

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-29010

(P2017-29010A)

(43) 公開日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q	1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2015-149483 (P2015-149483)</p> <p>(22) 出願日 平成27年7月29日 (2015.7.29)</p>	<p>(71) 出願人 000002369 セイコーエプソン株式会社 東京都新宿区新宿四丁目1番6号</p> <p>(74) 代理人 100090387 弁理士 布施 行夫</p> <p>(74) 代理人 100090398 弁理士 大淵 美千栄</p> <p>(72) 発明者 井手上 公太郎 長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内</p> <p>Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 4B063 QQ42 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 凍結乾燥試薬、混合試薬溶液および凍結乾燥試薬の保存方法

(57) 【要約】

【課題】 保存安定性に優れ、かつ、核酸増幅反応において反応阻害が生じにくい凍結乾燥試薬、この凍結乾燥試薬を調製するために用いる混合試薬溶液、および凍結乾燥試薬の保存方法を提供する。

【解決手段】 本発明に係る凍結乾燥試薬は、核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、糖と、を凍結乾燥した核酸増幅反应用の凍結乾燥試薬であって、糖は、凍結乾燥試薬に含まれる固形分濃度に対して72質量%以上86質量%以下である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、糖と、を凍結乾燥した核酸増幅反応用の凍結乾燥試薬であって、

前記糖の質量は、前記凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量に対して 72 質量%以上 86 質量%以下である、凍結乾燥試薬。

【請求項 2】

前記糖は、二糖類または三糖類である、請求項 1 に記載の凍結乾燥試薬。

【請求項 3】

疎水性の液体中で保存される、請求項 1 または請求項 2 に記載の凍結乾燥試薬。

10

【請求項 4】

前記疎水性の液体は、シリコンオイル、ミネラルオイルおよびパラフィンの少なくとも一種を含む、請求項 3 に記載の凍結乾燥試薬。

【請求項 5】

前記糖は、トレハロースを含む、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか一項に記載の凍結乾燥試薬。

【請求項 6】

前記試薬は、逆転写酵素を含む、請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載の凍結乾燥試薬。

【請求項 7】

前記試薬は、ポリメラーゼおよび dNTP を含む、請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の凍結乾燥試薬。

20

【請求項 8】

前記試薬は、プライマーおよびプローブの少なくとも一種を含む、請求項 1 ないし請求項 7 のいずれか一項に記載の凍結乾燥試薬。

【請求項 9】

前記添加物は、前記凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量に対して 77 質量%以上 84 質量%以下である、請求項 1 ないし請求項 8 のいずれか一項に記載の凍結乾燥試薬。

【請求項 10】

核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、糖と、を含む核酸増幅反応用の混合試薬溶液であって、

30

前記混合試薬溶液中における前記糖の濃度は、10%（質量/容量）以上 24%（質量/容量）以下である、混合試薬溶液。

【請求項 11】

請求項 1 ないし請求項 9 のいずれか一項に記載の凍結乾燥試薬を疎水性の液体中で保存する、凍結乾燥試薬の保存方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、凍結乾燥試薬、この凍結乾燥試薬を調製するために用いる混合試薬溶液、および凍結乾燥試薬の保存方法に関する。

40

【背景技術】**【0002】**

生化学の分野において、PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) の技術が確立されている。最近、PCR 法における増幅の精度や検出感度は向上してきており、極微量の検体 (DNA 等) を増幅し、検出・解析することができるようになってきた。PCR は、増幅の対象とする核酸 (標的核酸) 及び試薬を含む溶液 (反応液) に熱サイクルを施すことで、標的核酸を増幅させる手法である。PCR の熱サイクルとしては、2 段階又は 3 段階の温度で熱サイクルを施す手法が一般的である。

50

【 0 0 0 3 】

PCRに用いる核酸増幅反応試薬は、試薬に使用される酵素の保存性能が低く、その長期保存は一般的に非常に困難である。特に、逆転写酵素は、水溶液の状態では4で保存したとしても1日ももたず、活性が低下する。そこで、試薬に添加物を加えて凍結乾燥することで、試薬の保存安定性を向上させることが知られている（例えば、特許文献1参照）。ここでは、反応混合物に対して8～12%（重量/容量）の濃度のトレハロースを含むことにより、凍結乾燥した反応混合物の保存安定性を向上させている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 特許文献1 】 特表2000-514298号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

しかしながら、反応混合物に対してトレハロースを8～12%（重量/容量）含む場合、凍結真空乾燥した反応混合物は、0から10の温度領域では6ヵ月活性を維持するが、15以上と0以下の温度では1ヵ月以内に完全に失活し、さらなる長期の保存安定性のニーズに対応することができない。

【 0 0 0 6 】

一方、試薬の凍結乾燥状態を保持して長期の保存安定性を得るために、凍結乾燥試薬が入ったバイアル瓶を冷蔵庫で保存したり、凍結乾燥試薬の水分子との接触を避けるために、凍結乾燥試薬が入ったバイアル瓶中を窒素置換したり、凍結乾燥試薬と一緒に乾燥剤を同梱することが行われているが、それでも、凍結乾燥試薬中に水分子が吸い込まれることがある。そして、一旦、凍結乾燥試薬中に吸収された水分子は外れることがないため、凍結乾燥試薬であったとしても長期間の保存安定性は得られない。

【 0 0 0 7 】

本発明に係る幾つかの態様は、上述の課題の少なくとも一部を解決することで、保存安定性に優れ、かつ、核酸増幅反応において反応阻害が生じにくい凍結乾燥試薬、この凍結乾燥試薬を調製するために用いる混合試薬溶液、および凍結乾燥試薬の保存方法を提供するものである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、上記課題の少なくとも一部を解決するためになされたものであり、以下の態様または適用例として実現することができる。

【 0 0 0 9 】

[適用例1]

本発明に係る凍結乾燥試薬の一態様は、

核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、糖と、を凍結乾燥した核酸増幅反応の凍結乾燥試薬であって、

前記糖は、前記凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量に対して72質量%以上86質量%以下であることを特徴とする。

【 0 0 1 0 】

上記適用例によれば、凍結乾燥試薬に含まれる添加物の濃度を調整することにより、保存安定性に優れ、かつ、核酸増幅反応において反応阻害が生じにくい凍結乾燥試薬を提供することができる。

【 0 0 1 1 】

[適用例2]

上記適用例において、

前記糖は、二糖類または三糖類であることができる。

【 0 0 1 2 】

10

20

30

40

50

[適用例 3]

上記適用例において、
疎水性の液体中で保存されることができる。

【 0 0 1 3 】

[適用例 4]

上記適用例において、
前記疎水性の液体は、シリコンオイル、ミネラルオイルおよびパラフィンの少なくとも一種を含むことができる。

【 0 0 1 4 】

[適用例 5]

上記適用例において、
前記添加物は、トレハロースを含むことができる。

10

【 0 0 1 5 】

[適用例 6]

上記適用例において、
前記試薬は、逆転写酵素を含むことができる。

【 0 0 1 6 】

[適用例 7]

上記適用例において、
前記試薬は、ポリメラーゼおよび d N T P を含むことができる。

20

【 0 0 1 7 】

[適用例 8]

上記適用例において、
前記試薬は、プライマーおよびプローブの少なくとも一種を含むことができる。

【 0 0 1 8 】

[適用例 9]

上記適用例において、
前記添加物は、前記凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量に対して 7 7 質量 % 以上 8 4 質量 % 以下であることができる。

30

【 0 0 1 9 】

[適用例 1 0]

本発明に係る混合溶液の一態様は、
核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、糖と、を含む核酸増幅反応用の混合試薬溶液であって、

前記混合試薬溶液中における前記糖の濃度は、1 0 % (質量 / 容量) 以上 2 4 % (質量 / 容量) 以下である、混合試薬溶液。

【 0 0 2 0 】

上記適用例の混合試薬溶液に含まれる添加物の濃度を調整することにより、この混合試薬溶液を凍結乾燥して得られた凍結乾燥試薬は、保存安定性に優れ、かつ、核酸増幅反応において反応阻害が生じにくい。

40

【 0 0 2 1 】

[適用例 1 1]

本発明に係る凍結乾燥試薬の保存方法の一態様は、
上記適用例の凍結乾燥試薬を疎水性の液体中で保存することを特徴とする。

【 0 0 2 2 】

上記適用例によれば、含まれる添加物の濃度が調整された凍結乾燥試薬を疎水性の液体中で保存することにより、凍結乾燥試薬が水分子と接触することを防止し、凍結乾燥試薬の保存安定性を向上させることができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 3 】

50

【図1】トレハロースの濃度依存性について、標準条件でリアルタイムRT-PCRを行った結果を示すグラフ。

【図2】トレハロース添加による1週間後の保存安定性について示すグラフ。

【図3】トレハロース添加による1ヶ月後の保存安定性について示すグラフ。

【図4】トレハロースとオイル添加による保存安定性について示すグラフ。

【図5】トレハロース添加による保存安定性について示すグラフ。

【図6】スクロース添加による保存安定性について示すグラフ。

【図7】ラフィノース添加による保存安定性について示すグラフ。

【図8】ポリプロピレン添加による保存安定性について示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

10

【0024】

以下に本発明の好適な実施形態について説明する。以下に説明する実施形態は、本発明の一例を説明するものである。また、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を変更しない範囲において実施される各種の変形例も含む。

【0025】

1. 凍結乾燥試薬

本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、糖と、を凍結乾燥した核酸増幅反応用の凍結乾燥試薬であって、前記糖は、前記凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量に対して72質量%以上86質量%以下であることを特徴とする。以下、本実施形態に係る凍結乾燥試薬に含まれる各成分等について説明する。

20

【0026】

1.1. 反応混合物

本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物を含む。反応混合物は、例えば、滅菌水、蒸留水、イオン交換水等の精製された水、又はそのような水に対して、核酸増幅反応に用いられる試薬を溶解させた水溶液を凍結乾燥したものである。

【0027】

核酸増幅反応に用いられる試薬としては、ポリメラーゼおよびdNTPが挙げられるが、核酸増幅反応用プライマーおよび/または核酸増幅反応用プローブやバッファーを含んでいることが好ましい。また、凍結乾燥した核酸増幅反応試薬は、逆転写酵素を含んでもよい。その場合、逆転写用プライマーは、核酸増幅反応用プライマーと別に含んでもよく、核酸増幅反応用プライマーと共用してもよい。

30

【0028】

ポリメラーゼとしては、特に限定されないが、DNAポリメラーゼが挙げられる。DNAポリメラーゼとしては耐熱性の酵素やPCR用酵素が好ましく、例えば、Taqポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、あるいはそれらの改良型など、非常に多数の市販品があるが、ホットスタートを行えるDNAポリメラーゼが好ましい。

【0029】

dNTPは4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(deoxynucleotide triphosphate)の混合物を表す。つまり、dNTPは、dATP(Deoxyadenosine triphosphate)、dCTP(Deoxycytidine triphosphate)、dGTP(Deoxyguanosine triphosphate)、及びdTTP(Thymidine triphosphate)の混合物を表す。

40

【0030】

逆転写酵素も特に限定されず、例えば、アビアンミエロブラストウイルス(Avian Myeloblast Virus)、ラスアソシエテッドウイルス2型(Ras Associated Virus 2型)、マウスモロニー・ミュリーン・リューケミアウイルス(Mouse Molony Murine Leukemia Virus)、ヒト免疫不全ウイルス1型(Human Immunodeficiency Virus

50

s 1 型) 由来の逆転写酵素などが使用できるが、耐熱性の酵素が好ましい。耐熱性の酵素にも多数の市販品があるので、それを利用することが可能である。

【0031】

ここで、反応混合物に用いられる試薬を水に溶解させて反応液とした場合に、ポリメラーゼ、dNTP、プローブ、プライマー、バッファーおよび塩の濃度は、用いる反応に応じて適宜設定するものとするが、例えば、dNTPを10~1000mM、好ましくは100~500mM、 Mg^{2+} を1~100mM、好ましくは5~10mM、 Cl^{-} を1~2000mM、好ましくは200~700mM、とすれば良く、総イオン濃度は、特に限定されないが、50mMより高い濃度であってもよく、100mMより高い濃度が好ましく、120mMより高い濃度がより好ましく、150mMより高い濃度がさらに好ましく、200mMより高い濃度がさらに好ましい。上限は、500mM以下が好ましく、300mM以下がより好ましく、200mM以下がさらに好ましい。プライマー用オリゴヌクレオチドは、それぞれ0.1~20mMが用いられる。

10

【0032】

1.2.糖

本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、糖を含み、糖は、凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量に対して72質量%以上86質量%以下である。試薬に使用される酵素等は保存性が乏しいため、その活性を長期にわたって維持するために糖を所定量添加し、更に、糖と反応混合物とを含む混合試薬溶液を凍結乾燥する。

【0033】

20

凍結乾燥試薬中に含まれる糖としては、核酸増幅反応に用いられる試薬を凍結乾燥した際に、凍結乾燥した酵素等が失活せず、核酸増幅反応を保持する機能、つまり、保存安定性に優れ、凍結保護剤として機能する糖であれば特に限定されるものではないが、水との親和性が高く、酵素等の他の物質と反応しないものが好ましい。例えば、二糖類および三糖類のうち、非還元糖であるスクロース、トレハロース、ラフィノース、メレジトース等が挙げられる。

【0034】

二糖類および三糖類の中でも、凍結保護剤としての機能が高いため、特にトレハロースを用いることが好ましい。トレハロースは、その強力な水和力により、凍結乾燥試薬が水分子と接触することを防止し、凍結乾燥試薬の保存安定性を向上させる、と推測される。

30

【0035】

本実施形態において、糖の含有量は、凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量(100質量%)に対して72質量%以上86質量%以下であり、好ましくは77質量%以上84質量%以下である。糖の含有量が72質量%以上86質量%以下の場合には、凍結乾燥試薬の保存安定性がよく、凍結乾燥試薬を再溶解して核酸増幅反応を行った際に反応阻害が生じにくい。

【0036】

特に、本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、凍結乾燥試薬に含まれる固形分の全質量(100質量%)に対して72質量%以上86質量%以下という、従来に比べて多量の、凍結乾燥体中の大部分を占める糖を含むことにより、室温においても、長期に渡って凍結乾燥前と同程度の活性を保持することが可能となる。

40

【0037】

なお、凍結乾燥試薬に含まれる糖の濃度は、凍結乾燥前の反応混合物との混合試薬溶液の状態、10%(質量/容量)以上24%(質量/容量)以下となる。好ましくは、13%(質量/容量)以上21%(質量/容量)以下である。凍結乾燥試薬に含まれる糖の濃度が、凍結乾燥前の混合試薬溶液の状態、10%(質量/容量)以上24%(質量/容量)以下の場合には、添加した糖による反応阻害が生じないと同時に、保存安定性に優れ、凍結乾燥後の試薬は活性を維持しつつ長期保存が可能である。

【0038】

1.3.凍結乾燥試薬の調製方法

50

本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、核酸増幅反応に用いられる試薬を含む反応混合物と、所定量の糖とを含む混合試薬溶液を凍結乾燥することにより調製することができる。例えば、核酸増幅反应用容器に、核酸増幅反应用バッファと1反応分の反応混合物と糖を含む混合試薬溶液を入れ、低温低圧で所定時間放置することにより凍結乾燥して、反応混合物と糖とを容器の底に固着させる。この際、核酸増幅反应用バッファの量が少ないほど、試薬が容器の底に小さく硬く固着するようになる。

【0039】

凍結乾燥の温度は特に限定されないが、凍結乾燥させる試薬のコラプス温度よりも低く設定することが好ましく、 -80 以上であることが好ましい。なお、微細孔の平均空隙径は、急速に凍結させた方が小さくなり、微細孔の平均空隙径が小さい方が再溶解性および保存性が良くなる。このため、凍結乾燥の前に、予備凍結として、液体窒素中に保持する等の方法により、凍結乾燥よりも低い温度の液体中に保持し、更に、用いた液体を気化させる工程を経た後に凍結乾燥することが好ましい。

10

【0040】

低圧時の圧力は特に限定されず、 100 mmHg 以下であることが好ましいが、 20 mmHg 以下であることが最も好ましい。低圧に保つ時間も特に限定されず、 $2 - 24$ 時間であることが好ましいが、 8 時間程度であることが最も好ましい。

【0041】

このようにして核酸増幅反应用容器に用いる容器中で混合試薬溶液を凍結乾燥することにより、反応混合物と糖とを容器の底に固着させる。その後、後述するように、疎水性の液体を添加する場合には、容器を満たすように添加するのが好ましい。疎水性の液体としてワックスを使用する場合には、溶融した状態で添加する。オイルを使用する場合には、予めシリカゲルおよび/またはモレキュラーシーブなどで脱水しておくことが好ましく、オイルの添加は、水分が十分に少なく調節されたグローブボックス内などで行うことが好ましい。また、オイルを加えた後、容器を軽く遠心して、気泡を除去しておくのが好ましい。

20

【0042】

1.4. 物性

本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、スポンジ状もしくはケーキ状で、中に気泡がたまっている微細孔（気孔）が沢山ある多孔質であることが好ましく、それによって、凍結乾燥後に再溶解して使用する際の再溶解性が向上する。微細孔の平均空隙径は、急速に凍結させた方が小さくなり、微細孔の平均空隙径が小さい方が溶解性および保存性が良くなる。孔の平均空隙径（例えば、断面の孔の径を顕微鏡下で一定回数計測し、その平均値をとったもの）が $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましく、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることがさらに好ましい。

30

【0043】

1.5. 凍結乾燥試薬の保存方法

上記調製方法により調製された本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、核酸増幅反应用容器に用いる容器中で糖と共に容器の底に固着する。本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、糖を多く含むことにより保存安定性が向上しており、凍結乾燥体のままでも長期の室温の保存に耐え得るものの、更に水分子との接触を排除して長期保存安定性を得るために、反応混合物と糖が底に固着した容器に疎水性の液体を添加することにより、凍結乾燥試薬を疎水性の液体中で保存することが好ましい。これにより、更に凍結乾燥試薬が水分子に暴露されにくくなり、保存安定性能を更に向上させることができる。

40

【0044】

疎水性の液体としては、例えば、オイルやワックスが挙げられる。これらは単独で用いることができるが、例えば、凍結乾燥した凍結乾燥試薬にオイルを加える前に、溶解したワックスを加え、ワックスが固形化した後でオイルを加えることによって、凍結乾燥試薬がオイル中で拡散するのを防ぐことができる。

【0045】

50

ここで、ワックスとは、室温で液体または固体であって、室温で固体の場合には加熱すると液体となる有機物のことであるが、本発明に使用できるワックスは、31以上、好ましくは36以上、より好ましくは41以上、さらに好ましくは46以上であって、かつ100以下、好ましくは90以下、より好ましくは80以下、さらに好ましくは70以下の融点を有し、中性脂肪、高級脂肪酸、炭化水素などからなることが好ましい。ワックスとしては、特に限定されず、例えば、パラフィン、マイクロクリスタリンなどの石油由来のワックス、蜜蝋、ウールワックス、鯨蝋などの動物由来のワックス、カルナバ、ロジン、キャンデリラワックス、木蝋などの植物由来のワックスのほか、エルクリスタ（登録商標、出光興産）、ニッサンエレクトール（登録商標、日油株式会社）、ポエム（登録商標、理研ビタミン）、リケマール（登録商標、理研ビタミン）、ネオワックス（登録商標、ヤスハラケミカ（株））、ハイワックス（登録商標、三井化学）、シリコンワックス（登録商標、東レ・ダウコーニング）などを用いることができる。

10

【0046】

また、オイルの種類は、特に限定されず、ミネラルオイル、シリコンオイル（2CSシリコンオイルなど）、植物油などを用いることができる。

【0047】

中でも、疎水性の液体としては、シリコンオイル、ミネラルオイルおよびパラフィンの少なくとも一種を含むことができる。

【0048】

疎水性の液体は、予め脱水されていることが好ましい。疎水性の液体を予め脱水しておくことにより、更に、凍結乾燥試薬が水分子に暴露されにくくなり、保存安定性能を向上させることができる。

20

【0049】

1.6. 凍結乾燥試薬の再溶解および使用方法

用いた容器がPCR装置などの核酸増幅装置に使用できる場合、この核酸増幅反応用の試薬を有する核酸増幅反応用容器は、そのまま核酸増幅反応に用いることができる。具体的には、増幅させるDNAを含んだ適量の純水またはバッファーが凍結乾燥した試薬を浸すように添加し、核酸増幅反応を始めればよい。純水またはバッファーの量は、塩類などの最終濃度が核酸増幅反応に適するように、容易に決定することができる。なお、反応前に加熱処理や振とう処理をして、核酸増幅反応用の試薬を十分に溶解してもよい。

30

【0050】

凍結乾燥した核酸増幅反応試薬が逆転写酵素を含んでいる場合は、RNAを含んだ適量の純水またはバッファーが凍結乾燥した試薬を浸すように添加してもよく、その場合、逆転写反応を行うことができ、その後に核酸増幅反応を行うことができる。

【0051】

疎水性の液体を含む場合にも上記溶解および使用方法は同じであるが、疎水性の液体としてワックスを用い、固形のワックスが凍結乾燥した核酸増幅反応試薬を覆っている場合には、ワックスが溶解する温度まで加熱し、ワックスを溶解させてから、上述のように核酸を含んだ適量の純水またはバッファーを添加すればよい。この場合には、凍結乾燥試薬が疎水性の液体で保存されている場合であっても、疎水性の液体からの障害を受けることなく反応が起こる。

40

【0052】

なお、凍結乾燥試薬を再溶解させた溶液に含まれる糖の濃度は、凍結乾燥前の混合試薬溶液と同じ容量になるように上記純水またはバッファーを添加した場合、凍結乾燥前の混合試薬溶液と同じように、10%（質量/容量）以上24%（質量/容量）以下となる。再溶解後の溶液に含まれる糖の濃度が10%（質量/容量）以上24%（質量/容量）以下の場合には、核酸増幅反応において添加した糖による反応障害が生じることがない。

【0053】

本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、所定量の糖を含むことにより、凍結乾燥体のままで長期の室温の保存にも耐え得るものであるため、保存後に増幅させるDNAを含んだ適量

50

の純水またはバッファーを添加して核酸増幅反応を行った場合には、反応阻害が生じることなく、凍結乾燥前と同程度の活性を保持している。本実施形態に係る凍結乾燥試薬は、例えば、疎水性の液体との組み合わせにより、20℃の温度で2年近くの保存性能を実現する。

【0054】

2. 実施例

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0055】

2.1. トレハロースの濃度による反応阻害についての検討

まず、核酸増幅反応試薬中に添加したトレハロースがInfAの増幅反応に及ぼす影響について検討した。

【0056】

下記の核酸増幅反応試薬にトレハロースを添加した混合試薬溶液1.6μlを、200μlのエピンドルフ社製のPCRチューブ(核酸増幅反应用容器)内に導入した。混合試薬溶液は、核酸増幅反応試薬にそれぞれ0~800mMに調整したトレハロース水溶液を2μl添加した後に蒸留水を加えて10μlとなるようにして調製した。すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度は0~27.1%(質量/容量)であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度は0~87質量%である。その後、凍結乾燥のため、-80℃のディープフリーザー内で凍結し、十分に凍結したサンプルを、すばやく、凍結乾燥装置内に設置した。続いて、室温において、10Paの減圧環境下、オーバーナイトで凍結乾燥を行った。次に、混合試薬の凍結乾燥体が入ったPCRチューブ内に、インフルエンザAのテンプレートが入った水溶液1.6μlを滴下して凍結乾燥体を再溶解し、その溶液を用いて、下記プロトコルでリアルタイムRT-PCRを行った。

【0057】

< 混合試薬溶液の組成 >

SuperScript III (逆転写酵素)	0.2 μl
バッファー	2 μl
10 mM dNTP	0.25 μl
20 mM フォワードプライマー	0.8 μl
20 mM リバースプライマー	0.8 μl
10 mM プローブ	0.5 μl
0~800 mM トレハロース水溶液	2 μl
infA	0.5 μl
D.W. up to	10 μl

プライマー:

Primer F: GAC CAA TCC TGT CAC CTC TGA C

Primer R: AGG GCA TTT TGG ACA AAG CGT CTA

プローブ:

TaqMan probe: FAM- TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG -TAMRA

【0058】

RT-PCRの条件は、以下の通りである。

逆転写 50 60 秒

増幅反応

変性 105 5 秒

アニーリング/伸張 57 20 秒

変性とアニーリング/伸張: 50 サイクル

液滴サイズ: 1.6 μl

実験装置: 昇降式

【0059】

図1に示すように、添加したトレハロース水溶液の濃度が700mM（凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が23.8%（質量/容量））までの場合には、Ct値にそれほど影響が見られないが、添加したトレハロース水溶液の濃度が800mM（凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が27.1%（質量/容量））の場合はCt値の遅れが顕著に確認され、増幅反応が阻害されることがわかった。これらのことから、混合試薬中に含まれるトレハロース濃度は、凍結乾燥前の溶液の状態では24%（質量/容量）（凍結乾燥体中の濃度では86質量%）以下が好ましいことがわかった。

【0060】

2.2.トレハロースによる保存安定性の検討

次に、凍結乾燥試薬中に含まれるトレハロースの保存安定性について検討した。

10

【0061】

核酸増幅反応試薬にトレハロースを添加した混合試薬溶液1.6μlを、200μlのエッペンドルフ社製のPCRチューブ（核酸増幅反应用容器）内に導入した。その後、凍結乾燥のため、-80のディープフリーザー内で凍結し、十分に凍結したサンプルを、すばやく、凍結乾燥装置内に設置した。続いて、室温において、10Paの減圧環境下、オーバーナイトで凍結乾燥を行った。凍結乾燥直後、凍結乾燥体を30の高温槽に保存し、2日後、1週間後および1ヶ月後に、凍結乾燥体が入ったPCRチューブ内にインフルエンザAのテンプレートが入った水溶液1.6μlを滴下して凍結乾燥体を再溶解し、その溶液を用いて、2.1.と同様の条件でリアルタイムRT-PCRを行った。

20

【0062】

なお、混合試薬溶液の組成は、混合試薬溶液に2μl添加するトレハロース水溶液として100~600mg/mlの濃度のトレハロース水溶液を用いた以外は上記2.1.と同様である。すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度は1.9~13.9%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度は32~78質量%である。

【0063】

凍結乾燥直後と2日後では、いずれの濃度も同様に増幅反応が起こった。これに対し、図2に示すように、1週間保存後の場合は、添加したトレハロース水溶液の濃度が100mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が1.9%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が32質量%では、増幅反応が見られず、保存安定効果が得られなかった。また、添加したトレハロース水溶液の濃度が200、300mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が3.9~6.1%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が50~61質量%では、Ct値に遅れが確認され、保存安定効果が低かった。これに対し、添加したトレハロース水溶液の濃度が400~600mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が8.5~13.9%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が68~78質量%では、高い保存安定効果が得られ、反応阻害も確認されなかった。

30

【0064】

次に、図3に示すように、1ヶ月保存後の場合は、添加したトレハロースの濃度が100~300mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が1.9~6.1%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が32~61質量%では、増幅反応が見られず、保存安定効果が得られなかった。これに対し、添加したトレハロース水溶液の濃度が400~600mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が8.5~13.9%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が68~78質量%では、保存安定効果が得られた。特に、添加したトレハロース水溶液の濃度が500~600mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が8.5~13.9%（質量/容量）であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が68~78質

40

50

量%では、では、反応阻害も確認されず、高い保存安定効果が得られた。

【0065】

以上により、添加したトレハロース水溶液の濃度が400~600mg/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が11.1~13.9%(質量/容量)であり、凍結乾燥後の凍結乾燥試薬中のトレハロース濃度が73.8~78質量%では、高い保存安定効果が得られた。

【0066】

2.3.トレハロースおよびオイル添加による保存安定性の検討

次に、トレハロースを添加した凍結乾燥試薬をオイル中に保存した場合の保存安定性について検討した。

10

【0067】

核酸増幅反応試薬にトレハロースを添加した混合試薬溶液1.6μlを、200μlのエッペンドルフ社製のPCRチューブ(核酸増幅反应用容器)内に導入した。次に、凍結乾燥のため、-80のディープフリーザー内で凍結し、十分に凍結したサンプルを、すばやく、凍結乾燥装置内に設置した。続いて、室温において、10Paの減圧環境下、オーバーナイトで凍結乾燥を行った。その後、凍結乾燥体が入ったチューブ内に粘度が2CSのシリコンオイル(信越化学製)50μlを滴下した。得られた凍結乾燥体を室温に保存し、8ヵ月後、1年後および1年8ヵ月後に、凍結乾燥体が入ったPCRチューブ内にインフルエンザAのテンプレートが入った水溶液1.6μlを滴下して凍結乾燥体を再溶解し、その溶液を用いて、2.1.と同様の条件でリアルタイムRT-PCRを行った。比較として、凍結乾燥していない溶液1.6μlについても同様の条件でRT-PCRを行った。

20

【0068】

なお、混合試薬溶液の組成は、添加するトレハロース水溶液の濃度が1.6mmol/ml、すなわち、凍結乾燥前の混合試薬溶液中のトレハロースの濃度が18.8%(質量/容量)であり、凍結乾燥体中のトレハロース濃度が83質量%となるように調製した以外は上記2.1.と同様である。

【0069】

n=2で実施した実験結果を図4に示す。図4より、1年8ヵ月後であっても凍結乾燥していない溶液と同様に増幅反応がみられ、トレハロースの添加とオイルとを組み合わせることにより、20の温度で約2年間の保存性能を有する可能性が示唆された。

30

【0070】

2.4.トレハロース以外の糖による保存安定性の検討

最後に、トレハロース以外の糖による保存安定性について検討した。

【0071】

核酸増幅反応試薬にトレハロースを添加した混合試薬溶液1.6μlを、200μlのエッペンドルフ社製のPCRチューブ(核酸増幅反应用容器)内に導入した。次に、凍結乾燥のため、-80のディープフリーザー内で凍結し、十分に凍結したサンプルを、すばやく、凍結乾燥装置内に設置した。続いて、室温において、10Paの減圧環境下、オーバーナイトで凍結乾燥を行った。その後、凍結乾燥体が入ったチューブ内に粘度が2CSのシリコンオイル(信越化学製)50μlを滴下した。凍結乾燥直後、凍結乾燥体を30の高温槽に保存し、1週間後および3週間後に、凍結乾燥体が入ったPCRチューブ内にインフルエンザAのテンプレートが入った水溶液1.6μlを滴下して凍結乾燥体を再溶解し、その溶液を用いて、2.1.と同様の条件でリアルタイムRT-PCRを行った。

40

【0072】

なお、混合試薬溶液の組成は、混合試薬溶液に添加する添加物として、トレハロース、スクロース、ラフィノースおよびポリプロピレンを用い、それぞれ混合試薬溶液中の濃度が10%(質量/容量)となるように調製した以外は上記2.1.と同様である。

【0073】

50

図5～8に示すように、凍結乾燥直後では、いずれの例においても同様に増幅反応がみられた。これに対し、図6、7に示すように、トレハロースの代わりにスクロース、ラフィノースを添加した例では、1週間後にCt値の遅れが見られたが、3週間後においても増幅反応が確認された。このように、トレハロースと同じ濃度で実験した場合に、トレハロース程ではないが、スクロースとラフィノースも保存安定効果が得られた。このように、非還元糖であれば、二糖類に限らず三糖類でも添加物として使用可能であることがわかった。

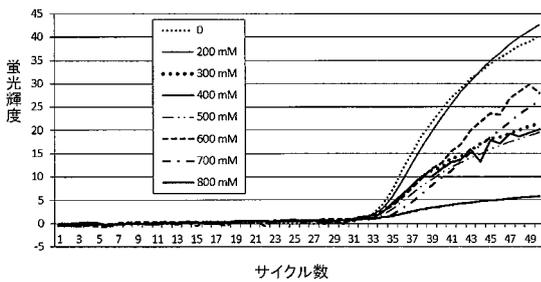
【0074】

なお、図8に示すように、凍結乾燥物の賦形剤として用いられるポリプロピレンを添加した例では、保存1週間後においても試薬の保存性が損なわれていることが顕著に確認されており、他の例のような保存安定効果が見られなかった。

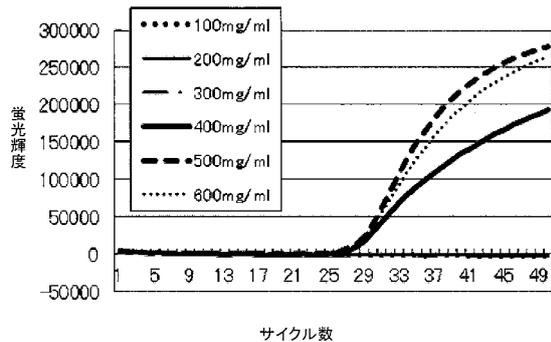
【0075】

本発明は、前述した実施形態に限定されるものではなく、種々の変形が可能である。例えば、本発明は、実施形態で説明した構成と実質的に同一の構成（例えば、機能、方法及び結果が同一の構成、あるいは目的及び効果が同一の構成）を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成の本質的でない部分を置き換えた構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成と同一の作用効果を奏する構成又は同一の目的を達成することができる構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成に公知技術を付加した構成を含む。

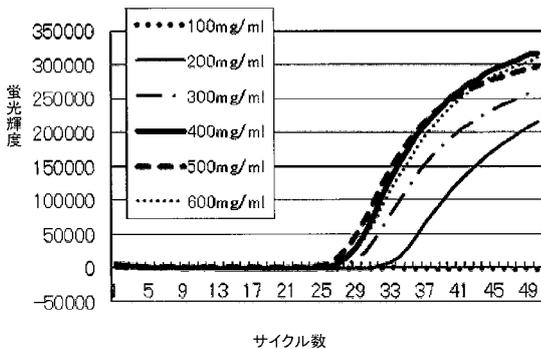
【図1】



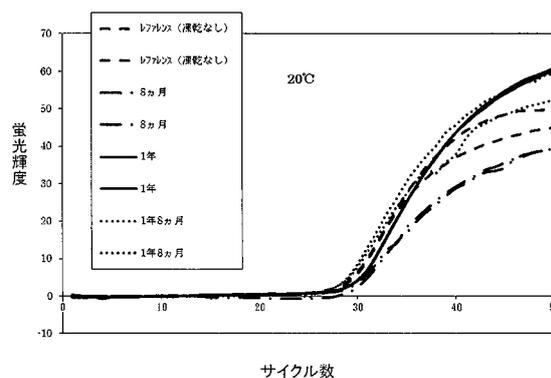
【図3】



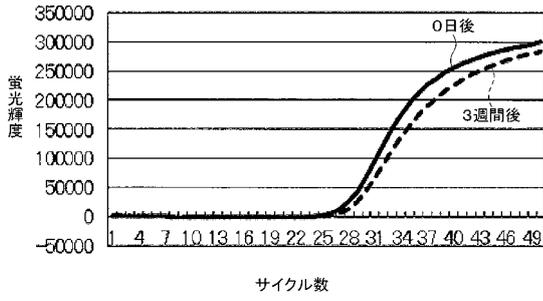
【図2】



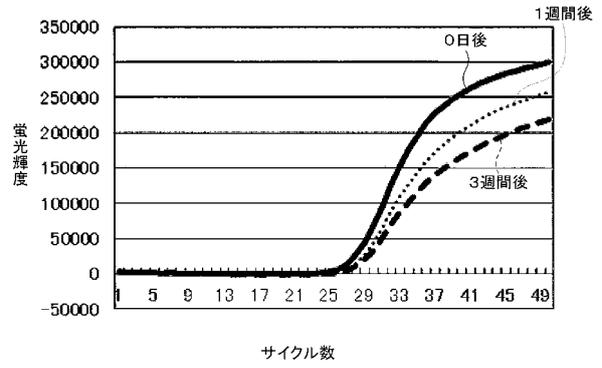
【図4】



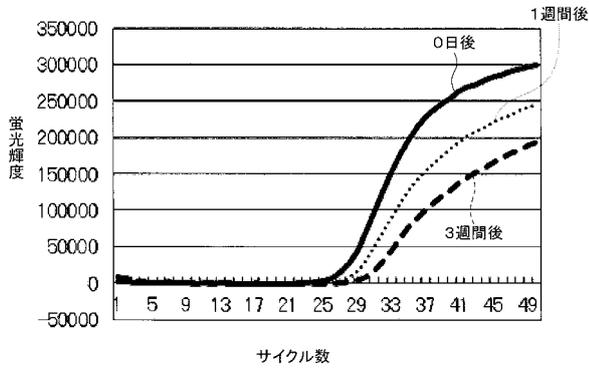
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】

