

1 M Tris-HCl, pH9.5	100 ml	
5 M NaCl		20 ml
H ₂ O	855 ml	
2M MgCl ₂		25 ml

mix this order

Stripping solution (0.2N NaOH, 0.1% SDS)

NaOH	8g
H ₂ O	990 ml

↓
stir
↓
add 10 ml of 10% SDS

現在 SRSV の検出に用いられている主なプライマー

プライマー	塩基配列 (5' - 3')	sence	
35 a	ctt gtt ggt ttg agg cca tat	-	First PCR
35'	ctt gtt ggt ttg agg cca ta	-	-
36 a	ata aaa gtt ggc atg aac a	+	First PCR
NV81 a	aca atc tca tca tca cca ta	-	Second PCR
NV82 a	tca ttt tga tgc aga tta	+	Second PCR
SM82	cca cta tga tgc aga tta	+	Second PCR
SR33 b	tgt cac gat ctc atc atc acc	-	G1, G2
SR46 b	tgg aat tcc atc gcc cac tgg	+	G2
SR48 b	gtg aac agc ata aat cac tgg	+	G1
SR50 b	gtg aac agt ata aac cac tgg	+	G1
SR52 b	gtg aac agt ata aac cat tgg	+	G1

サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブ

プローブ	塩基配列 (5' - 3')	プローブ
SR47d b	atg tca ggg gac agg ttt gt	P2B
SR61d b	atg tcg ggg cct agt cct gt	P2A
SR63d b	aca tca gga gag tgc cca ct	P1A
SR65d b	aca tca ggt gat aag cca gt	P1A
SR67d b	aca tct ggt gag aga cct ga	P1B
SR69d b	aca tcg ggt gat agg cct gt	P1A
96065d c	aca tcg ggt gac aat cca ga	new type
SOV	Southampton の相当部位	

文献

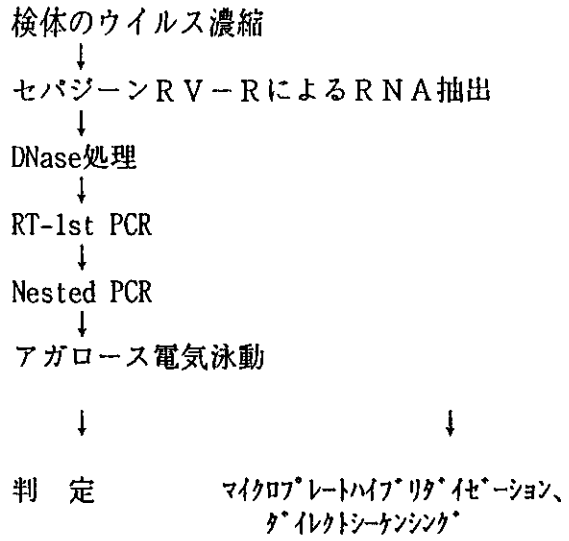
a :J. Virol. 68: 5982-5990 (1994)

b :J. Clin. Microbiol. 33:64-71 (1995)

c :入谷展弘他、第 45 回日本ウイルス学会 (1997)

Dig 標識プローブの作製上の注意点 : Dig は各オリゴプローブ 5'末に標識するほうが安価である。また、理由ははっきりしていないが他所でタカラにて合成標識したオリゴプローブはハイブリダイズがうまくいっていない。

当所ではベーリンガー/日本遺伝子研究所で合成標識している。しかし一度にたくさん注文した時などにプローブがコンタミしていたことがあった。



[かき中腸腺のウイルス濃縮]

- ① 中腸腺10個程度をストマッカー用滅菌ポリ袋に入れ、秤量する。
- ② 9倍量のPBS(-)および四分の一量のダイフロンを加える。
- ③ ストマッカーに約3分間かける。
- ④ 3,000rpm、15分、冷却遠心。
- ⑤ 遠心上清にPEG 6,000(最終濃度8%) NaCl(最終濃度0.5M)を添加。
- ⑥ 十分に攪拌後、4℃に一夜放置する。
- ⑦ 10,000rpm 60分、冷却遠心。
- ⑧ 上清を捨て、沈渣にPBS(-)10ml、ダイフロン5mlを加え再浮遊する。
- ⑨ ストマッカー用滅菌ポリ袋に移し、ストマッカーに約3分間かける。
- ⑩ 3,000rpm、15分、冷却遠心。
- ⑪ 上清を40%蔗糖液3mlに重層し、27,000rpm 3時間、超高速冷却遠心。
- ⑫ 沈渣に蒸留水400 μ l、ダイフロン400 μ lを加え再浮遊する。
- ⑬ 微量遠心管に移し、9,000rpm、5分、冷却遠心。
- ⑭ 上清を新しい微量遠心管に移し、濃縮材料とする。



RNA抽出

[糞便のウイルス濃縮]

- ① 滅菌蒸留水にて糞便を10%乳剤にする(乳鉢、海砂)。
- ② 10%乳剤を高速遠心管に移し、四分の一量のダイフロンを加える。
- ③ 蓋をして、十分に攪拌する。
- ④ 10,000rpm 30分冷却遠心。
- ⑤ 上清を40%蔗糖液2mlに重層し、40,000rpm 90分超高速冷却遠心。
- ⑥ 上清を捨て、沈渣を蒸留水300 μ lに再浮遊する。



RNA抽出、電子顕微鏡試料

セバジーンRV-RによるRNA抽出

日付 ()

1.5mLチューブに試薬(1) 300 μ Lを入れる
↓
EM用検体 50 μ Lを入れる
ボルテックス, spindown
↓
試薬(2) 300 μ L, 試薬(3) 600 μ Lを入れる
ボルテックス
↓
-40 $^{\circ}$ Cで5~10min
↓
12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15min遠心
↓
(別の1.5mLチューブにイソプロピルアルコール600 μ L分注)
↓
上層600 μ Lをイソプロ入りのチューブに入れ, 上下転倒混和
↓
-40 $^{\circ}$ C, 30min
↓
12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15min遠心
↓
上清を捨て, 70%エタノール400 μ Lを入れる(混ぜない)
↓
12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min遠心
↓
上清を完全に捨て, ふたを開け風乾(室温30min程度)
↓
DEPC-DW30 μ Lに溶解, ボルテックス, spindown

S R S V の R T - P C R

date()

DNase処理

	1検体	n検体	備考
DNase I (1unit/ μ l, ニッポノジーン)	1		
×5Ampdirect (島津)	10		
RNasin(40unit/ μ l, TOYOBO)	1		

0.5ml tubeにミツル材1滴滴下後、12 μ lずつ分注、抽出RNAを5 μ l分注
37℃、10min → 65℃、5min、氷冷、spindown

RT-1st PCR

	1検体	n検体	備考
Premix液	8		
dNTPs mix(0.5mM each, タカラ)	4		
NV-35(20 μ M)	1		
NV-36 (20 μ M)	1		
MR-3 (20 μ M)	1		
MR-4 (20 μ M)	1		
Oligo(dT) (0.5 μ g, Gibco)	1		
DEPC-DW(Research Genetics)	23.4		
ExTaq (5U/ μ l, タカラ)	0.5		
MMLV Rtase (200U/ μ l, TOYOBO)	0.1		

DNase処理後の0.5ml tubeに1stPCRプレミックスを33 μ lずつ分注後、
spindown → RT-1st PCR反応

Nested PCR

	1検体	n検体	備考
Premix液	43.5		
dNTPs mix	4		
NV81(20 μ M)	1		
NV82(20 μ M)	0.5		
SM82(20 μ M)	0.5		
DEPC-DW	37.5		
×10 EX Taq buffer (タカラ)	5		
ExTaq	0.5		

もしくは

Yuri22F(20 μ M)	1		
Yuri22R(20 μ M)	1		

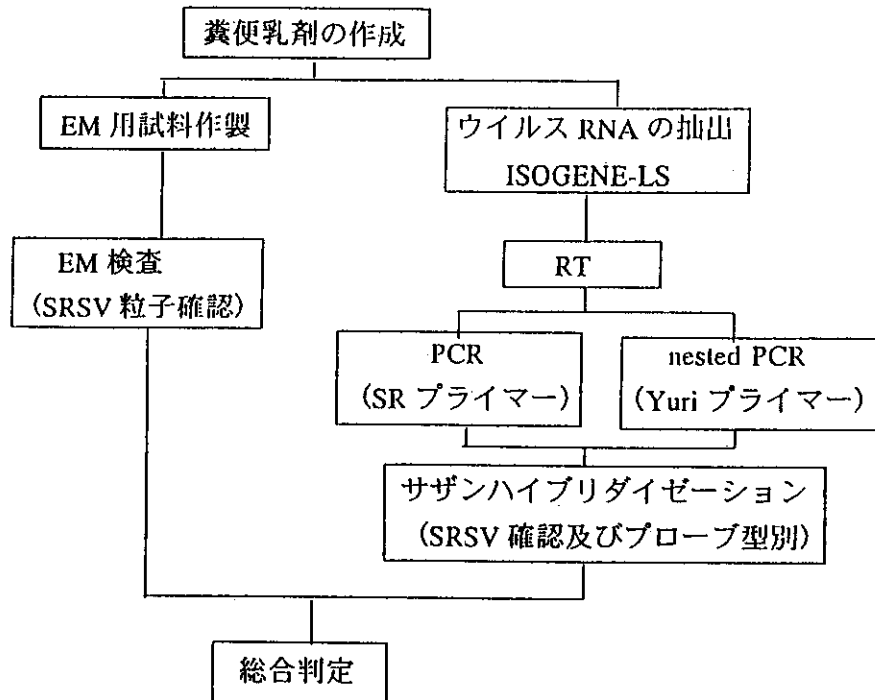
0.5ml tubeにミツル材1滴滴下後、49 μ lずつ分注、spindown
RT-1stPCR産物を1 μ l分注 → Nested PCR反応

P C R 反応条件

RT-1st PCR	Nested-PCR
37℃ 60min → 94℃ 3min	94℃ 3min
94℃ 1min 45℃ 1min 72℃ 1min	94℃ 1min 50℃ 1min 72℃ 1min
40回	40回
72℃ 15min → 4℃	72℃ 15min → 4℃

SRSV 検査のフローチャート

1. 糞便材料からの SRSV 遺伝子の検出



RT-PCR法 (nested PCR)

抽出RNAの熱処理 65℃ 5min.
 94℃ 3min.
 on the ice

RTの反応液の組成 (1検体あたり)

DW	8.6 μ l
5×RT buffer	5
MMLV-RT (200U/ μ l)	0.25
dNTPs (2.5mM)	5
RNase inhibitor (20U/ μ l)	0.15
Primer MR4 (50 μ M)	1

Sample RNA	5
Final volume	25

RTの条件

37℃ 30min.
99℃ 5min.

1st PCR反応液の組成 (1検体あたり)

DW	35 μ l
10×Reaction buffer	4
Taq DNA polymerase (5U/ μ l)	0.5
Primer MR3 (50 μ M)	0.5

cDNA	10
Final volume	50

1st PCRの条件

94℃ 2min.
94℃ 30sec. }
50℃ 60sec. } 5 cycles
60℃ 90sec. }
94℃ 30sec. }
50℃ 30sec. } 30 cycles
72℃ 60sec. }
72℃ 10min.

2nd PCR反応液の組成 (1検体あたり)

DW	38.5 μ l
10×Reaction buffer	5
Taq DNA polymerase	0.5
dNTPs (2.5mM)	4
Primer YURI 22F (50 μ M)	0.5
Primer YURI 22R (50 μ M)	0.5

1st PCR product	1
Final volume	50

2nd PCRの条件

94℃ 2min.
94℃ 30sec. }
50℃ 30sec. } 30 cycles
72℃ 60sec. }
72℃ 10min.

RT-PCR 法 (SR プライマー)

RT 反応液の組成 (1 検体あたり)

DW	13.9 μ l
10 \times RT buffer	2.5
2.5mM dNTPmix	2
RT (AMV)	0.2
RNase inhibitor	0.2
Primer SR33 (50 μ M)	1.25

Sample RNA	5
Final volume	25

PCR 反応液の組成 (1 検体あたり)

	(Genogroup 1 用)	(Genogroup 2 用)
DW	32.2 μ l	33.2 μ l
10 \times Reaction buffer	4	4
2.5mM dNTPmix	2	2
Taq. DNA polymerase	0.3	0.3
Primer SR48 (50 μ M)	0.5	-
SR50 (50 μ M)	0.5	-
SR52 (50 μ M)	0.5	-
Primer SR46 (50 μ M)	-	0.5

cDNA	10	10
Final volume	50	50

RT, PCT の反応条件

RT の条件	42 $^{\circ}$ C	60min.	
	95 $^{\circ}$ C	5min.	
PCR の条件	94 $^{\circ}$ C	2min.	} 35 cycles
	94 $^{\circ}$ C	30sec.	
	50 $^{\circ}$ C	60sec.	
	72 $^{\circ}$ C	60sec.	
	72 $^{\circ}$ C	10min.	

Electrophoresis

2% Agarose ME or 3% Nusieve 3:1 Agarose

Southern Blotting

stained gel

↓
50ml of denaturation solution, 30 min, gentle shake □(: - :)

↓
50ml of neutralization solution, 30 min, gentle shake □(: - :)

↓
transfer DNAs to nylon membrane using vaccum blotter under 5 inch Hg for 45 min

↓
rinse membrane in 5x SSC

↓
UV crosslinking (150mJ, 3 times)

↓
dry and store at 4C

Dot Blotting

PCR products 4 μ l in micronic tube

↓
add 650 μ l of denaturation solu.

↓ stand 10min.

rinse membrane with 5xSSC

set membrane in dot blotter

↓
dispense 150 μ l of denatured PCR products into well of the blotter

↓
aspiration

↓
lay the membrane on filter paper immersed neutralization solu.

↓
UV crosslinking (150mJ, once)

↓
rinse the membrane with 5xSSC

↓
dry and store at 4C

Hybridization

rinse membrane in 5xSSC

↓

transfer membrane into Hybri-bag

↓

add 15ml of Prehybridization solution

↓

↓ 58C for >3 hours (: - :)

↓

discard Prehybridization solution

↓

add 15ml of Hybridization solution

↓

↓ 58C for >6 hours (: - :)

↓

recover Hybridization solution, and store at -20C

↓

1st Wash

↓

50ml of 2x Wash solution, shaking 5 min. at RT, twice (: - :)

↓

(: - :)

2nd Wash

↓

50ml of 0.5x Wash solution, shaking 5 min. at RT, twice (: - :)

↓

(: - :)

Detection:

50ml of G-buffer-1, shaking 1 min. (: - :)

↓

25ml of G-buffer-2 (blocking solution), shaking 30 min. (: - :)

↓

25ml of anti Dig-AP 1:10000 in G-buffer-2, (ul of @Dig-AP / ml of G-b-2)
shaking 30 min. (: - :)

↓

washing with 50ml of G-buffer-1, shaking 15 min. twice

↓

(: - :)

↓

(: - :)

rinse in 50ml of G-buffer-3, shaking 2 min. (: - :)

↓

CSPD 1:100 in G-buffer-3 on Parafilm (ul of CSPD / ml of G-buffer-3)
lay membrane (DNA side down) on CSPD, stand 5 min. (: - :)

↓

drip off excess liquid, seal membrane between OHP film,

↓

incubate at 37C, 5 min. (: - :)

↓

exposure for 20 min. to X-ray film (: - :)

Stripping and reprobing:

rinse membrane in dw

↓

50ml of Stripping solution, shaking 15 min at 37C, twice

↓

□ (: - :)

↓

□ (: - :)

rinse in 2x SSC

↓

prehybridization and next probe

< Reagents >

Denaturation solution (0.5N NaOH, 1.5M NaCl)

NaOH (mw=40.0)	20g
NaCl (mw=58.44)	87.7g
dw	up to 1 liter(ca 970ml)

Neutralization solution (1.0M Tris-HCl,pH7.5, 1.5M NaCl)

1 M Tris-HCl, pH7.5	500ml
5 M NaCl	300ml
dw	up to 1 liter

20x SSC (3 M NaCl, 0.3M Sodium citrate)

NaCl (mw=58.44)	175.3g
Trisodium Citrate Dihydrate (mw=294.1)	88.23g
dw	up to 1 liter

Prehybridization solution

(5xSSC, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS, 1%(w/v) Blocking reagent)

20x SSC	250ml
N-lauroylsarcosine	1g
10% SDS	2ml
dw	700ml

↓ stir

Blocking reagent	10g
------------------	-----

↓ stir at 50C

dw	up to 1 liter
----	---------------

↓

aliquot 50ml each and store -20C

Hybridization solution

(10 pmole/ml Digoxigenin labeled probe / prehybridization solution)

50uM DIG-probe	5ul
prehybridization solution	25ml

2x Wash solution (0.3xSSC, 0.1% SDS)

20x SSC	15ml
10% SDS	10ml
dw	up to 1 liter

0.5x Wash solution (0.075xSSC, 0.1% SDS)

20x SSC	3.75ml
10% SDS	10ml
dw	up to 1 liter

G-buffer-1 (100mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl)

neutralization solution	100ml	50ml
dw	900ml	450ml

G-buffer-2 (100mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 2% Blocking reagent)

G-buffer-1	1 liter
Blocking reagent	20g

↓ stir and heat at 60C
aliquot and store at -20C

G-buffer-3 (100mM Tris-HCl, pH9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl)

1 M Tris-HCl, pH9.5	100ml	50ml
5M NaCl	20ml	10ml
dw	855ml	427.5ml
2M MgCl ₂	25ml	12.5ml

2.0M Tris-HCl, pH7.5

Tris (mw=121.14)	242.28g
dw	700ml

↓ stir and adjust pH to 7.5 with HCl (ca 120ml)

dw	up to 1 liter
----	---------------

1.0M Tris-HCl, pH9.5

Tris (mw=121.14)	121.14g
dw	800ml

↓ stir and adjust pH to 9.5 with HCl (ca 7 ml)

dw	up to 1 liter
----	---------------

5 M NaCl

NaCl (mw=58.44)	292.2g
dw	up to 1 liter

2 M MgCl₂

MgCl ₂ ·6H ₂ O (mw=203.30)	81.32g
dw	up to 200ml

Stripping solution (0.2N NaOH, 0.1% SDS)

NaOH	8g
dw	990ml

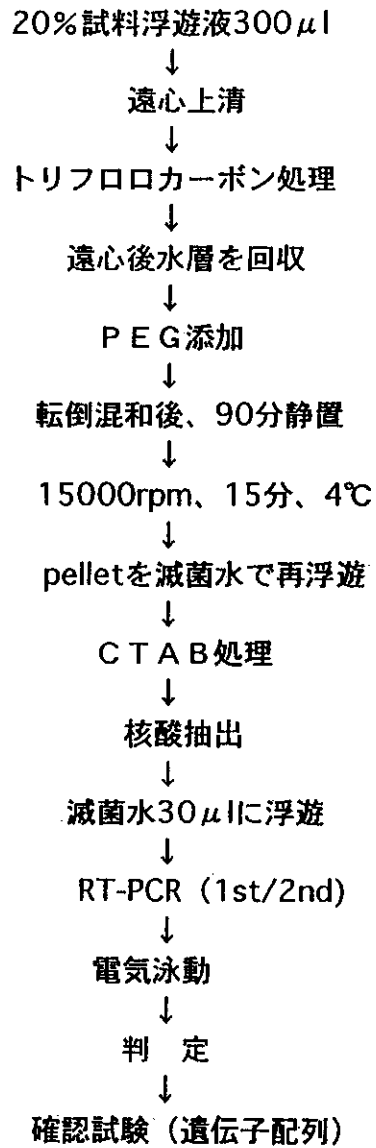
add 10ml of 10% SDS

KIT and REAGENTS

DIG Luminescent Detection Kit 50 回分	Boehringer Mannheim, 1 363 514	¥55,100
X-ray film Hyper film MP	Amersham #RPN1677H	
Hybridization bag ハイブリバック 50 枚	コスモ・バイオ S-1001	¥2,100
ハイブリバック・ソフト	S-1021	¥2,100
Nylon membrane Hybond-N+ 10 枚	Amersham #RPN2020B	

A-1) フローチャート

所属： 福岡県保健環境研究所
ウイルス課
氏名： 大津隆一



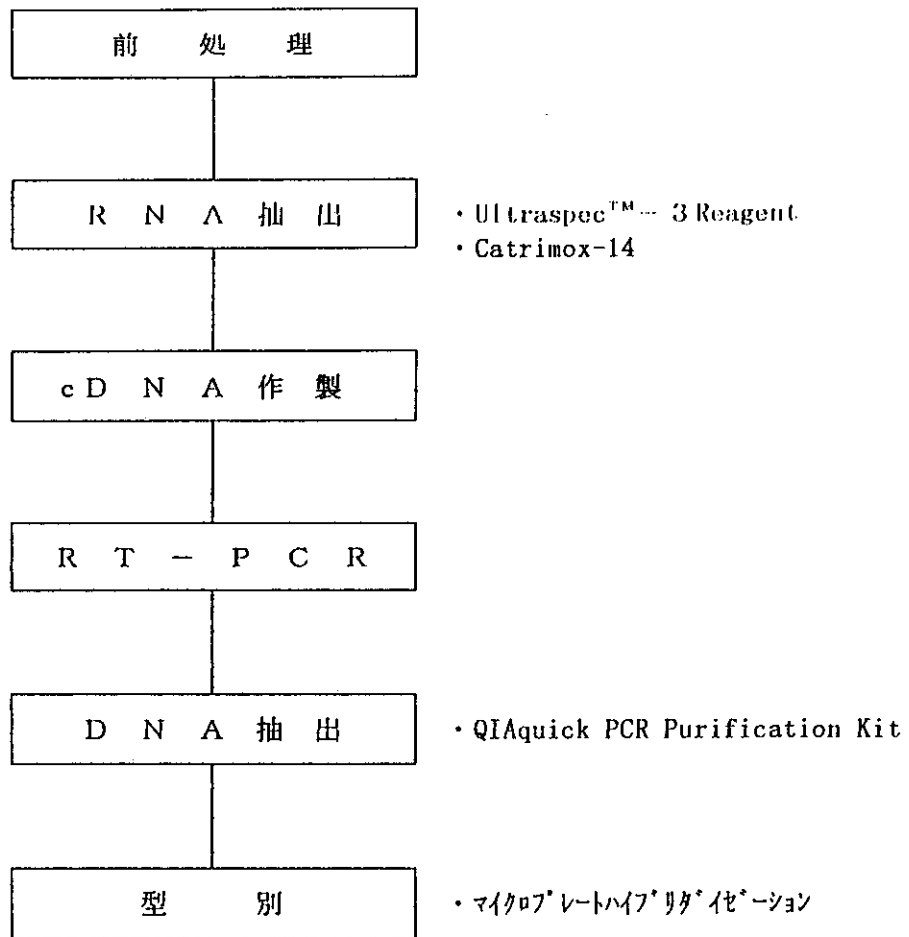
A-2) プロトコール

所属： 福岡県保健環境研究所
ウイルス課
氏名： 大津隆一

1. 20%試料300 μ lにダイロンを等量添加後、vortex (30秒)、15000rpm (5分)後の上清を300 μ l 回収
2. 16%PEGを等量添加、転倒混和後90分間放置(氷冷中で)、15000rpm (15分、4 $^{\circ}$ C)後の上清を捨てpelletに滅菌水150 μ lと2%proteinase K buffer150 μ lとproteinase K (5mg/mlを12 μ l)を加えて vortex, flash後37 $^{\circ}$ C、30分間放置
3. buffer A(10% CTAB)とbuffer B(4M Nacl)とを各50 μ l加えて vortex, flash後56 $^{\circ}$ C、30分間放置
4. phenol-chloroformを等量添加、vortex, flash後、15000rpm (10分、4 $^{\circ}$ C)後の上清を約400 μ l 回収し新しい滅菌チューブに移し、chloroformを等量添加、vortex, flash後、15000rpm (10分、4 $^{\circ}$ C)の上清を(約300 μ l)新しい滅菌チューブに移し、ethanol(2 \times 倍量)と2M NaOAC(finalで 0.2M)とを加えて vortex, flash後 -20 $^{\circ}$ C、30分間放置
5. 15000rpm (10分、4 $^{\circ}$ C)後の上清を捨て、70% ethanolを1ml加えて vortex, flash, 15000rpm (10分、4 $^{\circ}$ C)の上清をを捨て、減圧乾燥(室温)
6. 滅菌水(0.1%DEPC)30 μ lに浮遊したものを5 μ l用いて RT-PCR反応を実施
7. RT-PCR反応(One-step, One-tube法)
Ready To Go(RTG) RT-PCR Beads (アマシム ファルマシア バイオテック 株式会社)を使用
(キットのチューブにPCR用5' プライマーを0.5 μ l、PCR用3' プライマーを0.5 μ l、テンプレートRNAを5 μ lを加えて、DEPE処理水で全量を50 μ lに調整)
8. サーマルサイクラーへ

42 $^{\circ}$ C	15-30分	(RT反応)
95 $^{\circ}$ C	5分	(M.MuLV RTの失活及び鋳型DNA,プライマーの変性)
95 $^{\circ}$ C	1分	
55 $^{\circ}$ C	1分	(32サイクル)
72 $^{\circ}$ C	1分	

フローチャート

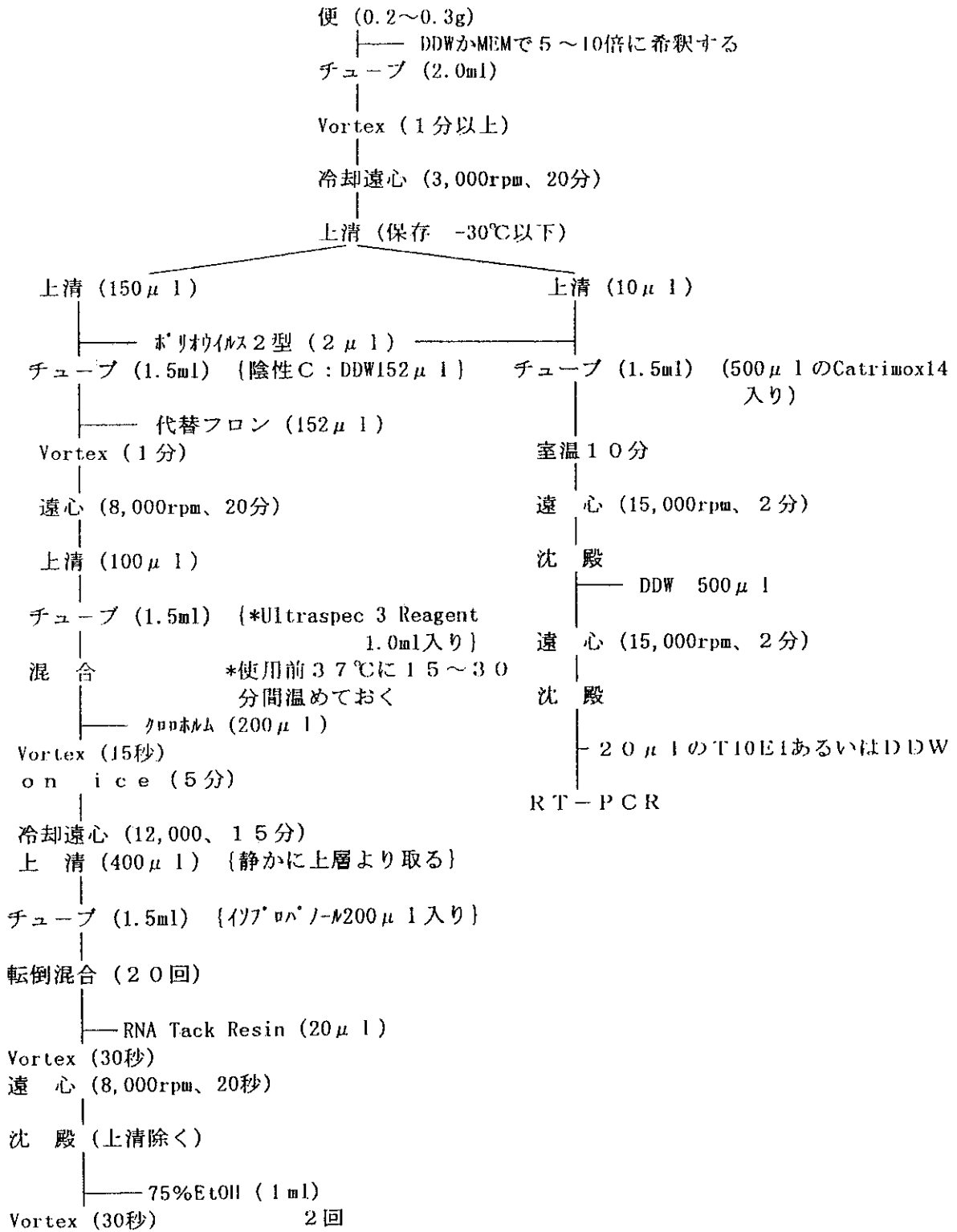


PCRによるSRSVの検出法

糞便からのRNAの抽出法

<Ultraspec 3 Reagent>

<Catrimox-14>



遠心 (8,000rpm, 20秒)
 |
 乾燥 (37°C, 5分)
 |
 20 μ l の T10E1 あるいは DDW
 Vortex (30秒)
 遠心 (12,000rpm, 1分)
 保存 (-40°C 以下)
 |
 RT-PCR

RT-PCR

PCR装置: PERKIN ELMER (GeneAmp PCR System 9600-R)

cDNAの作製

A混合液		B混合液	
1. Primer		1. 5×RT buffer	4 μ l
Oligo(dT) (12-18) (0.5 μ g)	1 μ l	2. 0.1M DTT	1 μ l
35' (25 μ M)	1 μ l	3. 2.5mM dNTP	4 μ l
SB2-R1 (25 μ M)	1 μ l	4. M-MLV RT (200unit/ μ l)	1 μ l
2. DDW	1 μ l	(GIBCO BRL)	
3. Sample RNA	5 μ l	5. RNase inhibitor (38unit/ μ l)	1 μ l
	9 μ l		11 μ l

A混合液を70°Cに10分間置いた後、ON ICEしてB混合液を加え
 その後、37°Cに1時間置き、次に98°Cに5分間置き、直ちにON ICEする。

1st PCR

1. DDW	34 μ l
2. 10×Ex Taq buffer	5 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4 μ l
4. 35' Primer (25 μ M)	0.75 μ l
5. 36' Primer (25 μ M)	1 μ l
6. cDNA	5 μ l
7. Ex Taq (5unit/ μ l) (宝酒造)	0.25 μ l
	50 μ l

Nested PCR

1. DDW	35.75 μ l
2. 10×Ex Taq buffer	5 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4 μ l
4. NV81 Primer (25 μ M)	1 μ l
5. NV82 Primer (25 μ M)	1 μ l
6. SM82 Primer (25 μ M)	1 μ l
7. Ex Taq (5unit/ μ l) (宝酒造)	0.25 μ l
8. 1st PCR産物	2 μ l
	50 μ l

PCR反応

94°C	3分	1回
94°C	1分] 40サイクル
48°C	1分	
72°C	2分	
72°C	15分	
4°C	hold	

94°C	3分	1回
94°C	1分] 35サイクル
48°C	1分	
72°C	2分	
72°C	15分	
4°C	hold	

マイクロプレートハイブリダイゼーション法

1、ゲルからDNAの抽出 (QIAquick PCR Purification Kit)

アガロースゲルから目的とするバンドを切り出す (1 s t 470bp、Nested 330bp)

* UV照射は、可能な限り短時間で行う

* フナゲルチップを用いると良い

チューブ (1.5 ml)

—— ゲル重量の3から4倍量のNaI溶液

Vortex (1分間)

恒温槽 (55℃、5分間) {3分後、4分後に上下に4回程混合する}

* ゲルが完全に溶解したか確認する

氷中 (数分間)

—— キットのBufferPB 300 μ l (NaIとBufferPBの合計が750 μ l以上としない)

キット添付のチューブ (2 ml) にQIAquickカラムをセットし、チューブ内の液を移す

遠心 (10,000rpm、60秒)

カラムの下のチューブに溜まった液を捨てる

—— キットBufferPE 750 μ l

遠心 (10,000rpm、60秒)

カラムの下のチューブに溜まった液を捨てる

遠心 (15,000rpm、60秒)

カラムを新しいチューブ (1.5 ml) に移し、1分間蓋を開け、アルコールをとばす

—— キットBufferEB 40 μ l

2分間静置

遠心 (10,000rpm、60秒)

抽出DNA (40 μ l) * 保存は、-20℃以下