

参考資料 3

神田芳郎. Hp 欠損症原因遺伝子の同定 (教育講演). 第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会, 日本輸血・細胞治療学会誌, 2008; 54: p137, 福岡. 要旨

教育講演 2

EL-2 ハプトグロビン欠損症原因遺伝子の同定

久留米大学医学部法医学人類遺伝学講座

神田芳郎

TEL : 0942-31-7554 FAX : 0942-31-7700 E-mail : ykoda@med.kurume-u.ac.jp

ハプトグロビン (Hp) はヒトで初めて多型が報告された血清蛋白である。法医学領域では個人識別や親子鑑定に用いられてきたが以前から親子関係が否定される例が散見されていた。我々はそのような家系の遺伝子解析をおこない Hp 遺伝子の完全欠失 (Hp^{del}) の存在をサザンブロット法により同定した。その後日本赤十字中央血液センターとの共同研究で、輸血後抗 Hp 抗体によりアナフィラキシーショックを呈したと考えられる無 Hp 血症患者の遺伝子解析をおこなった結果、これらの患者が Hp^{del} のホモ接合体であることを示した。そこで Hp^{del} の簡便な PCR 法による診断を目的として Hp^{del} 欠失領域のクローニングをおこない、この欠失が Hp 遺伝子の約 5 kb 上流から Hp 遺伝子の下流に存在する、ハプトグロビン遺伝子と高い相同性を示すハプトグロビン関連遺伝子 (Hpr) のイントロン 4 に及ぶことを示した。その結果欠失点をはさんだ領域と Hp 遺伝子のエクソン 1 のデュプレックス PCR 法を用いて 1 回の PCR により Hp^{del} の接合性の診断が可能になった。この方法を利用して日本人集団での Hp^{del} のアレル頻度を調べたところ約 1.5% であったことから、ホモ接合体の頻度は約 4,000 人に 1 人と推定された。日本人以外のさまざまなヒト集団でのスクリーニングの結果、 Hp^{del} はアフリカやヨーロッパ人集団には認められず、東アジア、東南アジア人集団に存在することが示唆された。日本人では血清蛋白欠損の輸血後アナフィラキシーショックのうち Hp 欠損症が最も高頻度に出現し、2005 年度から新たに各種血液製剤の添付資料の「慎重投与の項」に記載されるようになった。現在、臨床現場での利用と世界各地のヒト集団における Hp^{del} の頻度を解析するために、リアルタイム PCR 法を用いた、さらに迅速で簡便な診断法の確立と血液製剤投与前検査の有用性の検討を計画している。

参考資料 4

副島美貴子, 上村繁雄, 神田芳郎. 輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な診断法の確立. 第92次日本法医学会総会. 日本法医学雑誌. 2008; 62: p64, 長崎. 要旨

B210 輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な診断法の確立

副島美貴子, 上村繁雄, 神田芳郎 (久留米大)

血漿タンパク欠損によるアナフィラキシーショックは重篤な非溶血性輸血後副作用であり, 日本人ではハプトグロビン (Hp) 欠損症が最も高頻度に認められる. Hp遺伝子 (Hp) 欠失 Hp^{del} のホモ接合体は先天性Hp欠損症となるが, その頻度は日本人では約4,000人に1人と推定される. 今回臨床現場で利用可能な Hp^{del} の迅速診断法を確立することを目的とし条件検討をおこなった. 【方法】 Hpの遺伝子型が分かっている血液およびゲノムDNAを用い, Hp^{del} とHpの上流域をAmpdirect Plus (島津製作所), TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TAKARA BIO INC.) を用いたduplex PCRにより増幅し, 融解曲線により増幅産物の評価をおこなった. 機器はStepOneリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を用いた. 【結果】 健常者とヘテロ接合体については血液試料を, Hp^{del} のホモ接合体は血液試料を検討できなかったためゲノムDNA試料を用いたが何れも1本のチューブで Hp^{del} あるいはHp上流域の増幅が認められ, リアルタイムPCR機器による融解曲線解析により接合性の判定が可能であった. 【考察】 本法の導入により検査の迅速化と低コスト化, コンタミネーションやサンプルの取り違えの危険性の軽減が期待される. 日本赤十字社による検査では, これまでに調べられたHp欠損症患者はすべて, Hp^{del} のホモ接合体であり, 遺伝子診断によりHp欠損を原因とする血液製剤投与後のアナフィラキシーショックの回避が可能となるものと考え. 今後, 輸血医療現場における本法の臨床応用について検討をおこなう予定である.

副島美貴子, 神田芳郎. Real-time PCRによるハプトグロビン遺伝子型の判定. 日本DNA多型学会第17回学術集会抄録集, 2008, 東京. 要旨

21 Real-time PCRによるハプトグロビン遺伝子型の判定

副島美貴子, 神田芳郎

久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座

【はじめに】ハプトグロビン(Hp)は、*Hp1*と*Hp2*の2対立遺伝子の組み合わせによる3種の表現型からなる多型タンパクである。*Hp2*は*Hp1*の遺伝子内重複によって生じたものでありHp遺伝子型の判定には*Hp2*の重複部位を含む比較的長い領域の増幅が必要である。そこで今回我々はReal-time PCR法を用い迅速で簡便なHp遺伝子型の判定法の確立を試みた。

【材料・方法】プロモーター領域(*Hp5'*)と*Hp2*に特徴的な重複領域(*Hp2*)にそれぞれプライマーとプローブを設定し、*Premix Ex Taq* (Perfect Real Time) (takara社)およびMx3000P (Stratagene社)によりReal-time PCR解析をおこなった。*Hp5'*プローブはCAL Fluor Red 610、*Hp2*はCAL Fluor Orange 560でそれぞれラベルした。リファレンスとして用いた*Hp2/Hp2*サンプルの*Hp2*とコントロール領域である*Hp5'*の閾値に達するまでに要するサイクル数の差(ΔCt)から、各サンプルの ΔCt を減じ $\Delta \Delta Ct$ とした。*Hp2*の*Hp5'*に対する相対的コピー数は $2^{-\Delta \Delta Ct}$ により算出し遺伝子型を決定した。鑄型には遺伝子型が既知のDNAサンプルを使用した。なお、本研究計画は久留米大学倫理委員会の承認を得ておこなった。

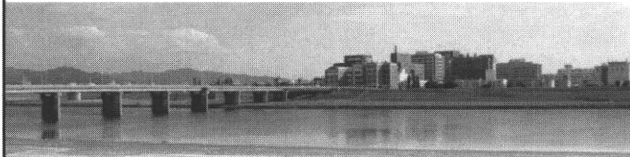
【結果・考察】123サンプルについて解析をおこない、プロモーター領域に対する*Hp2*の相対的コピー数が0.34~0.50であるサンプルを*Hp1/Hp2*、0.79~0.98であるサンプルを*Hp2/Hp2*とした。なお*Hp2*シグナルの得られなかったサンプルは*Hp1/Hp1*と判定した。得られた結果は、従来法によって決定した遺伝子型ならびに表現型と完全に一致した。本法は簡便であり解析に要する時間も短いことから大量解析に適した方法であることが示唆された。


参考資料6

神田芳郎、副島 美貴子、上村 繁雄、岩本 禎彦. ハプトグロビン多型とモンゴル人集団における生活習慣病の相関解析. 第57回日本法医学会九州地方会. 2009; 佐賀

2010/4/4


ハプトグロビン多型とモンゴル人集団における
生活習慣病の相関解析




神田 芳郎¹⁾, 副島 美貴子¹⁾, 上村 繁雄¹⁾, 岩本 禎彦²⁾
¹⁾久留米大, ²⁾自治医大 

Hpの多型

- 1955年
Smithiesにより多型の存在が報告される。
- 主要な表現型
Hp1, Hp2-1, Hp2
- その他の表現型
Hp Johnson, Hp2-1M, Hp0 (Hp^{del})





Hpとさまざまな疾患との相関(1)

- 糖尿病合併症
- 心血管障害 (虚血性心疾患、高血圧など)
- 妊娠高血圧症候群
- 脂肪代謝 (脂肪肝)
- セリアック病
- 感染症 (マラリア、結核、HIV、C型肝炎など)
- がん (頸部腫瘍、乳癌、卵巣癌、白血病など)
- 骨粗しょう症

どれも相関は不確定

KURUME UNIVERSITY

Hpの型判定法

1. 表現型: 電気泳動法、HPLC法、ELISA法
2. 遺伝子型: Southern blot法、PCR法

煩雑

比較的大きな断片の増幅が必要

輸血副作用原因遺伝子

Hp, Hprの構造 (Hp¹, Hp²およびHp^{del})

KURUME UNIVERSITY

Hpとさまざまな疾患との相関(2)

- 疾患との関連解析の効率化
- ↓
- Hpの簡便な型判定法の確立が必要
- ↓
- Real-time PCR (TaqMan) 法の利用
 1. 比較Ct法による主要な遺伝子型の判定
 2. 輸血副作用原因遺伝子 Hp^{del} の検出が可能
(日本DNA多型学会第17回学術集会)

KURUME
UNIVERSITY

方法

比較Ct法 ($\Delta\Delta$ CT法) によるコピー数の定量

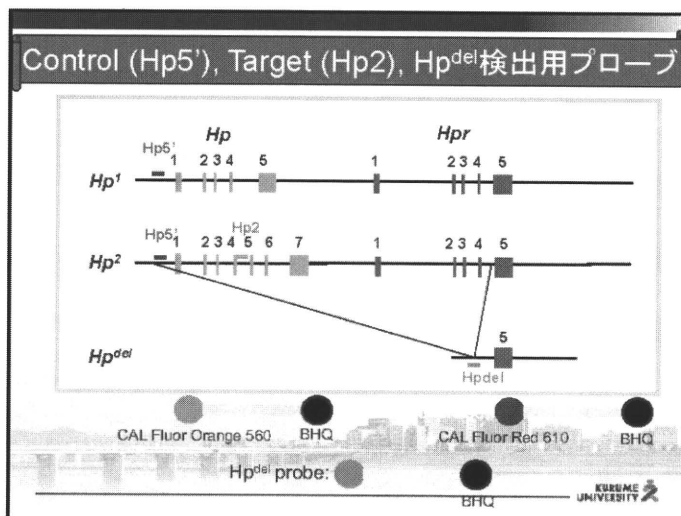
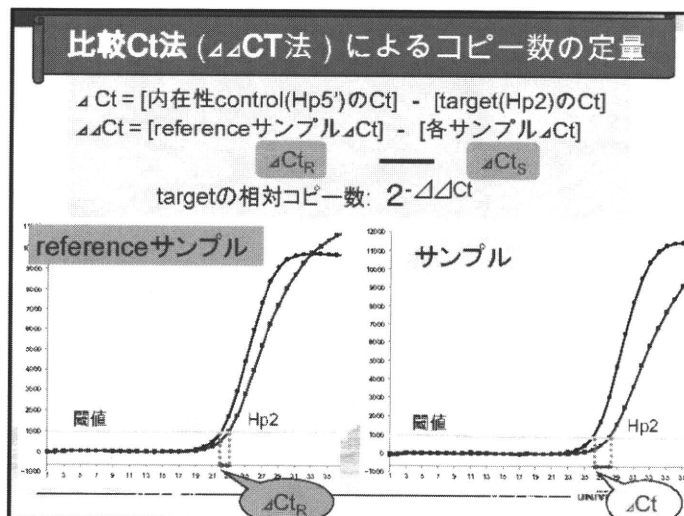
基準となるサンプル
が何サイクル早く、あるいは遅く閾値に到達するかに注目して相対定量する方法

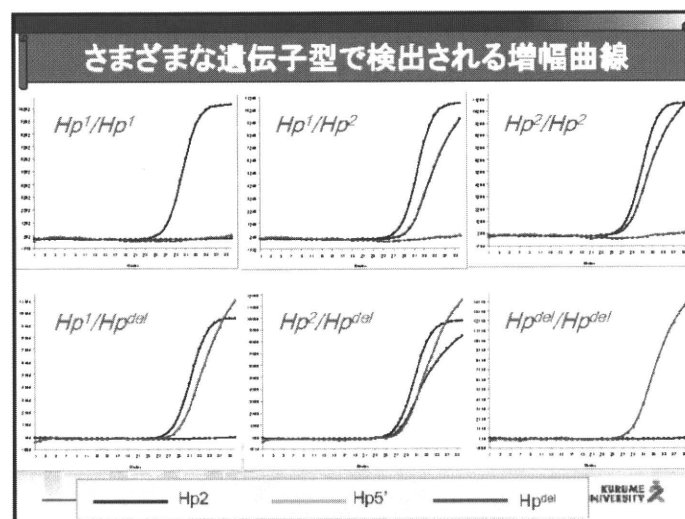
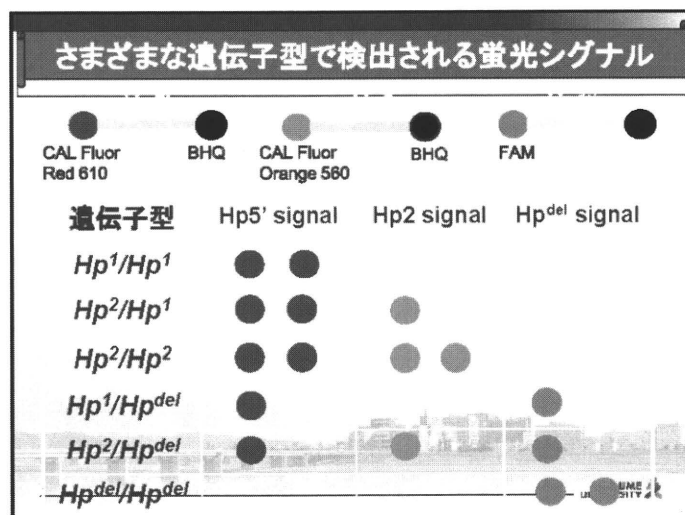
Ct: 閾値に達するまでに要するサイクル数

<条件>

1. target遺伝子と内在性control遺伝子の増幅効率がほぼ等しい
2. 増幅効率が1に近い

KURUME
UNIVERSITY





材料と方法

モンゴル人集団 946サンプル

- インフォームド・コンセントを取り採血、各種測定、検査を実施
- 末梢血からゲノムDNAを抽出
- Hpの遺伝子型判定
 1. コンベンショナルPCR法
 2. Real-time PCR (TaqMan) 法
- 有意差検定には、Fisher's exact test、One-way ANOVAあるいはKruskal-Wallis testを用いた。

結果を比較

モンゴル科学大学・自治医科大学・久留米大学
各大学の倫理委員会の承認

結果(1) モンゴル人946 サンプルのHp遺伝子型

Hp型	サンプル数	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ sample (Hp2:Hp5)の 平均値 ± 標準偏差	データ範囲
Hp ¹ /Hp ¹	70	0 ± 0	0 - 0
Hp ¹ /Hp ²	363	0.49 ± 0.04	0.38 - 0.64
Hp ² /Hp ²	493	1.00 ± 0.08	0.76 - 1.27
Hp ¹ /Hp ^{del}	5	0 ± 0	0 - 0
Hp ² /Hp ^{del}	12	1.01 ± 0.10	0.92 - 1.29
矛盾 Hp ¹ /Hp ³	2	1.02	0.98 - 1.06
Hp ² /Hp ³	1	1.36	1.36

2法で一致

矛盾

Hp2:Hp5' 値が大

KURUME UNIVERSITY

- 2種類のHp遺伝子型の結果は946サンプル中943サンプルで一致した。
- 2法で矛盾するサンプル2つと、real-time PCRでHp2/Hp5'値がHp2/Hp2型よりも大きいサンプル1つが存在し、これらは血清を用いた表現型判定の結果Hp Johnsonアリル(Hp³)のヘテロ接合体であることが示された。(第93次日本法医学会学術全国集会)

2型糖尿病、体格指標、臨床データとの関連解析

結果(2) 2型糖尿病患者の臨床データとHp遺伝子型

	Hp ¹ /Hp ¹	Hp ¹ /Hp ²	Hp ² /Hp ²	その他	P value
男/女(N)	13/14 (27)	53/45 (98)	75/74 (149)	3/4 (7)	0.793
年齢(y)	50.9±11.0	51.3±9.8	53.2±9.1	54.4±14.5	0.217
BMI (kg/m ²)	29.6±5.2	29.7±5.7	29.6±5.5	27.3±2.9	0.995
体脂肪率(%)	37.4±10.2	36.7±9.2	37.1±10.9	35.3±9.8	0.936
ウエスト/ヒップ比	0.92±0.08	0.94±0.08	0.93±0.08	0.91±0.10	0.527
最高血圧(mmHg)	144.8±26.3	145.7±27.6	147.6±29.1	128.6±14.4	0.827
最低血圧(mmHg)	87.8±15.5	87.0±15.5	88.1±14.3	80.4±11.5	0.841
総コレステロール(mg/mL)	200.9±46.7	192.8±39.9	190.6±40.8	184.8±30.7	0.634
HDLコレステロール(mg/mL)	50.1±12.6	49.3±11.6	49.5±10.4	49.4±13.3	0.968
トリグリセリド(mg/mL)	132 (39-1740)	164 (37-1480)	135 (49-1161)	112 (70-168)	0.517
空腹時血糖(mmol/L)	12.1 (5.3-18.9)	11.1 (4.4-27.5)	10.4 (2.7-24.8)	8.6 (7.3-13.6)	0.443
空腹時インシュリン(mU/mL)	16.8 (5.2-88.8)	18.9 (1.6-85.5)	18.1 (1.6-121.0)	16.1 (1.5-29.0)	0.594
アディポネクチン(ng/mL)	21.3 (4.4-86.6)	18.9 (3.1-267.6)	17.6 (1.0-220.6)	13.3 (5.2-38.5)	0.829
フルクトサミン(mmol/mL)	323 (153-516)	368 (225-589)	343 (216-709)	366 (248-529)	0.396

結果(3) 健常者の臨床データとHp遺伝子型					
	Hp/Hp	Hp/iHp	iHp/iHp	その他	P-value
男/女(N)	15/28 (43)	119/146 (265)	134/210 (344)	8/5 (13)	0.247
年齢 (y)	47.6±11.4	50.1±10.6	49.4±10.4	52.2±8.4	0.319
BMI (kg/m ²)	26.3±4.6	26.9±4.9	26.6±4.5	29.0±6.1	0.700
体脂肪率 (%)	36.2±12.6	33.7±9.8	34.7±9.6	36.9±8.6	0.235
ワエスト/ヒップ比	0.80±0.10	0.82±0.11	0.82±0.11	0.80±0.17	0.272
最高血圧 (mmHg)	132.6±22.6	131.5±22.6	130.0±23.1	136.4±34.3	0.649
最低血圧 (mmHg)	83.8±13.3	84.0±14.4	83.6±15.5	85.0±17.7	0.957
総コレステロール (mg/mL)	176.8±37.4	176.8±34.1	180.4±38.3	203.8±42.1	0.592
HDLコレステロール (mg/mL)	53.3±9.6	54.9±11.5	53.8±11.7	56.5±9.4	0.556
トリグリセリド (mg/mL)	101 (32-568)	87 (30-1210)	96 (34-635)	134 (67-292)	0.237
空腹時血糖 (mmol/L)	5.6 (4.6-6.8)	5.5 (4.2-6.9)	5.5 (4.2-6.8)	5.6 (4.4-6.6)	0.921
空腹時インシュリン (mU/mL)	11.6 (2.5-213.0)	11.7 (1.5-87.7)	11.3 (1.0-161.0)	12 (2.86-44.0)	0.792
アディポネクチン (ng/mL)	33.8 (4.3-85.4)	32.3 (2.0-249.5)	34.0 (3.0-103.2)	27.9 (4.81-66.9)	0.891
フルクトサミン (mmol/mL)	238 (206-268)	236 (191-340)	236 (194-307)	227 (205-255)	0.855

2型糖尿病とHp多型との相関

1. 遺伝子型との相関 $p = 0.313$
2. 対立遺伝子頻度との相関 $p = 0.766$
(Fisher's exact test)

⇒ 2型糖尿病とHp多型に相関は認められなかった

本研究で用いたモンゴル人サンプルのHp多型と2型糖尿病をはじめとする各種測定データとの間には有意な相関を認めない。

考 察

- リアルタイムPCR法によるHp遺伝子型判定法は簡便かつ信頼性も高く有用であることが示された。
- 今後さらに多集団、多検体を対象とした相関解析、多型間の機能差について知見を得ることが重要である。



参考資料7

Yoshiro Koda, Mikiko Soejima. GENOTYPING METHOD FOR COMMON POLYMORPHISMS OF HAPTOGLOBIN AND DISTRIBUTION OF H^{PDEL} IN ASIA. XXth Regional Congress of the ISBT, Asia. 2009; 名古屋

GENOTYPING METHOD FOR COMMON POLYMORPHISMS OF HAPTOGLOBIN AND DISTRIBUTION OF H^{PDEL} IN ASIA

Yoshiro Koda, Mikiko Soejima

Forensic Medicine and Human Genetics, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

Background

The haptoglobin gene (*HP*) has two common alleles, HP^1 and HP^2 , that account for three phenotypes, Hp1, Hp2-1, and Hp2. Because HP^2 is generated by an intragenic duplication of HP^1 and *HPR* with high homology to *HP* is located nearby *HP* the genotyping is not easy and time-consuming (Figure 1).

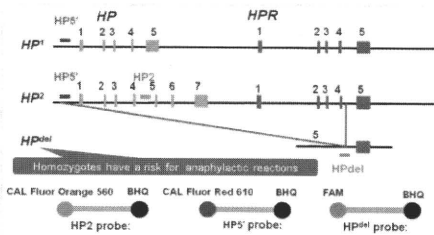


Figure 1. Structure of *HP*, *HPR* (HP^1 , HP^2 , HP^{del}) and position of probes used in this study.

Methods

The ethics committee of Kurume University School of Medicine approved this study. We used TaqMan PCR system for *HP* genotyping based on comparative Ct method that allows us to evaluate the relative number of copies of the HP^2 specific sequence (HP^2) to those of the *HP* promoter region (HP^5), which was used as the internal control (Figure 2). 129 samples of known genotypes were examined by the present method.

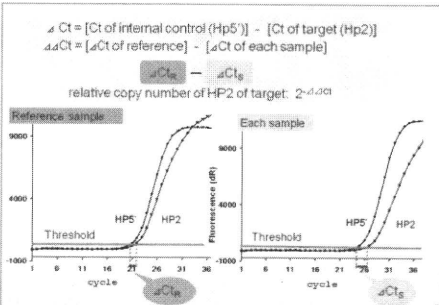


Figure 2. Estimation of copy number of HP^2 by comparable Ct method ($\Delta\Delta Ct$ method).

The position of probes used are shown in Figure 1. In addition to typing of common polymorphisms, the HP^{del} (one of causes for anaphylactic reactions to transfusions due to the production of antihaptoglobin antibodies) probe was also introduced in this PCR system. The expected signals for six genotypes by the triplex PCR are shown in Table 1.

Table 1. Expected fluorescent signals for various *HP* genotypes.

Genotype	HP5 signal	HP2 signal	HPdel signal
HP^1/HP^1	●	●	
HP^2/HP^1	●	●	●
HP^2/HP^2	●	●	●
HP^1/HP^{del}	●		●
HP^2/HP^{del}	●	●	●
HP^{del}/HP^{del}			●

Results

We successfully observed expected signals in six genotype groups by this method (Figure 3). We could simultaneously detect HP^{del} .

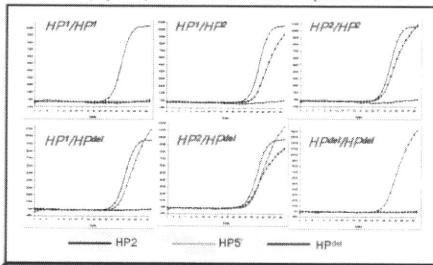


Figure 3. Amplification plots for HP^2 , HP^5 , and HP^{del} .

We then examined 123 DNA samples from Ghanaians whose Hp phenotypes and genotypes had previously been determined and clearly differentiated *HP* genotypes and the obtained results were completely consistent to the previous ones (Table 2).

Table 2. Determination of Hp genotypes of 123 Ghanaians by TaqMan assay.

Genotypes	Number of samples	Total mean HP^2/HP^5 (SD) Range data (the mean of 3 independent experiments)
HP^1/HP^1	35	0 (0)
HP^2/HP^1	57	0.44 (0.036) 0.34 – 0.50
HP^2/HP^2	31	0.88 (0.071) 0.79 – 0.98

The HP^{del} distribute in East Asian (0.8 ~ 3.0%) and Southeast Asian (1.0 ~ 1.5%) populations (Table 3).

Table 3. Allele frequency of the HP^{del} in various populations

Populations	Number of Chromosomes	Number of HP^{del}	HP^{del} frequency (%)	95% CI (%)
East Asians				
Mongolians	238	2	0.8	0.0-2.0
Japanese	1546	16	1.0	0.6-2.3
Han Chinese	569	17	3.0	1.6-4.4
Koreans	314	8	2.5	0.8-4.3
Kiwans	1018	31	3.0	2.0-4.1
Central Asians				
Tibetans	368	0	0	0.0-0.8
Tajiks	306	0	0	0.0-2.8
Uyghurs	152	0	0	0.0-2.6
Southeast Asians				
Indonesians	210	2	1.0	0.0-2.3
Thais	490	8	1.5	0.5-2.7
South Asians				
Bangladeshis	102	0	0	0.0-2.9
Tamils	389	0	0	0.0-2.9
Sinhalese	192	0	0	0.0-2.9
West Asians				
Turks	218	0	0	0.0-1.4
Europeans				
Europeans	250	0	0	0.0-1.5
Africans				
Xhosas	232	0	0	0.0-1.6
Ghanaians	346	0	0	0.0-1.2
Darbais	1188	0	0	0.0-0.3

Summary/conclusions

We successfully developed *HP* genotyping method. This assay produces results in less than 1 hour and is suitable for high-throughput analysis. In addition, this assay is applicable for routine diagnosis prior to transfusions to prevent anaphylactoid shock caused by anti-HP antibodies in Asian populations.



参考資料 8

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金輸血関連研究班第 2 回合同班会議.

2010/4/4

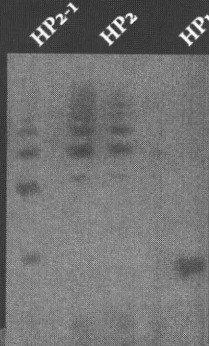
SYBR Green I-based real-time PCR
法によるハプトグロビン欠失アリの診断法の確立とその臨床検体による評価

法医学・人類遺伝学講座
神田 芳郎

血清タンパクハプトグロビン (Hp)

1955年Smithiesにより初めて多型の存在が報告された血清タンパク

法医学では親子鑑定に用いられる。

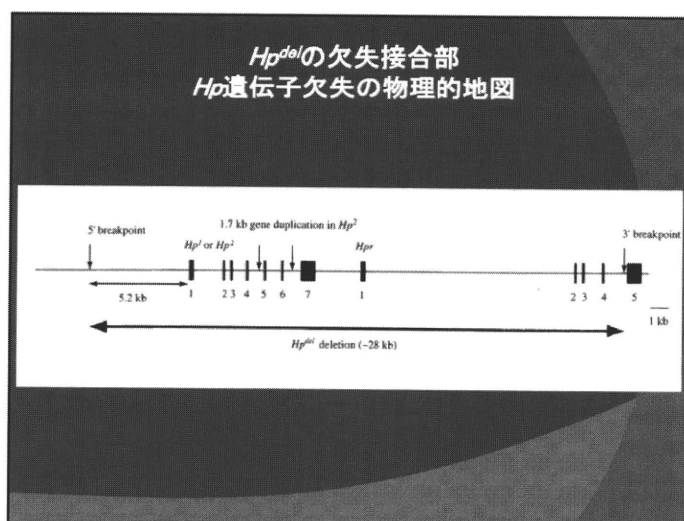


輸血後抗ハプトグロビン抗体による アナフィラキシーショックの2症例

- 症例 1. 33歳の女性。初産、羊水過多、胎児奇形。妊娠第37週にアルブミン製剤投与後にアナフィラキシーショックを発症。翌日子宮切開、死胎児除去術後、濃厚赤血球輸血後再びアナフィラキシーショックを発症。
- 症例 2. 94歳の女性。骨髓異形成症候群。7か月間に3回の濃厚赤血球及び1回の濃厚血小板輸血歴あり。2回目の濃厚血小板輸血後にアナフィラキシーショックを発症。

Hp^{del} の発見(無ハプトグロビン血症)

- The Haptoglobin-Gene Deletion Responsible for Anhaptoglobinemia
Koda Y et al. *Am. J. Hum. Genet.*, 62:245-252, 1998
- Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoglobinemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions
Koda Y et al. *Blood*, 95:1138-1143, 2000



さまざまな集団における Hp^{del} の頻度

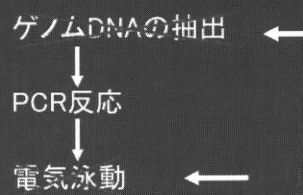
集団	染色体数	Hp ^{del} の数	Hp ^{del} の頻度 (%)	95%信頼区間 (%)
東アジア				
Mongolians	238	2	0.8	0.0-2.0
Han Chinese	568	17	3.0	1.6-4.4
Koreans	314	8	2.5	0.8-4.3
Koreans	1018	31	3.0	2.0-4.1
中央アジア				
Tibetans	364	0	0	0.0-0.8
Tamangs	106	0	0	0.0-2.8
Uygurs	112	0	0	0.0-2.6
東南アジア				
Indonesians	210	2	1.0	0.0-2.3
Thais	400	6	1.5	0.3-2.7
南アジア				
Bangladeshi	102	0	0	0.0-2.9
Tamils	104	0	0	0.0-2.8
Sinhalese	102	0	0	0.0-2.9
西アジア				
Turks	214	0	0	0.0-1.4
ヨーロッパ				
European	200	0	0	0.0-1.5
アフリカ				
Xhosas	202	0	0	0.0-1.5
Ghanaians	246	0	0	0.0-1.2
Gambians	1196	0	0	0.0-0.3

遺伝子頻度から予想されるハプトグロビン欠損症の頻度は4000人に1人と低頻度ではあるが、輸血前血液の診断とドナー血液確保の為のスクリーニングによる、より安全な輸血医療の実現が可能になる。

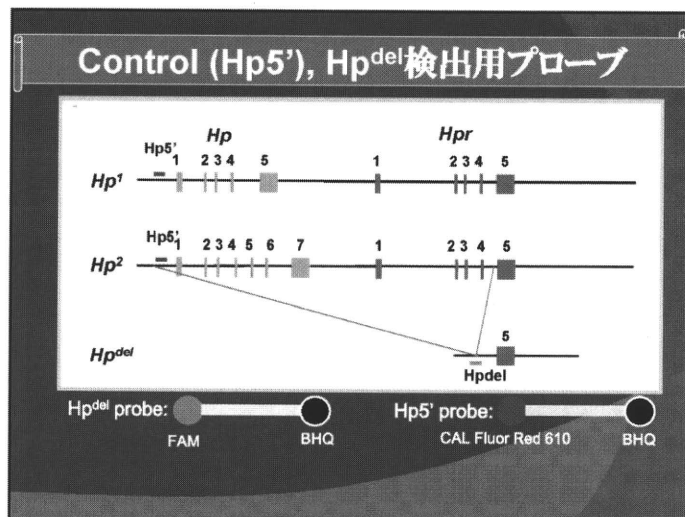
そのためにはより簡便、迅速な Hp^{del} 診断法の確立が必要

簡便、迅速な診断法について

PCR法を用いた診断法



簡便、迅速な診断が可能

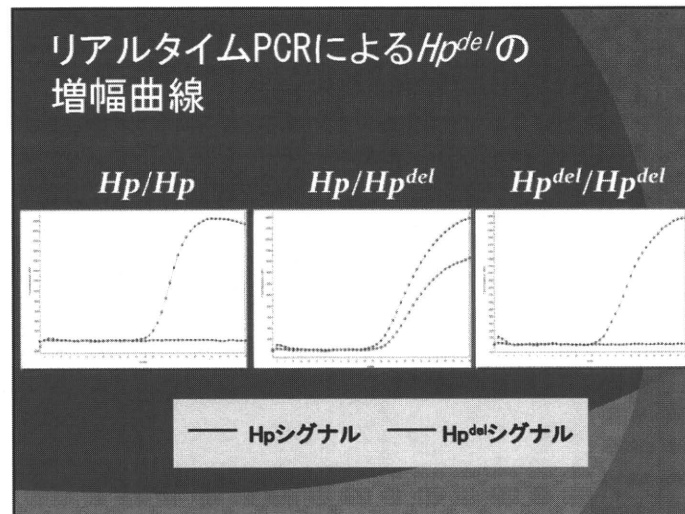


リアルタイムPCRによるHp^{del}の検出法 2つの特異的なプローブ

Hp プローブ
Hp^{del} プローブ

CAL Fluor Red 610 BHQ
FAM BHQ

遺伝子型	検出シグナル
<i>Hp</i> / <i>Hp</i>	● ●
<i>Hp</i> / <i>Hp</i> ^{del}	● ●
<i>Hp</i> ^{del} / <i>Hp</i> ^{del}	● ●

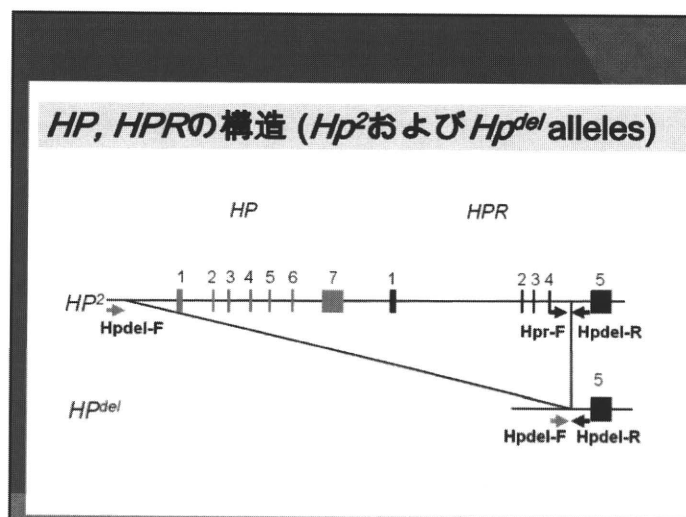


SYBR Greenを用いたreal time PCR

接合性をPCR産物の T_m 値 (PCR産物の半分が1本鎖DNAになる温度) で判定することで1本のチューブで判定が可能。

利点: primer (今回は3種類) のみでprobeを必要としないためコストの削減が可能。

欠点: TaqMan法ほど特異性が高くないため誤判定の危険性が高い。Primer dimerの出現。



方法

- 10 μ l of 1 x SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) (Takara), 75 nM Hpr-F primer, 500 nM Hpdel-690F, 250 nM Hpdel-823R primer, 0.5 μ l of the template (血液ないしはゲノムDNA)
- 95°C, 30 s \Rightarrow 95°C, 5 s and 65°C, 30 s (40 cycles) \Rightarrow 95°C, 1 min, 70°C, 30 s \Rightarrow heat the plate at 0.2°C/s to 90°C
- T_m解析: Mx3000P real-time PCR system, FAM filter set (Agilent)