

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、ゲルスライスの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の乗せる。
- (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  $\geq 10,000Xg$  (~13,000rpm) 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 値が低くなり、時には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<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・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
	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℃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℃、5 分間加熱処理、直ちに on ice する。

表 9. プローブの調製(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 <sup>注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

<sup>注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)のプローブ・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)<sup>注)</sup>

	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°C)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 $\mu$ l 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 $\mu$ l 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 $\mu$ l (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、捨てずに取っておく。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。

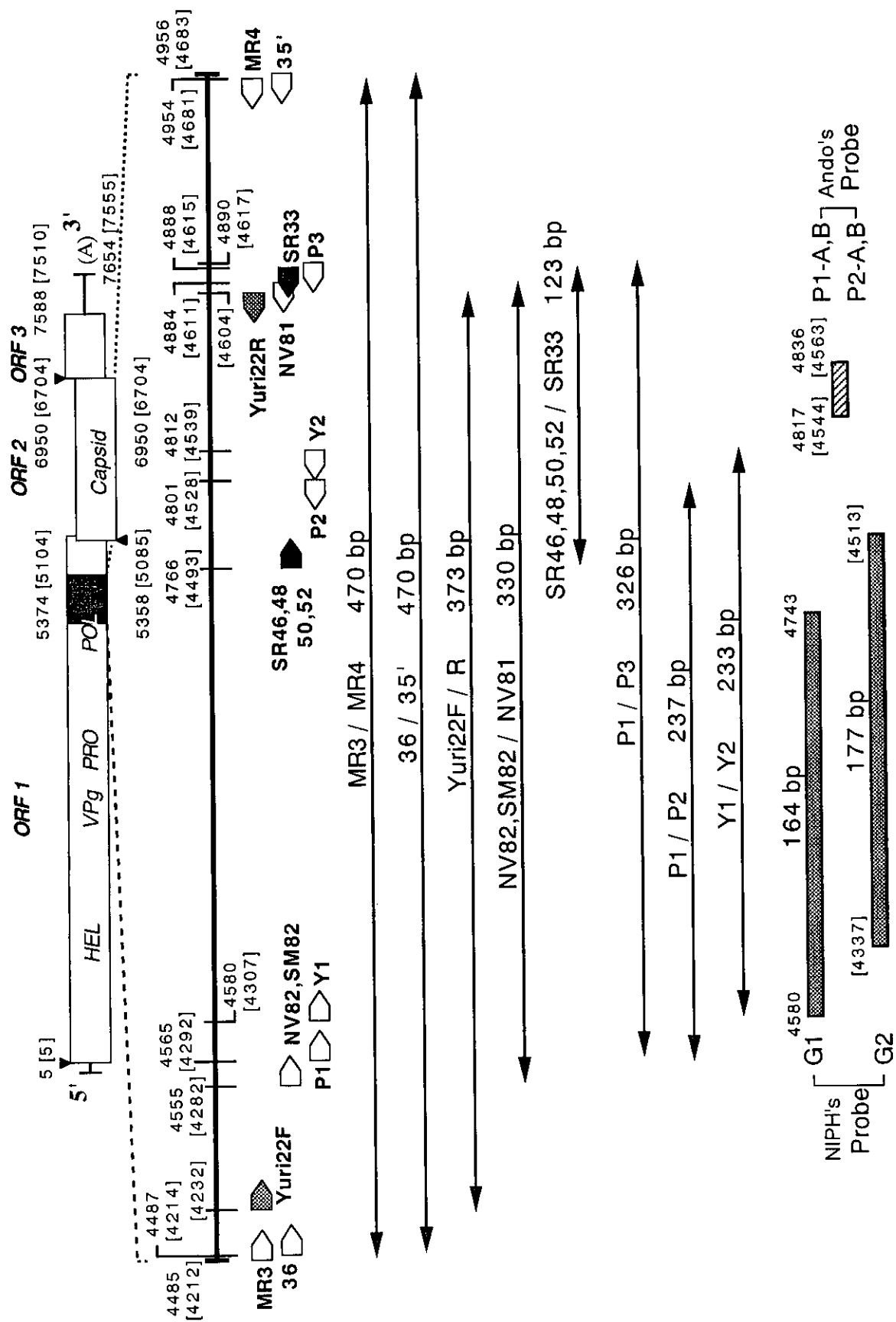
#### IV. 文献

- 1) 武田 直和：未発表データ
- 2) Moe C. I. 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



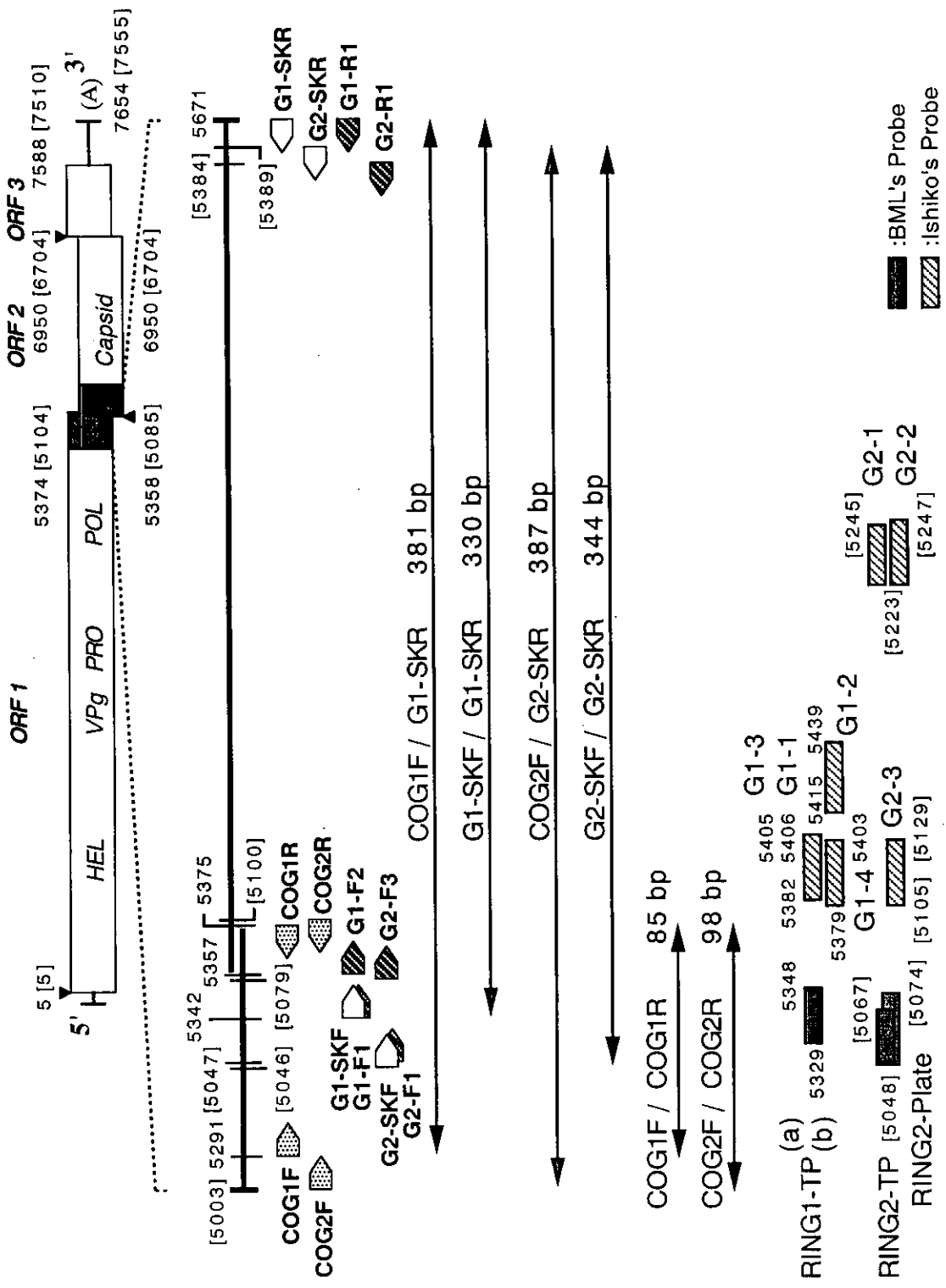
23) 石古博昭他：未発表

(国立公衆衛生院衛生微生物学部 西尾 治)



position...G1, Norwalk/68/US (M87661) : 括弧内はG2, Lordsdale/93/UK (X86557)

図 1. NLV ORF 1 部分のプライマーの位置



position...G1, Norwalk/68/US (M87661) : 括弧内はG2, Lordsdale/93/UK (X86557)

図 2. NLV ORF 2 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

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'注1	CTT 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 GGI 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 TCA CCA TA	-	4	RING1 - TP(a)	AGA TYG CGA TCG 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				
G1 - F1	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GAT	+	8				
G1 - F2	AAT GAT GAT GGC GTC TAA GGA	+	8				
G1 - R1	CCA ACC CAR CCA TTR TAC ATT T	-	8				
G2 - SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	+	9				
G2 - SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	-	9				
G2 - F1	GTG GGA GGG CGA TCG CAA TCT	+	8				
G2 - F3	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG A	+	8				
G2 - R1	TGC ATA ACC ATT RTA CAT TCT	-	8				
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	+	10				
COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT TYA C	-	10				
COG2F	CAR GAR BGN 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

注 1: 35'は 35 の 3'末端の "T" を切って 1bp 短くしたものの。

**IV**

**付録**

**陰電荷膜を用いた海水からの  
ウイルス濃縮法マニュアル**

## 陰電荷膜を用いた海水からのウイルス濃縮法

### <試薬>

MF-MEMBRANE FILTERS (MILLIPORE、孔径 0.45  $\mu\text{m}$ 、径 142mm、Cat.No. HAWP14250)

MF-MEMBRANE FILTERS (MILLIPORE、孔径 5.0  $\mu\text{m}$ 、径 142mm、Cat.No. SMWP14250)

$1.0 \times 10^{-3}$  N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH3)

$1.0 \times 10^{-3}$  N NaOH (pH10.5)

0.1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

100 倍 TE バッファー (オートクレーブ滅菌)

amicon Centriprep Concentrator 50 (MILLIPORE、Cat.No. 4310)

### <操作法>

#### 1. 吸着工程

孔径 5  $\mu\text{m}$  の膜の下に孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の膜を重ねて濾過機に装着し、海水を 10 ~ 20L (900ml/min の流速で) 通す。

(陽イオンによって負に帯電したウイルスが陰電荷膜に吸着する。)

#### 2. 酸洗浄工程

次いで、 $1.0 \times 10^{-3}$  N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH3) 1.8L (900ml/min の流速で) を膜に通す。

(酸によって陽イオンは誘出される。ウイルスは酸性では正に帯電しており、陰電荷膜に吸着する。)

#### 3. アルカリ誘出工程

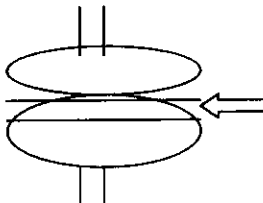
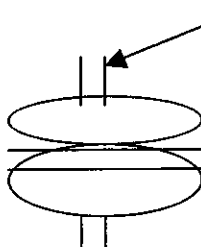
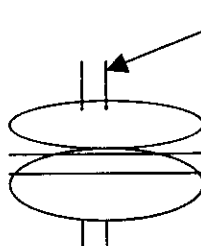
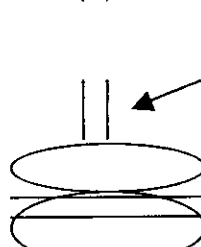
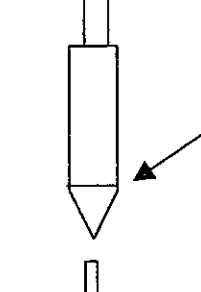
あらかじめ 0.1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  225  $\mu\text{l}$  と 100 倍 TE バッファー 450  $\mu\text{l}$  を入れた 50ml 遠心管を排水口に装着し、 $1.0 \times 10^{-3}$  N NaOH (pH10.5) 45ml を膜に注ぎ、5 分間置いた後、濾液をゆっくりに (10ml/min の流速) 回収する。

(アルカリによって再び負に帯電し、陰電荷膜から誘出される。)

#### 4. 再濃縮

遠心式フィルターユニット (MILLIPORE、Centriprep Concentrator 50) を用いて、2500rpm、4°C、10 分間遠心分離後に膜を透過した液層を捨て、管壁に残った液層を回収する。数回行ない最終 1.5ml 程度にする。

## 陰電荷膜を用いた海水からのウイルス濃縮法

1. 上に  $5\mu\text{m}$  のフィルター  
下に  $0.45\mu\text{m}$  のフィルターを置く
  2. 海水を 10~20 L 通す (流速  $900\text{ml}/\text{min}$  程度)
  3. 0.001 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH3.0) を 1.8 L 通す  
(流速  $900\text{ml}/\text{min}$  程度)
  4. 0.001 N  $\text{NaOH}$  (pH10.5) を 45ml 通す  
(ゆっくり通す  $10\text{ml}/\text{min}$  程度の流速)
  5. 50ml 遠心管を濾過器の下に付ける  
0.1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH3)  $225\mu\text{l}$   
100倍  $\text{T}_{10}\text{E}_1$  バッファー  $450\mu\text{l}$   
を入れて置く
5. 遠心管に溜まった液を超遠心あるいは amicon で 1.5ml 程度に再濃縮する