

明 細 書

発明の名称：リアルタイムPCRによる核酸検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、リアルタイムPCRによる核酸の検出方法に関する。詳しくは、ろ紙に血液を含ませた後に乾燥させたろ紙血中の標的核酸を光学的に検出する方法、当該検出方法による核酸定量方法及び核酸定量キットに関する。

背景技術

[0002] 疾患のスクリーニング及び診断を行うための検体として、ろ紙に血液を含ませた後に乾燥させたろ紙血は、試料の安定性が高く、飛散の可能性がないため、保管および輸送の観点から有用である。また、通常の採血が困難である新生児からの検体採取方法として、新生児マススクリーニングで用いられている。また、疾患のスクリーニング及び診断を目的として、関連遺伝子の変異有無の判定や遺伝子の定量にPCR反応が広く用いられている。具体的には、スクリーニング検査として、重症複合免疫不全症の指標として環状DNAのTRE C (T-cell receptor excision circles) 及びX連鎖無ガンマグロブリン血漿の指標として環状DNAのKRE C (kappa-deleting recombination excision circles) 定量が、米国を中心に普及している。さらに、脊髄性筋萎縮症に対する治療薬が開発されてきたこともあり、その原因遺伝子であるSMN1 (Survival Motor Neuron 1) のホモ欠失によるスクリーニングの要望が高まってきている。

[0003] その検査に用いられる乾燥ろ紙血には、PCR反応を阻害する物質（ヘモグロビンなど）が多く含まれるため、一般にはろ紙血から核酸を抽出し精製して、反応試料とする方法が用いられている。一方、検体中の夾雑物によるPCR反応阻害物質の影響を低減している試薬も商業利用されている（株式会社島津製作所製；Ampdirect（登録商標））。この試薬を使用すると、ろ紙血切片から直接PCR反応を行うことが可能であり、その増幅産物を電気泳動で検出することで確認されている（特許文献1）。しかしながら、このよ

うな試薬においても、光学的手段を用いて検出する場合には、血中に含まれるヘモグロビンやPCR反応時の熱変性により発生する血液成分の沈殿が光学経路を阻害することにより、正確な結果を得ることができない。その為、PCR反応の際に、反応液に対して全血試料の添加割合を規定する方法が開示されている（特許文献2）。しかしながら、全血成分由来の影響に加えて、PCR反応液中に存在する乾燥ろ紙血由来のろ紙切片自体が光学検出の光路を妨害することもあり、影響を十分に軽減できない恐れもある。

[0004] このような問題を解決するために、ろ紙血切片を洗浄する、前処理液に浸す、又は前処理液に浸して加温する、などの簡易前処理工程を行うことで、上記反応阻害物質の除去、同物質の反応液内拡散の抑制を行い、前処理工程終了後に、PCR反応試薬を添加し、ろ紙血切片が入ったままPCR反応を行うという方法が実施されている（非特許文献1）。

しかしながら、多段階の操作が必要になることでコンタミネーションの可能性が増加するうえに、新生児スクリーニングなどで多検体解析を行う場合には、時間及び手間がかかることで解析のコストが増加し、最善の方法であるとは言えない。

また、定量する場合に、ろ紙血の影響を相殺させる為、ろ紙血ベースのキャリブレーター（標準品）を設定する方法も考えられるが、ろ紙血から抽出される成分の変動による影響度合いのバラツキ等により、正確性及び再現性の悪化を招く恐れがある。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2004-283165号公報

特許文献2：第5144518号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Clinical Chemistry、61:2、412-419、2015

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ろ紙に血液を含ませた後、乾燥させたろ紙血の切片中に含まれる標的核酸をリアルタイムPCRによる核酸増幅反応を利用して増幅した産物を光学的に検出する方法及び定量する方法、さらにはこれらの方法に用いられるキット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

[0008] 乾燥ろ紙血は、ろ紙に血液を含ませた後に乾燥させ、穴あけパンチ工具によりパンチ穴形状の紙片（本明細書中、単にパンチ片ということがある）として取り出される。本発明者らは、このようなパンチ片の大きさ又はパンチ片に含まれる全血量、PCR反応試薬の量、PCR反応時にPCR反応チューブにキャップを装着すること等について種々の検討を行ったところ、従来のような煩雑な前処理をすることなく、乾燥ろ紙血から直接標的核酸をリアルタイムPCRにより光学的に検出及び定量できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の構成を有する。

<1>乾燥ろ紙血に含まれる標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法であって、下記（A）～（D）の工程を含む、前記検出方法。

（A）PCR反应用のチューブに乾燥ろ紙血を添加する工程であって、ろ紙は、直径1.2mm～2.0mmの円形のパンチ片又は全血を全反応溶液量に対して0.95v/v%～6.6v/v%を含むパンチ片である前記工程

（B）PCR反应用のチューブに20～50μLのPCR試薬を添加する工程

（C）PCR試薬と乾燥ろ紙血を添加したチューブをキャップにより密閉した状態で、PCR反応を行う工程

（D）PCR反応により増幅された標的核酸を経時的に光学的に検出する工程

<2>（A）の工程の後、（B）の工程を行う<1>に記載の標的核酸を検出する方法。

＜3＞PCR反応用のチューブは、PCR反応用96穴チューブ若しくは8連チューブである＜1＞又は＜2＞に記載の標的核酸を検出する方法。

＜4＞PCR試薬は少なくともプライマー、ポリメラーゼ、dNTP、及びインターカレーター若しくは蛍光標識プローブを含む＜1＞～＜3＞のいずれかに記載の標的核酸を検出する方法。

＜5＞前記インターカレーターへの励起光照射によって発生する蛍光の検出により、前記増幅された標的核酸を検出する、＜4＞に記載の標的核酸を検出する方法。

＜6＞前記蛍光標識プローブが、蛍光物質とクエンチャーとを有し且つ核酸増幅反応の鋳型に相補的な部分配列を含み、前記蛍光物質への励起光照射によって発生する蛍光の検出により、前記増幅された標的核酸を検出する、＜4＞に記載の標的核酸を検出する方法。

＜7＞標的核酸が、TREC、KREC及びSMN1からなる群から選ばれる1つ以上の遺伝子断片及び／又は遺伝子である、＜1＞～＜6＞のいずれかに記載の標的核酸を検出する方法。

＜8＞＜1＞～＜7＞のいずれかに記載の標的核酸をリアルタイムPCRで検出する方法により標的核酸を定量する方法において、以下の標準品を用いて標的核酸を定量する方法；

（1）標的核酸の配列を含む人工核酸を含み、乾燥ろ紙血に含まれたものではない標準品であって、当該標準品は直接反応容器に溶解させて使用されるものである前記標準品。

＜9＞＜1＞～＜7＞のいずれかに記載の標的核酸をリアルタイムPCRで検出する方法により標的核酸を定量する方法に用いられる定量キットであって、少なくとも以下を含む前記定量キット；

（1）標的核酸の配列を含む人工核酸を含み、乾燥ろ紙血に含まれたものではない標準品であって、当該標準品は直接反応容器に溶解させて使用されるものである前記標準品。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、乾燥ろ紙血に含まれる僅かな標的核酸を直接リアルタイムPCRにより特異的に、かつ迅速に検出及び定量することが可能になる。例えば、TREC、KRECやSMN1、SMN2のように、新生児に対するスクリーニング検査では、乾燥ろ紙血から一部をパンチ片として取り出して検体とするので、貴重な検体の節約につながる。さらに、前処理工程も不要となることから、スクリーニング検査としての解析効率の向上及びコストの削減が可能となる。

発明を実施するための形態

[0010] (PCR反応用チューブ)

本発明に用いられるチューブは、PCR反応用のチューブであり、ろ紙血のパンチ片がスムーズに挿入でき、キャップにより密閉できる構造であればよい。また、チューブ上部の開口部が円形（例えば、内径2.5mm～10mm程度）で底部が上部の開口部よりも狭くなっている形状が良く、逆円錐形などが好ましい。

上記チューブの容量は、PCR反応試薬を添加し、PCR反応による温度変化によっても反応溶液を十分に収容できる容量であればよく、0.1mL～0.3mL容量が好ましく、さらに好ましくは0.15mL～0.25mL容量、最も好ましくは0.2mL容量である。

本発明に用いるPCR反応用チューブは、チューブが96個連続しているPCR反応用96穴チューブ又は8個連続している8連チューブが好ましく、市販品としては、96ウェルPCRプレート、PCR8連チューブなどの名称で販売されているものを用いることができる。市販品としては、LightCycler480 Multiwell Plate 96 (ロッシュ社)、96-Well PCR Plate, Flat Top, Low Profile, Natural, Polypropylene, UltraFlux (Scientific Specialties, Inc.社)、エッペンドルフPCRプレート96、スカートレス, 150 µL, カラーレス (エッペンドルフ社)、PCRプレート 96well シンプレート0.1ml ナチュラル (BM機器社)、LightCycler (登録商標) 8-Tube Strips (ロッシュ社) などが挙げられる。

これらの反応用チューブの材質は、反応溶液のコンタミが少なく、また、PCR反応の温度変化による内部圧力変動によっても形状が変化しない剛性を有することが望ましく、例えばポリプロピレン製が挙げられる。

[0011] (キャップ)

本発明に用いられるキャップは、PCR反応チューブの開口部に吻合し、密閉できる構造であればよい。また、材質は、PCR反応チューブと同様に、PCR反応により生じる内部圧力変動によって変形しない材質であることが望ましく、また、光透過性の高い材質であることが望ましく、ポリプロピレン製が挙げられる。具体的には、LightCycler (登録商標) 8-Tube Strips (ロッシュ社)、オプティカルフラット 8 キャップストリップ (バイオラッド社)、MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips (Thermo Fisher Scientific社)、Strips of 8 Flat Optical Caps (日本ジェネティクス社)、キャップストリップ、8ストリップ、フラット (エッペンドルフ社) などが挙げられる。

本発明において、PCR反応チューブをキャップにより密閉した状態でPCR反応を行うことにより、サーマルサイクルによる気泡の発生を抑制することができる。このため、反応溶液中のパンチ片の振動やパンチ片の浮き上がりが抑制されることになる。したがって、パンチ片中に含まれる妨害物質の必要以上の反応液への溶出を抑制することができると考えられる。また、気泡の発生によるパンチ片の浮き上がりが抑制できるため、リアルタイムPCRによる光学的検出が、パンチ片によって光路を遮られることがなく、再現性よく行うことができる。

[0012] (血液試料／乾燥ろ紙血)

本発明に用いられる血液試料は、ろ紙 (フィルターペーパー) に血液 (全血) を含ませた後に乾燥させたろ紙中の血液 (全血) であり、単に乾燥ろ紙血ということがある。乾燥ろ紙血は、穴あけパンチ工具によりパンチ穴形状の紙片 (パンチ片) として取り出される。前記パンチ片の大きさは、含まれる血液の量を適切な範囲とする必要があることから、直径 1.2 ~ 2.0 mm が望ましく、1.5 mm ~ 1.8 mm がよりいっそう望ましい。また、前記パン

チ片に含まれる全血量としては、PCR全反応溶液量に対して0.95 v / v % ~ 6.6 v / v %が望ましく、1.4 v / v % ~ 5.2 v / v %がよりいっそう望ましい。また、パンチ片に含まれる全血量としては、PCR全反応溶液量に対して0.95 v / v % ~ 6.6 v / v %が望ましく、1.4 v / v % ~ 5.2 v / v %がよりいっそう望ましい。なお、前記全血量は、直径1.2 ~ 2.0 mmの円形のパンチ片、直径1.5 mm ~ 1.8 mmのパンチ片を20 ~ 50 μ LのPCR反応溶液に添加して血液を溶解した場合の割合を、実測値（全血30 μ Lをパンチ片を切り取る前の濾紙に添加して乾燥させた時にできた円形血液部分の直径は9.5 mmであった）をもとに算出した値として示している。

本発明に用いられる乾燥ろ紙血としては、例えば、新生児マス・スクリーニングなど新生児のかかとかから採血したろ紙血、同時にオプショナルスクリーニングとして採血されたろ紙血などが用いられるがこれらに限定されない。

[0013] (PCR試薬)

本発明に用いられるPCR試薬は、少なくとも、プライマーのセット、ポリメラーゼ、dNTP（デオキシヌクレオシド三リン酸）各種、インターカラーター若しくは蛍光標識プローブを含む。また、典型的には当該試薬にはバッファーも含まれている。バッファーとしては、生物の体液中に存在する正電荷物質（ある種のタンパク質など）や負電荷物質（ある種の糖、色素など）などのDNA増幅反応を阻害する物質の作用を抑制する働きを持つバッファーであれば特に限定されない。市販されているものとして、例えば、Ampdirect、Ampdirect plus（ともに（株）島津製作所製）等が挙げられる。

本発明に用いられるPCR試薬の反应用チューブへの添加量は、20 ~ 50 μ Lである。

[0014] (リアルタイムPCR)

リアルタイムPCR法は、一般的に、PCRにおいて増幅産物の生成過程を経時的にモニタリングする方法を意味する。本発明において、リアルタイ

ムPCRにより検出するとは、PCR反応の後に増幅された標的核酸（以下、単に増幅産物ともいう）を光学的手段により検出することを意味する。なお、増幅産物の検出は、例えば、PCR反応終了時または終了後に行ってもよいし、PCR反応工程と並行して行ってもよい。並行して行う場合、増幅産物の検出は、例えば、経時的に行うことができる。経時的な検出（モニタリング）は、例えば、連続的であっても非連続的（断続的）であってもよい。

[0015] PCR反応における各ステップの温度変化は、例えば、サーマルサイクラー等を用いて自動的に制御すればよい。本発明は、PCR反応においてチューブをキャップで密閉してからPCR反応を開始することで、上記温度変化による気泡の発生を抑え、パンチ片を浮き上がらせることなく、振動を抑えることができる。このため、パンチ片からの余分な妨害物質の抽出を抑え、パンチ片中に含まれる標的核酸を、煩雑な前処理をすることなく光学的に検出及び定量することが可能となった。また、リアルタイムPCRという継続的なPCR反応のモニタリングにおいては、途中でパンチ片を遠心分離等により強制的に底部に納めることが出来ないため、パンチ片の浮き上がりは光学検出にとって致命的である。本発明によりパンチ片の浮き上がりを防止することができるため、リアルタイムPCRにおいてパンチ片に光路を遮られることなく、連続的な光学検出が可能となった。

[0016] PCR反応により生成した増幅産物は、例えば、前記増幅産物から発生する蛍光強度を検出することにより検出できる。蛍光検出としては、特に制限されないが、従来公知のインターカレーター法、TaqMan（登録商標）プローブ法、ハイブリダイゼーション法、サイクリングプローブ法などがある。

[0017] 蛍光強度の検出は、例えば、蛍光光度計で行うことができる。また、一般に、PCR反応ユニット（例えば、サーマルサイクラー）と光学系ユニット（例えば、蛍光光度計）との両方を備える装置が使用される。具体例としては、市販のSmartCycler（商品名、タカラバイオ社製）、ライトサイクラー（

商品名、ロシュ・ダイアグノスティック社製）、ABI PRISM7000（商品名、アプライド・バイオシステム社製）等があげられる。

[0018]（標的核酸の定量方法）

本発明の標的核酸の定量方法は、乾燥ろ紙血中の標的核酸に相補的な増幅産物を生成させ、前記増幅産物を光学的手段により検出して、前記増幅産物を定量する方法である。前記増幅産物が所定量となったPCRサイクル数をカウントすることによって、前記乾燥ろ紙血中に含まれる標的核酸を定量する方法ことができる。また、後述する実施例のように、標準品から算出されたC_q値の検量線から乾燥ろ紙血中の全血1 μ Lのコピー数を換算して定量することもできる。

[0019] 本発明は、乾燥ろ紙血の標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法であって、下記（A）～（D）の工程を含む検出方法である。

（A）PCR反応用のチューブに乾燥ろ紙血を添加する工程であって、ろ紙は、直径1.2mm～2.0mmの円形のパンチ片又は全血を全反応溶液量に対して0.95v/v%～6.6v/v%を含むパンチ片である前記工程

（B）PCR反応用のチューブに20～50 μ LのPCR試薬を添加する工程

（C）PCR試薬とろ紙を添加したチューブをキャップにより密閉した状態で、PCR反応を行う工程

（D）PCR反応により増幅された標的核酸を経時的に光学的に検出する工程

ここで、（A）工程と（B）工程は、いずれを先に行っても、また同時に行ってもよいが、（A）の工程の後、（B）の工程を行うことが望ましい。

（A）を先に行うことで、ろ紙が仮にチューブ壁面などに付着した場合でも、試薬溶液によりチューブ底部に収容することがより確実になるからである。また、PCR反応開始前にパンチ片を確実にチューブの底に収めるために、遠心分離などを行うことも望ましい。

このように、本発明は乾燥ろ紙血から分離・精製などの前処理を行わずに

、ろ紙血を直接リアルタイムPCRに供することを特徴としている。このような前処理を行わない試料には、通常、DNA増幅反応を阻害する物質が含まれている。DNA増幅反応を阻害する物質とは、血中に含まれるヘモグロビンやPCR反応時の熱変性により発生する血液成分の沈殿物などである。

以上より、前処理を行わずにPCR反応を行おうとすると妨害物質の影響を受けることが予想される。しかし、本発明によれば、上述のとおりパンチ片の大きさ、あるいはパンチ片に含まれる全血量、PCR反応試薬量を所定の範囲内として、パンチ片をチューブの底に収め、さらにチューブをキャップで密閉してからPCR反応を行うことで、温度変化による気泡の発生を抑え、紙片を浮き上がらせることなく、振動を抑えることが可能になる。このため、パンチ片からの余分な妨害物質の抽出を抑えることが出来、パンチ片中に含まれる標的核酸を、煩雑な前処理をすることなく直接リアルタイムPCRにより光学的に検出及び定量することが可能となった。

[0020] (標的核酸)

本発明のリアルタイムPCRにより検出される標的となる核酸は、特に制限はなく、全血由来のDNA、RNAのほか、ウイルス等によって全血に導入された外来核酸等いずれも含まれる。

本発明の標的核酸としては、このうちでも、例えば新生児の全血由来の核酸が好ましく、TRE C (T-cell receptor excision circles)、KRE C (kappa-deleting recombination excision circles) の遺伝子断片、SMN 1 (Survival Motor Neuron 1)、SMN 2 (Survival Motor Neuron 2)などの遺伝子に含まれる核酸が挙げられる。

[0021] (標準品／キット)

本発明の標準品（キャリブレーターともいう）は、前記の標的核酸を検出する方法により標的核酸を定量する方法に用いられる標準物質をいう。本発明の標準品は、標的核酸の配列を含む人工核酸を含み、乾燥ろ紙血に含まれたものではないことを特徴としている。

標準品の形態については、乾燥ろ紙血の影響を相殺させる為、乾燥ろ紙血

に含ませて定量に用いる方法も考えられるが、乾燥ろ紙血から抽出される成分の変動による影響度合いや、乾燥ろ紙血からの標準品の溶出のバラツキ等により、正確性及び再現性の悪化を招く恐れがある。

これに対して、本願発明の標準品は、あえて乾燥ろ紙血に含まれない形態とし、例えば、溶液状態あるいは凍結乾燥品などの形態で存在する標準品である。本発明の標準品はこのような形態を採ることにより、直接反応溶液に溶解させて使用することが可能となり正確な定量が実現できる。

本発明は、このような標準品を含む標的核酸の定量キットを提供することもできる。

実施例

[0022] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

本実施例は、乾燥ろ紙血からパンチ片を取り出し、直接PCR反応を実施し、増幅産物をリアルタイムPCRにより光学的に検出した例である。

[0023] 〔実施例1〕TRECE/KRECE遺伝子定量系

(a) 試験材料

(a-1) TRECE、KRECE、RNaseP増幅用プライマー

TRECE、KRECE、内部標準遺伝子(RNaseP)増幅用のプライマーとして、下記のプライマーをシグマ-アルドリッチ社に合成依頼したものを用了。

TRECE用フォワードプライマー

5' -CCCTTTCAACCATGCTGACA-3' (配列番号1)

TRECE用リバースプライマー

5' -GTGCCAGCTGCAGGGTTTAG-3' (配列番号2)

KRECE用フォワードプライマー

5' -CAGCTCAGCGCCCATTACG-3' (配列番号3)

KRECE用リバースプライマー

5' -TGGGACTCCAGGAGCCAG-3' (配列番号4)

R N a s e P用フォワードプライマー

5' -GCGGAGGGAAGCTCATCA-3' (配列番号5)

R N a s e P用リバースプライマー

5' -GTCTGACCTCGCGCGGA-3' (配列番号6)

[0024] (a-2) T R E C、K R E C、R N a s e P検出プローブ

T R E C、K R E C、R N a s e PのPCR増幅を確認するためのプローブとして、蛍光標識を施した下記の検出プローブを、プライムテック社に合成依頼して作成したものを用いた。

[0025] T R E C用検出プローブ

5' -(Quasar670)-CCTCTGGTTTTGTAAAGGTGCCCACT-(BHQ3)-3' (塩基配列部分は配列番号7)

K R E C用検出プローブ

5' -(ROX)-TCTGCACGGGCAGCAGGTTGG-(BHQ2)-3' (塩基配列部分は配列番号8)

R N a s e P用検出プローブ

5' -(FAM)-CCACGAGCTGAGTGCGTCCTG-(BHQ1)-3' (塩基配列部分は配列番号9)

[0026] (a-3) プラスミド

PCR増幅産物を定量する為、下記に示すT R E C、K R E C、R N a s e Pの遺伝子部分配列をベクターに組み込んだプラスミドを、ユーロフィン社に合成依頼したものを検量線用の標準品として用いた。

[0027] T R E C部分配列 (配列番号10)

GA CTGAATTCGGCTCTGTCTAGTGTGATAACATTTTGTATCTTATTCATTGTCTTCATCCCTGAAATA
CA CTCTGCTCTCTCCTATCTCTGCTCTGAAAGGCAGAAAGAGGGCAGCCCTCTCCAAGGCAAAATGGGG
CTCCTGTGGGGAACAGAGGGGTGCCTCTGTCAACAAAGGTGATGCCACATCCCTTTCAACCATGCTGAC
ACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACTCCTGTGCACGGTGATGCATAGGCACCTGCACCCCGTGCCTA
AACCTGCAGCTGGCAGGGCCCTGTCTGCTCTTCATTACCGTTCTCACGAGTTGCAATAAGTTCAGC
CCTCCATGTCACACTGTGTTTTCCATCCTGGGGAGTGTTCACAGCTATCCAAGCCCCACGCTGACGA

ATCACGGCCGAAAACACACTCTGATGCCAGCACAGACCACGGAGCAAATGTCAGACAAGATCAGCCTCG
GAAAAGTGAGGAATTCAGTC

[0028] K R E C 部分配列（配列番号 1 1）

GCTTTAAATTATTTACAATCCCCTAATGGAAATTTTCACTAATGAGATATCATAATGAATGTGAATTTT
ATTTCTGAAATCTCTAATAAATCAGTCTTCTCCCTGGTTTTCCAGCTCAGCGCCATTACGTTTCTGT
TCTCTTTCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCACTGTGCATCAGCACAGTGTGCGCTGCCAACCTGCTGCC
CGTGCGAGAACTCTAGGGTAAGAGCTGGCTCCTGGAGTCCCACCCAGGCTGCGTGTCCCTCACAGTCTG
CTCTGTGTCTATGTGTGTGTGTTGGGGGATATTATTGGACAATTCAAGGGAGGCTCAGTGAGGAGGAA
GGAAAATTTTCATGTAATTCTTTCTGTTTTGTCTTTCTCAACCCCTCCTCCTGCCTACTCCTTAACTGA
GAGAGTG

[0029] R N a s e P 部分配列（配列番号 1 2）

ATAGGGCGGAGGGAAGCTCATCAGTGGGGCCACGAGCTGAGTGCGTCCTGTCACTCCACTCCCATGTCC
CTTGGGAAGGTCTGAGACTAGGGCCAGAGCGGGCCCTAACAGGGCTCTCCCTGAGCTTCGGGGAGGTGA
GTTCCCAGAGAACGGGGCTCCGCGCGAGGTCAGACTGGGCAGGAGATGCCGTGGACCCCGCCCTTCGGG
GAGGGGCGCGGATGCCTCCTTTGCCGAGCTTGGAACAGACTCACGGCCAGCGAAGTGAGTTCAAT
GGCTGAGGTGAGGTACCCCGCAGGGGACCTCATAACCCAATTCAGACTACTCTCCTCCGCCCAT

[0030] (b) P C R 試薬

P C R 試薬の組成を以下に示す。

P C R バッファー (Ampdirect Plus ; 島津製作所社)

0. 25 μ M (終濃度) T R E C 用フォワードプライマー

0. 25 μ M (終濃度) T R E C 用リバースプライマー

0. 125 μ M (終濃度) K R E C 用フォワードプライマー

0. 125 μ M (終濃度) K R E C 用リバースプライマー

0. 125 μ M (終濃度) R N a s e P 用フォワードプライマー

0. 125 μ M (終濃度) R N a s e P 用リバースプライマー

0. 135 μ M (終濃度) T R E C 用検出プローブ

0. 135 μ M (終濃度) K R E C 用検出プローブ

0. 135 μ M (終濃度) R N a s e P 用検出プローブ

0.03 U/ μ L BIOTAQ HSDNAポリメラーゼ

[0031] (c) 検量線用標準品含有PCR試薬

上記PCR試薬に各プラスミドを添加して、以下の標準品（希釈系列；STD1～4）含有PCR試薬を調製した。カッコ内は、それぞれの遺伝子のPCR1反応あたりのコピー数を示す。本試薬は、乾燥ろ紙血に含ませることなく、溶液状態で用いられた。

STD1 (TREC 10,000 copy/反応、KREC 10,000 copy/反応、RNaseP 100,000 copy/反応)

STD2 (TREC 1,000 copy/反応、KREC 1,000 copy/反応、RNaseP 10,000 copy/反応)

STD3 (TREC 100 copy/反応、KREC 100 copy/反応、RNaseP 1,000 copy/反応)

STD4 (TREC 10 copy/反応、KREC 10 copy/反応、RNaseP 100 copy/反応)

[0032] (d) コントロール乾燥ろ紙血

ブタ全血に、TRECプラスミド及びKRECプラスミドを、それぞれ12.5 copy/ μ Lとなるように添加し、さらにK562細胞株（慢性骨髄性白血病細胞由来；国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所細胞バンクより分譲）より抽出したゲノムDNAを13.5 ng/ μ Lとなるように添加した後、採血用ろ紙（アドバンテック社）に40 μ L染み込ませ、そのまま乾燥させた。

[0033] (e) PCR反応の条件

(i) 95℃：15分

(ii) 95℃：15秒、63℃：80秒（45サイクル）

(iii) 37℃：5分

[0034] (f) リアルタイムPCR測定

(f-1) 測定方法

以下の手順で測定した。

(i) コントロール乾燥ろ紙血から、パンチャーを用いて直径 1.2 mm、1.5 mm、1.8 mm、2.0 mm、3.0 mm の円形のパンチ片を採取した。

(ii) PCR 反応用のチューブ(ロッシュ社製: LightCycler(登録商標) 8-Tube Strips、ポリプロピレン製) に上記パンチ片を投入した。

(iii) そのチューブに 20 μ L、30 μ L、40 μ L、50 μ L の PCR 試薬をそれぞれ加えた後、キャップ(前記チューブとセットになっているもの)をして密閉した。

(iv) 検量線用標準品含有 PCR 試薬も添加量に合わせてチューブに分注したものを用意した。

(v) サーマルサイクラー装置(LightCycler96; ロッシェ社)を用いて、TREC、KREC 及び RNase P の 3 項目同時リアルタイム PCR 測定を行った。

(vi) 各組み合わせをそれぞれ 4 回測定し、標準品から算出された Cq 値の検量線から、パンチ片中の全血 1 μ L あたりのコピー数として換算し、4 回のコピー数の平均値を算出した。また、平均値を設定値で序したものを回収率とした。

[0035] (f-2) 測定結果

結果を表 1～3 に示す。パンチ片のサイズの違いでは、直径 1.5 mm～2.0 mm の場合は、増幅の再現性及び回収率も良好となった。直径 1.2 mm では、増幅が起きない場合があったが、回収率は良好であった。一方、直径 3.0 mm の場合では増幅曲線を描くことが出来なかったため、測定が出来ないものがあった(表中のグレーの網掛け部)。その要因としては、パンチ片のサイズが大きくチューブの底に届いておらず、このため、紙片が光路を遮ることで光が反応溶液に届かず、蛍光検出に影響しているものと考えられた。

[0036]

[表1]

表1 TREC測定結果

PCR反応 液量	パンチ片サ イズ	TREC (copy/ μ L W.B.)	N=1	N=2	N=3	N=4	平均 (copy/ μ L W.B.)	回収率 %
20 μ L	1.2mm	12.5	5.6	22.3	8.6	10.3	11.7	94
	1.5mm	12.5	16.8	23.5	11.5	22.0	18.4	147
	1.8mm	12.5	17.6	4.8	13.3	14.5	12.5	100
	2.0mm	12.5	22.8	14.3	10.8	16.5	16.1	129
	3.0mm	12.5						
30 μ L	1.2mm	12.5	8.1	3.2	17.4	18.4	11.8	94
	1.5mm	12.5	26.1	20.1	10.2	20.8	19.3	154
	1.8mm	12.5	6.1	6.6	16.8	6.4	8.9	72
	2.0mm	12.5	5.5	14.3	20.0	2.4	10.6	85
	3.0mm	12.5						
40 μ L	1.2mm	12.5		7.1	6.0	19.9	11.0	88
	1.5mm	12.5	10.2	5.6	12.0	19.8	11.9	95
	1.8mm	12.5	23.3	14.7	9.2	10.1	14.3	115
	2.0mm	12.5	10.5	9.1	8.4	7.1	8.8	70
	3.0mm	12.5	44.8			33.8	39.3	314
50 μ L	1.2mm	12.5	23.0	9.9	11.5	26.1	17.6	141
	1.5mm	12.5	5.6	20.2	16.5	11.8	13.5	108
	1.8mm	12.5	44.6	6.8	11.3	8.0	17.7	141
	2.0mm	12.5	6.7	20.8	19.4	11.0	14.5	116
	3.0mm	12.5	65.2	220.2	10.8		98.7	790

[0037] [表2]

表2 KREC測定結果

PCR反応 液量	パンチ片サ イズ	KREC (copy/ μ L W.B.)	N=1	N=2	N=3	N=4	平均 (copy/ μ L W.B.)	回収率 %
20 μ L	1.2mm	12.5		7.8	21.9	9.9	13.2	106
	1.5mm	12.5	6.5	20.3	9.0	20.8	14.2	113
	1.8mm	12.5	22.2	10.0	14.7	10.1	14.2	114
	2.0mm	12.5	10.0	17.2	7.6	13.0	11.9	96
	3.0mm	12.5						
30 μ L	1.2mm	12.5	3.1	2.4	13.8	36.7	14.0	112
	1.5mm	12.5	9.4	5.7	11.1	8.2	8.6	69
	1.8mm	12.5	5.6	8.1	6.7	6.1	6.6	53
	2.0mm	12.5	14.2	7.6	14.2	14.5	12.6	101
	3.0mm	12.5	56.3				56.3	450
40 μ L	1.2mm	12.5	15.6	14.1		14.7	14.8	119
	1.5mm	12.5	13.1	5.3	11.9	6.7	9.3	74
	1.8mm	12.5	9.3	28.4	4.5	15.3	14.4	115
	2.0mm	12.5	8.7	14.8	11.7	17.0	13.0	104
	3.0mm	12.5			98.7	31.4	65.0	520
50 μ L	1.2mm	12.5	34.3	7.6	23.9	29.4	23.8	190
	1.5mm	12.5	21.6	27.9	20.8	33.0	25.8	207
	1.8mm	12.5	14.1	17.6	6.4	8.7	11.7	93
	2.0mm	12.5	31.7	16.1	20.2	21.1	22.3	178
	3.0mm	12.5	129.5	101.9	20.2	131.1	95.7	765

[0038] [表3]

表3 RNase P測定結果 (参考)

PCR反応 液量	パンチ片サ イズ	N=1	N=2	N=3	N=4	平均 (copy/ μ L W.B.)
20 μ L	1.2mm	795	770	958	643	791
	1.5mm	972	700	723	657	763
	1.8mm	517	497	603	527	536
	2.0mm	1462	1337	469	1891	1290
	3.0mm					
30 μ L	1.2mm	695	499	942	672	702
	1.5mm	556	724	590	854	681
	1.8mm	525	479	466	576	511
	2.0mm	574	483	527	452	509
	3.0mm					
40 μ L	1.2mm	567	517	556	638	570
	1.5mm	651	864	830	1350	924
	1.8mm	525	615	2426	561	1032
	2.0mm	489	512	1320	806	782
	3.0mm					
50 μ L	1.2mm	645	560	1336	593	783
	1.5mm	670	649	522	911	688
	1.8mm	635	531	580	664	602
	2.0mm	618	551	681	668	629
	3.0mm			1283		1283

産業上の利用可能性

[0039] 本発明によれば、乾燥ろ紙血に含まれる僅かな標的核酸を特異的に、かつ迅速にリアルタイムPCRにより検出及び定量することが可能になる。