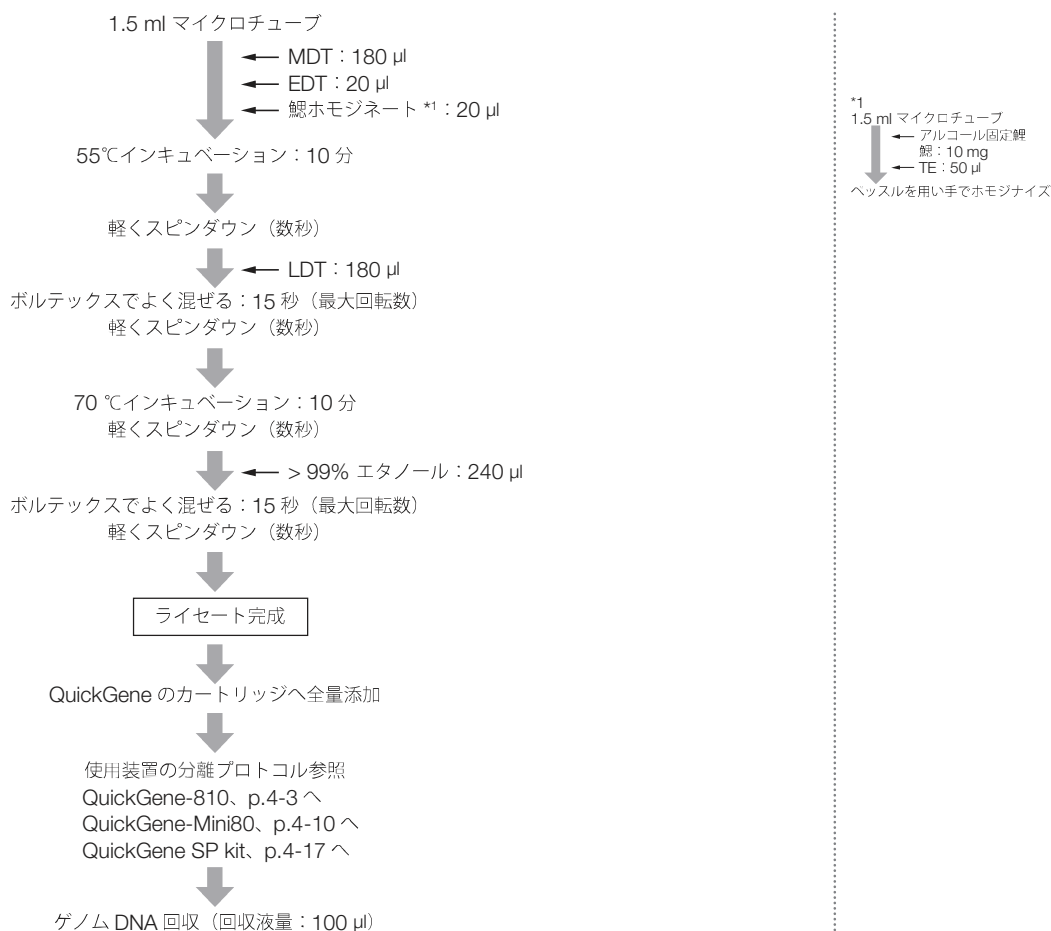


3-IX 章

ウイルスからのゲノム DNA分離

コイヘルペスウイルス (KHV) 感染魚の鰓 (エラ) からのゲノムDNA分離

プロトコル



結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

	No.	収量 (μ g)
健康魚	1	4.24
	2	4.07
感染魚	1	0.67
	2	1.28
	3	2.41
	4	2.35

■ タンパク質の混入：A260/280

	No.	A/260/280
健康魚	1	2.19
	2	2.27
感染魚	1	2.04
	2	2.39
	3	2.10
	4	1.99

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

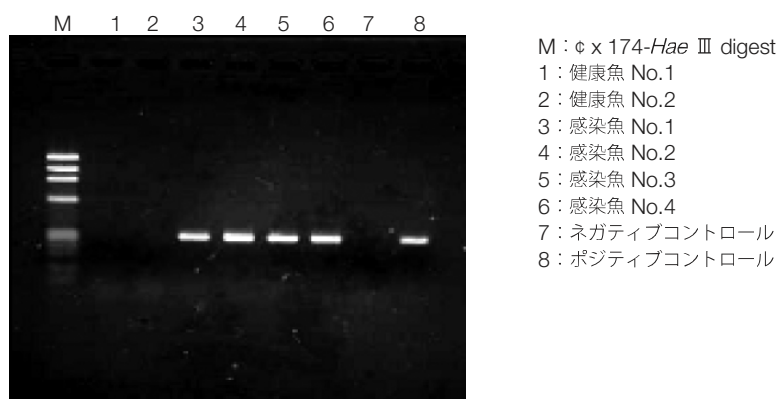
■ その他

● PCR

QuickGene-810 システムを用いて分離した DNA をテンプレートとして PCR を行った。

PCR の 方 法 は、Yuasa et al, Improvement of a PCR method with the Sph 1-5 primer set for the detection of Koi herpesvirus (KHV), Fish Pathology, 40, 37-39 (2005) に従って行った。

プライマー：Sph I -5F, Sph I -5R



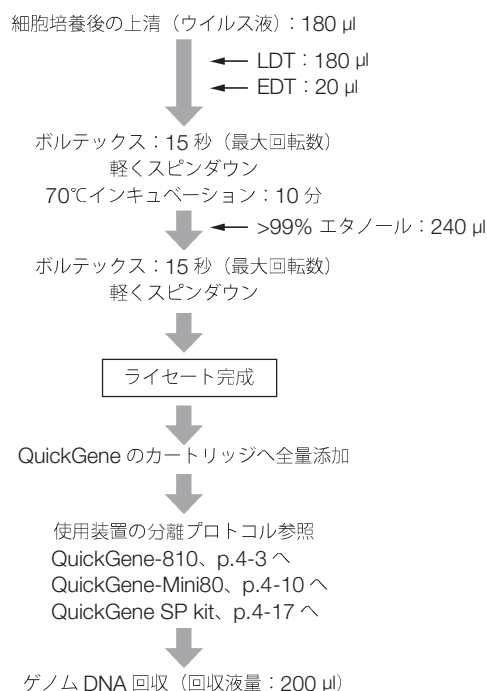
この PCR の結果、感染魚 No.1-4 でポジティブコントロールと同様の増幅産物が確認された。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

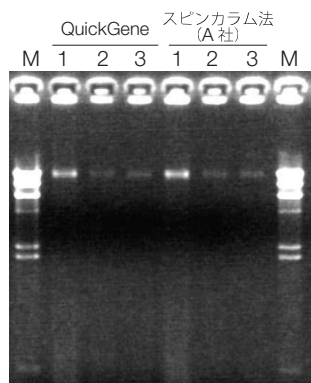
ヒト単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）ウイルス液からのゲノムDNA分離

プロトコル



結果

電気泳動図



電気泳動条件：1.5% アガロース / 1 × TAE

M： λ -Hind III
1：No.1 VR3（野生株）
2：No.2 d41（UL41 欠損変異株）
3：No.3 d13（UL13 欠損変異株）

分離したゲノム DNA に分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3
QuickGene	324 ng	32 ng	51 ng
スピнкаラム法（A 社）	351 ng	36 ng	40 ng

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3
QuickGene	2.23	2.01	2.14
スピнкаラム法（A 社）	1.98	2.41	1.92

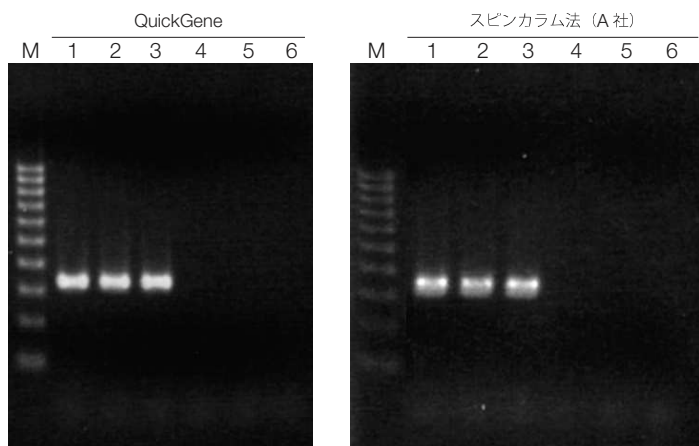
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法（A 社）を用いて HSV-1 遺伝子から分離したゲノム DNA で、HSV-1 遺伝子の検出を、HSV-1 に特異的なプライマーおよび HSV-2 に特異的なプライマーを使用した PCR により行った。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder

1：No.1 VR3/HSV-1 プライマー

2：No.2 d41/HSV-1 プライマー

3：No.3 d13/HSV-1 プライマー

4：No.1 VR3/HSV-2 プライマー

5：No.2 d41/HSV-2 プライマー

6：No.3 d13/HSV-2 プライマー

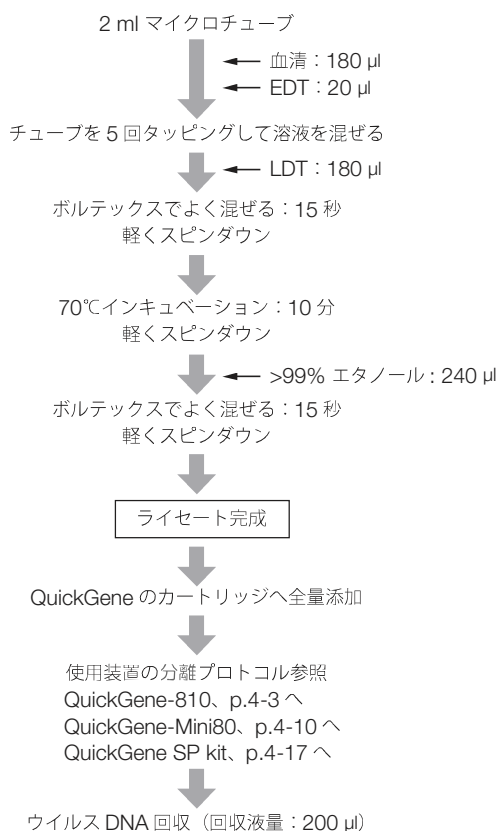
いずれのゲノム DNA からでも PCR 産物を検出できた。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

血清からの HBV DNA分離

プロトコル



結果

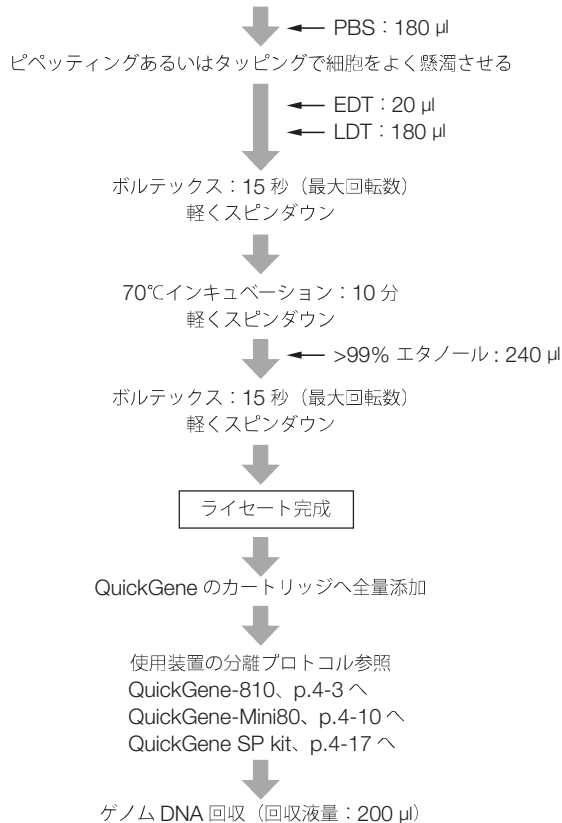
- 電気泳動図
データなし
- ウイルス DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230
データなし
- その他
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

ヒト子宮頸癌細胞株からのヒトパピローマウイルス (HPV) DNA分離

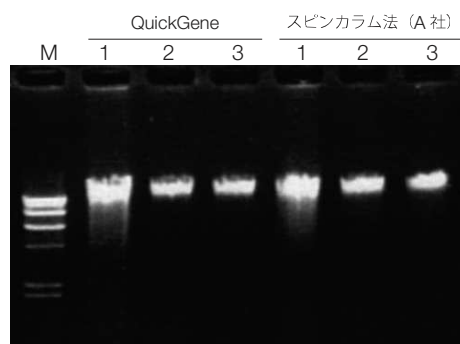
■ プロトコル

1.5 ml マイクロチューブに回収した細胞ペレット (上限 1×10^6 個の細胞)

■ 結果

細胞株 : HeLa (HPV18 10 ~ 50 コピー)
: SiHa (HPV16 1 ~ 2 コピー)
: CasKi (HPV16 400 ~ 600 コピー)

■ 電気泳動図

電気泳動条件 : 1.5% アガロース / $1 \times$ TAEM : λ -Hind III

1 : HeLa

2 : SiHa

3 : CasKi

分離したゲノム DNA に分解は認められなかった。

■ ゲノム DNA の収量

サンプル	HeLa	SiHa	CasKi
QuickGene	23.5 µg	11.6 µg	13.5 µg
スピンカラム法 (A 社)	26.2 µg	10.5 µg	7.3 µg

■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	HeLa	SiHa	CasKi
QuickGene	2.00	1.94	1.93
スピンカラム法 (A 社)	1.81	1.94	2.15

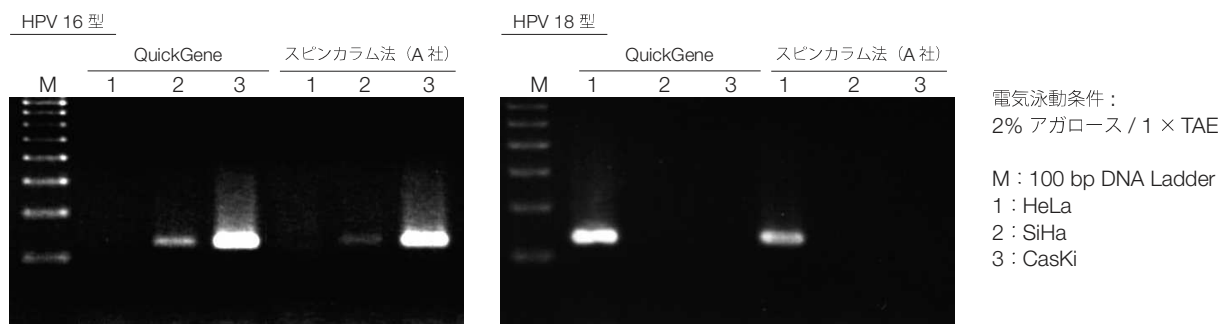
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A 社) を用いて分離したゲノム DNA で、HPV の 16 型と 18 型のウイルスゲノム DNA の検出を、PCR 法により行った。



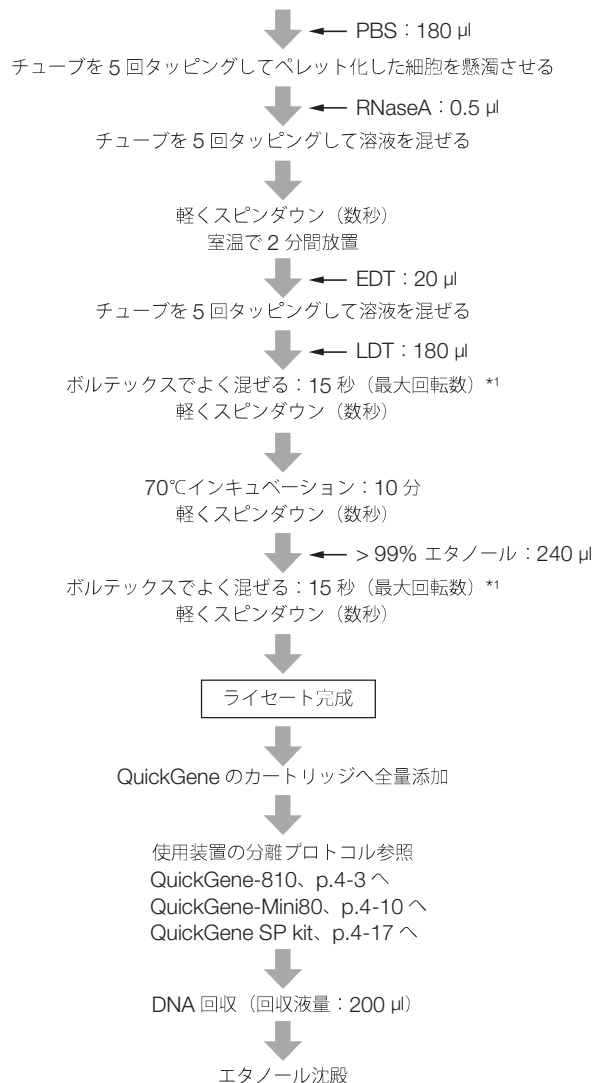
QuickGene システムを用いて分離した HPV 感染細胞 DNA から、感染細胞中 1 から 2 コピーの HPV ゲノム DNA を PCR により検出することができた。

共通プロトコルサンプル

データなし

サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染細胞からのウイルスDNA分離

プロトコル

細胞を 1.5 ml マイクロチューブに回収し、ペレット化する (1.5 ml マイクロチューブ中に $\sim 1 \times 10^6$ 個の細胞)

*1 ボルテックスで完全に混ぜる
(最大回転数)
ボルテックスで不十分ならばタッ
ピング、ビヘディングあるいは
転倒混和で混合

結果

電気泳動図

データなし

ウイルス DNA の収量 (μ g)

感染後時間 (h)	1.5		3		6		24	
ウイルス	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV
細胞数	1×10^6	1×10^6	1×10^6	8×10^5	1×10^6	9.2×10^5	1×10^6	1×10^6
QuickGene-810	7.6	7.9	3.0	8.0	4.5	8.0	8.2	7.4
Spin column	3.8	4.3	3.0	2.5	5.4	5.5	4.7	3.4

タンパク質の混入：A260/280

感染後時間 (h)	1.5		3		6		24	
ウイルス	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV
QuickGene-810	1.81	1.80	1.79	1.75	1.80	1.80	1.80	1.82
スピンカラム (A社)	1.85	1.85	1.80	1.81	1.79	1.77	1.81	1.82

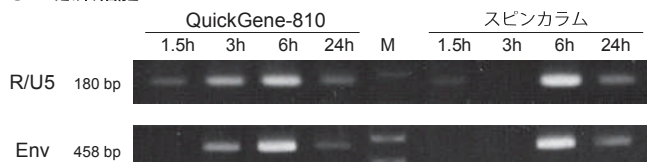
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

PCR の AGE・DNA の断片

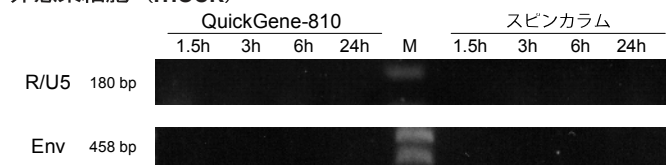
SIV 感染細胞



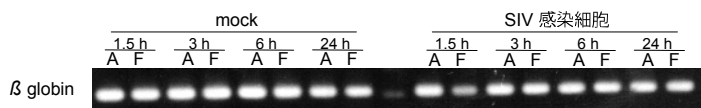
QuickGene システムおよびスピンカラムを用いて、SIV 感染細胞から分離した DNA 1 µg で PCR を行った。

この PCR の結果、QuickGene-810 システムでは、感染 1.5 および 3 時間後に分離した DNA の増幅産物の電気泳動バンドも検出できた。

非感染細胞 (mock)



M：マーカー (ladder)



F：QuickGene-810
A：スピンカラム

共通プロトコルサンプル

データなし