

2、マイクロプレートハイブリダイゼーション

チューブ (0.5ml)

3倍1.5M NaCl buffer 16.5 μ l
抽出DNA 33 μ l

98℃、5分間加熱処理 (ヒートブロックかサーマルサイクラーを使用)

氷中に置く

マイクロプレートを右記の様に使用する

使用する穴に固定化液85 μ lを先に入れて置く

加熱処理した抽出DNAを15 μ lずつ3穴 (probe con、G1 probe、G2 probe用) に入れる
(NC、G1、G2、検体1、・・・)

プレートにシールをしっかりと密着させる

37℃の恒温槽に重石をして沈め、2時間置く

PBS-Tweenでプレートを3回洗浄する

* 洗浄液は、次亜塩素

酸付加りの容器に棄てる

ハイブリ液を各穴に80 μ lを入れる。

マイクロプレート	1	2	3	4	5	6	7
		N	G	G	検	検	検
		C	1	2	体	体	体
					1	2	3
A	●	●	●	●	●	●	●
probe con	B	●	○	○	○	○	○
G1 probe	C	●	○	○	○	○	○
G2 probe	D	●	○	○	○	○	○

1検体当たりProbe control (T₁₀E₁11 μ lとサケ精子DNA11 μ l混合) とProbe G1とG2
11 μ lとサケ精子DNA11 μ lを混合した液を0.5mlチューブにつくる。

98℃、5分間加熱処理 (ヒートブロックかサーマルサイクラーを使用)

氷中に置く

B列は、probe control、C列は、G1 Probe、D列は、G2 Probeを20 μ lを入れる

プレートにシールをしっかりと密着させる

42℃の恒温槽に重石をして沈め、4時間以上置く (通常は1夜置く)

シールを剥がし、プレートをPBS-Tweenで可能な限り素早く3回洗浄する。
(使用するPBS-Tweenは42℃に温めておく)

ストロプトアビジン標識ペルオキシダーゼを使用する全穴に100 μ l入れ、室温で1時間置く

プレートをPBS-Tweenで4回洗浄する。

使用する全穴に発色液を100 μ l入れ、遮光して室温に15分間静置する。

停止液を使用する全穴に50 μ l入れる。

450nmで吸光度を測定し、対象に比べOD値が、2倍以上で、かつ0.2以上の差が認められた時に陽性とする。

引用文献：公衆衛生院のSRSV研修テキスト

試薬類 (1)

1、RNAの抽出用試薬

1) RNAの抽出キット

Ultraspec 3 Reagent (Bioteck Lab)
Catrimox-14 (宝酒造)

2) 1.0倍PBS (-)

NaCl 80g
Na₂HPO₄·12H₂O 29g
KH₂PO₄ 2g

精製水を加えて1,000mlとし、使用時に精製水で10倍希釈し、高压滅菌して使用する。

3) T₁₀E₁

1M-Tris-HCl 0.5ml
0.5M-EDTA 0.1ml
DDW 50ml

1N-HClでpH7.5にし、高压滅菌後、0.22μmのフィルターでろ過する。

4) 代替エフロン

アサヒクリンAK-141b 20kg
(株・旭硝子)

5) 75%エタノール

99.5%エタノールを滅菌水で75%にする。

6) グリコーゲン: Boehringer Mannheim

90133 20mg/ml 1ml入り

2、RT-PCR用試薬

1) TAE溶液

50倍TAE溶液 (株・ニッポンジーン) 20ml
DDW 980ml
滅菌不要

2) 1% Agarose gel

アガロースME (岩井科学) 1g
50倍TAE溶液 2ml
DDW 98ml

容器口をラップし、電子レンジで煮沸させ30秒毎に止め攪拌して完全にAgaroseを溶かす。最後にDDWで100mlに再調整する。

3) Molecular Marker

Hi-LO DNA Marker (株) アベテック

4) 5倍loading buffer

ブROMOフェノール 0.01g
グリコセロール 50ml
Xylen cyanol.FF 0.01g
SDS 0.01g
DDW 50ml

5) Oligo(dt)(12-18) primer

GibcoBRL 25μg入り

6) プライマー

35' / 36 と NV81 / NV82、SM82
公衆衛生院より分与

7) Ex Taq

宝酒造

8) M-MLV RT

GibcoBRL 40,000units

9) RNase inhibitor

Toyobo

試薬類 (2)

3、マイクロプレートハイブリグアイゼーション用試薬

1) NaI 溶液

NaI	90.8g
Na ₂ SO ₃	1.5g
DDW	100ml

0.2 μm でろ過し、その後 Na₂SO₃ を 2.5g 加え酸化を防ぐ

2) DNA 抽出キット

QIAquick PCR Purification Kit
(QIAGEN)

3) 3倍1.5M NaCl buffer

NaCl	13.15g
リン酸2ナトリウム	0.213g
0.5M EDTA	3ml
DDW	47ml

4) 固定化液

3倍1.5M NaCl buffer	3.0ml
DDW	6.0ml

高压滅菌後使用

5) PBS-Tween

PBS	100ml
Tween20	50 μl

高压滅菌後使用

6) ハイブリ液

3倍1.5M NaCl buffer	1.35ml
DDW	1.26ml
ホルムアミド	4.5ml
10% Tween20	0.09ml

7) サケ精子DNA

サケ精子DNA 破片 (10mg/ml) 10 μl
(STRATAGENE)

T ₁₀ E ₁	1 ml
3倍1.5M NaCl buffer	666 μl
DDW	333 μl

8) 1% BSA+PBS-Tween

Albumin Bovine	0.1g
PBS-Tween	10ml

9) ストレプトアビジン標識ヘルペシス抗体
(BIOSOURCE)

1% BSA+PBS-Tween で 1,000倍から 10,000倍で使用 (メーカー、Lotにより異なる)

10) 0.1M Citrate/Acetate Buffer (pH 5.5)

酢酸ナトリウム	0.82g
1.0M クエン酸水和物	0.4ml
DDW	100ml

高压滅菌後、室温保存

11) 発色液

TMB	1 Tab
DMSO	1 ml
0.1M Citrate/Acetate Buffer	9 ml
30% H ₂ O ₂	2 μl

TMB を DMSO で溶解したあと
0.1M Citrate/Acetate Buffer を加え
使用直前に 30% H₂O₂ を加える

12) 停止液 (4NH₂SO₄)

H ₂ SO ₄ (95%, 18N)	10ml
DDW	35ml

カリシウイルスの検査法について

1. 電子顕微鏡によるウイルス粒子の検索： 電子顕微鏡での検査が行える機関で、検査に充分量の糞便材料が得られた時には、電子顕微鏡によるカリシウイルスの検索を行う。カリシウイルス粒子が確認されたときには陽性とする。電子顕微鏡での検査が行うことができないときには PCR 法でウイルスの検出を行う。なお、原則的には糞便材料の PCR は 1st PCR で、Nested PCR は行わない。食品の時には恐らくウイルス量が少ないので電子顕微鏡でウイルスの検出は難しいので PCR 法で行い、Nested PCR まで行う。
2. PCR 法： RNA の抽出法には多くの方法がある。特にこれという指定はしないので、それぞれが良いと判断した方法を用いて構わない。またプライマーにおいて推奨するものを示しているが、他に優れていると考えられるものであれば新たに加えたり、変更しても良い。PCR の判定は 3 に示した条件に適していることを確認した上で判定を行う。
3. PCR 法による判定： PCR 法では、RNA 抽出のコントロールとして入れた、ポリオウイルス(粒子数 $10^4 \sim 10^5$ 個/ μ l)の PCR で目的とするバンド (200bp) が認められること。検査材料の代わりに DDW を入れた陰性コントロールで目的としたバンドが見られないこと (遺伝子の混入が無い)、陽性コントロールで目的とするバンドが見られた時、以上の条件が満たされた時にのみ PCR 法の判定を行う。この条件を満たさない時には再度検査を行う。
4. 確認試験： PCR 法で問題が無く、目的とするバンドが認められた時には確認試験のハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を調べる。
5. ハイブリダイゼーションで陽性の時にカリシウイルス (+) とする。
6. 遺伝子配列で既知のカリシウイルスと類似の配列が認められた時に陽性 (+) とする。

1. 電子顕微鏡観察試料の作製

糞便材料 0.3g ~ 1g

蒸留水または PBS 10ml

Vortex

↓
遠心 3000rpm 15min

遠心上清に等量のダイフロン*を加える

Vortex

↓
遠心 3000rpm 15min

水相 7~8mlを採取、30%蔗糖水溶液に重層、

↓
遠心 35000rpm ~ 40000rpm 150min

沈渣を残して水相を除き、約1mlの蒸留水で沈渣を
巻き上げないように洗う。

↓

沈渣に2~5滴の蒸留水に再浮遊（沈渣が多い場合は
高速微量遠心機で、10000rpm 1minの遠心が有効）

電子顕微鏡観察試料

水様便、軟便等便の性
状により調節、濃すぎ
ない方がよい

*代替品

HCFC-141b(ダイキン工業)

支持膜の作製

支持膜の作製法は種々の方法があるが、その一例として我々が用いている方法を示す。

市販のコロジオン膜張器にステンレスの網板を置き、約 40℃の蒸留水を満たす。

↓

ステンレス網板の上に400メッシュの銅製グリッドを並べる。

↓

2%コロジオン液（酢酸アミル溶液）をパスツールピペットで1滴静かに滴下する。10分程そのまま膜が乾燥するのを待つ。

↓

膜張器の下のコックを緩め、静かに水を抜いて水位を下げ、コロジオン膜が銅製グリッドに張り付かせる。

↓

ステンレス網板ごと取り出し、濾紙上で水切りした後、室温で一夜乾燥させる。

↓

カーボン蒸着してコロジオン膜を補強する

（カーボンの蒸着量は、側に置いた濾紙が薄く着色した状態が良い。）

親水化処理

イオンスプッターで膜表面を親水化する。親水化の効果は2、3日でなくなるので出来るだけ早く使う。数日後使用する場合は再処理する。

糞便材料では通常必要ない。水様便や培養液で、試料の載りが悪い時には有効。

ネガティブ染色法

染色剤

(1) 2%リンタングステン酸カリ溶液(pH 7.0)

リンタングステン酸 2g

蒸留水 100ml

2~3NのKOHでpH7に調整、4℃で1年保存

(2) 2%酢酸ウラン溶液(pH 4.0-4.5)

酢酸ウラン 2g

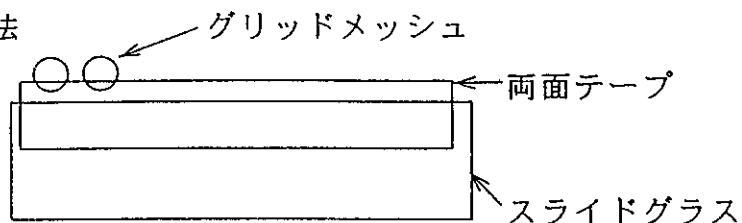
蒸留水 100ml

褐色ビンで室温保存、沈殿が生じたら作り直す。

リンタングステン酸と酢酸ウランとは染色性が異なるので、時には両方の染色剤を用いるのが良い。

酢酸ウランは国際核規制物質

滴下法



グリッド上に試料を1滴載せ、1~2分後濾紙片で吸い取る。



染色液を1滴載せ、1~2分後濾紙片で吸い取って自然乾燥させた後、鏡検する。

試料の塩類含量が多い場合は、試料を吸い取った後、直ちに蒸留水を1滴で洗浄してから染色すると良い。

電子顕微鏡による観察

試料の観察は、3万倍か4万倍で常に同一倍率で行うのがよい。

1グリッドにつき少なくとも5スクエアは観察し、粒子の有無を判定する。試料の載りかたにより観察するスクエア数を調節する。

牡蠣の前処理法

国立公衆衛生院 衛生微生物学部

ウイルス室 西尾 治

1. 殻付き牡蠣はへら等で貝柱（牡蠣の中程にある）を切り殻を外し、むき身の重量を測定する（ビニール袋、シャーレ等に入れて秤量）

2. 牡蠣の外套膜を始めに取り、次いで中腸腺の周りについている脂質部分をはさみ、メス等で可能な限り取り除く（脂肪部分が付いていると PCR を行う時に障害となる）、中腸腺を取り出す（うまく取り出すとハート形をしている）。

3. 牡蠣 5 個分の中腸腺を秤量し、ホモジナイザーあるいはホモジナイザーサンプリングバッグにいれ、次いで 5 から 10 倍量の PBS (-) を加え良く粉砕する（冷却して行う）。

4. 粉砕した試料を遠心管に移し、10,000 rpm. 20 min. 冷却遠心する。

5. 超遠心用遠心管に 30% ショ糖溶液を遠心管の 10% 程度の容量を入れ、それに 4 の遠心上清を静かに重層させ、35,000 rpm/180 min. あるいは 40,000 rpm/120 min 冷却遠心する。

6. 上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとする。

7. 遠心管の周りを PBS (-) で軽く洗い、遠心管の周りを滅菌した濾紙で水分を取る。

8. 沈渣に 200 μ l の DDW を加え、浮遊させる。これをウイルス RNA の抽出に用いる。

（浮遊液に不純物が多いときには 10,000 rpm 20 min. の遠心を行い、その上清を RNA 抽出に用いる）

超遠心器を使えない時には

4 の遠心上清に Polyetlen glycol 6,000 を 8%, NaCl を 2.1g/100ml になるように加え、軽く攪拌し（時間の無いときには室温で 2 時間攪拌し遠心）、4 ° C の冷蔵庫に一晩置く。

↓

5,000 から 12,000 rpm/min 20 分間冷却遠心する。

↓

上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとし、菅壁の周りの水分を濾紙で吸い取る。

↓

沈渣に 200 μ l の DDW に浮遊させる。これをウイルス RNA の抽出に用いる。（浮遊液に不純物が多いときには 10,000 rpm/20 min. の遠心を行い、その上清を RNA 抽出に用いる）

SV Total RNA isolation system quick protocol

使用前に行う試薬の調整

添付の β -Mercaptoethanol(BME)を SV RNA Lysis buffer に加える。

95% ethanol を SV RNA Wash Solution と SV DNase Stop Solution に加える。

凍結乾燥の DNase I の入っている瓶に Nuclease-Free water を入れて、溶解する (Vortex はしない)。

RNA の抽出法

食品あるいは糞便の遠心上清を用いる (フロン処理は不要)。また糞便は直接行える。

1. 滅菌チューブ (1.5ml) に SV RNA Lysis Buffer (BME を加えてあるもの) を 350 μ l 入れる。それに検査材料を 100 μ l とポリオ 2 型ウイルス (Sabin 株) を 2 μ l 入れた後、上下混合 3 から 4 回行い、軽く遠心する。(糞便を直接用いるときには重量を測定し、30mg/175 μ l にたいして比例して SV RNA Lysis Buffer を加える)。
2. 次に SV RNA Dilution Buffer を 350 μ l を入れ、攪拌 (上下混合 3 から 4 回)、(糞便材料の時には完全に溶解させるため、良く混合する。溶解しない時には Vortex する)。
3. チューブを 70° C の water bath に 3 分間入れ、直ちに on ice する。
4. 冷えたら 12,000 から 14,000 x g で 10 分間遠心する。新しい 1.5ml のチューブに 95% ethanol を 300 μ l (糞便を 30mg を用いたときには 200 μ l) を入れて置いたものに、遠心上清をピペットで取り、攪拌 (3 から 4 回上下混合)、軽く遠心。
5. 新しいチューブ (1.5ml) に Spin Basket Assembly をセットし、その Basket に 4 の溶液を入れ、12,000 から 14,000 x g で 1 分間遠心し、チューブの液を捨てる。
6. Basket に SV RNA Wash Solution (95% ethanol を加えたもの) を 600 μ l 入れ、12,000 から 14,000 x g で遠心し、チューブの液を捨てる。
7. Basket に DNase incubation mix を 50 μ l 入れ (キットに添付されている Yellow Core Buffer 40 μ l, MnCl₂ 5 μ l, DNase I 5 μ l の混合液)、室温に 15 分間置く。
8. 次に、Basket に SV DNase Stop solution を 200 μ l 入れた後、12,000 から 14,000 x g で 1 分間遠心、チューブの液を捨てる。
9. Basket に SV RNA Wash Solution を 600 μ l 加え、12,000 から 14,000 x g で 1 分間遠心し、チューブの溶液を捨てる。
10. Basket に SV RNA Wash Solution を 200 μ l 加え、14,000 x g で 2 分間遠心する。
11. Basket を新しいチューブ (Elution チューブ) にセットし、蓋を 2 分間開けておき、

ethanolを飛ばす。

- 1 2. 次いで Nuclease-Free water を Basket に 100 μ l 入れ、2 分間置いた後、12,000 X g で 2 分間遠心。Basket を取り除く。
- 1 3. Elution チューブに 95% エタノール 300 μ l, glycogen 2 μ l および 3M NaOAc 40 μ l を加え上下混合し、-70° C 以下に 30 分置いた後 (over night のときは -20° C に置く) 、15,000 回転で 30 分間遠心し、上清を完全に除く。
- 1 4. Basket に 75% ethanol を 400 μ l 加え、上下混合後、15,000 回転で 30 分延伸し、上清を完全に除いた後、乾燥させる (完全に乾燥させない) 。
- 1 5. Nuclease-free Water 25 μ l 加えたのち、70° C に 5 分間置き、RNA を溶解させる。これを抽出 RNA とし PCR に用いる。保存は -20° C 以下で行う。

SV Total RNA isolation system quick : Promega. Cat. #Z3100

RT-PCR法

PCRを行う上での注意点は糞便の処理から核酸の混入を防ぐため、遺伝子操作の行っていない部屋で、手袋を着用して行う。チューブを開ける時にはオープナーを使う。

検体材料、RNA、DNAをマイクロピペットで吸引する時は、綿栓付きのチップを用い、ピペット操作は穏やかに行う。

検体材料、RNA、DNAが実験台あるいは周囲に飛散したときには次亜塩素酸ソーダ(1,000 ppm の濃度)で拭くかあるいはUV照射する。

I. RT反応

まず初めに0.5ml のチューブに A混合液を作製する。

A 混合液

1. Primer

Oligo(dT) (12-18) (0.5 μ g)	1 μ l
35' (25 μ M)	1 μ l
SB2-R1 (25 μ M)	1 μ l
2. DDW	1 μ l
3. 抽出 RNA	5 μ l

9 μ l

↓

1, 2, 3を混合し、70° C に10分間置いた後、直ちにon iceに置く

次いでB混合液を作製する。

B混合液

1. 5 X RT buffer	4 μ l	
2. 0.1M DTT	1 μ l	
3. 2.5mM dNTP	4 μ l	
4. M-MLV RT(200 unit/ μ l)#	1 μ l	# AMV-RT を用いる時には
5. RNase inhibitor(38 unit/ μ l)	1 μ l	3.5 unit で良い。

11.0 μ l

A混合液をon iceし、軽く遠心した後、B混合液を加える。

その後、37° C に1時間置く。

↓

98° C に5分間置き、直ちにon iceする。

cDNAの作製終了。

II. 1st PCR

1st PCRはSRSVと Poliovirus の2つに分けて行う。

A) SRSV

1. DDW #	34 μ l	#はミリQ水を高圧滅菌し、0.22 μ mの
2. 10X Ex Taq™ buffer	5 μ l	フィルターで濾過したもの。
3. dNTP(2.5mM)	4 μ l	
4. 35' primer(25 μ M)	0.75 μ l	患者の糞便材料の時にはさらにNV81・
5. 36' primer(25 μ M)	1 μ l	82・SM82のプライマーを用いる(別の
6. cDNA(Template)	5 μ l	チューブで行う)。
7. Ex Taq™(5unit/ μ l)	0.25 μ l	また、Yuri 22R・Yuri22 Fも行うのが

50 μ l

望ましい。左の調整液プライマーが増えた時には(NW81, 82, SM82) DDWの量を1 μ l減らす。

b) Polio virus

1. DDW	34 μ l
2. 10X Ex Taq TM buffer	5 μ l
3. dNTP(2.5mM)	4 μ l
4. SB2-R1(25 μ M)	0.75 μ l
5. SB2-F1(25 μ M))	1 μ l
6. cDNA(Template)	5 μ l
7. Ex Taq TM (5 unit/ μ l)	0.25 μ l

50 μ l

各混合液を作製したら、軽く混合し、弱く遠心する。(混合液は強く混合し泡立てたり、強い遠心をしてはならない)。

(ミネラルオイルの必要な機械はミネラルオイル 50 μ l を重層する)

↓

「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	1回	
4° c	hold		

↓

PCR 産物の電気泳動

III. PCR 産物の電気泳動

PCR産物 8 μ l と 6倍loading buffer 2 μ l を混合し 1から1.5% Agarose gel (通常の PCR 産物の確認には1.5 から2%のゲルを用いる) で電気泳動を行う。ゲルから DNAを抽出する時には、ゲル濃度の低い方が回収率が良い。泳動bufferにはTAE が良く、TBE は DNAの回収が悪くなる。

6倍loading buffer: 0.25% プロモフェノールブルー(BPB) を 50%グリセロール、1mM EDTA(pH8.0)に混合したもの。

また。バンドの大きさを確認するため、Molecular Marker も同様に泳動する。

↓

染色液 (TAE 溶液 100mlにエチジウムブロマイド 10mg/mlのものを10 μ l 加えた溶液) に20分間置く、この時軽く揺ると良い、エチジウムブロマイドは発癌性を有するので取扱に注意する。

↓

UV 照射下で写真撮影しバンドの確認を行う。

1% Agarose gel

Agarose	1g	容器の口のところをラップし、電子レンジで煮沸してきたら20から30秒毎に止め攪拌する。この操作を4 回繰り返す。 水分が蒸発するので、DDW で100ml に再調整する。
50倍 TAE	2ml	
DDW	98ml	

50X TAE buffer

Tris	108 g	滅菌不要、室温保存 使用時蒸留水で10倍に希釈する。
氷酢酸	11.4ml	
0.5 M EDTA(pH8.0)	20 ml	
蒸留水で1,000ml とする		

Molecular Marker: Hi-Lo™ DNA Marker, アベテック社、Cat.No. MW1010

IV. Nested PCR

基本的にはNested PCRは食品についてのみ行う。患者の糞便材料は1st PCR で判定を行う。

Nested PCRの調整

DDW	35.75 μ l	
10 倍 PCR buffer	5 μ l	
2.5 mM dNTP	4 μ l	
NV 81 primer(25 μ M)	1 μ l	この時にG1とG2のP.C を同時に行う
NV 82 primer(25 μ M)	1 μ l	可能であればYuri22R とYuri22F のプライマー
SM 82 primer(25 μ M)	1 μ l	についても行うと良い(別のチューブで行う)。
Ex Taq(5 unit)	0.25 μ l	左の調整液の DDWの量を 1 μ l 増やす。
1st PCR産物	2 μ l	

50 μ l

↓

「PCR反応」

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	1回	
4° c	hold		

↓

電気泳動(1st PCR と同様に行う)

↓

UV照射で写真撮影しバンドの確認を行う。

試薬

Oligo(dT)(12-18) primer: 25 μ g 入り。GibcoBRL, Cat.No. 18418-012

M-MLV Reverse Transcriptase: 40,000units. Gibco BRL, Cat. No. 28025-013

0.1M DTT:M-MLV Reverse Transcriptase に添付

5X Strand buffer: M-MLV reverse Transcriptaseに添付

2.5mM dNTP: Ex Taqに添付

RNase inhibitor: Toyobo, Cat.No.SIN101

アガロースME: 岩井科学、250g, Cat. No. 50013R

GenElute™ Minus EtBr Spin Columns を用いるゲルから DNA 抽出法

国立公衆衛生院 衛生微生物学部
ウイルス室 西尾 治

I. ゲルからの DNA 抽出法

1. 0.8% アガロースゲルを用い（ゲル濃度が低い方が DNA の回収率が良い）、泳動 Buffer は TAE が良い）、PCR 産物を泳動し、ゲルをラップに乗せ、目的とするバンド（1st PCR では 470bp、2nd は 330bp）を UV 照射下（UV の照射により DNA は壊されるので、可能な限り短時間で行う）で切り出す（フナコシのフナゲルチップを用いると良い）。

2. 切り出したゲルをメスで 2 mm 以下にする。

3. Spin Column を 1.5ml のチューブに乗せ、100 μ l の T₁₀E₁ (pH8.0) を入れ、12,000 xg で 5 秒間遠心、チューブに溜まった液をすてる。

4. Spin column に細かくしたゲルを入れ、12,000 xg で 10 分間遠心し、Spin Column を取り除く。チューブに溜まった液の中に抽出 DNA が含まれている。これをハイブリに用いる。

5. 抽出量の多い時には抽出液の 0.1 量の 5 M ammonium acetate (pH5.0) と 2 倍量の 99.5% ethanol を加え、-20 ° C に 10 分間以上置いた後、15,000 rpm. で 20 分間遠心し、上清を完全に除き、40 μ l の T₁₀E₁ (pH8.0) に再浮遊させ、これをハイブリに用いる。

GenElute™ Minus EtBr Spin Columns : SUPELCO, Cat.No. 56501

II. マイクロプレートハイブリダイゼーション

国立公衆衛生院 衛生微生物学部

ウイルス室 西尾 治

1. 抽出 DNA 33 μ l を0.5ml のチューブに取り、それに 3倍 1.5 M NaCl buffer 16.5 μ l を加え98° C 5 分間加熱処理し、直ちにon iceする。抽出DNAはG1PC98 でPCR で通常得られるPCR 産物の 8 μ l の泳動で抽出されたDNA は20倍から100 倍に希釈する、そのまま用いると陰性となることがある。従って、検査材料からえられたDNA も、G1, G2 PC 98 の DNAと比較して、希釈あるいは濃縮する。

↓

2. マイクロプレートに固定化液^{#1}を先に85 μ l入れておく(マイクロプレート側面にプレートNo . 検体名等を書く)、次いで加熱処理した抽出 DNA を15 μ l ずつ3 つの穴に入れる。

固定化液^{#1} :

[3倍 1.5 M NaCl buffer* 3.0ml]	高圧滅菌
	DDW		6.0ml

* 3 倍 1.5 M NaCl buffer:

[4.5M NaCl, 30mM リン酸 2ナトリウム(pH7.0)]
	30mM EDTA,	

例えば、B-2, C-2, D-2 にはBufferのみの陰性対照((陰性PCR コントロールのゲル)、B-3, C-3, D-3 にはG1陽性対照、B-4, C-4, D-4 にはG2陽性対照、B-5, C-5, D-5 には抽出DNA-1、B-6, C-6, D-6 には抽出 DNA-2 と順に入れていく(外側の 1列は温度の伝導が異なるので使用しない)。

↓

3. プレートにシールシローラーでしっかり密着し、軽く揺すったのち、37° C 恒温槽に重しをして沈め、2 時間置く。

↓

4. PBS-Tween #2でプレートを3回洗浄する。

洗浄液は先に次亜塩素酸ナトリウムを入れておいた容器に棄てる。

↓

5. プレートにハイブリ液#3を各穴に80 μl あて入れておく。

↓

6. Probe control はT₁₀E₁ 11 μl probe con
とサケ精子DNA 11 μl と混合した G1 probe
もの。Probe(G1とG2) を 1検体当 G2 probe
たり11 μl とサケ精子DNA #4 11 μl
を混合する。(ProbeはT₁₀E₁ で希釈してある)

マイクロプレート

	1	2	3	4	5	6	7
		N	G	G	検	検	検
					体	体	体
	C	1	2	1	2	3	
A	●	●	●	●	●	●	●
B	●	○	○	○	○	○	○
C	●	○	○	○	○	○	○
D	●	○	○	○	○	○	○

プロ-ブの調整 (1 検体当たり)

Probe control T₁₀E₁ 11 μl + サケ精子DNA 11 μl #5
probe G1 11 μl + サケ精子DNA 11 μl
probe G2 11 μl + サケ精子DNA 11 μl

#5: 10mg/mlのものをT₁₀E₁ で100 μg/ml に希釈し、それに等量の 2倍1.5 M NaCl bufferと混合したもの

7. 上記混合液 (プローブ) を98° C で5 分間加熱処理した後、ただちにOn iceする。