

魚病診断マニュアル

コイ春ウイルス血症（SVC）の診断

魚類組織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

- ・ サンプルと採取方法は「ウイルス分離法による診断」で記述した魚類組織を使用する。
- ・ サンプルの採取後は多くの点で「分離ウイルスをテンプレートとした RT-PCR 法による診断」に従う。そのため、ここでは、共通する項目は略して、本診断方法にだけ使う材料と方法のみを記載する。

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 の代わりに TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Cat No. 15596-018) を使用する。

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
exSVCV F	5' - GGA TAA TAT CGG CTT GGA AAG C -3'
exSVCV R	5' - GCC TAA ATG TGT TGA TGG AAC G -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*(Invitrogen, Cat.No.12574-026) 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。テンプレート(抽出したRNA)を 5 μL 入れて、合計 50 μL で行う。

RT-PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
2×Reaction Mix (キット)	25 μL
dDW (滅菌超純水)	14 μL
exSVCV F primer (10pmol/μL)	2 μL
exSVCV R primer (10pmol/μL)	2 μL
RT Platinum ^R <i>Taq</i> Mix (キット)	2 μL
合計	45 μL

3. 手技

1) 核酸の抽出



- ① 魚類組織を 10-50mg チューブに入れる。検体数が多い場合は 5 尾ずつプールしてもよいが、その場合は、1 尾あたり約 10mg とする。組織をより破壊しやすくするため、チューブにジルコニアビーズをいれておいてもよい。



- ② 1,000 μ L オートピペッターを用いて、TRIzol 1000 μ L をチューブに加える (TRIzol にはフェノールが含まれているので手袋を着用)。検体数が予めわかっているなら、作業①と②は逆の方でもよい。すなわち、予めトリゾールを入れたチューブに組織を入れる。



- ③ 組織が分解するまで vortex した後、室温で5分間放置する。ペッセルを使用してもよい。

- ④ その後は「分離ウイルスをテンプレートとした RT-PCR 法による診断」に従い、RNA を抽出し、最後にサンプルに dDW (DNase・RNase free) 60 μ L を加える。

- ⑤ その内 5 μ L を RT-PCR 反応液に供試する。

2) RT-PCR 反応

プログラム

50°C 30 分

94°C 2 分

94°C 15 秒

50°C 30 秒

68°C 1 分

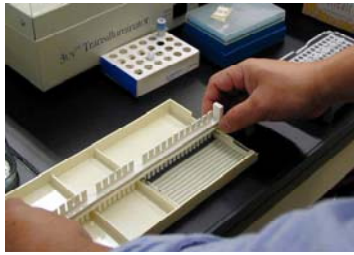
68°C 7 分, 4°C 保冷

} 34 サイクル

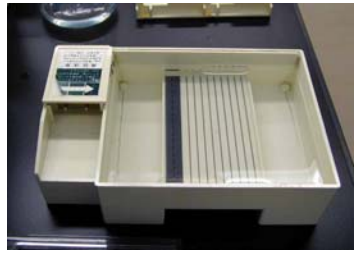
3) RT-PCR 増幅産物の電気泳動と判定



- ① TBE 緩衝液に終濃度 2%になるようアガロース HS (日本ジーン) を入れ, 電子レンジで完全に溶解させる。溶解中は突沸に注意する。
- ② アガロース溶液が 60°C程度になるまで放置し冷却する。冷却後, 20 倍希釈臭化エチジウム溶液をアガロース 100mL に対し 20 μ L 加え混合する。
- ③ 上記のアガロースをゲルメーカーに流し込む。その際に, 気泡がコーム周辺に残らないように注意する。



- ④ 放置し十分に冷却させた後、ゲルメーカーのコームを抜く。



- ⑤ 電気泳動槽に TBE 緩衝液を入れ、作製したアガロースゲルをセットする。エチジウムブロマイドには発ガン性があるので作業中は手袋を着用する。



- ⑥ PCR 反応が終了し保冷プログラムに入ったチューブを取り出し、各チューブに電気泳動用ローディングバッファー $5\mu\text{L}$ を入れ混合する。



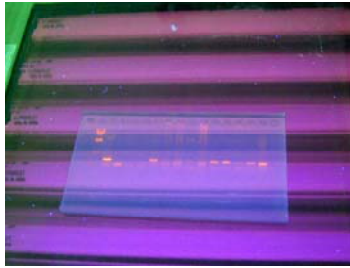
- ⑦ 上記の混液 $7\mu\text{L}$ を泳動槽にセットしたアガロースゲルのウエルに入れる。この際、分子量マーカーも同時に泳動する。



- ⑧ 蓋を閉じ、スイッチを負電荷の核酸が泳動されるようサンプル側の電極をマイナス（反対側がプラス）にセットし、 100V （定電圧）で泳動を開始する。



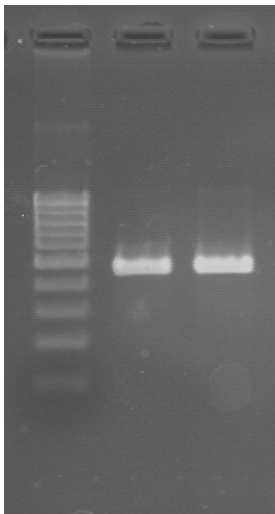
- ⑨ 先行の色素マーカーがゲルの半ばに来るまで（20分程度）泳動したところで、電源を切りゲルを取り出す。



⑩ 泳動槽からゲルを取り出し、トランスイルミネーター上へのせ、UVが裸眼に触れないよう注意し、トランスイルミネーターの電源を入れる（紫外線波長は 300nm 付近がよい）。



⑪ 泳動像をポラロイドカメラ等で記録する。ウイルス遺伝子由来 470bp の増幅産物の有無を観察する。



⑫ 判定： 470bp の増幅産物を確認し、陽性と判定する。

4. 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) Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR (2003) Koutná M et al. Dis. Aquat. Org., 55, 229-235.