

## 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でハイブリを行うもので、洗いが簡単であり、反応は酵素抗体法と同一である<sup>文献11)</sup>。42℃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(DMSO)、BSA(SIGMA、Cat No. A-2153)、3M酢酸ナトリウム(pH5.0)、100%イソプロパノール、PBS-T(PBS(-)+0.5%Tween20)

#### 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 ethanol (96~100%) を添加する (添加容量は試薬ボトルのラベルを参照)。
- (2) 3M の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lice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 を決定するのに大変便利である。

- (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、MinElute 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  $\geq 10,000Xg$  ( $\sim 13,000rpm$ ) 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°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 90  $\mu$ l 入れ、それに加熱処理した DNA を 10  $\mu$ 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、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
Control	A	○	○	○	○	○	○	○
RING1-Tp(a), (b) probe	B	○	○	○	○	○	○	○
RING2-Plate probe	C	○	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○	○

図1. トレイのレイアウト

↓プレートにシールし、37 °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6. に示したようにプローブの調製を行い、98 °C、5分間加熱処理、直ちに on ice する。

表6. プローブの調製 (1検体当たり)

	Probe control	RING1-Tp(a), (b) ビオチン標識 probe	RING2-Plate ビオチン標識 probe
100pmol/ $\mu$ l probe (Probe controlはTE)	TE 1 $\mu$ l	RING1-Tp(a)probe RING1-Tp(b)probe 各0.5 $\mu$ l	RING2-Plate probe 1 $\mu$ l
100 $\mu$ g/ml サケ精子 DNA <sup>注6)</sup>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
3倍1.5M NaCl buffer	3.3 $\mu$ l	3.3 $\mu$ l	3.3 $\mu$ l
DDW	0.7 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l

注6) : サケDNAは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7. 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 7. ハイブリ液(1 検体当たり)<sup>注7)</sup>

3 倍 1.5M NaCl buffer	30 $\mu$ l
ホルムアミド	50 $\mu$ l
10% Tween20	1 $\mu$ l
DW	9 $\mu$ l

注 7) : 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<sup>#3</sup>を 100  $\mu$  l 入れる。

#3 : TMB 1mg、DMSO 1ml、phosphate-citrate buffer 9ml (0.2M dibasic sodium phosphate 25.7ml、0.1M citric acid 24.3ml、精製水 50ml、pH5.0) を作製し、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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 SRSV 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、DW、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℃) 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℃) 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℃) 10ml に 2.5M MgCl<sub>2</sub> を 200μl 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。

### 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℃で 5 分間熱変成し、1μl 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 8.)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℃、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℃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 8. 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
DW		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 9. 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 9. 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 9. 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
DW	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。

### Ⅲ. 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



表 10. ノロウイルスのプライマーとプローブの塩基配列

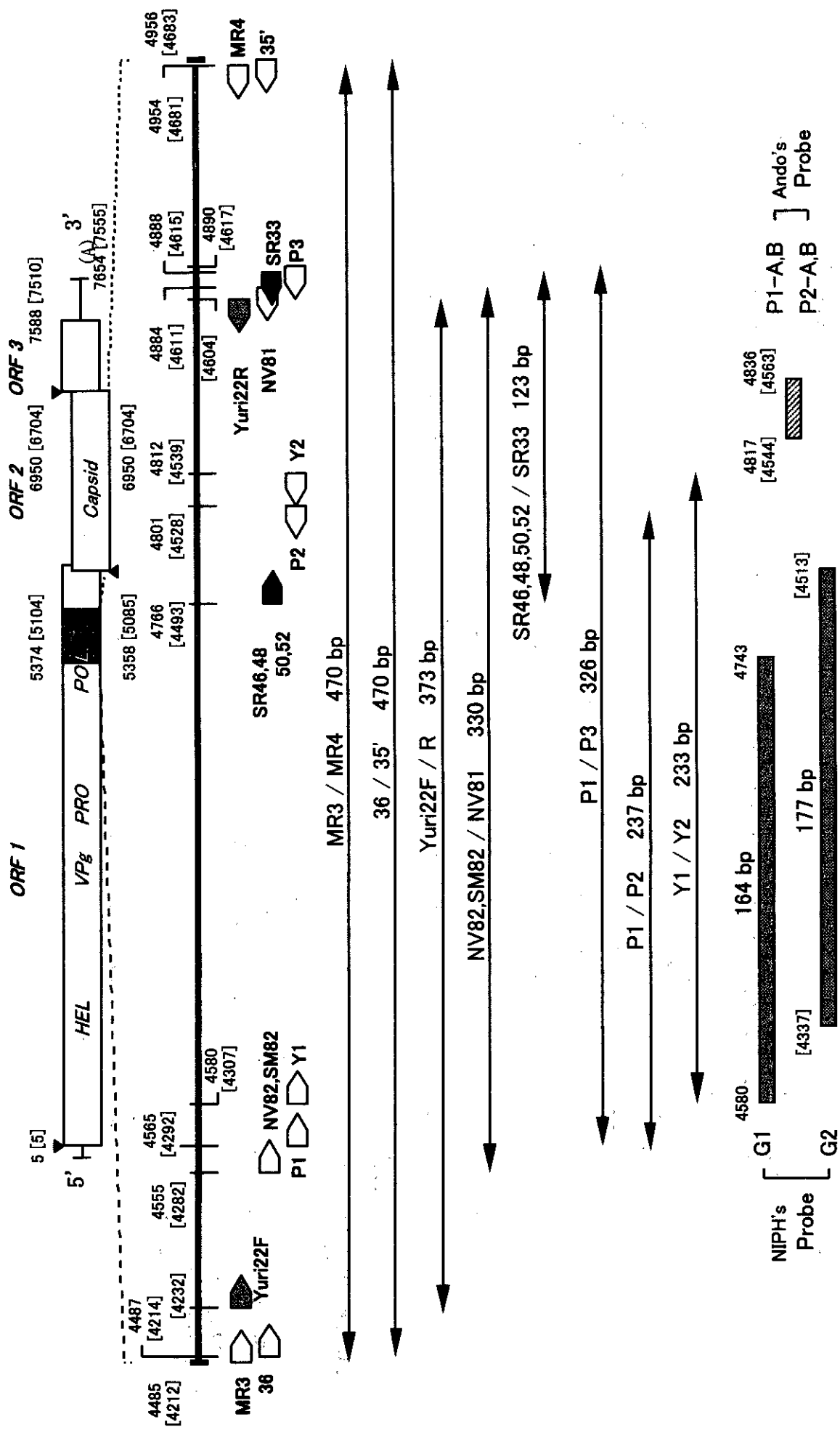
Primer	塩基配列 [5' - 3']	sense	文献
36	ATA AAA GTT GGC ATG AAC A	+	2
35'	CTT GTT GGT TTG AGG CCA TA	-	2
MR3	CCG TCA GAG TGG GTA TGA A	+	3
MR4	AGT GGG TTT GAG GCC GTA	-	3
NW82	TCA TTT TGA TGC AGA TTA	+	4
SN82	CCA CTA TGA TGC AGA TTA	+	4
NW81	ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA	-	4
YUR122F	ATG AAT GAG GAT GGA CCC AT	+	5
YUR122R	CAT CAT CCC CGT AGA AAG AG	-	5
P1	GCT GAT TAC TCT SGG TGG GA	+	6
P2	ACA CAG AGT GAG SAR CCA GTG	-	6
P3	GTR STC ACA ATY TCA TCA TC	-	6
Y1	TGG GAC TCA ACA CAR CAG AG	+	6
Y2	TCA GAM AGK GCA CAS AGA GT	-	6
SR33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	-	7
SR46	TGG AAT TCC ATC GCC CAC TGG	+	7
SR48	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	+	7
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 - F2	AAT GAT GAT GGC GTC TAA GGA	+	8
G1 - SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	-	9
G2 - SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	+	9
G2 - F3	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG A	+	8
G2 - SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	-	9
G2AL-SKR	GCA CCA GCA TAT GAA TTG TAC AT	-	22
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	+	10
COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT TYA C	-	10
COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	+	10
ALPF	TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG	+	24
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-	10

Probe	塩基配列 [5' - 3']	sense	文献
SR47d : P2B	ATG TCA GGG GAC AGG TTT GT	-	7
SR61d : P2A	ATG TGG GGG CCT AGT CCT GT	-	7
SR63d : P1A	ACA TCA GGA GAG TGC CCA CT	-	7
SR65d : P1A	ACA TCA GGT GAT AAG CCA GT	-	7
SR67d : P1B	ACA TCT GGT GAG AGA CCT GA	-	7
SR69d : P1A	ACA TCG GGT GAT AGG CCT GT	-	7
RING1 - TP (a)	AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA	+	10
RING1 - TP (b)	AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA	+	10
RING2 - TP	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	+	10
RING2AL-TP	TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT	+	22
RING2 - Plate	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTB GCT CCC	+	22
G1-1 (Ishiko)	CCA ACA AAC ATG GAT GGC ACC AGT G	+	23
G1-2 (Ishiko)	CAG TTG GTA CCG GAG GTT AAT GCT T	+	23
G1-3 (Ishiko)	CCT CAA AGC GCT GAT GGC GCA AGC	+	23
G1-4 (Ishiko)	GCT ACA CCA AGC GCA GAT GGC GCC A	+	23
G2-1 (Ishiko)	ATA ATT GAC CCC TGG ATT AGA AA	+	23
G2-2 (Ishiko)	ATA ATT GAT CCC TGG ATT ATG AAT A	+	23
G2-3 (Ishiko)	CGC CCG TCC ATC TAA TGA TGG TGC A	+	23

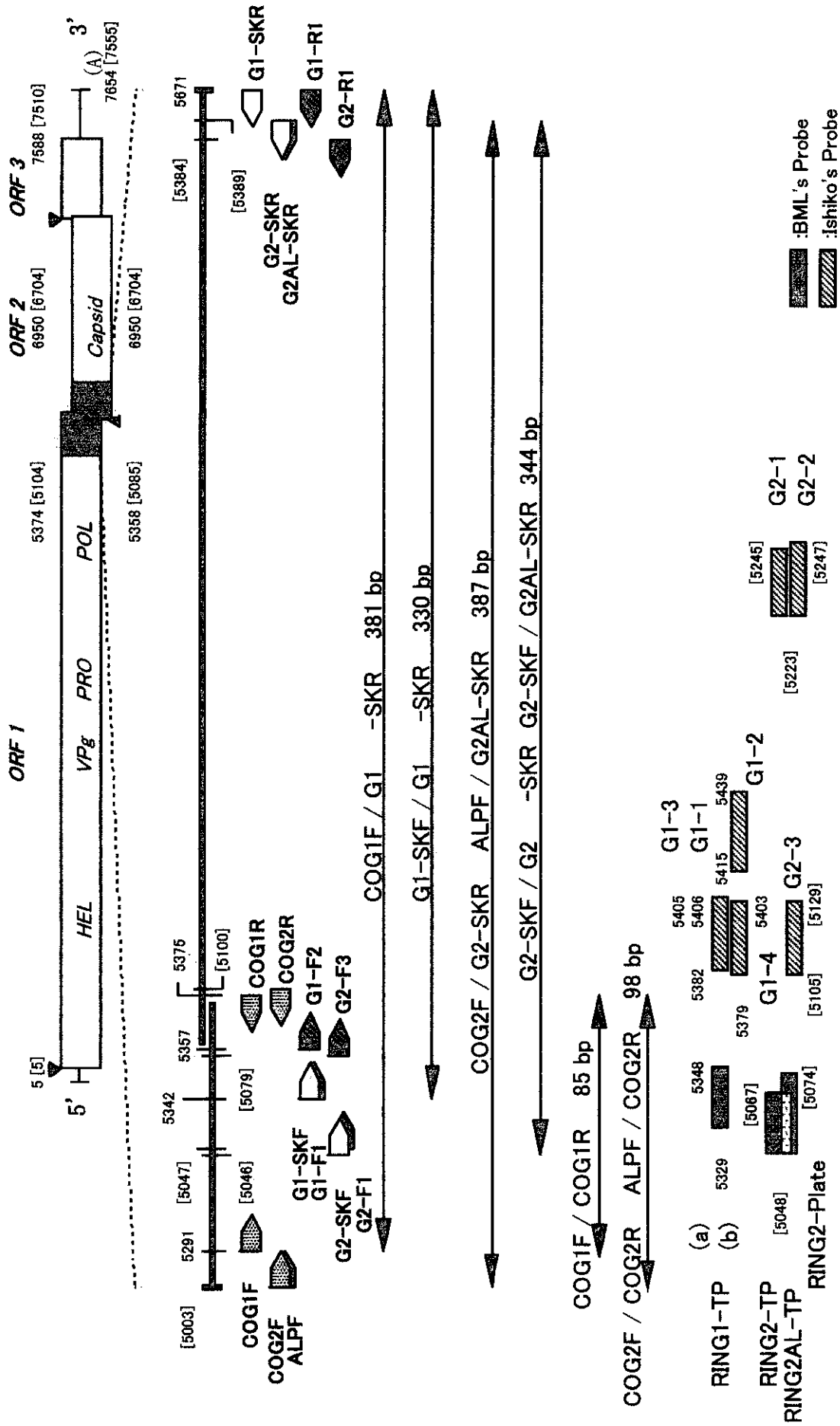
  

IUB CODES	塩基
R	= A or G
Y	= C or T
K	= G or T
M	= A or C
S	= G or C
W	= A or T
N	= any base



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. ノロウイルス ORF1 部分のプライマーとプローブの位置



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 3. ノロウイルス ORF2 部分のプライマーとプローブの位置

- 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)
- 14) Noel J.S. et al. : Arch Virol. Suppl 12:263 (1996)
- 15) Vinje J. et al. : J Clin Microbiol 38:530 (2000)
- 16) Noel J S. et al. : J Med Virol 52:173 (1997)
- 17) Matsui M. et al. : Microbiol and Immunol 42: 539 (1998)
- 18) Sakamoto T. et al. : J Med Virol 61:326 (2000)
- 19) Sakon N. et al. : J Med Virol 61:25 (2000)
- 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
- 24) 春木 孝祐 : 平成 13 年度厚生労働省科学研究生活総合安全研究事業 (食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究)P44(2002)

ABI PRISM 7000 を用いたリアルタイム PCR 法

国利感染症研究所  
 感染症情報センター  
 西尾 治

1. 器具・試薬

マイクロピペット、Micro Amp Optical96-Well Reaction Plate (ABI Cat. No. N801-0560)、  
 MicroAmpOpticalCap, 8caps/strip (ABI Cat. No. N801-0935)、  
 Micro Amp Base (ABI Cat. No. N801-0531)、  
 Taq Man Universal PCR Master Mix (ABI Cat. No. 4304437)、核酸フリー精製水、  
 Taq Man プローブ

RING1 - TP (a) 5' -VIC-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TMRA-3'

RING1 - TP (b) 5' -VIC-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-TMRA-3

RING2AL-TP 5' -FAM-TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT-TMRA-3

プライマー

COG1F 5' -CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA-3'

COG1R 5' -CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C-3'

COG2F 5' -CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3'

ALPF 5' -TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG-3'

COG2R 5' -TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA-3'

2. 反応プレートの準備

1) 表 1. に示した反応液を調整する。

表 1. 反応液の調整

	G1	G2
DDW	13.88 $\mu$ l	16.54 $\mu$ l
Taq Man Universal Master MIX	25.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
100pmol/ $\mu$ l プライマー	COG1F 0.2 $\mu$ l	COG2F 0.2 $\mu$ l
	COG1R 0.2 $\mu$ l	ALPF 0.2 $\mu$ l
		COG2R 0.2 $\mu$ l
4pmol/ $\mu$ l Taq Man プローブ	RING1-TP (a) 4.29 $\mu$ l	RING2AL-TP 2.86 $\mu$ l
	RING1-TP (b) 1.43 $\mu$ l	
計	45.0 $\mu$ l	45.0 $\mu$ l

- 2) プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate) のウェルに  $45.0 \mu\text{l}$  ずつ反応液を入れる。コントロール DNA は 3 ウェル以上、サンプルおよび陰性コントロール (NTC: No Template Control) は 2 ウェル使用する。
- 3) サンプル cDNA (cDNA 作製は RT-PCR と同様に行う。)  $5 \mu\text{l}$  を 2 ウェルずつに加え、蓋 (Micro Amp Optical Cap, 8 caps/strip) を軽く閉める。
- 4) コントロール DNA ( $10^7$  コピー/ $5 \mu\text{l}$ ) を  $10^7$  から  $10^0$  コピーまで 10 倍階段希釈し、 $5 \mu\text{l}$  を 2 ウェルずつに加え、蓋を軽く閉める。
- 5) NTC として DDW  $5 \mu\text{l}$  を 2 ウェルずつに加え、蓋を軽く閉める。
- 6) プレートを Micro Amp Base にセットし、蓋をしっかりと閉める。
- 7) ウェルの壁についている反応液を遠心機で落とす。(遠心機が無い場合はプレートを軽く叩いたり、振り下ろしたりする。)
- 8) キムワイプで蓋を軽く拭き、プレートを Micro Amp Base から外す。

### 3. ABI PRISM7000 のランの開始

- 1) コンピュータの電源を入れ、コンピュータが完全に起動したら、本体電源を入れる。(ランの開始 15 分前には電源を入れる。)
- 2) デスクトップ上の ABI PRISM7000 SDS Software アイコンをダブルクリックする。
- 3) File メニューの New を選択し、新規のプレートドキュメントを開く。  
この時、本体とコンピュータのコミュニケーションがとれ、フィルターが回転する。コミュニケーションが取れると画面右下の表示が Disconnected から Connected になる。
- 4) プレートドキュメントを設定する。  
同一の反応系で設定する全ウェルをハイライト選択し、Well Inspector 画面で使用する Detector (VIC または FAM) のチェックボックスにチェックを入れる。
- 5) Unknown サンプルを設定するウェルをハイライトで選択し、Well Inspector 画面の Task

- カラムをクリックし、Unkown を選択する。ウェルをハイライト選択し、Well Inspector 画面の Sample Name フィールドにサンプル名を入力し、Enter キーを押す。
- 6) スタANDARDを設定するウェルをハイライトで選択し、Well Inspector 画面の Task カラムをクリックし、Standard を選択する。同一濃度に設定するウェルをハイライト選択し、Well Inspector 画面の Quantity フィールドをクリックし濃度を入力した後 Enter キーを押す。
  - 7) NTC を設定するウェルをハイライトで選択し、Well Inspector 画面の Task カラムをクリックし、NTC を選択する。
  - 8) Instrument タブをクリックし、サーマルサイクラー条件を設定する。Stage1, Reps:1, 50.0°C 2:00、Stage2, Reps:1, 95.0°C 10:00、Stage3, Reps:45, 95.0°C 0:15, 56.0°C 1:00 に設定し、9600Emulation チェックボックスにチェックを入れる。
  - 9) File メニューから Save as を選択し、ランを開始する前に保存する。Save As 画面の Save as type は SDS Document (\*.sds) を選択する。
  - 10) 本体のキャリッジをスライドさせ、反応プレートを A1 のウェルが左奥のコーナーに位置するようにサンプルブロックにセットする。
  - 11) 本体上部の窓を開き、ハロゲンランプが点いていることを確認する。確認後、窓は閉める。
  - 12) プレートドキュメントの Instrument タブ画面を表示し、Start ボタンをクリックする。
  - 13) 反応中の Amplificatipn Plot を表示したいときは、Results の Amplificatipn タブをクリックし、下段のプレート表示から、見たいセルを選択する。
  - 14) ランが終了したら Status に idle と表示される。

#### 4. データ解析

- 1) プレートドキュメントの Results 画面内の Amplificatipn タブをクリックする。
- 2) 下段のプレート表示から全セルを選択し、Analysis をクリックする。
- 3) ベースラインの設定を行う。グラフの縦軸の数値をダブルクリックし Graph Settings 画面にし、Y-Axis の設定を Liner にする。Baseline フィールドに蛍光の増加が始まる約5 サイクル前を入力し、Analysis をクリックする。  
グラフの縦軸の数値をダブルクリックし Graph Settings 画面にし、Y-Axis の設定を log にもどす。
- 4) Threshold Line を設定する。Amplificatipn 上に全てのデータを表示し、グラフ上の緑色の線を増幅曲線の指数関数的増幅領域の中央に設定し、Analysis をクリックする。緑色の線は、マウスでドラッグするか、Anaiysis Setting 内の Threshold フィールドに数値を入力することで移動する。
- 5) Standard Curve タブをクリックし、Standard Curve を表示する。右側の  $R^2$  が 0.990～1 であればよい(1 に近いほどよい)。
- 6) Report タブをクリックし、Report 画面を表示させ、下の画面のウェルをハイライト選択し、解析データを表示させる。(コピー数は Plate 画面でも確認できる。) 2つのウェルにおいて、食品では10 コピー以上で、糞便では100 コピー以上で陽性とする。



# A型肝炎ウイルス(HAV)のRT-PCR法

## I. A型肝炎ウイルスのRT-PCR法

A型肝炎ウイルス(HAV)はHepatovirus属に分類され、直径27nmで、envelope、coreも認められない。

A型肝炎ウイルスは潜伏期が2から6週間、平均1ヶ月であることから原因食材の検査に当たっては潜伏期間を考慮すること。

### 1. 必要な器具と試薬

#### 1) 器具

サーマルサイクラー、超遠心器、ホモジナイザーあるいはストマッカー、ヘラ、メス、ハサミ、ピンセット、マイクロ冷却遠心器(12,000rpm)、Vortex、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、マイクロピペット(2、20、200、1000 $\mu$ l)、チューブ(0.5ml、0.2ml、1.5ml)、15mlおよび50ml遠心管、濾紙。

#### 2) 試薬

核酸フリー精製水、EDTA・2NA(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)、電気泳動用アガロースME(岩井科学、250g入り Cat. No. 50013R)、エチジウムブロマイド、Random primer hexamer(Amersham Pharmacia, Cat.27-2166-01)

Super Script II(GibcoBRL, Cat. No. 18064-014)

100mM DTT(Super Script IIに添付)

QIA Viral RNA Mini Kit(Qiagen Cat.No.52904)

DNase I(Takara, Cat. No.2 215A)

Ribonuclease Inhibitor(Takara, Cat. 2310A)

Takara EX Taq(Takara, Cat. No. No.RR001A)

50倍濃度TAE buffer[Tris 242g、氷酢酸 57.1ml、0.5M EDTA・2NA(pH8.0) 100mlを蒸留水で1,000mlとする]。

Ethanol、シヨ糖、ポリエチレングリコール6000、NaCl、KCl、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム。

### 2. 操作上の注意

患者のふん便を取り扱う時には安全キャビネット内で行い感染防止に最大の注意を払い行うこと。

RNA抽出後DNase処理を行った方が良く(DNase処理の6の項を参照)、DNaseを取り扱うマイクロピペットは専用のものを用いる。

また、PCRを行う際には手袋をし、チューブの蓋を開ける時にはその前に軽く遠心した後、オープナーを用いること、また、RT-PCR反応液の調製をする部屋とPCR産物の電気泳動の部屋を分ける。それができない時にはそれぞれのクリーンベンチで行う。クリーンベンチで行う際にファンは止めて行う。コンタミ防止とRNaseの混入の防止

に細心の注意を払うこと。

### 3. 食品の処理

#### 1) 貝類の前処理（超遠心法）

本項では食品として最も重要視されている貝類の方法について記す。他の食品においても基本的にはこの方法に準じて行える。超遠心器のローターとの関係もあるが、貝の中腸腺が1gあるいはそれ以上の時は1個または2個を1件として行い、1ロットにつき3検体から10検体（中腸腺として合計12gから24g程度を目途とする）を行う。シジミ、アサリ等の中腸腺が1g以下の貝では中腸腺1gから1.5gを1件検体として、3検体から5検体の検査を行う。

- (1) 殻付き貝類はヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- (2) 貝の外套膜を取り、次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をメス、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。中腸腺を摘出する際にはできる限り周りの白い組織(脂肪)を取り除くこと。特にリアルタイムPCRを行うときには完全に取り除くこと。
- (3) ホモジナイザーまたはサンプリングバッグに中腸腺をいれ、次いで6～10倍量PBS(-)を加え粉碎する。貝類の乳剤は20%以上の濃度にしないこと。20%以上になると回収率が悪くなる。
- (4) 粉碎した試料を遠心管に移す。  
↓10,000 rpm. 20分間冷却遠心し、上清を新しい試験管に取る。
- (5) 超遠心用遠心管に30%ショ糖溶液を遠心管の10%程度入れ、それに(4)の遠心上清を静かに重層させる（ショ糖層を壊さないように初めは特に注意して少量ずつ入れる）  
↓35,000 rpm. 180分間 あるいは40,000 rpm. 120分間 冷却遠心する。
- (6) アスピレーター、注射器等で液層を吸引し、沈渣のみとする。
- (7) 遠心管の管壁をPBS(-)で軽く1回洗い、管壁の周りの水分を滅菌した濾紙で吸い取る。
- (8) 沈渣に200 $\mu$ lのDDW（滅菌後、0.22 $\mu$ mフィルターで濾過したもの）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10,000 rpm. 20分間の遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる）

超遠心器を使えない時には以下の操作で行う。

#### 2) ポリエチレングリコールによる濃縮

- (1) 超遠心法(4)の遠心上清にポリエチレングリコール 6,000を8%、NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌し4℃の冷蔵庫に一晩置く、または室温で2時間攪拌する。  
↓5,000～12,000 rpm. 20分間、冷却遠心する。
- (2) 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（滅菌したもの）で吸い取る。さらにPBS(-)で管壁を軽く2回洗い、その後濾紙で水分を完全に取る。
- (3) 沈渣を200 $\mu$ 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

不純物が多い場合には10,000 rpm. 20 分間の冷却遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。

### 3) 貝の内容液からのウイルス検出

(1) 超遠心法(2)の中腸腺を内容液が漏れないように取り出し、それを大きめの遠心管に入れ、ガラス棒等で中腸腺を潰した後、1度凍結融解する(-40℃以下で凍結させ、融解するときには40℃程度のお湯ですばやく融解する)。

(2) 10,000回転で20分間冷却遠心し、上層の液層を新しいチューブに取る。

(3) 得られた液をRNA抽出に用いる。但し、QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出では560 $\mu$ lまで、それ以上の量の時には2つに分けて行うか、PBSで6倍希釈した後、前項のポリエチレングリコールあるいは超遠心器による濃縮を行い、200 $\mu$ lのDDWに再浮遊させ、それをRNA抽出に用いる。

### 4. ふん便材料の処理

1) ふん便の10%乳剤(PBS)を作製する。

2) 10%乳剤を激しく攪拌した後、10,000から12,000回転、20分間冷却遠心する。

3) 遠心上清の138 $\mu$ lを4. QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出に用い、RNAの抽出を行う。

### 5. QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出

このキットはRNA抽出にCarrier RNAが含まれており、RNA抽出効率はSV Total RNA isolation systemより10倍程度良い。しかしこのキットにはDNase処理が含まれていないので、各自が行わなければならない。

#### 1) 使用前に行う試薬の調整

サンプルを室温(15~20℃)に戻す。

Buffer AW1(Kit Cat. No. 51104)は96~100%エタノールを25ml加える。Buffer AW2(Kit Cat. No. 5110)は96~100%エタノール30mlを加える。Carrier RNA(凍結乾燥品)のチューブにBuffer AVL 1ml添加し、Carrier RNAを溶解させ、Buffer AVLに全量を添加する。添加したBuffer AVL/Carrier RNAは室温で2週間、2~8℃で6ヶ月間安定。Buffer AVL/Carrier RNA中に沈殿物がある場合には、5分間以内に加熱(80℃)により溶解し、6回以上の加熱は行わない。使用前に室温に戻す。

#### 2) 操作法

以下の操作は室温で行う。

(1) 1.5mlチューブにBuffer AVL/Carrier RNA 560 $\mu$ lを入れる。

(2) RNA抽出液を138 $\mu$ l(558 $\mu$ lまで増量することも可能である。詳細はキットの添付マニュアル参照)とポリオウイルス2型(Sabin株)を2 $\mu$ l(10,000個程度の粒子数)入れ、サンプルとBufferを充分混合するため15秒間Vortexにかけ、室温(15~25℃)に10分間置く。チューブをスピンドウンする。

(3) エタノール(96~100%)560 $\mu$ lをチューブに加え、15秒間Vortexをかけた後、チ

ューブをスピンドウンする。液が混濁した時には 9,000Xg(10,000rpm)5 分間遠心する (リアルタイム PCR を行うときにはこの遠心を行ったほうが良い)。

- (4) (3)の液 630  $\mu$ l を QIAamp スピнкаラム (2ml コレクションチューブの中にスピнкаラムが装着されている。それに注入し、蓋を閉め、6,000Xg(8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの(3)の液 630  $\mu$ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (RNA 抽出液が 140  $\mu$ l の時には 2 回で終わる)。
- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500  $\mu$ l を入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000Xg(8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しいコレクション 2ml のチューブに移し、濾液の入っているコレクションチューブは捨てる。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500  $\mu$ l を加え、20,000Xg(14,000 rpm)で 3 分間遠心する。Buffer AW2 の濾液等が接触した時には(8)を行う (このような事は通常起きない)。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブチューブに移し、濾液の入っているコレクションチューブチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する (必ずしも必要でない)。
- (9) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、濾液の入っているコレクションチューブチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 30  $\mu$ l を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000Xg(8,100 rpm)で 1 分間遠心する。
- (10) この濾液が抽出 RNA であり、RNA は -20°C 以下で 1 年間は安定。

## 6. DNase 処理

貝の中腸腺には様々な DNA が含まれており、しばしば PCR で非特異バンドが出現するので、それらを抑制するため DNase 処理を行う。この時点までに DNA の混入が起きた時でも、それらを消化することができる。従って、キットに DNase 処理が含まれていない時にはこの操作を行うことが望ましい。注意として DNase I を使用するマイクロピペットは専用のものを用い、可能であればオートクレイブができるものが良い。検査終了後使用した DNase の含まれている液、チューブ等は全てオートクレイブにかける。

- 1) 表 1 示したように DNase 処理混合液の調製を行う。

表 1. Super Script RT II buffer を用いる時

反応液量	15 $\mu$ l 系	30 $\mu$ l 系
Sample RNA	12.0 $\mu$ l	24 $\mu$ l
5X First-Strand buffer <sup>注</sup>	1.5 $\mu$ l	3.0 $\mu$ l
DDW	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
DNase I (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l