

ルの代わりに蒸留水でもよい)。

- 4) ゲルとブタノール間に明瞭な界面が出現した(20~30分後)のち、ブタノールを除き界面を蒸留水で洗う。
- 5) 濃縮用ゲルを調製し、分離ゲル上に重層する。直ちに試料用コウムをコウムの先端に気泡が残らないように注意しながら挿入する。
- 6) 重合が完了した(通常20~30分)のち、装置を完全に組み立てる。
- 7) 泳動槽に泳動用緩衝液を静かに入れる。ガラスプレート下部と緩衝液の間のできる気泡は装置を傾斜させたり、注射器などで除く。
- 8) コウム下端中央それぞれに相当する位置を外側ガラス板にマジックペンなどで印を付け、コウムを静かに抜き取る。試料(抽出RNA 試料20 μ l, BPB 5 μ l)をマイクロシリンジまたはマイクロチップで印を目標にして静かに注入する。
- 9) \ominus 極を上部、 \oplus 極を下部に接続し泳動する。泳動条件はゲルの大きさと厚さによって決定されるが、1.0mm厚で90 \times 70mmゲルでは30mAの定電流で90~120分泳動する。
- 10) 泳動終了後、電源を切り、リード線ははずしてからガラスプレートを装置からはずす。切り込みの入ったプレートを上方にして、プレート間をスパーク等で静かに押し上げて切り込みプレートははずす。濃縮ゲルを切り離し、上下左右がわかるように1カ所の角を小さく斜めに切り取る。

(b) 臭化エチジウム染色

- 1) 容器に0.5 μ g/ml臭化エチジウム液100mlを準備し、ゲルを下端の方から両手で静かにプレートから持ち上げるようにして離して、染色液に入れる。
- 2) 30分間浸したのち、ゲルを水洗いする。
- 3) 紫外線イルミネーター上にのせRNAパターンを観察する(紫外線から眼を保護するため眼鏡を使用する)。ポラロイドの撮影装置があれば、写真を撮っておく。臭化エチジウムは発がん性があるとされているので必ず手袋を使用する。

(c) 銀染色

この操作はすべて室温で行い、振とう装置があれば使用したほうがよい。また銀染色は核酸ばかりでなくタンパクも染めるので、ゲルを素手で触れてはいけない。手袋を使用するのが便利である。銀染色用キットも市販されている。

- 1) 固定液^{#2}(90 \times 70mmゲルの場合100mlで可)にゲルを浸し、ときどき振とうしながら30分置く。

^{#2} 固定液 (酢酸0.5ml, エタノール10ml, 蒸留水90ml)

2) ゲルを硝酸銀液^{#3}に移し30分間染色する。ときどき軽く振とうし、むらなく染色されるようにする。

^{#3} 硝酸銀液 (硝酸銀0.19g, 蒸留水100ml)

3) 蒸留水で2回水洗いする^{#1}。

4) 発色液^{#4}を少し入れ、直ちによく振とうしてゲル前面にまぶされるようにする(ゲル全面が一様に発色するように)。残りの発色液を入れ、ときどき振とうしながら RNA バンドを観察する。RNA 量にもよるが5~10分で観察可能である。時間とともに濃くなるが、同時にバックの色も濃くなることがあるので注意する。

^{#4} 発色液 (5M NaOH 15ml, フォルマリン0.8ml, 蒸留水85ml)

5) 発色液を捨て、反応停止液^{#5}を入れる。

^{#5} 反応停止液 (酢酸10ml, 蒸留水90ml)

[注]

水道水で洗うと、水道水中の塩素と銀が反応し塩化銀の白い沈殿ができ、量が多いとゲル表面に塩化銀の膜を作ることがある。

硝酸銀溶液は褐色ビンに保存し、数回は使用可能である。廃棄する場合は別容器に保存し、特定の処理を行う必要がある。

(d) 乾燥

ゲルを長期に保存する場合、乾燥させると便利である。

市販の乾燥器の説明書に従って使用する。

ゲル乾燥用ろ紙を使う場合は、ろ紙をゲルよりやや大きめに切り水に浸しておく。ゲルを十分に水洗いして、ろ紙、ゲル、プラスチックフィルム(ろ紙より少し大きめ)の順に乾燥器にのせて、作動させる。

セロファンを使う場合、セロファン2枚をゲルより大きめに切って、十分に水につける。乾燥器上にセロファン、ゲル、セロファンと各間に気泡が入らないようにのせて乾燥させる。

電気泳動は同じ条件で行っても常に同じというわけではない。1枚のゲルで同時に泳動した検体の RNA パターンは比較できるが、別々のゲルでは細かい変化は指摘できない。2つの検体の微妙な差異を調べるためには、1本の試料孔に2検体の試料を入れて泳動しなければならない。

RNA 量が少なく、パターンが不明瞭で分子量の小さいバンドが見えない場合、抽出 RNA をエタノール沈殿で濃縮する。抽出 RNA の2.5倍量のエタノールを加え、

軽く振とうして -80°C に30~60分（または -20°C に一夜）放置したのち、10,000~15,000rpm, 10分間遠心する。上清を捨てて沈渣を十分に乾燥し（風乾または減圧乾燥）、 $20\mu\text{l}$ の試料希釈液を加えて溶かし、BPB $5\mu\text{l}$ を加え泳動用試料とする。

下痢症ウイルスの電子顕微鏡による検出（ネガティブ染色）

A 群以外のロタウイルス、カリシウイルス (SRSV)、アストロウイルス等培養細胞で難増殖性のウイルス粒子検出に有効な方法である。

1. 器具および試薬

超遠心機と水平ローター (40,000rpm)

低速遠心機 (3,000~5,000rpm)

ホモジナイザー

電子顕微鏡

真空蒸着装置

400メッシュ銅製グリッド

電動ミキサー

高速微量遠心機

ガラスまたはプラスチック遠心管

マイクロチューブ

ピペット

HCFC-141b (ダイキン工業)

2%コロジオン溶液

2%リントングステン酸カリ溶液 (pH7.0)

30%蔗糖水溶液

0.01M リン酸緩衝液 (pH7.2)

精製水

2. 電子顕微鏡観察試料の作製

便材料 0.3g~1g

蒸留水または PBS 10ml

↓ Vortex
遠心 3,000rpm 15min

遠心上清に等量の HCFC・141b を加える

↓ Vortex
遠心 3,000rpm 15min

水相 7 ~ 8 ml を採取, 30%蔗糖水溶液に重層,

↓ 遠心 35,000rpm~40,000rpm 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, 10,000 rpm, 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

3. 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。)

4. 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。

* 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。

5. ネガティブ染色法

染色剤

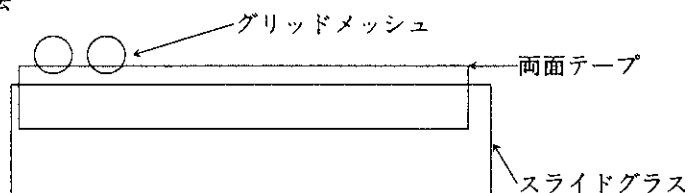
2% リンタングステン酸カリ溶液 (pH7.0)

リンタングステン酸 2g

蒸留水 100ml

2~3 N の KOH で pH7 に調整, 4℃ で 1 年保存

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 1 滴で洗浄してから染色すると良い。

6. 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。

免疫電顕法 (IEM 法)

検出されたウイルス粒子の鑑別同定は標準抗血清を用いて、病気との関係は患者のペア血清を用いて検査する。

1. 機器, 試薬

前記(1), ①機器, 試薬に同じ。

恒温槽 (56°C)

2. 検体の採取

患者の血液を急性期および3～4週後の回復期に採取し、血清に分離して-20°C以下に保存する。

3. 検査方法

- 1) ウイルス粒子浮遊液: EM法で用いた粗製鏡検材料を0.01M PBSで、1スクエア当たり5～10粒子の濃度に希釈する。
- 2) 希釈患者血清: 患者ペア血清を0.01M PBSで50～150倍に希釈し、56°Cで30分非働化して40,000回 rpmで1時間超遠心した上清を用いる。
- 3) ウイルス浮遊液25 μ lと等量の希釈血清を混合し、室温に1時間保ち、4°Cで一晩置く。
- 4) 2%リンタングステン染色をして鏡検する。
- 5) ウイルス粒子の凝集塊の大きさとウイルス粒子表面に付着した抗体の多寡を観察して判定する。抗体量が多い場合はウイルス粒子の周囲に密に抗体が付着し、粒子表面の形態は失われる。抗体量が少ない場合は粒子表面形態は明瞭で、大きな凝集塊ができる。急性期と回復期血清とを比較し、明らかな差異が認められた場合、ウイルス粒子と特異的抗原抗体反応陽性とする。

カリシウイルスの RT-PCR 法とハイブリダイゼーション

従来小型球形ウイルス (SRSV) と呼称されていたものは、カリシウイルス科に属し、Norwalk like virus (NLV) と Sapporo like virus (SLV) に分けられ、NLV には genogroup 1 (Norwalk 群) と genogroup 2 (Snow Mountain 群) が含まれる。SLV は古典的なカリシウイルスである。食品による食中毒下痢症の原因ウイルスは NLV によることが多い。ここでは PCR 法による NLV の検出について述べる。

I. 検査の進め方

食品関連下痢症患者のカリシウイルス (SRSV) の検査は電子顕微鏡での検索が行える機関では糞便材料が必要量得られた時に電子顕微鏡で行い、ウイルス粒子が確認された場合にはウイルス陽性とする。

電子顕微鏡の検査が行うことができない、あるいは電子顕微鏡で陰性の時には PCR 法でウイルス検出を行う。原則的に糞便材料の PCR は 1st PCR で診断し、Nested PCR は行わない。

食品に含まれるウイルス量は少ないと思われるので PCR 法で行い Nested PCR まで行う。

PCR で目的とするバンドが見られた時には確認試験としてハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を決定し診断する。

II. 牡蠣の前処理

1. 器具および試薬

超遠心器, 冷却遠心器 (10,000rpm), ヘラ, ホモジナイザーまたはストマッカー, ハサミ, メス, 超遠心用遠心管, 遠心管

PBS, ショ糖溶液, Polyehytlene Glycol 6,000, NaCl

2. 検査方法

ここでは原因食品として重要視されている牡蠣の処理方法について示す。

- 1) 殻付き牡蠣はヘラ等で貝柱を切り殻を除く。
- 2) 牡蠣の外套膜を取り、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、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。
- 3) ホモジナイザーまたはストマッカーに摘出した中腸腺をいれ、次いで5から10倍量の PBS (-) を加え良く粉砕する。

4) 粉碎した試料を遠心管に移す。

↓10,000rpm 20分間冷却遠心し、上清を取る。

5) 超遠心用遠心管に30%ショ糖溶液を遠心管の10%程度を入れ、それに4)の遠心上清を静かに重層させる。

↓35,000rpm 3時間あるいは40,000rpm 2時間冷却遠心する。

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10,000rpm 20分間遠心を行い、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 Polyethylene Glycol 6,000 を8%, NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌し、4℃に1晩置く。(時間の無いときには室温で2時間攪拌)

↓5,000から12,000rpm.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、管壁の周りの水分を濾紙で吸い取る。

沈渣を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10,000rpm 20分間遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる)

III. RT-PCR 法

1. 器具および試薬

サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器 (15,000rpm), マイクロピペット (2, 20, 200, 1000 μ l), ヒートブロック, 電気泳動装置, UV 照射写真撮影装置, UV 防御メガネ, 0.5ml, 0.2ml, 1.5ml チューブ, 1 ml 注射器, SV Total RNA isolation system (Promega.Cat. # Z3100),

Oligo (dt) (12-18) primer (GibcoBRL, Cat. No. 18418-012), M-MLV Reverse Transcriptase (GibcoBRL, Cat. No. 28025-013), 5X Strand buffer (M-MLV Reverse Transcriptase に添付), RNase Inhibitor, DDW (高圧滅菌後フィルター濾過したもの, あるいは市販されている Nuclease-Free water あるいは DEPEC 水), Takara EX Taq (Takara, RR001B), 10X PCR buffer (Takara EX Taq

に添付), 2.5mM dNTPs (Takara EX Taq に添付), ポリオ 2 型ウイルス (Sabin 株), 99.5%エタノール, 75%ethanol, NaOAC, Glycogen(Boehringer Mannheim 901393), primer は末尾に示した。

Loading buffer (0.025%プロモフェノールブルー, 50%グリセロール, 1 mM EDTA, pH8.0), 電気泳動用 Agarose, Molecular Marker, 50倍 TAE{Tris 108 g, 氷酢酸11.4ml, 0.5M EDTA (pH8.0) を精製水で1,000ml とする, 使用時50 倍希釈で使用}, エチジウムブロマイド

2. 検査の進め方

RNA の抽出には多くの方法があり, また各種キットも市販されている。特にこの方法と指定はしないので, それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。またプライマーも現在の時点で推奨するものを末尾に示している。他に優れていると考えられるものがあれば新たに加えたり変更しても良い。

3. ウイルス RNA の抽出

ここでは SV Total RNA isolation system について紹介する。このキットは便材料を直接使え, フロン処理が不要であり, DNase の処理も含まれており, 非特異バンドの出現を抑える利点を持っている。基本的には使用説明書に従って行う。ここではわれわれが行っている方法について記す。

a) 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。

99.5%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)。なお操作法の 1) から 12) までの試薬は 99.5%エタノールのほかは全て添付されている。

b) 操作法

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)。また糞便は乳剤でないものも直接行える。

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, 3 から 4 回上下混合し, 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 に比例して SV RNA Lysis Buffer を加える)。なお,

- 陰性コントロールとして糞便の代わりに DDW を入れたものも行う。
- 2) 次に SV RNA Dilution Buffer を350 μ l 入れ、攪拌、(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 $^{\circ}$ Cの water bath に3分間静置、直ちに on ice する。
↓12,000から14,000xg で10分間遠心する。
 - 4) 新しい1.5ml のチューブに99.5%Ethanol を300 μ l (糞便30mg を用いたときには200 μ l) を入れ、それに遠心上清を加え、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の溶液を入れる。
↓12,000から14,000xg で1分間遠心し、下のチューブ液を捨てる。
 - 6) Basket に SV RNA Wash Solution を60 μ l 入れる。
↓12,000から14,000xg で遠心し、下のチューブの液を捨てる。
 - 7) Basket に DNase incubation mix を50 μ l 入れ、室温に15分間置く。
 - 8) Basket に SV DNase Stop solution を200 μ l 入れる。
↓12,000から14,000xg 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 加える。
↓12,000から14,000xg 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 加える。
↓14,000xg 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、Ethanol を飛ばす。
 - 12) 次いで食品の時にはを Nuclease-free Water 100 μ l、糞便材料は40 μ l を Basket に入れ、2分間置く。
↓12,000xg で2分間遠心。
チューブに溜まった液が抽出 RNA である。
糞便材料はこれを PCR に用いる。
食品の時には以下の操作を続けて行う。
 - 13) Elution チューブ に99.5%Ethanol 300 μ l, glycogen 2 μ l および3M NaOAc 40 μ l を加え上下混合し、-70 $^{\circ}$ C以下に30分置いた後 (over night のときは-20 $^{\circ}$ Cに置く)、
↓15,000rpm で30分間遠心し、上清を完全に除く。
 - 14) Basket に75%Ethanol を400 μ l 加え、上下混合後、

↓ 15,000rpm で20分間遠心し,

15) 上清を完全に除いた後, 乾燥させる (完全に乾燥させない)。

16) Nuclease-free Water $30\mu\text{l}$ 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。

4. RT 反応法

1) はじめに 0.5ml のチューブに A 混合液を, 次いで B 混合液を作製する。

A 混合液

1. Primer	
Oligo (dt) (12-18) ($0.5\mu\text{g}$)	$1\mu\text{l}$
35' ($25\mu\text{M}$)	$1\mu\text{l}$
SB2-R1 ($25\mu\text{M}$)	$1\mu\text{l}$
2. DDW	$1\mu\text{l}$
3. 抽出 RNA	$5\mu\text{l}$

B 混合液

1. 5X Strand buffer	$4\mu\text{l}$
2. 0.1 M DTT	$1\mu\text{l}$
3. 2.5mM dNTPs	$4\mu\text{l}$
4. M-MLVRT ($200\text{unit}/\mu\text{l}$)	$1\mu\text{l}$
5. RNase inhibitor ($38\text{unit}/\mu\text{l}$)	$1\mu\text{l}$

A 混合液

↓ 70°C に10分間置いた後, on ice。

2) 次いで B 混合液を加える。

↓ 37°C に 1 時間, 次いで 98°C に 5 分間, 直ちに on ice。

3) cDNA の作製終了

作製された cDNA を用いて PCR を行う。

5. 1st PCR

1) 1st PCR はカリシとポリオの 2 つの混合液を作製する。

A) カリシウイルス

1. DDW	$34\mu\text{l}$
2. 10X Ex Taq™ buffer	$5\mu\text{l}$
3. dNTPs (2.5mM)	$4\mu\text{l}$
4. 35' primer ($25\mu\text{M}$)	$0.75\mu\text{l}$
5. 36 Primer ($25\mu\text{M}$)	$1\mu\text{l}$
6. cDNA (Template)	$5\mu\text{l}$
7. EX Taq ($5\text{unit}/\mu\text{l}$)	$0.25\mu\text{l}$
Total	$50\mu\text{l}$

B) ポリオウイルス

1. DDW	$34\mu\text{l}$
2. 10X Ex Taq™ buffer	$5\mu\text{l}$
3. dNTPs (2.5mM)	$4\mu\text{l}$
4. SB2-R1 primer ($25\mu\text{M}$)	$0.75\mu\text{l}$
5. SB2-F1 Primer ($25\mu\text{M}$)	$1\mu\text{l}$
6. cDNA (Template)	$5\mu\text{l}$
7. EX Taq ($5\text{unit}/\mu\text{l}$)	$0.25\mu\text{l}$
Total	$50\mu\text{l}$

A と B の混合液を作製し、以下の条件で増幅を行う。

↓

2) PCR 反応

(以下の条件で行う)

94°C 3分 — 1回
94°C 1分 — —
48°C 1分 — —
72°C 2分 — —
72°C 15分 — 1回
4°C hold

患者糞便材料のときにはさらに NV81.82, SM82, Yuri22R/22F のプライマーを用いるとよい。陽性コントロールは NV81, 82, SM82のプライマーで行う。

↓

3) 1st PCR 産物の電気泳動

↓ (PCR 産物 8 μ l と 6 倍 loading buffer 2 μ l を混合し泳動する。1.5から 2% のゲルを用い、泳動 buffer は TAE が良い)

4) 染色

(TAE 溶液100ml にエチジウムブロマイド10mg/ml を10 μ l 加えたもの)

5) UV 照射で写真撮影, バンドの確認 (写真撮影)

食品では1st PCR でバンドが見られなかった時には Nested PCR を行う

6. Nested PCR 法

1) Nested PCR の調整

以下の混合液を作製する。(可能であれば Yuri22R/22F のプライマーも行う)

1. DDW	35.75 μ l
2. 10X Ex Taq buffer	5 μ l
3. dNTPs(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. 1st PCR 産物	2 μ l
8. EX Taq	0.25 μ l
Total	50 μ l

↓

2) PCR 反応

(増幅は以下の条件で行う)

94°C	3分	—	1回
94°C	1分	┌ ├ └	35回
48°C	1分		
72°C	2分		
72°C	15分	—	1回
4°C	hold		

↓

3) Nested PCR 産物の電気泳動

↓ (1st PCR 産物と同様)

4) 染色 (1st PCR と同様)

5) UV 照射下で写真撮影, バンドの確認

7. PCR 結果の判定

(1) PCR 法では RNA 抽出のコントロールとして入れた, ポリオ Sabin 株 2 型 (粒子数 10^4 から 10^5 個) の PCR で目的とするバンドが認められること (RNA の抽出に問題はない)。

(2) 検査材料の代わりに DDW を入れた陰性コントロールでバンドが見られない (遺伝子の混入が無い)。

(3) 陽性コントロールで目的とするバンドが見られる (PCR がうまく行われた)。

以上の条件が満たされた時に PCR の判定を行う。

なお上記条件が満たされなときには再試験を行う。

PCR 陽性と判定されたときに確認試験としてハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を調べる。

ハイブリダイゼーションで陽性, あるいは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カリシウイルス陽性とする。

IV. マイクロトレイハイブリダイゼーション

ここではプローブにビオチン標識したものをを用いる時の方法を示す (但しこの時にはプローブの長さは 100bp 以上を必要とする)。

1. 器具および試薬

ELISA 用マイクロプレートリーダー, 恒温槽, ヒートブロック, ELISA 用マイクロプレート, マイクロピペット (2, 20, 200, 1,000 μ l), マイクロチューブ (0.5, 1.5ml), 10ml, 100ml, 500ml ガラス瓶, プレートシール, ゲル写真撮影装置

DNA 分子量マーカー, GenElute™ Minus EtBr Spin Columns (SUPELCO, Cat. No.56501), 電気泳動用 Agarose, フナゲルチップ, T₁₀E₁ (10mM Tris, 1mM EDTA 2Na), NaCl, リン酸2Na, EDTA 2Na, トリス, HCl, Tween20, DDW, サケ精子 DNA, ホルムアミド, ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ, ウシ血清アルブミン (BSA), TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine), DMSO (Dimethyl Sulfoxide), Citric acid, 30% H₂O₂, H₂SO₄.

2. ゲルからの DNA 抽出法 (GenElute™ Minus EtBr Spin Columns を用いる方法)

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 照射下で切り出す (フナコシのフナゲルチップを用いると良い)。

- 1) Spin Column を 1.5ml のチューブに乗せ, それに 100 μ l の T₁₀E₁ (pH8.0) を入れる。
↓ 12,000xg で 5 秒間遠心, チューブに溜まった液をすてる。
- 2) Spin Column に切り出したゲルを入れる。
↓ 12,000xg で 10 分間遠心し, Spin Column を取り除く。
- 3) 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。

3. ハイブリダイゼーション法

- 1) 抽出 DNA 33 μ l を 0.5ml のチューブに取り, 3 倍濃度の 1.5M NaCl buffer #1 16.5 μ l を加える。(DNA 量は 200ng/ml 程度の濃度とする。通常の G1PC98 の PCR で得られ, 本法で得られた抽出 DNA は 20 倍から 100 倍希釈して用いる。そのまま用いると陰性となることがある)

↓ 98℃, 5 分間加熱処理, 直ちに on ice する。

- 2) マイクロトレイに固定化液 #2 を 85 μ l 入れ, それに加熱処理した DNA を 15 μ l ずつ 1 検体当たり 3 ウェルに入れる。

#1: 3 倍 1.5M NaCl buffer: 4.5M NaCl, 30mM リン酸 2 ナトリウム, 30mM EDTA 2Na を加え, 精製水で 1,000ml に, pH7.0

#2: 固定化液: 3倍濃度1.5M NaCl buffer 3.0ml, DDW 6.0ml

		1	2	3	4	5	6	7
			N*	G	G	検	検	検
			C	1	2	体	体	体
						1	2	3
Probe con	A	○	○	○	○	○	○	○
G1 probe	B	○	○	○	○	○	○	○
G2 probe	C	○	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○	○
	E	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○

- NC: 陰性コントロール
- G1: G1 陰性コントロール
- G2: G2 陰性コントロール

トレイのレイアウト

↓プレートをシールし、37℃恒温槽に重しをして沈めて2時間以上置く。

3) PBS-T でプレートを3回洗浄する。

4) プレートにハイブリ液#3を各ウェルに80μl あて入れる。

5) 1検体当たり、プローブコントロール、G1プローブ、G2プローブを各22μl ずつ作製する。

#3: 3倍1.5M NaCl buffer 1.35ml, DDW1.26ml, ホルムアミド4.5ml, 10% Tween20 0.09ml を混合したもの。

プローブの調整 (1検体当たり)

プローブコントロール	T ₁₀ E ₁ 11μl + サケ精子 DNA11μl*
G1 プローブ	probe G1 11μl + サケ精子 DNA11μl
G2 プローブ	probe G2 11μl + サケ精子 DNA11μl

* サケDNA: DNA量10mg/mlのものをT₁₀E₁で100μg/mlに希釈し、それに2倍濃度の1.5M NaCl bufferと混合したもの。

6) 上記混合液(プローブ)を98℃, 5分間加熱処理, 直ちに on ice し, プローブコントロール, G1プローブ, G2プローブを20μl あてそれぞれの列に入れる。

↓42℃ 恒温槽に重しをして沈め, 6時間以上あるいは1夜置く。

7) シールを剥がし, PBS-T で3回洗浄する。液が飛び散らない様にする。PBS-T

は42℃に暖めておく。

- 8) ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (1%BSA+PBS-T で適宜希釈したもの) を全てのウェルに100 μ l 入れる。

↓室温1時間置く (弱く振動させるとよい)。

- 9) プレートを PBS-T で4回洗浄する。

- 10) 全てのウェルに発色液^{#4}を100 μ l 入れる。

^{#4}: TMB 1 mg, DMSO 1 ml, phosphate-citrate buffer 9 ml (0.2M 燐酸 2Na25.7ml, 0.1M クエン酸24.3ml, 精製水50ml, pH5.0), 30% H_2O_2 2 μ l(使用直前に作る)。

↓室温15分間 (プレートは遮光しておく)。

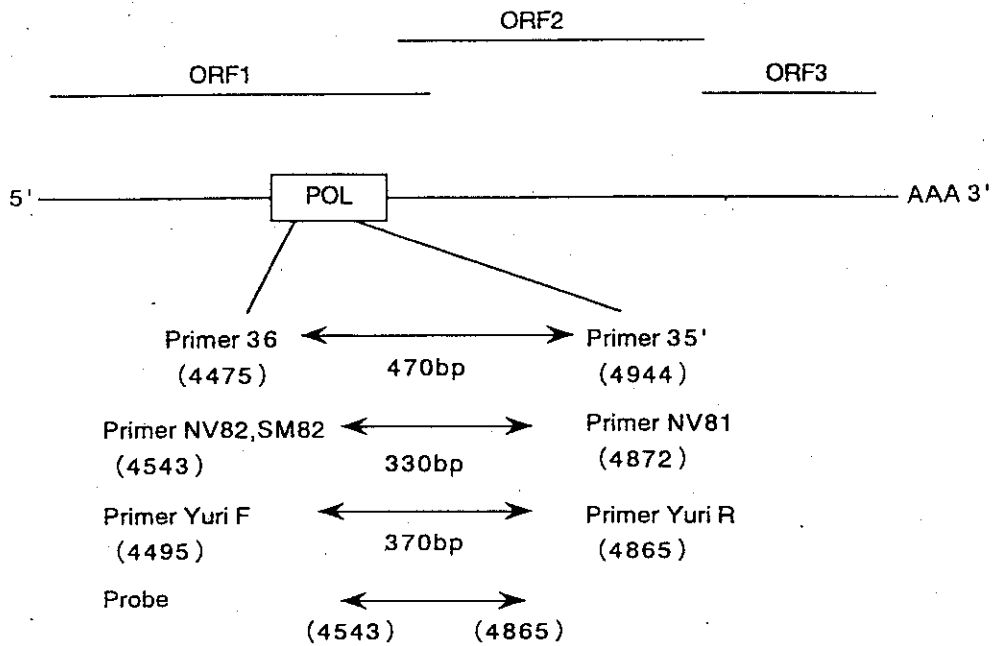
- 11) 停止液 (4N H_2SO_4) を50 μ l 入れる。

- 12) 450nm で吸光度を測定する。

- 13) 判定 コントロールに比べ OD 値が2倍以上, かつ0.2以上の差が認められた時に陽性とする。

4. 注意点

DNA の汚染を避けるため, プレートのシールを剥がす時, プレートの洗浄時には液を飛び散らさないこと。プレートの洗浄液は予め次亜塩素酸ナトリウム2,000PPM 程度を入れた容器に捨てること。実験台等が汚染されたときには次亜塩素酸ナトリウム1,000 PPM で拭く。



Primer 35'	5'-CTT GTT GGT TTG AGG CCA TA-3'	20 mer
Primer 36	5'-ATA AAA GTT GGC ATG AAC A-3'	19 mer
Primer NV81	5'-ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA-3'	20 mer
Primer NV82	5'-TCA TTT TGA TGC AGA TTA-3'	18 mer
Primer SM82	5'-CCA CTA TGA TGC AGA TTA-3'	18 mer
Primer Yuri 22 F	5'-ATG AAT GAG GAT GGA CCC AT-3'	20 mer
Primer Yuri 22 R	5'-CAT CAT CCC CGT AGA AAG AT-3'	20 mer
Primer SB2/F1	5'-AGC AAG CAC CGT ATT GAG CC-3'	20 mer (4468-4487)
Primer SB2/R1	5'-GTT TCA TGT CTG CTC CGT CTG-3'	21 mer (4687-4667)

Primer の Sequence と位置

ロタウイルス RT-PCR 法

A 群ロタウイルスを糞便から検出するためには、他の簡便なキットが多く市販されているので RT-PCR 法はあまり良い方法ではない。RT-PCR 法を使用するのは、A 群ロタウイルスが髄液、血清、咽頭拭い液など極微量に含まれていると思われる検体と血清型判定 (Serotyping) を行なう場合であろう。

1. 器具および試薬

サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器、マイクロピペット (2, 20, 200, 1000 μ l)、電気泳動装置 (ミューピッド-2, 株式会社アドバンス)、UV 照射写真撮影装置、マイルドミキサー (タイテック社)、マイクロチューブ (0.5, 1.5ml)、電気泳動用アガロース、分子量マーカー、グアニジンチオシアネイト (Fluka 社製)、Dimethyl sulfoxide, 1M Tris-HCl (pH8.3), 1M KCl, 1M MgCl₂, 1%ゼラチン, 100mM DTT, プライマー, AMV reverse transcriptase, 精製水。

2. ウイルス RNA の抽出

RNaid 法 (BIO101, Inc.フナコシ株式会社), Isogen LS 法 (ニッポンジーン社), その他, 色々な RNA 抽出キットが販売されている。抽出方法はキットに添付されているのでそれを参照して行う。我々は RNaid 法を使用しているのでその方法を紹介する。

1. 滅菌チューブ (1.5ml) に検体0.2ml を入れ, 6M グアニジンチオシアネイトを等量加える。
2. RNAMATRIX を 5 μ l 加えた後, マイルドミキサーで1時間攪拌する。
3. マイクロ冷却遠心器で8,000rpm でスピンドウン。上清を除く。
4. RNaid Kit に添付されている, Washing solution を 1ml 加えてミキサーにて沈さが無くなるまで良く攪拌する。
5. マイクロ冷却遠心器で8,000rpm でスピンドウン。上清を除く。
6. この操作を 3 回繰り返す, 沈さを残し乾燥させる。
7. 乾燥させた RNAMATRIX に25 μ l の滅菌蒸留水を加えて良く攪拌する。
8. 65°C 10分間加熱する。
9. マイクロ冷却遠心器で8,000rpm でスピンドウンし, その上清を検体とする。

3. RT-PCR 法

ここでは、VP 7 をコードする分節 9 を検出し、型別を行なう Gouvea⁴⁾らの方法を少し変更した現在我々が使用している方法を紹介する。

- 1) 抽出した dsRNA に 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) を加え 97°C で 5 分間加熱処理後、急冷する。
- 2) その検体に RT-PCR 反応液を加え 42°C に 1 時間置く。

反応液

1 M Tris-HCl (pH8.3)	1.5 μ l
1 M KCl	2.75 μ l
1 M MgCl ₂	0.15 μ l
1 % Gelatin	2.5 μ l
100mM DTT	0.25 μ l
2.5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	4.0 μ l
33.3 μ M プライマー (Beg 9 と End 9)	1.0 μ l
38.6 unit AMV reverse transcriptase	0.5 μ l
DDW	31.85 μ l
Sample dsRNA	5.0 μ l
Total	50.00 μ l

- 3) その後、1 単位の Taq または Tth polymerase 0.5 μ l を加えて PCR 反応を行う。

94°C 1 分間	}	30 回
42°C 2 分間		
72°C 3 分間		
72°C 7 分間		1 回

4. PCR 法 (Secondary PCR)

RT-PCR を行なった検体 1~5 μ l に各々 1 μ M プライマー (RV9 と aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9 の混合) と reverse transcriptase を除いた RT-PCR に使用した反応液を加え PCR を行なう。

5. アガロースゲル電気泳動

1.2% Seakem agarose を使用し、0.5g/ml ethidium bromide を含む Tris-borate buffer (0.089M Tris-0.089M boric acid-0.002M EDTA, pH 8) で 100V 約 40 分間電