

## 解析方法

### (1) DNA 抽出

DNA Mini Kit (キアゲン) を用い、血液または唾液より DNA 抽出を行った。唾液については、DNA 濃度が低い場合もあるため、最終容量を  $40\mu\text{l}$  (血液は  $200\mu\text{l}$ ) とした。抽出後、Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いて、DNA 濃度を測定した。

### (2) 変異アレル特異的プライマーを用いた PCR

リバースプライマー 3' 末端にプロテイン S 徳島型バリエーションがくるようにプライマーを設計した。1 箇所の変異のみでは 3' 末端の一塩基ミスマッチを検出できないため、2 塩基目もミスマッチとなるように以下のプライマーを設計した。またプライマーには偽遺伝子 *PROS2P* が増幅されないように *PROS2P* と異なる塩基を含むようにした。Forward primer, A-allele primer および Forward primer, G-allele primer のプライマーを用いて塩基 A および G を検出する PCR 増幅を行った。PCR 産物を LabChip マイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システムまたは 310 ジェネティックアナライザにて解析した。

Forward primer : 5' -AGTGTGAATTTGGTACGTATAA-3'      *PROS1\_a-F*  
A-allele primer : 5' -GCTCTTACCTTTACAATCTTTTC**GT**-3'      *PROS1\_bA-R [FAM]*  
G-allele primer : 5' -GCTCTTACCTTTACAATCTTTTC**GC**-3'      *PROS1\_bG-R [HEX]*

#### PCR 条件 (Ex Taq 使用)

①	94°C	5分	} 35 サイクル
②	94°C	30秒	
	55°C	30秒	
	72°C	1分	
③	72°C	5分	

### (3) シークエンス

(2) の PCR にて G バリエーションが検出された場合、シークエンスにて確認を行った。

プロテイン S 徳島型バリエーションを含み、偽遺伝子 *PROS2P* が増幅されないように設計された以下のプライマーを用いて PCR 増幅し、増幅した PCR 産物を BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit / AB を用いてシークエンス PCR を行った。解析は ABI310 / AB にて行った。

Forward primer : 5' -AGTGTGAATTTGGTACGTATAA-3'      *PROS1\_a-F*  
Reverse primer : 5' -ACAGTGAGCCATGATGGAGC-3'      *PROS1-R*

シークエンスプライマー

*PROS1a-F* : AGTGTGAATTTGGTACGTATAA

#### PCR 条件 (Ex Taq 使用)

①	94°C	5分	} 35 サイクル
②	94°C	30秒	
	55°C	30秒	
	72°C	1分	
③	72°C	5分	