

明 細 書

発明の名称：核酸精製方法、核酸抽出液、及び核酸精製キット

技術分野

[0001] 本発明は、核酸精製方法、並びに該核酸精製方法に用いられる核酸抽出液及び核酸精製キットに関する。

背景技術

[0002] 従来、ウイルス、細菌、真菌、又は細胞等の試料に含まれるRNAやDNAなどの核酸を精製する方法が種々検討されている。例えば、試料由来の核酸を含む抽出液にアルコールなどの析出試薬を添加して核酸を析出させ、析出した核酸を固相担体上に吸着させ、核酸とともに固相担体に付着した試料由来のタンパク質等の不純物を洗浄した後に、溶出液で核酸を回収する方法が知られている。

[0003] 例えば、下記の特許文献1には、マイクロデバイスを用いた核酸の分離精製方法が開示されている。上記核酸の分離精製方法は、核酸を含む試料溶液を核酸吸着性担体に接触させ、核酸を吸着させる工程と、洗浄液により、核酸が吸着した状態で、核酸吸着性担体を洗浄する工程と、回収液により、核酸吸着性担体から核酸を脱着させ、核酸を精製する工程とを含んでいる。

[0004] また、特許文献1では、検体と核酸可溶化試薬を混合し均一化して核酸を含む試料溶液を得る前処理工程を含んでもよいことが記載されている。核酸可溶化試薬としては、カオトロピック塩、界面活性剤、タンパク質分解酵素、消泡剤、及び核酸安定化剤の少なくともいずれかを含む溶液であってもよいことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2006-087372号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] ところで、マイクロチップを用いて溶液を送液する際には、気泡が発生し、核酸の精製や検出に影響するという問題がある。
- [0007] 特許文献1の核酸精製方法を用いた場合にも、十分に気泡の発生を抑制できないことがあった。また、たとえ気泡の発生を抑制できたとしても、核酸回収効率を十分に高められないことがあった。従って、特許文献1の核酸精製方法では、気泡の発生の抑制と、核酸回収効率の向上の両立を図ることが難しいという問題がある。
- [0008] また、スピンカラムや磁性ビーズを用いた核酸精製方法においても、検体由来の夾雑物を除去するために抽出液のフィルターろ過を行う場合があるが、検体由来の粘性によるろ過抵抗の上昇や、検体由来の泡立ちによってフィルターろ過のハンドリング性が悪くなるといった問題がある。
- [0009] 従って、従来の核酸精製方法では、核酸を効率よく精製することが難しいという問題がある。
- [0010] 本発明の目的は、核酸を効率よく精製することができる、核酸精製方法、並びに該核酸精製方法に用いられる核酸抽出液及び核酸精製キットを提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明に係る核酸精製方法は、核酸と、消泡剤及び共沈剤とを混合する工程と、前記核酸を精製する工程とを備え、前記消泡剤が、ノニオン系界面活性剤及びシリコン系消泡剤のうち少なくとも一方である。
- [0012] 本発明に係る核酸精製方法のある特定の局面では、前記核酸と、前記消泡剤及び共沈剤とを混合した後に、前記核酸を固相担体に吸着させて精製する。
- [0013] 本発明に係る核酸精製方法の他の特定の局面では、前記消泡剤及び前記共沈剤が予め含まれる核酸抽出液を用意する工程をさらに備え、前記核酸を含む試料と、前記核酸抽出液とを接触させることにより、前記核酸と、前記消泡剤及び共沈剤とを混合する。
- [0014] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記消泡剤が、

ノニオン系界面活性剤である。

- [0015] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記消泡剤及び共沈剤が予め含まれる核酸抽出液を用意する工程をさらに備え、前記核酸抽出液中における前記ノニオン系界面活性剤の含有量が、前記0.001体積%以上、1体積%以下である。
- [0016] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレングリセリルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル- β -D-マルトシド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、パーム核油脂脂肪酸ジエタノールアミド、及びジギトニンからなる群から選択される少なくとも1種である。
- [0017] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルと、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステルとの混合物である。
- [0018] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記消泡剤が、前記シリコーン系消泡剤である。
- [0019] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記消泡剤及び共沈剤が予め含まれる核酸抽出液を用意する工程をさらに備え、前記核酸抽出液中における前記シリコーン系消泡剤の含有量が、0.001体積%以上、10体積%以下である。
- [0020] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記シリコーン系消泡剤が、シリコーンオイル及び乳化剤により構成されている。
- [0021] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記シリコーン系消泡剤が、シリコーンオイルをノニオン系界面活性剤で乳化したものである。
- [0022] 本発明に係る核酸精製方法のさらに他の特定の局面では、前記共沈剤が、ポリアデニンである。

- [0023] 本発明に係る核酸抽出液は、核酸精製に用いられる核酸抽出液であって、消泡剤及び共沈剤を含み、前記消泡剤が、ノニオン系界面活性剤及びシリコーン系消泡剤のうち少なくとも一方である。
- [0024] 本発明に係る核酸抽出液のある特定の局面では、前記消泡剤が、前記ノニオン系界面活性剤である。
- [0025] 本発明に係る核酸抽出液の他の特定の局面では、前記核酸抽出液中における前記ノニオン系界面活性剤の含有量が、0.001体積%以上、1体積%以下である。
- [0026] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン分岐アルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステリルエーテル、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレングリセリルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル β -D-マルトシド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミド、及びジギトニンからなる群から選択される少なくとも1種である。
- [0027] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルと、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステルとの混合物である。
- [0028] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記消泡剤が、前記シリコーン系消泡剤である。
- [0029] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記核酸抽出液中における前記シリコーン系消泡剤の含有量が、0.001体積%以上、10体積%以下である。
- [0030] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記シリコーン消泡剤が、シリコーンオイル及び乳化剤により構成されている。
- [0031] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記シリコーン消

泡剤が、シリコンオイルをノニオン系界面活性剤で乳化したものである。

[0032] 本発明に係る核酸抽出液のさらに他の特定の局面では、前記共沈剤が、ポリアデニンである。

[0033] 本発明に係る核酸精製キットは、本発明に従って構成される核酸抽出液を含む。

発明の効果

[0034] 本発明によれば、核酸を効率よく精製することができる、核酸精製方法、並びに該核酸精製方法に用いられる核酸抽出液及び核酸精製キットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0035] [図1]図1は、本発明の一実施形態に係る核酸精製方法で用いるマイクロチップを示す模式的平面図である。

[図2]図2は、図1中のA-A線に沿う部分の模式的断面図である。

[図3]図3は、本発明の一実施形態に係る核酸精製方法において、核酸がアニオン性吸着体に吸着している状態を説明するための模式図である。

[図4]図4は、実施例1の送液中に生じた気泡の数を確認するための写真である。

[図5]図5は、実施例2の送液中に生じた気泡の数を確認するための写真である。

[図6]図6は、比較例1の送液中に生じた気泡の数を確認するための写真である。

発明を実施するための形態

[0036] 以下、図面を参照しつつ、本発明の具体的な実施形態を説明することにより、本発明を明らかにする。

[0037] [核酸精製方法及び核酸抽出液]

本発明の核酸精製方法は、核酸と、消泡剤及び共沈剤とを混合する工程と、核酸を精製する工程とを備える。本発明において、消泡剤は、ノニオン系界面活性剤及びシリコン系消泡剤のうち少なくとも一方である。

[0038] 本発明の核酸精製方法は、核酸と、消泡剤及び共沈剤とを混合する工程を備え、消泡剤としてノニオン系界面活性剤及びシリコーン系消泡剤のうち少なくとも一方を用いるので、核酸を効率よく精製することができる。

[0039] 従来、マイクロチップを用いて溶液を送液する際には、特に粘性が高い溶液を送液するに際して気泡が発生し、核酸の精製や検出に影響するという問題があった。核酸濃度が低い場合には、特に核酸精製効率が低下するという問題もあった。また、たとえ気泡の発生を抑制できたとしても、核酸回収効率を十分に高められないという問題があった。従って、従来の核酸精製方法では、気泡の発生の抑制と、核酸回収効率の向上の両立を図ることが難しいという問題があった。

[0040] これに対して、本発明者らは、核酸を精製する前工程において、核酸と、ノニオン系界面活性剤及びシリコーン系消泡剤のうち少なくとも一方である消泡剤とを混合することにより、気泡の発生を抑制し得ることを見出した。また、この場合、核酸と共沈剤とを混合することにより、さらに核酸回収効率をも高め得ることを見出した。すなわち、本発明者らは、核酸を精製する前工程において、核酸と、特定の消泡剤及び共沈剤とを混合することにより、気泡の発生の抑制と、核酸回収効率の向上を高いレベルで両立し得ることを見出した。従って、本発明の核酸精製方法によれば、核酸を効率よく精製することができる。これにより、一度の精製処理で十分量の核酸を獲得するため、後工程における分析や検査の感度を高めることもできる。

[0041] (核酸抽出液)

本発明の核酸抽出液は、消泡剤及び共沈剤を含む。上記消泡剤は、ノニオン系界面活性剤及びシリコーン系消泡剤のうち少なくとも一方である。

[0042] ノニオン系界面活性剤としては、特に限定されないが、例えば、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン分岐アルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンジステレン化フェニルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステリルエーテル、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレングリセリルエ

ーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル- β -D-マルトシド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミド、ジギトニン、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、アルキルポリグリコシド、アルキルアルカノールアミド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、アルキルグリセリルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。なお、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルとしては、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル等が挙げられる。また、ポリオキシエチレン分岐アルキルエーテルとしては、例えば、ポリオキシエチレンイソデシルエーテル、ポリオキシエチレントリデシルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルドデシルエーテル等が挙げられる。これらは、1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。

[0043] ノニオン系界面活性剤は、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルと、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステルとの混合物であることが好ましい。この場合、気泡の発生をより一層確実に抑制することができる。

[0044] なお、脂肪酸エステルを構成する脂肪酸としては、例えば、ステアリン酸、オレイン酸、イソステアリン酸、ラウリン酸、カプリル酸等を挙げることができる。

[0045] 核酸抽出液中におけるノニオン系界面活性剤の含有量は、好ましくは0.001体積%以上、より好ましくは0.01体積%以上、好ましくは1体積%以下、より好ましくは0.1体積%以下である。ノニオン系界面活性剤の含有量が上記範囲内にある場合、気泡の発生をより一層確実に抑制することができ、核酸回収効率をより一層向上させることができる。

[0046] シリコーン系消泡剤は、シリコーンオイル及び乳化剤により構成される消

泡剤であることが好ましい。あるいは、シリコーン系消泡剤は、シリコーンオイルをノニオン系界面活性剤で乳化したものであることが好ましい。シリコーン系消泡剤としては、例えば、ビスフォームGC-302、ビスフォームED-10（日新化学研究所社製）；信越シリコーン（登録商標）KM-70、KM-71、KM-72、KM-72F、KM-72FS、KM-72S、KM-73、KM-73A、KM-73E、KM-75、KM-7750D、KM-7752、KM-85、KM-89、KM-90、KM-98（信越化学工業社製）等を挙げることができる。

[0047] 乳化剤としては、例えば、上述したノニオン系界面活性剤等を挙げることができる。

[0048] 核酸抽出液中におけるシリコーン系消泡剤の含有量は、好ましくは0.001体積%以上、より好ましくは0.01体積%以上、好ましくは10体積%以下、より好ましくは0.1体積%以下である。シリコーン系消泡剤の含有量が上記範囲内にある場合、気泡の発生をより一層確実に抑制することができ、核酸回収効率をより一層向上させることができる。

[0049] 共沈剤としては、特に限定されないが、例えば、tRNA、ポリアデニン、アクリルアミド系ポリマー、グリコーゲン、デキストラン、ポリエチレングリコール、塩化ナトリウム、塩化リチウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等が挙げられる。なかでも、共沈剤は、ポリアデニンであることが好ましい。この場合、核酸回収効率をより一層向上させることができる。なお、ポリアデニンの塩基数としては、例えば、300塩基以上、3500塩基以下とすることができる。

[0050] 核酸抽出液中における共沈剤の含有量は、好ましくは10ng/μL以上、より好ましくは20ng/μL以上、好ましくは40ng/μL以下、より好ましくは30ng/μL以下である。共沈剤の含有量が上記範囲内にある場合、気泡の発生をより一層確実に抑制することができ、核酸回収効率をより一層向上させることができる。

[0051] 核酸抽出液としては、上記消泡剤及び共沈剤の他に、例えば、タンパク変

性剤と、金属カチオンと、極性溶媒とを含む溶液を用いることができる。極性溶媒は、核酸抽出液中に50%以上含まれていることが好ましい。

[0052] タンパク変性剤は、タンパクと相互作用することで、タンパクの高次構造を崩す役割を有するものである。タンパク変性剤としては、例えば、界面活性剤、還元剤、又はグアニジン誘導体、チオ尿素、尿素、もしくはこれらの塩等を用いることができる。界面活性剤としては、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ポリオキエチレンソルビタンモノラウレート（Tween 20）等を用いることができる。還元剤としては、例えば、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール（DTT）等を用いることができる。また、上記塩としては、例えば、グアニジン塩酸塩等の塩を用いることができる。これらのタンパク変性剤は、1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。

[0053] 核酸抽出液中におけるタンパク変性剤の濃度は、特に限定されないが、好ましくは2 mol/L以上、より好ましくは4 mol/L以上、さらに好ましくは8 mol/L以上、好ましくは10 mol/L以下である。タンパク変性剤の濃度を上記範囲内とすることにより、核酸をより一層確実に抽出することができる。なお、タンパク変性剤を2種以上有する場合は、合計の濃度が上記範囲内であることが好ましい。

[0054] 金属カチオンとしては、特に限定されないが、例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、遷移金属イオン、又は12族金属イオンを用いることができる。

[0055] アルカリ金属イオンとしては、カリウムイオン、ナトリウムイオン、リチウムイオン、ルビジウムイオン、セシウムイオン、フランシウムイオン等が挙げられる。

[0056] アルカリ土類金属イオンとしては、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ベリリウムイオン、ストロンチウムイオン、バリウムイオン、ラジウムイオン等が挙げられる。

[0057] 遷移金属イオンとしては、マンガンイオン、鉄イオン、コバルトイオン、

ニッケルイオン、銅イオン等が挙げられる。

[0058] 12族金属イオンとしては、亜鉛イオン、カドミウムイオン、水銀イオン等が挙げられる。

[0059] これらの金属カチオンは、1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。

[0060] 金属カチオンの価数は、2価以上であることが好ましい。2価以上の金属カチオンとしては、例えば、カルシウムイオンやマグネシウムイオンが挙げられる。2価以上の金属カチオンを用いた場合、核酸をより効率的に回収することができる。

[0061] 核酸抽出液中における金属カチオンの濃度は、好ましくは0.5mol/L以上、より好ましくは1mol/L以上、さらに好ましくは2mol/L以上である。金属カチオンの濃度が上記下限値以上である場合、核酸をより効率的に回収することができる。金属カチオンの濃度の上限値は、特に限定されないが、例えば、6mol/Lとすることができる。

[0062] 極性溶媒としては、特に限定されないが、例えば、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルアセトアミド(DMA)、メトキシプロパノール、ポリエチレングリコール、ペンタンジオール、プロパンジオール、アミノエタノール、ジエタノールアミン等を用いることができる。これらの極性溶媒は、1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。なお、核酸抽出液中に極性溶媒は含まれていなくてもよい。また、核酸抽出液中には、極性溶媒以外の溶媒が含まれていてもよい。もっとも、核酸をより一層確実に抽出する観点からは、核酸抽出液中に水等の極性溶媒が含まれていることが好ましい。

[0063] (核酸精製方法)

マイクロチップ；

本発明の核酸精製方法では、マイクロチップを用いて核酸を精製してもよい。以下、マイクロチップの一例について図面を参照して説明する。

[0064] 図1は、本発明の一実施形態に係る核酸精製方法で用いるマイクロチップ

を示す模式的平面図である。また、図2は、図1のA-A線に沿う部分の模式的断面図である。

[0065] 図1及び図2に示すように、マイクロチップ1は、流体が送液される流路2を有する。流路2の途中には、回収部3が設けられている。従って、流路2は、回収部3より上流側に設けられた上流側流路2aと、回収部3より下流側に設けられた下流側流路2bとを有する。また、回収部3には、核酸を吸着させ、精製するための固相担体4が配置されている。

[0066] マイクロチップ1は、検査や分析に用いられるチップである。マイクロチップ1は、特に限定されないが、本実施形態では、図2に示すように、板状の基板5と、カバー部材6とを有する。基板5は、主面5aを有する。基板5の主面5a側には、凹部5bが設けられている。凹部5bは、基板5の主面5a側に開口するように設けられている。

[0067] 基板5を構成する材料は、特に限定されず、例えば、合成樹脂、ゴム、金属などを用いることができる。合成樹脂としては、特に限定されないが、熱可塑性樹脂であることが好ましい。熱可塑性樹脂としては、例えば、シクロオレフィンポリマー、シクロオレフィンコポリマー、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、又はポリプロピレンなどを用いることができる。これらは、1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。

[0068] 基板5は、上記熱可塑性樹脂の成形体からなることが好ましい。成型方法としては、特に限定されず、公知の成型方法を用いることができる。成型方法としては、例えば、射出成型、射出圧縮成型、ガスアシスト法射出成型、押し出し成型、多層押し出し成型、回転成形、熱プレス成型、ブロー成形、又は発泡成形などの方法が挙げられる。なかでも、射出成型であることが好ましい。

[0069] 基板5は、複数枚の合成樹脂のシートを積層することにより形成されていてもよい。基板5は、ベースシートと、ベースシート上に設けられた貫通孔を有する基板本体とにより構成されていてもよい。

[0070] 基板5の主面5a上には、カバー部材6が設けられている。カバー部材6

は、基板 5 の凹部 5 b を閉成するように設けられている。カバー部材 6 が、基板 5 の凹部 5 b を閉成することにより、回収部 3 が構成されている。なお、本実施形態では、上流側流路 2 a 及び下流側流路 2 b も同様にカバー部材 6 が基板 5 の凹部 5 b を閉成することにより構成されている。

[0071] カバー部材 6 は、例えば、樹脂フィルムなどの可撓性を有する材料により構成することができる。樹脂フィルムとしては、例えば、シクロオレフィンポリマー、シクロオレフィンコポリマー、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、又はポリプロピレン等の熱可塑性樹脂を用いることができる。

[0072] また、カバー部材 6 は、弾性部材により構成されていてもよい。弾性部材としては、特に限定されないが、エラストマーであることが好ましい。なお、本発明において、基板 5 とカバー部材 6 とは、一体的に構成されていてもよい。

[0073] 基板 5 内には、流体が送液される上述した流路 2 が設けられている。ここでは、流路 2 がマイクロ流路である。流路 2 は、マイクロ流路ではなく、マイクロ流路よりも断面積の大きな流路であってもよい。もっとも、マイクロ流路であることが好ましい。それによって、微量の試料により、様々な分析を行うことができる。

[0074] ところで、マイクロ流路とは、流体の搬送に際し、マイクロ効果が生じるような微細な流路をいう。このようなマイクロ流路では、液体は、表面張力の影響を強く受け、通常の寸法の流路を流れる液体とは異なる挙動を示す。

[0075] マイクロ流路の横断面形状及び大きさは、上記のマイクロ効果が生じる流路であれば特に限定はされない。例えば、マイクロ流路に流体を流す際、ポンプや重力を用いる場合には、流路抵抗を低下させる観点から、マイクロ流路の横断面形状がおおむね長方形（正方形を含む）の場合には、小さい方の辺の寸法で、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以上が好ましく、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上がより好ましく、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上がさらに好ましい。マイクロチップ 1 を用いたマイクロ流体デバ

イスのより一層の小型化の観点より、小さい方の辺の寸法で、5 mm以下が好ましく、1 mm以下がより好ましく、500 μ m以下がさらに好ましい。

[0076] また、マイクロ流路の横断面形状がおおむね円形の場合には、直径（楕円の場合には、短径）が、20 μ m以上が好ましく、50 μ m以上がより好ましく、100 μ m以上がさらに好ましい。上記マイクロ流体デバイスのより一層の小型化の観点より、直径（楕円の場合には、短径）は、5 mm以下が好ましく、1 mm以下がより好ましく、500 μ m以下がさらに好ましい。

[0077] 以下、本発明の核酸精製方法の各工程について説明する。

[0078] 抽出工程；

抽出工程では、核酸を含む試料と、核酸抽出液とを接触させる。これにより試料中の核酸が抽出され、核酸を含む核酸抽出液を得る。

[0079] 上記核酸抽出液には、上述の消泡剤及び共沈剤が予め含まれていることが好ましい。すなわち、上記核酸抽出液には、核酸を含む試料と接触させる前に消泡剤及び共沈剤が添加されることが好ましい。この場合、核酸回収効率をより一層向上させることができる。もっとも、上記核酸抽出液には、核酸を含む試料と接触させた後に消泡剤及び共沈剤が添加されてもよい。いずれの場合においても、核酸と、消泡剤及び共沈剤を混合させることができる。

[0080] 核酸を含む試料としては、例えば、DNAやRNAなどの核酸を含む生体試料が挙げられる。このような生体試料としては、例えば、細胞、血液、組織液、尿、糞便等が挙げられる。また、上記核酸を含む試料としては、例えば、土壌、海水、河川水等、環境中の核酸を含む試料であってもよく、特に限定されない。

[0081] 核酸吸着工程；

核酸吸着工程では、核酸を含む核酸抽出液を固相担体と接触させることにより、核酸を固相担体に吸着させる。

[0082] 図1及び図2に示すマイクロチップ1を用いた核酸精製方法では、注入口7aから、上記核酸の抽出工程における核酸抽出後の核酸抽出液を上流側流路2aに注入し、回収部3に送液する。それによって、回収部3における固

相担体 4 に核酸を吸着させる。

- [0083] 固相担体 4 は、核酸を担持させるための担持体である。本実施形態では、固相担体 4 がアニオン性吸着体である。また、抽出工程で用いる核酸抽出液が、金属カチオンを含んでいる。
- [0084] そのため、核酸を含む試料が核酸抽出液と接触した際に、負の電荷を帯びた核酸に金属カチオンがイオン結合することとなる。このような核酸抽出後の抽出溶液をアニオン性吸着体と接触させると、図 3 に示すように今度は金属カチオンがアニオン性吸着体とイオン結合する。それによって、核酸を、金属カチオンを介してアニオン性吸着体に吸着させることができる。
- [0085] 従って、この場合、金属カチオンを介して容易に核酸をアニオン性吸着体に吸着させることができる。金属カチオンは、核酸抽出液に添加しても核酸の抽出を阻害しないため、従来のアルコールを用いる方法のように核酸抽出後にさらに溶液を添加する工程を設けなくともよい。よって、煩雑な工程を必要としない。
- [0086] もっとも、固相担体 4 は、アニオン性吸着体でなくともよく、抽出工程で用いる核酸抽出液が、金属カチオンを含んでいなくてもよい。すなわち、他の方法により、核酸を固相担体 4 に吸着させてもよい。
- [0087] アニオン性吸着体の形態は、特に限定されないが、例えば、膜、フィルター、プレート、チューブ、繊維状等の形態で用いることができる。アニオン性吸着体の形状は、繊維、粒子、又は多孔質であることが好ましい。
- [0088] アニオン性吸着体としては、特に限定されないが、例えば、ケイ素化合物類、リン酸塩鉱物類、ケイ酸塩鉱物類、又はアルミノケイ酸塩鉱物類等により構成することができる。ケイ素化合物類としては、例えば、シリカ、ガラス等が挙げられる。リン酸塩鉱物類としては、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。ケイ酸塩鉱物類としては、タルク、モンモリロナイト等が挙げられる。アルミノケイ酸塩鉱物類としては、ゼオライト等が挙げられる。これらは、1 種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。
- [0089] アニオン性吸着体としては、シリカ繊維やガラス繊維であることが好まし

く、シリカ繊維であることがより好ましい。本実施形態では、アニオン性吸着体としてシリカ繊維を用いている。もっとも、アニオン性吸着体は、シリカ粒子であってもよく、シリカの多孔質体であってもよい。

[0090] 洗浄工程；

洗浄工程では、核酸吸着工程で核酸を吸着させた固相担体に、洗浄液を接触させることにより、核酸を吸着させた固相担体を洗浄する。

[0091] マイクロチップ1を用いた核酸精製方法では、洗浄液を回収部3に送液する。それによって、核酸が吸着した固相担体4を洗浄する。

[0092] 洗浄液としては、特に限定されないが、例えば、水、塩酸－塩化カリウム緩衝液、グリシン－塩酸緩衝液、クエン酸－クエン酸ナトリウム緩衝液、又はクエン酸－リン酸緩衝液等が挙げられる。これらは、単独で用いてもよく、複数を併用してもよい。

[0093] 洗浄液のpHは、好ましくは5.0以下、より好ましくは4.0以下である。洗浄液のpHが上記上限値以下である場合、アニオン性吸着体に吸着した核酸を脱離させることなく、不要な金属イオンをより一層確実に除去することができ、後工程における核酸の増幅をより一層阻害させ難くすることができる。また、この場合、洗浄液に、核酸増幅反応を阻害するアルコールを用いないため、核酸増幅反応前にアルコールを除去する操作が不要であり、核酸をより一層簡便に精製することができる。

[0094] また、洗浄液のpHの下限值は、例えば、2.0とすることができる。

[0095] 核酸回収工程；

次に、洗浄工程で洗浄した固相担体に回収液を接触させることにより、アニオン性吸着体から核酸を単離させ、核酸を回収する。

[0096] 具体的に、マイクロチップ1を用いた核酸精製方法では、回収液を回収部3に送液し、核酸を固相担体4から単離させつつ、下流側流路2b側へ送液し、回収口7bから核酸を回収する。

[0097] 回収液は、核酸増幅反応を阻害しない溶液であることが好ましい。この場合、後工程における分析や検査の精度をより一層高めることができる。

- [0098] 回収液としては、緩衝液や、核酸増幅用試薬等を用いることができる。
- [0099] 緩衝液としては、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、N-トリス (ヒドロキシメチル) メチルー2-アミノエタンスルホン酸 (TES)、トリシン (tricine)、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、HEPES、TAPSO、POPSO、HEPSO、EPPS、Bicine、TAPS、リン酸緩衝液等を用いることができる。
- [0100] 核酸増幅用試薬としては、TaqPath 1-Step Multiplex MasterMix、TaqMan Gene Expression MasterMix、TaqMan Fast Advanced MasterMix Mix、TaqPath qPCR Master Mix、CG、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher社製) 等を用いることができる。
- [0101] これらは、1種を単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。
- [0102] 緩衝液のpHは、好ましくは6.0以上、より好ましくは7.0以上、さらに好ましくは8.0以上である。この場合、核酸をより効率的に回収することができる。緩衝液のpHの上限値は、特に限定されないが、例えば、9.0とすることができる。
- [0103] 緩衝液の濃度は、好ましくは5 mmol/L以上、より好ましくは10 mmol/L以上、好ましくは50 mmol/L以下、より好ましくは30 mmol/L以下である。緩衝液の濃度が上記範囲内にある場合、核酸をより効率的に回収することができる。
- [0104] なお、核酸吸着工程、洗浄工程、及び核酸回収工程における送液は、例えば、マイクロポンプを用いて行うことができる。マイクロポンプとしては、特に限定されないが、例えば光ガス発生テープ等が挙げられる。光ガス発生テープとは、光照射により気体を発生することができるテープである。
- [0105] なお、本実施形態では、図1及び図2に示すマイクロチップ1を用いた例について説明したが、上述したマイクロ流路を有するマイクロチップであれ

ば、その構造は、特に限定されない。

[0106] また、本発明の核酸精製方法では、スピンカラムや磁性ビーズを用いて核酸の精製を行ってもよい。この場合においても、消泡剤の効果によって、濡れ性が向上し、泡立ちが抑制できるため、フィルターろ過時間をより短縮することができる。また、核酸と共沈剤とを混合することにより、さらに核酸の回収効率をも高めることもできる。よって、この場合においても、核酸を効率よく精製することができる。

[0107] [核酸精製キット]

本発明の核酸精製キットは、上述した本発明の核酸抽出液を含んでいる。また、本発明の核酸精製キットは、洗浄液と、回収液と、アニオン性吸着体等をさらに含んでもよい。本発明の核酸精製キットによれば、上述の核酸精製方法を用いることにより、効率よく核酸を精製することができる。なお、洗浄液と、回収液と、アニオン性吸着体については、上述の核酸精製方法で説明したものと同一のものを用いることができる。

[0108] 以下、本発明の具体的な実施例及び比較例を挙げることにより、本発明を明らかにする。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0109] (実施例 1)

実施例 1 では、以下のようにして図 1 及び図 2 に示すマイクロチップ 1 を作製した。

[0110] 基板 5 を構成する材料として、シクロオレフィンポリマーを用い、これを射出成形することにより、凹部 5 b を有する基板 5 を作製した。また、カバー部材 6 には、封止テープを用い、封止テープで基板 5 の凹部 5 b を閉成することによりマイクロチップ 1 を作製した。なお、回収部 3 には、固相担体 4 としてアニオン性吸着体であるシリカ繊維（2 mm ϕ 、厚み 0.8 mm）を配置した。また、流路 2 の幅は 0.8 mm とし、深さは 0.8 mm とした。

[0111] このようなマイクロチップ 1 を用いて、以下のようにして核酸（RNA）を回収した。なお、送液は、光ガス発生テープを用いて行った。

[0112] まず、消泡剤としてのノニオン系界面活性剤（日新化学研究所社製、ビスフォームASV）と、共沈剤としてのポリアデニン（Carrier RNA、QIAGEN社製、品番「1017647」、以下はcRNAと記載）と、尿素4mol/Lと、グアニジン塩酸塩4mol/Lと、塩化カルシウム2mol/Lと、Tris-HCl Buffer（pH7.0）とを含む水溶液に、鼻腔粘液を懸濁した核酸抽出液を用意した。なお、核酸抽出液中におけるノニオン系界面活性剤の濃度は、0.1体積%とした。また、核酸抽出液中におけるポリアデニン（cRNA）の濃度は、20ng/μLとした。

[0113] 次に、核酸（RNA）を含む試料（ウイルス；60000コピー）1μLを、核酸抽出液150μLに添加し、核酸を抽出した。

[0114] 次に、核酸抽出後の核酸抽出液を上流側流路2aから回収部3へ送液することにより、回収部3のシリカ繊維に核酸を吸着させた。

[0115] 次に、洗浄液（10mmol/L、KCl-HCl Buffer（pH2.0））400μLを回収部3に送液し、核酸が担持されたシリカ繊維を洗浄し、送液後の洗浄液を回収した。回収液（10mmol/L、Tris-HCl Buffer（pH8.0））21μLを回収部3に送液し、回収部3に担持された核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0116] （実施例2）

消泡剤として、シリコン系消泡剤（日新化学研究所社製、ビスフォームGC-302）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0117] （実施例3～5）

消泡剤としてのノニオン系界面活性剤の濃度を下記の表2のように変更したこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0118] （実施例6～9）

消泡剤としてのシリコン系消泡剤の濃度を下記の表2のように変更した。

こと以外は、実施例2と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0119] （実施例10）

核酸（RNA）を含む試料（ウイルス；100000コピー）1 μ Lを、核酸抽出液（尿素4 mol/Lと、グアニジン塩酸塩4 mol/Lと、塩化カルシウム2 mol/Lと、Tris-HCl Buffer（pH7.0）とを含む水溶液）150 μ Lに添加し、核酸を抽出した。核酸抽出後に、消泡剤としてのノニオン系界面活性剤（日新化学研究所社製、ビスフォームASV）と、共沈剤としてのポリアデニン（cRNA、QIAGEN社製、品番「1017647」）を添加した。なお、核酸抽出液中におけるノニオン系界面活性剤の濃度は、0.1体積%とした。また、核酸抽出液中におけるポリアデニン（cRNA）の濃度は、20 ng/ μ Lとした。その他の点は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0120] （実施例11）

消泡剤として、シリコーン系消泡剤（日新化学研究所社製、ビスフォームGC302）を用いたこと以外は、実施例10と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0121] （比較例1）

消泡剤及び共沈剤を用いなかったこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0122] （比較例2）

共沈剤を用いなかったこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0123] （比較例3）

共沈剤を用いなかったこと以外は、実施例2と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0124] （比較例4）

消泡剤を用いなかったこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0125] (比較例5)

実施例1の消泡剤の代わりに、カチオン系界面活性剤（花王社製、コータミン24P）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0126] (比較例6)

実施例1の消泡剤の代わりに、アニオン系界面活性剤（花王社製、デモールNL）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして核酸（RNA）を単離させ、回収した。

[0127] [評価]

(消泡効果の評価)

図4～図5は、実施例1～2の送液中に生じた気泡の数を確認するための写真である。図6は、比較例1の送液中に生じた気泡の数を確認するための写真である。

[0128] 図4～図6に示すように、実施例1～2では、比較例1と比較して気泡の発生が抑制されていることがわかる。

[0129] なお、実施例3～9及び比較例2～6においても同様の観察を行い、送液中に生じた気泡の数により、以下の評価基準で消泡効果を判定した。

[0130] <評価基準>

○：5個以下

×：6個以上、10個以下

××：11個以上

[0131] (回収率)

実施例1～11及び比較例1～6において、回収した回収液中におけるRNAの割合を評価した。具体的には、回収液2μLとプライマー、TaqPath 1-Step Multiplex MasterMix（ThermoFisher社製）を用いて、RT-PCR反応溶液を調整した。また、スタンダードとして、同じウイルスをQIAGEN社製、QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いて抽出・精製した溶液を2

μL 入れた RT-PCR 反応溶液（核酸濃度は $50,000 \cdot 5,000 \cdot 500 \text{ copies}/\mu\text{L}$ の 3 水準）も調整した。次に、回収液から調整した RT-PCR 反応溶液及びスタンダード RT-PCR 反応溶液をサーマルサイクラー「CFX96（BIO RAD 社）」を用いて増幅した。増幅は $50^\circ\text{C}-30$ 秒にて逆転写反応を行った後、 $95^\circ\text{C}-20$ 秒にて初期変性を行い、 $95^\circ\text{C}-3$ 秒、 $60^\circ\text{C}-5$ 秒で PCR サイクルを 45 回行った。増幅後、CFX96 がスタンダードから自動計算することにより得られる核酸量から、以下の計算式により RNA 回収率（回収率）を算出した。

[0132] 回収率 (%) = $\{ (\text{CFX96 が算出した核酸量} \times \text{回収液量} / 2) \times 100 \} / 3,0000$

[0133] なお、実施例 1～9 及び比較例 1～6 においては、消泡効果と回収率の総合評価を以下の評価基準で判定した。

[0134] <評価基準>

○：回収率 5% 以上、かつ上記消泡効果の評価基準が○

×：消泡効果に関わらず回収率 1% 以上 5% 未満、又は回収率に関わらず上記消泡効果の評価基準が×

××：消泡効果に関わらず回収率 1% 未満、又は回収率に関わらず上記消泡効果の評価基準が××

[0135] 結果を下記の表 1～表 3 に示す。

[0136]

[表1]

	実施例1	実施例2	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
溶液剤	ノニオン系 界面活性剤	シリコーン系 溶剤	-	ノニオン系 界面活性剤	シリコーン系 溶剤	-	カチオン系 界面活性剤	アニオン系 界面活性剤
共沈剤	CRNA	CRNA	-	-	-	CRNA	CRNA	CRNA
消泡効果	○	○	xx	○	○	xx	xx	x
回収率	51.5%	42.5%	0.29%	0.24%	0.57%	-	-	-
総合評価	○	○	xx	xx	xx	xx	xx	x

[0137]

[表2]

[illegible]

[0138] [表3]

	実施例1	実施例10	実施例2	実施例11	比較例1
消泡剤	ノニオン系 界面活性剤	ノニオン系 界面活性剤	シリコーン系 消泡剤	シリコーン系 消泡剤	—
共沈剤	cRNA	cRNA	cRNA	cRNA	—
共沈剤・消泡剤の 添加タイミング	核酸抽出液に 予め添加	抽出後の核酸抽 出液に添加	核酸抽出液に 予め添加	抽出後の核酸抽 出液に添加	—
回収率	51.5%	46.7%	42.5%	52.4%	0.29%

符号の説明

[0139] 1…マイクロチップ

2…流路

2 a…上流側流路

2 b…下流側流路

3…回収部

4…固相担体

5…基板

5 a…主面

5 b…凹部

6…カバー部材

7 a…注入口

7 b…回収口

請求の範囲

- [請求項1] 核酸と、消泡剤及び共沈剤とを混合する工程と、
前記核酸を精製する工程と、
を備え、
前記消泡剤が、ノニオン系界面活性剤及びシリコーン系消泡剤のうち少なくとも一方である、核酸精製方法。
- [請求項2] 前記核酸と、前記消泡剤及び共沈剤とを混合した後に、前記核酸を固相担体に吸着させて精製する、請求項1に記載の核酸精製方法。
- [請求項3] 前記消泡剤及び共沈剤が予め含まれる核酸抽出液を用意する工程をさらに備え、
前記核酸を含む試料と、前記核酸抽出液とを接触させることにより、前記核酸と、前記消泡剤及び共沈剤とを混合する、請求項1又は2に記載の核酸精製方法。
- [請求項4] 前記消泡剤が、前記ノニオン系界面活性剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸精製方法。
- [請求項5] 前記消泡剤及び共沈剤が予め含まれる核酸抽出液を用意する工程をさらに備え、
前記核酸抽出液中における前記ノニオン系界面活性剤の含有量が、0.001体積%以上、1体積%以下である、請求項4に記載の核酸精製方法。
- [請求項6] 前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン分岐アルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステリルエーテル、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレングリセリルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル- β -D-マルトシド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミド、及びジギトニンからなる群から選択される少なくとも1種

である、請求項 4 又は請求項 5 に記載の核酸精製方法。

- [請求項 7] 前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルと、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステルとの混合物である、請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸精製方法。
- [請求項 8] 前記消泡剤が、前記シリコーン系消泡剤である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸精製方法。
- [請求項 9] 前記消泡剤及び共沈剤が予め含まれる核酸抽出液を用意する工程をさらに備え、
前記核酸抽出液中における前記シリコーン系消泡剤の含有量が、0.001 体積%以上、10 体積%以下である、請求項 8 に記載の核酸精製方法。
- [請求項 10] 前記シリコーン系消泡剤が、シリコーンオイル及び乳化剤により構成されている、請求項 8 又は 9 に記載の核酸精製方法。
- [請求項 11] 前記シリコーン系消泡剤が、シリコーンオイルをノニオン系界面活性剤で乳化したものである、請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の核酸精製方法。
- [請求項 12] 前記共沈剤が、ポリアデニンである、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸精製方法。
- [請求項 13] 核酸精製に用いられる核酸抽出液であって、
消泡剤及び共沈剤を含み、
前記消泡剤が、ノニオン系界面活性剤及びシリコーン系消泡剤のうち少なくとも一方である、核酸抽出液。
- [請求項 14] 前記消泡剤が、前記ノニオン系界面活性剤である、請求項 13 に記載の核酸抽出液。
- [請求項 15] 前記核酸抽出液中における前記ノニオン系界面活性剤の含有量が、0.001 体積%以上、1 体積%以下である、請求項 14 に記載の核酸抽出液。
- [請求項 16] 前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエー

テル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレングリセリルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル- β -D-マルトシド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、パーム核油脂肪酸ジエタノールアミド、及びジギトニンからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項14又は15に記載の核酸抽出液。

- [請求項17] 前記ノニオン系界面活性剤が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルと、ポリオキシアルキレン脂肪酸エステルとの混合物である、請求項14～16のいずれか1項に記載の核酸抽出液。
- [請求項18] 前記消泡剤が、前記シリコーン系消泡剤である、請求項13に記載の核酸抽出液。
- [請求項19] 前記核酸抽出液中における前記シリコーン系消泡剤の含有量が、0.001体積%以上、10体積%以下である、請求項18に記載の核酸抽出液。
- [請求項20] 前記シリコーン系消泡剤が、シリコーンオイル及び乳化剤により構成されている、請求項18又は19に記載の核酸抽出液。
- [請求項21] 前記シリコーン系消泡剤が、シリコーンオイルをノニオン系界面活性剤で乳化したものである、請求項18～20のいずれか1項に記載の核酸抽出液。
- [請求項22] 前記共沈剤が、ポリアデニンである、請求項13～21のいずれか1項に記載の核酸抽出液。
- [請求項23] 請求項13～22のいずれか1項に記載の核酸抽出液を含む、核酸精製キット。