

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 のオイルからなる第 1 プラグ、
オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体を洗浄するための第 1 洗浄液からなる第 2 プラグ、
第 2 のオイルからなる第 3 プラグ、
オイルと相分離し、逆転写反応を行うための逆転写反応液からなる第 4 プラグ、
第 3 のオイルからなる第 5 プラグ、
オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体から前記核酸を溶出するための溶出液からなる第 6 プラグ、
第 4 のオイルからなる第 7 プラグ、
を、この順で内部に備えたチューブと、
前記チューブに前記核酸結合性固相担体を導入するためのタンクと、
を備えた核酸抽出用器具と、
前記チューブに磁力を印加するための磁力印加器具と、
を備えた核酸抽出用装置。

10

【請求項 2】

前記チューブの長手方向に沿って、前記チューブと前記磁力印加器具の位置関係を相対的に変化させるための磁力印加器具移動装置または核酸抽出用器具移動装置を備える、請求項 1 に記載の核酸抽出用装置。

20

【請求項 3】

前記チューブの第 4 プラグ及び / 又は第 6 プラグを加熱する位置に設けられた加熱装置をさらに備える、請求項 1 または 2 に記載の核酸抽出用装置。

【請求項 4】

前記チューブが、第 5 プラグと第 6 プラグとの間に、第 5 プラグ側から順に、
オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体を洗浄するための第 2 洗浄液からなる第 10 プラグ、及び
オイルからなる第 11 プラグ、
を、さらに備える、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸抽出用装置。

30

【請求項 5】

前記溶出液が、DNA ポリメラーゼ、dNTP 及び DNA ポリメラーゼ用プライマーを含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸抽出用装置。

【請求項 6】

前記タンクと、前記チューブが着脱可能である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の核酸抽出用装置。

【請求項 7】

前記チューブの第 7 プラグ側の端が開放している開放端であって、
前記開放端を封止する、着脱可能な栓をさらに有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸抽出用装置。

40

【請求項 8】

前記タンクが、核酸を抽出するための試料を溶解するための溶解液を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 7 までのいずれか 1 項に記載の核酸抽出用装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、核酸抽出用装置に関する。

【背景技術】**【0002】**

シリカ粒子等の核酸結合性固相担体とカオトロピック剤を用いて、生体材料からより簡便に核酸を抽出する方法が、Boomらにより報告された（非特許文献 1 参照）。このBoomら

50

の方法を含め、シリカ等の核酸結合性固相担体とカオトロピック剤を用いて核酸を担体に吸着させ、抽出する方法は、主に、(1)カオトロピック剤存在下、核酸結合性固相担体に核酸を吸着させる工程(吸着工程)、(2)非特異的に結合した夾雑物及びカオトロピック剤を除くため、洗浄液にて核酸の吸着した担体を洗浄する工程(洗浄工程)、および(3)水または低塩濃度緩衝液にて核酸を担体から溶出させる工程(溶出工程)の3工程からなる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】J.Clin.Microbiol.,vol.28 No.3, p.495-503 (1990)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、新規な核酸抽出用装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の一実施形態の核酸抽出用装置は、第1のオイルからなる第1プラグ、オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体を洗浄するための第1洗浄液からなる第2プラグ、第2のオイルからなる第3プラグ、オイルと相分離し、逆転写反応を行うための逆転写反応液からなる第4プラグ、第3のオイルからなる第5プラグ、オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体から前記核酸を溶出するための溶出液からなる第6プラグ、第4のオイルからなる第7プラグ、を、この順で内部に備えたチューブと、前記チューブに前記核酸結合性固相担体を導入するためのタンクと、を備えた核酸抽出用器具と、前記チューブに磁力を印加するための磁力印加器具と、を備えた核酸抽出用装置である。前記チューブの長手方向に沿って、前記チューブと前記磁力印加器具の位置関係を相対的に変化させるための磁力印加器具移動装置または核酸抽出用器具移動装置を備えてもよい。前記チューブの第4プラグ及び/又は第6プラグを加熱する位置に設けられた加熱装置をさらに備えてもよい。前記チューブが、第5プラグと第6プラグとの間に、第5プラグ側から順に、オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体を洗浄するための第2洗浄液からなる洗浄液からなる第10プラグ、及びオイルからなる第11プラグ、を、さらに備えてもよい。前記溶出液が、DNAポリメラーゼ、dNTP及びDNAポリメラーゼ用プライマーを含有してもよい。前記タンクと、前記チューブが着脱可能であってもよい。前記チューブの第7プラグ側の端が開放している開放端であって、前記開放端を封止する、着脱可能な栓をさらに有してもよい。前記タンクが、核酸を抽出するための試料を溶解するための溶解液を有してもよい。

20

30

【発明の効果】

【0006】

本発明によって、新規な核酸抽出用装置を提供することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【0007】

40

【図1】本発明の一実施例における核酸抽出用器具の構成の模式図である。

【図2】本発明の一実施例における核酸抽出用器具の構成の模式図である。

【図3】本発明の一実施例における核酸抽出用装置の構成の模式図である。

【図4】本発明の一実施例の核酸抽出方法において、矩形磁石の使用法を示す図である。

【図5】本発明の一実施例において、1段階溶出用キャピラリー(1-step)と2段階溶出キャピラリー(2-step)について、それぞれで得られた核酸含有溶出液を用いてPCRを行った場合の検出感度の経時変化を比較して示す図である。

【図6】本発明の一実施例において、1段階溶出用キャピラリー(1-step)と2段階溶出キャピラリー(2-step)について、それぞれで得られた核酸含有溶出液を用いてPCRを

50

行った場合の検出感度を比較して示す図である。

【図 7】本発明の一実施例の 2 段階溶出キャピラリー (2-step) において、逆転写反応液プラグの後に、さらに洗浄液からなるプラグを設けない場合と設けた場合について、それぞれで得られた核酸含有溶出液を用いて P C R を行った場合の検出感度を比較して示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 8 】

実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、M. R. Green & J. Sambrook (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (4th edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2012); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

10

【 0 0 0 9 】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

20

【 0 0 1 0 】

= = 核酸抽出用器具 = =

(1) タンク

本発明の核酸抽出用器具は、単数または複数のチューブに核酸結合性固相担体を導入するためのタンクを備える。

【 0 0 1 1 】

タンクは、内部に液体を収容することができ、外部から内部に物質を導入できる開口を有する。タンクにおける開口の位置は特に限定されず、開口を複数有してもよい。開口には、着脱可能な蓋を有していてもよい。

30

【 0 0 1 2 】

タンクの内容積は、特に限定されないが、例えば、0.1 mL 以上 100 mL 以下とすることができる。タンクの材質は、特に限定されないが、例えば、ガラス、プラスチックなどの樹脂、金属などとすることができる。特に、タンクの材質として透明なガラスや樹脂を選択すると、タンクの外部から内部を観察することができるので、より好ましい。なお、タンクと各チューブは、一体成形されていても、着脱可能になっていても構わない。タンクの材質にゴム、エラストマー、高分子等の可とう性を有するものを利用すると、タンクに蓋を装着した状態で、タンクを変形させることにより、タンクの内部を加圧することができる。それにより、チューブの内部から外部へと、チューブの先端側からチューブの内容物を押し出すことができる。

40

【 0 0 1 3 】

また、タンクは、核酸を抽出するための試料を溶解するための溶解液を有しているのが好ましく、チューブとともに振とうすることができ、タンク内の液体を十分に攪拌することができる。

【 0 0 1 4 】

溶解液は、カオトロピック物質を含有すれば特に限定されないが、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で界面活性剤を含有させてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば特に限定されないが、具体的には、T r i t o n - X などのトリトン系界面活性剤や T w e e n 2 0

50

などのツイーン系界面活性剤のような非イオン性界面活性剤、N ラウロイルサルコシンナトリウム (S D S) 等の陰イオン性界面活性剤が挙げられるが、特に非イオン性界面活性剤を、0.1 ~ 2 % の範囲となるように使用するのが好ましい。さらに、溶解液には、2 -メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール等の還元剤を含有させることが好ましい。溶解液は、緩衝液であってもよいが、pH 6 ~ 8 の中性であることが好ましい。これらのことを考慮し、具体的には、3 ~ 7 M のグアニジン塩、0 ~ 5 % の非イオン性界面活性剤、0 ~ 0.2 mM の E D T A 、0 ~ 0.2 M の還元剤などを含有することが好ましい。

【0015】

カオトロピック物質は、水溶液中でカオトロピックイオン (イオン半径の大きな 1 価の陰イオン) を生じ、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、核酸の固相担体への吸着に寄与するものであれば、特に限定されない。具体的には、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、過塩素酸ナトリウム等が挙げられるが、これらのうち、タンパク質変成作用の強いグアニジンチオシアン酸塩またはグアニジン塩酸塩が好ましい。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、各物質により異なり、例えば、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合には、3 ~ 5.5 M の範囲で、グアニジン塩酸塩を使用する場合は、5 M 以上で使用するのが好ましい。

【0016】

チューブを重力の方向と平行になるように設置したとき、タンクはチューブの上方に位置するように構成される。タンクの中に試料を入れ、振とうした上で、再度、チューブを重力の方向と平行になるように設置する。タンク内には、溶解液以外に、空間を残しておくのが好ましい。それによって、この核酸抽出用器具を逆さまにしたりして軽く振とうするだけで、タンク内の液体を、容易に混ぜることができるからである。

【0017】

チューブが複数ある場合は、チューブが重力の方向と平行になるように設置されたとき、全て同じ高さで平行に並ぶように構成されている。タンクは、核酸結合性固相担体を含む液体を各チューブに分配するための液体分配部を備え、核酸結合性固相担体を含む液体をタンクに入れると、液体は液体分配部で核酸結合性固相担体とともに分配され、核酸結合性固相担体が、液体を介して、各チューブに入っていく様に構成されている。液体分配部は、各チューブに連通する空間を隔てる隔壁を有してもよい。この隔壁によって、チューブごとに、各チューブと連続するタンクの底面を区切ることが可能になる。そして、底面が重力の方向に垂直に広がり、隔壁が底面に対し垂直であれば、各チューブに繋がる底面の面積の比が、各チューブに分配される核酸結合性固相担体の比と一致する。例えば、各チューブに繋がる底面の面積が等しければ、各チューブに分配される核酸結合性固相担体も等しく分配される。タンクの中に試料を入れ、振とうした上で、再度、チューブを重力の方向と平行になるように設置すると、この設置状態で、タンク内の液体を隔壁より高くすることができる。これによって、複数のチューブに均等に液体が流れるようにできる。

【0018】

核酸結合性固相担体は、カオトロピックイオンの存在下で、核酸を吸着すなわち可逆的な物理的結合により保持することができる親水性表面を有する固体であれば、特に限定されない。具体的には、二酸化珪素を含有する物質、例えば、シリカ、ガラス、珪藻土、あるいはこれらを化学的修飾により表面処理を施したものが好ましく、磁性体や超常磁性金属酸化物等との複合体がより好ましい。化学的修飾により表面処理を施す場合は、核酸との可逆的な結合を妨げない程度に、適度な陽性電荷を帯びさせてもよい。

【0019】

また、これらの核酸結合性固相の形態としては、塊、粒子、粉体等が具体的に挙げられるが、特に限定されない。これらのうち、吸着と溶出の効率を考慮すると粒子の形態がより好ましい。その場合の粒径は特に限定されないが、0.05 ~ 500 μm であってもよく、好ましくは 1 ~ 100 μm であり、特に好ましくは 1 ~ 10 μm である。

10

20

30

40

50

【0020】

核酸結合性固相担体は、溶解液より密度が大きい方が好ましい。例えば、分散液の密度が1.1~1.2 g/mLであれば、核酸結合性固相担体の密度は、1.5~2.0 g/mLなどとすればよい。

【0021】

(2) チューブ

本発明の核酸抽出用器具は、第1のオイルからなる第1プラグ、オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体を洗浄するための第1洗浄液からなる第2プラグ、第2のオイルからなる第3プラグ、オイルと相分離し、逆転写反応を行うための逆転写反応液からなる第4プラグ、第3のオイルからなる第5プラグ、オイルと相分離し、核酸が結合した核酸結合性固相担体から核酸を溶出するための溶出液からなる第6プラグ、および第4のオイルからなる第7プラグを、この順で内部に備える、単数のチューブ、または平行に配置された、同様の形状を有する複数のチューブと、を備える。チューブが複数の場合、お互いに平行に配置されさえすれば、全体には、直線上に配置されても、環状に配置されても構わない。直線上の配置は、複数のチューブを全体に同時に制御しやすくするが、環状の配置は、器具全体の小型化を可能にする。ここで、プラグとは、チューブ内において、一種類の液体が一区画を占める場合の液体を指すものとする。

10

【0022】

チューブは、内部に空洞を有し、液体を長手方向に流通させることのできる筒状の形状を有するものであって、キャピラリーと呼ばれるものであってもよい。チューブは、長手方向に、屈曲してもよいが、直線状であるのが好ましい。チューブの内部の空洞は、液体がチューブ内でプラグの形状を維持できれば、大きさ、形状ともに特に限定されない。また、チューブ内の空洞の大きさや、長手方向に対して垂直な断面の形状は、チューブの長手方向に沿って、一定であることが好ましいが、変化していてもよい。

20

【0023】

チューブの外形の長手方向に垂直な断面の形状も限定されないが、円であるか、円に近い楕円であることが好ましい。チューブの肉厚(内部の空洞の側面から外部の表面までの長さ)も特に限定されないが、均一であることが好ましい。チューブが円筒状の場合、その内径(内部の空洞の長手方向に垂直な断面における円の直径)は、例えば、0.5 mm以上3 mm以下とすることができる。チューブの内径がこの範囲であると、チューブの材質、液体の種類において広範な範囲で液体のプラグを形成しやすい。

30

【0024】

チューブの材質は、特に限定されないが、例えば、ガラス、プラスチックなどの樹脂、金属などとすることができる。特に、チューブの材質として透明なガラスや樹脂を選択すると、チューブの外部から空洞内を観察することができるので、より好ましい。また、チューブの材質に、磁力を透過する物質や非磁性体を選択すると、チューブに磁性粒子を通過させる場合などに、チューブの外部から磁力を与えることによってこれを行うことが容易化されるため好ましい。なお、チューブの材質は、タンクの材質と同じにしても構わない。

【0025】

チューブの第7プラグ側の端は、開放している開放端であってもよいが、開放端を封止する、着脱可能な栓をさらに有することが好ましい。栓は、例えば、ゴムやエラストマー、樹脂等により作製することができる。栓は脱着自在であるが、その機構は特に限定されない。例えば、栓の一部がチューブ部の内部に挿入されて固定されてもよく、栓はキャップ状であってもよい。

40

【0026】

プラグの中やプラグ間には、気泡や他の液体がないことが好ましいが、核酸結合性固相担体がプラグを通過できる限りにおいて、気泡や他の液体が存在してもよい。

【0027】

オイルからなるプラグは、その両側の水溶性のプラグが互いに混合することを抑制する

50

機能を有する。

【0028】

オイルは、より高粘度なオイルにすることによって、上側のプラグとの界面で、核酸結合性固相担体を移動させる場合に、オイルによる「ぬぐい効果」を高めることができる。これにより、上側のプラグから、オイルからなるプラグに核酸結合性固相担体を移動させた場合に、核酸結合性固相担体に付着した水溶性の成分をオイル内に、より持ち込まれにくくすることができる。

【0029】

チューブの長手方向に対する、オイルからなるプラグの長さは、プラグが形成可能な範囲であれば、いずれも特に限定されないが、具体的には、1 mm以上50 mm以下であってもよく、核酸結合性固相担体の移動距離を大きくしすぎないように、1 mm以上30 mm以下が好ましく、5 mm以上20 mm以下がさらに好ましい。

10

【0030】

第2プラグは、チューブ内の第1プラグと第3プラグとの間の位置に配置され、第1洗浄液からなる。

【0031】

第1洗浄液は、第1プラグを構成するオイル及び第3プラグを構成するオイルのいずれとも混和しない液体である。第1洗浄液は、エタノールやイソプロピルアルコール等の有機溶媒およびカオトロピック物質を事実上含まない溶液であれば特に限定されないが、水または低塩濃度水溶液であることが好ましく、低塩濃度水溶液の場合、緩衝液であることが好ましい。低塩濃度水溶液の塩濃度は、100 mM以下が好ましく、50 mM以下がより好ましく、15 mM以下が最も好ましい。また、低塩濃度水溶液の下限は特に無いが、0.1 mM以上であることが好ましく、1 mM以上であることがさらに好ましく、10 mM以上であることが最も好ましい。また、この溶液はTriton、Tween、SDSなどの界面活性剤を含有しても良く、pHは特に限定されない。緩衝液にするための塩は特に限定されないが、トリス、ヘペス、ピペス、リン酸などの塩が好ましく用いられる。

20

【0032】

第2プラグの体積は、特に限定されず、核酸結合性固相担体の量等を指標として適宜設定することができる。例えば、核酸結合性固相担体の体積が、0.5 μ Lである場合には、第2プラグの体積は、10 μ L以上であれば十分であり、20 μ L以上50 μ L以下とすることが好ましく、20 μ L以上30 μ L以下とすることがさらに好ましい。第2プラグの体積が、この範囲であれば、核酸結合性固相担体の体積が、0.5 μ Lである場合に核酸結合性固相担体の洗浄を十分に行うことができる。なお、核酸結合性固相担体の洗浄には、第2プラグの体積は、より大きいことが好ましいが、チューブの長さや太さ、これに依存する第2プラグのチューブの長手方向における長さ等を考慮して、適宜に設定することができる。

30

【0033】

第2プラグは、オイルのプラグによって分割されて任意の数の複数のプラグから構成されてもよい。第2プラグが複数のプラグからなる場合、各プラグの液体は、同じであっても異なっても構わない。その中に、少なくとも1つの第1洗浄液のプラグがあれば、他のプラグの液体は特に限定されないが、全てのプラグが第1洗浄液であることが好ましい。第2プラグが分割される数は、例えば、チューブの長さや洗浄の対象等を考慮して適宜設定されることができる。

40

【0034】

第4プラグは、チューブ内の第3プラグと第5プラグとの間の位置に設けられ、逆転写反応液からなる。

【0035】

逆転写反応液は、逆転写酵素、dNTP、及び逆転写酵素用プライマー（オリゴヌクレオチド）を含む。溶媒は、水であることが好ましく、逆転写反応液は、エタノールやイソプロピルアルコール等の有機溶媒およびカオトロピック物質を事実上含まない溶液が好ま

50

しい。また、逆転写酵素用バッファーとなるように、塩を含有することが好ましい。バッファーに含まれる塩は、酵素反応を阻害しない限り、特に限定されないが、トリス、ヘペス、ピペス、リン酸などの塩が好ましく用いられる。逆転写酵素は特に限定されず、例えば、アビアンミエロブラストウイルス (Avian Myeloblast Virus)、ラスアソシエテッドウイルス2型 (Ras Associated Virus 2型)、マウスモロニーミュリーンリユーケミアウイルス (Mouse Molony Murine Leukemia Virus)、ヒト免疫不全ウイルス1型 (Human Immunodeficiency Virus 1型) 由来の逆転写酵素などが使用できるが、耐熱性の酵素が好ましい。逆転写反応液に含まれるdNTPや塩の濃度は、用いる逆転写酵素について適した濃度にすればよいが、通常、dNTPを10~1000 μ M、好ましくは100~500 μ M、 Mg^{2+} を1~100 mM、好ましくは5~10 mM、 Cl^- を1~2000 mM、好ましくは200~700 mM、とすれば良く、総イオン濃度は、特に限定されないが、50 mMより高い濃度であってもよく、100 mMより高い濃度が好ましく、120 mMより高い濃度がより好ましく、150 mMより高い濃度がさらに好ましく、200 mMより高い濃度がさらに好ましい。上限は、500 mM以下が好ましく、300 mM以下がより好ましく、200 mM以下がさらに好ましい。プライマー用オリゴヌクレオチドは、それぞれ0.1~10 μ M、好ましくは0.1~1 μ Mが用いられる。キャリアとして、BSAまたはゼラチンなどを含有させてもよいが、その濃度は、1 mg/mL以下では、反応阻害防止効果が少なく、10 mg/mL以上だと、逆転写反応やその後の酵素反応を阻害する可能性があるため、1~10 mg/mLが好ましい。ゼラチンを用いる場合、その由来は、牛皮、豚皮、牛骨が例示できるが、特に限定されない。ゼラチンが溶解ににくいときは、加温して溶解させてもよい。

10

20

【0036】

第4プラグの体積は、特に限定されず、核酸を吸着させた粒子等の量などを指標として適宜設定することができる。例えば、粒子等の体積が、0.5 μ Lである場合には、第4プラグの体積は、0.5 μ L以上であれば十分であり、0.8 μ L以上5 μ L以下とすることが好ましく、1 μ L以上3 μ L以下とすることがさらに好ましい。第4プラグの体積がこれらの範囲であれば、例えば、核酸結合性固相担体の体積を0.5 μ Lにしても、十分逆転写反応を行わせることができる。

30

【0037】

第6プラグは、チューブ内の第5プラグと第7プラグとの間の位置に設けられ、溶出液からなる。

【0038】

溶出液とは、核酸結合性固相担体に吸着した核酸を、担体から液中に溶出させる液体のことを言う。溶出液も特に限定されないが、水または低塩濃度水溶液が好ましく、エタノールやイソプロピルアルコール等の有機溶媒およびカオトロピック物質を事実上含まないものがより好ましい。低塩濃度水溶液の場合、バッファーであることが好ましい。低塩濃度水溶液の塩濃度は、100 mM以下が好ましく、50 mM以下がより好ましく、15 mM以下が最も好ましい。低塩濃度水溶液の下限は特に無いが、0.1 mM以上であることが好ましく、1 mM以上であることがさらに好ましく、10 mM以上であることが最も好ましい。バッファーにするための塩は特に限定されないが、トリス、ヘペス、ピペス、リン酸などの塩が好ましく用いられ、TE (10 mM トリス塩酸緩衝液、1 mM EDTA、pH 8.0) が最も好ましい。なお、第1洗浄液と溶出液は、同じであっても異なってもよい。

40

【0039】

溶出液は、さらに、DNAポリメラーゼ及びDNAポリメラーゼ用プライマー (オリゴヌクレオチド) を含んでも良く、TaqManプロブや、Molecular Beacon、サイクリングプロブなどのリアルタイムPCR用プロブやSYBRグリーンなどのインターカレーター用蛍光色素を含んでもよい。DNAポリメラーゼも特に限定されないが、耐熱性の酵素やPCR用酵素が好ましく、例えば、Taqポリメラー

50

ぜ、T f i ポリメラーゼ、T t h ポリメラーゼ、あるいはそれらの改良型など、非常に多数の市販品がある。さらに、反応阻害防止剤として、B S A (ウシ血清アルブミン) またはゼラチンを含有することが好ましい。

【0040】

溶出液に含まれる d N T P や塩の濃度は、用いる D N A ポリメラーゼについて適した濃度にすればよいが、通常、d N T P を $10 \sim 1000 \mu\text{M}$ 、好ましくは $100 \sim 500 \mu\text{M}$ 、 Mg^{2+} を $1 \sim 100 \text{mM}$ 、好ましくは $5 \sim 10 \text{mM}$ 、 Cl^- を $1 \sim 2000 \text{mM}$ 、好ましくは $200 \sim 700 \text{mM}$ 、とすれば良く、総イオン濃度は、特に限定されないが、 50mM より高い濃度であってもよく、 100mM より高い濃度が好ましく、 120mM より高い濃度がより好ましく、 150mM より高い濃度がさらに好ましく、 200mM より高い濃度がさらに好ましい。上限は、 500mM 以下が好ましく、 300mM 以下がより好ましく、 200mM 以下がさらに好ましい。プライマー用オリゴヌクレオチドは、それぞれ $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1 \sim 1 \mu\text{M}$ が用いられる。キャリアとして、B S A またはゼラチンなどを含有させてもよいが、その濃度は、 1mg/mL 以下では、反応阻害防止効果が少なく、 10mg/mL 以上だと、重合反応やその後の酵素反応を阻害する可能性があるため、 $1 \sim 10 \text{mg/mL}$ が好ましい。ゼラチンを用いる場合、その由来は、牛皮、豚皮、牛骨が例示できるが、特に限定されない。ゼラチンが溶解ににくいときは、加温して溶解させてもよい。

10

【0041】

第6プラグの体積は、特に限定されず、核酸を吸着させた粒子等の量などを指標として適宜設定することができる。例えば、粒子等の体積が、 $0.5 \mu\text{L}$ である場合には、第6プラグの体積は、 $0.5 \mu\text{L}$ 以上であれば十分であり、 $0.8 \mu\text{L}$ 以上 $5 \mu\text{L}$ 以下とすることが好ましく、 $1 \mu\text{L}$ 以上 $3 \mu\text{L}$ 以下とすることがさらに好ましい。第6プラグの体積がこれらの範囲であれば、例えば、核酸結合性固相担体の体積を $0.5 \mu\text{L}$ にしても、十分逆転写反応を行わせることができる。

20

【0042】

溶出液が、D N A ポリメラーゼ及び D N A ポリメラーゼ用プライマーを含んでいる場合は、溶出後の溶出液を、直接 D N A ポリメラーゼ反応に用いることができる。この際、チューブ内で反応を行ってもよいが、溶出液をチューブから外に出して、新たに D N A ポリメラーゼ反应用容器に移して反応を行ってもよい。チューブ外で D N A ポリメラーゼ反応を行う際には、溶出液の一部または全部を用いてもよく、一部を用いる場合は、D N A ポリメラーゼ用に調節したバッファーで希釈するのが好ましい。D N A ポリメラーゼ用に調節したバッファーは、溶出液と同じ成分の溶液を用いてもよいが、塩濃度が適正に調節されていることが好ましく、D N A ポリメラーゼ、d N T P、及び D N A ポリメラーゼ用プライマーは、それぞれ添加されていてもいなくても構わない。

30

【0043】

この核酸抽出用器具には、第1～第7プラグ以外に、目的に応じて、任意の場所にプラグを設けてもよい。オイルからなるプラグは、その両側の水溶性のプラグが互いに混合することを抑制することを考えると、オイルからなるプラグと水溶性のプラグは、交互に配置されるのが好ましく、水溶性のプラグを追加した場合、隣の水溶性のプラグとの間に、オイルからなるプラグを設ければよい。

40

【0044】

例えば、第3プラグと第4プラグとの間に、第3プラグ側から順に、オイルと混和しない第2洗浄液からなる第8プラグ、及びオイルからなる第9プラグを有していてもよい。この場合、第2洗浄液は、第3プラグを構成するオイル及び第9プラグを構成するオイルのいずれとも混和しない液体である。第2洗浄液は、第1洗浄液と同じ組成であってもよいし、異なる組成であってもよいが、第8プラグの基本的な構成の選択の仕方は、第2プラグに準じる。

【0045】

このように、逆転写反応液プラグの前に、洗浄液からなるプラグを複数設ける場合、上

50

流側の洗浄液にカオトロピック剤を含有させてもよい。例えば、第2プラグの第1洗浄液にグアニジン塩酸塩を含有させると、第2プラグにおいて、粒子等に吸着した核酸の吸着を維持又は強化しつつ粒子等を洗浄することができる。第2プラグにグアニジン塩酸塩を含有させる場合の濃度としては、例えば、 3 mol/L 以上 10 mol/L 以下、好ましくは 5 mol/L 以上 8 mol/L 以下とすることができる。グアニジン塩酸塩の濃度がこの範囲であれば、粒子等に吸着された核酸をより安定に吸着させつつ、他の夾雑物等を洗浄することができる。そして、第8プラグの第2洗浄液を、水又は緩衝液とすることで、第2プラグにおいて、粒子等に吸着した核酸をより安定して吸着させるとともに洗浄を行うことができ、かつ、第8プラグにおいて、カオトロピック剤を除去しつつ担体をさらに洗浄することができる。

10

【0046】

また、第5プラグと第6プラグとの間に、第5プラグ側から順に、オイルと混和しない第3洗浄液からなる第10プラグ、及びオイルからなる第11プラグを有していてもよい。この場合も、第3洗浄液は、第5プラグを構成するオイル及び第11プラグを構成するオイルのいずれとも混和しない液体である。第3洗浄液は、第1洗浄液と同じ組成であってもよいし、異なる組成であってもよいが、第10プラグの基本的な構成の選択の仕方は、第2プラグに準じる。

【0047】

このように、逆転写反応液プラグの後に、洗浄液からなるプラグを設ける場合、特に、第7プラグでDNAポリメラーゼ反応を行う場合に、DNAポリメラーゼ反応溶液への逆転写反応液の持込が少なくなるので、DNAポリメラーゼ反応の効率が上がるという効果がある。

20

【0048】

== 核酸抽出用装置 ==

本発明の核酸抽出用装置は、上述した核酸抽出用器具と、チューブと、必要な場合はタンクにも、磁力を印加するための磁力印加器具と、を有する。チューブが複数の場合、チューブの対応部に、同時に磁力を印加できるように磁力印加器具を構成することが好ましい。磁力印加器具は特に限定されないが、例えば、永久磁石、電磁石等が例示できるが、発熱等を生じない点で、永久磁石がより好ましい。核酸抽出の際には、磁力印加器具を移動させる必要があるため、磁力印加器具を自動的に移動させるための磁力印加器具移動装置を備えていてもよい。あるいは、磁力印加器具に対し、核酸抽出用器具のほうを移動させてもよく、その場合、核酸抽出用器具移動装置を備えていてもよい。

30

【0049】

また、本発明の核酸抽出用装置は、逆転写反応液からなる第4プラグ、及びチューブの溶出液からなる第6プラグを加熱する位置に設けられた加熱装置をさらに備えてもよい。ここで、第4プラグと第6プラグを制御する加熱装置を設けてもよいが、それぞれ別個に制御する複数の加熱装置を設けてもよい。加熱装置は特に限定されないが、例えば、ヒートブロック、ヒーター、電磁加熱などを例示することができる。

【0050】

なお、核酸を抽出するための試料を溶解するための溶解液と、磁性体を有する核酸結合性固相担体と、核酸抽出用器具を核酸抽出用キットとしてもよい。それによって、この核酸抽出用装置で用いるうちの、使い捨てにできる部分だけをキット化できる。

40

【0051】

== 核酸抽出方法 ==

上述した核酸抽出用装置は、本発明の核酸抽出方法に、好適に用いることができる。核酸を抽出するための試料は、核酸を含んでいれば特に限定されず、細胞や、組織などの細胞塊などの生体試料、ウイルス、合成核酸、一旦単離した核酸に不純物や夾雑物が混入した試料などであってもよい。

【0052】

まず、上述した核酸抽出用器具を、単数又は複数のチューブの長手方向が重力方向と平

50

行になるように固定器具に設置する。

【0053】

次に、磁性体を有する核酸結合性固相担体と、溶解液と、核酸を抽出するための試料をタンクに投入する。投入する順序は限定されず、具体的な方法は、例えば下記工程を含んでもよいが、その場合、各工程を行う順序は、特に限定されない。

- (1) 溶解液に試料を投入し、溶解液を混合する工程と、
- (2) 溶解液に、磁性体を有する核酸結合性固相担体を添加する工程と、
- (3) 核酸抽出用器具のタンクに、試料を混合した溶解液を投入する工程と、
- (4) 溶解液中で、核酸と結合した核酸結合性固相担体を均一にする均一工程

【0054】

例えば、核酸を抽出するための試料を溶解するための溶解液に試料及び核酸結合性固相担体を投入して混合し(1)(2)、ホモジェナイザーやヴォルテックス・ミキサーなどによって試料を溶解させた(4)あと、この粉碎物をタンクに入れてもよい(3)。あるいは、試料は、それだけで溶解させ(1)、溶解させた試料と核酸結合性固相担体を別々にタンクに入れ(2)(3)、核酸抽出用器具の開口部に蓋をして、十分混合してもよい(4)。または、試料は、それだけで溶解させ(1)、溶解させた試料と核酸結合性固相担体を混ぜて(2)、十分混合し(4)、混合物をタンクに投入してもよい(3)。この工程で、試料中の核酸が、核酸結合性固相担体に吸着する。

【0055】

なお、タンクに、すでに磁性体を有する核酸結合性固相担体及び/又は溶解液が入っていれば、そこに核酸を抽出するための試料を投入すればよく、担体又は溶解液が欠けていれば、それを一緒に投入すればよい。

【0056】

複数のチューブを設けた場合、核酸抽出用器具は、チューブの長手方向が重力方向と平行になるように固定器具に設置されているので、全てのチューブに均等に担体が入って行くようになる。タンク内に、各チューブに連通する空間を隔てる隔壁が設けられている場合は、試料溶解物と担体を含んだ溶解液は、隔壁より高くすることによって、各チューブに均等に担体が入って行く。

【0057】

その後、核酸結合性固相担体は、磁性体を有しているので、単数又は複数のチューブの対応部に同時に磁力を印加できる磁力印加器具を用いて、第1プラグから第6プラグの方向へ、磁力を印加し、核酸結合性固相担体をタンク内から第6プラグに移動させることができる。その際、永久磁石を用いる場合には、作業者の手で磁石を動かして行ってもよいし、磁力印加器具移動装置等を利用して行ってもよい。核酸結合性固相担体が各プラグを通過するときの各プラグにおける滞在時間は特に限定されない。なお、磁力印加器具は、同一プラグ内でチューブの長手方向に沿って往復するようにして移動させてもよい。また、磁力印加器具を進行方向に対して角度をもった方向に(例えば、ほぼ垂直に)振動させてもよい。この振動は、いずれのプラグでも与えることは可能だが、例えば、洗浄液からなる第2プラグでそのような振動を与えることによって、洗浄効果を増強させることができる。

【0058】

第2プラグで洗浄された核酸結合性固相担体を第4プラグに移動させたとき、そこで、逆転写反応をさせる。反応は、用いる逆転写酵素に適した条件で行えばよい。例えば、逆転写反応液を、30～50℃、好ましくは42～45℃に加熱し、その中で核酸結合性固相担体を一定時間保持することで、RNAを担体に結合させたままで、逆転写反応を起こさせることができる。加熱方法としては、特に限定されないが、例えば、チューブの第4プラグに対応する位置に、ヒートブロック等の熱媒体を接触させる方法や、ヒーター等の熱源を用いる方法、電磁加熱による方法などを例示することができる。保持時間も、実施者が適時選択できるが、10秒～5分、好ましくは30秒から1分、保持すればよい。この段階で合成されたcDNAは、RNAと結合したままの状態、固相担体に結合してい

10

20

30

40

50

る。

【0059】

その後、核酸結合性固相担体を第6プラグの溶出液中に移動させる。ここで、核酸結合性固相担体から核酸、特にcDNAを効率よく遊離させるために、第6プラグを加熱するのが好ましい。加熱方法としては、特に限定されないが、第4プラグの加熱で用いるのと同様の方法を用いることができる。加熱温度は、40より高ければ良く、50以上が好ましく、60以上がより好ましい。加熱温度の上限は特に限定されないが、70以下であることが好ましく、65以下であることがより好ましく、60以下であることがさらに好ましく、60であることが最も好ましい。

【0060】

核酸結合性固相担体から核酸を遊離させた後、磁力印加器具を用いて、核酸結合性固相担体を第6プラグから上方に移動させる。第6プラグの溶出液に混入していなければ、どこに移動させても構わない。

【0061】

その後、第6プラグの溶出液に遊離した核酸を回収する。例えば、タンクの材質にゴム、エラストマー、高分子等の可とう性を有するものを利用した場合、チューブの先端の栓を外し、タンクに蓋を装着した状態で、タンクを変形させることによってタンクの内部を加圧すると、チューブの先端からチューブ内部の溶液が吐出される。まず、第7プラグのオイルが吐出され、その後、第6プラグの溶出液が吐出される。

【0062】

このようにして溶出したcDNAは、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、PCRなどの酵素反応に直接使用することができる。なお、溶出液からcDNAを単離してもよく、例えばRNAを除去するためには、得られた溶出液にRNaseを添加してもよいが、あらかじめRNaseを溶出液に含有させてもよい。例えば、溶出液にRibonuclease Aを10～20μg/mL含有させることで、効率よくRNAを分解させることができる。通常、RNaseが含まれたままで、PCRなどの操作を行うことができるが、RNaseを除去したい時には、本発明の方法を再度繰り返すか、その他公知の方法によって、cDNAを精製してもよい。

【0063】

一方、溶出液に、予めDNAポリメラーゼ、dNTP及びDNAポリメラーゼ用プライマー（オリゴヌクレオチド）を含ませることも可能である。それにより、第6プラグから回収した溶液そのものをもちいて、直接PCRを行うことができる。

【0064】

なお、第6プラグの溶出液に遊離した核酸を回収せず、チューブに保持したまま第6プラグ内でPCRを行ってもよい。この場合、溶出液に、予めPCR酵素、dNTP、及びPCR酵素用プライマー（オリゴヌクレオチド）を含ませておく必要がある。PCRのための加熱方法としては、特に限定されないが、第4プラグの加熱で用いるのと同様の方法を用いてもよく、昇降PCR法を用いてもよい。PCR反応後、増幅したcDNAを回収すればよいが、回収方法は特に限定されず、増幅せずに回収する場合と同様の方法を用いることができる。

【実施例】

【0065】

(1) 核酸抽出用器具の構成 I

図1に核酸抽出用器具の組み立て前の分解図（図1A）および組み立て後の完成図（図1B）を示す。

【0066】

この器具は、1本のキャピラリー100と、そのキャピラリー100に液体を注入するためのタンク120を有する。このキャピラリー100とタンク120とは、核酸抽出用器具組み立て用キット130を構成できる。

【0067】

キャピラリー１００は栓１１０を有し、内部には、第１～第７プラグが設けられ、それぞれ順に、オイル１０、洗浄液２０、オイル３０、逆転写反応液４０、オイル５０、溶出液６０、オイル７０が充填されている。オイルは、各水溶液を分離するための役割を有している。

【００６８】

タンク１２０は、開口部１２１、開口部１２１に対する着脱可能な蓋１２２、空間１２３、溶解液１２４を有する。また、溶解液１２４中に、表面にコーティングされたシリカに核酸が吸着した磁性ビーズ１２５が含まれている。

【００６９】

キャピラリー１００とタンク１２０は、それぞれ、栓１１０と蓋１２２を外して、図１Ｂのように接続することができる。

10

【００７０】

(２) 核酸抽出用器具の構成 ⅠⅠ

図２の装置は、複数のキャピラリー１００、及びそのキャピラリー１００に液体を注入するためのタンク２２０、矩形磁石２６０を有する。

【００７１】

タンク２２０は、開口部２２１、開口部２２１に対する着脱可能な蓋２２３、空間２２３、溶解液２２４、液体分配部の隔壁２４０、タンク２２０の内壁および隔壁２４０によって囲まれたコンパートメント２５０を有する。また、溶解液２２４中に、表面にコーティングされたシリカに核酸が吸着した磁性ビーズ２２５が示されている。

20

【００７２】

複数のキャピラリー１００は、互いに独立で、平行に、かつ直線状の配列になるように、設けられている。キャピラリー１００を直線的な配列にすることで、互いに正対する矩形磁石２６０は、容易に複数のキャピラリー１００を挟み込み、上下運動のような単純作業によって同時に複数のキャピラリー１００の対応部に、同時に磁力を印加することができる。それによって、複数のキャピラリー１００内で、磁性ビーズ２２５に対し、同一の動きをさせることが容易になり、自動化装置の単純化が可能になる。なお、キャピラリー１００の内部には、第１～第７プラグが設けられ、それぞれ順に、オイル１０、洗浄液２０、オイル３０、逆転写反応液４０、オイル５０、溶出液６０、オイル７０が充填されている。

30

【００７３】

(３) 核酸抽出用装置の構成

本発明の核酸抽出用装置３０００は、(１)の核酸抽出用器具２０００を装着して核酸の抽出を行う装置である(図３)。この装置３０００は、キャピラリー２００で支持しながら核酸抽出用器具２０００を装着するための装着部３００と、装着部３００に核酸抽出用器具２０００が装着された場合に、キャピラリー２００及び必要に応じてタンク１２０の側面から磁力を印加するための磁力印加部４００と、装着部３００及び磁力印加部４００の相対的な配置を、キャピラリー２００の長手方向に沿って変化させるための移動機構５００と、キャピラリー２００の一部を過熱するための加熱部６００を有する。そして、装着部３００と磁力印加部４００との相対的な位置関係を変化させることによって、核酸抽出用器具２０００内の磁性粒子をその内部で移動させることができる。

40

【００７４】

装着部３００は、キャピラリー２００が沿うように配置される添え板３１０を有している。この添え板３１０によって、キャピラリー２００の振動等を抑制することができる。また、装着部３００は、クリップ機構３２０を有しており、これによりキャピラリー２００を２箇所固定する。

【００７５】

装着部３００は、磁力印加部４００との位置関係が、キャピラリー２００の長手方向に対して相対的に変化することができるよう構成される。本実施例では、磁力印加部４００の移動を行わずに装着部３００を磁力印加部４００に対して相対的に移動させるように

50

設計されているため、装着部 300 を移動させる移動機構 500 が設けられている。なお、装着部 300 には、ヒンジ 330、ガイドレール 340、駆動ベルト 350、モーターが設けられている。

【0076】

磁力印加部 400 は、タンク 120 及びキャピラリー 200 を挟んで対向して設けられた一対の矩形磁石 410 を有している。一対の矩形磁石 410 は、キャピラリー 200 の外径よりも大きい間隔で離れて位置している。また、磁力印加部 400 は、一対の矩形磁石 410 の一方がキャピラリー 200 に接近すると他方がキャピラリー 200 から離間するように配置され、モーター 420 によって、一対の矩形磁石 410 がキャピラリー 200 に接近したり離れたりするように揺動させることができるようになっている（詳しくは後述）。モーター 420 は、タンク 120 やキャピラリー 200 のどの位置に磁力を印加する場合でも、必要に応じて駆動することができる。

10

【0077】

加熱部 600 は、装着部 300 にキャピラリー 200 が装着された場合に、キャピラリー 200 の第 4 プラグと第 6 プラグを加熱することができ、独立に制御される 2 個のヒーターを備える。

【0078】

核酸抽出装置 3000 は、第 2 プラグ 20 の第 1 洗浄液及び第 6 プラグ 60 の第 2 洗浄液の少なくとも一方による洗浄によって、磁性粒子 M に吸着した核酸の量が減少している場合でも、第 4 プラグ 40 の溶出液に対して、十分な量の核酸を溶出させることができる。これにより、洗浄効果を高めることができるとともに、PCR のために十分な濃度の核酸を溶出液に対して溶出させることができる。

20

【0079】

（4）矩形磁石の使用法

図 4 は、核酸抽出用装置のうち、キャピラリー 200 と矩形磁石 410、及び矩形磁石 410 の使用方法が示されている。

【0080】

互いに正対する矩形磁石 410 は、容易にキャピラリー 200 を挟み込み、上下運動のような単純作業によってキャピラリー 200 に、磁力を印加し、キャピラリー 200 内の磁性ビーズ 125 を上下させることができる。それによって、自動化装置の単純化が可能になる。

30

【0081】

また、例えば、A のように、両側に 2 つある矩形磁石 410 のうち、左側をキャピラリー 200 にちかづけることで、磁性ビーズ 125 はキャピラリー 200 の左側に固まり、右側をキャピラリー 200 にちかづけることで、磁性ビーズ 125 はキャピラリー 200 の右側に固まる。また、C のように、両方の矩形磁石 410 とともに、キャピラリー 200 から離すことによって、磁性ビーズ 125 はキャピラリー 200 内で、散在するようになる。従って、同じ場所で、矩形磁石 410 を左右に動かすことで、A の状態と B の状態を繰り返すことができ、磁性ビーズ 125 を揺動させることができる。

40

【0082】

（5）核酸抽出方法

以下、1 本のキャピラリー 200 を有する核酸抽出用装置 3000 を用いた核酸抽出方法を示す。

【0083】

インフルエンザの診断において、綿棒で咽頭内の粘膜から採取された検体を、タンク 130 の蓋 122 を外した後、溶解液 124 を含むタンク 130 内に挿入し、溶解液 124 に検体を採取した綿棒を浸すことで、ウイルスを溶解液 124 中に採取する。溶解液 124 内には、表面がシリカでコーティングされた磁性ビーズ 125 が入っており、蓋 121 を閉め、タンク 130 を振とうすることによって、磁性ビーズ 125 に核酸を吸着させる。

50

【 0 0 8 4 】

次に、再度、タンク 1 3 0 の蓋 1 2 2 を外し、キャピラリー 1 0 0 の上栓 1 1 0 を外して、タンク 1 3 0 とキャピラリー 1 0 0 を接続し、キャピラリーを重力方向に平行に設置する。

【 0 0 8 5 】

その後、矩形磁石 4 1 0 を用い、キャピラリー 1 0 0 に沿って、重力方向に動かすことによって、磁性ビーズ 1 2 5 を各プラグ内に通してゆく。途中で、図 4 に示したように、左右の矩形磁石 4 1 0 を交互に用いることによって、磁性ビーズ 1 2 5 を左右に振動させてもよい。

【 0 0 8 6 】

磁性ビーズ 1 2 5 を、予めヒートブロックで 4 5 に加熱した第 4 プラグまで移動させた後、30 秒間静止させ、逆転写反応を行う。

【 0 0 8 7 】

その後、さらに、磁性ビーズ 1 2 5 を、予めヒートブロックで 8 0 に加熱した第 6 プラグまで移動させ、30 秒間、矩形磁石 4 1 0 を揺動させて、磁性ビーズ上の c D N A を溶出させる。

【 0 0 8 8 】

最後に、キャピラリー 1 0 0 の下栓 1 1 0 を外し、タンク 1 2 0 を指で両側から押してへこませることで、タンク 1 2 0 内を加圧し、キャピラリー 1 0 0 の下端からオイル 7 0 及び溶出液 6 0 を押し出すことで、溶出させた c D N A を含む溶出液 6 0 を別の容器に受け取ることが可能である。

【 0 0 8 9 】

あるいは、第 6 プラグ内で、P C R 反応を行なってもよい。

【 0 0 9 0 】

(6) 1 段階溶出と 2 段階溶出の比較

内径 1 . 0 m m 、長さ 1 0 0 m m のキャピラリー及び 1 0 m L のタンクを用いて、第 1 ~ 第 7 プラグを有する核酸抽出用器具 (2 段階溶出用) を作製した。ここで、第 2 プラグは 2 5 μ L 、第 4 及び第 6 プラグは 2 μ L とした。また、各オイルプラグの長さは、1 2 . 5 m m とした。各プラグの溶液は、以下のものを用いた。

第 2 プラグ : 5 m M トリス塩酸緩衝液

第 4 プラグ :

0 . 2 u / μ L	A M V 逆転写酵素 (日本ジーン)
0 . 8 m M	d N T P
0 . 5 μ M	プライマー (reverse)
2 . 0 m g / m L	B S A
x 1	バッファー (MgCl ₂ 7mM; Tris pH9.0 25mM; KCl 50mM)

第 6 プラグ :

0 . 0 5 u / μ L	G e n e T a q N T P C R 酵素 (日本ジーン)
0 . 5 m M	d N T P
0 . 5 μ M	プライマー (forward)
0 . 5 μ M	プライマー (reverse)
0 . 2 5 μ M	プローブ (Taq man)
2 . 0 m g / m L	B S A
x 1	バッファー (MgCl ₂ 7mM; Tris pH9.0 25mM; KCl 50mM)

【 0 0 9 1 】

対照として、第 6 ~ 第 7 プラグを有さず、第 4 プラグに P C R 用試薬が混合されている以下の溶液が入っているキャピラリー (1 段階溶出用) を用いた。

第 4 プラグ :

0 . 2 u / μ L	A M V 逆転写酵素 (日本ジーン)
-------------------	-----------------------

0.125 u / μ L Gene Taq NT PCR 酵素 (日本ジーン)
 0.5 mM d N T P
 1.0 μ M プライマー (forward)
 1.0 μ M プライマー (reverse)
 0.5 μ M プローブ (Taq man)
 4.0 mg / mL B S A
 x 1 バッファー (MgCl₂ 7mM; Tris pH9.0 25mM; KCl 50mM)

【 0 0 9 2 】

オリゴヌクレオチド配列 :

プライマー (forward) : GAC CAA TCC TGT CAC CTC TGA C (配列番号 1)

プライマー (reverse) : AGG GCA TTT TGG ACA AAG CGT CTA (配列番号 2)

プローブ (Taq man) : FAM- TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG -TAMRA (配列番号 3)

【 0 0 9 3 】

これらのキャピラリーについて、作製した直後のもの、1週間4 保存のもの、6ヵ月間4 保存のもの、の3種類を以下の実験に用いた。

【 0 0 9 4 】

タンクに、350 μ L の溶解液 [5 M グアニジンチオシアン酸塩、2 % T r i t o n X - 1 0 0、5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 2)] 及び 2 μ L の磁性ビーズ分散液を入れて、検体を採取した綿棒を浸し、蓋を閉めて、30秒間、約100回振ることにより混合した。この磁性ビーズ分散液として、30体積%の磁性シリカ粒子 (N P K - 4 0 1、東洋紡績社) を含む 3 0 質量 % 塩化ナトリウム水溶液を用いた。

【 0 0 9 5 】

このようにして準備したタンクを、キャピラリーに接続し、重力と平行になるように核酸抽出用器具を設置した。そして、容器側面に磁石を接触させ、上述の方法によって、洗浄、逆転写、溶出の工程を行い。溶出液をキャピラリーの外に放出した。得られた溶出液 2 μ L 全量を昇降式 P C R 装置 (特願 2 0 1 0 - 2 6 8 0 9 0 明細書・実施例 1 に記載の装置) を用いて、P C R 反応を行った。図 5 は、P C R サイクルの経過に伴う輝度の変化を示す。

【 0 0 9 6 】

図 5 より、対照の 1 段階溶出では、キャピラリー作製後 1 週間で、すでに検出感度が落ちており、6ヶ月経つと、ほとんど検出できなくなったのに対し、本発明の 2 段階溶出では、キャピラリー作製後 6ヶ月経っても、ほとんど検出感度の現象は観察されなかった。

【 0 0 9 7 】

また、キャピラリー作製直後で比較しても (図 6)、本発明の 2 段階溶出のほうが、対照の 1 段階溶出より、検出感度が高かった。

【 0 0 9 8 】

(7) 洗浄プラグを増やした場合

さらに、第 5 プラグと第 6 プラグとの間に、第 5 プラグ側から順に、オイルと混和しない洗浄液からなる第 1 0 プラグ、及びオイルからなる第 1 1 プラグを有したキャピラリーを作製し、作製直後に実験を行った。第 1 0 プラグは第 2 プラグと同じプラグとし、第 1 1 プラグは他のオイルプラグと同じプラグとした。なお、キャピラリー以外は、(2) と同様に実験を行った。図 7 は、P C R サイクルの経過に伴う輝度の変化を示す。

【 0 0 9 9 】

(3) で行ったように、洗浄プラグの無い場合と結果を比較すると (図 7)、洗浄プラグを増やした場合のほうが、P C R による増幅効率が良かった。

【 符号の説明 】

【 0 1 0 0 】

1 0 ~ 7 0 第 1 ~ 第 7 プラグ

1 0 0 キャピラリー

10

20

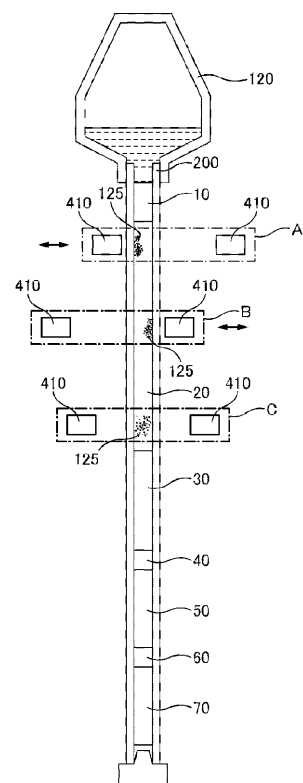
30

40

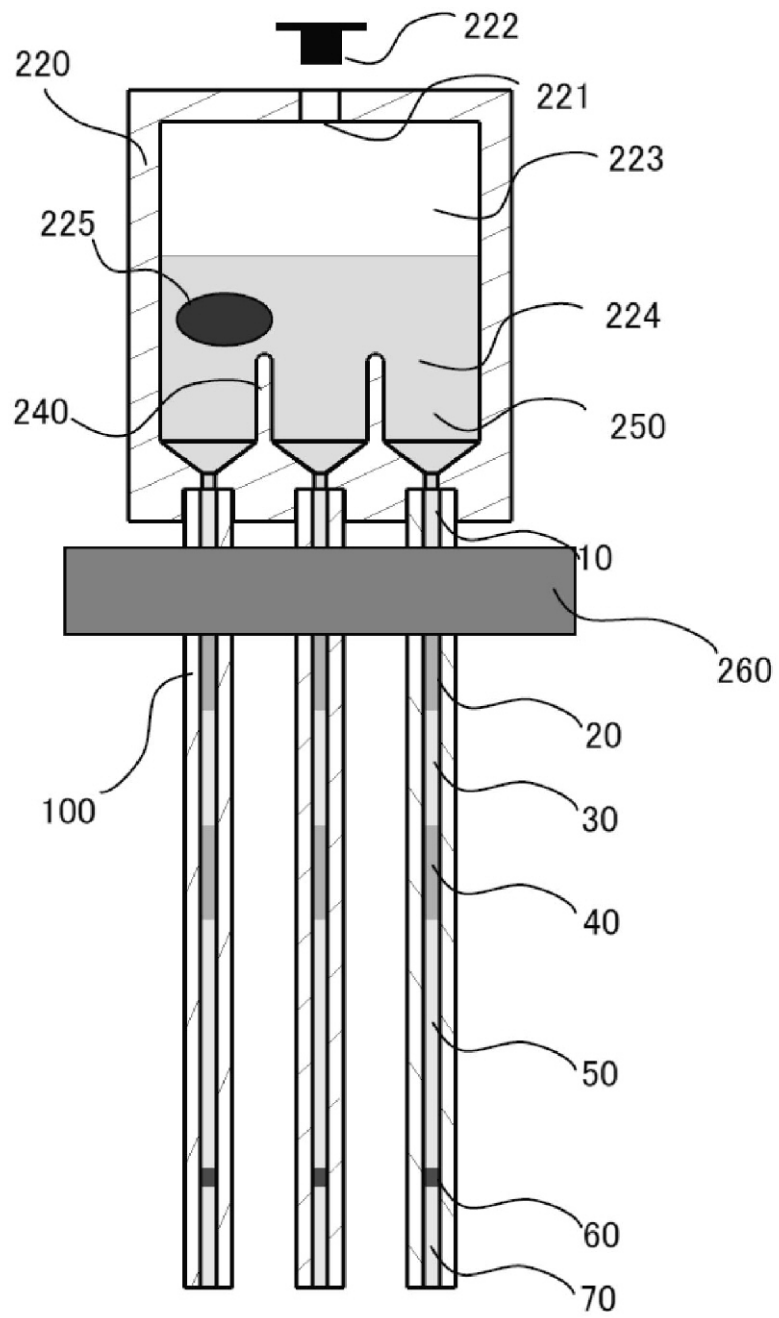
50

1 1 0	栓	
1 2 0	(装着後の)タンク	
1 2 1	開口部	
1 2 2	蓋	
1 2 3	空間	
1 2 4	溶解液	
1 2 5	磁気ビーズ	
1 3 0	(装着前の)タンク	
2 0 0	キャピラリー	
2 2 0	タンク	10
2 2 1	開口部	
2 2 2	蓋	
2 2 3	空間	
2 2 4	溶解液	
2 2 5	磁気ビーズ	
3 0 0	装着部	
3 1 0	添え板	
3 2 0	クリップ機構	
3 3 0	ヒンジ	
3 4 0	ガイドレール	20
3 5 0	駆動ベルト	
4 0 0	磁力印加部	
4 1 0	矩形磁石	
4 2 0	モーター	
5 0 0	移動機構	
6 0 0	加熱部	
2 0 0 0	核酸抽出器具	
3 0 0 0	核酸抽出装置	

【 図 4 】

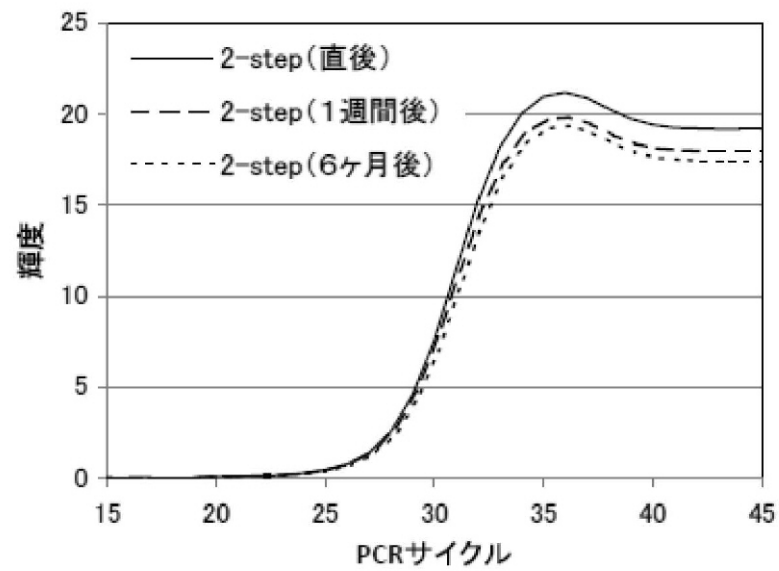


【図 2】

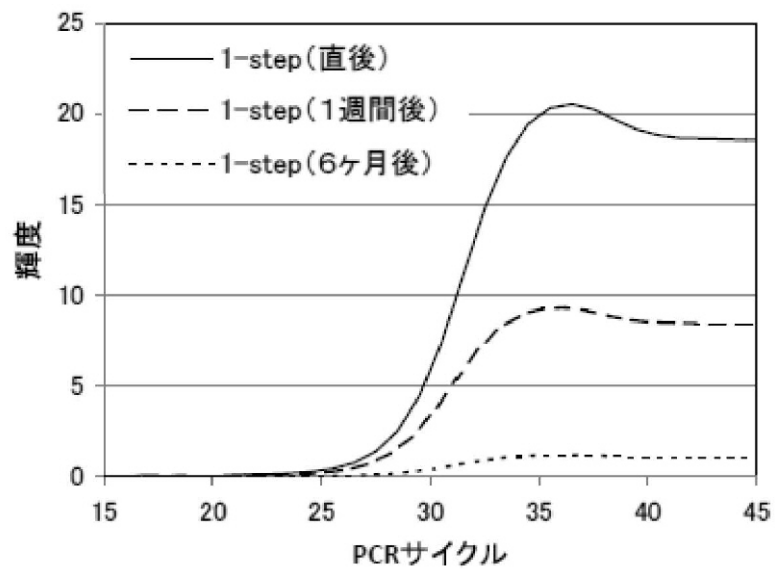


【図5】

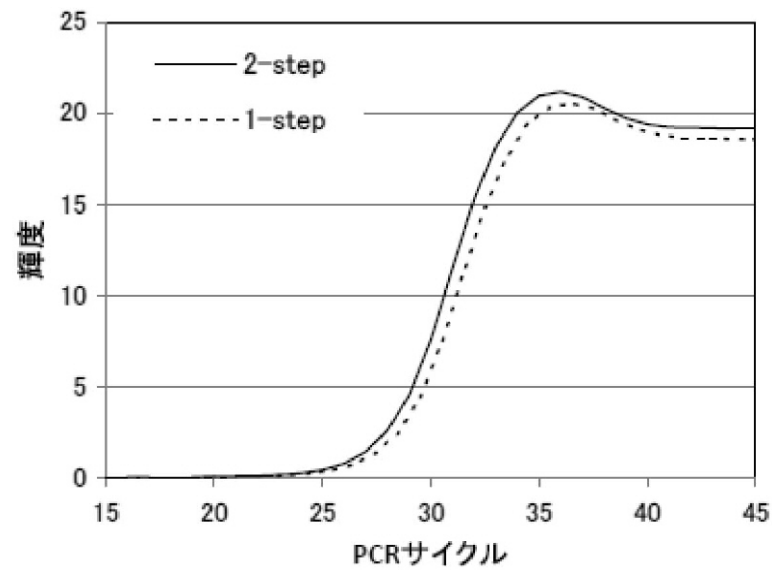
(A) 本発明に係る2段階溶出



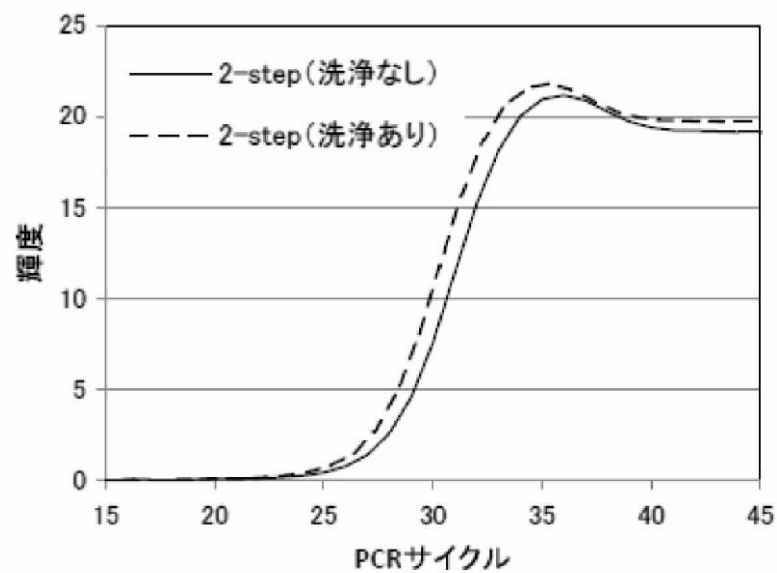
(B) 対照：1段階溶出



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2014083041000001.app