

明 細 書

発明の名称：核酸の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸の精製方法に関する。

背景技術

[0002] 従来より、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として、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。この際、析出試薬だけでなく、抽出試薬や洗浄液にも、通常、エタノールなどのアルコールが用いられる。

[0003] 例えば、下記の特許文献1には、細胞原料と、抽出溶液とを接触させることにより、細胞材料を溶解して核酸を抽出する方法が開示されている。特許文献1では、抽出溶液に、エタノールやブタノールなどのアルコールが用いられている。

[0004] また、下記の特許文献2では、核酸が結合した固相を、核酸を用いた酵素反応に適用できる反応液を構成する成分のうち少なくとも1成分を含む洗浄液に接触させて固相を洗浄する方法が開示されている。特許文献2の実施例では、第二洗浄液としてアルコールが用いられている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2018-134093号公報

特許文献2：特許第4340298号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献1のように、抽出溶液がアルコールを含む場合、

試料から核酸を抽出する際にアルコールが共存することで、十分に核酸を抽出できない場合がある。そのため、試料から核酸を抽出した後に、核酸を析出させるためのアルコールを混合する工程が必要となり、工程が煩雑になるという問題がある。

[0007] また、特許文献2のように、洗浄液がアルコールを含む場合、洗浄液を保管する際にアルコールの揮発や引火に注意する必要があり、取り扱い性が悪いという問題がある。また、特許文献2では、後工程にアルコールを持ち込まないよう洗浄工程が3回も設けられており、工程が煩雑である。

[0008] なお、アルコールを用いない場合は、核酸の回収率が低下し、核酸を効率よく回収できないことがある。また、アルコール以外の核酸精製に用いる物質が後工程における検査や分析において反応を阻害することもある。

[0009] 本発明の目的は、核酸を簡便に精製することができ、効率よく回収することができる、核酸の精製方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明に係る核酸の精製方法は、核酸を含む試料と、金属カチオンを含む抽出溶液とを接触させることにより、核酸を含む抽出溶液を用意する工程と、前記核酸を含む抽出溶液をアニオン性吸着体と接触させることにより、前記核酸をアニオン性吸着体に吸着させる工程と、pH5.0以下の洗浄液を前記アニオン性吸着体に接触させることにより、前記核酸が吸着したアニオン性吸着体を洗浄する工程と、pH6.0以上の回収液を前記アニオン性吸着体に接触させることにより、前記アニオン性吸着体から前記核酸を単離させる工程と、を備える。

[0011] 本発明に係る核酸の精製方法のある特定の局面では、前記回収液が、核酸増幅反応を阻害しない溶液である。前記回収液は、緩衝液であることが好ましい。前記緩衝液の濃度は、5mmol/L以上、100mmol/L以下であることがより好ましい。また、前記回収液は、核酸増幅用試薬を含む溶液であってもよい。

[0012] 本発明に係る核酸の精製方法の他の特定の局面では、前記pH5.0以下

の洗浄液が、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、及びクエン酸－リン酸緩衝液からなる群から選択される少なくとも１種である。

[0013] 本発明に係る核酸の精製方法のさらに他の特定の局面では、前記抽出溶液中の金属カチオンの濃度が、 0.5 mol/L 以上である。

[0014] 本発明に係る核酸の精製方法のさらに他の特定の局面では、前記金属カチオンが、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族金属イオンである。

[0015] 本発明に係る核酸の精製方法のさらに他の特定の局面では、前記金属カチオンの価数が、２価以上である。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、核酸を簡便に精製することができ、効率よく回収することができる、核酸の精製方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図１は、本発明の一実施形態に係る核酸の精製方法において、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2]図２は、本発明の一実施形態に係る核酸の精製方法で用いるチップを示す模式的平面図である。

[図3]図３は、図２中のＡ－Ａ線に沿う部分の模式的断面図である。

[図4]図４は、洗浄液のｐＨと、洗浄液中及び回収液中におけるＲＮＡの割合との関係を示すグラフである。

[図5]図５は、洗浄液のｐＨと、ＲＮＡの回収率との関係を示すグラフである。

[図6]図６は、鼻腔粘液を添加した際の洗浄液のｐＨと、ＲＮＡの回収率との関係を示すグラフである。

[図7]図７は、実施例３においてｐＨ２の塩化カリウム－塩酸緩衝液を洗浄液に用いた場合のＰＣＲサイクル数と、蛍光強度の関係を示す図である。

[図8]図８は、実施例６においてｐＨ２の水を洗浄液に用いた場合のＰＣＲサ

イクル数と、蛍光強度の関係を示す図である。

[図9]図9は、金属カチオンの種類と、RNAの回収率との関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0018] 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。

[0019] 本発明に係る核酸の精製方法では、まず、核酸を含む試料と、金属カチオンを含む抽出溶液とを接触させることにより、核酸を含む抽出溶液を用意する（抽出工程）。次に、核酸を含む抽出溶液をアニオン性吸着体と接触させることにより、核酸をアニオン性吸着体に吸着させる（核酸吸着工程）。次に、pH5.0以下の洗浄液をアニオン性吸着体に接触させることにより、核酸が吸着したアニオン性吸着体を洗浄する（洗浄工程）。次に、pH6.0以上の回収液をアニオン性吸着体に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る（核酸回収工程）。

[0020] 本発明の核酸の精製方法によれば、核酸を簡便に精製することができ、効率よく回収することができる。この理由については、以下のように説明することができる。

[0021] 本発明においては、抽出工程で用いる抽出溶液が金属カチオンを含んでいる。そのため、核酸を含む試料が抽出溶液と接触した際に、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1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。

[0022] このように、本発明においては、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、核酸抽出溶液に添加しても核酸の抽出を阻害しないため、従来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。従って、煩雑な工程を必要としない。

[0023] また、本発明は、アルコールを用いなくとも、核酸をアニオン性吸着体に吸着できるので、取り扱い性にも優れる。さらには、核酸を析出させるためにアルコールを大量に添加すると、核酸抽出後の抽出溶液の体積が増加して核酸の濃度が下がるのに対し、本発明における金属カチオンを用いた核酸精製では抽出溶液の体積増加を伴わない（核酸濃度が下がらない）ため、核酸の回収率を高めることができる。これにより、一度の精製処理で十分量の核酸を獲得できるため、後工程における分析や検査の感度を高めることができる。

[0024] もっとも、金属カチオンを多量に含む溶液を後工程における核酸増幅工程で用いた場合、核酸増幅が阻害されることがある。よって、洗浄工程で、核酸と共にアニオン性吸着体に結合した余分な金属カチオンを洗い流す必要がある。しかしながら、洗浄液にアルコールを含まない溶液を用いると、アニオン性吸着体から、金属カチオンと共に核酸が脱離する場合がある。

[0025] 本発明では、pH 5.0以下の洗浄液を使用することにより、アニオン性吸着体に結合した核酸を脱離させることなく、余分な金属カチオンを洗い流すことができる。よって、核酸を効率よく回収することができ、しかも後工程において、金属カチオンにより核酸増幅が阻害され難く、分析や検査の精度を高めることができる。また、アルコールを用いず、1回で確実に洗浄できることから、取り扱い性に優れ、かつ核酸を簡便に精製することができる。また、本発明では、pH 6.0以上の回収液を使用するので、この点からも、核酸を効率よく回収することができ、しかも後工程において、金属カチオンにより核酸増幅が阻害され難く、分析や検査の精度を高めることができる。

[0026] 以下、各工程について、より詳細に説明する。

[0027] （抽出工程）

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

[0028] 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。

[0029] 抽出溶液としては、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、抽出溶液中に50%以上含まれていることが好ましい。

[0030] 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種単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。

[0031] 抽出溶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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 抽出溶液中における金属カチオンの濃度は、好ましくは 0.5 mol/L 以上、より好ましくは 1 mol/L 以上、さらに好ましくは 2 mol/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、 6 mol/L とすることができる。

[0040] 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種単独で用いてもよく、複数種を併用してもよい。なお、抽出溶液中に極性溶媒は含まれていなくてもよい。また、抽出溶液中には、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、抽出溶液中に水等の極性溶媒が含まれていることが好ましい。

[0041] 抽出溶液は、さらに共沈剤を含んでもよい。共沈剤としては、例えば、tRNA、ポリアデニン、アクリルアミド系ポリマー、グリコーゲン等が挙げられる。上記抽出溶液がさらに共沈剤を含む場合、より一層効率的に核酸をアニオン性吸着体に吸着させることができる。

[0042] (核酸吸着工程)

核酸吸着工程では、核酸を含む抽出溶液をアニオン性吸着体と接触させることにより、核酸をアニオン性吸着体に吸着させる。

[0043] アニオン性吸着体は、核酸を担持させるための担持体である。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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] (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アニオン性吸着体に、pH 5.0以下の洗浄液を接触させることにより、核酸を吸着させたアニオン性吸着体を洗浄する。

[0047] pH 5.0以下の洗浄液としては、例えば、水、塩酸一塩化カリウム緩衝液、グリシンー塩酸緩衝液、クエン酸ークエン酸ナトリウム緩衝液、又はク

エン酸ー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。

[0048] 洗浄液のpHは、5.0以下、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結合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、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。

[0049] また、洗浄液のpHの下限値は、例えば、2.0とすることができる。

[0050] (核酸回収工程)

次に、洗浄工程で洗浄したアニオン性吸着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。

[0051] 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。また、回収液のpHは、6.0以上、好ましくは7.0以上、より好ましくは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。回収液の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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 核酸増幅用試薬としては、TaqPath 1-Step Multiplex MasterMix、TaqMan Gene Expression MasterMix、TaqMan Fast Advanced M

asterMix 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。

[0055] 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。

[0056] 緩衝液のpHは、6.0以上、好ましくは7.0以上、より好ましくは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。

[0057] 緩衝液の濃度は、好ましくは5mmol/L以上、より好ましくは10mmol/L以上、好ましくは100mmol/L以下、より好ましくは50mmol/L以下、さらに好ましくは30mmol/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。

[0058] 以下、より具体的な実施形態を例示する。

[0059] (第1の実施形態)

図2は、本発明の第1の実施形態に係る核酸の精製方法で用いるチップを示す模式的平面図である。また、図3は、図2のA-A線に沿う部分の模式的断面図である。

[0060] 図2及び図3に示すように、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、精製するためのアニオン性吸着体4が配置されている。

[0061] チップ1は、検査や分析に用いられるチップである。チップ1は、特に限定されないが、本実施形態では、図3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。

[0062] 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。なかでも、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。

[0063] 基板5は、上記熱可塑性樹脂の成型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。

[0064] 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。

[0065] 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5b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5b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2a及び下流側流路2bも同様にカバー部材6が基板5の凹部5bを閉成することにより構成されている。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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。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、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下がさらに好ましい。

[0071] 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、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 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。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、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下がさらに好ましい。

[0072] 本実施形態では、このようなチップ1を用いて、上述の本発明に係る核酸の精製方法を実施する。

[0073] 具体的には、チップ1における注入口7aから、上記核酸の抽出工程にお

ける核酸抽出後の抽出溶液を上流側流路 2 a に注入し、回収部 3 に送液する。それによって、回収部 3 におけるアニオン性吸着体 4 に核酸を吸着させる。

[0074] 次に、pH が 5.0 以下の洗浄液を回収部 3 に送液する。それによって、核酸が吸着したアニオン性吸着体 4 を洗浄する。次に、回収液を回収部 3 に送液し、核酸をアニオン性吸着体 4 から単離させつつ、下流側流路 2 b 側へ送液し、回収口 7 b から核酸を回収する。

[0075] 本実施形態の核酸の精製方法では、金属カチオンを介して容易に核酸をアニオン性吸着体 4 に吸着させることができる。金属カチオンは、核酸抽出前に抽出溶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抽出後にアルコール添加する工程を設けなくともよい。従って、煩雑な工程を必要としない。

[0076] また、本発明はアルコールを用いなくとも、核酸をアニオン性吸着体 4 に吸着できるので、取り扱い性にも優れる。さらには、核酸を析出させるためにアルコールを大量に添加すると、核酸抽出後の抽出溶液の体積が増加して核酸の濃度が下がるのに対し、本発明における金属カチオンを用いた核酸精製では抽出溶液の体積増加を伴わない（核酸濃度が下がらない）ため、核酸の回収率を高めることができる。これにより、一度の精製処理で十分量の核酸を獲得できるため、後工程における分析や検査の感度を高めることができる。

[0077] もっとも、金属カチオンを多量に含む溶液を後工程における核酸増幅工程で用いた場合、核酸増幅が阻害されることがある。よって洗浄工程で、核酸と共にアニオン性吸着体に結合した余分な金属カチオンを洗い流す必要がある。しかしながら、洗浄液にアルコールを含まない溶液を用いると、アニオン性吸着体から、金属カチオンと共に核酸が脱離する場合がある。

[0078] 本発明では、pH 5.0 以下の洗浄液を使用することにより、アニオン性吸着体に結合した核酸を脱離させることなく、余分な金属カチオンを洗い流すことができる。よって、後工程において、金属カチオンにより核酸増幅が

阻害され難く、分析や検査の精度を高めることができる。また、アルコールを用いず、1回で確実に洗浄できることから、取り扱い性に優れ、かつ核酸を簡便に精製することができる。

[0079] (第2の実施形態)

第2の実施形態では、容器を用いて、上述の本発明に係る核酸の精製方法を実施する。

[0080] 具体的には、まず、ポリプロピレン等のプラスチック製の容器に、核酸を吸着させ回収するためのアニオン性吸着体を配置する。この容器に、上記核酸の抽出工程における核酸抽出後の抽出溶液を注入して、アニオン性吸着体と攪拌し、アニオン性吸着体に核酸を吸着させる。攪拌方法としては、特に限定されないが、例えば、ボルテックスミキサー、超音波等を用いて行うことができる。

[0081] 次に、容器内の溶液を取り出した後、洗浄液を注入し、攪拌する。それによって、核酸が吸着したアニオン性吸着体を洗浄する。次に、洗浄液を取り出した後、回収液を注入し、攪拌する。これにより、核酸をアニオン性吸着体から単離させることができる。最後に、回収液を取り出し、単離した核酸を回収する。

[0082] 第2の実施形態においても、抽出溶液が金属カチオンを含んでいる。そのため、核酸を含む試料を抽出溶液に添加した際に、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。このような金属カチオンがイオン結合した核酸が抽出された後の混合液をアニオン性吸着体と接触させると、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。

[0083] このように、本実施形態の精製方法では、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、核酸抽出前に抽出溶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抽出後にアルコールを添加する工程を設けなくともよい。従って、煩雑な工程を必要としない。

[0084] また、本発明はアルコールを用いなくとも、核酸をアニオン性吸着体に吸着できるので、取り扱い性にも優れる。さらには、核酸を析出させるためにアルコールを大量に添加すると、核酸抽出後の抽出溶液の体積が増加して核酸の濃度が下がるのに対し、本発明における金属カチオンを用いた核酸精製では抽出溶液の体積増加を伴わない（核酸濃度が下がらない）ため、核酸の回収率を高めることができる。これにより、一度の精製処理で十分量の核酸を獲得できるため、後工程における分析や検査の感度を高めることができる。

[0085] もっとも、金属カチオンを多量に含む溶液を後工程における核酸増幅工程で用いた場合、核酸増幅が阻害されることがある。よって洗浄工程で、核酸と共にアニオン性吸着体に結合した余分な金属カチオンを洗い流す必要がある。しかしながら、洗浄液にアルコールを含まない溶液を用いると、アニオン性吸着体から、金属カチオンと共に核酸が脱離する場合がある。

[0086] 本発明では、pH 5.0以下の洗浄液を使用することにより、アニオン性吸着体に結合した核酸を脱離させることなく、余分な金属カチオンを洗い流すことができる。よって、後工程において、金属カチオンにより核酸増幅が阻害され難く、分析や検査の精度を高めることができる。また、アルコールを用いずとも、1回で確実に洗浄できることから、取り扱い性に優れ、核酸を簡便に精製することができる。

[0087] 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。

[0088] （実施例1～2及び比較例1～4）

実施例1～2及び比較例1～4では、以下のようにして図2及び図3に示すチップ1を作製した。

[0089] 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5b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5bを閉成することによりチップ1を作製した。なお、回収部3には、アニオン性吸着体

4としてシリカ繊維（2mmφ、厚み0.8mm）を配置した。また、流路2の幅は0.8mmとし、深さは0.8mmとした。

[0090] このようなチップ1を用いて、以下のようにして回収率を測定した。

[0091] まず、核酸（RNA）を含む試料（ウイルス；30000コピー）1μLを、抽出溶液（尿素4mol/L、グアニジン塩酸塩4mol/L、塩化カルシウム2mol/L、Tris-HCl Buffer（pH7.0）を含む水溶液）150μLに添加し、核酸を抽出した。

[0092] 次に、核酸抽出後の抽出溶液を上流側流路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。

[0093] 次に、洗浄液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。

[0094] なお、実施例1では、洗浄液として、pH4.0の水を用いた。実施例2では、pH5.0の水を用いた。比較例1では、濃度が10mmol/Lであり、pH6.0の緩衝液（Tris）を用いた。比較例2では、濃度が10mmol/Lであり、pH7.0の緩衝液（Tris）を用いた。比較例3では、濃度が10mmol/Lであり、pH8.0の緩衝液（Tris）を用いた。また、比較例4では、濃度が10mmol/Lであり、pH9.0の緩衝液（Tris）を用いた。

[0095] 次に、回収した洗浄液中及び回収液中におけるRNAの割合を評価した。まず、送液後の洗浄液中のRNAをQIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit（QIAGEN社製）及びQIAcube HTシステム（QIAGEN社製）で精製した（精製洗浄液）。続いて、洗浄液中から精製したRNA溶液、又は回収溶液2μLとプライマー、TaqPath 1-Step Multiplex MasterMix（ThermoFisher社製）を用いて、RT-PCR反応溶液を調製した。またスタンダードとして、同じウイルスをQIAGEN社製、QIAamp V

iral RNA Mini Kitを用いて抽出・精製した溶液を2 μ L 入れたRT-PCR反応溶液（核酸濃度は50,000・5,000・500 copies/ μ Lの3水準）も調製した。次に、回収液から調製した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℃-30秒にて逆転写反応を行った後、95℃-20秒にて初期変性を行い、95℃-3秒、60℃-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（核酸回収率）を算出した。後工程の核酸増幅による分析精度を担保するため、核酸回収率は5%以上であることが望ましい。結果を図4に示す。

[0096] 核酸回収率 (%) = { (CFX96が算出した核酸量 × 回収液量 / 2) × 100 } / 3,000

[0097] 図4に示すように、pHが5.0以下の実施例1～2では、pHが5.0より大きい比較例1～4と比較して、RNAが洗浄液に流出することを抑制でき、良好な回収率で核酸を回収できることがわかる。なお、比較例1～4では、金属カチオンによる影響を考慮して、ナトリウムイオンなどの金属カチオンを添加せずに、水ではなく、緩衝液を用いてpHを調整した。

[0098] （実施例3～6）

実施例3では、洗浄液として、濃度が10 mmol/Lであり、pH2.0の塩酸-塩化カリウム緩衝液を用いたこと以外は、実施例1と同様にして核酸を回収した。実施例4では、洗浄液として、濃度が10 mmol/Lであり、pH2.0及びpH3.0のグリシン-塩酸緩衝液を用いたこと以外は、実施例1と同様にして核酸を回収した。実施例5では、洗浄液として、濃度が10 mmol/Lであり、pH3.0及びpH4.0のクエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液を用いたこと以外は、実施例1と同様にして核酸を回収した。また、実施例6では、洗浄液として、pH2.0、pH3.0、及びpH4.0の水（水-HCl）を用いたこと以外は、実施例1と同様に

して核酸を回収した。続いて、実施例 1 と同様にして回収液中に回収した R N A の回収率を算出した。結果を図 5 に示す。

[0099] 図 5 から明らかなように、実施例 3 ～ 6 では、良好な回収率で R N A を回収できることがわかる。

[0100] また、各サンプルについて、P C R サイクル数と、蛍光強度の関係を求めた。

[0101] 図 7 は、実施例 3 において p H 2 . 0 の塩酸－塩化カリウム緩衝液を洗浄液に用いた場合の P C R サイクル数と、蛍光強度の関係を示す図である。また、図 8 は、実施例 6 において p H 2 . 0 の水を洗浄液に用いた場合の P C R サイクル数と、蛍光強度の関係を示す図である。

[0102] 図 7 及び図 8 の比較から明らかなように、洗浄液として p H 2 . 0 の塩化カリウム－塩酸緩衝液を用いた場合においても、p H 2 . 0 の水を洗浄液に用いた場合と比較して、蛍光強度及び C t 値（増幅曲線の立ち上がり始めたサイクル数）がほぼ等しいことがわかる。これにより、洗浄液として p H 2 . 0 の塩酸－塩化カリウム緩衝液を用いた場合においても、核酸増幅反応が阻害されないことがわかる。同様にして、各実施例における C t 値を求めた。結果を下記の表 1 に示す。なお、下記の表 1 における回収率及び C t 値は、N = 3 で測定した 3 回の平均値である。また、水については、洗浄液として、p H 5 . 0 の水を用いた結果についても併せて示している。また、比較のため、洗浄液として、p H 6 . 0 の緩衝液（T r i s－H C l）を用いた結果についても、比較例 5 として示している。

[0103]

[表1]

	洗浄液組成	洗浄液 pH	回収率	C t 値
実施例3	K C l - H C l	2.0	93.4%	32.01
実施例4	グリシン - H C l	2.0	86.7%	32.23
	グリシン - H C l	3.0	78.9%	32.34
実施例5	クエン酸 - クエン酸 N a	3.0	100.2%	31.88
	クエン酸 - クエン酸 N a	4.0	103.4%	31.83
実施例6	水	2.0	82.9%	32.29
	水	3.0	78.9%	32.32
	水	4.0	91.4%	32.05
	水	5.0	24.2%	33.54
比較例5	Tris-HCl	6.0	0.3%	39.12

[0104] 表1に示すように、実施例3～6では、核酸回収率が5%以上であり、良好に核酸が回収できることがわかる。また、実施例3～6では、C t 値が38.0未満であり、C t 値の顕著な増加が見られず、核酸増幅反応が阻害され難いことがわかる。一方、比較例5では、核酸回収率が5%未満であり、核酸回収率が不十分であることがわかる。また、比較例5では、回収率の低下に伴い、C t 値が38.0以上となり、核酸増幅反応が遅延していることがわかる。

[0105] また、核酸(RNA)を含む試料(ウイルス; 30000コピー) 1 μLを、鼻腔粘液を懸濁した抽出溶液(尿素4 mol/L、グアニジン塩酸塩4 mol/L、塩化カルシウム2 mol/L、Tris-HCl Buffer (pH 7.0)を含む水溶液) 150 μLに添加し、同様にRNA回収率を求めた。結果を図6に示す。実施例3～6では、鼻腔粘液を含む試料を用いた場合にも、RNA回収率が良好であることがわかる。

[0106] (実施例7～22及び比較例6)

実施例7～22及び比較例6では、洗浄液として、濃度が10 mmol/Lであり、pH 2.0の塩酸-塩化カリウム緩衝液を用いた。また、実施例7～13では、回収液として、下記の表2に示すpHであり、下記の表2に

示す濃度のトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) を用いた。実施例 14～17 では、回収液として、下記の表 2 に示す pH であり、下記の表 2 に示す濃度の N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタンスルホン酸 (TES) を用いた。実施例 18～21 では、回収液として、下記の表 2 に示す pH であり、下記の表 2 に示す濃度のトリシン (Tricine) を用いた。実施例 22 では、回収液として、4 倍希釈した TaqPath 1-Step Multiplex MasterMix (ThermoFisher 社製、1×Master Mix、pH 8.0) を用いた。比較例 6 では、回収液として、pH 5.0 であり、濃度が 10 mmol/L (10 mM) であるトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) を用いた。その他の点は、実施例 3 と同様にして、RNA 回収率及び Ct 値を求めた。結果を下記の表 2 に示す。なお、下記の表 2 における回収率及び Ct 値は、N = 3 で測定した 3 回の平均値である。

[0107] [表2]

	回収液組成	回収液pH	回収率	Ct値
実施例7	10mM Tris	6.0	9.8%	36.27
実施例8	10mM Tris	7.0	45.4%	33.54
実施例9	10mM Tris	8.0	75.4%	32.50
実施例10	10mM Tris	9.0	75.0%	32.44
実施例11	5mM Tris	8.0	68.4%	32.75
実施例12	50mM Tris	8.0	74.5%	32.53
実施例13	100mM Tris	8.0	71.0%	32.61
実施例14	5mM TES	8.0	80.2%	32.30
実施例15	10mM TES	8.0	73.2%	32.56
実施例16	50mM TES	8.0	84.4%	32.31
実施例17	100mM TES	8.0	79.4%	32.46
実施例18	5mM Tricine	8.0	76.7%	32.48
実施例19	10mM Tricine	8.0	69.5%	32.68
実施例20	50mM Tricine	8.0	84.4%	32.29
実施例21	100mM Tricine	8.0	63.5%	32.84
実施例22	TaqPath	8.1	75.3%	32.51
比較例6	10mM Tris	5.0	0.0%	増幅せず

[0108] 表2に示すように、実施例7～22では、いずれも良好な核酸回収率で核酸を回収できることがわかる。また、実施例7～22では、Ct値が38.0未満であり、Ct値の顕著な増加が見られず、核酸増幅反応が阻害され難いことがわかる。一方、比較例6では、核酸回収率が5%未満であり、核酸回収率が不十分であることがわかる。また、比較例6では、核酸が回収できなかったことに伴い、核酸増幅反応を認めなかった。

[0109] (実施例23～29)

実施例23～29では、洗浄液として、濃度が10mmol/Lであり、pH2.0の塩酸－塩化カリウム緩衝液を用いた。また、実施例23～29では、回収液として、pH8.0であり、濃度が10mmol/L (10mM) であるトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) を用いた。また、実施例23～29では、下記の表3に示す金属カチオンを用いた。結果を下記の表3に示す。なお、下記の表3における回収率及びCt値は、N＝3で測定した3回の平均値である。

[0110] [表3]

	洗浄液組成	洗浄液pH	回収液組成	回収液pH	金属カチオン	回収率	Ct値
実施例23	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	LiCl	5.4%	33.19
実施例24	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	NaCl	45.4%	29.83
実施例25	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	KCl	30.7%	30.46
実施例26	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	RbCl	31.2%	30.38
実施例27	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	CaCl ₂	56.2%	30.38
実施例28	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	MgCl ₂	67.8%	29.17
実施例29	10mM KCl	2.0	10mM Tris	8.0	SrCl ₂	73.7%	29.00

[0111] 表3に示すように、金属カチオンとして、2価のCaCl₂、MgCl₂、SrCl₂を用いた場合により良好な回収率で核酸を回収できることがわかる。

[0112] (参考例)

参考例では、金属カチオン (RNA吸着用金属カチオン) として、NaCl (ナトリウムイオン)、CaCl₂ (カルシウムイオン)、MgCl₂ (マグネシウムイオン)、KCl (カリウムイオン)、LiCl (リチウムイオン)、及びRbCl (ルビジウムイオン) を用いた場合のRNA回収率を比較

検討した。

[0113] 回収率の測定は、実施例1と同じチップ1を用いて、以下のように行った。

[0114] まず、核酸（RNA）を含む試料（ウイルス；5000コピー）1 μ Lを、核酸抽出液（金属カチオン2 mol/L、50 mmol/L Tris-HCl Buffer（pH 8.0）を含む水溶液）60 μ Lに添加し、核酸を抽出した。

[0115] 次に、核酸抽出後の混合液を上流側流路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。

[0116] 次に、洗浄液200 μ L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た。続いて、ヒーターにより80℃、3分の条件で回収部3を加熱し、洗浄液を乾燥させた。なお、洗浄は、1.8 mol/Lのグアニジンチオシアン酸塩、40%エタノール、30 mmol/LのTris-HCl（pH 7.0）を用いた洗浄と、90%エタノールを含む洗浄液を用いた洗浄との2回行った。洗浄液除去後、回収液（1×Master Mix）28 μ L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。

[0117] 結果を図9に示す。図9より明らかなように、金属カチオンとして、2価のCaCl₂及びMgCl₂を用いた場合に回収率をより高められていることがわかる。

符号の説明

- [0118] 1…チップ
2…流路
2a…上流側流路
2b…下流側流路
3…回収部
4…アニオン性吸着体
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