(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4519247号
(P4519247)

(45)発行日　平成22年8月4日(2010.8.4)　(24)登録日　平成22年5月28日(2010.5.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	A

請求項の数 8　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願2000-65486(P2000-65486)
(22)出願日　平成12年3月9日(2000.3.9)
(65)公開番号　特開2001-252100(P2001-252100A)
(43)公開日　平成13年9月18日(2001.9.18)
審査請求日　平成19年3月2日(2007.3.2)

(73)特許権者　390014960
シスメックス株式会社
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(72)発明者　池田　昌郁
兵庫県神戸市西区室谷１丁目１－２
国際試薬株式会社　研究開発センター内

審査官　神谷　昌男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸の抽出精製用試薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

核酸結合能を有する磁性粒子を用いた核酸の抽出精製用試薬であって、デキストラン硫酸を含有する液状試薬であることを特徴とする核酸抽出精製用試薬。

【請求項２】

磁性粒子が、シリカを含む磁性粒子又は、表面にカルボキシル基、シラノール基もしくはその組み合わせからなる官能基を修飾した磁性粒子である請求項１に記載の核酸抽出精製用試薬。

【請求項３】

核酸を吸着させるための磁性粒子と、デキストラン硫酸を含有する核酸吸着促進用試薬と、を有する核酸抽出精製キット。

【請求項４】

生物試料を溶解するための溶解液と、核酸が吸着した磁性粒子を洗浄するための洗浄液と、核酸が吸着した磁性粒子から核酸を溶出させるための溶出液と、をさらに有する請求項３に記載の核酸抽出精製キット。

【請求項５】

溶解液が、プロテアーゼを含む溶解液である、請求項４に記載の核酸抽出精製キット。

【請求項６】

核酸抽出精製キットが、自動核酸抽出装置に使用される核酸抽出精製キットである、請求項３～５のいずれか１項に記載の核酸抽出精製キット。

【請求項７】
核酸を含有する試料に、デキストラン硫酸の溶液および磁性粒子を添加し、核酸を磁性粒子に結合させる工程と、核酸が結合した磁性粒子を洗浄液により洗浄する工程と、核酸が結合した磁性粒子から核酸を溶出させる工程と、を有する核酸の精製方法。
【請求項８】
核酸を磁性粒子に結合させる工程の前に、核酸を含有する試料に溶解液を加え、核酸を抽出する工程をさらに有する、請求項７に記載の核酸の精製方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、核酸の精製および測定に使用しうる核酸の抽出精製用試薬に関する。さらに詳しくは、核酸を含有する試料から、ポリアニオン性物質の存在下で核酸結合能を有する固相担体を用い、煩雑な操作をすることなく、短時間で行う核酸抽出精製方法、および核酸の抽出精製キットに関する。
【０００２】
【従来の技術】
核酸を含有する試料から核酸を抽出精製する方法は、遺伝子工学や臨床診断の分野において不可欠である。例えば、ある核酸を解析するにあたっては、核酸を含有する生物試料からＤＮＡもしくはＲＮＡを抽出精製する必要がある。また、感染症の診断においても、細菌やウイルスからＤＮＡもしくはＲＮＡを抽出した後、検出することが一般的である。
【０００３】
生物試料においては一般的に、ＤＮＡやＲＮＡといった核酸は、蛋白質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁などの殻の中に存在しており、また核酸は遊離した状態で存在しているのではなく、蛋白質と複合体を形成している。このため核酸を含有する生物試料から核酸を抽出精製する場合には、プロテアーゼによる酵素処理や界面活性剤などを用いた変性処理、また、超音波処理や熱処理により核酸を遊離させた後、フェノールやクロロホルムといった有機溶媒による抽出操作や塩化セシウムを用いた超遠心分離等により核酸を精製する必要があり、これらの手法は、遺伝子工学や臨床診断の分野において、用いる核酸の用途によって組み合わされ、至適化されているのが現状である。
【０００４】
上記有機溶媒による抽出操作は、時間を要し煩雑な遠心操作を必要とし、また塩化セシウムを用いた超遠心操作も同様に時間を要し、脱塩も必要であり、コストがかかるという問題がある。
【０００５】
一方、簡便な核酸抽出精製方法として、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子を用いる方法がある（特開平９－１９２９２号公報）。この方法は核酸を含有する生物試料から遠心操作を行わずに非特異的に核酸を吸着させ、水またはＴＥバッファーなど低濃度の緩衝液を用いて磁性シリカ粒子から吸着した核酸を溶出後直ちに解析できるといった利点を持つ。しかし、カオトロピック物質によりイオン強度を高められた状態で核酸を吸着しうる磁性粒子は磁性シリカ粒子のみであり、市販されている一般的な磁性粒子、例えば、カルボキシル基やカルボキシル基にシラノール基が導入された官能基を持つ磁性粒子はカオトロピック物質によりイオン強度を高めた状態では核酸を吸着させることはできない。
【０００６】
【発明が解決しようとする課題】
本発明の目的は、従前の技術が有する上記問題点を解決することであり、核酸を含有する試料から煩雑な操作をすることなく、短時間で核酸を抽出精製する試薬、その試薬を用いた核酸の精製方法及び核酸抽出精製キットを提供することである。
【０００７】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために鋭意検討した結果、適当なポリアニオン性物質を用いることにより、上記のようにシリカでコーティングされたもののみでなく、例えばカルボキシル基やカルボキシル基にシラノール基が導入された担体にも核酸が効率良く吸着し、ＴＥバッファーなど低濃度の緩衝液を用いて吸着した核酸を溶出できることを見出し本発明を完成させた。

【０００８】

すなわち、本発明は、核酸を含有する試料から、核酸結合能を有する磁性粒子を使用することによって、核酸を抽出精製するに際して、デキストラン硫酸を液相に存在させることを特徴とする核酸の抽出精製用試薬である。別の本発明は、この抽出精製用試薬を利用した核酸の精製方法である。さらに別の本発明は、これら抽出精製に使用される試薬を含む、核酸の測定用キットである。

【０００９】

本発明の核酸の精製方法は、下記のような工程からなる；

（ａ）核酸を含有する試料に、デキストラン硫酸溶液および磁性粒子を添加混合し、核酸を磁性粒子に結合させる、

（ｂ）（ａ）工程における核酸－磁性粒子の複合体を洗浄液により洗浄する、

（ｃ）（ｂ）工程にて洗浄した核酸－磁性粒子複合体から用途に応じて、核酸を溶出させる。

【００１０】

【発明の実施の形態】

本発明において核酸とは、ＤＮＡ、ＲＮＡを含みプラスミドＤＮＡであってもよい。その長さは格別限定されないが、塩基配列として、好ましくは８個以上のものが適当である。

【００１１】

また、本発明に用いられる核酸を含有する試料としては、核酸を含有するものであれば特に限定されないが、ＰＣＲ産物、生物試料を例示することができる。生物試料とは生物に由来する試料を意味し、全血、血漿、血清、骨髄、バッフィーコート、尿、体液、唾液、鼻汁、涙液、糞便由来物、細胞培養物、細胞溶解物、培養培地等のような核酸を含有する可能性ある生物試料を例示することができる。

【００１２】

また必要に応じて例えば生物試料をあらかじめ溶解し核酸を抽出してもよい。生体試料からの核酸の溶出・抽出方法としては、溶解液を加え、細胞を溶解させ、有機溶媒を加えて核酸を抽出させる方法が例示される。

【００１３】

生体試料からの核酸の溶出に用いられる溶解液は、プロテアーゼが含まれることが好ましく、プロテアーゼとしては細胞膜の破壊や生物試料中に含まれる蛋白質を分解するものであれば特に限定されない。具体的には、プロナーゼ、プロテイナーゼＫ等が挙げられ、これらのうち、プロテイナーゼＫが好ましく用いられる。その使用濃度としては、０．１～１０００Ｕ／ｍＬの範囲で使用するのが好ましい。また緩衝液を溶解液に含有させることも可能で、ｐＨ６～１２の範囲が好適である。この緩衝剤としては、一般に使用されているものであれば特に限定されるものではないが、ｐＨ６～１２の範囲のいずれかのｐＨにおいて緩衝能を持つものが望ましく、例えば、１，３ビス［トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ］プロパン、トリス［ヒドロキシメチル］アミノメタン等が挙げられ、その使用濃度としては、１～５００ｍｍｏｌ／Ｌ、ｐＨは６～１２の範囲が好ましい。

【００１４】

さらに本発明に用いられる有機溶媒は、核酸の核酸結合能を有する固相担体への結合を妨げるものでなければ特に限定されない。本発明に用いられる有機溶媒の具体例としては、水飽和フェノール、緩衝液飽和フェノール、クロロホルム等が挙げられる。これらのうち、水飽和フェノールまたは緩衝液飽和フェノール、あるいはこれらの飽和フェノー

ルとクロロホルムを適当な割合で混合したものが好ましい。

【００１５】

また、核酸の溶解・抽出操作時に塩化ナトリウム、ＳＤＳ、グリコーゲン等を適宜用いてもよい。

【００１６】

本発明は、上記核酸を含有する試料から、核酸結合能を有する固相担体を使用することによって、核酸を分別するに際し、ポリアニオン性物質を液相に存在させることを特徴とする核酸の分別手段である。本発明による核酸の分別手段は、（ａ）吸着工程、（ｂ）洗浄工程、（ｃ）溶出工程の３段階に大きく分けられる。

【００１７】

（ａ）吸着工程

この工程では、核酸を含有する試料に、ポリアニオン性物質溶液および核酸結合能を有する固相担体を添加、混合し、核酸を核酸結合能を有する固相担体に吸着させる。

【００１８】

本発明に用いられるポリアニオン性物質は、核酸と固相担体との親和性を高めるポリアニオン性物質が含まれる。ポリアニオン性物質は、核酸の核酸結合能を有する固相担体への吸着を促進するものと推察される。ポリアニオン性物質としては、多価陰イオン性の物質であって核酸と固相担体との親和性を高めるものであれば特に限定されないが、その具体例としてデキストラン硫酸、リンタングステン酸マグネシウム、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸などが挙げられる。これらのうち、デキストラン硫酸が好ましく用いられ、その分子量は５００～５００，０００、その使用濃度としては０．５～３０％の範囲が好ましい。

【００１９】

本発明に用いられるポリアニオン性物質溶液には、イオン強度を上げるために塩を添加しており、ポリアニオン性物質の作用を促進するものと推察される。用いられる塩の具体例としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられるが、イオン強度を上げるものであれば特に限定されない。これらのうち、塩化ナトリウムが好ましく用いられ、その使用濃度としては、０．０１～３ｍｏｌ／Ｌの範囲が好ましい。

【００２０】

本発明において用いられる核酸結合能を有する固相担体としては、ポリアニオン性物質の存在下で核酸を吸着保持しうる固体であれば、特に限定されない。具体的には、二酸化ケイ素、すなわちシリカが好ましく用いられる。また、シリカから構成される担体であるガラス、ケイソウ土、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や、さらに超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。さらにカルボキシル基やシラノール基およびこれらの組み合わせからなる官能基で表面を修飾したものや、さらに超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。これらのうち、吸着と溶出の効率を考えると、固相担体は粒子であることが好ましく、その大きさとしては０．０５～１０μｍの範囲が好ましい。

【００２１】

本発明においては、上記溶解液以外の、有機溶媒からなる抽出液、ポリアニオン性物質溶液、核酸結合能を有する固相担体を別々に添加しても、あるいは同時に添加してもよい。

【００２２】

（ｂ）洗浄工程

この工程は、溶解液、有機溶媒、および核酸結合能を有する固相担体の混合物から、核酸が吸着した核酸結合能を有する固相担体のみを分離・洗浄する工程である。この時、洗浄液を使用して１～３回程度、繰り返し洗浄するのが好ましい。

【００２３】

本発明における核酸結合能を有する固相担体の分離のための具体的な手段は、使用する固相担体の形態により異なり、例えば核酸結合能を有する固相担体の場合には、遠心

分離、ろ過等が好ましく、超常磁性金属酸化物を含ませておいたものを固相担体として使用する場合には、磁石等を用いて簡便な磁力による分離が可能となり、より好ましい。

【００２４】

本発明において用いられる洗浄液としては、固相担体に保持された核酸の遊離を妨げるものや蛋白質の固相担体への吸着を妨げるものであれば、特に限定されない。具体的には、０．５～２．５ｍｏｌ／Ｌ塩化ナトリウム溶液あるいは４０～１００％エタノールで洗浄することが好ましい。

【００２５】

（ｃ）溶出工程

この工程は核酸が吸着した核酸結合能を有する固相担体から核酸を溶出させる工程であり、本発明に用いられる溶出液としては固相からの核酸の溶出を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはＴＥバッファー［１０ｍｍｏｌ／Ｌトリス塩酸緩衝液、１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０］が好ましい。この時回収した核酸は透析やエタノール沈殿等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、制限酵素や核酸ポリメラーゼ等を使用した酵素反応に直接使用することができる。

【００２６】

上記のように、本発明による核酸の精製方法は、単純な工程から構成されるため、核酸抽出精製キットならびに固相担体の分離操作や試薬分注操作を自動化した核酸抽出装置へ、容易に応用しうることは明らかである。

【００２７】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【００２８】

実施例１　血清に添加したＤＮＡの回収

（１）ＤＮＡ抽出材料の調製

λ－ＤＮＡ（宝酒造 社製）１μｇを秤取し、血清に加え、１μｇ／２００μＬとなるように調製し、ＤＮＡ抽出材料とした。

【００２９】

（２）λ－ＤＮＡの抽出精製

上記（１）にて調製した２００μＬのＤＮＡ抽出材料を３本の２ｍＬのマイクロチューブに取り、それぞれに２００μＬの溶解液［５０ｍｍｏｌ／Ｌトリス（ヒドロキシル）アミノメタン－塩酸（ｐＨ８．０）、５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、０．２５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、１％ＳＤＳ、２０μｇ／ｍＬグリコーゲン、１２０Ｕ／ｍＬプロテイナーゼＫ］を加え、ボルテックスミキサーで混合し、５６℃で３０分間加温した。加温後、４００μＬのＴＥバッファー飽和フェノール／クロロホルムをそれぞれのチューブに加え、激しく攪拌した。

【００３０】

これらに８００μＬのポリアニオン性物質溶液［２０％デキストラン硫酸（平均分子量５０００、シグマ社製）、２．５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ］を加えて混合し、４０μＬの異なる種類の０．１ｇ／ｍＬ磁性粒子［（平均粒径３μｍ、四三酸化鉄１５％含有、比表面積０．１７m^2／ｇ、官能基 C_3COOH；SiO_2…ＳｉＯＨ：ｍｉｃｒｏｍｏｄ社製　ｍｉｃｒｏｍｅｒ－Ｍ）、（平均粒径 ６．１７μｍ、四三酸化鉄粒子４３％含有、比表面積１５９m^2／ｇ、細孔容積２７９mm^3／ｇ、表面細孔直径３．２ｎｍ：他磁性粒子１・２）］をチューブに加え、室温で１０分間混合した。

【００３１】

次にチューブを磁気スタンドに設置して、磁性粒子をチューブ壁に集め、上清を除いた。磁気スタンドからチューブを外した後、さらに１ｍＬの洗浄液［７０％エタノール］を加えて、ボルテックスミキサーを用い、十分に混和した。同様に磁気スタンドにチューブを置き、上清を除き、この洗浄操作を２回繰り返した。上清を除いた後、マイクロチ

ューブを５６℃にセットしたヒートブロックに置き、１０分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発させ、取り除き、粒子を乾燥させた。これに５０μＬの滅菌水を添加し、５６℃で１０分間混合した後、磁気スタンドに置いて磁性粒子を集め、上清を回収した。

【００３２】

３種の磁性粒子を用いた回収液のうち、それぞれ５μＬを１．０％アガロースゲルにアプライし、１００Ｖ、４０分間電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色し、蛍光バイオイメージアナライザー［ＦＭＢＩＯ（登録商標）ＩＩ　Ｍｕｌｔｉ－Ｖｉｅｗ：宝酒造社製］で検出した結果を図１に示す。

【００３３】

（３）回収したλ－ＤＮＡの制限酵素消化

上記（２）λ－ＤＮＡの抽出精製において得られた回収液のうち１０μＬを取り、３μＬの１０×Ｍバッファー［１００ｍｍｏｌ／Ｌトリス－塩酸（ｐＨ７．５）、１００ｍｍｏｌ／Ｌ塩化マグネシウム、１０ｍｍｏｌ／Ｌジチオスレイトール、５００ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ］、１μＬの１５Ｕ／μＬのＨｉｎｄ　ＩＩＩ（宝酒造社製）ならびに滅菌水を加え全量を３０μＬとし、３７℃で１６時間放置した結果、本発明による分別手段にて抽出精製されたλ－ＤＮＡは、制限酵素Ｈｉｎｄ　ＩＩＩによって完全に切断されており、直ちに、制限酵素消化に使用できることが確認できた。

【００３４】

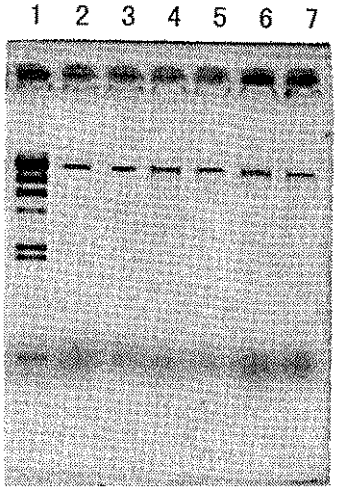
【発明の効果】

本発明によれば、ポリアニオン性物質存在下で核酸結合能を有する固相担体を使用することにより、核酸を含有する試料から核酸を吸着させ、さらに適当な溶出液を使用することにより、煩雑な操作をすることなく、短時間で核酸を抽出精製することができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】　λ－ＤＮＡを添加した血清から、ポリアニオン性物質存在下で磁性粒子によりλ－ＤＮＡが回収されたことを示す図である（実施例１）。図中、レーン１：λ－Ｈｉｎｄ　ＩＩＩマーカー、レーン２：磁性粒子ｍｉｃｒｏｍｅｒ－Ｍ（３μｍ）による回収１、レーン３：磁性粒子ｍｉｃｒｏｍｅｒ－Ｍ（３μｍ）による回収２、レーン４：他磁性粒子１による回収１、レーン５：他磁性粒子１による回収２、レーン６：他磁性粒子２による回収１、レーン７：他磁性粒子２による回収２。回収１、２は、各磁性粒子について、同様のλ－ＤＮＡ回収実験を２回行い、それぞれの結果を示している。

【図１】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０９－０１９２９２（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－２３６５０６（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５０６９９１（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－１６５０６６（ＪＰ，Ａ）
特表平０１－５０２３１９（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－２７７０６２（ＪＰ，Ａ）
特開平０８－０００２９６（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－０２０１３０（ＪＰ，Ａ）
特開平０４－２２８０７５（ＪＰ，Ａ）
Anal. Biochem., １９８７年, 165, 20-27
Exp. Cell Res., １９７６年, 102, 143-152

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
G01N 33/48-33/98
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)