

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-83114

(P2006-83114A)

(43) 公開日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 07 H 1/08 (2006.01)	C O 7 H 1/08	4 C O 5 7
C 07 H 21/02 (2006.01)	C O 7 H 21/02	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2004-270657 (P2004-270657)	(71) 出願人	501387839 株式会社日立ハイテクノロジーズ 東京都港区西新橋一丁目24番14号
(22) 出願日	平成16年9月17日 (2004.9.17)	(74) 代理人	100075096 弁理士 作田 康夫
		(74) 代理人	100100310 弁理士 井上 学
		(72) 発明者	山下 善寛 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立ハイテ クノロジーズ那珂事業所内
		(72) 発明者	桜井 智也 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立ハイテ クノロジーズ那珂事業所内
		Fターム(参考)	4C057 AA05 AA10 BB02 DD01 MM02

(54) 【発明の名称】 核酸抽出方法、及び核酸遊離方法

(57) 【要約】

【課題】

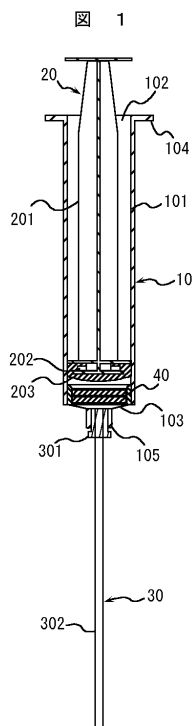
本発明の目的は、簡便かつ短時間に、生物材料から核酸を遊離し、抽出することに関する。

【解決手段】

本発明は、細胞を含む生物材料を固相担体に通過させて細胞を単離し、この細胞と細胞溶解試薬との混合液を当該固相担体に通過させて細胞中の核酸を遊離し、この遊離核酸と核酸結合試薬との混合液を当該固相担体に通過させて核酸を固相担体に結合させる核酸抽出技術に関する。

固相担体を備えた器具としては、例えば、シリンジ内部に固相担体を固定した器具であり、シリンジによる加減圧により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。

固相担体は、好ましくは、その内部に多数の通水路を有する固相や、繊維状物質から構成されるメッシュ状固相であり、細胞を含む生体試料から細胞を溶解し核酸を遊離、核酸を結合することができるものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸抽出方法であって、

細胞を含む生物材料を多孔性固相に通過させ、

前記多孔性固相に捕捉された細胞と、細胞を溶解する溶解試薬とを混合し、得られた第 1 混合液を前記多孔性固相に通過させ、

前記細胞から遊離した核酸を含む前記第 1 混合液と、前記多孔性固相へ核酸を結合させる結合試薬とを混合し、得られた第 2 混合液を前記多孔性固相に通過させる方法。

【請求項 2】

請求項 1 において、前記多孔性固相の最大孔径が 2 ~ 20 μm である核酸抽出方法。 10

【請求項 3】

請求項 1 において、その内部を区画するように前記多孔性固相を内蔵する配管を用い、圧力変化により配管の一端から前記生物材料、前記第 1 混合液、および前記第 2 混合液を吸引排出する核酸抽出方法。

【請求項 4】

請求項 1 において、その内部を区画するように前記多孔性固相を内蔵する配管を用い、遠心力により配管の一方から他方へ生物材料、前記第 1 混合液、および前記第 2 混合液を通過させる核酸抽出方法。

【請求項 5】

請求項 1 において、前記多孔性固相が、ガラス繊維濾紙、ガラス粒子、シリカ粒子、又はシリカールを含む核酸抽出方法。 20

【請求項 6】

請求項 1 において、前記多孔性固相が、前記多孔性固相が、ポリプロピレンの繊維や粒子、ポリエステル繊維や粒子、又はナイロンの繊維や粒子を含む核酸抽出方法。

【請求項 7】

請求項 1 において、前記細胞を含む生物材料が全血であり、前記細胞が白血球であり、前記核酸が RNA である核酸抽出方法。

【請求項 8】

核酸抽出方法であって、

細胞と、細胞を溶解する溶解試薬とを混合し、得られた第 1 混合液を前記多孔性固相に通過させ、 30

前記細胞から遊離した核酸を含む前記第 1 混合液と、前記多孔性固相へ核酸を結合させる結合試薬とを混合し、得られた第 2 混合液を前記多孔性固相に通過させる方法。

【請求項 9】

請求項 8 において、前記多孔性固相の最大孔径が 2 ~ 20 μm である核酸抽出方法。

【請求項 10】

請求項 8 において、その内部を区画するように前記多孔性固相を内蔵する配管を用い、圧力変化により配管の一端から前記生物材料、前記第 1 混合液、および前記第 2 混合液を吸引排出する核酸抽出方法。

【請求項 11】

請求項 8 において、その内部を区画するように前記多孔性固相を内蔵する配管を用い、遠心力により配管の一方から他方へ生物材料、前記第 1 混合液、および前記第 2 混合液を通過させる核酸抽出方法。 40

【請求項 12】

請求項 8 において、前記多孔性固相が、ガラス繊維、ガラス粒子、シリカ粒子、又はシリカールを含む核酸抽出方法。

【請求項 13】

請求項 8 において、前記細胞が白血球であり、前記核酸が RNA である核酸抽出方法。

【請求項 14】

核酸遊離方法であって、

細胞を含む生物材料を多孔性固相に通過させ、

前記多孔性固相に捕捉された細胞と、細胞を溶解する溶解試薬とを混合し、得られた混合液を前記多孔性固相に通過させる方法。

【請求項 15】

請求項 14 において、前記多孔性固相の最大孔径が 2 ~ 20 μm である核酸遊離方法。

【請求項 16】

請求項 14 において、その内部を区画するように前記多孔性固相を内蔵する配管を用い、圧力変化により配管の一端から前記生物材料、および前記混合液を吸引排出する核酸遊離方法。

【請求項 17】

請求項 14 において、その内部を区画するように前記多孔性固相を内蔵する配管を用い、遠心力により配管の一方から他方へ生物材料、および前記混合液を通過させる核酸遊離方法。

【請求項 18】

請求項 14 において、前記多孔性固相が、ガラス繊維、ガラス粒子、シリカ粒子、又はシリカールを含む核酸遊離方法。

【請求項 19】

請求項 14 において、前記多孔性固相が、ポリプロピレンの繊維や粒子、ポリエステル繊維や粒子、又はナイロンの繊維や粒子を含む核酸遊離方法。

【請求項 20】

請求項 14 において、前記細胞を含む生物材料が全血である核酸遊離方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物材料からの核酸抽出技術に関する。例えば、全血に含まれる白血球から、RNA を回収する技術に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸の分析により得られる遺伝子情報は、医療、臨床検査、医薬品産業、食品産業等の様々な分野で活用されている。この核酸分析には、血液、血清、尿、等の生物材料に含まれる細胞から核酸を単離・精製する核酸抽出操作が必須の前処理となり、核酸の性状を劣化させる物質や核酸分析の阻害要因物質を含まない高い精製度で抽出された核酸が要求される。

【0003】

核酸抽出方法としては、非特許文献 1 に報告されるカオトロピック剤の存在下で核酸がシリカに結合する性質に基づいた方法、あるいは、特許文献 1、特許文献 2 に報告される有機溶媒の存在下で核酸がシリカに結合する性質に基づいた方法が一般的である。

【0004】

しかし、高精製度の核酸を抽出する為には、生物材料から細胞を単離し、細胞を溶解して核酸を遊離状態とした後に、核酸抽出を行うことが好ましい。

【0005】

そこで、例えば、非特許文献 2 では、血液から赤血球を除去した後に、単離された白血球から RNA を抽出する核酸抽出技術を開示している。具体的には、血液中の赤血球を赤血球溶解液で溶解した後、遠心分離操作で白血球を単離する。その後、単離された白血球にタンパク質変性作用と RNA 分解酵素不活性化作用をもつカオトロピック塩溶液を添加し、機械的ホモジナイザーを用いて白血球を溶解する。そして、白血球溶解液にエタノールを添加し、シリカ質の固相担体と接触させて RNA を固相担体に結合させ、固相担体から不純物を洗浄・除去した後、RNA を溶離する。

【0006】

【特許文献 1】特開 2001 - 95572 号公報

10

20

30

40

50

【特許文献2】特開2002-360245号公報

【非特許文献1】B. Vogelstein and D. Gillespie, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76 (2), 615-619(1979)

【非特許文献2】QIAamp RNA Blood Mini プロトコールとトラブルシューティング、2000年10月

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

非特許文献2開示の核酸抽出方法は、高精製度の核酸を得られることができるが、遠心分離機、機械的ホモジナイザー及び核酸抽出器具等、異なる装置や器具を用いる必要がある為、核酸抽出操作が複雑であり、核酸抽出に時間を要する。核酸抽出に時間を要する程、抽出核酸の性状劣化という問題も顕在化してくる。

10

【0008】

そこで、本発明の目的は、簡便かつ短時間に、生物材料から核酸を遊離し、抽出することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、細胞を含む生物材料を固相担体に通過させて細胞を単離し、この細胞と細胞溶解試薬との混合液を当該固相担体に通過させて細胞中の核酸を遊離し、この遊離核酸と核酸結合試薬との混合液を当該固相担体に通過させて核酸を固相担体に結合させる核酸抽出技術に関する。

20

【0010】

また、本発明は、細胞と細胞溶解試薬との混合液を固相担体に通過させて細胞中の核酸を遊離させ、この遊離核酸と核酸結合試薬との混合液を当該固相担体に通過させて核酸を固相担体に結合させる核酸抽出技術に関する。

【0011】

また、本発明は、細胞を含む生物材料を固相担体に通過させて細胞を単離し、この細胞と細胞溶解試薬との混合液を当該固相担体に通過させて細胞中の核酸の遊離する核酸遊離技術に関する。

【0012】

固相担体を備えた器具としては、例えば、シリンジ内部に固相担体を固定した器具、チップ先端部に固相担体を固定した器具、又は遠心分離器に施すスピンカラムに固相担体を固定した器具等である。シリンジ内部に固相担体を固定した器具は、シリンジによる加減圧により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。また、チップ先端部に固相担体を固定した器具は、チップに接続したピペッターやシリンジによる加減圧により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。また、遠心分離器に施すスピンカラムに固相担体を固定した器具は、遠心分離により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。

30

40

【0013】

固相担体は、好ましくは、その内部に多数の通水路を有する固相や、繊維状物質から構成されるメッシュ状固相であり、細胞を含む生体材料から細胞を捕捉することができるものである。また、好ましくは、カオトロピック物質等を含む核酸結合試薬の作用により、核酸を結合させることができるものである。例えば、ガラス繊維、ガラス粒子、シリカ粒子、シリカウール、あるいは、それら破砕物、ケイソウ土など、酸化ケイ素を含有する物質で構成され、最大孔径2~20 μm の多孔を有するものが好ましい。また、これらに、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン等の繊維や粒子で構成され、最大孔径2~20 μm の多孔を有するものを組み合わせても良い。

【発明の効果】

50

【0014】

本発明により、生物材料からの核酸遊離や核酸抽出を、容易且つ迅速に行える。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、上記及びその他の本発明の新規な特徴と効果について、図面を参酌して説明する。尚、図面はもっぱら説明の為であって、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0016】

本実施例は、生物材料から細胞を単離する第1工程、細胞を溶解して核酸を遊離状態とする第2工程、核酸を固相担体に結合させて、不純物を洗浄・除去し、固相担体から核酸を溶離する第3工程、で構成される核酸抽出方法である。本実施例では、第1工程と第2工程と第3工程を1つの固相担体を保持した器具により実施して、操作を簡素化し、核酸抽出を短時間で実現している。別の観点で言えば、第1工程と第2工程を、所定の固相担体を保持した器具により実施して、操作を簡素化し、核酸遊離を短時間で実現している。別の観点で言えば、第2工程と第3工程を、所定の固相担体を保持した器具により実施して、操作を簡素化し、核酸抽出を短時間で実現している。

10

【0017】

本実施例に用いる固相担体を備えた器具は、例えば、シリンジ内部に固相担体を固定した器具、チップ先端部に固相担体を固定した器具、又は遠心分離器に施すスピncラムに固相担体を固定した器具等である。シリンジ内部に固相担体を固定した器具は、シリンジによる加減圧により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。また、チップ先端部に固相担体を固定した器具は、チップに接続したピペッターやシリンジによる加減圧により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。また、遠心分離器に施すスピncラムに固相担体を固定した器具は、遠心分離により、固相担体により隔てられた一方の空間から他方の空間へと溶液を移動させ、固相担体に溶液を通過させることができる。

20

【0018】

固相担体としては、ガラス繊維、ガラス粒子、シリカ粒子、シリカウール、あるいは、それら破砕物、ケイソウ土など、酸化ケイ素を含有する物質で構成され、最大孔径2 ~ 20 μm の多孔を有するものが好ましい。また、これらに、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン等の繊維や粒子で構成され、最大孔径2 ~ 20 μm の多孔を有するものを組み合わせても良い。

30

【0019】

尚、第1工程と第2工程のみを所定の固相担体を保持した器具により実施する場合においては、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン等の繊維や粒子で構成され、最大孔径2 ~ 20 μm の多孔を有するものを単独で用いることもできる。

【0020】

以下、本実施例に係る核酸抽出の基本的手順と、核酸抽出に用いる試料や試薬について説明する。

40

【0021】

第1工程は、生物材料から細胞を単離する工程である。第1工程では、固相担体を保持した器具により、固相担体を隔てる一方の空間から他方の空間へと溶液状態の生物材料を固相担体の内部を通過させ、固相担体の表面、及び内部に生物材料に含まれる細胞を捕捉する。

【0022】

核酸を有する細胞を含む生物材料としては、白血球を含む全血、細菌類を含む喀痰、尿、糞便、培養細菌等、或いは、培養細胞等である。例えば、全血においては、全血に含まれる白血球のDNA、あるいはRNAが対象となり、全血から白血球を単離する場合、塩化アンモニウム溶液や食塩水等で赤血球を溶解する前処理を行うことが好ましい。

50

【 0 0 2 3 】

第2工程は、細胞を溶解して核酸を遊離状態とする工程である。第2工程では、第1工程を終えた器具について、固相担体を隔てる一方の空間から他方の空間へとカオトロピック剤を含む溶液を固相担体の内部を通過させる。これにより、固相担体に捕捉された細胞を同溶液で湿潤させて、細胞を化学的に溶解し、これと同時に、固相担体と接触させて物理的に溶解を促進し、核酸を遊離状態とする。

【 0 0 2 4 】

カオトロピック剤としては、ヨウ化ナトリウム，ヨウ化カリウム，チオシアン酸ナトリウム，チオシアン酸グアニジン，塩酸グアニジンを用いる。また、カオトロピック剤に加えて、界面活性剤やタンパク質分解酵素を添加しても良い。

10

【 0 0 2 5 】

第3工程は、核酸を固相担体に結合させて、不純物を洗浄・除去し、固相担体から核酸を溶離する工程である。第3工程では、第2工程を終えたカオトロピック剤を含む溶液に、有機溶媒を添加，混合する。そして、第2工程を終えた器具について、固相担体を隔てる一方の空間から他方の空間へと遊離状態の核酸とカオトロピック剤と有機溶媒を含む混合溶液を固相担体の内部を通過させる。これにより、固相担体に核酸を結合する。有機溶媒としては、脂肪族アルコール，脂肪族エーテル，脂肪族エステル，脂肪族ケトンの中から選ばれた2から10個の炭素数を有する化合物の1種または2種以上の組み合わせが使用可能である。脂肪族アルコールとして、好ましくは、エタノール，イソプロパノール，プロパノール，ブタノールを用いる。脂肪族エーテルとして、好ましくは、エチレングリ

20

【 0 0 2 6 】

次いで、核酸を結合した器具について、固相担体を隔てる一方の空間から他方の空間へと洗浄溶液を固相担体の内部を通過させる。これにより、固相担体に結合した不純物を洗浄，除去する。洗浄溶液としては、固相担体に結合した核酸を溶離せず、且つ、非特異的

30

【 0 0 2 7 】

次いで、不純物を洗浄，除去した上記器具について、固相担体を隔てる一方の空間から他方の空間へと溶離溶液を固相担体の内部を通過させる。これにより、固相担体に結合した核酸を溶離する。溶離液としては、固相担体に結合した核酸を効率的に溶離し、且つ、核酸の性状を劣化させない為に、核酸分解酵素除去、あるいは核酸分解酵素失活化処理を行った純水や低塩濃度緩衝液などを用いる。

【 0 0 2 8 】

〔 実験 1 〕

本実験では、固相担体を保持した器具として、固相担体を保持した抽出用シリンジを用い、全血からRNAを抽出した。以下、その内容について説明する。

40

【 0 0 2 9 】

< 固相担体を保持した器具 >

図1に、抽出用シリンジの概略断面図を示す。図2に、抽出用シリンジの概略斜視図を示す。図3に、抽出用シリンジに固定された固相担体の概略断面図を示す。以下、図1から図3を参照し、抽出用シリンジについて説明する。

【 0 0 3 0 】

抽出用シリンジは、テルモ社製30mlシリンジ(ロックタイプ)のシリンジ内部に固

50

相担体を固定した器具である。抽出用シリンジは、シリンジ本体 10、プランジャ 20、ノズル 30 及び固相担体ユニット 40 から構成される。ノズル側を下側、プランジャ側を上側と称する。

【0031】

シリンジ本体 10 は、円筒状の円筒部 101 と、上端の開口部 102 と、下端の底部 103 と、開口部 102 の周囲に設けられた罫形の保持部 104 と、底部 103 に設けられたノズルを接続するための接続部 105 とを有する。

【0032】

プランジャ 20 は、プランジャ本体 201 とシールピース 203 とを有する。シールピース 203 は、プランジャ本体 201 とは別個の部材として形成され、プランジャ本体 201 の下端の取り付け部 202 に取り付けられる。シールピース 203 は、下端に円錐状の突起 204 を有する。

10

【0033】

ノズル 30 は、上端の接続部 301 とそれより下方に延びる筒状部 302 とを有する。ノズルの接続部 301 とシリンジ本体の接続部 105 は、ねじによって接続される。

【0034】

シリンジ本体 10 及びプランジャ本体 201 はポリプロピレン、シールピース 203 はゴム、ノズル 30 はステンレスによって形成される。

【0035】

固相担体ユニット 40 は、円板状の固相担体 41、固相担体 41 の上側及び下側に配置された 2 つの円板状の保持部材 42、43 及び円筒状のホルダ 44 から構成される。保持部材 42、43 及び円筒状のホルダ 44 はポリプロピレンによって形成される。

20

【0036】

固相担体 41 は、Whatman 社製ガラス繊維ろ紙 (GMF 150) を構成する疎層を分取し、これを 2 枚重ね合わせた状態で、ポンチ状のカッターによって円板形状に打ち抜いたものを用いる。尚、ガラス繊維ろ紙 (GMF 150) は、 $2.0 \mu\text{m}$ の粒子保持能を有し、最大孔径が $2.0 \mu\text{m}$ 程度の密層と、最大孔径が約 $10 \mu\text{m}$ 程度の疎層で構成されている。本実験では、固相担体を保持した器具により、溶液を複数回、吸引・排出する為、疎層のみを用いることで通液性を高め、且つ、複数枚を重ね合わせることで細胞捕捉効率を高めている。

30

【0037】

< 生物材料 >

生物材料としては、白血球を含むヒト全血を用い、白血球の RNA を抽出対象とする。

【0038】

< 試薬 >

赤血球溶解液：155 mM NH_4Cl ，10 mM KHCO_3 ，0.1 mM EDTA

カオトロピック溶液：4 M チオシアン酸グアニジン，8 mM MES - KOH (pH

5.5)

有機溶媒：50% ジエチレングリコールジメチルエーテル水溶液

洗浄液：80% EtOH 水溶液

40

溶離液：10 mM Tris - HCl (pH 8.0)，0.1 mM EDTA

【0039】

< 容器 >

抽出用容器：50 ml 遠沈管 (ポリプロピレン製)

精製品用容器：5 ml 遠沈管 (ポリプロピレン製)

【0040】

< 核酸抽出工程 >

核酸抽出工程の手順を以下に示す。

1. 抽出用容器にヒト全血 2 ml を分注する。

2. 抽出用容器に赤血球溶解液 10 ml を添加し、ヒト全血と混合する。

50

3. 混合液を氷上で5分間インキュベートする。
4. 混合液を抽出用シリンジで吸引・排出し、溶液を廃棄する。
5. カオトロピック溶液2mlを抽出用シリンジで5回、吸引・排出し、抽出用容器に排出する。
6. 抽出用容器に排出したカオトロピック溶液に有機溶媒2mlを添加し、混合する。
7. 混合液を抽出用シリンジで5回、吸引・排出し、溶液を廃棄する。
8. 洗浄液10mlを抽出用シリンジで3回、吸引・排出し、溶液を廃棄する。
9. 洗浄液10mlを抽出用シリンジで3回、吸引・排出し、溶液を廃棄する。
10. 溶離液2mlを抽出用シリンジで10回、吸引・排出し、溶液を精製品用容器へ排出する

10

【0041】

<抽出結果>

本実験による抽出核酸の濃度及び純度、また抽出操作の所要時間を表1に示す。核酸濃度は従来法と比較して若干低値となり、核酸純度は同等であった。所要時間は従来法から大幅に短縮した。ただし、従来法としては、QIAGEN社製RNA抽出キット(QIAamp RNA Blood Mini Kit)を用い、取り扱い説明書に従った抽出操作を行った。具体的には、遠心分離器を用いて血液から白血球を単離し、スピнкаラム方式の細胞破碎器具を用いて白血球を溶解し、スピнкаラム方式の固相担体を保持した器具を用いて核酸の結合、洗浄、及び溶離、を行った。尚、抽出核酸の濃度は、核酸の極大吸収波長260nmの吸光度を分光光度計により測定し、 $1 A_{260} = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ として算出した。また、核酸純度は、不純物であるタンパク質の吸収波長280nmの吸光度と、260nmの吸光度の比(A_{260} / A_{280})として算出した。一般的に核酸精製度が高い場合、 A_{260} / A_{280} の値は1.7~1.9となる。

20

【0042】

従来、全血からRNAを抽出する場合は、遠心分離機、機械的ホモジナイザー、核酸精製キット等の器具を各工程で用いる必要があった為、抽出操作が複雑であり、操作に長時間を要した。しかし、本実験では、抽出シリンジという単一の器具により全工程を行うことにより、抽出操作を簡素化し、操作に要する時間を大幅に短縮できた。また、この操作所要時間の短縮は、RNA分解酵素による抽出操作中のRNAの性状劣化を軽減する効果も持つ。従って、抽出核酸濃度が従来法と比較して低値となったが、操作が簡素化され、抽出操作に要する時間が大幅に短縮されたことの効果は大きい。

30

【0043】

[実験2]

本実験では、固相担体を保持した器具として、側面孔を有し、固相担体を保持した抽出用シリンジを用い、全血からRNAを抽出した。以下、この内容について、実験1との相違点を中心に説明する。

【0044】

<固相担体を保持した器具>

図4に、側面孔付抽出用シリンジの概略断面図を示す。図5に、側面孔付抽出用シリンジの概略斜視図を示す。以下、図4及び図5を参照し、抽出用シリンジについて説明する

40

【0045】

側面孔付抽出用シリンジは、[実験1]の抽出用シリンジにおいて、シリンジ本体10の円筒部101の側面に側面孔50を追加加工し、固相担体41を変更したものである。

【0046】

側面孔付抽出用シリンジの側面孔50は、固相担体ユニット40の最上部より高く、且つ、プランジャ20を最上部まで上げた状態でのシールピース203の円錐状突起204の最下部より低くなる位置に設けられている。また、側面孔50の直径は、ピペット等の先端部が入るような大きさである。側面孔付抽出用シリンジは、プランジャ20を最上部まで上げた状態で、側面孔50からピペット等を用いて、シリンジ本体10の内部に溶液

50

を注入できる。また、次いで、プランジャ 20 を下げることにより、注入された溶液を、固相担体を通過させて排出できる。

【0047】

固相担体 41 は、Whatman社製ガラス繊維ろ紙 (GMF 150) をポンチ状のカッターによって円板形状に打ち抜いたものを用いる。尚、ガラス繊維ろ紙 (GMF 150) を構成する密層と疎層の疎相側が上部となるように、固相担体ユニット 40 に設置する。本実験では、固相担体を保持した器具により、溶液を一方向で排出する為、密層を用いることで細胞捕捉効率を高め、且つ、疎層を密層の上部側に設置することで固相担体の目詰りを防止している。

【0048】

10

< 生物材料 >

実験 1 と同じである。

【0049】

< 試薬 >

赤血球溶解液：155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA
カオトロピック溶液：4 M チオシアン酸グアニジン , 8 mM MES - KOH (pH 5.5)

有機溶媒：50% ジエチレングリコールジメチルエーテル水溶液

洗浄液：80% EtOH 水溶液

溶離液：10 mM Tris - HCl (pH 8.0) , 0.1 mM EDTA

20

【0050】

< 容器 >

実験 1 と同じである。

【0051】

< 核酸抽出工程 >

核酸抽出工程の手順を以下に示す。

1. 抽出用容器にヒト全血 2 ml を分注する。
2. 抽出用容器に赤血球溶解液 10 ml を添加し、ヒト全血と混合する。
3. 混合液を氷上で 5 分間インキュベートする。
4. 側面孔付抽出用シリンジのプランジャを最上部まで引き上げた状態で、ピペットを用いて混合液を側面孔からシリンジ内部に注入する。 30
5. 側面孔付抽出用シリンジのプランジャを下方に押し、シリンジ内部の混合液を排出する。
6. 側面孔付抽出用シリンジのプランジャを最上部まで引き上げた状態で、ピペットを用いて赤血球溶解液を側面孔からシリンジ内部に注入する。
7. 側面孔付抽出用シリンジのプランジャを下方に押し、シリンジ内部の赤血球溶解液を排出する。
8. カオトロピック溶液 2 ml を抽出用シリンジで 5 回、吸引・排出し、抽出用容器に排出する。
9. 抽出用容器に排出したカオトロピック溶液に有機溶媒 2 ml を添加し、混合する。 40
10. 混合液を抽出用シリンジで 5 回、吸引・排出し、溶液を廃棄する。
11. 洗浄液 10 ml を抽出用シリンジで 3 回、吸引・排出し、溶液を廃棄する。
12. 洗浄液 10 ml を抽出用シリンジで 3 回、吸引・排出し、溶液を廃棄する。
13. 溶離液 2 ml を抽出用シリンジで 10 回、吸引・排出し、溶液を精製品用容器へ排出する。

【0052】

< 抽出結果 >

本実験による抽出核酸の濃度及び純度、また抽出操作の所要時間を表 1 に示す。核酸濃度は、[実験 1] に比較して増加し、従来法とほぼ同等となった。核酸純度と所要時間は、[実験 1] と同等であった。

50

【0053】

本実験では、側面孔付抽出用シリンジを用いることにより、血液からの白血球単離の工程において、血液と赤血球溶解液の混合液を、シリンジ内部から外部へと一方向で、密な孔径の固相担体を通過させている。これにより、白血球の単離効率が向上し、抽出核酸の濃度が増加した。

【0054】

[実験3]

本実験では、固相担体を保持した器具として、固相担体を保持した抽出用スピncラムを用い、全血からRNAを抽出した。以下、この内容について、実験1, 2との相違点を中心に説明する。

【0055】

<固相担体を保持した器具>

図6に、抽出用スピncラムの概略断面図を示す。図7に、抽出用スピncラムの概略斜視図を示す。以下、図6及び図7を参照し、抽出用スピncラムについて説明する。

【0056】

抽出用スピncラムは、カラム本体60, 固相担体ユニット40, 溶液受け容器70から構成される。カラム本体側を下側、溶液受け容器側を上側と称する。

【0057】

カラム本体60は、円筒状の円筒部101と、上端の開口部102と、下端の底部103と、開口部102の周囲に設けられた鐳形の保持部104を有する。

【0058】

固相担体ユニット40は、抽出用シリンジと同様である。

【0059】

溶液受け容器70は、円筒状の円筒部701と、上端の開口部702と、下端の底部703を有する。円筒部701の内径はカラム本体の円筒部101の外径より大きく、また、上端の開口部702の外径は、鐳形の保持部104の短径よりも小さい。

【0060】

カラム本体60及び溶液受け容器70はポリプロピレンによって形成される。

【0061】

抽出用スピncラムのカラム本体60の内部に溶液を注入し、遠心分離機に施すことにより、カラム本体内部の溶液は固相担体を通過して、カラム本体60の開口部から溶液受け容器へと落下する。尚、固相担体は、実験2と同じである。

【0062】

<生物材料>

実験1と同じである。

【0063】

<試薬>

実験1と同じである。

【0064】

<容器>

実験1と同じである。

【0065】

<遠心分離機>

遠心分離機：Himac CR5B2（日立工機）

【0066】

<核酸抽出工程>

核酸抽出工程の手順を以下に示す。

1. 抽出用容器にヒト全血2mlを分注する。
2. 抽出用容器に赤血球溶解液10mlを添加し、ヒト全血と混合する。
3. 混合液を氷上で5分間インキュベートする。

10

20

30

40

50

4. 混合液を抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
5. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、200×gで1分間遠心する。
6. 溶液受けの溶液を廃棄し、赤血球溶解液5mlを抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
7. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、300×gで1分間遠心する。
8. 溶液受けの溶液を廃棄し、カオトロピック溶液2mlを抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
9. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、2000×gで2分間遠心する。
10. 溶液受けの溶液に有機溶媒2mlを添加，混合し、抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
11. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、2000×gで2分間遠心する。
12. 溶液受けの溶液を廃棄し、洗浄液10mlを抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
13. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、2000×gで2分間遠心する。
14. 溶液受けの溶液を廃棄し、洗浄液10mlを抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
15. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、3000×gで5分間遠心する。
16. 溶液受けの溶液を廃棄し、新しい溶液受け容器を設置し、溶離液2mlを抽出用スピカラム上部からカラム本体内部に注入する。
17. 抽出用スピカラムを遠心分離機に設置し、2000×gで2分間遠心する。
18. 溶液受けの溶液を精製品用容器へ分注する。

10

20

【0067】

< 抽出結果 >

本実験による抽出核酸の濃度及び純度、また抽出操作の所要時間を表1に示す。抽出核酸の濃度，純度は、実験2とほぼ同等であった。所要時間は、実験1と比較して長い。

【0068】

本実験では、抽出用スピカラムを用いることにより、遠心分離器により、全工程の溶液をカラム本体内部から外部へと一方向で密な孔径の固相担体を通過させている。これにより、所要時間は実験1と比較して延長されるが、実験1のような吸排操作が不要であり、操作労力は軽減される。

30

【0069】

[実験4]

本実験では、固相担体を保持した器具として、固相担体を保持した単離・溶解用シリンジを用い、全血から白血球を単離し、白血球を溶解してRNAを遊離した後、RNA抽出キットによりRNAを抽出した。以下、この内容について、実験1，2，3との相違点を中心に説明する。

【0070】

< 固相担体を保持した器具 >

本実験に用いた固相担体を保持した単離・溶解用シリンジは、実験2の側面孔付抽出用シリンジにおいて、固相担体41をポリプロピレン微細繊維の集合体で構成され、最大孔径が約5μmと測定されるフィルタ状としたものである。本実験では、単離・溶解用シリンジの固相担体により、白血球の捕捉と溶解のみを行っており、核酸の結合は行っていない。従って、固相担体としては、カオトロピック剤や有機溶媒の存在下で核酸との結合能を有するガラス繊維ろ紙を用いずに、白血球の捕捉能と溶解能を有するポリプロピレン繊維によるフィルタを用いた。ポリプロピレンの他、ポリエステル，ナイロン等は細胞吸着性を有する為、ガラス繊維ろ紙等の固相担体と比較して、白血球の捕捉効率が高い。

40

【0071】

< 生物材料 >

実験1と同じである。

【0072】

50

< 試薬 >

赤血球溶解液：155 mM NH_4Cl ，10 mM KHCO_3 ，0.1 mM EDTA

カオトロピック溶液：RLT Buffer (QIAGEN)

有機溶媒：70%エタノール水溶液

【0073】

< 容器 >

【0074】

抽出用容器：50 ml 遠沈管 (ポリプロピレン製)

【0075】

< RNA 抽出キット >

QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

【0076】

< 核酸抽出工程 >

核酸抽出工程の手順を以下に示す。

1. 抽出用容器にヒト全血 2 ml を分注する。
2. 抽出用容器に赤血球溶解液 10 ml を添加し、ヒト全血と混合する。
3. 単離・溶解用シリンジのプランジャを最上部まで引き上げた状態で、ピペットを用いて、混合液を側面孔からシリンジ内部に注入する。
4. 単離・溶解用シリンジのプランジャを下方に押し、シリンジ内部の混合液を排出する。
5. 単離・溶解用シリンジのプランジャを最上部まで引き上げた状態で、ピペットを用いて、赤血球溶解液を側面孔からシリンジ内部に注入する。
6. 単離・溶解用シリンジのプランジャを下方に押し、シリンジ内部の赤血球溶解液を排出する。
7. カオトロピック溶液 2 ml を単離・溶解用シリンジで 5 回、吸引・排出し、抽出用容器に排出する。
8. 抽出用容器に排出したカオトロピック溶液に有機溶媒 2 ml を添加し、混合する。
9. 以下、市販 RNA 抽出キットの取り扱い方法に従う。ただし、溶離液は 2 ml とする。

【0077】

< 抽出結果 >

本実験による抽出核酸の濃度及び純度、また抽出操作の所要時間を表 1 に示す。抽出核酸の濃度は、従来法と比較して高く、核酸純度は同等であった。所要時間は、実験 3 と同等であった。

【0078】

本方法では、単離・溶解用シリンジを用いることで、全血から白血球を単離し、白血球を溶解して核酸を遊離状態とした。この操作は、RNA 抽出キットによる核酸抽出の前処理操作である。単離・溶解用シリンジによる白血球の単離は、実験 2 の方法、さらには RNA 抽出キットの取り扱い説明書に記載される遠心分離による方法よりも高い白血球単離効果を持つ。これは、単離・溶解用シリンジの固相担体として、ガラス繊維ろ紙よりも、白血球吸着効率の高いポリプロピレン製のフィルタを用いたためである。これにより、抽出核酸の濃度が従来法と比較して増加した。

【0079】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

核酸抽出方法	実験 1	実験 2	実験 3	実験 4	従来方法
核酸濃度【 $\mu\text{g/ml}$ 】	2.08	2.50	2.35	2.84	2.75
核酸純度【A260/A280】	1.92	1.91	1.92	1.90	1.89
所要時間【分】	15	15	25	25	50

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図 1】抽出用シリンジの概略断面図。

【図 2】抽出用シリンジの概略斜視図。

【図 3】抽出シリンジに固定された固相担体の概略断面図。

【図 4】側面孔付抽出用シリンジの概略断面図。

【図 5】側面孔付抽出用シリンジの概略斜視図。

【図 6】抽出用スピncラムの概略断面図。

【図 7】抽出用スピncラムの概略斜視図。

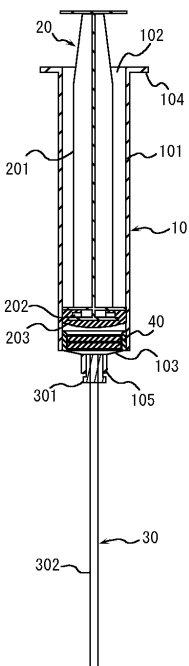
【符号の説明】

【0081】

10 ... シリンジ本体、20 ... プランジャ、30 ... ノズル、40 ... 固相担体ユニット、
 41 ... 固相担体、42, 43 ... 保持部材、44 ... ホルダ、50 ... 側面孔、60 ... カラム本
 体、70 ... 溶液受け容器、101, 701 ... 円筒部、102, 702 ... 開口部、103, 703 ... 底
 部、104 ... 保持部、105, 301 ... 接続部、201 ... プランジャ本体、
 202 ... 取り付け部、203 ... シールピース、204 ... 突起、302 ... 筒状部。

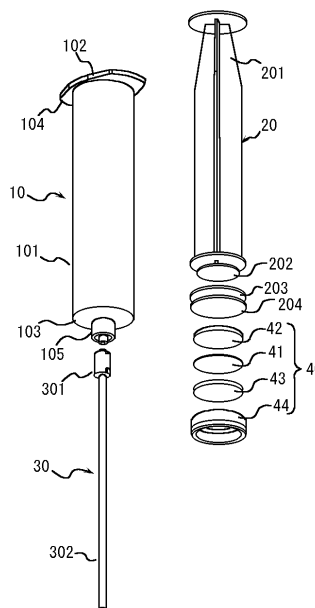
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2

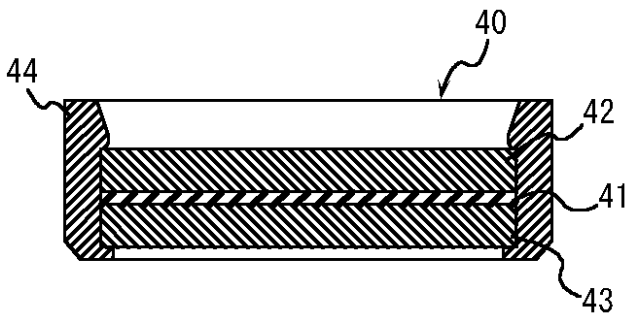


10

20

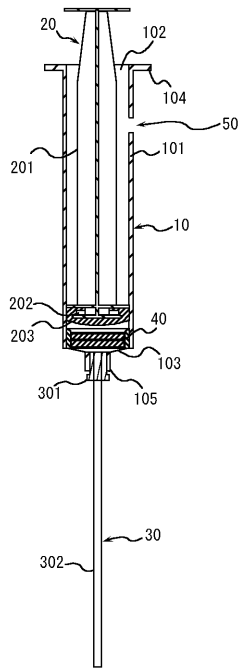
【 図 3 】

図 3



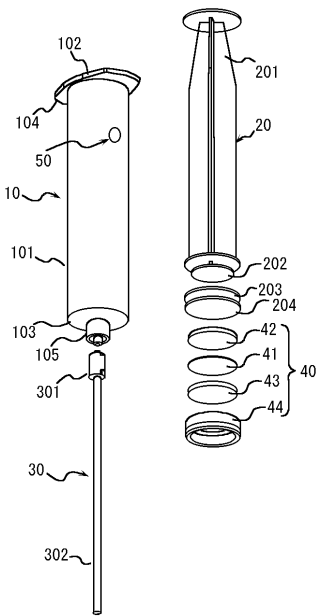
【 図 4 】

図 4



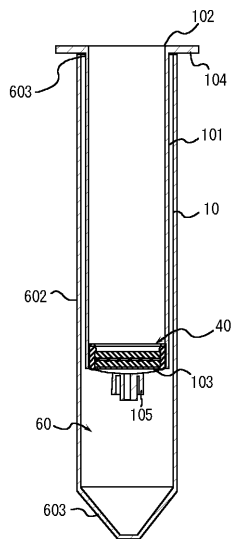
【 図 5 】

図 5

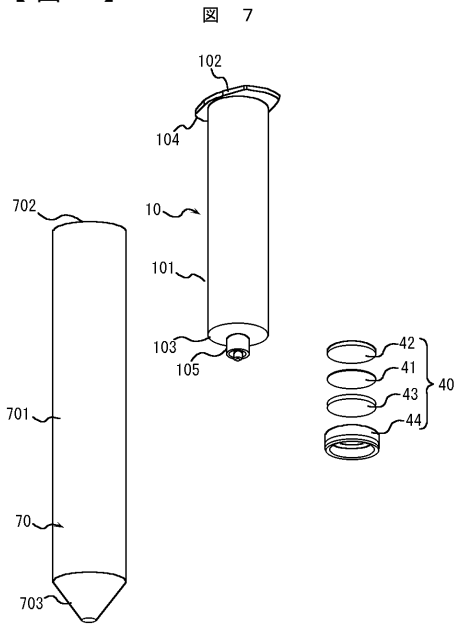


【 図 6 】

図 6



【 図 7 】



フロントページの続き

【要約の続き】

【選択図】図1