

注)使用する Reverse Transcriptase の buffer を用いる。

- 2) 混合液調製後、37℃に 30 分間置く。
- 3) 次いで 75℃に 5 分間置く。
- 4) 直ちに on ice(または 4℃)する。これが DNase 処理済み抽出 RNA である。

7. RT 反応 [Super Script RT II (GibcoBRL) を用いる時]

- 1) 表 2 の RT 反応調製液を作製する。

表 2. RT 反応液調製液 (Super Script RT II を用いる時)

反応液量	15 μ l 系	20 μ l 系	30 μ l	50 μ l 系
DNase 処理 RNA	7.5 μ l	10.0 μ l	15.0 μ l	30.0 μ l
5X First-Strand Buffer	2.25 μ l	3.0 μ l	4.5 μ l	7.0 μ l
10mM dNTPs	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Random Primer (1.0 μ g)	0.375 μ l	0.5 μ l	0.75 μ l	1.25 μ l
RNAasin (33unit/ μ l)	0.5 μ l	0.67 μ l	1.0 μ l	1.67 μ l
100m M DTT#	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Super Script RT II (200u/ μ l)	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
DDW	2.125 μ l	2.83 μ l	4.25 μ l	2.58 μ l

注)Random Primer の代わりに HAV では HAV-3273 プライマー、ポリオウイルスでは SB2-R1 を用いても良いが、プライマー毎に作製する。

- 2) 反応は 42℃で 30 分から 2 時間行う (通常 1 時間)。
- 3) 次いで 99℃で 5 分間加熱し、on ice(または 4℃)する。

8. 1st PCR

- 1) 1st PCR は HAV とポリオウイルスの 2 つの混合液 (表 3、4) を作製する。

表 3. HAV

1. DDW	33.75 μ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 μ l
4. HAV+2799 primer (25 μ M) ^{注)}	1.0 μ l
5. HAV-3273 primer (25 μ M)	1.0 μ l
6. cDNA (Template)	5.0 μ l
7. EX Taq (5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

表 4. ポリオウイルス

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

注) プライマーの塩基配列は図 2 を参照^{文献 1, 2)}。

注1) ポリオ2型プライマー^{文献3)}

[SB2-R1:5' -AGC AAG CAC CGT ATT GAG CC-3' (4468-4487)
SB2-F1:5' -GTT TCA TGT CTG CTC CGT CTG-3' (4687-4667)
2組の混合液を作製し、以下の条件で増幅を行う。]

2) PCR 反応

増幅は 94℃ 3分を1 サイクル、94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 2分を40 サイクル、72℃ 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。

3) 電気泳動

PCR 産物 8 μ l と 5 倍 Loading buffer 2 μ 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 μ 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。

9. Nested PCR法

食品の時にはウイルス量が少ないので、1st PCRで陰性の時にはNested PCRを行う。但しNested PCRを行う時にはコンタミが起こる危険性が有るので注意して実施する。

1) Nested PCRの調製

Nested PCRの混合液(表5)を作製する。Nested PCRではHAV+2907/-3162プライマーを用いる。

表5. Nested PCRの混合液

1. DDW	36.75 μ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 μ l
4. HAV+2907 Primer (25 μ M)	1.0 μ l
5. HAV-3162 Primer (25 μ M)	1.0 μ l
6. 1st PCR産物	2.0 μ l
7. EX Taq	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

*: プラスミドに組み込んだHAV陽性コントロール(位置2799-3355領域を組み込んだもの)についても行う。

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。

10. 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(1st PCRではポリオ2型、Nested PCRではHAV陽性コントロール)。
- 4) PCRでの増幅産物は目的とする大きさであること。HAV+2799/-3273は498bp、HAV+2907-3162は280bpである。
- 5) 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。
- 6) PCR陽性と判定された時には確認試験としてドットあるいはマイクロプレート・ハイブリダイゼーションで確認する。または遺伝子配列を決定し、既知のHAVと比較して同一のクラスターのものが存在すればHAVとして良い。

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プレート・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。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。

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 μ 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)、酢酸ナトリウム、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)、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、PBST (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нка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)。
- (2) 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 μ l とする) に対して 3 倍容量の Buffer QG を添加する。
- (3) 50℃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、(2)でゲルに対して 6 倍量の Buffer GG を添加し、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 μ 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 μ 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 μ l である。800 μ 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 μ 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 μ 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 \sim 30 μ 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。

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^{#1} 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 μ l を泳動) は 5 倍から 20 倍希釈して用いる。
 ↓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^{#2}を 90 μ l 入れ、それに加熱処理した DNA を 10 μ l ずつ 1 検体当たり 1 ウェルに入れる。

#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	P	検	検	検		
	C	C	体	体	体		
Control HAV-prob+3129	A	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○
	C	○	○	○	○	○	○

図 1. 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 回洗淨する。
- 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)

	プローブコントロール	プローブ
100pmol/ μ l probe	TE 1 μ l	1 μ l
100 μ g/ml 牝精子 DNA 注1	5 μ l	5 μ l
3 倍 1.5M NaCl buffer	3.3 μ l	3.3 μ l
DDW	0.7 μ l	0.7 μ l

注1 サケ DNA : DNA 量 10mg/ml のものを T₁₀E₁ で 100 μ 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 混合液と合わせる。

表 7. ハイブリ液 (1 検体当たり) 注

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

注: ハイブリ液は使用前に氷冷しておく。

- 6) 表 6 で作製した混合液 10 μ l に表 7 で作成したハイブリ液 90 μ l を加え、100 μ l とし、それを各ウエルに 100 μ l ずつ入れる。

↓
マイクロ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 (マイクロプレート内の 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 回洗淨する。プレート洗淨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、洗淨液等は 1000ppm 濃度の次亜塩素酸ソーダに直ちに漬ける。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エルに 100 μ 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 回洗淨する。
- 9) 全てのウエルに発色液^{#3}を 100 μ 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% H₂O₂ 2μl 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 H₂SO₄) を 50μl 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・ハイブリダイゼーションインによる A 型肝炎ウイルス (HAV) 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、MgCl₂、

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 MgCl₂ を 200μl 加える (最終濃度 50mM MgCl₂)。

Streptavidin Alkaline Phosphatase: Promega, Cat.No. V5591

ビオチン標識プローブ: HAV-probe+3129。

3. 操作法

- 1) アガロースゲル電気泳動で HAV 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、その 1 μ 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 20cm² 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 9）5ml にビオチン標識プローブを 50 μ l（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	0	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 8 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 μ 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 μ l を加え、発色基質溶液を調整する。
加える stock 溶液は 50 μ 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. A 型肝炎ウイルスのリアルタイム PCR 法

cDNA 作製までは RT-PCR 法と同様に行う。ここで示してある cDNA は DNase 処理済みのもので、Random primer で cDNA を作製したものをを用いる。

1. 反応液の調整

反応液の調製は表 10 に示した。但しこの方法は ABI PRISM7700 あるいは 7000 のものである。機種が異なる時にはそれぞれの機種での最適な条件に合わせる。ウイルス陽性コントロール (10^7 から 10^0) および検体は各 2 ウェルを用いる。

表 10. 反応液の調製

DDW	16.6 μ l
TaqMan Universal Master MIX (ABI)	25.0 μ l
100pmol/ μ l プライマー HAV+449*	0.2 μ l
100pmol/ μ l プライマー HAV-557	0.2 μ l
4pmol/ μ l プローブ HAV+482-P-FAM	3.00 μ l
cDNA	5.00 μ l
計	50 μ l

*: プライマー、プローブの配列は図 2 参照^{文献}

2. PCR 反応

PCR 反応は以下に示した条件で行う。

50°C 2 分間
95°C 10 分間
95°C 15 秒間
56°C 2 分間

} 50 回

3. ABI PRISM7700 (ABI) で蛍光強度測定

蛍光強度測定し、標的領域をプラスミドに組み込んだ DNA を 10^7 から 10^0 コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度(コピー数)を算出する。

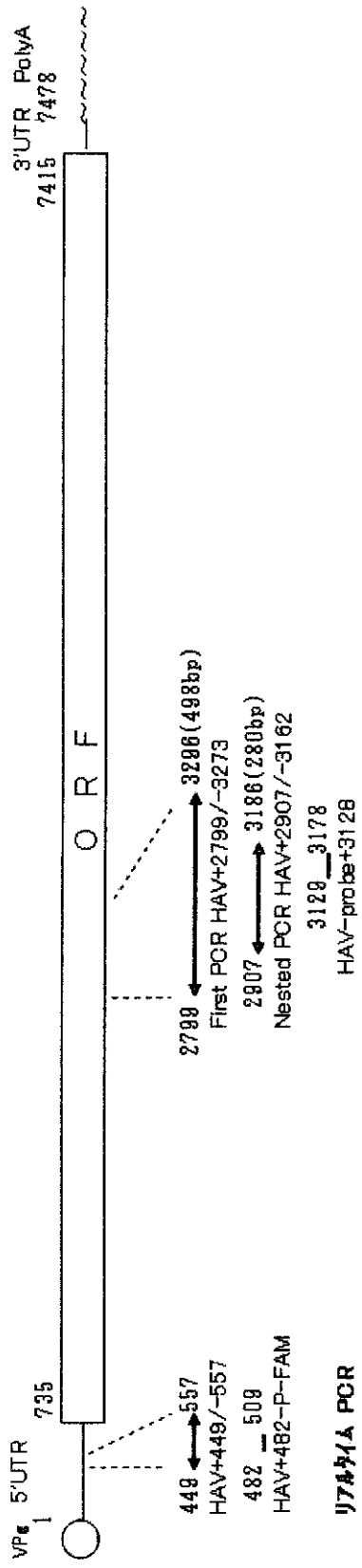
4. 判定

サンプルのコピー数が 2 ウェル共に 10 コピー以上の時に陽性とする。また、1 ウェルのみ行ったときには再度行い、2 回共に 10 コピー以上の時に陽性とする。判断に困難を来したときには再度行い判定する。

IV. 参考文献

1. Robertson. H. et al: J Gen Virol. 73:1365-1377
2. 戸塚敦子: 肝炎ウイルス検査法マニュアル、A 型肝炎ウイルス RNA の RT-PCR 法による検出法 (印刷中)
3. 武田直和: 未発表
4. 西尾 治、秋山美穂、加藤由美子: リアルタイム PCR 方による A 型肝炎ウイルスの検出について、第 76 回日本感染症学会抄録 P251、2002

(西尾 治)



RT-PCR,マイクロプレートハイブリダイゼーション

RT-PCR,マイクロプレートハイブリダイゼーション

- <Primer> HAV+2799 5'-ATT CAG ATT AGA CTG CCT TGG TA-3'
- HAV+2907 5'-GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GA-3'
- HAV-3162 5'-CTT CYT GAG CAT ACT TKA RTC TTT G-3'
- HAV-3273 5'-CCA AGA AAC CTT CAT TAT TTC ATG-3'
- <Probe> HAV-probe+3129 5'-Biotin-CCA TAT AAA GAA DTG AGA TTA GAA GTT GGG AAR CAA AGA YTC AAG TAT GC-3'

リアルタイムPCR

- <Primer> HAV+449 5'-AGG GTA ACA GCG GCG GAT AT-3'
- HAV-557 5'-ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCA CT-3'
- <Probe> HAV+482-P-FAM 5'-FAM-AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C-TMRA-3'

図2. A型肝炎ウイルス検出のプライマーおよびプローブ