

明 細 書

発明の名称：乾燥濾紙血片を用いた標的核酸の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法に関する。
より詳しくは、本発明は、乾燥濾紙血中の標的核酸を、蛍光色素を用いたりリアルタイムPCRにより検出する方法において、蛍光検出するタイミングをPCRのサイクル開始から遅らせることにより、乾燥濾紙血に含まれる標的核酸を特異的に検出する方法に関する。

背景技術

[0002] 濾紙に血液を含ませた後に乾燥させた濾紙血（以下、乾燥濾紙血あるいは単に濾紙血ということがある）が検体となる新生児スクリーニング検査において、近年遺伝子検査として注目されている先天性疾患として、原発性免疫不全症(Primary Immunodeficiency Disease; PID)や脊髄性筋萎縮症(Spinal Muscular Atrophy; SMA)が挙げられる。

その検査に用いられる乾燥濾紙血には、PCR増幅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、一般には濾紙血から核酸を抽出し精製したものを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、乾燥濾紙血から直接PCR反応を行うことが可能であり、そのPCR増幅産物を電気泳動で検出することにより乾燥濾紙血中の目的遺伝子の有無を確認するという技術が開示されている（特許文献1）。

[0003] しかしながら、このような試薬を用いても、光学的手段を用いてPCR増幅産物を検出する場合には、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的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増幅反応の際に、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濾紙血由来の濾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] 乾燥濾紙血は、濾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切片（本明細書中、乾燥濾紙血パンチ片）ということがある）として取り出された後、標的核酸の検出に使われる。本発明者らは、このようなパンチ片の大きさやパンチ片に含まれる全血量、PCR反応試薬の量を所定の範囲とし、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の工夫により従来のような煩雑な前処理をすることなく、乾燥濾紙血から直接標的核酸をリアルタイムPCRにより増幅し、当該増幅産物を光学的に検出及び定量できる方法を見出し特許出願を行っている（特願2019-166510号）。

[0005] ところで、上記工夫によってもなお、乾燥濾紙血から直接、標的核酸をリアルタイムPCRにより増幅し、増幅産物を光学的に検出及び定量する方法において、乾燥濾紙血中に含まれている夾雑物が要因でベースラインの乱れが生じる場合がある。この傾向は、全血に含まれるヘモグロビンの影響を受け易いと思われる蛍光色素を適用する測定系で特に高い傾向にあった。

ここで、リアルタイムPCRにおいてノイズの多いデータに起因するベースラインの質の低下を防ぐために増幅曲線のベースラインの終点（終止サイクル）を決定する方法が提案されている（特許文献3）。本方法は、増幅曲線の導関数を算出し、得られた一次導関数のピーク解析により増幅曲線を処理することでベースラインの終点を推定する方法である。しかしながら、本方法は複雑なアルゴリズムを実行するための新たなソフトウェアを必要とする。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2004-283165号公報

特許文献2：特許第5144518号公報

特許文献3：特表2008-545380号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、乾燥濾紙血パンチ片中の標的核酸を、蛍光色素を用いたリアルタイムPCRにより検出する方法において、簡易な方法によりベースラインの乱れの影響を軽減する方法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] 本発明では、乾燥濾紙血パンチ片中の標的核酸を、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCRにより検出する方法において、乾燥濾紙血中に含まれている夾雑物が要因で引き起こされる、ベースラインの乱れに対して、蛍光検出するタイミングをPCRサイクル開始よりも遅らせるなど、光学的に検出したデータのうち、所定サイクル数以降のデータを用いて標的核酸の定量解析を行うことにより、便宜上ベースラインの乱れを検出することなく、乾燥濾紙血中の標的核酸を正確に検出及び定量する方法を見出し、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>

以下の工程を含む乾燥濾紙血中の標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法；

(1) 乾燥濾紙血パンチ片及びPCR試薬を含む試料溶液にサーマルサイクルを施すことにより乾燥濾紙血中の標的核酸を増幅する工程であって、PCR試薬が蛍光標識プローブを含むものである、前記工程

(2) サーマルサイクル毎の試料溶液の蛍光強度を光学的に検出する工程

(3) 光学的に検出したデータのうち、所定サイクル数以降のデータを用いて標的核酸の定量解析を行う工程

<2>

前記（３）の所定サイクル数が１０サイクル以上２５サイクル以下である＜１＞に記載の方法。

＜３＞

前記（３）の所定サイクル数以降のデータが、サーマルサイクルの開始より遅れて開始される光学的検出により得られるデータである、＜１＞又は＜２＞に記載の方法。

＜４＞

ＰＣＲ試薬は蛍光標識プローブのほかに、少なくともプライマー、ポリメラーゼ及びｄＮＴＰを含む＜１＞～＜３＞のいずれかに記載の方法。

＜５＞

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、＜１＞～＜４＞のいずれかに記載の方法。

＜６＞

蛍光標識が、５００ｎｍ～６００ｎｍの範囲の蛍光検出波長を有するものである＜１＞～＜５＞のいずれかに記載の方法。

＜７＞

標的核酸が、ＴＲＥＣ、ＫＲＥＣ及びＳＭＮ１からなる群から選ばれる１つ以上の遺伝子の核酸である、＜１＞～＜６＞のいずれかに記載の方法。

＜８＞

（２）のサーマルサイクル毎の試料溶液の蛍光強度を光学的に検出する工程が、サーマルサイクラーに設定された測光パラメーターにもとづく工程であり、サーマルサイクル開始から所定サイクル数は未測光パラメーターが設定され、所定サイクル数以降は測光パラメーターが設定されていることにより、光学的な検出がサーマルサイクルの開始より遅れて開始される工程である、＜３＞～＜６＞のいずれかに記載の方法。

＜９＞

以下の工程を含む乾燥濾紙血中の標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法におけるベースラインの乱れを低減する方法。

(1) 乾燥濾紙血パンチ片及びPCR試薬を含む試料溶液にサーマルサイクルを施すことにより乾燥濾紙血中の標的核酸を増幅する工程であって、PCR試薬が蛍光標識プローブを含むものである、前記工程

(2) サーマルサイクル毎の試料溶液の蛍光強度を光学的に検出する工程

(3) 光学的に検出したデータのうち、所定サイクル数以降のデータを用いて標的核酸の定量解析を行う工程

<10>

前記(3)の所定サイクル数が10サイクル以上25サイクル以下である<9>に記載の方法。

<11>

前記(3)の所定サイクル数以降のデータが、サーマルサイクルの開始より遅れて開始される光学的検出により得られるデータである、<9>又は<10>に記載の方法。

<12>

PCR試薬は蛍光標識プローブのほかに、少なくともプライマー、ポリメラーゼ及びdNTPを含む<9>～<11>のいずれかに記載の方法。

<13>

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、<9>～<12>のいずれかに記載の方法。

<14>

蛍光標識が、500nm～600nmの範囲の蛍光検出波長を有するものである<9>～<13>のいずれかに記載の方法。

<15>

標的核酸が、TREC、KREC及びSMN1からなる群から選ばれる1つ

以上の遺伝子の核酸である、＜ 9 ＞～＜ 1 4 ＞のいずれかに記載の方法。

＜ 1 6 ＞

前記（ 2 ）のサーマルサイクル毎の試料溶液の蛍光強度を光学的に検出する工程が、サーマルサイクラーに設定された測光パラメーターにもとづく工程であり、サーマルサイクル開始から所定サイクル数は未測光パラメーターが設定され、所定サイクル数以降は測光パラメーターが設定されていることにより、光学的な検出がサーマルサイクルの開始より遅れて開始される工程である、＜ 1 1 ＞～＜ 1 5 ＞のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、乾燥濾紙血を前処理することなく直接リアルタイムPCRに供して、乾燥濾紙血パンチ片中の標的核酸を、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCRで増幅し、当該増幅産物を検出する方法において、ベースライン不良による誤判断を防いで検出及び定量することが可能となった。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明のリアルタイムPCRによりRNAseP遺伝子を増幅したときの増幅曲線を示す図である（実施例1）。

[図2]従来のリアルタイムPCRによりRNAseP遺伝子を増幅したときの増幅曲線を示す図である（比較例1）。

発明を実施するための形態

[0011] （乾燥濾紙血）

本発明に用いられる乾燥濾紙血は、濾紙（フィルターペーパー）に全血を含ませた後に乾燥させた濾紙中の血液（全血）であり、単に乾燥濾紙血ということがある。乾燥濾紙血は通常、血液を含ませ乾燥した濾紙から切り出されて紙の切片として使用される。典型的には、穴あけパンチ工具によりパンチ穴形状の切片（パンチ片）として取り出される。血液を含む当該パンチ片形状の濾紙の切片を特に乾燥濾紙血パンチ片という。本発明に用いられる当該パンチ片の大きさは、反応溶液に含まれる血液の量を所定の範囲とするこ

とが望ましく、直径1.2～2.0mmが望ましく、1.5mm～1.8mm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、パンチ片の大きさより換算するとPCR全反応溶液量に対して0.95v/v%～6.6v/v%が望ましく、1.4v/v%～5.2v/v%がよりいっそう望ましい。

本発明に用いられる乾燥濾紙血としては、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濾紙血、同時にオプショナルスクリーニングとして採血された濾紙血などが用いられるがこれらに限定されない。

[0012] (標的核酸)

本発明における標的核酸は、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。

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、より具体的には、TREC、KREC、SMN1、SMN2などの遺伝子由来の核酸が挙げられる。

[0013] (リアルタイムPCR)

PCR法は、標的核酸、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTPs)、一对のプライマーセット及びポリメラーゼの存在下で、変性、アニーリング、および伸長工程からなる温度変化を1サイクルとしてサーマルサイクルを繰り返すことにより、上記プライマーセットで挟まれる標的核酸の領域を指数関数的に増幅させる方法として広く用いられている。サーマルサイクルの回数は、各種試薬や試料、反応時間により適宜変更されるが通常25～40回程度である。

本発明においてリアルタイムPCR法とは、PCR法による標的核酸の増幅産物の生成過程を経時的に光学的手段等によりモニタリングする方法を意味する。

本発明において、サーマルサイクル毎の試料溶液の蛍光強度を光学的に検

出するとは、各サーマルサイクルの終了時点の試料溶液中から産生される蛍光強度を光学的に検出することを意味する。

[0014] 本発明の特徴である「光学的に検出したデータのうち、所定サイクル数以降のデータを用いて標的核酸の定量解析を行う工程」としては、大きく以下の2通りが挙げられる。

(1) 光学的な検出が、サーマルサイクルの開始より遅れて開始され、この遅れた光学的検出により得られるデータを用いて解析を行う工程

(2) サーマルサイクルの開始から蛍光強度の検出を行うものの、サーマルサイクルの開始から所定サイクル数までの検出データはあえて使用せず、所定サイクル数以降の検出データを使って標的核酸の定量解析を行う工程

(1) の「光学的な検出がサーマルサイクルの開始より遅れて開始される」とは、従来はサーマルサイクルの開始と同時に光学的な検出も開始し、1サイクル目の終了時点から蛍光強度の検出が行われていたところ、本発明においてはサーマルサイクルの開始から所定サイクル数まではあえて蛍光強度の検出を行わず、所定サイクル数を越えた時点から蛍光強度の検出を行うことを意味する。所定サイクル数としては、ベースラインが安定化するまでのサイクル数であればよく、使用する蛍光色素の種類や試料中のヘモグロビン量などにより適宜設定すればよい。

(2) の「サーマルサイクルの開始から蛍光強度の検出を行うものの、サーマルサイクルの開始から所定サイクル数までの検出データはあえて使用せず、所定サイクル数以降の検出データを使って標的核酸の定量解析を行う工程」は通常測定終了後に任意にサイクル幅を設定し、ベースラインを補正することによって行われる。

所定サイクル数としては、最大でも25サイクルが望ましく、20サイクル以下が望ましい場合もある。また、前記所定サイクル数は少なくとも5サイクル以上が好ましく、10サイクル以上が好ましい場合もある。以上より、本発明における所定サイクル数としては、5サイクル以上25サイクル以下が好ましく、10サイクル以上25サイクル以下が好ましい場合がある。

- [0015] 本発明のPCR反応におけるサーマルサイクルの条件（温度や時間）は、サーマルサイクラー等を用いて任意に設定することができ、蛍光強度の検出は、サーマルサイクル毎に設定された測光パラメーターにもとづいて任意に制御することが可能である。本発明においては、サーマルサイクル開始から所定サイクル数に未測光パラメーターを設定し、所定サイクル数以降に測光パラメーターを設定することで、光学的な検出をサーマルサイクルの開始より遅れて開始することができる。従って、未測光パラメータとそれに続く所定サイクル経過後の測光パラメータの設定による光学的な検出工程も、本発明の「光学的な検出がサーマルサイクルの開始より遅れて開始される」工程に含まれる。
- [0016] 本発明において、PCR反応により生成した標的核酸の増幅産物は、前記増幅産物から発生する蛍光強度を光学的に検出することにより検出できる。本発明の蛍光検出は、蛍光標識プローブの蛍光物質へ励起光照射をすることによって蛍光が発生し、これを光学的に検出することで増幅された標的核酸を検出又は定量することができる。蛍光標識プローブとしては、TaqMan（登録商標）プローブ、サイクリングプローブ、FRETプローブ等が挙げられる。
- [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] （PCR試薬）
- 本発明に用いられるPCR試薬は、蛍光標識プローブを含み、さらに少なくとも、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）各種を含む。
- 本発明の蛍光標識プローブは、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むことが望ましい。

蛍光標識プローブ用の蛍光色素としては、公知のいずれの蛍光色素でもよく、例えばAlexa Fluorシリーズ、CAL Fluorシリーズ、Cyシリーズ、ATTOシリーズ、DYシリーズ、DyLightシリーズ、Quasarシリーズ、FAM、TAMRA、TET、JOE、VIC、ROX、TexasRed、HEXなどが挙げられるが、特にヘモグロビンが500～600nmの波長を良く吸収することから、蛍光検出波長がこの範囲にある蛍光色素を使用した場合は、より本発明の効果が発揮されるため好ましい。例えば、FAM、TET、CAL Fluor（登録商標）Gold540、JOE、VIC、HEX、CAL Fluor Orange560、Quasar（登録商標）、CyTM3、NED、TAMRA、CAL Fluor Red590、Cy3.5が挙げられる。

また、当該PCR試薬には通常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。

[0019]（標的核酸の定量方法）

本発明の標的核酸の定量方法は、リアルタイムPCRにより乾燥濾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、前記乾燥濾紙血中に含まれる標的核酸を定量することができる。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濾紙血中の全血1μLのコピー数を換算して定量することもできる。

[0020] 本発明の標的核酸の乾燥濾紙血の標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法は、以下の（１）及び（２）の工程を含む。

(1) 乾燥濾紙血パンチ片及びPCR試薬を含む試料溶液にサーマルサイクルを施すことにより乾燥濾紙血中の標的核酸を増幅する工程であって、PCR試薬が蛍光標識プローブを含むものである、前記工程

(2) サーマルサイクル毎の試料溶液の蛍光強度を光学的に検出する工程

(3) 光学的に検出したデータのうち、所定サイクル数以降のデータを用いて標的核酸の定量解析を行う工程

[0021] 上記(1)の工程は、より具体的には、下記(A)～(C)の工程を含む工程であることが望ましい。

(A) PCR反応用のチューブに乾燥濾紙血を添加する工程

(B) PCR反応用のチューブにPCR試薬を添加する工程であって、PCR試薬が蛍光標識プローブを含むものである、前記工程

(C) 乾燥濾紙血パンチ片及びPCR試薬を含む試料溶液に複数のサーマルサイクルを施すことにより乾燥濾紙血中の標的核酸を増幅する工程

[0022] 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、濾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。

また、本発明は、PCR反応において反応チューブをキャップで密閉してからサーマルサイクルを開始することが好ましく、これにより、サーマルサイクル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。

本発明において「サーマルサイクルを施す」とは、温度変化を繰り返し行うことであり、サーマルサイクリングを行うことでもある。また、具体的にはサーマルサイクラーという機器を用いてPCR反応溶液に繰り返し温度変化を付与することである。

[0023] 上記(3)光学的に検出したデータのうち、所定サイクル数以降のデータ

を用いて標的核酸の定量解析を行う工程によりベースラインの乱れを低減することができる。この点において、本発明は、換言すれば乾燥濾紙血中の標的核酸をリアルタイムPCRにより検出する方法におけるベースラインの乱れを低減する方法ともいえる。

ベースラインの乱れが低減される理由は定かではないが、おそらく乾燥濾紙血に含まれる夾雑物質が原因となるノイズや、PCR反応で蛍光標識プローブから産生される蛍光がヘモグロビン蛋白に吸収される程度がサーマルサイクル数に伴い増減し、ベースラインに何らかの変動を引き起こしているものと推察している。本発明によれば、所定サーマルサイクル数の蛍光検出を行わないことにより、前記変動の影響を受けずに正確なベースラインを引くことが可能になったと思われる。

したがって、本発明によれば、乾燥濾紙血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により正確に光学的に検出及び定量することが可能となった。

[0024] (反応チューブ)

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、乾燥濾紙血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、LightCy

cler480 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 μ L, 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(R) 8-Tube Strips (ロッシュ社) などが挙げられる。

これらの反应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。

ここで、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が望ましい。

以下、本発明を実施例にもとづき説明するが、これに限定されるものではない。

実施例

[0025] 〔実施例1〕 蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCR

(a) 試験材料

(a-1) RNase P遺伝子増幅用プライマー

RNase P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。

フォワードプライマー； 5' - GCGGAGGGAAGCTCATCA - 3' (配列番号1)

リバースプライマー； 5' - GTCTGACCTCGCGCGGA - 3' (配列番号2)

[0026] (a-2) RNase P遺伝子検出用プローブ

RNase PのPCR増幅を確認するためのプローブとして、蛍光標識 (FAM) を施した以下の検出プローブを用いた。当該プローブはプライムテック社に合成依頼して作成した。

RNase P遺伝子検出用プローブ；

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

[0027] (a-3)

PCR反応の鋳型として、下記に示すRNase P遺伝子の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用いた。

RNase P遺伝子部分配列（配列番号4）

```
CAACTTAATTTCTGATCATATTTTGTGAATAAAATAAGTAAATGTCTTGTAACAAAATGCTTTTT  
AACATCCATATAAAGCTATCTATATATAGCTATCTATGTCTATATAGCTATTTTTTTTAACTTCCTTTA  
TTTTCCTTACAGGGTTTCAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGTA  
AGTCTGCCAGCATTATGAAAGTGAATCTTACTTTTGTAAACTTTATGGTTTGTGGAAAACAAATGTTT  
TTGAACATTTAAAAAGTTCAGATGTTAAAAAGTTGAAAGGTTAATGTAAACAATCAATATTAAAGAAT  
TTTGATGCCAAACTATTAGATAAAAGGTTAATCTACATCCCTACTAGAATTCTC
```

[0028] (b) PCR試薬

PCR試薬の組成を以下に示す。

PCRバッファー（Ampdirect Plus；島津製作所）

0.125 μ M（終濃度）RNase P遺伝子増幅用フォワードプライマー

0.125 μ M（終濃度）RNase P遺伝子増幅用リバースプライマー

0.125 μ M（終濃度）RNase P遺伝子検出用プローブ

0.025 U/ μ L BIOTAQ HSDNAポリメラーゼ

[0029] (c) コントロール乾燥濾紙血

白血球を除去したヒト赤血球画分と1%BSA（PBSベース）を、6：4の割合で混合した血液に、RNase P遺伝子部分配列を含んだプラスミドを、10,000 copy/ μ Lとなるように添加して、採血用濾紙（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ものを、コントロール乾燥濾紙血とした。

[0030] (d) PCR反応の条件

以下に示す本発明の未測光パラメーターを組み合わせた条件でPCR反応を行った。

(i) 95℃：15分

(ii) 95℃：15秒、63℃：60秒（10サイクル）未測光設定

(iii) 95℃：15秒、63℃：60秒（30サイクル）測光設定

(iv) 37℃：5分

[0031] (e) リアルタイムPCR測定

(e-1) 測定方法

以下の手順で測定した。

(i) コントロール乾燥濾紙血から、パンチャーを用いて直径1.5mm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(R) 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40μLの上記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) サーマルサイクラー装置(LightCycler96; ロッシェ社)を用いて、上記パラメーターにて、RNAse P遺伝子のリアルタイムPCR測定(励起; 470nm/検出; 514nm)を行った。

[0032] (e-2) 測定結果

本発明のPCR反応条件で測定したPCR反応の増幅曲線の結果を図1に示す。20個のパンチ片それぞれを、未測光パラメーターを組み合わせたパラメーターにて測定した結果、後述する比較例1で発生したような乱れを実質的に含まないベースライン補正が良好に行われることが確認された。

このように、乾燥濾紙血中に含まれている夾雑物が要因で引き起こされる、ベースラインの乱れに対して、蛍光検出しないパラメーターを組み込むことで、便宜上ベースラインの乱れが検出されないように設定することが出来た。したがって、本発明方法によれば、乾燥濾紙血中の特定遺伝子を測定する際に、ベースライン不良による再検査の発生頻度を抑え、正確で効率的な定量方法を提供することが可能となった。

[0033] [比較例1] 従来のパラメーターによる蛍光標識プローブを用いたリアルタ

リアルタイムPCR

(a) リアルタイムPCR測定

上記実施例1の(d)PCR反応の条件のパラメータを以下に変更した以外は同じ方法でFAM標識蛍光プローブを用いたリアルタイムPCRを行い、44個のパンチ片についてRNAseP遺伝子の測定を行った。

＜PCR反応条件：従来のパラメータ＞

(i) 95℃：15分

(ii) 95℃：15秒、63℃：60秒（40サイクル）測光設定

(iii) 37℃：5分

[0034] (b) 測定結果

44個のパンチ片について測定したPCR反応の増幅曲線を図2に示す。

44個中6個分の増幅曲線で、装置に組み込まれているベースライン補正機能処理後でもなおベースラインの乱れが見られた。この理由は定かではないが、検体である乾燥濾紙血パンチ片からのヘモグロビン蛋白質の溶出量にも関わっている可能性がある。すなわち、反応初期に蛍光物質であるFAMの蛍光がタンパク質に吸収されたために、蛍光値が一時的に相対的に低くなってしまい、サーマルサイクル数が進むにつれて、ヘモグロビン蛋白質の影響が弱まった場合などが考えられる。このような場合、一過性の蛍光値上昇となり、増幅曲線の矢印部分の時点（サイクル数）で増幅反応が起こったかのように装置の演算部が処理してしまい、C_q値が非常に小さく算出されることになった。

したがって、当該C_p値にもとづき検量線へのあてはめが行われた場合には、検体中の標的核酸濃度は実際の濃度よりも非常に高い濃度であると誤って算出されることになる。

産業上の利用可能性

[0035] 本発明は、乾燥濾紙血パンチ片中の標的核酸を、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCRで検出する方法において、蛍光検出のタイミングをPCRのサーマルサイクル開始より遅らせるなど、光学的に検出したデータの

うち、所定サイクル数以降のデータを用いて標的核酸の定量解析を行うことによりベースライン不良による誤判断を防いで、正確な定量をすることが可能となった。

本発明方法は、特定遺伝子の定量、例えば、P I Dの新生児スクリーニング検査であるT R E C／K R E C遺伝子断片定量方法及びS M Aの新生児スクリーニング検査であるS M N 1 遺伝子定量方法に応用することができる。