

表3. ポリエチレンイミン磁気ビーズ処理による培養上清中のウイルス感染価の低下

		TCID ₅₀ in Virus suspension (xlog10)
SV-40 virus	Applied Sample	7.8 ± 6.1*
	Upper layer treated with PEI-beads	3.0 ± 2.3
HSV-1	Applied Sample	7.8 ± .60
	Upper layer treated with PEI-beads	2.5 ± 1.5
Sindbis virus	Applied Sample	6.5 ± 4.8
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3 ± 2.0
VSV	Applied Sample	8.6 ± 6.6
	Upper layer treated with PEI-beads	2.5 ± 1.8
PPV	Applied Sample	6.8 ± 5.3
	Upper layer treated with PEI-beads	6.6 ± 5.1
Poliovirus	Applied Sample	7.0 ± 5.7
	Upper layer treated with PEI-beads	7.0 ± 6.0

Means ± S.D. (n=4)

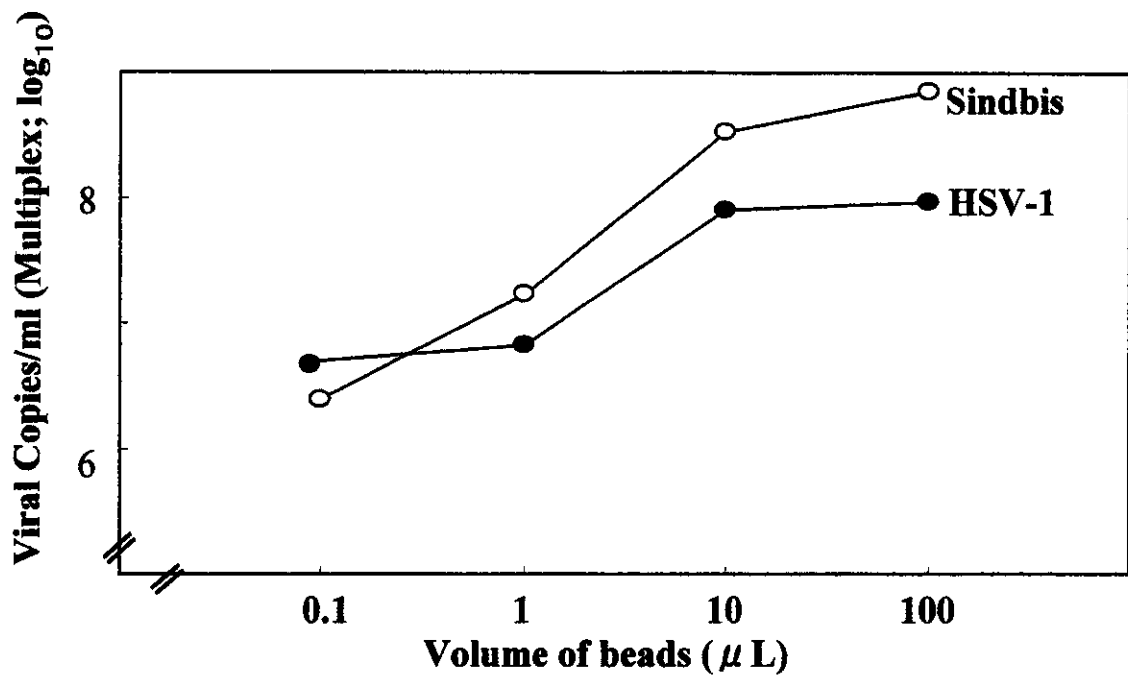


図4. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮の用量依存性

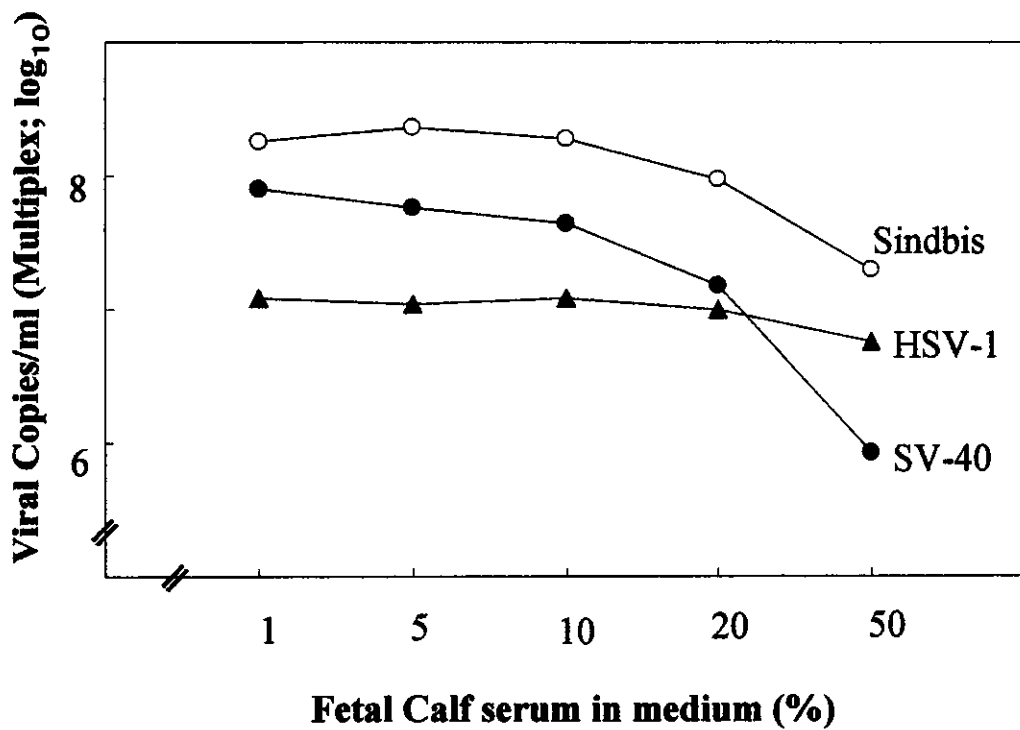


図5. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮に対する血清の影響

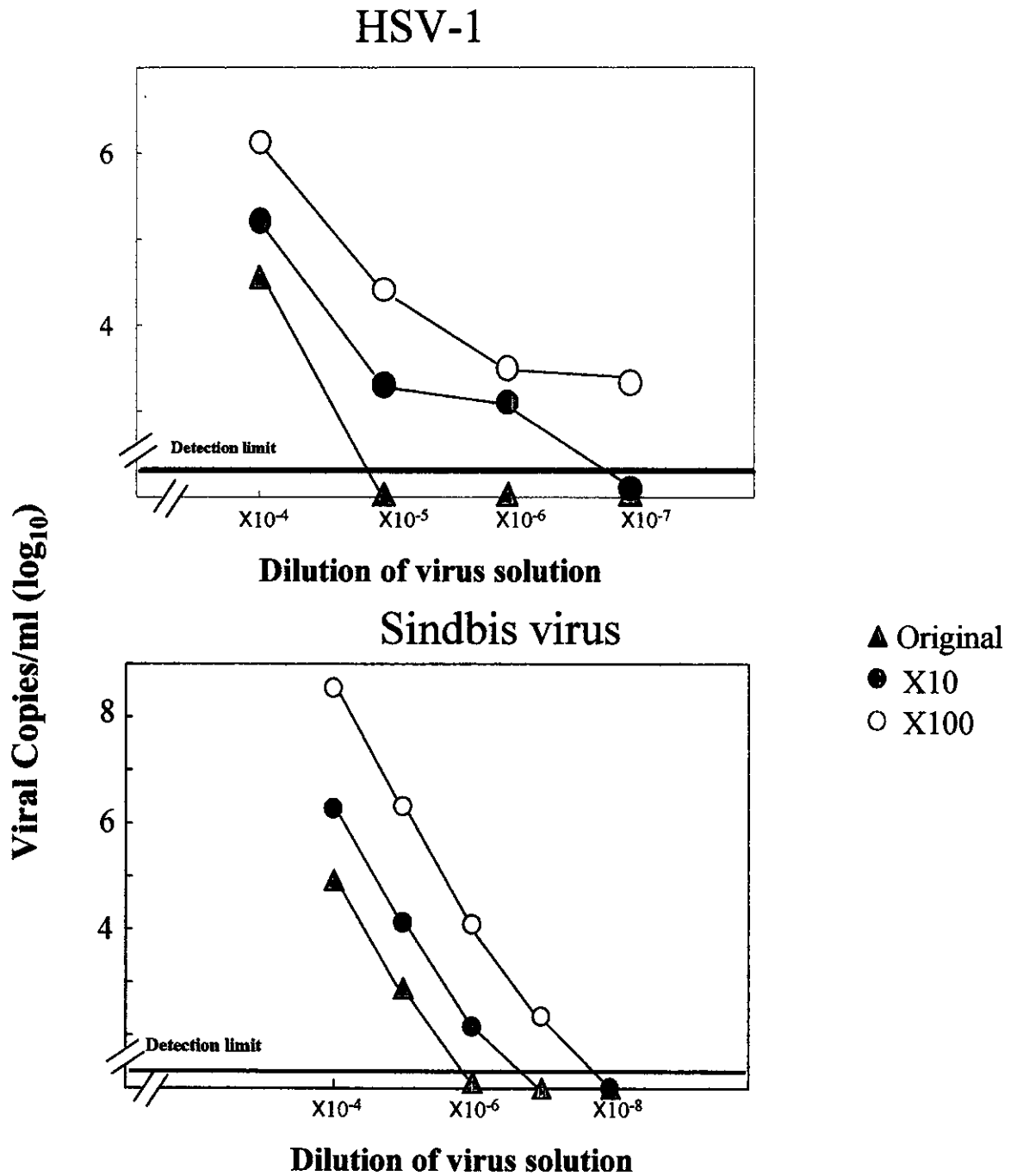


図6. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

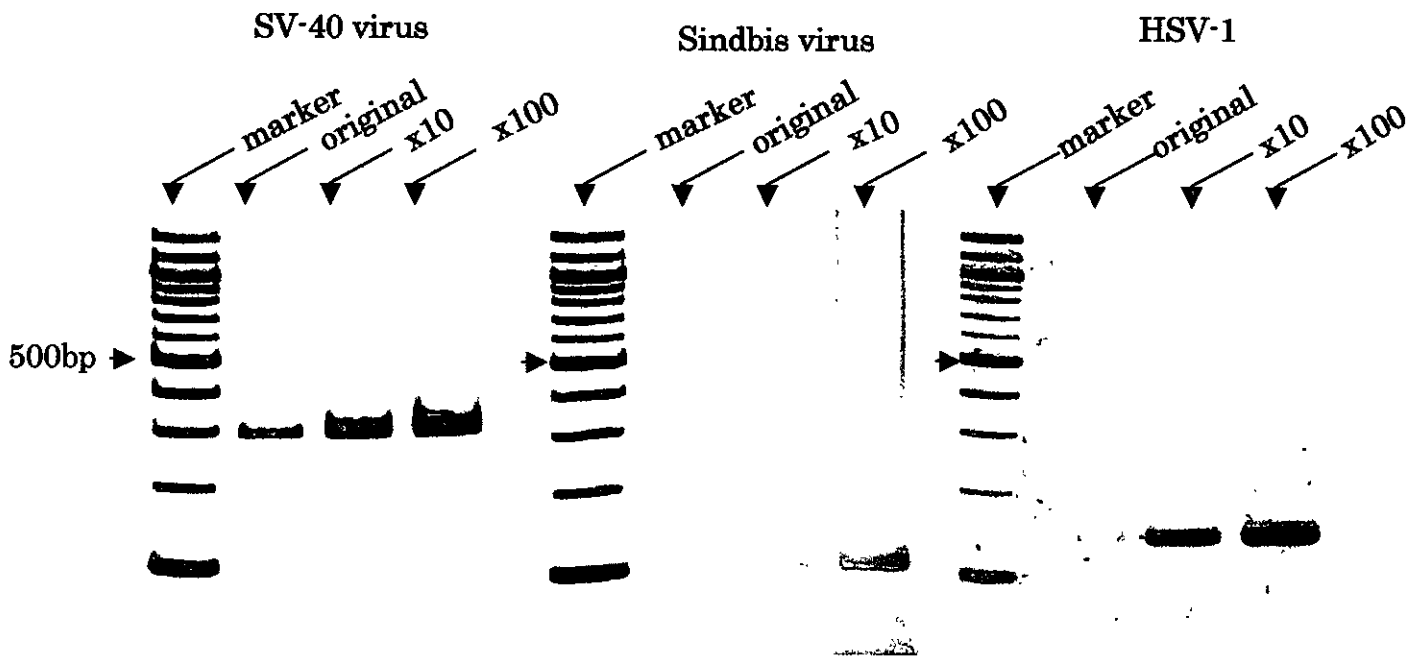


図7. 3種類のウイルスを混合した時のPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮

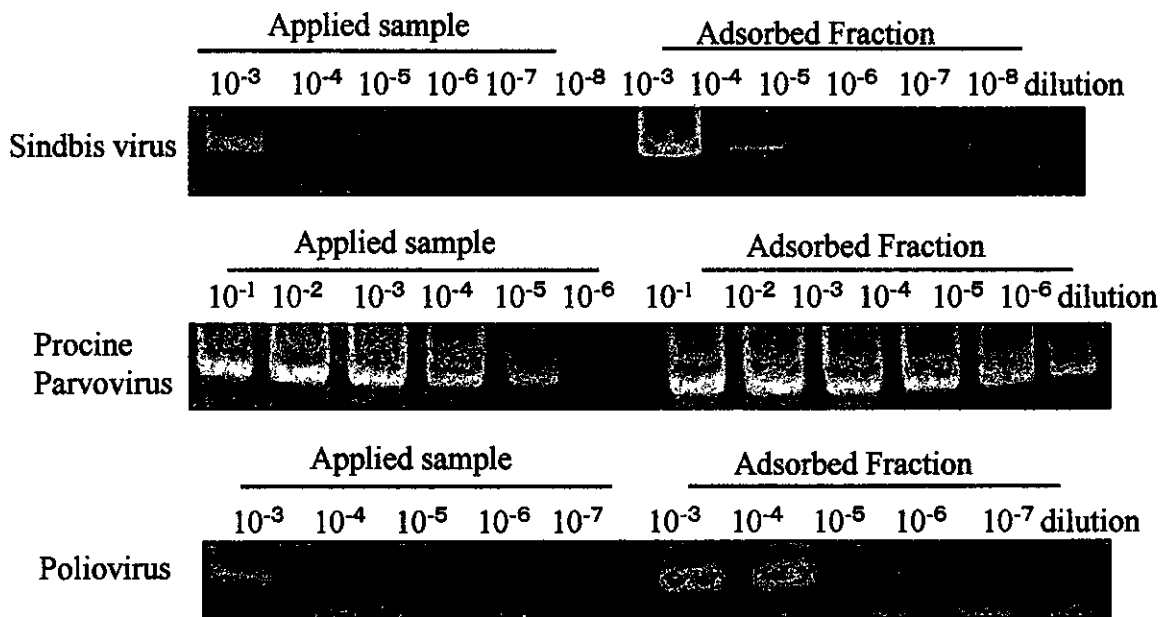


図8. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

ウイルス上清の段階希釈液1mlをスルホン酸磁気ビーズを用いて100 μ lに濃縮し、ウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCRにより増幅した。

表4. Zn²⁺イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズ処理を行うことによる培養上清中のウイルス感染価の低下.

		Concentration of Infectious Virus (x log ₁₀)
Sindbis virus	Applied Sample	6.5 ± 4.8
	Upper layer treated with PEI-beads	4.3 ± 2.0
PPV	Applied Sample	6.8 ± 5.3
	Upper layer treated with PEI-beads	4.5 ± 2.4
Poliovirus	Applied Sample	7.0 ± 5.7
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3 ± 1.5

Means ± S.D. (n=4)

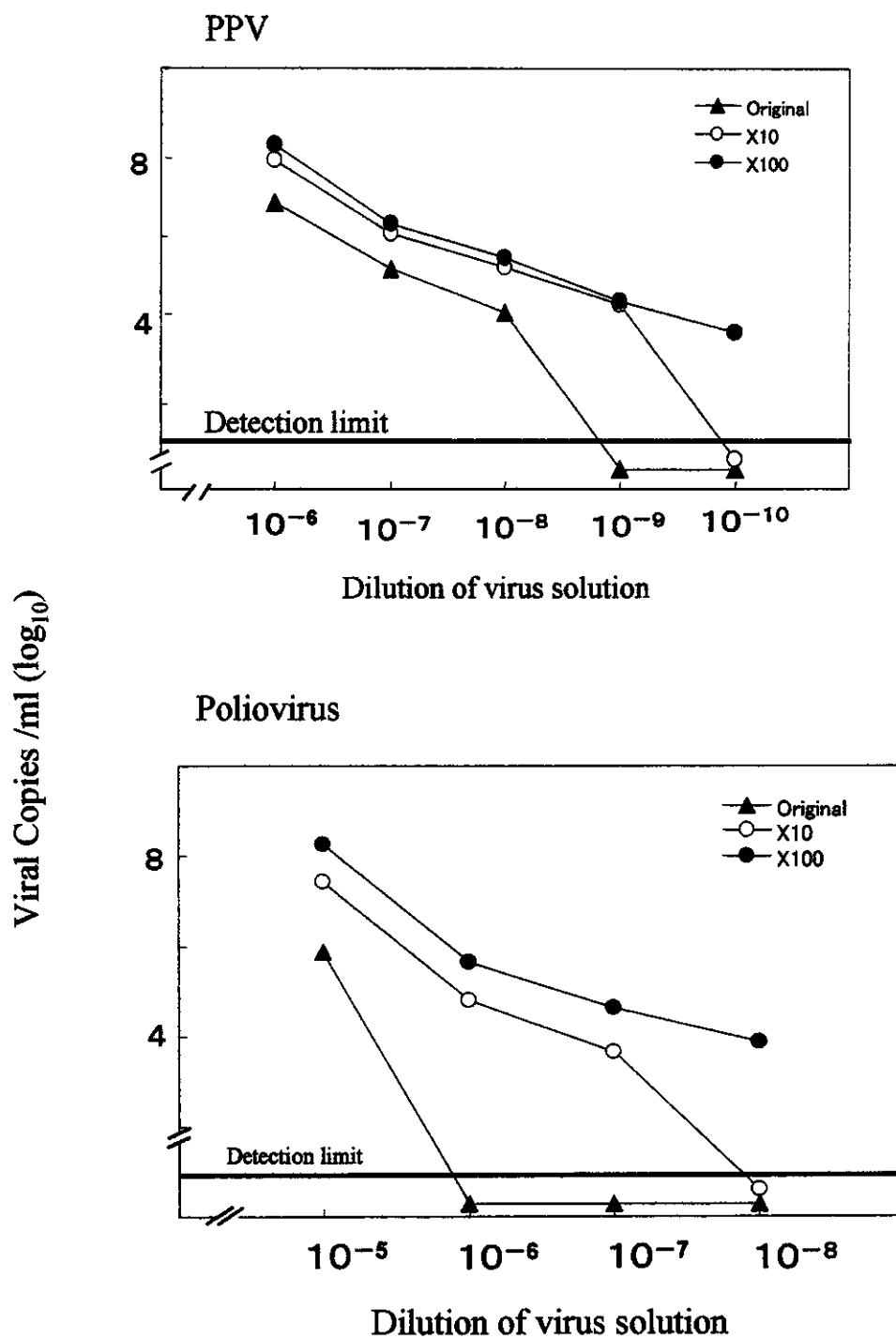


図9. スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

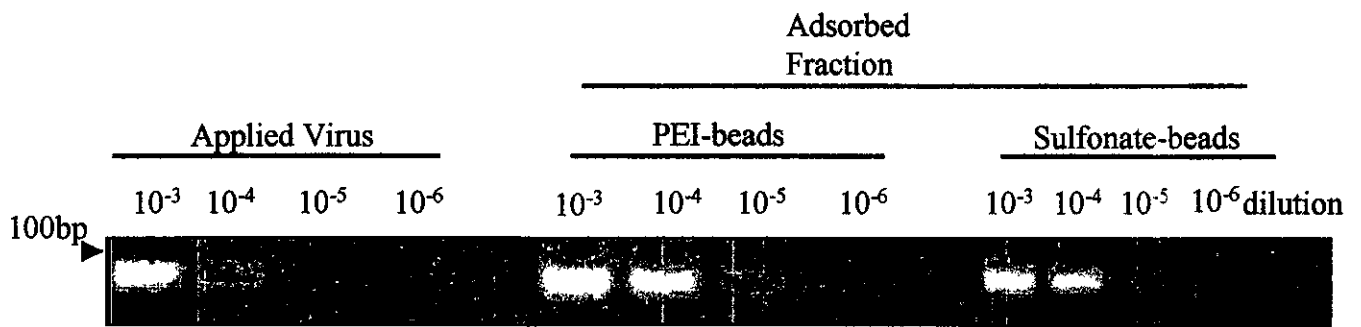


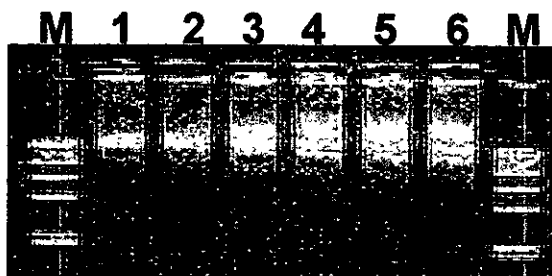
図10. PEI磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたサイトメガロウイルスの濃縮

表5. 白血球からGene Ballを用いて抽出したDNAのイールドと純度

Exp. No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ave.	CV%
DNA (μg)	43	44	43	51	51	50	44	47	45	46	46	6.8
A260/A280	1.98	1.91	1.91	1.92	1.84	1.82	1.94	1.95	1.88	1.80	1.90	3.8
A260/A230	2.00	1.93	1.91	1.82	1.80	1.75	1.87	1.88	1.82	1.88	1.87	3.8

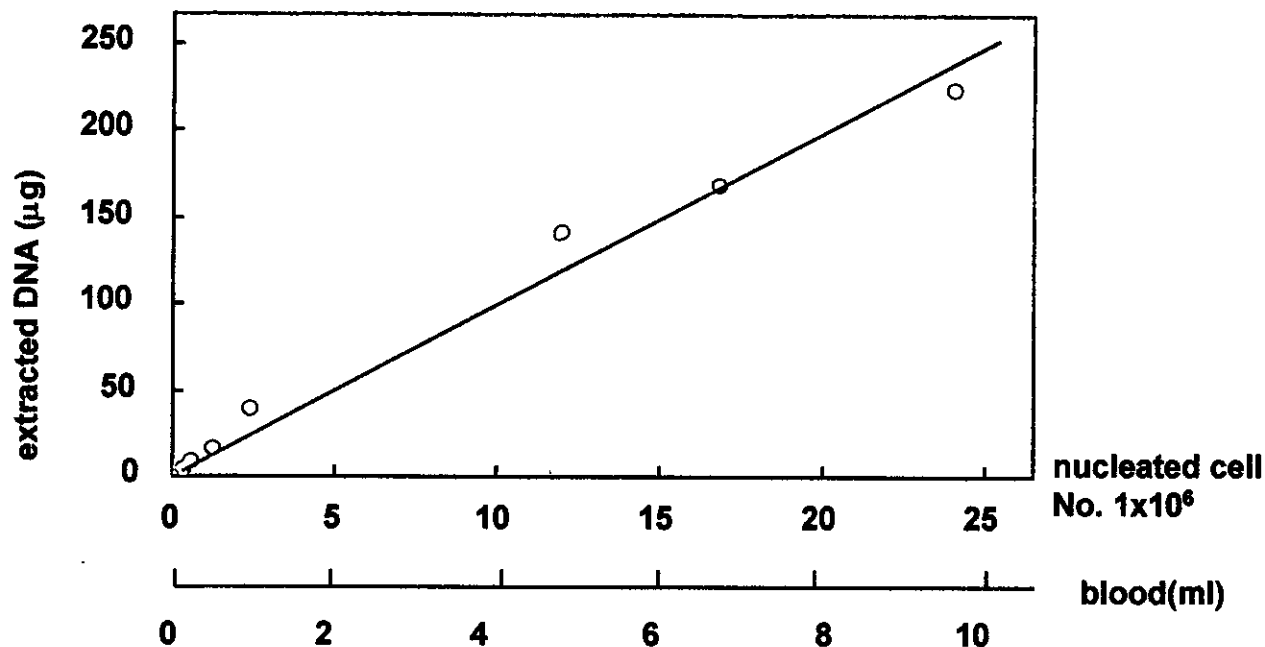
Gene Ball was applied to isolate DNA from 1 ml of human blood from the same individual. 10 tubes were run at the same time.

図11. 白血球からGene Ballを用いて抽出したDNAの1%アガロース電気泳動パターン



M: λ DNA Hind III maker
1-6: isolated DNA, lane No corresponds to the Run No above.

図12. 白血球数を変えてGene Ballで抽出した時のDNA収量



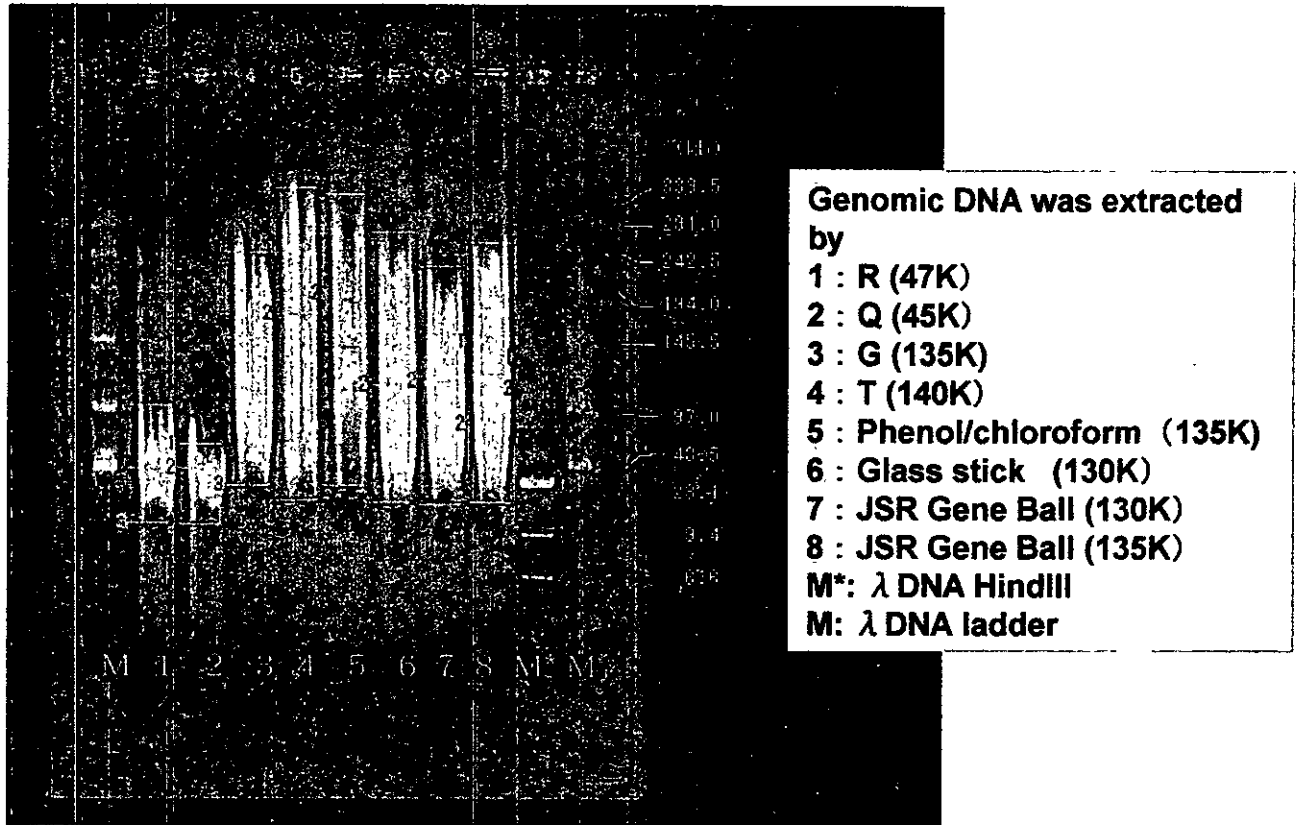
•DNA was isolated from 1ml of whole blood and buffy coat collected from 2-10ml of blood by Gene Ball. The OD purity of each point (A260/A280, A260/A230) is larger than 1.8, respectively.

表6. Gene Ball及び市販キットによるDNA抽出の比較

commercial kits	DNA yield(μg)	A260/A280	A260/A230
R	18	1.51	0.61
Q	8	1.92	1.92
T	15	1.56	2.08
G	32	1.68	2.23
Gene Ball	61	2.01	1.99

•DNA was extracted from 1ml of blood of the same individual by using commercial products and Gene Ball.

図13. Gene Ball及び市販キットを用いて抽出したDNAの大きさの比較



•Isolated genomic DNA size was analyzed by pulse field electrophoresis

図14. Poliovirusの感染細胞内での増幅

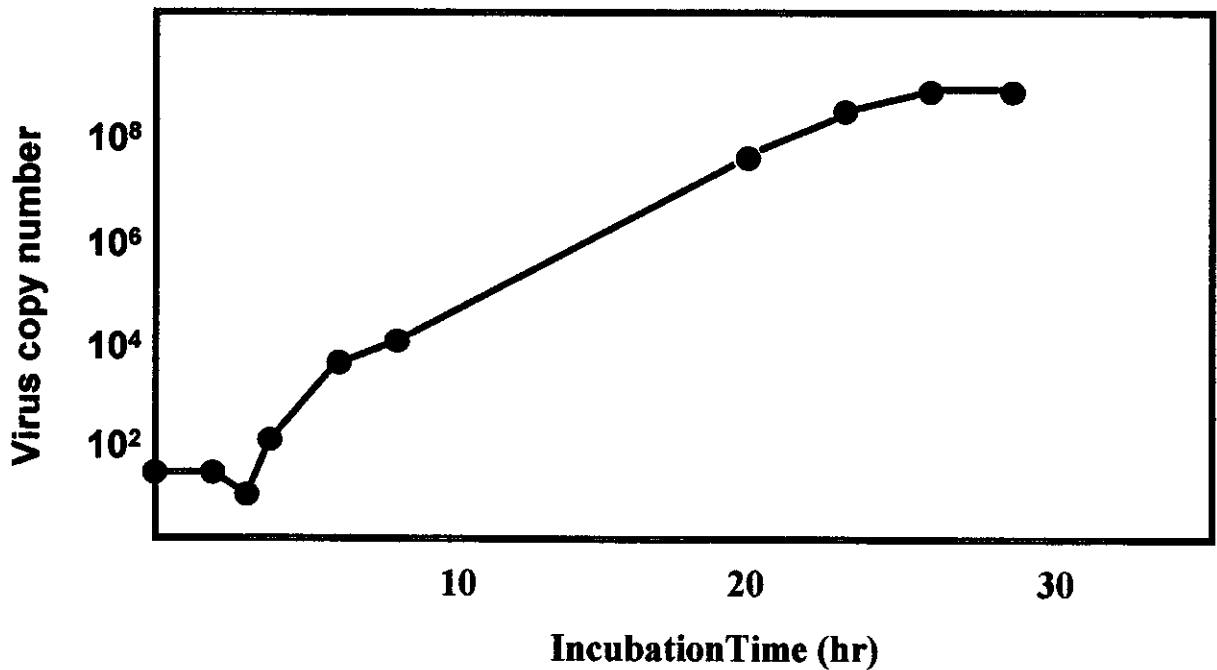


図15. HSVの感染性の Infectivity PCR及びCPEによる検出

Infectivity PCR				CPE method			
pfu	1 day	2days	4days	pfu	1 day	2days	4days
200	3/3	3/3	3/3	200	0/3	3/3	3/3
20	3/3	3/3	3/3	20	0/3	0/3	3/3
2	2/3	3/3	3/3	2	0/3	0/3	0/3
0.2	0/3	1/3	3/3	0.2	0/3	0/3	0/3
0.02	0/3	0/3	0/3	0.02	0/3	0/3	0/3

種々の感染価のHSVをVero細胞に感染させた後、細胞からGene Ballによるウイルスゲノムの抽出を行いPCRで検出した。各カラムは、検体数あたりの陽性数の値を示している (infectivity PCR)。CPEによる検出では、細胞変性が見られた検体の値を示している。

図16. Poliovirusの感染性の Infectivity PCR及びCPEによる検出

Infectivity PCR				CPE method			
virus(copies)	1 day	2days	3days	virus(copies)	1 day	2days	3days
1×10^5	3/3	3/3	3/3	1×10^5	0/3	0/3	3/3
1×10^4	3/3	3/3	3/3	1×10^4	0/3	0/3	0/3
1×10^3	2/3	0/3	3/3	1×10^3	0/3	0/3	0/3
1×10^2	2/3	0/3	0/3	1×10^2	0/3	0/3	0/3
1×10^1	0/3	0/3	0/3	1×10^1	0/3	0/3	0/3

種々の感染価のPoliovirusをVero細胞に感染させた後、細胞からGene Ballによるウイルスゲノムの抽出を行いPCRで検出した。各カラムは、検体数あたりの陽性数の値を示している (infectivity PCR)。CPEによる検出では、細胞変性が見られた検体の値を示している。

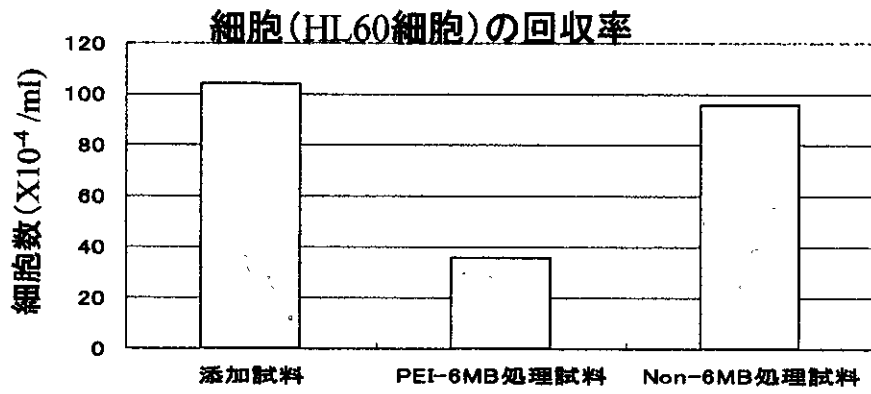
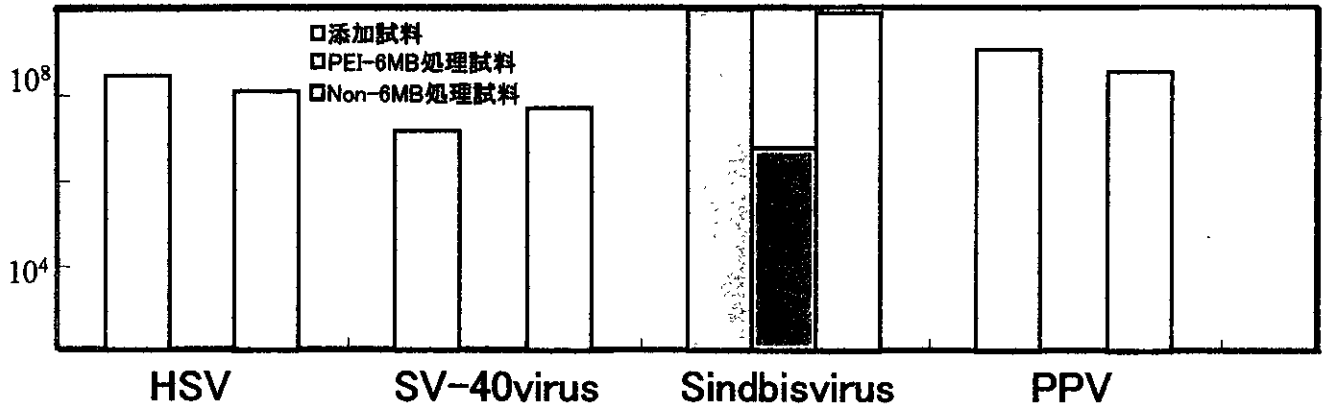
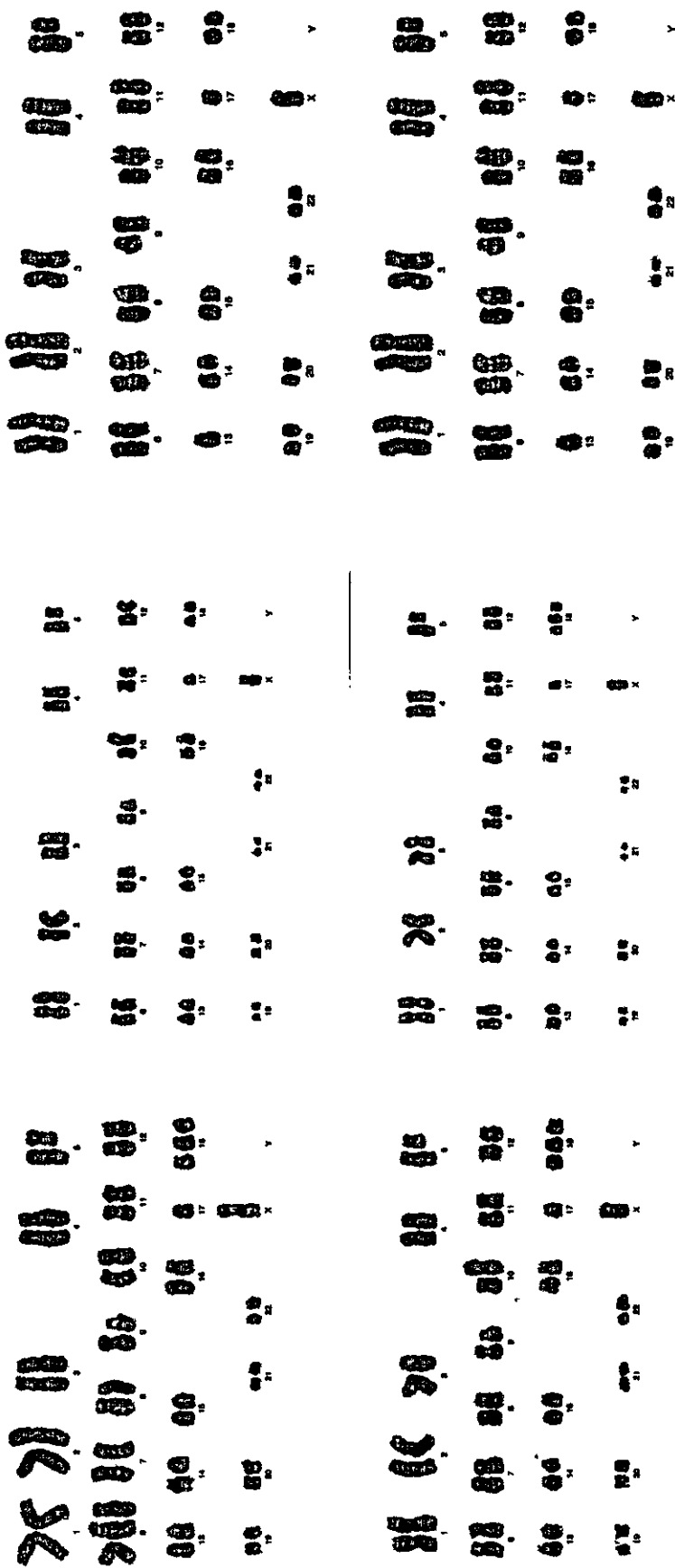


図17. ポリエチレンイミンセファロース6MBを用いたウイルスの除去

図18. HL-60細胞とHL-60RG細胞のG-band解析

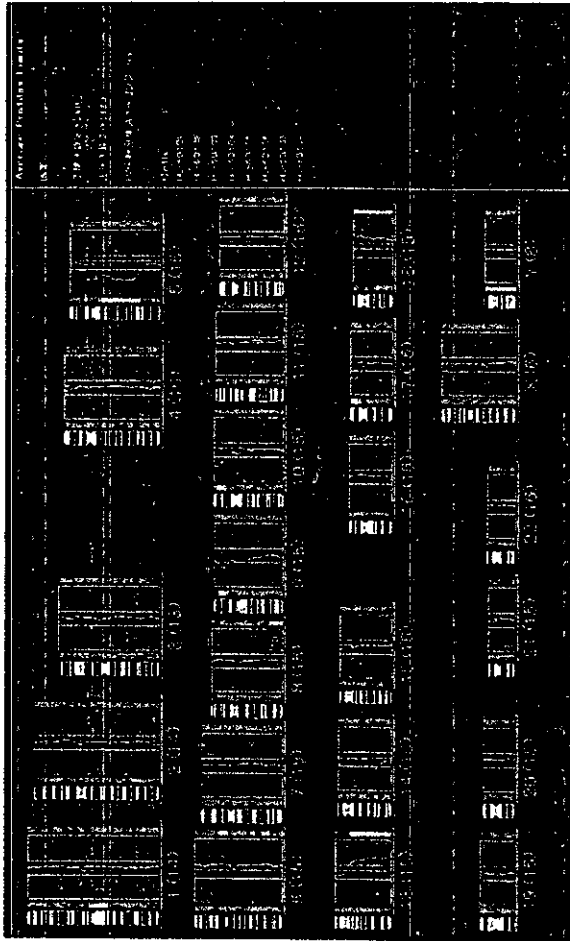


HL-60 cells

HL-60RG cells

図19. HL-60細胞とHL-60RG細胞のCGH解析

HL-60



HL-60RG

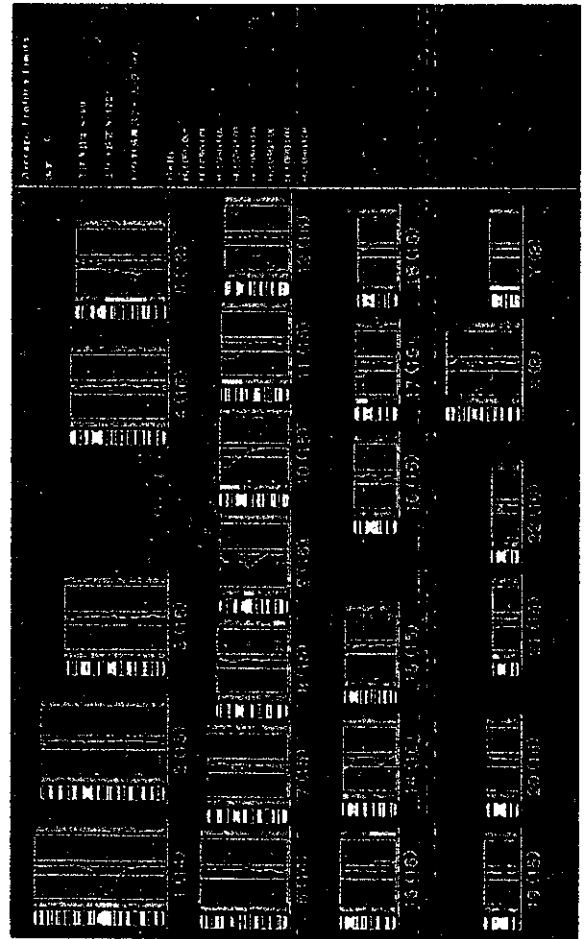
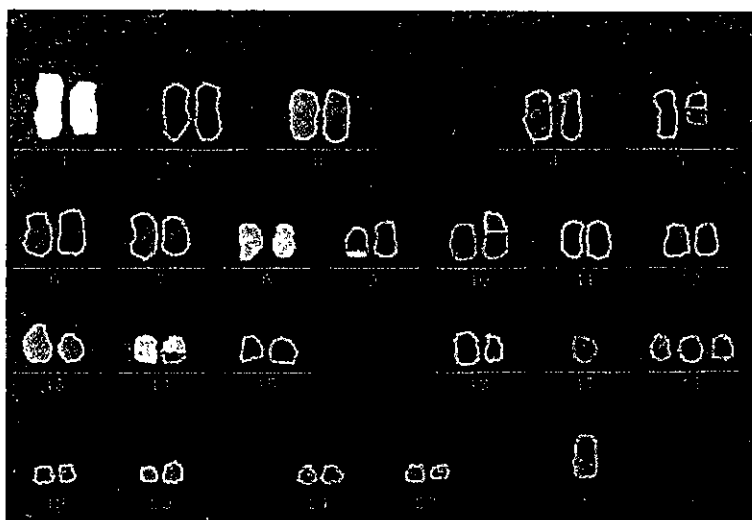


図20 HL-60細胞とHL-60RG細胞のm-FISH解析

HL-60細胞



HL-60RG細胞

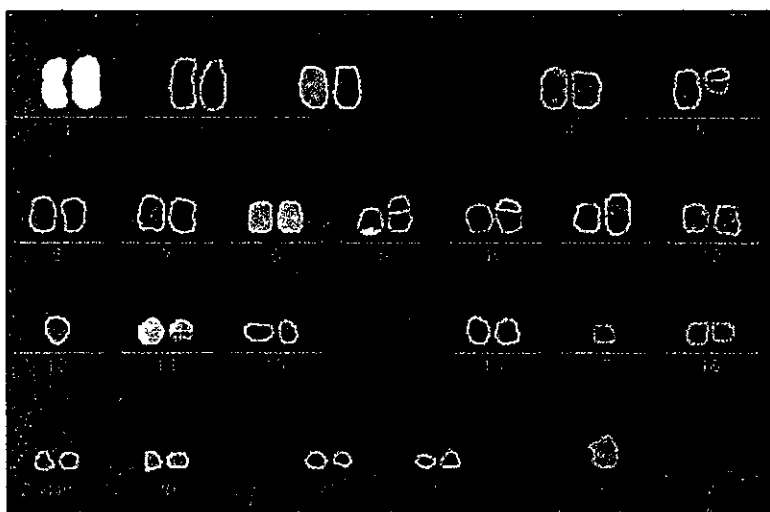
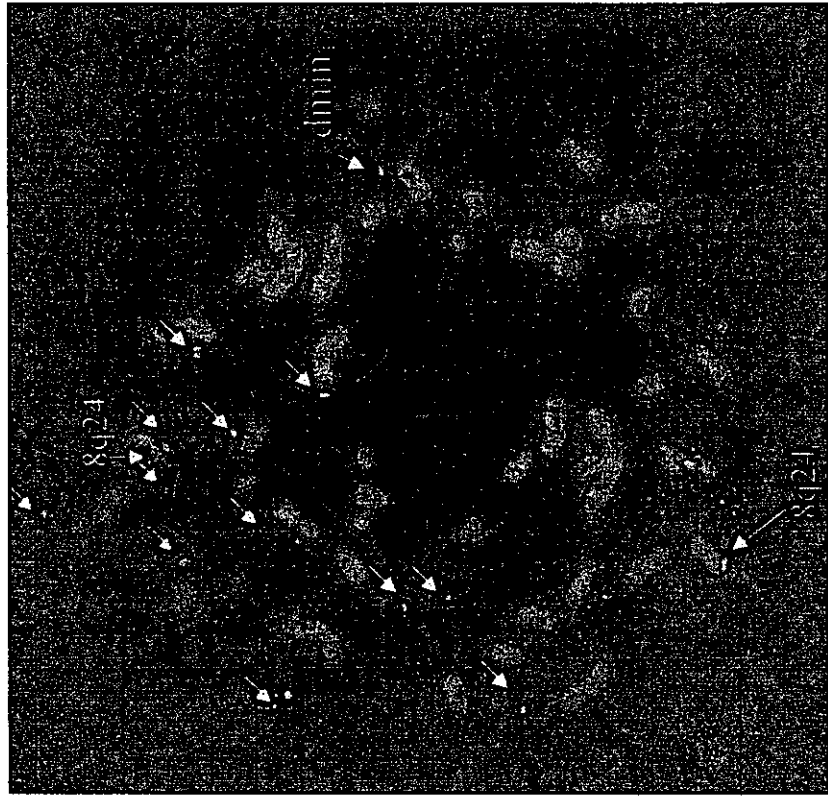


図21 c-mycプローブを用いたFISH解析

HL-60細胞



HL-60RG細胞

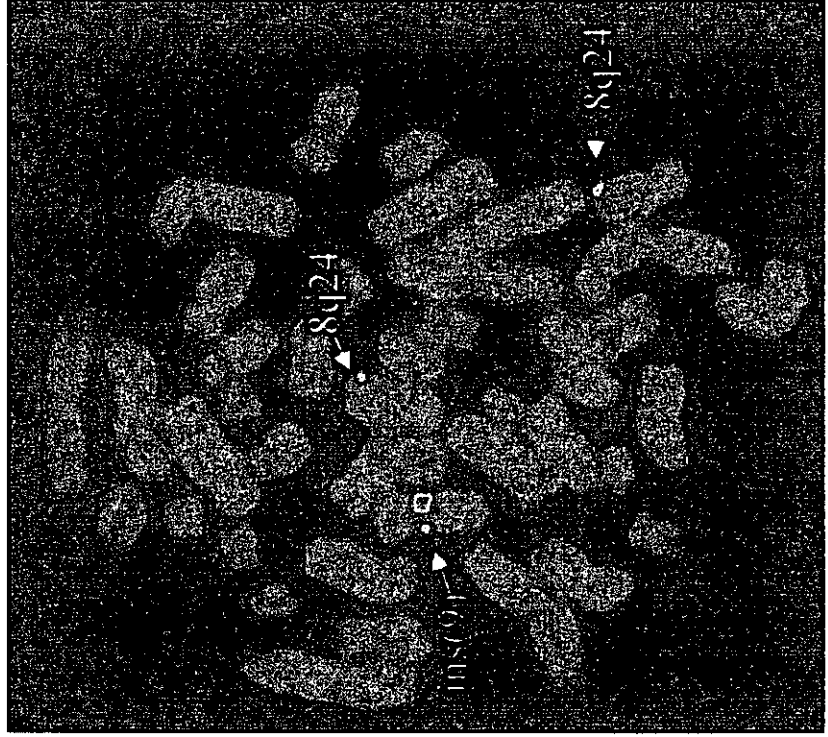
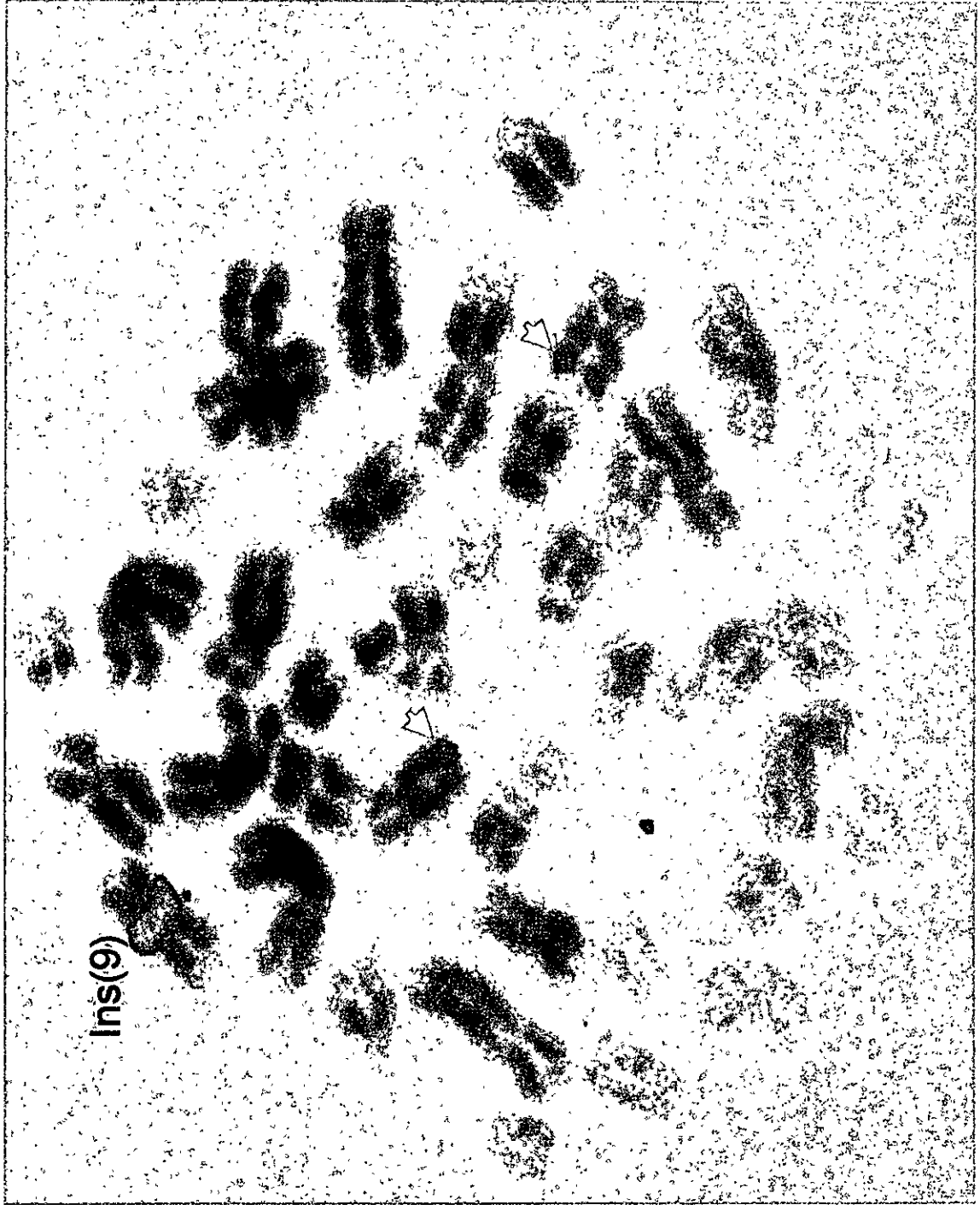


図22 c-mycプローブを用いたFISH解析とG-バンド解析を組み合わせた解析



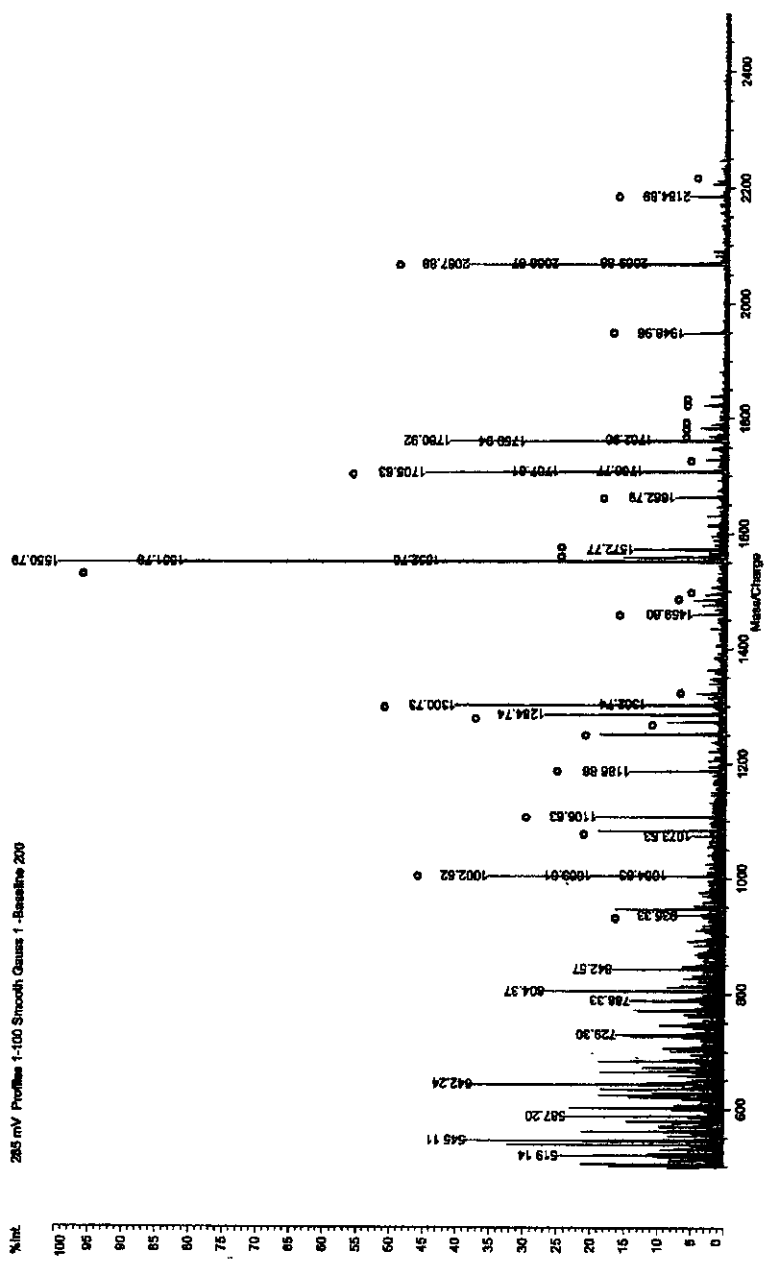


図23 HL-60RGの培養上清の二次元電気泳動のゲルから得たタンパク質をトリプシン消化したペプチドの質量分析スペクトル例
丸印の質量数をMascot検索に用いた。

細胞由来タンパク質プロファイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発

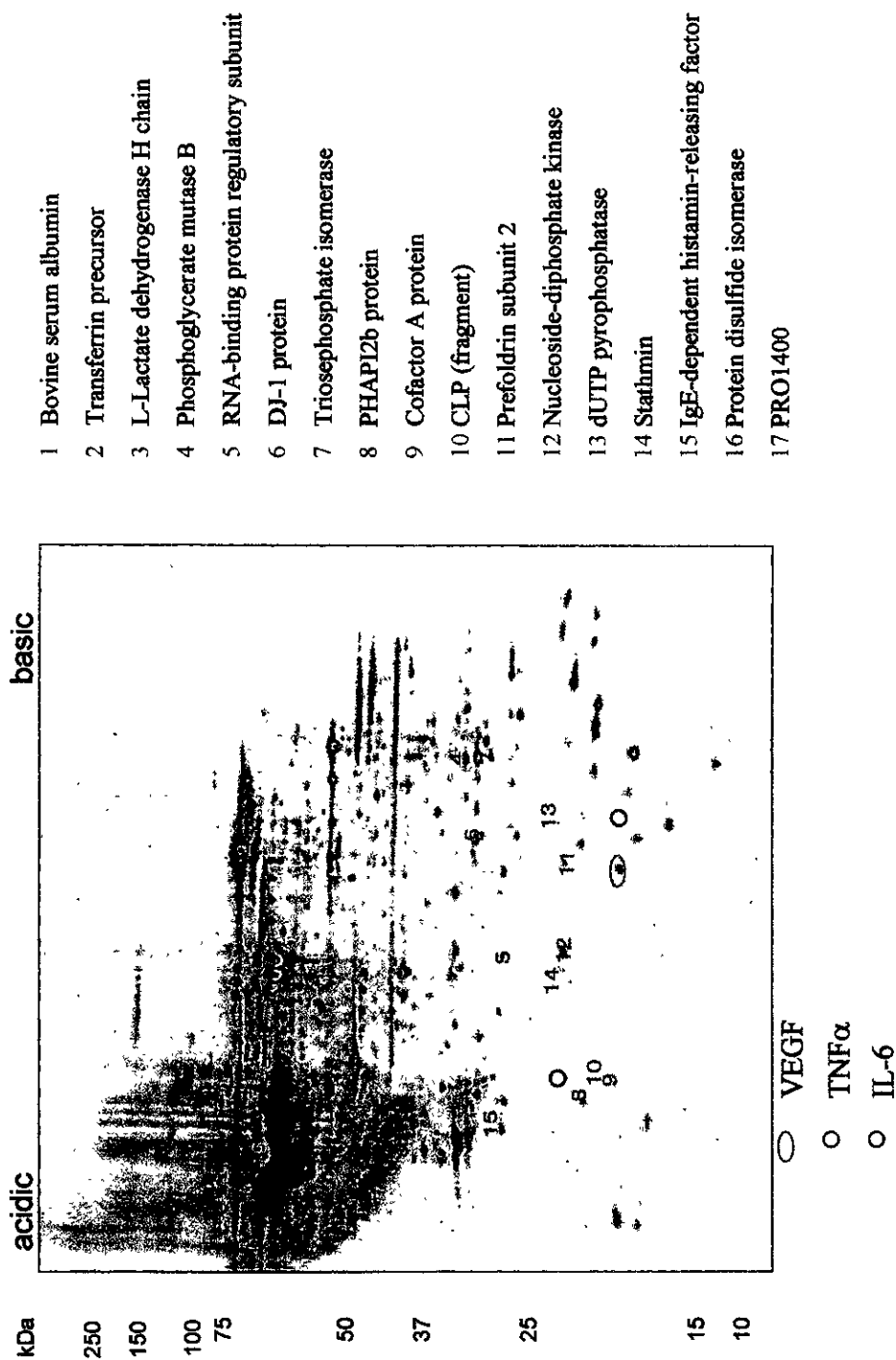


図24 HL-60RG培養上清中のタンパク質プロファイル

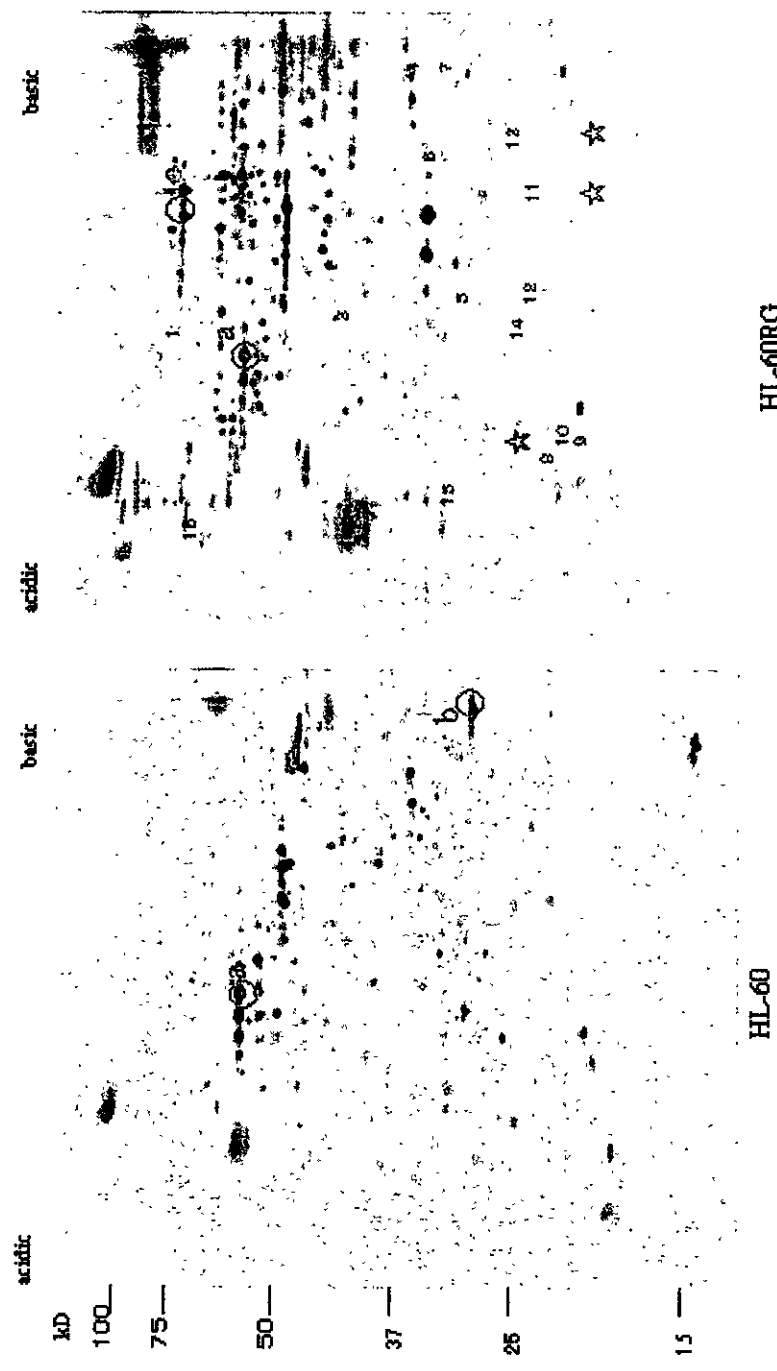


図25. HL-60とHL-60RG培養上清中のヘパリン親和性タンパク質プロファイル

