

## 6. 1st PCR

1) 1st PCRはNLVとポリオウイルスの2つのA,B混合液を作製する。

表5. A ノーウオクウイルス (NLV)

1. DDW	33.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 $\mu$ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. NLV primer(25 $\mu$ M) <sup>注)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. NLV primer(25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. cDNA(Template)	5.0 $\mu$ l
7. EX Taq(5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

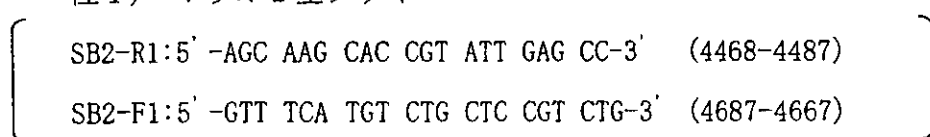
表6. B ポリオウイルス

1. DDW	33.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffe	5.0 $\mu$ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. SB2-R1primer(25 $\mu$ M) <sup>注1)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. SB2-F1 Primer(25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. cDNA(Template)	5.0 $\mu$ l
7. EX Taq(5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

注) primerは最適と思われるものを選択して用いる。なお、2種類以上のプライマーを用いる時にはプライマー毎にA液を作成する。現在のところ患者のふん便ではNLVを検出するのにCOG1F/COG1R、COG2F/COG2Rの両方を用いるのがよいようである。COG1F/COG1Rはgenotype 1 (G1)を、COG2F/COG2Rはgenotype 2(G2)を検出する。遺伝子型を調べるにはキャプシド領域のG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRを用いると良い。またポリメラーゼ領域には36/35'、MR3/MR4、NV82、SM82/NV81、Yuri22F/ Yuri22R、P1, 2, 3、Y1/Y2、SR33, 46, 48, 50, 52等のプライマーを用いる。

食品の1st PCRでは、G1はCOG1FとG1-SKR、G2はCOG2FとG2-SKRで行い、Nested PCRではG1はCOG1F/COG1RおよびG1-SKF/G1-SKR、G2はCOG2F/COG2RおよびG2-SKF/G2-SKRで行う。確認試験はCOGプライマーで増幅したものはRING1(a, b)およびRING2プローブ(図2、表8参照)を用いたハイブリダイゼーションで、G1-SKF/G1-SKRおよびG2-SKF/G2-SKRはシーケンスで行うのが現状ではよいと考えられる。さらに検査精度を高めるためにポリメラーゼ領域に(ポリメラーゼ領域のプライマーは図1および表8を参照)についても行うことが望ましい。また、各自が最も良いと判断したプライマーを用いて行って良い。

注1) ポリオ2型プライマー<sup>文献1)</sup>



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

増幅は 94°C 3分を1 サイクル、94°C 1分、50°C 1分、72°C 2分を40 サイクル、72°C 15分を1 サイクルで行う。増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適な条件で行うと良い。PCR の陽性コントロールは大腸菌に NLV を組み込んだものを用いるとよい。

## 3) 電気泳動

PCR 産物 8 $\mu$ l と 5 倍 Loading buffer 2 $\mu$ l を混合し、1.5%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動 buffer は TAE を使用する。

## 4) アガロースゲル染色

泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色液(TAE 溶液 100ml にエチジウムブロマイド 10mg/ml のものを 10 $\mu$ l 加えた溶液)に 20 分間入れておく。この時に緩やかに揺ると良い。

## 5) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。食品では 1st PCR でバンドが見られなかった時には(多くの例では見られない)、次に Nested PCR を行う。

## 7. Nested PCR法

### 1) Nested PCRの調製

表7. Nested PCRの混合液

1. DDW	36.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 $\mu$ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. NLV primer (25 $\mu$ M) <sup>注)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. NLV Primer (25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. 1st PCR産物	2.0 $\mu$ l
7. EX Taq	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

注) NLVプライマーは1st PCRに用いたものの内側に設定されたプライマーあるいはセミNested PCRで行う。

1) 表7の混合液を作製する。

2) PCR反応、電気泳動

増幅は1st PCRと同様に行うが、サイクル数は35とする。

Nested PCR産物の電気泳動、UV照射で写真撮影、バンドの確認は1st PCRと同様に行う。

## 8. 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10,000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い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ノーウ  
オークウイルス株と同じ系統に属する配列が認められた時に陽性とする。

図1. NLV ORF1部分のプライマーの位置

図2. NLV ORF2部分のプライマーの位置

表8. NLVのプライマーとプローブの塩基配列

## II. ハイブリダイゼーション

### A. マイクロプレートハイブリダイゼーション法

ここではPCR産物の確認試験としてのマイクロトレイハイブリダイゼーション法につ  
いて記す。この方法はマイクロプレート上でハイブリダイゼーションを行うもので、洗  
いが簡単であり、反応は通常の酵素抗体法と同一である<sup>文献11)</sup>。42°Cでハイブリダイ  
ゼーションを行うと、80%以上の相同性のときに陽性となる。ハイブリダイゼーショ  
ンの温度を上げるとさらにその感度は高まる<sup>文献12)</sup>。

#### 1. 必要な器具と試薬

##### 1) 器具

恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、マイクロプレート  
リーダー、UV防御メガネ、サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器 (15,000rpm)、ウ  
ォーターバス、ヘラ、ハサミ、メス、マイクロピペット (2、20、200、1000  $\mu$ l)、  
マイクロプレート (NUNC-IMMUNO PLATE、Cat.No. 442404)

##### 2) 試薬

MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN Cat.No. 28604)、フナゲルチップ、ホルム  
アミド、Tween20、サケ精子DNA、マイクロプレートシール、ペーパータオル、ストレプ  
トアビジン標識ペルオキシダーゼ (BIOSOURCE、Cat. #SNN1004)、リン酸水素二ナトリウ  
ム、クエン酸、30% 過酸化水素、硫酸、T3, 3, 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB)、ジメ  
チルスルホキシド (SDS)、ウシ血清アルブミン (SIGMA、Cat No. A-2153)、3M 酢酸ナトリ

ウム (pH5.0)、100%イソプロパノール。

## 2. ゲルからのDNA抽出法 (MinElute Gel Extraction KitによるPCR産物の精製)

マイクロ遠心機を利用する方法を示す。

このプロトコールは、TAE buffer または TBE buffer の標準的なアガロースゲル、あるいは低温融解アガロースゲルから、70bp から 4kb の DNA フラグメントを高い最終濃度で抽出、精製することができる。1 個のスピンカラムにつき、最大 400mg のアガロース処理が可能である。Buffer QG は pH7.5 以下の時、黄色になる。すべての遠心操作は、一般的な卓上遠心機で  $\geq 10,000Xg$  ( $\sim 13,000rpm$ ) で行う。

### 1) 使用前に行う試薬の調整

- (1) 使用前に Buffer PE にエタノール (96~100%) を添加する (添加容量は試薬ボトルのラベルを参照)。
- (4) 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.0) が必要な場合がある。

### 2) 操作法

- (1) 清潔で刃の鋭いメスあるいはフナコシのフナゲルチップでアガロースゲルから DNA フラグメントを切り取る。余分なゲルを取り除いて、ゲルスライスサイズを最小とする。
- (2) 1.5ml のチューブにゲルスライスを測り入れる。サンプルゲル (100mg = 100  $\mu$ l とする) に対して 3 倍容量の Buffer QG を添加する。
- (3) 50°C で 10 分間 (ゲルが完全に溶解するまで) インキュベートする。ゲルの溶解を助けるため、インキュベーション中、2~3 分に 1 度チューブを Vortex にかけて溶液を混合する。

注：アガロースゲルを完全に溶解する。2%以上のゲルを用いる場合は、インキュベーション時間を長くする。

- (4) ゲルスライスが完全に溶解後、溶液の色が黄色であることを確認する (アガロース溶解前の Buffer QG の色とほぼ同じ)。

注：溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M の酢酸ナトリウム (pH5.0) を 10  $\mu$ l ずつ添加混合し、溶液の色が黄色になるようにする。DNA のメンブレンへの

吸着は、pH7.5 以下においてのみ効率的に行われるので、pH 指示薬により pH7.5 以下で黄色、それより高い pH ではオレンジまたは紫色を呈する Buffer QG は、DNA 結合に最適な pH を決定するのに便利である。

- (5) ゲルと同容量のイソプロパノールをサンプル溶液に添加し、チューブを 10 回上下混合する。  
例えば、100mg のアガロースゲルスライスには、100  $\mu$ l のイソプロパノールを添加する。この時点でサンプルを遠心しない。
- (6) ラックにセットした 2ml コレクションチューブに MinElute カラムを乗せる。
- (7) サンプルを MinElute カラムにアプライし、DNA をカラムに結合して、1 分間遠心する。最大の回収率を得るために、サンプル液は残さず全てカラムに添加する。カラムへ 1 度に添加可能な最大容量は 800  $\mu$ l である。800  $\mu$ l よりサンプル量が多い場合には、数回に分けて添加、遠心操作を行う。
- (8) フロースルー液は捨て、MinElute カラムを同じコレクションチューブに再度乗せる。
- (9) 500  $\mu$ l の Buffer QG をスピнкаラムに添加し、1 分間遠心する。
- (10) フロースルー液は捨て、Min Elute カラムを同じコレクションチューブに再度乗せる。
- (11) 洗浄のため、750  $\mu$ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加し、1 分間遠心する。
- (12) フロースルー液を捨てた後、MinElute カラムをさらに 1 分間  $\geq 10,000 \times g$  ( $\sim 13,000 \text{rpm}$ ) で遠心する。
- (13) 新しい 1.5ml のマイクロ遠心チューブに MinElute カラムを乗せる。
- (14) DNA の溶出を行うために、10  $\mu$ l の Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH8.5) あるいは DDW をメンブレン表面の中央に添加し、1 分間カラムを放置後、1 分間遠心する。これが抽出 DNA である。

↓ 15,000 rpm、30 分間遠心する。液層を除き、乾燥させる。

T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> を 200  $\mu$ l 加え、56°C 10 分間置いた後、使用時まで -70°C で保存する。これをプローブとして用いる。プローブは使用前に DNA 量を 200ng/ml から 500ng/ml 濃度にして用いる。

### 3. ハイブリダイゼーション

1) 抽出 DNA を 0.5ml のチューブに取り、1.5M NaCl buffer<sup>#1</sup> でバンドの濃度を見て適宜希釈する (DNA 量は 200ng/ml 程度の濃度とする)。なお通常の PCR でバンドがしっかりとみられた増幅 DNA (PCR 産物 8 $\mu$ l を泳動) は 5 倍から 20 倍希釈して用いる。そのまま用いると OD 価が低くなり、時には陰性となることがある。

↓98 $^{\circ}$ C、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<sup>#2</sup>を 85 $\mu$ l 入れ、それに加熱処理した DNA を 15 $\mu$ l ずつ 1 検体当たり 3 ウェルに入れる (プローブが 2 種類の時、通常プローブの数+1)。

#1 : 3 倍濃度 1.5M NaCl buffer : 4.5M NaCl、30mM リン酸 2 ナトリウム、30mM EDTA $\cdot$ 2NA、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
			C	1	2	体	体
						検	検
						体	体
Control	A	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○
RING1-Tp(a), (b) probe	C	○	○	○	○	○	○
RING2-Plate probe	D	○	○	○	○	○	○

図 3. トレイのレイアウト

↓プレートにシールし、37 $^{\circ}$ C 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) 表 9. に示したようにプローブの調製を行い、98 $^{\circ}$ C、5 分間加熱処理、直ちに on ice する。

表 9. プロブの調製(1 検体当たり)

	Probe control	RING1-Tp(a), (b) probe	RING2-Plate probe
100pmol/ $\mu$ l probe (Probe control は TE)	TE 2 $\mu$ l	RING1-Tp(a) probe RING1-Tp(b) probe 各 2 $\mu$ l	RING2-Plate probe 2 $\mu$ l
100 $\mu$ g/ml サケ精子 DNA 注 <sup>1</sup>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
3 倍 1.5M NaCl buffer	3 $\mu$ l	1 $\mu$ l	3 $\mu$ l

注<sup>1</sup> サケ DNA : DNA 量 10mg/ml のものを T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> で 100  $\mu$ g/ml に希釈したもの

- 5) 表 10. に示したようにハイブリ液を調整し、4) のプロブ・サケ精子 DNA 混合液に合わせる。

表 10. ハイブリ液(1 検体当たり)注

	Probe control RING2-Plate probe	RING1-Tp(a), (b) probe
3 倍 1.5M NaCl buffer	30 $\mu$ l	32 $\mu$ l
ホルムアミド	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
10% Tween20	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
DDW	9 $\mu$ l	7 $\mu$ l

注) ハイブリ液は使用前に冷やしておく。

- 6) 5) の混合液を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ入れる。

↓ プレートにシールをし、45 °C 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) シールのプレート側を内側にして巻き込むように剥がす(プレート内の DNA を撒き散らさないように包み込む)。45 °C に温めておいた PBS-T で 3 回洗浄する。プレート洗浄時にはプレートをペーパータオル等で包み、その後叩き水分を完全に除くと同時に DNA を周りに撒き散らさないように細心の注意を払う。使用したペーパータオル、洗浄液等は 1000ppm の次亜塩素酸ソーダに漬ける。



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 $\mu$ l入れる(ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ入れた容器は使用後廃棄するか高圧滅菌し酵素を不活化する)。

↓室温1時間置く(弱く振動させるとよい)。

- 8) プレートをPBS-Tで5回洗浄する。
- 9) 全てのウェルに発色液\*を100 $\mu$ l入れる。

\*: TMB 1mg、DMSO 1ml、phosphate-citrate buffer 9ml (0.2M リン酸水素二ナトリウム 25.7ml、0.1M クエン酸 24.3ml、精製水 50ml、pH5.0)を作製し、30% 過酸化水素 2 $\mu$ lを使用直前に入れる。

↓室温15分間(プレートは遮光しておく)。

- 10) 停止液(4N 硫酸)を50 $\mu$ l入れる。
- 11) 450nmで吸光度を測定する。
- 12) 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。

## B. ドットハイブリによるNLV遺伝子確認検査

この方法はメンブレンにDNAを吸着させて行う方法である。ウイルスでは一般的にこの方法で行われている。

### 1. 器具

恒温水槽、ハイブリダイゼーションインキュベータ、トランスイルミネータ、ヒートシーラ、ポジティブチャージナイロンメンブレン(Nylon membranes, positively charged ベーリンガー Cat.No.1209272)

ハイブリダイゼーションバッグ(ニッポンジーン, Cat.No.533-19171)

タッパー井内 Code.No.45-068-022)

### 2. 試薬

NaCl、濃塩酸、DDW、SDS、マレイン酸、MgCl<sub>2</sub>、

20×SSC [NaCl 100gを900mlの蒸留水に溶解(68℃)し、濃塩酸でpH7.2に調整後、蒸留水で、1000mlとする。]

10% SDS [SDS 100g を 900ml の蒸留水に溶解(68°C)し、濃塩酸で pH7.2 に調整後、蒸留水を加え全量を 1000ml とする]。

N-Lauroylsarcosine (SIGMA, Cat.No.L-5777)

ホルムアミド(Wako, Cat.No.068-00426)

Blocking reagent (ベーリンガー Cat.No.1096176)

NBT/BCIP(ベーリンガー Cat.No.1681451)

Buffer 1 [0.1M マレイン酸 0.15M NaCl (pH7.5, 20°C) pH の調整は pH6.5 くらいまで固形 NaOH(8.5g)で、それ以降は 1N NaOH を加えて調整する]。

洗浄 Buffer [Buffer 1 に 0.3%となるように Tween 20 を加える]。

ブロッキング溶液 [Buffer 1 で Blocking reagent を 1%とする]。

検出溶液 [100mM Tris-HCl 100mM NaCl (pH9.5, 20°C)10ml に 2.5M MgCl<sub>2</sub>を 200 μl 加える(最終濃度 50mM MgCl<sub>2</sub>)]。

Streptavidin Alkaline Phosphatase (Promega, Cat.No.V5591)

ビオチン標識プローブ(プローブにビオチンを標識したもの、作製は業者に依頼する)。

### 3. 操作法

- 1) アガロースゲル電気泳動で NV 陽性バンドが認められた部分から DNA を抽出後、100°Cで 5 分間熱変成し、1 μl をナイロンメンブレンにスポットし風乾後する(上記ゲルから DNA 抽出を参照)。
- 2) トランスイルミネータ上でスポットした面を下にして 3 分間 UV 照射する。それをハイブリダイゼーションする。
- 3) 溶液量は、約 20cm<sup>2</sup> のメンブレンで計算してあるので、メンブレンの面積によって以後適宜調整する。
- 4) ハイブリ液(表 11)5ml にビオチン標識プローブを 50 μl (200ng/ml) 加えプローブ溶液を調整し、沸騰水中で 5 分間(98°C、5 分間)、加熱しプローブ溶液を調整する。適量のプローブ溶液(2~5ml)をメンブレンの入っているバックに加え、バッグ中から気泡を追い出した後ヒートシーラでシールする。
- 5) 42°Cの恒温水槽中で 6 時間~一夜ハイブリダイゼーションする。

表 11. ハイブリダイゼーション溶液

Stock solution	Final concentration	Required volume for 50ml
20×SSC	5×	12.5ml
10% Blocking reagent	2%	10ml
10% N-Lauroylsarcosine	0.1%	0.5ml
10% SDS	0.02%	0.1ml
Formamide	50%	25ml
DDW		2ml

6) バッグからメンブレンを取り出し、タッパーに移し 0.1% SDS を含む 2×SSC(表 12 参照)20ml で 5 分間、室温で 2 回洗浄する。その後、0.1% SDS を含む 0.1×SSC(表 12 参照)20ml で 15 分間、42℃で 2 回洗浄する。

注:使用したプローブ溶液は、数回使用できるので、捨てずにとっておく。使用前には、沸騰水中で 5～10 分間熱変成する。0.1% SDS を含む 0.1×SSC は、あらかじめハイブリダイゼーション温度と同じ温度に温めておく。

表 12. 洗浄液の組成

Stock solution	2×SSC, 0.1% SDS	0.1×SSC, 0.1% SDS
20×SSC	50ml	2.5ml
10% SDS	5ml	5ml
DDW	445ml	492.5ml
Total	500ml	500ml

- 7) メンブレンを洗浄 Buffer 1 の 20ml に 10% Tween 20 を 600 $\mu$ l 加えた Buffer で 1 分間洗浄する。
- 8) ブロッキング溶液 20ml で 30 分間、室温でインキュベートする。
- 9) ブロッキング溶液 200ml で Streptavidin Alkaline Phosphatase を 5000 倍希釈した溶液 20ml にメンブレンを浸漬し、30 分間室温でインキュベートする。
- 10) 洗浄 Buffer 25ml で 15 分間室温 2 回洗浄する。

- 11) 検出溶液 20ml で2 分間、平衡化のためインキュベートする。
- 12) 検出溶液 5ml に NBT/BCIP stock 溶液 100  $\mu$ l を加え、発色基質溶液を調整する。  
加える stock 溶液は 50  $\mu$ l でも行える。
- 13) 検出溶液で平衡化したメンブレンをハイブリバッグに移し、発色気質溶液を 3～5ml 加え、気泡を追い出した後ヒートシーラでシールする。発色するまで、静置する。発色中は、振とうしたり攪拌したりしない
- 14) 発色が確認できたら、メンブレンを TE Buffer 30～50ml で 5 分間洗浄して、反応を停止させる

#### 4. 判定

紫色にスポットが染色されたものを陽性とする。この際には必ずゲルの陰性コントロールと比較して行う。

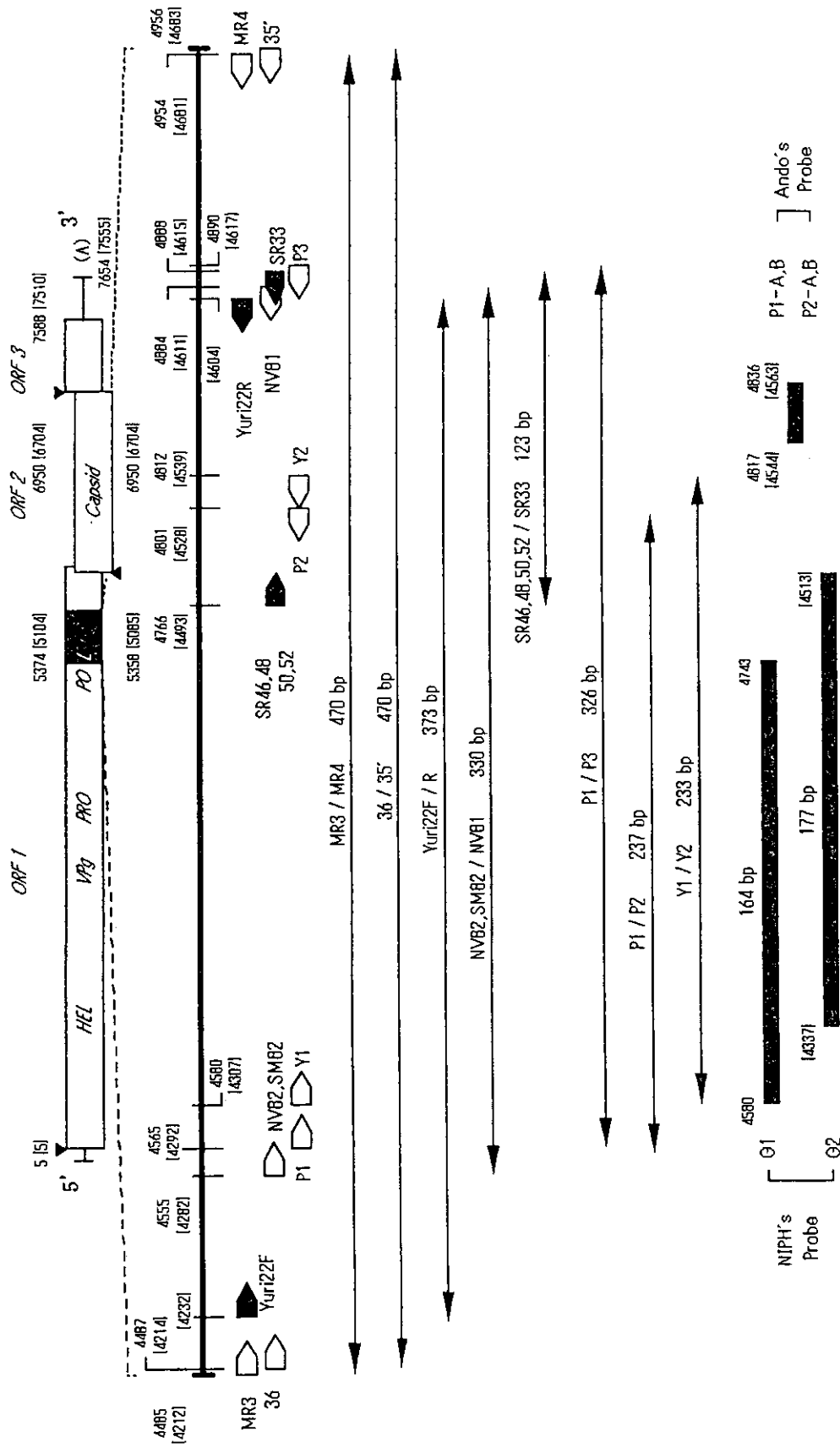
#### IV. 文献

- 1) 武田 直和：未発表データ
- 2) Moe C.l. et al. : J Clin Microbiol 32:642(1994)
- 3) Lew J.F. et al. : J Virol 68:3391(1994)
- 4) 林直志他：未発表データ
- 5) Saito H. et al. : Microbiol Immunol 42:439(1998)
- 6) 山崎謙治他：感染症学雑誌 74:470 (2000)
- 7) Ando T. et al. : J Clin Microbiol 33:64(1995)
- 8) Kobayashi S. et al. : Microbiol Immunol 44:687(2000)
- 9) 篠原美千代他：第48回日本ウイルス学会学術集会抄録 P264 (2000)
- 10) 景山 努他：Vita 18:42(2000)
- 11) Inouye S. et al. : J Clin Microbiol 28 : 1469 (1990)
- 12) 西尾 治他：第48回日本ウイルス学会学術集会抄録 P236(2000)
- 13) Ando T. et al. : J Clin Microbiol 33:64 (1995)
- 20) Mitchell D K. : J Infect Dis 192:1437 (1995)
- 21) Marx F.E. et. al. : Water S A 23:257 (1997)
- 22) 西尾 治：未発表

23) 石古博昭他：未発表

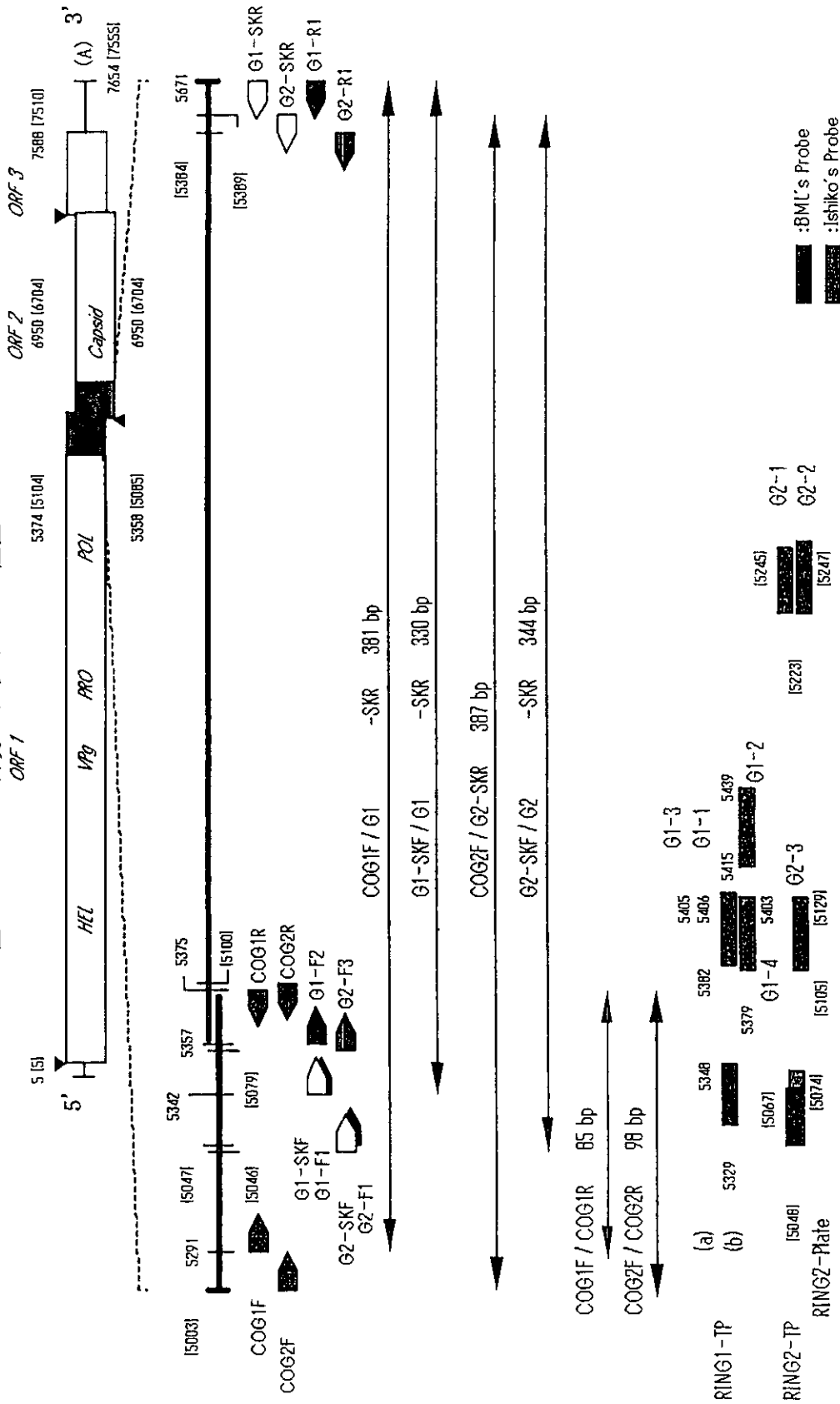
(国立公衆衛生院衛生微生物学部 西尾 治)

図1 NLV ORF1部分のプライマーの位置



position...G1, Norwalk/68/US (M87661 : Last updated,26-MAR-1997 )  
 括弧内はG2, Lordsdale/93/UK (X86557 : Last updated,15-NOV-1995 )

図2 NLV ORF2部分のプライマーの位置



position...G1, Norwalk/68/US (M87661 : Last updated,26-MAR-1997 )

括弧内はG2, Lordsdale/93/UK (X86557 : Last updated,15-NOV-1995 )

表8 NLVのプライマーとプローブの塩基配列

Primer	塩基配列 [5' - 3']	sense	文献	Probe	塩基配列 [5' - 3']	sense	文献
36	ATA AAA GTT GGC ATG AAC A	+	2	SR47d : P2B	ATG TCA GGG GAC AGG TTT GT	-	7
35'	C TT GTT GGT TTG AGG CCA TA	-	2	SR61d : P2A	ATG TCG GGG CCT AGT CCT GT	-	7
MR3	CCG TCA GAG TGG GTA TGA A	+	3	SR63d : P1A	ACA TCA GGA GAG TGC CCA CT	-	7
MR4	AGT GGG TTT GAG GCC GTA	-	3	SR65d : P1A	ACA TCA GGT GAT AAG CCA GT	-	7
NV82	TCA TTT TGA TGC AGA TTA	+	4	SR67d : P1B	ACA TCT GGT GAG AGA CCT GA	-	7
SM82	CCA CTA TGA TGC AGA TTA	+	4	SR69d : P1A	ACA TCG GGT GAT AGG CCT GT	-	7
NV81	ACA ATC TCA TCA CCA TA	-	4	RING1 - TP(a)	AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA	+	10
YURI22F	ATG AAT GAG GAT GGA CCC AT	+	5	RING1 - TP(b)	AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA	+	10
YURI22R	CAT CAT CCC CGT AGA AAG AG	-	5	RING2 - TP	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	+	10
P1	GCT GAT TAC TCT SGS TGG GA	+	6	RING2 - Plate	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTB GCT CCC	+	22
P2	ACA CAG AGT GAG SAR CCA GTG	-	6	G1-1 (Ishiko)	CCA ACA AAC ATG GAT GGC ACC AGT G	+	23
P3	GTR STC ACA ATY TCA TCA TC	-	6	G1-2 (Ishiko)	CAG TTG GTA CCG GAG GTT AAT GCT T	+	23
Y1	TGG GAC TCA ACA CAR CAG AG	+	6	G1-3 (Ishiko)	CCT CAA AGC GCT GAT GGC GCA AGC	+	23
Y2	TCA GAM AGK GCA CAS AGA GT	-	6	G1-4 (Ishiko)	GCT ACA CCA AGC GCA GAT GGC GCC A	+	23
SR33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	-	7	G2-1 (Ishiko)	ATA ATT GAC CCC TGG ATT AGA AA	+	23
SR46	TGG AAT TCC ATC GCC CAC TGG	+	7	G2-2 (Ishiko)	ATA ATT GAT CCC TGG ATT ATG AAT A	+	23
SR48	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	+	7	G2-3 (Ishiko)	CGC CGC TCC ATC TAA TGA TGG TGC A	+	23
SR50	GTG AAC AGT ATA AAC CAC TGG	+	7				
SR52	GTG AAC AGT ATA AAC CAT TGG	+	7				
G1 - SKF	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	+	9				
G1 - SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	-	9				
G2 - SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	+	9				
G2 - SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	-	9				
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	+	10				
COG1R	C TT AGA CGC CAT CAT TYA C	-	10				
COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	+	10				
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-	10				

IUB CODES

R = A or G  
 Y = C or T  
 K = G or T  
 M = A or C  
 S = G or C  
 W = A or T  
 N = aNy base

B = C, G or T  
 D = A, G or T  
 H = A, C or T  
 V = A, C or G