精製して得た）をテンプレートとして添加した。PCR反応は、Eppendorf Mastercycler<sup>TM</sup> グラディエントPCR装置で行った。全反応体積は、50 µlである。熱サイクリング条件は実施例2の場合と同じである。

【0064】

アガロース・ゲル電気泳動

アガロース・ゲル電気泳動は、実施例2に記載したとおりに行った。

【0065】

概要

図3に示されるように、反応を強く阻害することなく、50 µlの従来PCR反応で許容されるNaOHの最高の最終濃度は8 mMであった。これは、初期濃度400 mMのNaOHに相当し、次に、このNaOH溶液は唾液サンプルで1:1に希釈されて、その後PCRに使用された。

10

【0066】

[実施例5] PCR反応を阻害しないNaOH/唾液混合物の体積の決定

方法

1 mlの唾液を1の提供者から回収し、同量の100 mMの水酸化ナトリウム溶液と混合した。このサンプルを攪拌混合後、室温で保存した。室温で7日間保存後、一定分量（アリコット、1~20 µlの範囲で調整）を標準の50 µlのPCR反応系に添加した。

【0067】

PCR条件

PCR条件は実施例2と同じである。全反応体積は、一定に50 µlに保たれた。熱サイクリング条件は実施例2と同じである。

20

【0068】

アガロース・ゲル電気泳動

アガロース・ゲル分析は、実施例2に記載したとおりに行った。

【0069】

概要

図4に示されるように、反応を阻害することなく、50 µlの従来PCR反応系に、10 µlまでのNaOH/唾液混合物を添加することができた。

30

【0070】

[実施例6] Oragene<sup>TM</sup>によるPCR反応の阻害

Oragene<sup>TM</sup> (DNA Genotek Inc.)は、唾液中のDNAを室温で安定化する水溶液を含む唾液回収装置である

方法

100 mMの水酸化ナトリウム、100 mMの水酸化カリウム、200 mMの炭酸ナトリウム、またはOragene<sup>TM</sup> DNA保存溶液を、蒸留水で1:1に希釈した。それぞれの希釈組成物の2 µlを標準のPCR反応系に添加した。

【0071】

PCR条件

PCR条件は実施例2と同じである。熱サイクリング条件は実施例2の場合と同じである。50 ngの精製したDNAを各反応にテンプレートとして添加した。

40

【0072】

アガロース・ゲル電気泳動

アガロース・ゲル分析は、実施例2に記載したとおりに行った。

【0073】

概要

図5に示されるように、Oragene<sup>TM</sup> DNA保存溶液はPCRを阻害する。対照的に本実施例は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよび炭酸ナトリウムの組成物は、反応を阻害することなく、PCR反応系に直接添加できることを示す。

50

## 【0074】

## [実施例7] 唾液からのDNA抽出の改良

French等 (French等 (2002) *Molecular and Cellular Probes*, 16: 319-326)は、採取直後の全唾液を水で1:1に希釈し、この混合物を定量的リアルタイムPCRに使用した。希釈した唾液サンプルは、希釈直後に使用するか、または4℃で(2~3日)または-20℃で保存した。リアルタイムPCRに使用できるサンプルからのDNAの算出濃度は、異なる個人から得たサンプル間で違いがあるが、0.1 ng/μl ~ 3.5 ng/μlであることがわかった。

## 【0075】

表I、IIおよびIIIの例は、唾液と水の混合物よりも、本発明の組成物により、より多くのDNAが使用できるようになることを示す。

10

## 【0076】

## 方法

1mlの唾液を1の提供者から回収し、1mlの100mMの水酸化ナトリウム、100mMの水酸化カリウム、200mMの炭酸ナトリウムまたは蒸留水と混合した。混合物を室温で保存した。1日経過時(表I)、14日経過時(表II)および365日経過時(表III)に、各混合物の1μlを、下記に述べるリアルタイムPCR反応系に直接添加した。

## 【0077】

さらに、同一提供者から1mlの唾液を回収し、20mMのCDTA、400mMのNaOAc(酢酸ナトリウム)、200mMのトリスHCl、および0.05%のSDSを含む、pH8.0に調整した溶液と混合した。唾液の回収後、保存する前に、20μlのプロテイナーゼK(濃度1mg/ml)を混合物に添加した(最終濃度10μg/ml)。サンプルを室温で保存した。1日経過時、14日経過時および365日経過時に、60℃で1時間インキュベーションした後に、1μlの上記混合物を下記のリアルタイムPCR反応系に直接添加した。

20

## 【0078】

## リアルタイムPCR条件

リアルタイムPCR反応は、Rotor-Gene<sup>TM</sup> 3000 リアルタイム・サーマル・サイクラー (Corbett Research)で行った。全反応体積は25μlである。

30

各反応系には、KCl(最終濃度50mM)、トリスHCl(20mM、pH8.4)、MgCl<sub>2</sub>(3mM)、4つのdNTPのそれぞれ1つ(400μM)、ヒトのチミジル酸生成酵素遺伝子の143bpの断片の5ピコモルの各プライマー(順方向プライマー: 5'-GCCCTCTGCCAGTTCTA-3'、逆方向プライマー: 5'-TTCAGGCCCGTGATGT-3')、2ユニットのTaq DNAポリメラーゼ、YBR Green I色素(Molecular Probes)が含まれる(最終濃度 1:25,000)。

## 【0079】

熱サイクリング条件は、5分間96℃を1サイクル; 20秒間95℃、20秒間55℃、30秒間72℃を40サイクル、とした。融解曲線分析条件は次のようにした。72℃で45秒後、1℃ずつ5秒きざみで、72℃から97℃まで上げる。

40

既知の濃度の精製したDNAを用いて、標準の曲線を作成した。

## 【0080】

## 結果

入力サンプルのDNA濃度は、標準の曲線を基準にして、Rotor Gene<sup>TM</sup> 3000ソフトウェアを用いて自動的に計算された。

## 【0081】

【表 1】

表I - 1日経過サンプルからのリアルタイムPCRの結果

組成物	リアルタイムPCRからのしきい値境界点 (Ct)	Ct値に基づく入力サンプルの算出DNA濃度 (ng/μl)
対照DNA、30ng/μl	21.06	26.80
対照DNA、15ng/μl	22.14	14.43
対照DNA、7.5ng/μl	23.21	7.84
対照DNA、3.75ng/μl	24.06	4.84
対照DNA、1.90ng/μl	25.83	1.76
対照DNA、1.00ng/μl	26.67	1.09
対照DNA、0.50ng/μl	28.31	0.43
テンプレートなし		0
水+唾液	34.6	0.01
CDTA/SDS/NaOAc/Tris+唾液	23.33	7.32
100mM水酸化ナトリウム+唾液	23.54	6.51
100mM水酸化カリウム+唾液	24.96	2.89
200mM炭酸ナトリウム+唾液	25.19	2.54

10

20

【0082】

30

## 【表 2】

表 I I - 14日経過サンプルからのリアルタイムPCRの結果

組成物	リアルタイムPCRからのしきい値境界点 (Ct)	Ct値に基づく入力サンプルの算出DNA濃度 (ng/μl)
対照DNA、30ng/μl	20.56	25.88
対照DNA、15ng/μl	21.2	17.71
対照DNA、7.5ng/μl	22.44	8.50
対照DNA、3.75ng/μl	23.97	3.45
対照DNA、1.90ng/μl	25.07	1.80
対照DNA、1.00ng/μl	26.19	0.92
対照DNA、0.50ng/μl	27.11	0.54
テンプレートなし		0
水+唾液	31.81	0.03
CDTA/SDS/NaOAc/Tris+唾液	23.62	4.23
100mM水酸化ナトリウム+唾液	23.01	6.06
100mM水酸化カリウム+唾液	24.12	3.15
200mM炭酸ナトリウム+唾液	24.02	3.35

【0083】

## 【表 3】

表 I I I - 365日経過サンプルからのリアルタイムPCRの結果

組成物	リアルタイムPCRからのしきい値境界点 (Ct)	Ct値に基づく入力サンプルの算出DNA濃度 (ng/μl)
対照DNA、30ng/μl	21.21	27.91
対照DNA、15ng/μl	22.11	16.32
対照DNA、7.5ng/μl	23.43	7.44
対照DNA、3.75ng/μl	24.68	3.52
対照DNA、1.9ng/μl	25.5	2.15
対照DNA、1.0ng/μl	26.81	0.99
対照DNA、0.5ng/μl	28.04	0.47
テンプレートなし	33.99	0.01
水+唾液		0
CDTA/SDS/NaOAc/Tris+唾液	23.51	7.07
100mM水酸化ナトリウム+唾液	26.06	1.54
100mM水酸化カリウム+唾液	26.48	1.20
200mM炭酸ナトリウム+唾液	25.35	2.35

【0084】

概要

この研究の目的は、DNAの保存に水だけを使用した場合と比較して、本発明の組成物により、DNAを保存するための性能の改良を実証することであった。本研究に使用したリアルタイムPCR技術は半定量的であり、この技術に存在する本質的なエラー度により、算出されたDNA濃度値が実際のDNA濃度に一致しない可能性があることを理解されたい。しかし、当業者には容易に理解されるものと思うが、この方法は試験したサンプル間の的確な比較を提供する。

【0085】

表I, IIおよびIIIに示されるように、唾液を水に1日、14日または365日間保存した場合、リアルタイムPCRによって検出可能なDNAはごくわずかである。対照的に、本発明の種々の組成物中のDNAの濃度は、1日経過時(表I)では2.54~7.32 ng/ $\mu$ l、14日経過時(表II)では3.15~6.06 ng/ $\mu$ l、365日経過時(表III)では1.20~7.07 ng/ $\mu$ lである。

10

【0086】

本明細書で言及したすべての刊行物、特許および特許出願は、本発明が関係する技術における当業者の技術レベルを示すものである。各々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが明確に示されていたならば、それと同一程度に、参照することにより本明細書に援用される。

【0087】

ここに記述した発明は、種々の変形がありうることは明らかであろう。このような変形は当業者には明らかであろうが、本発明の精神と範囲から逸脱するとみなすべきものではなく、すべて添付の請求の範囲に含まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】PCR生成物の電気泳動後、臭化エチジウムで染色されたアガロース・ゲルを示す。含水組成物と混合し、室温で1日、14日または365日間保存した唾液からのDNAの直接増幅を示す。PCRの前にサンプルを60°Cで1時間インキュベートした。アガロース・ゲル中の各レーンの内容は以下のとおりである。

【表4】

レーン#	記述
1	100bpマーカー
2	1日
3	14日
4	365日
5	100bpマーカー

30

【図2】PCR生成物の電気泳動後、臭化エチジウムで染色されたアガロース・ゲルを示す。下記に示す等体積の含水組成物と混合し、室温で1日、7日、14日または365日間保存した後の唾液からのDNAの直接増幅を示す。アガロース・ゲル中の各レーンの内容は以下のとおりである。

40

【表5】

レーン#	記述
1	100bpマーカー
2	水
3	100mM水酸化ナトリウム
4	100mM水酸化カリウム
5	200mM炭酸ナトリウム
6	100bpマーカー

50



【図3】PCR生成物の電気泳動後、臭化エチジウムで染色されたアガロース・ゲルを示す。精製したヒトDNAを含むPCR増幅反応系に対する、段階化した各NaOH濃度の影響を示す。アガロース・ゲル中の各レーンの内容は以下のとおりである。

【表6】

レーン#	NaOH(mM)の最終濃度
1	100bpマーカー
2	0
3	1
4	2
5	4
6	6
7	8
8	10
9	12
10	14
11	100bpマーカー

10

【図4】PCR生成物の電気泳動後、臭化エチジウムで染色されたアガロース・ゲルを示す。50 $\mu$ lのPCR増幅反応に対するNaOH/唾液混合物の体積の増加の影響を示す。アガロース・ゲル中の各レーンの内容は以下のとおりである。

20

【表7】

レーン#	NaOH+唾液( $\mu$ l)の体積
1	100bpマーカー
2	0
3	1
4	2
5	3
6	4
7	5
8	6
9	7
10	8
11	9
12	10
13	12
14	14
15	16
16	18
17	20
18	100bpマーカー

30

40

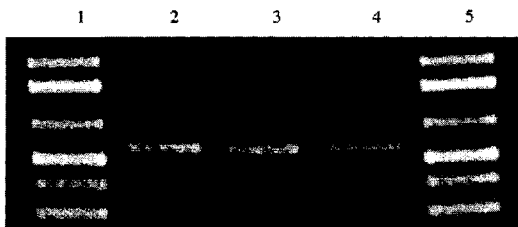
【図5】PCR生成物の電気泳動後、臭化エチジウムで染色されたアガロース・ゲルを示す。PCR増幅反応に対する、他の組成物と比較したOragene<sup>T M</sup>の阻害作用を示す。アガロース・ゲル中の各レーンの内容は以下のとおりである。

50

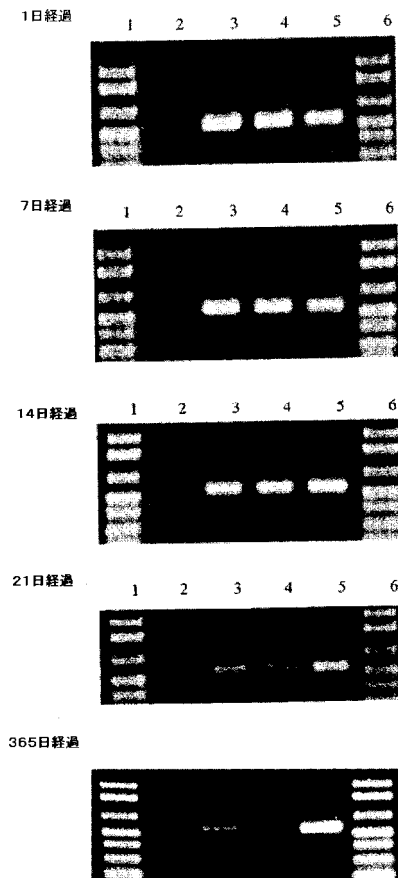
【表 8】

レーン#	記述
1	100bp マーカー
2	水
3	100mM 水酸化ナトリウム
4	100mM 水酸化カリウム
5	200mM 炭酸ナトリウム
6	Oragene 溶液
7	100bp マーカー

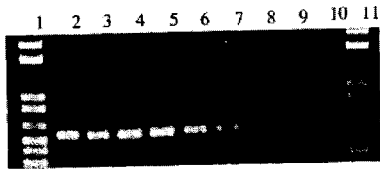
【図 1】



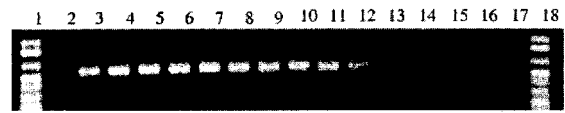
【図 2】



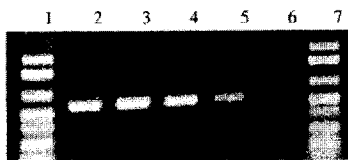
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成19年1月16日(2007.1.16)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

体液サンプルから核酸を抽出するための含水組成物であって、

前記サンプル内の前記核酸は、前記含水組成物と混合された後、室温で少なくとも14日間安定であり、

(a) (i) 変性剤と、(ii) キレート剤と、(iii) 緩衝剤と、(iv) プロテアーゼとを含むか、または(b) アルカリ金属水酸化物、可溶性アルカリ土類金属水酸化物、アルカリ金属酸化物または有機塩基である塩基性物質を含み、増幅反応混合物に、前記増幅反応混合物の総体積に対して少なくとも2% (vol./vol.) の量の前記組成物が添加されても、前記核酸の増幅は阻害されない、含水組成物。

【請求項2】

前記体液は唾液である、請求項1に記載の含水組成物。

【請求項3】

前記変性剤はSDSであり、前記キレート剤はCDTAであり、前記緩衝剤はトリスHClであり、前記プロテアーゼはプロテアーゼKである、請求項1または2に記載の含水組成物。

【請求項4】

0.05%のSDSと、20mMのCDTAと、200mMのトリスHCl pH8.0と、400mMのNaOAcと、10µg/mlのプロテアーゼKとを含む、請求項3に記載の含水組成物。

【請求項5】

前記塩基性物質は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、および炭酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項1または2に記載の含水組成物。

【請求項6】

前記塩基性物質は、50mM~400mMの濃度で存在する水酸化ナトリウムである、請求項5に記載の含水組成物。

【請求項7】

前記濃度は約100mMである、請求項6に記載の含水組成物。

【請求項8】

前記塩基性物質は、約100mMの濃度で存在する水酸化カリウムである、請求項5に記載の含水組成物。

【請求項9】

前記塩基性物質は、約200mMの濃度で存在する炭酸ナトリウムである、請求項5に記載の含水組成物。

【請求項10】

前記組成物は、核酸増幅混合物に、前記増幅反応混合物の全体積に対して2% (vol.) ~ 10% (vol.) の量を添加されたとき、核酸増幅を阻害しない、請求項6に記載の含水組成物。

【請求項11】

前記核酸は、室温で少なくとも365日間安定である、請求項2~10のいずれか一項に記載の含水組成物。

【請求項12】

( a ) 体液サンプルを、それと等体積の請求項 1 に記載の含水組成物に混合すること、および

( b ) ステップ ( a ) で得られた混合物の一部を P C R 増幅処理することを含む、体液からの D N A を直接増幅するための方法。

【請求項 1 3】

前記体液は唾液である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ ( a ) で得られた混合物は、室温で少なくとも 1 4 日間にわたり安定である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

ステップ ( a ) で得られた混合物は、室温で少なくとも 3 6 5 日間にわたり安定である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ステップ ( b ) の前に、約 1 5 ~ 6 0 分間、約 4 5 ~ 8 0 の温度で混合物を加熱するステップをさらに含む、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

( a ) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の含水組成物と、( b ) それを使用するための指示事項とを含む、体液からの D N A を増幅するためのキット。

【請求項 1 8】

前記体液は唾液である、請求項 1 7 に記載のキット。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/CA2006/000380
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: <i>C12N 15/10</i> (2006.01), <i>C12P 19/34</i> (2006.01), <i>C07H 1/06</i> (2006.01), <i>C12N 9/50</i> (2006.01), <i>C07H 21/04</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>C12N 15/10</i> (2006.01), <i>C12P 19/34</i> (2006.01), <i>C07H 1/06</i> (2006.01), <i>C12N 9/50</i> (2006.01), <i>C07H 21/04</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: PubMed, Delphion, Canadian Patent Database, STN (CAPus, BIOSIS) Keywords: nucleic acid, storage, preservation, forensic, archive, room temperature, CTDA, cyclohexanediamine tetraacetate, saliva, extraction, Bimboim		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/104251 A2 (BIRNBOIM, C.) December 18, 2003. see whole document	4 and 14
A	SEUTIN, G. <i>et al.</i> Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. Can. J. Zool. 1991. Vol. 69, No. 1, pages 82-90. see whole document.	4, 5 and 7-14
A	EP 1207208 A2 (McMILLIAN, R.) May 22, 2002. see whole document	4, 5 and 7-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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		Date of mailing of the international search report
6 June 2006 (06-06-2006)		6 July 2006 (06-07-2006)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001(819)953-2476		Authorized officer  Robin Green (819) 997-3077

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CA2006/000380

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO03104251 A2	18-12-2003	AU2003240327 A1	22-12-2003
		AU2003240327 A1	22-12-2003
		CA2488769 A1	18-12-2003
		EP1513952 A2	16-03-2005
		US2004038269 A1	26-02-2004
		WO03104251 A3	15-07-2004
		WO03104251 A9	11-03-2004
EP1207208 A2	22-05-2002	CA2437473 A1	20-02-2004
		EP1207208 A3	10-12-2003
		JP2002199899 A	16-07-2002
		JP2004159648 A	10-06-2004
		US7029840 B2	18-04-2006
		US2003113705 A1	19-06-2003

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2006/000380
--

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

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

1.  Claim Nos. :  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :
  
2.  Claim Nos. : 1-3, 6 and 15-21  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :  
  
See extra sheet (Continuation of Box No. II)
  
3.  Claim Nos. :  
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

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



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
**PCT/CA2006/000380**Continuation of Box II

Claims 1-3, 6 and 15-21 do not comply with Article 6 and Rule 6.3(a) of the PCT. The aqueous composition of claim 1 lacks clarity and is defined in terms of the desired result and not in terms of technical features that would allow one skilled in the art to ascertain what are the components of said aqueous composition. As such, claims dependent thereon (claims 2-3, 6 and 15-21) are also not sufficiently defined in terms of technical features. Further, the "basic agent" of claim 6 is indefinite and not fully supported over the full breadth of the meaning of term. For instance, a basic agent could comprise a basic protein. The application provides only support within the meaning of Article 6 and disclosure within the meaning of Article 5 of the PCT for the compositions defined in claims 4 and 7. Consequently, the search has been established for the parts of the application which appear to be clear and supported, namely an aqueous composition comprising a denaturing agent that is SDS, a chelator that is CTDA, a buffering agent that is Tris HCl and a protease that is proteinase K, as well as other compositions comprising as the basic agent, an alkali metal hydroxide, a soluble alkaline earth metal hydroxide, an alkali metal oxide or an organic base.

## フロントページの続き

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

(72)発明者 イワショウ ラファル

カナダ国 ケー2ジェイ 2エイチ3 オンタリオ オタワ チェスター クレセント 8

(72)発明者 シャルティエ ジョアンヌ

カナダ国 ケー0エー 3エル0 オンタリオ ホワイト レイク アールアール# 1

(72)発明者 レム ポール

カナダ国 ケー1エヌ 8ワイ6 オンタリオ オタワ ヨーク ストリート 302-145

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 HA14