

プロジェクト5：ウイルス

狂犬病ウイルス

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 22 年度 分担研究報告書

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究
狂犬病ウイルスに関する研究（海外の研究機関との連携）

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部	
	朴 天鎬	北里大学・獣医病理学研究室	
	山田章雄	国立感染症研究所・獣医科学部	
	研究協力者	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
		加来義浩	国立感染症研究所・獣医科学部
		飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部
		阿戸 学	国立感染症研究所・免疫部
		杉浦尚子	国立感染症研究所・獣医科学部
		宇田晶彦	国立感染症研究所・獣医科学部
		佐藤 豪	国立感染症研究所・獣医科学部
奥谷晶子	国立感染症研究所・獣医科学部		
海外研究 協力者	Beatriz Quiambao Daria	Research Institute for Tropical Medicine (RITM)	
	Daria Manalo	RITM	
	Catalino Demetria	RITM	
	Nguyen Thi Kieu Anh	The National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi (NIHE) Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC)	
	Qing Tang	Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC)	

研究要旨 本研究は CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワークを構築してその連携を強化することが目的である。平成 22 年度は、ラボラトリーネットワークの委託連携機関であるフィリピン¹の熱帯医学研究所 (RITM)、ベトナム²の国立衛生疫学研究所 (NIHE)、中国³の疾病制御センター (China CDC) に韓国衛生研究所/疾病センター (NIH/KCDC) を加えてネットワークの拡大強化を行った。また、共同研究の推進による連携強化を図るため、前年度までに確立した成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について国立感染症研究所 (NIID) において実技を交えた議論と研修を行った。また、新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行い、感染マウスの脊髄で特異的に遺伝子の発現低下を示す遺伝子群（神経疾患関連遺伝、GABA 関連遺伝子、イオンチャネル関連遺伝子）を見いだした。本研究により狂犬病ネットワークの基盤が構築できたが、連携機関を統合したネットワークの構築までには至っていない。現在、ネットワーク化および連携強化を進めるためにゲノム情報の共有化とともに、アジア関係諸国で標準化がなされていない中和抗体測定法について標準血清の検証と力価測定法の共有等を NIID、RITM、NIHE、China CDC、NIH/KCDC 間で行うことについて提案・検討を進めている。

A. 研究目的

本研究は CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワークを構築してその連携を強化することが目的である。今年度（平成 22 年（2009））は、委託連携機関を増やし、前年度までに確立した成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について国立感染症研究所（NIID）において実技を交えた議論と研修を主体に行うことでネットワークの拡大と連携強化を行うことにした。

B. 研究方法

ラボラトリーネットワークの確立と強化を推進するために、委託連携機関に韓国衛生研究所/疾病センター（NIH/KCDC）を加えてネットワークの拡大強化を行い、共同研究の推進と連携強化を図るために NIID とともに確立した研究成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について RITM、NIHE、China CDC の担当者と実技を交えた議論と研修を行う事にした。また、新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行った。

C. 研究結果

（1）実技を交えた議論と研修

RITM（平成 22 年（2010）3 月 18 日-28 日）：狂犬病の迅速抗原検出系の確立に必要な手技および検出用抗体作成に必要な免疫用

plasmid の回収・増殖方法を習得。

ウイルス感染マウス脳のスランプスメアを利用して免疫組織化学を利用した迅速抗原検出系でウイルス抗原の検出を確認。

◆ワーキングプランと成果報告（資料 1）

検討事項：多くのアジア地域では診断用抗体の作成に必要な試薬・器具等は高価であり入手にも時間がかかる。コールドチェーンが未整備であり高温に安定な診断システムが望まれる。未調査地区があり野外診断ではできるだけ抗原性変異をカバーできる診断抗体の作成が望まれる。技術伝達をできるだけ容易にできる抗体産生手技が望まれる。以上の課題点を考慮して、タンパクよりも精製と産生が容易で高温での保存性に課題の少ないプラスミドを免疫源にした診断用抗原作成法（プラスミド免疫法）による免疫誘導法と得られたプラスミドで発現されたタンパクに特異的な抗体を用いた dRIT 法について技術共有を行った。

帰国後：野外検体を利用した検出系の確立と検証を行う。

NIHE（平成 22 年（2010）8 月 22 日-9 月 11 日）：狂犬病の抗体検出系に使用する抗原の調整にウイルスを使用しないで安全（非感染性）かつ安定して産生するために組み換え技術によるタンパク発現系を構築することにした。ベトナムでの流行株を使用した組み換え体作成はゲノム遺伝子の国外持ち出し帰規制が強いため実験株（CVS-II 株）を利用してタンパク発現系の確立を行った。

◆ワーキングプランと成果報告（資料 2）

検討事項：発現系の確立を野外の流行株で

行うことが希望である。帰国後、野外株で系を確立する必要がある。安定したタンパク発現が可能となれば ELISA の開発とさらには流行株に特異性の高い診断用抗体の作出が容易になることが期待される。

帰国後： 野外検体を利用した発現系と発現タンパクを利用した抗体検出系の確立を行う。

China CDC (平成 22 年 (2010) 12 月 5 日-19 日): 狂犬病の中和抗体検出法には RFFIT 法がよく知られているが、現在の所アジア諸国では欧米のように検査系の検証や標準化等について定期的に評価し合う仕組みはない。したがって、実験室間での誤差を特定することが困難である。また、標準血清についても同様の課題がある。そこで今回、China CDC と NIID で行っている RFFIT 法の実験室間での比較検討と国際標準として用いている由来の異なる血清について評価を行った。

◆ワーキングプランと成果報告 (資料 3)

検討事項：

NIID の RFFIT 法

○カウント誤差の要因

1. 陽性細胞の見分けに若干の慣れが必要で、グリーン蛍光があっても必ずしもウイルス抗原特異的なものではなく、ゴミも時として非常に近い色を発することがある。今回初めて Yu さんが判定した際に、Yu さんのカウントが若干多めであったウエルがあり、上記のことがカウントの差の要因の一つと考える。
2. 1 ウエル当たり、200 倍で 10 視野

を観察すると、全面積に対し約 30%しかカバーしていない。そのため、陽性細胞の存在する位置と観察する視野の関係から、必ずしもすべての陽性細胞を反映した観察結果にならないことから、観察者あるいは微妙な観察位置の違いにより、カウントに差が出ることもある。

○利点：

1. 細胞を前日に調整し、mono-layer で感染に使用することで、細胞のコンディションを一定条件で行える。
2. 観察部位 (視野) をあらかじめ決めておくことで、観察者間でのカウント誤差を小さくできる。

○改善点：

1. 各ウエルについて、10 視野観察し、陽性視野数をカウントする必要があるため、観察時間が長くなる。
2. 観察領域として、全面積に対し約 30%しかカバーしないので、カウントの誤差が起こりうる。

China CDC の RFFIT 法

○感染率判定誤差の要因

1. 感染率が観察者の感覚で判定される。そのため観察者により感染率判定にばらつきがみられ、一定の判断を行うにはかなりの熟練度を要する。
2. 一定の感染率判定ができれば、観察者間の感染率判定誤差があったとしても、標準血清の IU/ml との比較を行うので、最終的な抗体価 (IU/ml) に大きな誤差を生じない。

3. 感染率判定の標準化として、倍率を x100, x200 等で観察し、視野内における全細胞数に対する感染細胞数を事前に確認をしておくことで、観察者間における感染率判定誤差を小さくできるのではないかと。

○利点：

1. ウェルを低倍率（40 倍）で観察することで、全体の感染状況を一瞬で把握できるので、観察時間が短い。
2. 細胞の播き込みが中和を行う当日なので、実際の中和試験を 2 日で完了できる。

○改善点：

1. 感染率の判定は、感覚的なものなので観察者によりブレがある。
2. 判定基準が表現しにくいいため、一定の基準を把握するまでに熟練を要する

その他：NIID の標準血清の値と WHO, China の値に差がありそうである。今後、OIE の標準血清も考慮し NIID の標準血清の値を再検討する必要がある。

帰国後：NIID 使用の標準および検体血清を中国の標準および検体血清と並列して手技及び成績の検証を行う。

(2) 新しい診断方法の開発に関する研究

マウス感染モデルのマイクロアレイによる解析：狂犬病の特徴である麻痺についてはその発症機序が十分に明らかとなっていない。

狂犬病で見られる麻痺症状を特定できれば臨床診断における鑑別に有益となる。そこで、狂犬病ウイルスに感染して下肢に麻痺を示したマウスの脳と脊髄における遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。

狂犬病ウイルス CVS-11 株を 6 週齢、雌、C57BL/6J マウスの大腿三頭筋に接種して下腿麻痺が見られる 7 日後の脳と脊髄について検索を行った（資料 4-1）。興味深いことに、ウイルス接種後に有意に発現が変動していた遺伝子を調べたところ、「脳のみ」および「脳と脊髄共通」で変動していた遺伝子の多くは発現上昇していたが、「脊髄のみ」で有意に変動していた遺伝子の多くは発現が低下していた（資料 4-2）。脊髄で発現が減少した遺伝子を検索したところ神経病的疾患・GABA 関連遺伝子・イオンチャネル関連遺伝子が特定されたことからこれら神経疾患関連遺伝子の発現変動は麻痺症状と関連性があるのではないかと考えられた（資料 4-3）。現在、個々の遺伝子について感染した宿主で見られる麻痺との関連性及び因果関係について解析を進めている。

D. 考察

ラボラトリーネットワークの確立と強化を推進するために、RITM、NIHE、China CDC の担当者と実技を交えた議論と研修を行う事により、共同研究の推進と連携強化に必要な研究成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について明確にすることができた。また、新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行い、感染マウスの脊髄で特異的に遺伝子の発現低下を示す遺伝子群（神経疾患関連遺伝、GABA 関連遺伝

子、イオンチャネル関連遺伝子) を見いだすことができた。今後、構築されたラボラトリーネットワークを活用して実験室内で得られた知見を自然感染事例に応用、若しくは検証していきたい。

E. 結論

本研究は CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワークを構築してその連携を強化することが目的である。

ラボラトリーネットワークの委託連携機関であるフィリピンの熱帯医学研究所 (RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (NIHE)、中国の疾病制御センター (China CDC) に韓国衛生研究所/疾病センター (NIH/KCDC) を加えてネットワークの拡大強化が可能になり、共同研究の推進による連携強化を図るため、前年度までに確立した成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について国立感染症研究所 (NIID) において実技を交えた議論と研修を行なうことができた。

新しいコンセプトの診断・治療法を開発する目的で、マウス感染モデルを利用した狂犬病の麻痺症状についてマイクロアレイによる解析マーカー遺伝子の検索を行い、感染マウスの脊髄で特異的に遺伝子の発現低下を示す遺伝子群 (神経疾患関連遺伝、GABA 関連遺伝子、イオンチャネル関連遺伝子) を見いだした。

本研究により狂犬病ネットワークの基盤が構築できてきたが、連携機関を統合したネットワークの構築までには至っていない。現在、ネットワーク化および連携強化を進めるためにゲノム情報の共有化とともに、アジア関係諸国で標準化がなされていない中和抗体測定法について標準血清の検証と

力価測定法の共有等を NIID、RITM、NIHE、China CDC、NIH/KCDC 間で行うことについて提案・検討を進めている

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kojima D., Park C.-H., Tsujikawa S., Kohara K., Hatai H., Oyamada T., Noguchi A., and Inoue S. (2010) Lesions of the Central Nervous System Induced by Intracerebral Inoculation of BALB/c Mice with Rabies Virus (CVS-11). *J. Vet. Med. Sci.* 72: 1011-1016.
- (2) Bazartseren B., Inoue S., Tuya N., Dulam P., Batchuluun D., Sugiura N., Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Kotaki A., and Yamada A. (2010) Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005-2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 358-363.

2 口頭発表

- (1) Sato G., Inoue S., Yamada A., Ito F.-H., Silva M. L. -C. -R, Itou T., Sakai T. The rabies viral RNA genomes selectively shifted in quasispecies population after serial passages of street virus in mouse. 44th joint working conferece on viral diseases.

US-Japan Cooperative Medical Science Program. 28-30 June, 2010. Sapporo, Japan.

- (2) 杉浦尚子、宇田晶彦、小嶋大亮、野口章、奥谷晶子、加来義浩、朴天鎬、山田章雄、井上智。狂犬病ウイルス (CVS-11) の末梢感染により麻痺症状を示した C57BL/6J マウスの中枢神経組織における宿主遺伝子のマイクロアレイ解析。第 150 回日本獣医学会学術集会、2010、9 月、帯広畜産大学、北海道
- (3) 小嶋大亮、朴天鎬、石田誠、小原慶子、井上謙一、畑井仁、小山田敏文、野口章、井上智。Macaque 属サル脳の脳に関する病理学的研究。第 150 回日本獣医学会学術集会、2010、9 月、帯広畜産大学、北海道

(4) 佐藤豪、井上智、Ito Fumio、Silva Maria、伊藤琢也、酒井健夫、山田章雄。マウスを用いた継代で見られたブラジル狂犬病ウイルスゲノムの選択。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、11 月、徳島県郷土文化会館、徳島県

(5) 杉浦尚子、宇田晶彦、小嶋大亮、野口章、奥谷晶子、加来義浩、朴天鎬、山田章雄、井上智。狂犬病ウイルス (CVS-11 株) を末梢感染させた C57BL/6J マウスの脳脊髄における免疫関連遺伝子のマイクロアレイ解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、11 月、徳島県郷土文化会館、徳島県

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

資料 1

ワーキングプラン

Introduction

A series of the experiments are designed to grasp:

- # how to conduct DRIT method
- # how to generate materials to be used for DRIT.

Specifically, during your stay, you will learn:

- # how to generate hyperimmune antisera by DNA immunization (April 19th to 23rd)
- # how to generate detecting IgG for DRIT from antisera, and the detailed procedures of DRIT (April 26th to 28th)

The schedule of the first half (April 19th to 23rd)

First, you will learn basic operation related to generating hyperimmune antisera by DNA immunization. And, by the end of your stay, you will be able to obtain all the plasmid DNA to be used for DNA immunization at your lab in Philippine.

- 1) Training of the preparation of plasmid DNA preparation (using small-scale culture)
 - # preparation of LB plate for E.coli culture
 - # transformation of E.coli with plasmid DNA (RV-N)
 - # small-scale culture of E.coli
 - # extraction of plasmid DNA from E.coli
 - # measuring the concentration of plasmid DNA
 - # making glycerol stock of E.coli for long-span storage
 - # confirming the insert of plasmid DNA by digesting with restriction enzyme
- 2) Training how to use the equipment for DNA immunization ("Shimajet")
- 3) Preparation of large amount of plasmid DNA (to be used for DNA immunization in Philippine)
 - # large scale culture of E.coli
 - # extraction of plasmid DNA from E.coli s
 - # measuring the concentration of plasmid DNA

DAY 1 REPORT OF ACTIVITIES

Laboratory: Department of Veterinary Science
National Institute of Infectious Disease

Reported by: DARIA L. MANALO

Date: April 19 2010

DAILY REPORT

I attended a lecture on the “National Institute of Infectious Disease (NIID) Program of Biosafety”, given by Dr. Sugiyama of the Division of Biosafety Control and Research of NIID. Included in the lecture are the following: Introduction of biosafety, history of laboratory acquired infection, principles and practices of biosafety. A manual and a certificate were given.

In the afternoon, Dr. Kaku gave a lecture on the “Generation of anti-RABV-N protein rabbit polyconal serum by DNA vaccination” and after, I did laboratory work together with Dr. Kaku.

Preparation of the media

A. Preparation Luria-Bertani (LB) agar plates

1. Weight 5 grams of LB broth (composed of sodium chloride 2: tryptone 2: yeast 1) and dissolve in 200 ml distilled water using magnetic mixer.
2. After mixing, 3 grams of agar was added in the mixture
3. Autoclave for 20 minutes with a temperature of 121 °C.
4. Allow to cool.
5. Ampicillin was added in the mixture with a concentration of 1:1000 (100ug/ml of Amp finally).
6. Using a pipette, aspirate 20 ml of the mixture and pour in plate
7. Allow to solidify.
8. Remove moisture by opening the plate and inverting the plate with agar
9. Store at 4 °C for further use (good for 2 weeks only)

B. Preparation of the LB broth

1. Dissolve 25g of LB in 950 ml distilled water using magnetic stirrer. After dissolving, fill up to 1000 ml. Transfer the mixture into two containers with 500 ml each.
2. Autoclave for 20 minutes with a temperature of 121 °C.
3. Allow to cool.
4. Keep in 4 °C until use (good for 2 weeks only).

C. Transformation

1. Mix 50 µl of E. coli (DH5α) competent strain with 1 µl of RABV-N plasmid (around 100ng/ul).

2. Place on ice for 20-30 minutes
3. Transfer immediately to 42 °C water bath for 1 minute
4. Return immediately to ice again for 5-10 minutes.
5. Add 250 µl of SOC medium
6. Incubate for 1 hour at 37 °C with slow mixing
7. Collect 50 µl and spread on the LB plate
8. Centrifuge for 5 minutes at 2000 rpm the remaining 250 µl mixture.
9. Aspirate around 200 µl from the supernatant without disturbing the pellet.
10. Mix the pellet with the remaining liquid with the pipetting in and out
11. Spread on the LB plate.
12. Incubate both LB plates at 37 °C overnight.
13. Check for growth

DAY 2 REPORT OF ACTIVITIES

Laboratory: Department of Veterinary Science
National Institute of Infectious Disease

Reported by: DARIA L. MANALO

Date: April 20 2010

DAILY REPORT

Continuation of the transformation procedure

I. Transformation

14. The plates were checked for growth
15. More colonies of E. coli were observed on the plate with 250 μ l than in 50 μ l

II. Demonstration of the use of "Shimajet"

Dr. Kaku demonstrated the use of the shimajet.

Protocol on how to use the Shimajet

1. Put the nozzle into the plunger of the shimajet by inserting the two parallel plastic into the rod inside. Make sure that the thread of the plastic is on the side of green arrow. Push downward the nozzle until it fits.
2. Turn the nozzle in the position where the pin is in between the plastic slot and in the pink arrow.
3. Turn the plunger counter clockwise to see the number below zero which is just a line with a green background. Then if already in that position, the pink line will appear on the top of the plunger.
4. Put in locked position.
5. Put a drop of antigen on the parafilm.
6. Aspirate the drop of antigen by turning counterclockwise the plunger until all is aspirated.
7. Remove the bubbles by turning clockwise or counterclockwise.
8. Put in the unlocked position.
9. Prepare the site of injection
 - a. Shave the area to be injected
 - b. Disinfect with alcohol
10. Press strongly the shimajet on the injection site (skin), then press the plunger.

III. Demonstration of the 96 cell culture plate with rabies virus on inverted FA

With the magnification of 200 μ magnification of one well of 96 cell culture plate, 10 fields are counted and determine if positive or negative. Two wells are comparable with 1 chamber slide. Inverted FA microscope is being used.

IV.

Extraction and Purification of Plasmid DNA

Preparation of cells

1. Add 15 μ l of Ampicillin (from 100mg/ml stock) to 15 ml of LB broth
2. Place 3 ml of the LB broth-antibiotic mixture in a tube.
3. Using a toothpick get one colony of transformed E. coli from the LB agar plate and inoculate into the 3 ml LB broth
4. Incubate the 4 culture tubes overnight at 37 °C with vigorous shaking.

DAY 3 REPORT OF ACTIVITIES

Laboratory: Department of Veterinary Science
National Institute of Infectious Disease

Reported by: DARIA L. MANALO

Date: April 21, 2010

DAILY REPORT

I.

Extraction and Purification of Plasmid DNA

Preparation of cells

5. Add 15 μ l of Ampicillin to 15 ml of LB broth (1:1000)
6. Place 3 ml of the LB broth-antibiotic mixture in a tube.
7. Using a toothpick get one colony of transformed E. coli from the LB agar plate and inoculate into the 3 ml LB broth
8. Incubate the 4 culture tubes overnight at 37 °C with vigorous shaking (April 20 2010).

II. DNA Purification system using Wizard^R Plus SV Miniprep

A. Production of cleared lysate

1. Transfer 1.5 ml from the culture tubes to centrifuge tubes. Centrifuge for 5 minutes at 15,000 x g.
2. Decant supernate then blot excess in absorbent paper. Centrifuge for short time to totally remove the supernate. Decant by aspirating remaining supernate with a pipettor.
3. Add 250 μ l cell suspension solution. Thoroughly resuspend the pellet by pipetting in and out, until all the pellets are resuspended.
4. Add 250 μ l cell lysis solution, invert 6 times to mix.
5. Add 10 μ l of alkaline protease solution, pipette in and out for 10 time until mix. (to inactivate other proteins). Incubate for 5 minutes at room temperature.
6. Add 350 μ l neutralization solution. Invert 10 times to mix, completely. Centrifuge at room temperature for 10 minutes, 15,000 x g.

B. Binding of plasmid DNA

7. Get the supernatant by pipetting out without disturbing the pellet
8. Insert spin column into the collection tube
9. Transfer the supernatant to spin column. Centrifuge 1 minute, 15,000x g, at room temperature. Discard the flowthrough.

C. Washing

10. Add 750 μ l wash solution, centrifuge 1 minute, 15,000 x g, room temperature. Discard flowthrough
11. Add 250 μ l wash solution. Centrifuge 2 minutes, 15,000 x g, room temperature (to make it dry). Make it as dry as possible. If not yet dry, centrifuge again. Discard flowthrough.
cf. At this stage, all the wash solution has gone down. Don't make them dried up completely by centrifugating or leaving far longer.

D. Elution

12. Get new sterile 1.5 microtube. Transfer the spin column to the new 1.5 sterile tube.
13. Add 100 μ l of nuclease-free water to spin column. Centrifuge 1 minute, 15,000 x g, room temperature.
14. Discard spin column.

E. Protein concentration

15. Check protein content by spectrophotometer

Tube 1 – 163.7 ng/uL
260/280 ratio = 1.90

Tube 2 - 146.6 ng/uL
260/280 ratio = 1.87

Tube 3 - 151.5 ng/uL
260/280 ratio = 1.88

Tube 4 - 175.2 ng/uL
260/280 ratio = 1.9

(260/280 ratio is a ratio of nucleic acids to proteins. Accepted ratio is above 1.75-1.8)

16. Store DNA at -20°C

F. Confirmation of the presence of RABV-N, using restriction enzyme digestion

1. Two restriction enzymes were already identified, xho1 and kpn1.
2. Each restriction enzyme has its own buffer
3. Based from the literature, the combination of these 2 enzymes needs. The buffer of these enzymes were selected according to the catalogue or manual of the company.

Required reagents and amount in the restriction enzyme digestion

Reagent	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
DNA (1µg)	6.1	6.8	6.6	5.7
10X buffer M	5.0	5.0	5.0	5.0
XhoI	0.5	0.5	0.5	0.5
KpnI	0.5	0.5	0.5	0.5
DW				
TOTAL (µl)	50.0	50.0	50.0	50.0

The concentration of the enzyme stocks was 15Unit/ul (Xho I) and 10Unit (KpnI). Then, 1 unit of restriction enzyme is expected to digest 1ug DNA in the reaction volume of 50ul, in 1hr, in 37 degree. However, we use 5-10 units for 1ug DNA to digest completely on an empirical basis.

Note: difficult to aspirate 0.5 µl, so make master mix of enzymes and buffer for 5 tubes

$$\begin{aligned}
 \text{xhoI } 0.5 \mu\text{l} \times 5 &= 2.5 \mu\text{l} \\
 \text{kpnI } 0.5 \mu\text{l} \times 5 &= 2.5 \mu\text{l} \\
 \text{10x buffer } 5 \times 5 &= 25 \mu\text{l} \\
 \text{TOTAL} & 30 \mu\text{l} \div 5 = 6 \mu\text{l each tube}
 \end{aligned}$$

Incubate for 1 hour at 37 °C.

G. Agarose gel preparation

Mix 1.5 g of agarose to 100ml TAE buffer. The final concentration was 1.5% at this time.

Prepare the gel mold and comb. Pour the liquefied agarose to the mold and wait to solidify. After solidification, add TAE buffer in order for the gel not to dry.

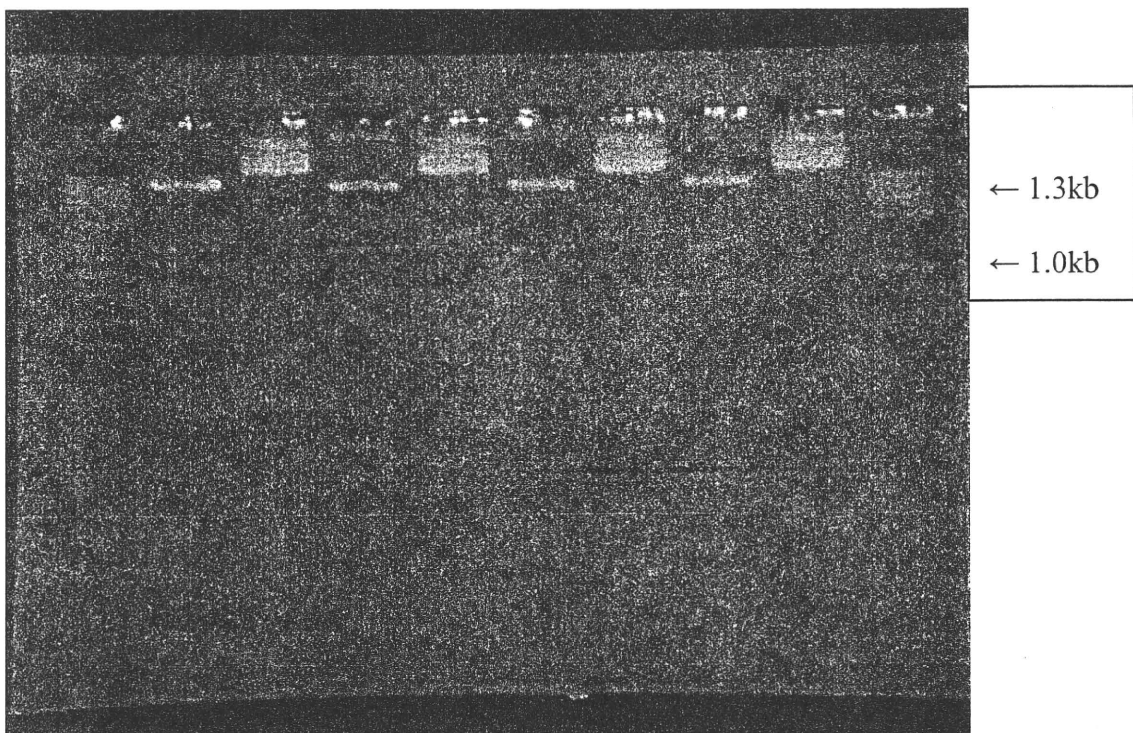
H. Electrophoresis

1. Place the gel into the electrophoresis apparatus.
2. 2 µl of loading buffer is mixed 10 µl of digested DNA sample with a concentration of 1:6. Mixed and load into the gel (10x Loading buffer, NIID make it 6X)
3. 1 µl of loading buffer and 5 µl of undigested DNA in parafilm. Mix and load in the gel.
4. Load on both ends 3 µl of ladder.
5. Run electrophoresis for 30 minutes.
6. Stain the gel with ethidium bromide for 10 minutes with slow shaking (belly dancing).
7. Wash the gel with tap water for 10 minutes with slow shaking.

8. View in UV illuminator.

Electrophoresis results of digested plasmid DNA using 2 restriction enzymes (xho1 and kpn1)

L 1D 1U 2D 2U 3D 3U 4D 4U L



L – ladder

1D – tube 1 digested

1U – tube 1 undigested

2D – tube 2 digested

2U – tube 2 undigested

3D – tube 3 digested

3U – tube 3 undigested

4D – tube 4 digested

4U – tube 4 undigested

Comments: In the sample lanes, upper bands are from digested linear plasmid (5.5kb), and lower bands are from the inserted RABV-N gene (1.35kb).

Preparation of Glycerol stocked transformed E. coli

Prepare 30% of glycerol in water. Filtered using syringe filter. Place equal volume of transformed E. coli and glycerol to have final concentration of 15% glycerol. Place in

-80 C. Aspirate 500 μ l of 30% glycerol and 500 μ l transformed E. coli into the single tube and mix by vortex, then store in - 80 C.

Large scale production of plasmid DNA.

Bacterial culture

1. Prepare 4 bottles of 100 ml of LB broth. Add 10 μ l of ampicillin to each 100 ml LB broth 1:10,000 concentration with 100 μ g/ml concentration (ampicillin stock solution - 100 mg/ml).
Comments: As added 100 μ l of the Amp stock (100mg/ml), the final concentration was 100 μ g/ml (1:1,000 dilution).
2. Check first the electrophoresis result if there is really RABV-N DNA.
3. Get 10 μ l of transformed E. coli from small scale production tube 4 and place in each 100 ml LB broth

DAY 4 REPORT OF ACTIVITIES

Laboratory: Department of Veterinary Science
National Institute of Infectious Disease

Reported by: DARIA L. MANALO

Date: April 22, 2010

DAILY REPORT

Large scale production of plasmid DNA

First batch

A. Bacterial culture and lysis

4. Prepare 4 bottles of 100 ml of LB broth. Add 10 μ l of ampicillin to each 100 ml LB broth 1:10,000 concentration with 100 μ g/ml concentration (ampicillin stock solution - 100 mg/ml).
Comments: As added 100ul of the Amp stock (100mg/ml), the final concentration was 100ug/ml (1:1,000 dilution).
5. Check first the electrophoresis result if there is really RABV-N DNA.
6. Get 10 μ l of transformed E. coli from small scale production tube 4 and place in each of 100 ml LB broth.
7. Incubate overnight at 37 °C with vigorous shaking (April 21, 2010)
8. Transfer 50 ml to each centrifuge tube (8 tubes). Centrifuge at 4 °C for 20 minutes, 6000 x g.
9. Decant supernate. Blot excess supernate with adhesive paper. If there are still supernate, centrifuge again just for seconds to remove completely the supernate. Aspirate the supernate using pipettor.
10. Resuspend the pellet with 10 ml buffer P1 by pipetting in and out or vortex. Make sure that it is completely resuspended.
11. Add 10 ml buffer P2 (lysis buffer). Mix by inverting more than 6 times. Incubate for 5 minutes at room temperature.
12. Add 10 ml buffer P3 (neutralizing buffer), mix by inverting 1 times.

B. Bacterial lysate clearing

13. Pour lysate into the barrel of the QIA filter cartridge. Incubate at room temperature for 10 minutes.
14. Meantime equilibrate QIAGEN tip 500 by 10 ml buffer QBT and allow the column to empty by gravity. Empty the capture tube.
15. After incubation, remove the cap of QIA filter Maxi cartridge and gently insert the plunger and filter cell lysate into previously equilibrated QIAGEN tip. Allow the cleared lysate to enter the resin by gravity flow. Empty the capture tube
16. Wash the QIAGEN tip with 30 ml buffer QC. First put 5ml to each tube to start washing and add the remaining 25 ml. Empty the capture tube and repeat washing.

17. Change the capture tube with sterile tube. Elute DNA by adding 15 ml of QF buffer.

C. Precipitate, wash and redissolved plasmid DNA

18. Precipitate DNA by adding 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature pure isopropanol to the eluted DNA and mix. Centrifuge at 15,000 x g for 30 mins to 1 hour at 4 °C.
19. Examine the DNA (white part). Carefully decant without disturbing the pellet (once decanted keep the tube upside down, do not invert the tube) and blot excess isopropanol.
20. Add carefully 5 ml 70% ethanol by not disturbing the pellet. Centrifuge (angular type) for 10 minutes at 4 °C with speed of 15,000 x g. Centrifuge again in less than a minute in swing type to let the pellet drop to the bottom.
21. Carefully aspirate the ethanol without disturbing the pellet with transfer pipette. If there is still ethanol, centrifuge again and aspirate with pipette carefully not to disturb the pellet. Repeat centrifugation if there is still ethanol. Make sure that completely no ethanol left. Turn the tube upside down and let it dry for 10-15 minutes.
22. If completely dry, redissolve the pellet in 200 µl suitable medium (distilled water). Completely dissolve the DNA by pipetting in and out. Check if DNA is already dissolved by aspirating all the content and no bubble is seen at the tip of the pipette tip. Pool all dissolved DNA in one tube.
23. Check for nucleic acid content.

Result:

Nucleic acid content = 2836.7 ng/ul
260/280 ratio = 1.88

Second batch of plasmid production

Bacterial cultures

1. Prepare 4 bottles of 100 ml of LB broth. Add 100 µl of ampicillin to each 100 ml LB broth 1:1,000 concentration with 100 µg/ml concentration (ampicillin stock solution - 100 mg/ml).
2. Get 20 µl of glycerol stocked transformed E. coli and inoculate into each of 100 ml LB broth.
3. Incubate overnight at 37 °C with vigorous shaking.

DAY 5 REPORT OF ACTIVITIES

Laboratory: Department of Veterinary Science
National Institute of Infectious Disease

Reported by: DARIA L. MANALO

Date: April 23, 2010

DAILY REPORT

Large scale production of plasmid DNA

Second batch of plasmid production

Bacterial cultures

4. Prepare 4 bottles of 100 ml of LB broth. Add 100 μ l of ampicillin to each 100 ml LB broth 1:1,000 concentration with 100 μ g/ml concentration (ampicillin stock solution - 100 mg/ml).
5. Get 20 μ l of glycerol stocked transformed E. coli and inoculate into each of 100 ml LB broth.
6. Incubate overnight at 37 °C with vigorous shaking. (April 22, 2010)

A. Bacterial pellet and lysis

24. Transfer 50 ml to each centrifuge tube (8 tubes). Centrifuge at 4 °C for 20 minutes, 6000 x g.
25. Decant supernate. Blot excess supernate with adhesive paper. If there are still supernate, centrifuge again just for seconds to remove completely the supernate. Aspirate the supernate using pipettor.
26. Resuspend the pellet with 5 ml buffer P1 by pipetting in and out or vortex. Make sure that it is completely resuspended.
27. Add 5 ml buffer P2 (lysis buffer). Mix by inverting 6 times. Incubate for 5 minutes at room temperature.
Comments: After re-suspension of the pellet with buffer P1 (5ml/tube), two tubes were mixed into one (finally 10ml). Then added 10ml of P2 and P3 in one tube
28. Add buffer P3 (neutralizing buffer), mix by inverting 10 times.

B. Bacterial lysate clearing

29. Pour lysate into the barrel of the QIA filter cartridge. Incubate at room temperature for 10 minutes.
30. Meantime equilibrate QIAGEN tip 500 by 10 ml buffer QBT and allow the column to empty by gravity. Empty the capture tube.
31. After incubation, remove the cap of QIA filter Maxi cartridge and gently insert the plunger and filter cell lysate into previously equilibrated QIAGEN tip. Allow the cleared lysate to enter the resin by gravity flow. Empty the capture tube