

2. PCR の方法

- 1) 抽出 DNA 11 μ l を PCR 用チューブに入れ, 0.05M EDTA 0.5 μ l を加え 99 $^{\circ}$ C 10 分間加熱処理し, 急冷する (5 分間程度)。
- 2) 上記チューブを flash down した後, 下記の混合液をその中に加える。混合液はあらかじめ作り 4 $^{\circ}$ C に保っておく。
- 3) 混合液の調整
 - a. 1st PCR 調整液

DDW	57.5 μ l
25 μ M プライマー	
hexAA1885	4 μ l
hexAA1913	4 μ l
10倍 Taq buffer	10 μ l
2.5mM dNTPs	8 μ l
Taq(2.5unit)	0.5 μ l
計	84 μ l

b. Nested PCR 調整液

1st PCR 産物	5 μ l
DDW	68.5 μ l
25 μ M プライマー	
hexAA1893	4 μ l
hexAA1905	4 μ l
10倍 Taq buffer	10 μ l
2.5mM dNTP	8 μ l
Taq(2.5unit)	0.5 μ l
計	100 μ l

1st PCR プライマー

hexAA1885 : 5'-GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT-3'

hexAA1913 : 5'-CAG CAG GCC GCG GAT TGT CAA AGT-3'

Nested PCR プライマー

hexAA1893 : 5'-GCC ACC GAG ACG TAC TTC AGC CTG-3'

hexAA1905 : 5'-TTG TAC GAG TAC GCG GTA TCC TCG CGG TC-3'

3) PCR 反応

1st PCR および Nested PCR 共に、以下の条件で行う。

94℃	4分	1回	
94℃	30秒	30-35回	}
55℃	30秒		
70℃	30秒		
4℃	保存		

4) 電気泳動

1.8% 電気泳動用アガロースを用い、Tris-borate buffer (0.089M Tris, 0.089 M boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0) で100V 約40分間泳動し、ethidium bromide 染色し、UV 照射写真撮影を行い、バンドのサイズを確認して診断する。1st PCR は 301bp, Nested PCR は143bp である。

B: 全てのアデノウイルスを検出する PCR 法

1) プライマー

プライマーは3種類を用いる。

VA3a : 5'-CGG T(G/C)A GGC G(TC)G CGC AGTC-3'

VA3b : 5'-CGG TAA GAC GGG CGC AAT C-3'

VA6 : 5'-CGC AGC AC(C/G/T/A) GGA TGC ATC T-3'

2) 混合液

抽出 DNA	5 μ l
DDW	61.5 μ l
25 μ M プライマー (3種類, 各4 μ l)	12 μ l
10倍 Taq buffer	10 μ l
2.5mM dNTP	8 μ l
Taq(2.5unit)	0.5 μ l
計	100 μ l

3) PCR 反応

94℃	4分		1回
94℃	1分	}	35回
45℃	1分		
72℃	3分		
72℃	8分		1回
4℃	保存		

なお混合液は半量で行っても良い。

PCR 産物の確認は上記と同様方法で行う。

3つのプライマーを混合して用いることにより、アデノウイルス subgenus A は240 bp, B2は260bp, F は290bp に増幅される。F である Ad40と41型の PCR 産物は Ava I と Sfu I によって切断されない。しかし A および B2は切断される。

Subgenus B1, C, D あるいは E は400~520bp に増幅され、全て Taq I によって切断される。その切断パターンから subgenus を知ることができる(3)。

4) 文 献

1. Allard A et al., 1992, J. Med. Virology, 37: 149-157
2. Allard A et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28: 2659-2667
3. Kidd A H et al. 1996, J. Clin. Microbiol. 34: 622-627

平成11年9月10日 印 刷
平成11年9月22日 初版発行
平成12年7月10日 第2版発行

ウイルス性下痢症診断マニュアル（第2版）

編集・発行 国立感染症研究所 ウイルス第二部
衛生微生物技術協議会レファレンス委員会

連絡先 国立感染症研究所ウイルス第二部 武田 直和
〒162-8640 新宿区戸山1-23-1
Phone : 03-5285-1111 (ext.2522)
FAX : 03-5285-1161
E-mail : ntakeda@nih.go.jp

印刷所 昭和情報プロセス株式会社