(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3575633号
(P3575633)
(45)発行日　平成16年10月13日(2004.10.13)　(24)登録日　平成16年7月16日(2004.7.16)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12Q 1/68	C12Q	1/68	Z
C12N 15/09	C12Q	1/10	
C12Q 1/10	C12Q	1/70	
C12Q 1/70	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 1　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願平6-340360
(22)出願日　平成6年12月27日(1994.12.27)
(65)公開番号　特開平8-173198
(43)公開日　平成8年7月9日(1996.7.9)
審査請求日　平成12年9月13日(2000.9.13)

(73)特許権者　000001993
株式会社島津製作所
京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳
(72)発明者　西村　直行
京都市中京区西ノ京桑原町１番地　株式会社島津製作所三条工場内
(72)発明者　中山　知子
京都市中京区西ノ京桑原町１番地　株式会社島津製作所三条工場内

審査官　鈴木　美葉子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸合成法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
血液を主成分とする試料中に存する、目的核酸の塩基配列を増幅させる核酸合成法において、予め血液成分を凝固させることを特徴とする核酸合成法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、核酸合成法、特にポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）法を用いる核酸合成法に関する。
【０００２】
【従来の技術および発明が解決しようとする課題】
従来、肝炎の原因ウイルスであるＨＢＶ、ＨＣＶ又はＡＩＤＳの原因ウイルスであるＨＩＶ等のウイルス、敗血症を起こす細菌又は遺伝病等の遺伝子検査には、血液中に存在するウイルス、細菌又は末梢血白血球のＤＮＡまたは逆転写酵素によりＲＮＡより合成したｃＤＮＡをポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）法により増幅させて検出する方法が用いられている。
しかし、血液、血清又は血漿試料を直接ＰＣＲ反応溶液中に添加しても、試料中に含まれる夾雑物によりＰＣＲが強く抑制され、目的とする核酸の検出が困難となる。従って、核酸合成前に、試料中のウイルス、細菌又は細胞からＤＮＡ又はＲＮＡの分離精製が必須となる（Ｂｌｉｎ，Ｎ　ａｎｄ　Ｄ．Ｗ．Ｓｔａｆｆｏｒｄ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ

Ｒｅｓ．，３，２３０３－２３０６，１９７６　）。
【０００３】
試料から、ウイルス、細菌、又は細胞の核酸を分離精製するには、フェノール－クロロホルム、イオン交換樹脂、ガラスビーズ、蛋白凝集剤等種種の材料を用いて行われ、一定の時間を必要とする。しかし、遺伝子検査は迅速を要する場合が多く、また、ＰＣＲ法は極めて高感度であるため、コンタミネーションの機会を可能な限り減らすことが必要であることから、試料の前処理はなるべく行わず、試料中の核酸を直接増幅させる方法の開発が必要とされている。
従って、本発明の目的は、血液を多く含む試料中の核酸を、複雑な前処理なしにＰＣＲ法により増幅させる方法を提供することにある。
【０００４】
【課題を解決するための手段】
本発明者らは、上記の状況に鑑み、ＰＣＲ法に対する血清の影響を鋭意検討したところ、ＰＣＲ反応溶液にヒト血清を１０％の濃度で添加し、標的ＤＮＡを加えてＰＣＲを行ったところ、ＰＣＲ反応溶液が白濁化し、ＰＣＲが阻害された。このことから、本発明者らは、反応溶液の白濁化は、蛋白の凝集であり、ＰＣＲが阻害される原因の一つは、反応中の蛋白の凝集によるものであると考え、種々検討を加えたところ、血清試料についてＰＣＲを行う前に、予め、血液成分を凝固させることにより、ＰＣＲが血清の影響を受けることなく進行する事実を発見した。本発明は、かかる発見に基づき更に検討を進めて完成するに至ったものである。
【０００５】
即ち、本発明の要旨は、血液を主成分とする試料中に存する、目的核酸の塩基配列を増幅させる核酸合成法において、予め血液成分を凝固させることを特徴とする核酸合成法、に関する。
【０００６】
以下に本発明について詳細に説明する。
本発明に用いられる血液を主成分とする試料としては、ＰＣＲによる増幅の目的となる肝炎やエイズ等の原因ウイルス、細菌、細胞等を含む試料であれば、特に限定されるものではない。
【０００７】
本発明における血液を凝固させる方法としては、熱処理による方法が代表的なものである。熱処理の方法としては、ヒートブロックを用いる方法、温浴を用いる方法、電子レンジを用いる方法等のいずれでもよく、その他の熱処理方法でもよい。
本発明における熱処理の温度は、通常６５～１００℃、好ましくは７５～１００℃である。熱処理の時間は、熱処理の温度により変わるが、試料の温度が処理温度に達してから通常１秒間～６０分間、好ましくは１秒間～１０分間である。
【０００８】
熱処理に付される本発明に係る試料としては、ＰＣＲ法による増幅の目的となる肝炎やエイズ等の原因ウイルス、細菌、細胞等を含む血清そのもの又は蒸留水で１～３倍以内に希釈された試料が用いられる。
【０００９】
本発明に用いられる試料中の可溶性蛋白の含量は、通常２５ｍｇ／ｍｌ以上、、好ましくは４０ｍｇ／ｍｌ以上である。
【００１０】
血液を主成分とする試料については、本発明の方法で処理することにより、以下の実施例に示すように、ＰＣＲは支障なく行うことができる。熱処理が不十分であり蛋白の凝固が不十分であれば、ＰＣＲ中に白濁が生じ、核酸の合成は進行し難い。従って、本発明の方法を用いることにより、血液を含む試料からの核酸合成を簡易かつ迅速に行うことができる。
【００１１】

ＰＣＲは、Ｓａｉｋｉ らが開発した方法（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０，１３５０－１３５４（１９８５））に従って行うことができる。この方法は、ある特定のヌクレオチド配列領域（本発明の場合は、試料中に存在するＤＮＡ）を検出する場合、その領域の両端の一方は＋鎖を、他方は－鎖をそれぞれ認識してハイブリダイゼーションするようなオリゴヌクレオチドを用意し、それを熱変性により１本鎖状態にした試料核酸に対し鋳型依存性ヌクレオチド重合反応のプライマーとして機能させ、生成した２本鎖核酸を再び１本鎖に分離し、再び同様な反応を起こさせる。この一連の操作を繰り返すことで２つのプライマーに挟まれた領域は検出できるまでにコピー数が増大する。

【００１２】

本発明の方法は、ＰＣＲのみでなく、逆転写酵素反応やリガーゼチェインリアクション（Ｌｉｇａｒｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ） 等にも利用可能であると思われる。

【００１３】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

【００１４】

実施例１

ヒト血清１０μｌに段階希釈したＨＩＶ－１のＤＮＡ１μｌ（１００ａｇ／μｌ～１０ｆｇ／μｌ）および１～５倍希釈となるように適当量の蒸留水を加えた後、ミネラルオイル５０μｌを添加し、９５℃にて５分間の熱処理を行ったものを試料として用いた。熱処理試料に、ＰＣＲ反応溶液を添加し、溶液量を１００μｌとしてＰＣＲを行った。

【００１５】

ＰＣＲのプライマーは、Ｃ－Ｙ．Ｏｕ（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９，２９５－２９７，１９８８）が用いたＨＩＶ－１ｅｎｖ遺伝子領域内に位置するＳＫ６８（配列番号：１）とＳＫ６９（配列番号：２）とを用いた。なお、ＳＫ６８とＳＫ６９の塩基配列は次の通りであり、２種類のプライマーに挟まれる領域には１４２塩基対（プライマーを含む）が存在する。

ＳＫ６８：ＡＧＣＡＧＣＡＧＧＡＡＧＣＡＣＴＡＴＧＧ

ＳＫ６９：ＣＣＡＧＡＣＴＧＴＧＡＧＴＴＧＣＡＡＣＡＧ

ＰＣＲ反応溶液は、各プライマーを１μＭ、４種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）を２００μＭ含む反応液（１０ｍＭのトリス塩酸（ｐＨ８．３）、５０ｍＭのＫＣｌ、１．５ｍＭの$MgCl_2$ 、０．０１％（ｗ／ｖ）のゼラチン、０．０２５Ｕ／μｌの耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ（ＡｍｐｌｉＴａｑ，Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ 社製）を用いた。

ＰＣＲは、９４℃にて１分間の熱変性、５５℃にて１分間のアニーリング、７２℃にて１分間のＤＮＡ鎖伸長反応を１サイクルとして４０サイクルの反応を行い、最後に７２℃にて７分間のＤＮＡ鎖伸長反応を行うことにより、２種類のプライマーに挟まれた領域のＤＮＡ部分の増幅を行った。

【００１６】

ＰＣＲ終了後、反応液の１０μｌを用いて、３％アガロースを含むＴＡＥ（４０ｍＭのトリス－酢酸、１ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ８．０））液中で電気泳動を行い、臭化エチジウムによるＤＮＡの染色と検出を行った。

その結果を図１に示す。図は、電気泳動によるＤＮＡの検出結果であり、矢印は、特異的なＰＣＲ産物の泳動位置を、Ｍはマーカー（ＨｉｎｃＩＩて切断した１２５ｎｇのφＸ１７４のＤＮＡ）を示す。

【００１７】

蒸留水で希釈しない試料および２倍希釈した試料の熱処理により、血清蛋白の凝固が認められたが、３倍希釈もしくは５倍希釈した試料の熱処理では、血清蛋白の凝固が不完全であった。熱処理後、ＰＣＲを行ったところ、熱処理により血清蛋白の凝固が認められた希釈なしもしくは２倍希釈の試料を用いた場合、ＰＣＲ中に反応溶液の白濁が認められず、

試料中に１０コピーのＨＩＶ－１のＤＮＡが存在すれば、ＨＩＶ－１ｅｎｖ遺伝子に特異的なＰＣＲ産物が検出された。一方、熱処理により、血清蛋白の凝固が不完全な３倍希釈もしくは５倍希釈の試料を用いた場合、ＰＣＲ中に反応溶液の白濁化が認められ、試料中に１０００コピーのＨＩＶ－１のＤＮＡが存在しても、特異的なＰＣＲ産物は認められなかった。

【００１８】

実施例２

ヒト血清１０μｌに段階希釈したλファージ２μｌ（０．０５～５０００ＰＦＵ（ｐｌａｑｕｅ　ｆｏｒｍｉｎｇ　ｕｎｉｔ）／μｌ）を加え、ミネラルオイル５０μｌを添加し、９５℃にて５分間の熱処理を行ったものを試料として用いた。熱処理試料に、ＰＣＲ反応溶液を添加し、溶液量を１００μｌとしてＰＣＲを行った。

【００１９】

ＰＣＲのプライマーは、λファージ遺伝子領域内に位置するＰ１（配列番号：３）およびＰ２（配列番号：４）を用いた。なお、Ｐ１およびＰ２の塩基配列は次のとおりであり、２種類のプライマーに挟まれる領域には５００ｂｐの塩基配列（プライマーを含む）が存在する。

Ｐ１：ＧＡＴＧＡＧＴＴＣＧＴＧＴＣＣＧＴＡＣＡＡＣＴＧＧ

Ｐ２：ＧＧＴＴＡＴＣＧＡＡＡＴＣＡＧＣＣＡＣＡＧＣＧＣＣ

ＰＣＲ反応溶液の組成、ＰＣＲおよび電気泳動は、実施例１と同様に行った。結果を図２に示す。図２は、電気泳動によるＤＮＡ検出結果であり、矢印とマーカーは図１と同様である。

【００２０】

血清を予め熱処理せずにＰＣＲに用いた場合、１００００ＰＦＵのλファージが存在しても、λファージ遺伝子に特異的なＰＣＲ産物は認められないが、予め熱処理し、血清蛋白を凝固させた場合、１ＰＦＵのλファージが存在すれば、特異的なＰＣＲ産物が認められた。

【００２１】

実施例３

ヒト血清４μｌに段階希釈した易熱性エントロトキシン（ＬＴ）産生大腸菌４μｌ（０．２５～２５００ｃｆｕ／μｌ）を加え、さらにミネラルオイル２５μｌを添加し、９５℃にて５分間の熱処理を行ったものを試料として用いた。熱処理試料にＰＣＲ反応溶液を添加し溶液量を４０μｌとしてＰＣＲを行った。

【００２２】

ＰＣＲのプライマーは、ＬＴ遺伝子領域内に位置するＥＬＴ１、ＥＬＴ２（島津製作所製）を用いた。なお、２種類のプライマーに挟まれる領域には２６４ｂｐの塩基配列（プライマーを含む）が存在する。

ＰＣＲ反応溶液の組成、ＰＣＲおよび電気泳動は、実施例１と同様に行った。結果を図３に示す。図は電気泳動によるＤＮＡ検出結果であり、矢印とマーカーは図１に同じである。

【００２３】

血清を予め熱処理せずにＰＣＲに用いた場合、１試料当り１００００個のの大腸菌細胞が存在しても、反応終了液中にはＬＴ遺伝子に特異的なＰＣＲ産物は認められないが、熱処理により血清蛋白を凝固させた場合は１試料当り１個の細胞の大腸菌が存在すれば特異的なＰＣＲ産物が認められた。

【００２４】

【発明の効果】

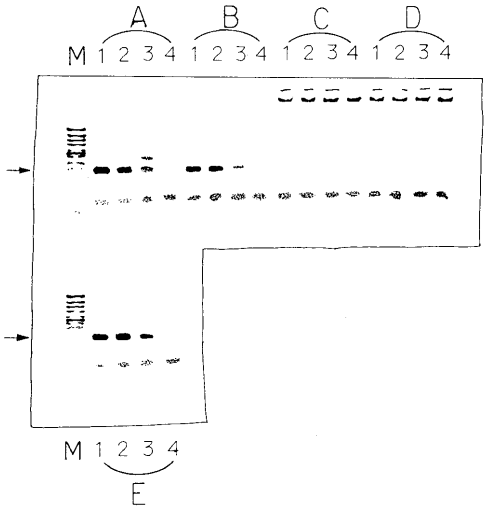
本発明により、核酸の分離精製の過程を経ずに、血液を主成分とする試料から直接目的のＤＮＡを増幅することが可能となる。

従って、本発明により、簡便、迅速、かつコンタミネーションの危険の少ない核酸合成法を提供することができる。

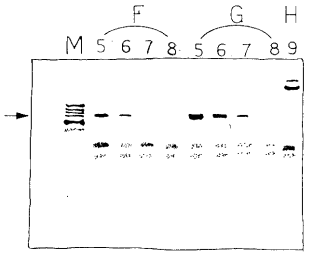
【００２５】
【配列表】
配列番号：１
配列の長さ：２０
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ
ハイポセティカル配列：ＮＯ
アンチセンス：ＮＯ
起源：ＨＩＶｅｎｖ遺伝子
配列の特徴
特徴を決定した方法：Ｓ
配列
ＡＧＣＡＧＣＡＧＧＡ　ＡＧＣＡＣＴＡＴＧＧ　２０
【００２６】
配列番号：２
配列の長さ：２１
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ
ハイポセティカル配列：ＮＯ
アンチセンス：ＮＯ
起源：ＨＩＶｅｎｖ遺伝子
配列の特徴
特徴を決定した方法：Ｓ
配列
ＣＣＡＧＡＣＴＧＴＧ　ＡＧＴＴＧＣＡＡＣＡ　Ｇ　２１
【００２７】
配列番号：３
配列の長さ：２５
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ
ハイポセティカル配列：ＮＯ
アンチセンス：ＮＯ
起源：λファージ遺伝子
配列の特徴
特徴を決定した方法：Ｓ
配列
ＧＡＴＧＡＧＴＴＣＧ　ＴＧＴＣＣＧＴＡＣＡ　ＡＣＴＧＧ　２５
【００２８】
配列番号：４
配列の長さ：２５
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ

ハイポセティカル配列：ＮＯ
アンチセンス：ＮＯ
起源：λファージ遺伝子
配列の特徴
特徴を決定した方法：Ｓ
配列
ＧＧＴＴＡＴＣＧＡＡ　ＡＴＣＡＧＣＣＡＣＡ　ＧＣＧＣＣ　　２５
【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、ＨＩＶ－１　ＤＮＡを添加したヒト血清を蒸留水で希釈して作成した試料を熱処理した後ＰＣＲを行った場合の電気泳動図である。
【図２】図２は、λファージを添加したヒト血清を熱処理後にＰＣＲを行った場合の電気泳動図である。
【図３】図３は、易熱性エンテロトキシン（ＬＴ）産生大腸菌を添加したヒト血清を熱処理後にＰＣＲを行った場合の電気泳動図である。
【符号の説明】
Ｍ　マーカー
Ａ　ヒト血清を希釈しない群
Ｂ　ヒト血清を２倍希釈した群
Ｃ　ヒト血清を３倍希釈した群
Ｄ　ヒト血清を５倍希釈した群
Ｅ　血清無添加・熱処理なし（コントロール）の群
Ｆ　血清添加し、熱処理した群
Ｇ　血清無添加・熱処理なし（コントロール）の群
Ｈ　血清添加し熱処理なし（コントロール）の群
Ｉ　血清添加し、熱処理した群
Ｊ　血清無添加・熱処理なし（コントロール）の群
Ｋ　血清添加し熱処理なし（コントロール）の群
１　添加したＨＩＶ－１　ＤＮＡのコピー数が１０００コピー
２　添加したＨＩＶ－１　ＤＮＡのコピー数が１００コピー
３　添加したＨＩＶ－１　ＤＮＡのコピー数が１０コピー
４　ＨＩＶ－１　ＤＮＡ無添加
５　添加したλファージが１０ＰＦＵ
６　添加したλファージが１ＰＦＵ
７　添加したλファージが０．１ＰＦＵ
８　λファージを無添加
９　添加したλファージが１００００ＰＦＵ
１０　添加した大腸菌が１００ＣＦＵ
１１　添加した大腸菌が１０ＣＦＵ
１２　添加した大腸菌が１ＣＦＵ
１３　添加した大腸菌が０．１ＣＦＵ
１４　大腸菌無添加
１５　添加した大腸菌が１００００ＣＦＵ

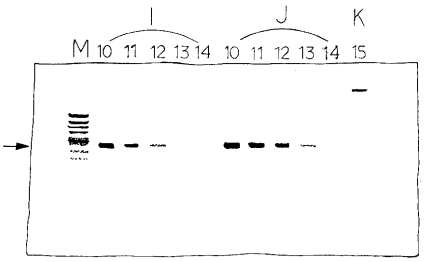
【図１】


A
B
C
D
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
M 1 2 3 4
E

【図２】


F
G
H
M 5 6 7 8 5 6 7 8 9

【図３】


I
J
K
M 10 11 12 13 14 10 11 12 13 14 15

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０３－１３３３７９（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－３１９５２７（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－２９２２９８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12Q 1/00-1/70
C12N 15/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
JSTPlus(STN)