

遺伝子を標的とした nested PCR より感度が高かった。

次に、FAM 標識の omp1 および 2 と VIC 標識の IS1 および 2 を併用したところ、omp2 と IS1 を併用すると感度が著しく落ちることか示された。

## 2 設計したプライマーおよびプローブの特異性

omp1 と IS1、omp1 と IS2 の組み合わせで、FAM と VIC の同時検出で検討した。その結果、IS2 は 35 サイクル前から、一般細菌のいくつかに非特異的に反応した。また、omp1 と IS1 は 36 サイクル以降で、いくつかの細菌に非特異的に反応したか、36 サイクル以前では陽性のものはなかった。

## 3 PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響

卵黄 500  $\mu$ l に等量の PBS-NaCl を加えたときに、NaCl 濃度が 2.9% 以上で顕著なペレット量の減少がみられた。また、Tween20 の濃度はペレットの量に影響しなかった。

## 4 スパイク試験の結果

表 2 に IS2 により 2 回行った結果を示す。検体あたりスモールスケールでは 1,000 個、ラーシスケールでは 10,000 個まで 2 回とも検出可能であった。Omp1 についてもほぼ同様結果であった。

## 5 市販鶏卵の初期調査の結果

市販鶏卵、計 115 個の卵黄 500  $\mu$ l からの *C burnetii* 遺伝子検出はすべて陰性であった。コントロールとして用いた *S enteritidis* は 500 個でスパイクしたものが 4/4 (100%) 陽性、50 個が 1/4 (25%) 陽性であった。

## 東京都健康安全研究センターにおける検討 B 研究方法

### 1 卵黄からの *C burnetii* 遺伝子検出法の検討

卵黄をストマノカーにより、よく粉碎後、既知のコピー数の *C burnetii* Nine Mile 株 II 相菌を添加した。0.25~2.0 M のモル濃度の異なる NaCl 加 PBS をそれぞれ等量加えホモシナイスし、25,000G で高速遠心後の卵成分の沈殿量を比較した。さらに、遠心沈渣を SDS、proteinase K で消化後、NaI 法により DNA を抽出した (または、市販キト QIA amp DNA Mini Kit で抽出し、DNA 溶液を 20  $\mu$ l に濃縮)。得られた DNA 10  $\mu$ l を材料に、com1 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法による遺伝子検出をおこなった。

### 2 市販鶏卵の初期調査

東京都内で販売されていた卵 100 個について、上記の方法により検査を実施した。

## C 研究結果

### 1 卵黄からの *C burnetii* 遺伝子検出法の検討

NaCl 濃度 1M の PBS を加え、ホモシナイス後、25,000G で遠心した場合に *C burnetii* の検出感度を落とさずに、卵成分の沈殿量が最も少なくなり *C burnetii* 遺伝子の抽出効果か最も高いことか判明した。また、同操作による鶏卵 (卵黄) 中への添加実験を実施した結果、*C burnetii* 検出感度は  $5 \times 10^2$  個/卵黄 10ml であった。

### 2 市販鶏卵の初期調査の結果

市販鶏卵 100 個の検査を実施した結果、*C burnetii* 遺伝子は検出されなかった。

## 栄研化学(株)生物化学研究所における検討 B 研究方法

### 1 LAMP 法を用いた *C burnetii* の検出法

①プライマーの設計と LAMP 反応 *C burnetii* に特異的である 27-kDa outer membrane protein をコードしている遺伝子 (com 1) を標的として LAMP の基本プライマーを設計し、あわせてより効率よく増幅させるために Loop primer の設計を行った。全量を 25  $\mu$ l として、65°C の等温で 60 分間の反応条件で測定した。Loop primer の効果確認には蛍光リアルタイム測定装置 (ABI 7000) を、それ以外の測定にはリアルタイム濁度測定装置 (LA-200) を用いて測定した。② 使用菌株 *C burnetii* の鑄型として Nine Mile 株の genomic DNA を用いた。*C burnetii* 以外の菌株として市中肺炎の起炎菌を中心に 35 菌株を用いた。③感度試験 *C burnetii* は蛍光染色によるカウント法で細胞数を確認したもののから調製した genomic DNA を希釈し、600、60、6 個/test になるように調製し LAMP 反応を行った。なお、対照として「Q 熱診断マニュアル」(国立感染症研究所・地方衛生研究所編) 記載の PCR 法で測定した。④特異性試験 *C burnetii* 以外の 35 菌株は  $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$  個/test の濃度で測定した。⑤増幅産物の確認 LAMP 産物の電気泳動による確認およびプライマーの F1 領域と F2 領域間に制限酵素 Hinc II で切断される配列があるのを利用して、産物か目的とした遺伝子領域であるかどうか確認を行った。

## 2 卵からの *C burnetii* DNA 抽出と検出法の確立

鶏卵から *C burnetii* を検出するための処理法について検討を行った。菌体の回収効率については、

- ① 卵黄の採取法の検討 卵黄のみを採取する・検体量を多くし検出感度を確保する
- ② 卵黄の沈殿量の検討 塩濃度を高め沈殿量を軽減する

③ QIAamp DNA Mini Kit による DNA 抽出の検討 抽出効率を高める。

これら 3 つの要因について検討した。

## C 研究結果

### 1 LAMP 法を用いた *C burnetii* の検出

com 1 を標的として LAMP の基本プライマーを設計し、さらに Loop primer を添加することで検出時間を 20~30 分短縮することができた。これらの系により *C burnetii* Nine Mile 株の genomic DNA を 65°C の等温で 30 分以内に検出してきた。検出感度は 6 個/test で、対照である nested PCR 法と同等であった。

*C burnetii* のみ増幅し、非 *C burnetii* 35 菌株に対しては本菌の検出感度の数千倍から数万倍の鑄型量でも、LAMP 反応は認められず、高い特異性を示した。従って、本法は、*C burnetii* の迅速検出に有用であると考えられた。

### 2 卵からの *C burnetii* DNA 抽出と検出法の確立

卵白と分離した卵黄を比較的目的の粗いメッシュに通すことで、効率よく卵黄のみを採取することが出来た。

全卵より卵黄のみを 10ml 採取し、5% NaCl, 0.1% Tween-20/0.01M PB pH 7.2 を 30ml 添加した後、13,000rpm・45 分・4°C で遠心し、上清除去後、2ml の TE を添加・混合後、12,000rpm・45 分・4°C の条件で遠心し、その沈殿物を QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社製) を用いて DNA 抽出する方法が至適であると考えられた。本法で *C burnetii* II 相菌の死菌を用いて添加回収実験を行った結果、LAMP 法によって 1,000 個/卵黄 10ml (卵 1 個の卵黄量を 17ml とすると 1,700 個/卵黄 1 個) が検出可能であり、添加した菌体と同等の回収結果が得られた。

#### D 考察

国立感染症研究所での検討結果に関して、今回の結果から、*C burnetii* 検出のために新たに設計したプライマーおよびプローブによる Real Time PCR 法は、omp1 と IS2 の組み合わせによる検出感度および特異性ともに良好であった。しかし、36 サイクル以降では、いくつかの細菌に対し陽性となったので、以後の検査では 36 サイクル以前で上昇するもの（陽性コントロールと曲線がほぼ同じ高さまで）を陽性、上昇途中のものおよびそれ以降で上昇するものを擬陽性あるいは保留、全く上昇しないものを陰性とする事とした。

PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響は、塩濃度が高いほどペレットが小さくなり、Tween20 の濃度はペレットの量には影響しなかった。そこで、高塩濃度や高 Tween20 の存在下では、DNA 抽出に影響かたることを懸念し、スパイク試験では、スモールスケールでは 5% NaCl-PBS を、ラーシスケールでは 8% NaCl-PBS を使用することとした。その結果、スモールスケールでは、最大で卵黄 500  $\mu$ l 内に 100 個の菌を、ラーシスケールでは、最大で卵黄 10ml あたり 10,000 個の菌の検出が可能であった。これを、卵一個の卵黄量 17ml に換算すると、スモールスケールでは卵一個あたり 3400 個の、ラーシスケールでは 17,000 個の菌が検出可能である。従って、今回のスパイク試験の結果から、スモールスケールの方がより高感度であることが示された。また、スモールスケールの方が一度に多くの検体を処理することが可能で、手技も煩雑でないため、市販の卵からの検出にはスモールスケールを用いることにした。

市販鶏卵の検査結果は 115 個すべてが陰性であった。陽性コントロールとして用いた *S enteritidis* は 500 個をスパイクしたとき

は常に陽性となったので、検出限界は最低でも卵一個あたり 17,000 個と考えられた。しかし、50 個の菌が検出される場合もあり、実際の感度はこの検出限界よりも若干高いものと推察された。今後さらに、卵黄からの DNA 抽出法を改良し感度を上げていくための検討が必要と考えている。

次に東京都健康安全研究センターにおける検討では、卵黄からの *C burnetii* 遺伝子検出法について、卵黄への添加実験で nested PCR による *C burnetii* 検出感度は  $5 \times 10^2$  個/卵黄 10ml であった。これは鶏卵 1 個（卵黄 17ml）あたりでは 850 個となる。また、市販鶏卵の初期調査として市販卵 100 個の検査を実施した結果、*C burnetii* 遺伝子は検出されなかった。

さらに栄研化学(株)生物化学研究所における検討では、LAMP 法での *C burnetii* 検出感度は 1,700 個/卵黄 1 個のスパイク量（1,000 個/10ml）が得られた。これは、操作中のロスが無かったと仮定すると最終的に約 125 個/assay (5  $\mu$ l) の計算となる。Genomic DNA と II 相死菌の反応性を比較したところ、II 相死菌の反応性は LAMP でも nested PCR でも比較的悪く、50 個/assay は検出できるか、5 個/assay は検出されなかった。このことから、約 125 個/assay は LAMP 検出感度限界に位置していると考えられた。

以上のように、今回 3 施設での検討を行うにあたり、感度検定用のサンプルは同一のものを使用し、3 施設でそれぞれ可能な範囲で抽出法などの統一をした上で、検出法はそれぞれの独自に検討を行った。種々の条件の違いがあり、感度を単純に比較することはできないが、方法は異なっても 3 施設での *C burnetii* 検出感度は 850 個～3400 個/卵 1 個という範囲であった。

今後の課題としては、①それぞれの検出法について検出感度の向上を目指すこと、②市販鶏卵についての調査を追加検討し、結果によっては関連食品についても検討すること、③親鶏、死ごもり卵などに対する血清および分子疫学を展開し、汚染状況の把握を様々な角度から行うこと、④鶏の感染実験を行い、コクシエラの体内動態や卵への移行の有無、移行する菌数などを調査すること、⑤マウスを用いた経口感染モデルを確立し、感染に必要な最低菌量を検討すること、⑥人のQ熱症例での感染経路の検討をすること、などかあげられる。

#### E 結論

本年度の解析で得られた *C burnetii* 検出感度は、850 個～3400 個/卵 1 個という範囲であり、これによる市販鶏卵の初期調査ではすべて陰性であったか、その感度か卵の *C burnetii* 汚染の有無の検討や健康被害のリスクの検討に十分かどうか、また情報が少なく判断することは困難である。今後さらに検出方法の改善に向けた検討を行うとともに市販鶏卵からの検出数を追加する予定であるか、鶏卵の *C burnetii* 汚染の有無のみの検証、実態調査にととまらず、親鳥の実態調査や経口感染などに対する基本的な検討をすすめていく必要かあると思われる。

#### F 健康危険情報

今回の解析からは、*C burnetii* に汚染された卵は検出しなかった。但し、限られた数の結果であることと、検出限界以下の汚染かないとはいえないことから、健康被害の有無の結論には至っていない。現時点でいたずらに危険性を指摘することは慎むべきであり、今後もその可能性については引き続き考慮しつつ研究の進捗を見守ることか望ましい。

#### G 研究発表

##### 1 発表論文

なし

##### 2 学会発表

- 1) 佐藤 梢, 小川基彦, アクス・セティヨノ, 山崎 勉, 岸本寿男 Real Time PCR (TaqMan) による *Coxiella burnetii* 検出法の開発 第 21 回日本クラミシア研究会・第 10 回リケノチア研究会 東京 2003 年 11 月 1 日 -2 日
- 2) 佐藤 梢, 小川基彦, アグス・セティヨノ, 山崎 勉, 岸本寿男 Real Time PCR (TaqMan) による *Coxiella burnetii* 検出法の開発 第 52 回東日本感染症学会 横浜 2003 年 10 月 30 日-31 日
- 3) 平井昭彦, 金子誠二, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 貞升健志, 新開敬行, 村田以和夫, 諸角 聖 市販牛乳中の *Coxiella burnetii* 汚染状況および鶏卵中の *C burnetii* 検査法の検討、第 137 回日本獣医学会学術総会、2004 年 4 月
- 4) 貞升健志, 新開敬行, 金子誠二, 平井昭彦, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 村田以和夫, 諸角 聖 マヨネーズ中の *Coxiella burnetii* 検査法の検討、第 137 回日本獣医学会学術総会、2004 年 4 月
- 5) 百田隆祥, 小島 禎, 他戸正成, 小川基彦, 佐藤 梢, アクススティヨノ, 岸本寿男 LAMP 法による *Coxiella burnetii* の検出の基礎 第 21 回日本クラミシア研究会・第 10 回リケノチア研究会 東京 2003 年 11 月 1 日 -2 日
- 6) Momoda, T, Ogawa, M, Kojima, T, Ikedo, M, Sato, K, Setiyono, A, Kishimoto, T Sensitive and Rapid Detection of *Coxiella burnetii* by Loop-mediated Isothermal Amplification

(LAMP), a Novel DNA Amplification  
Method American Society for  
Microbiology 104th General Meeting New  
Orleans, LA, USA May 24, 2004

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

なし。

2 実用新案登録

なし。

3 その他

なし。

表1 設計したプライマーおよびプローブの感度

			検出可能な菌数				
			100	10	1	0.1	0.01
omp1FAM	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	-	-
omp2FAM	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	-	-
IS1VIC	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	+
		2回目	+	+	+	+	-
IS2VIC	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	+	-
Com12-34	nested PCR	1回目	+	+	+	-	-
		2回目	+	+	+	-	-

表2 スパイク試験の結果

		スパイク菌数/検体					
検体量(卵黄量)		100,000	10,000	1,000	100	10	
Small Scale	5.9%	0.5ml	++	++	++	±+	--
Large Scale	8%	10ml	++	++	±-	--	NT

+ 35 サイクル以前に上昇、± 36 サイクル以後に上昇、- 上昇せず  
(IS2により2回行った結果。Omp1もほぼ同様の結果)

## 検体の受付から判定までの流れ

自治体担当者または本省より連絡

送付票ファノクス

採材日、検体数、到着予定日時

担当者連絡先（氏名、所属、電話、ファノクス、(E-mail) 確認）

検体受理（内容確認）

番号記入

ディレクティジェンFluA+Bによる再試

RNA抽出（残りは-80℃保管、三室冷凍庫上段）

RT-PCR、アガロース電気泳動（一次判定）

本省へ連絡

塩基配列解析

陽性対照の混入否定、HA塩基配列及び解裂部位のアミノ酸配列推定（高病原性型）

（二次判定）報告

塩基配列解析およびウイルス分離

MDCK細胞準備、発育鶏卵注文、ニワトリ血球注文

検体接種（細胞、発育鶏卵）

HA反応、蛍光抗体、HI試験、RT-PCR

三次判定（確定）

ウイルス分離された場合はウイルス三部へ同定確認依頼

## 検体からの RNA 抽出

作業場所 3室 P2 日立安全キャビネット

作業服 手袋、マスク、ブルーディスボ前着、キャップ (3室 P2 に設置)

器具類 ピペトマン、フィルターチップ、ピンセット (3室 P2 の内棚のタイトボックス)  
ディスボピペト、ピペトエイト (3室 P2 引き出し)

試薬準備 (はじめてキットの箱を開いたとき) キット (青い箱) は 3室 P2 棚上段

QIAamp Viral RNA Mini Kit (for viral RNA purification from plasma, serum, and cell-free body fluids, QIAGEN #52904)

- ・ エタノール 未開封又は RNA 用としたボトルから 50ml チューブにデカントにより分注
- ・ Carrier RNA の Buffer AVL への添加  
Carrier RNA のチューブに 1 ml の Buffer AVL を加え、溶解後もとのボトルに戻す。  
4℃保存、6ヶ月安定  
(使用直前に沈殿がないか確認。必要なら 80℃で溶かして室温に戻す)
- ・ Buffer AW1 の調整  
19ml の AW1 濃縮液に 25ml のエタノール (96 から 100%) を添加  
室温保存、1年間安定
- ・ Buffer AW2 の調整  
13ml の AW2 濃縮液に 30ml のエタノール (96 から 100%) を添加  
室温保存、1年間安定

## 操作を始める前に

- ・ サンプルを室温 (15 から 25℃) にする。  
Buffer AVE (溶出液) を室温に戻す。  
Buffer AW1, AW2 にエタノールを加えたか確認
- ・ Buffer AVL/Carrier RNA に沈殿がないか確認
- ・ 遠心機の温度は室温



操作手順 (緑のチューブはキットに入っていないのでアシストチューブを使用)

- 1 Buffer AVL/carrier RNA 560 $\mu$ l を 1.5ml microtube に分注
- 2 サンプル 140 $\mu$ l を加えて 15 秒間 Vortex。
- 3 室温 10 分間保温。
- 4 軽く遠心
- 5 560 $\mu$ l のエタノールを添加 (ここままで 1260 $\mu$ l)、15 秒間 Vortex、軽く遠心
- 6 630 $\mu$ l を QUAamp スピнкаラムに注入 (2ml チューブにセットしておく)。キャップをして 6000g (8000rpm)、1 分間遠心。濾過液とチューブは捨てる。
- 7 再度残りの液 630 $\mu$ l を添加遠心。濾過液とチューブは捨てる。
- 8 スピнкаラムを 2ml チューブにセット。AW1 500 $\mu$ l を添加。8000rpm、1 分間遠心。
- 9 スピнкаラムを 2ml チューブにセット。AW2 500 $\mu$ l を添加。14000rpm、3 分間遠心。
- 9a スピнкаラムを 2ml チューブにセット。14000rpm、1 分間遠心。
- 10 スピнкаラムを 1.5ml チューブにセット。AVE 60 $\mu$ l を添加。室温 1 分間保温。8000rpm、1 分間遠心。
- 11 RT-PCR に使用。残りは $-80^{\circ}\text{C}$ 保管 (3 室超低温冷凍庫上段-1)

## RT-PCR

TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) #RR024A or B、共通（ハイオテロ用）冷凍冷蔵庫に保管

試薬の分注作業は今岡または井上の実験台にて行う。

検体の添加は該当チューブだけを3室P2に搬入する。

陽性対照 RNA の添加は三室実験台にて該当チューブだけを移動して行う。

### 器具の用意

ピペットマン P20, P200、フィルターチップ (P20, P200) 0 2ml PCR tubes、チューブラック (for 0 2ml, 0 5ml, 1 5ml microtubes)

(試薬分注用、検体 RNA 添加用、陽性コントロール添加用は別々のピペットを使用すること。3室P2の内棚のタイトホックス)

Thermal cycler (ASTECH model PC806, File HPAI-RTPCR in Box3)

水

### 検出用プライマーセット

A型インフルエンザ検出用プライマーセット

Type A/M30F TTCTAACCGAGGTCGAAACG

Type A/M264R2 ACAAGCGTCTACGCTGCAG

PCR産物の長さ 231 bp

ウイルス三部西藤さん設計 (50 $\mu$ M stock, 20 $\mu$ M working solution)

H5 515f CATACCCAACAATAAAGAGG

H5 1220r GTGTTCATTTTGTTAATGAT

PCR産物の長さ 708bp

感染研ホームペーシ (ウイルス三部) (100 $\mu$ M stock, 20 $\mu$ M working solution)

新たに合成したプライマーセット (50pmol/ $\mu$ l) も同じ箱に保管してあります。(共通 (ハイオテロ用) 冷凍冷蔵庫に保管、アシスト緑の箱)

### 陽性対照 RNA

A/duck/Hong Kong/820/80 抽出 RNA (三室超低温冷凍庫上段アシストホックスに保管)

(32 $\mu$  を使ったときに 10<sup>6</sup> 希釈まで陽性になるはず、ウイルス三部今井、)

RT-PCR 試薬混合分注

A 型インフルエンザウイルス検出 (M遺伝子、231bp 増幅)  
[プライマー以外はすべてキット]

	1 反応	5 反応	反応
DW	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	$\mu$ l
10x One Step RNA PCR Buffer	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	$\mu$ l
dNTP mix (10mM each)	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	$\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	10 $\mu$ l	50 $\mu$ l	$\mu$ l
M30F primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
M264R2 primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
AMV RTase XL (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
AMV-Optimized Taq (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
Total	30 $\mu$ l	150 $\mu$ l	$\mu$ l

H5 インフルエンザウイルス特異的検出 (HA 遺伝子、708bp 増幅)  
[プライマー以外はすべてキット]

	1 反応	5 反応	反応
DW	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	$\mu$ l
10x One Step RNA PCR Buffer	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	$\mu$ l
dNTP mix (10mM each)	5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	$\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	10 $\mu$ l	50 $\mu$ l	$\mu$ l
H5/515f primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
H5/1220r primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
AMV RTase XL (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
AMV-Optimized Taq (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	$\mu$ l
Total	30 $\mu$ l	150 $\mu$ l	$\mu$ l

軽く Vortex、遠心後 30 $\mu$ l ずつ分注 (水上においておく)

検体添加と反応

20 $\mu$ l の DW (陰性対照)、検体 RNA、陽性対照 RNA を順次添加  
(チューブのフタはその度に開閉)

Program Temp Control System (ASTECC model PC806,) にセトする

File HPAI-RTPCR 1n Box3

50°C x 30min

94°C x 2min

94°C x 1min ↓ ←

45°C x 1min ↓ ↑ 30 cycles

72°C x 2min → ↑

72°C x 10min

4°C x ∞

↓↓

アガロースゲル電気泳動による検出

## アガロースゲル電気泳動による増幅 DNA 断片の検出

### 泳動用バッファー、ゲルの調製

1x TAE containing EtBr

DW	1960ml
50x TAE	40ml
10mg/ml EtBr	100 $\mu$ l
<hr/>	
Total	2000ml

1 5% agarose gel

SeaKem GTG agarose 1 5g

1x TAE containing EtBr 100ml

電子レンジで 2- 3 分間加熱融解

ミューピット 8 レーン用には 15ml、17 レーン用には 30ml を入れる

固化後 1x TAE containing EtBr に保存

### 検体のゲル電気泳動

ゲルをミューピットにセットし、泳動バッファーをゲルが浸るまで加える。

RT-PCR 反応終了液 10 $\mu$ l に 1 $\mu$ l の loading buffer を添加

マーカー (100bp DNA Ladder、TaKaRa#3407A、100-1500bp)

5 $\mu$ l に 1 $\mu$ l の添付の 6x loading buffer を加える (500bp 約 150ng、他は約 50ng、)

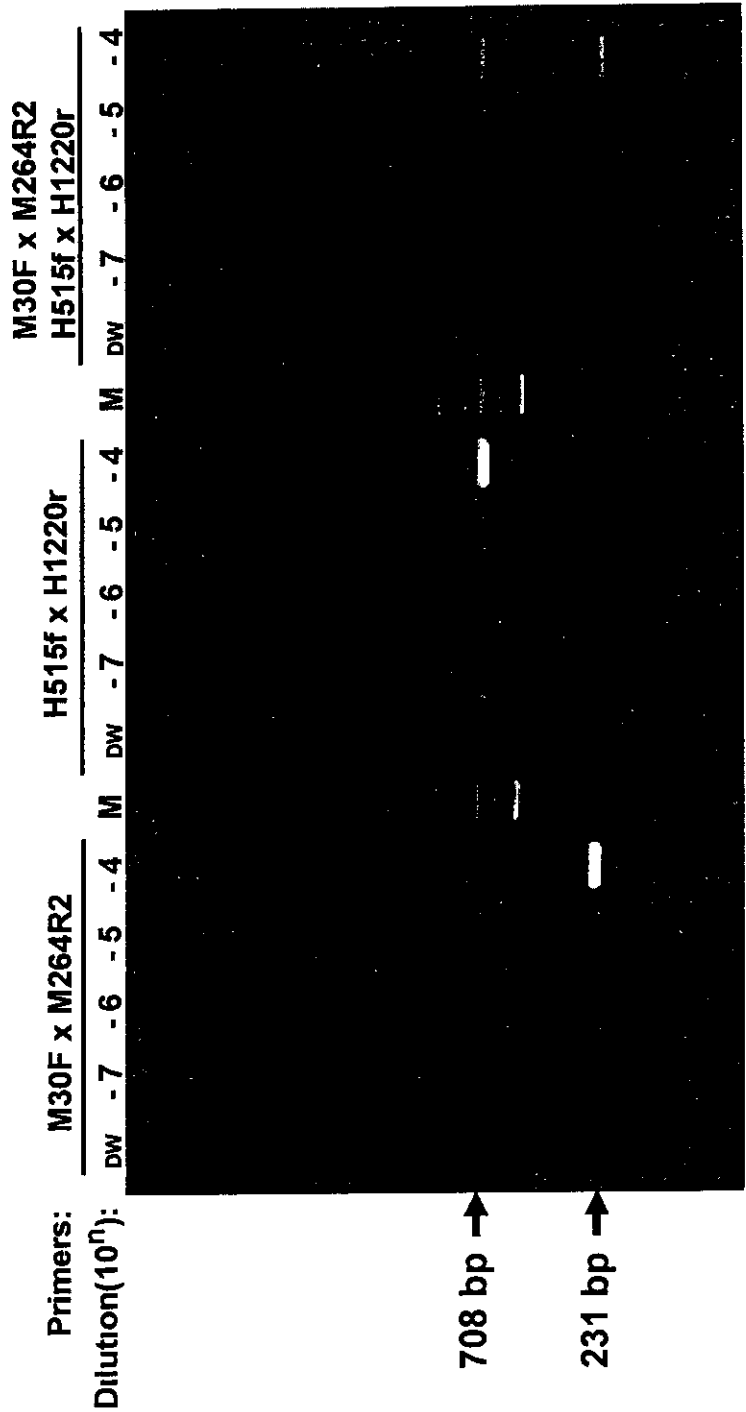
100V、30 分泳動

写真撮影、プリントとファイル保存

(M 遺伝子 231bp、HA 遺伝子 708bp)

31604-5Tan  
(31704)

RT-PCR  
TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)#RR024



Positive A/duck/HongKong/820/80      1 5% SeaKem GTG agarose  
 Dilution 10<sup>n</sup> with DW                      1x TAE containing 0 5µg/ml EtBr  
 20µl RNA/50µl reaction                    100V, 30min  
 10µl/lane

## 増幅フラグメントの塩基配列解析

(シーケンサー予約確認)

- 1) フラグメント DNA の精製
- 2) サイクルシーケンシング
- 3) 塩基配列の解析

### 1) フラグメント DNA の精製

PCR clean-up Gel extraction, NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel #740590 50)

- ・ アカロースゲル電気泳動
- ・ 目的のバンドを Long Wave UV 下で切り取り、細切し、1.5ml マイクロチューブに入れる。
- ・ 軽く遠心し、おおよその量を量る。(100~200  $\mu$ l)
- ・ 3倍量の NT1 buffer を加え、50°C で 5~10 分間加熱して溶解する。
- ・ 2ml collecting tube にセットした NucleoSpin Extract column に添加する。  
8000g (9400rpm) で 1 分間遠心。通過液を捨てて再びセットする。
- ・ 600  $\mu$ l の NT3 buffer (エタノール添加済み) を加える。
- ・ 11000g (11000rpm) で 1 分間遠心。通過液を捨てて再びセットする。
- ・ 200  $\mu$ l の NT3 buffer (エタノール添加済み) を加える。
- ・ 11000g (11000rpm) で 2 分間遠心。通過液を捨てて再びセットする。
- ・ 70°C、2-5 分間保温 (メンブランを乾燥させる)
- ・ カラムを新しい 1.5ml のマイクロチューブにセット
- ・ 50ml の Elution buffer NE を加え、室温 1 分間保温
- ・ 11000g (11000rpm) で 1 分間遠心。
- ・ 5ml を アカロース電気泳動し、精製度確認、濃度推定

### 2) サイクルシーケンシング (Big Dye Terminator v3.1)

Ready reaction mix	4 $\mu$ l
BigDye Sequencing buffer (5x)	2 $\mu$ l
1pmol/ $\mu$ l of primer	3.2 $\mu$ l
template DNA	x $\mu$ l
DW	20-x $\mu$ l
<hr/>	
Total	20 $\mu$ l

DNA 3-10ng for M gene, 5-10ng for HA gene

Primer RT-PCR と同じもの 4 種類

Program Temp Control System (ASTECC model PC806) にセットする

File BIGDYE SEQ 1n Box2

96°C x 1min  
96°C x 10sec ↓ ←  
50°C x 5sec ↓ ↑ 25 cycles  
60°C x 4min → ↑  
4°C x  $\infty$  (2 時間 30 分て終了)

add 2ml of 2% SDS

98°C x 5min, 25°C x 10min (File SDS-TREAT in Box2)

apply to Centr-Sep spin column

(サイクルシーケンシングをはしめるときに0.8ml DWで膨潤、2時間静置、自然落下後  
遠心 3000rpm、2分間しておく)

3000rpm、2分間

乾燥 (Speed-Vac, TOMY CC-101で30分間)

溶解 20µl HiDi Formamide (3室冷凍庫最上段に分注済み)

95°C、2分間加温後、氷上で急冷却

シーケンサー用 96穴プレートに移す

以降は ABI3100 操作マニュアル参照

(所要時間 1 ラン 4 サンプル 3 時間かかるとして予約確認)