

魚病診断マニュアル

コイ春ウイルス血症（SVC）の診断

分離ウイルスをテンプレートとした RT-PCR 法による診断

（平成 20 年 8 月 改訂版）

独立行政法人 水産総合研究センター

養殖研究所 魚病診断・研修センター

1. 診断にあたっての注意

- ・ 生のウイルス培養液を材料とするので、核酸抽出試薬と混合するまでは、無菌室内で作業を行う。
- ・ 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペットを換える。
- ・ エチジウムブロミドは強力な発ガン物質なので、取り扱い時には必ず手袋を着用する。粉末と溶液が市販されているが、吸引などの危険性から溶液を購入するのがよい。また、廃液は活性炭で吸着後焼却処分をする。

2. 必要な実験装置と試薬類

1) 試薬・実験器具



<核酸抽出用試薬>

- ・ TRIzol[®] LS Reagent (インビトロジエン)
- ・ クロロホルム (特級)
- ・ 2-プロパノール (特級)
- ・ dDW (DNase・RNase free) (インビトロジエン)
- ・ 75%エタノール (特級を dDW で希釈)

<PCR 用試薬>

- ・ SuperScript[™] III One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq (インビトロジエン, Cat.No. 12574-026)
- ・ Takara EX Taq HS (タカラ)

<電気泳動用試薬>

- ・ 電気泳動用アガロース HS (ニッポンジーン)
- ・ 電気泳動用バッファー (TBE, Takara) : 粉末を DW に溶解し使用する。
- ・ 臭化エチジウム溶液 (10mg/mL, ニッポンジーン) : 本液の 20 倍希釈液をアガロース 100mL に対し 20 μ L 添加する (最終濃度 0.1 μ g/mL)。臭化エチジウムは発ガン物質であるため、取り扱い時には手袋を着用する。
- ・ マイクロチューブ (0.5 mL, 1.5 mL 用 高圧滅菌済みのもの)
- ・ PCR 用マイクロチューブ (PCR 用 0.2 mL 等, 高圧滅菌済みのもの)
- ・ DNA 分子量マーカー (フナコシなど)

<核酸抽出用器具>

- ・ ディスポーザブルピペット (5mL, 1mL)
- ・ フィルター付きチップ (1,000 μ L, 200 μ L など)
- ・ オートピペッター (1,000 μ L, 200 μ L)
- ・ チューブ立て
- ・ パウダーフリー・ディスポーザブル手袋

<RT-PCR 用器具>

- ・ フィルター付きチップ (1,000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L など)
- ・ オートピペッター (1,000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L)
- ・ チューブ立て

RT-PCR プライマー・反応液

- ・ RT-PCR プライマー：下表の配列のものをメーカーに合成依頼する。通常合成されたプライマーは、乾燥状態で納品されるので dDW 等で溶解し使用する（ストック液は 10pmol/ μ L に調製し小分けして冷凍保存する）。

診断用プライマーの配列

プライマー名	配列
SVCV F1	5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3'
SVCV R2	5'-AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH* ACN* CAY*-3'

ストック液は 10pmol/ μ L に調製

*R:A又はG H:A又はC又はT N:A又はC又はG又はT Y:C又はT

- ・ RT-PCR反応液：SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum^R Taq を用いて、使用する直前に所定の濃度になるよう調製する。

RT-PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
2×Reaction Mix (キット)	25 μ L
dDW (滅菌超純水)	8 μ L
SVCV F1 primer(10pmol/ μ L)	5 μ L
SVCV R2 primer(10pmol/ μ L)	5 μ L
RT Platinum ^R Taq Mix (キット)	2 μ L
合計	45 μ L

2) 実験装置

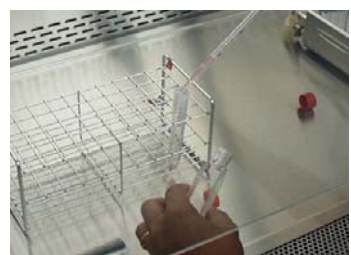
- ・ 冷却微量高速遠心機
- ・ オートクレーブ
- ・ PCR サーマルサイクラー
- ・ ミニゲル電気泳動装置
- ・ トランスイルミネーター
- ・ 写真撮影装置あるいは CCD カメラ撮影装置
- ・ 攪拌機

3. 手技

1) 核酸の抽出



- ① 倒立顕微鏡により，培養細胞の細胞変性効果（CPE）が完全に出現し細胞がほとんど全て浮き上がっていること確認する。



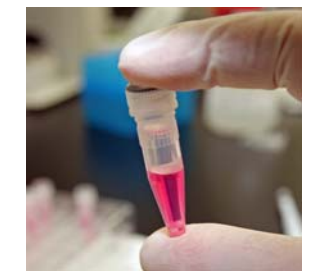
- ② ピペットを用いて，培養フラスコ内の組織培養液を遠沈管に移す。使用済み培養フラスコおよびピペットは滅菌缶に捨てる。



- ③ 遠沈管に回収した組織培養液を4℃で3,000 rpm・5分間，遠心分離する。



- ④ ピペットを用いて，遠心した上清250 μ Lを1.5 mL チューブに移す。使用済み遠沈管およびピペットは滅菌缶に捨てる。



- ⑤ 1,000 μ L オートピペッターを用いて, TRIzol LS 750 μ L をチューブに加える (TRIzol (LS) にはフェノールが含まれているので手袋を着用)。
- ⑥ 十分攪拌した後, 室温で5分間放置する。
- ⑦ クロロホルム 200 μ L を加え, 15秒間激しく攪拌し, その後, 室温で5分間放置する。
- ⑧ 4 $^{\circ}$ C で 12,000 $g \cdot 10$ 分間, 遠心分離する。
- ⑨ 透明上層 (水相), 白色中間層 (DNA 相), 赤色下層 (フェノール相) の3層に分離されていることを確認する。分離されていない場合は, 再度遠心分離する。
- ⑩ 白色中間層を吸わないように, 水相 (500–600 μ l) のみを別の 1.5mL チューブに移入する。全ての水層をとる必要はない。



⑪ 500 μ L の 2-プロパノール（原液）を入れ、軽く混合する。室温で 10 分間放置する。作業、⑩と⑪は逆でもよい。先に新しいチューブに 2-プロパノールを入れておき、それに⑨の水相を加える。



⑫ 4℃で 12,000 g ・10 分間、遠心沈澱する。ペレットは確認できないことが多い。

⑬ 上清をピペット等で吸い取り除去した後、75%エタノール 1,000 μ L を入れて、軽く攪拌機で混ぜる。

⑭ 4℃で 7,500 g ・5 分間、遠心する。

⑮ 上清をピペットで除去し、遠沈管を乾燥させる（過剰乾固を避けるため、吸引器は用いない）。

⑯ サンプルに dDW（DNase・RNase free）100 μ L を加える。

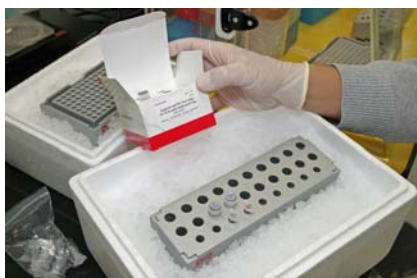
⑰ 1.5mL チューブを指で弾いて、よく溶かす。RNA は分解されやすいので、溶解後は速やかに氷冷する。保存する場合は、-80℃で行う。



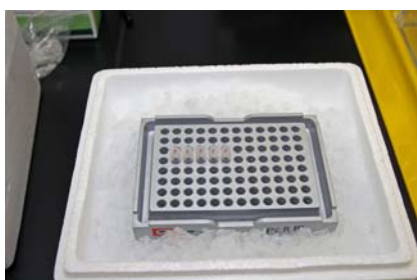
⑱ ウイルスに汚染した器具等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。



2) RT-PCR 反応



- ① SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum^R Taq キット中のx2 Reaction Bufferと 10pmol/μLに調整したプライマーを解凍し、氷冷する。Taqは直接氷冷する。



- ② オートクレーブ処理した PCR チューブにサンプルの番号を記入し準備する。陽性・陰性対照用チューブ（計2本）も加えて準備する（ポジコンにバンドが出ない、あるいはネガコンにバンドが出たら、やり直し）。



- ③ 総サンプル分の RT-PCR 反応液を調製する。



- ④ PCR 反応液 45 μL を PCR チューブに分注する。



- ⑤ 抽出核酸サンプル液 5 μL を PCR チューブに入れた RT-PCR 反応液に移入する。



⑥ チューブのキャップをしっかりと閉める。



⑦ サーマルサイクラーのプログラムを開始し、50℃に達したところでポーズして止める。PCR チューブをセットし、蓋を閉め、再スタートさせる。

プログラム

50℃ 30分

94℃ 2分

94℃ 15秒

55℃ 30秒

68℃ 1分

68℃ 7分, 4℃保冷

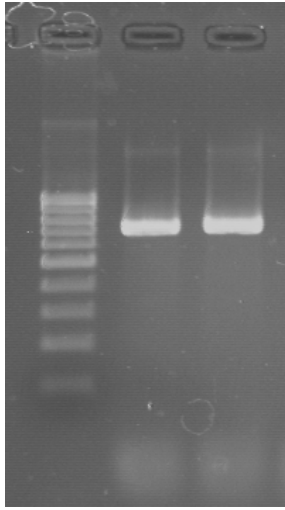
} 35 サイクル

3) RT-PCR 増幅産物の電気泳動と判定

電気泳動による RT-PCR 増幅産物の確認と判定は、「魚類組織をテンプレートとした RT-PCR 法による診断」に準ずる。



・ 2nd PCR を予定している場合には、反応が終わった PCR チューブには直接電気泳動用ローディングバッファーを入れず、パラフィルム上で、増幅産物 9 μL と電気泳動用ローディングバッファー 1 μL をピペッティングにより混合する。これを電気泳動用試料とする。



- ・判定：714bp の増幅産物を確認し、陽性と判定する。

4. 付録—2nd PCR (nested-PCR)

最初の RT-PCR では SVCV の他に近縁種の PFRV (Pike Fry Rhabdovirus) の遺伝子も増幅する可能性がある。SVCV と PFRV の宿主は共通することがある。OIE では、シーケンスすることを勧めているが、ここでは、nested-PCR で SVCV と PFRV に分ける。nested-PCR は感度が高いため、テンプレートのコンタミに注意する。

1) 必要な試薬類

- ・ テンプレートの準備 (RT-PCR 1/50) : RT-PCR 反応液 1.0 μ L に dDW を 49 μ L 加えて混ぜる。コンタミしないように注意する。もし、RT-PCR でバンドが認められなくても同様な処理でテンプレートとして用いてよい。
- ・ 2nd (nested)-PCR プライマー (SVCV 用) : 下表の配列のものをメーカーに合成依頼する。通常合成されたプライマーは、乾燥状態で納品されるので dDW 等で溶解し使用する (ストック液は 10pmol/ μ L に調製し小分けし冷凍保存する)。

SVCV Nested-PCR プライマーの配列

プライマー名	配列
SVCV nest F	5'-TGA AGA Y*TG TGT CAA TCA AGT C-3'
SVCV nest R	5'-GCG AR*T GCA GAG AAA AAG TG-3'

ストック液は 10pmol/ μ L に調製

*Y:C又はT R:A又はG

- ・ 2nd(nested)-PCR プライマー (PFRV 用) :

PFRV Nested-PCR プライマーの配列

プライマー名	配列
PFRV nest F	5'-GTG CY*C TCA CAC AS*C GTA AA-3'
PFRV nest R	5'-GGA GGA GAG TGT AAT GCT CC-3'

ストック液は 10pmol/ μ L に調製

*Y:C又はT S:C又はG

- ・ Nested-PCR 反応液 : Takara EX *Taq* HS を用いて、使用する直前に所定の濃度になるよう調製する。

2nd-PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
10x EX <i>Taq</i> buffer	5.0 μ L
2.5mM dNTP mixture	4.0 μ L
dDW (滅菌超純水)	34.75 μ L
nest F primer(10pmol/ μ L)	2.5 μ L
nest R primer(10pmol/ μ L)	2.5 μ L
Takara EX <i>Taq</i> HS	0.25 μ L
合計	49 μ L

2) 手技

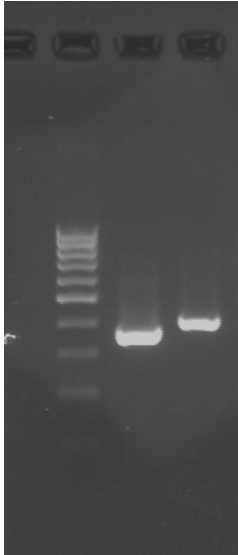
- ① オートクレーブ処理した PCR チューブにサンプルの番号を記入し、準備する。
- ② Takara Ex *Taq* Hot Start Version を使用し、総サンプル分の PCR 反応液を調整する。
- ③ PCR 反応液 49 μ L を PCR チューブに分注する。
- ④ 希釈した RT-PCR 反応液 (1/50) の 1 μ L を PCR チューブに加える。ポジコンとネガコンを必ず作る。ポジコンにバンドが出ない、あるいはネガコンにバンドが出たら、やり直し。
- ⑤ チューブのキャップをしっかりと閉める。
- ⑥ サーマルサイクラーのプログラムを開始し、94°Cに達したところでポーズして止める。PCR チューブをセットし、蓋を閉め、再スタートさせる。SVCV と PFRV は同じプログラムを使用する。

プログラム	
94°C	30 秒
94°C	30 秒
55°C	30 秒
72°C	30 秒
} 25 サイクル	
72°C	7 分, 4°C保冷

3) 2nd-PCR 増幅産物の電気泳動と判定

RT-PCR の方法に準ずる。目的増幅産物は SVCV で 369bp、PFRV で 410bp である。また、増幅産物と電気泳動ローディングバッファーを混合する際、ローディングバッファー6 μ Lを直接、反応終了後の PCR チューブに入れてもよい。

SVCV PVRV
(369bp) (410bp)



SVCV (左) 369bp および PFRV (右) 410bp の核酸の増幅バンド。

5. 付録—2nd-PCR (Semi-nested PCR)

この 2nd-PCR は RT-PCR で陽性バンドが得られなかった時にのみ実施する。

1) 必要な試薬類

- 2nd (Semi-nested)-PCR プライマー：下表の配列のものをメーカーに合成依頼する。通常合成されたプライマーは、乾燥状態で納品されるので dDW 等で溶解し使用する（ストック液は 10pmol/ μ L に調製し小分けし冷凍保存する）。

Nested-PCR プライマーの配列

プライマー名	配列
SVCV F1	5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3'
SVCV R4	5'-CTG GGG TTT CCN* CCT CAA AGY* TGY*-3'

ストック液は 10pmol/ μ L に調製

- Nested-PCR 反応液：Takara EX *Taq* HS を用いて、使用する直前に所定の濃度になるよう調製する。

2nd-PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
10x EX <i>Taq</i> buffer	5.0 μ L
2.5mM dNTP mixture	4.0 μ L
dDW (滅菌超純水)	28.25 μ L
SVCV F1 primer (10pmol/ μ L)	5.0 μ L
SVCV R4 primer (10pmol/ μ L)	5.0 μ L
Takara EX <i>Taq</i> HS	0.25 μ L
合計	47.5 μ L

2) 手技

- オートクレーブ処理した PCR チューブにサンプルの番号を記入し、準備する。
- Takara Ex *Taq* Hot Start Version を使用し、総サンプル分の PCR 反応液を調整する。
- PCR 反応液 47.5 μ L を PCR チューブに分注する。
- ここにサンプル (RT-PCR 反応液) 2.5 μ L を PCR チューブに加える。ポジコンとネガコンを必ず作る。ポジコンにバンドが出ない、あるいはネガコンにバンドが出たら、やり直し。

- ⑤ チューブのキャップをしっかりと閉める。
- ⑥ サーマルサイクラーのプログラムを開始し、94℃に達したところでポーズして止める。PCR チューブをセットし、蓋を閉め、再スタートさせる。

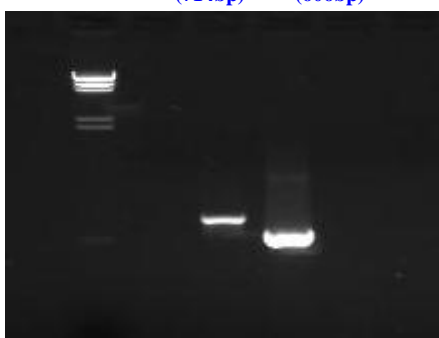
プログラム	
94℃	30 秒
94℃	30 秒
55℃	30 秒
72℃	1 分
72℃	7 分, 4℃保冷

} 35 サイクル

3) 2nd-PCR 増幅産物の電気泳動と判定

RT-PCR の方法に準ずる。目的増幅産物は 606bp である。また、増幅産物と電気泳動ローディングバッファーを混合する際、ローディングバッファー6 μ L を直接、反応終了後の PCR チューブに入れてもよい。

1st RT-PCR (714bp) 2nd PCR (606bp)



RT-PCR (左) および 2nd-PCR (右) による SVCV 核酸の増幅バンド。

判定：606bp の増幅産物を確認し、陽性と判定する。

6. 参考資料

- 1) バイオ実験イラストレイテッド③本当に増える PCR, 秀潤社
- 2) Molecular Cloning(third edition) ,CSHL PRESS
- 3) Protocol for the proposed new confirmatory test for spring viraemia of carp, OIE 2004 proposal
- 4) The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses, spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses (1996) Bjorklund H.V. et al. Virus Res., 42, 65-80.

- 5) Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp viruses and pike fry rhabdovirus isolates reveals four distinct piscine vesiculovirus genogroups (2002) Stone D.M. et al. *Dis. Aquat. Org.*, 53, 203-210.