

イミダゾリウム側鎖構造のデザインによる 前処理オンサイト DNA 精製担体の性能向上

キーワード：オンサイト核酸精製、イミダゾリウム側鎖構造、PCR

特許情報

発明の名称：核酸抽出用基材、核酸抽出用キット
及び核酸抽出方法

出願人：地方独立行政法人大阪産業技術研究所

出願日：2023 年 3 月 3 日

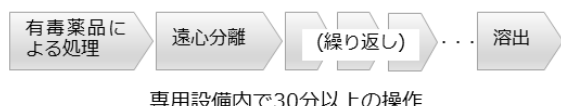
特許出願公開番号：特開 2024-125007

発明者：柿倉 泰明

適用製品

本発明は、遠心機などの大型機器を使えない現場でも、ピペッティング操作で核酸増幅反応の前処理を完了できる基材（吸着体）および方法です。生体試料由来の核酸を吸着させた後、トリス塩酸塩緩衝液などの一般的な緩衝液で溶出が可能です。救急・在宅医療の現場、農畜産や食品衛生、環境水の現場検査、教育用途の簡易 PCR 実験キットなどへの組み込みに適しています。吸着体はシリカゲルなどの多孔質担体にカチオン分子を固定化したもので、チップ充填型や小型カラムといった形状に設計できます。

<従来法の操作イメージ>



<本手法の操作イメージ>

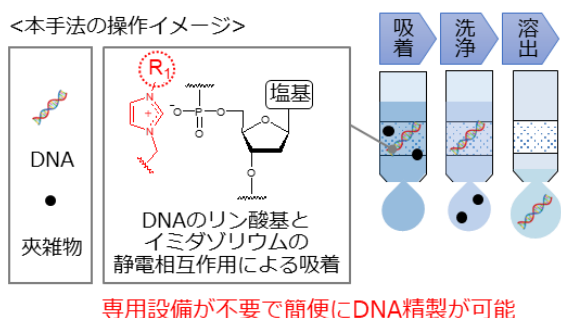


図 1 従来法と本発明の DNA 精製操作の比較
(R₁ = イミダゾリウム側鎖)

発明の概要

本発明は、負電荷側鎖（カルボキシ基またはスルホ基など）を有するイミダゾリウム塩を担体表面に固定化した核酸抽出用吸着体に関するものです。

対照実験のため、カチオン官能基（アミノ基）や中性官能基（メトキシ基）を持つ吸着体を合成し、同一条件での DNA 精製・回収の性能を評価しました。

リアルタイム PCR を用いて DNA 回収量を評価したところ、負電荷側鎖を持つイミダゾリウムで作製した吸着体は中性または正電荷側鎖の場合よりも、少なくとも 1000(=2¹⁰)倍以上回収量が高いことが示唆されました。側鎖長も含めたイミダゾリウム塩の構造について検討した結果、アニオン性官能基、特に短鎖カルボン酸を側鎖に持つイミダゾリウム塩を用いて吸着体を作製した場合に、DNA 精製・回収量が最大になりました。

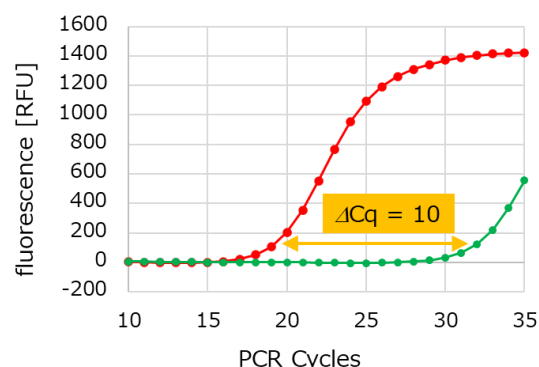


図 2 リアルタイム PCR を用いた側鎖構造の差による溶出量の比較

また、溶出液の組成について検討したところ、濃度が 500 mM のトリス塩酸塩緩衝液(pH 8)において最も DNA 回収効率が高くなり、溶出液をそのまま PCR に供することができました。

本発明による DNA 精製の操作は、①DNA の吸着体への静電的吸着、②水通液による洗浄、③緩衝液を用いた溶出の三行程から成ります。煩雑な機器操作を必要とせず、PCR 阻害の原因となるカオトロピック塩（グアニジン塩酸塩など）やアルコールを使用しないため、偽陰性リスクを低減できます。

* C_q 値＝一定の増幅産物量になるサイクル数。低いほど回収 DNA 量が多いことを示す。また C_q 値が 1 つ違うと、その濃度は 2 倍違うことを意味し、吸着体の DNA 回収性能が高いことを示す。