

## 3-XVIII 章

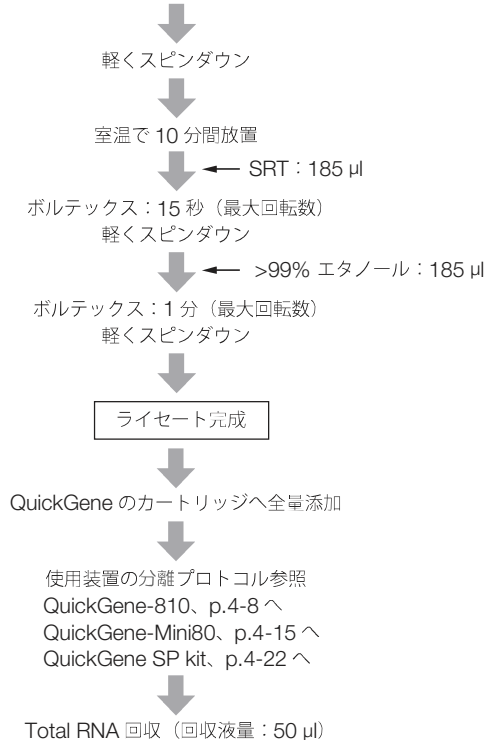
ウイルスからの total RNA分離

---

## 血清からのC型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus (HCV)) RNA分離

### プロトコル

200  $\mu$ l の LRT (2-ME 添加済み) \*2 に、10  $\mu$ l の 10 mg/ml キャリア RNA\*1 溶液と  
150  $\mu$ l の被験血清を添加してボルテックス：30 秒 (最大回転数)



\*1 キャリア RNA：血清中の RNase によるウイルス RNA 分解防止と微量 RNA の非特異的吸着防止のために入れる。PolyA RNA (Sigma-Aldrich 社) を用いた。会社：Sigma-Aldrich 名称：ポリアデニル酸カリウム塩 Catalog No. : P9403

\*2 1ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

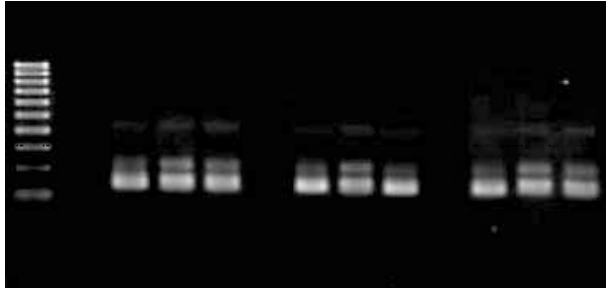
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

## ■ その他

### ● HCV ウイルス RNA の RT-PCR/nested PCR のよる検出

M a b c d e f g h i j k l



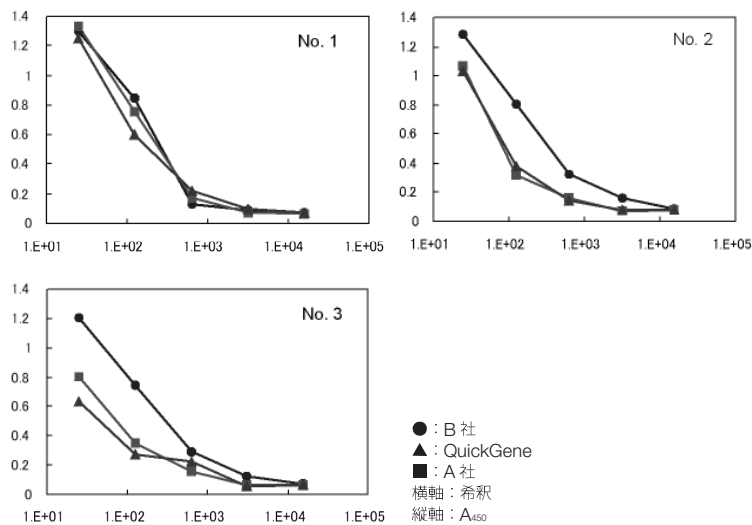
M : マーカー (100 bp ladder)  
 a, e, i : HCV 陰性健常人  
 b, f, j : HCV 陽性患者 No.1  
 c, g, k : HCV 陽性患者 No.2  
 d, h, l : HCV 陽性患者 No.3

a, d : QuickGene  
 e, h : A 社  
 i, l : B 社

QuickGene によって HCV 感染患者血清から調製した RNA を用いて、C 型肝炎 RNA を RT-PCR/nestedPCR 法によって検出することができた。

### ● HCV RNA の検出

QuickGene システム、A 社製品、B 社製品で得られた 3 種の RNA について AMPLICOR の検出システム (ハイブリダイゼーション法) を用いて HCV RNA の検出感度を検討した。



B 社との比較では、3 検体中 2 検体で最大で約 5 分の 1 の反応性の低さが認められた。一方、QuickGene と A 社製品で調製した RNA では、反応性には有意な差を認めなかった。この AMPLICOR との感度の乖離については、QuickGene および A 社では、分解した RNA の小断片は標品中に入っていないことが一因として考えられる。

QuickGene で調製した血清 RNA によって、通常の患者血清中の HCV RNA を十分な感度で検出できることが示された。

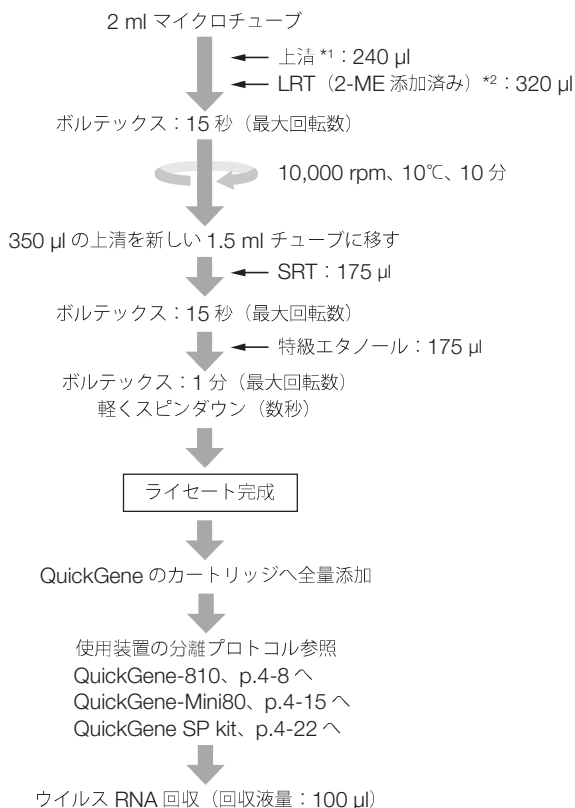
QuickGene では、AMPLICOR の RNA 調製プロトコルに含まれているイソプロパノール沈澱と遠心による回収などの煩雑な操作が不要であり、RNA 調製が容易となる。

## ■ 共通プロトコルサンプル

HIV

## 糞便からのノロウイルス RNA分離

### プロトコル A (PCR 法)



\*1 10% 乳剤 (糞便を PBS に添加を遠心。

\*2 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ウイルス RNA 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

##### ● 検査

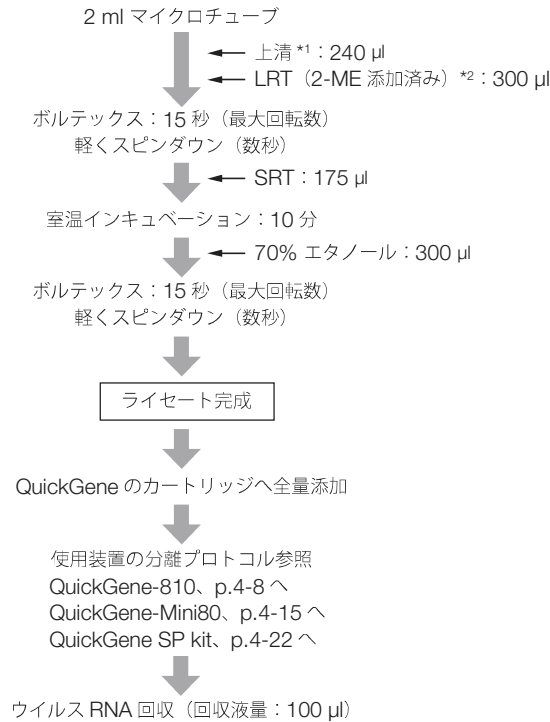
PCR 法 (厚生労働省認可 / 製薬・医療発明 2007 Nov. 5)

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## プロトコル B (TRC 法)



\*1 10% 乳剤 (糞便を PBS に添加) を遠心。

\*2 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

## 結果

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ ウイルス RNA 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

#### ● 検査

ノロウイルス検査 : トーソー コーポレーション TRCRapid-160 システム

<http://www.tosoh.co.jp/science/trc/real.html>

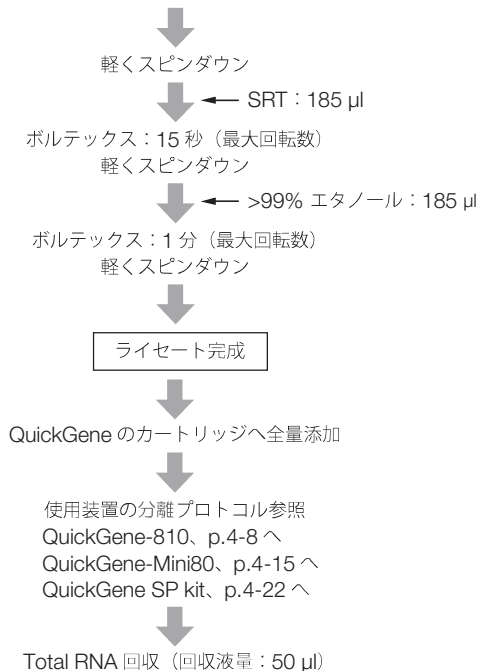
## 共通プロトコルサンプル

データなし

## HIV 患者血清および、HIV のウイルス粒子をスパイクしたヒト血清からの RNA 分離と HIV RNA の検出限界

### プロトコル

200  $\mu$ l の LRT (2-ME 添加済み) \*2 に 10  $\mu$ l の 10 mg/ml キャリア RNA \*1 溶液と 150  $\mu$ l の血清を添加して、ボルテックス：30 秒 (最大回転数)



\*1 キャリア RNA：精製された微量 RNA の非特異的吸着防止と血清中の RNase によるウイルス RNA 分解防止のために入れる。PolyA RNA (Sigma-Aldrich 社) を用いた。  
会社：Sigma-Aldrich  
名称：ポリアデニル酸カリウム塩  
Catalog No.：P9403

\*2 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

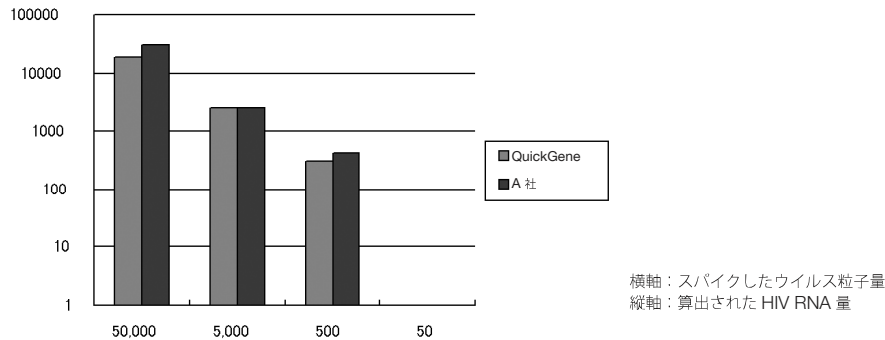
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし

## ■ その他

### ● HIV のウイルス粒子をスパイクしたヒト血清からの HIV RNA の精製と検出限界

HIV のウイルス液をプールした健常ヒト血清に下表の濃度になるように添加した。上記プロトコルに従って QuickGene を用いて調製した RNA と A 社の標準プロトコルで分離した RNA について、AMPLICOR の検出システム (PCR- ハイブリダイゼーション) を用いて HIV RNA を定量的に検出した。

スパイクしたウイルス量 (ウイルス粒子数/ml)	算出値 (コピー/ml)	
	QuickGene	A 社
50,000	18623.6	30827
5,000	2467	2471.2
500	304.9	435.4
50	-6.6	-2.6

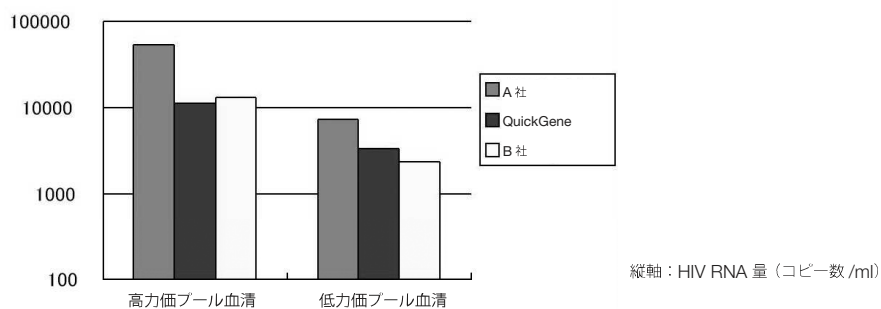


以上の結果から、QuickGene で分離した RNA を用いて、A 社と同等の検出感度で HIV RNA を検出することができた。その感度は数百ウイルス粒子/ml 程度であった。

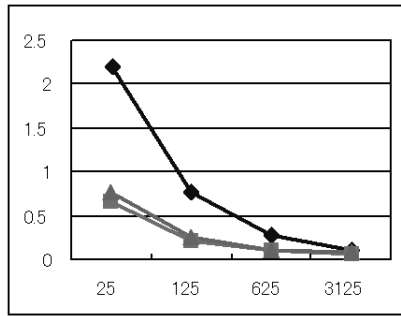
### ● HIV 患者血清からの HIV RNA の精製と検出

HIV 患者のプール血清 (高力価と低力価の 2 検体) から QuickGene、B 社の製品を用いて RNA を調製、AMPLICOR の検出システム (PCR- ハイブリダイゼーション) で HIV RNA を定量的に検出した。

	高力価プール血清	低力価プール血清
A 社	53908.8	7391.2
QuickGene	11178.6	3349.9
B 社	13157.2	2425.7

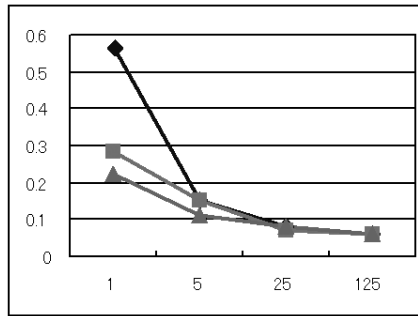


高力価プール血清



◆ : A社    ■ : QuickGene    ▲ : B社

低力価プール血清



横軸：PCR産物の希釈度  
縦軸：450 nmの吸光度

以上の結果から、患者血清での HIV RNA 検出に関しては、A 社製品で最も強いレスポンスが得られた。QuickGene と B 社製品では同等のレスポンスが得られたが、A 社製品の 1/2 から 1/5 程度であった。本検出法は、RNA コピー数のオーダーの算出が目的であり、1/2 から 1/5 の乖離は実験間の誤差の範囲とみなしてよい。三者の値は同じオーダーの範囲に入っており、検出感度の点からは同等であると考えてよい。従って、QuickGene を用いた本プロトコルで HIV 患者血清から HIV RNA を定量的かつ高感度に検出できることが示された。

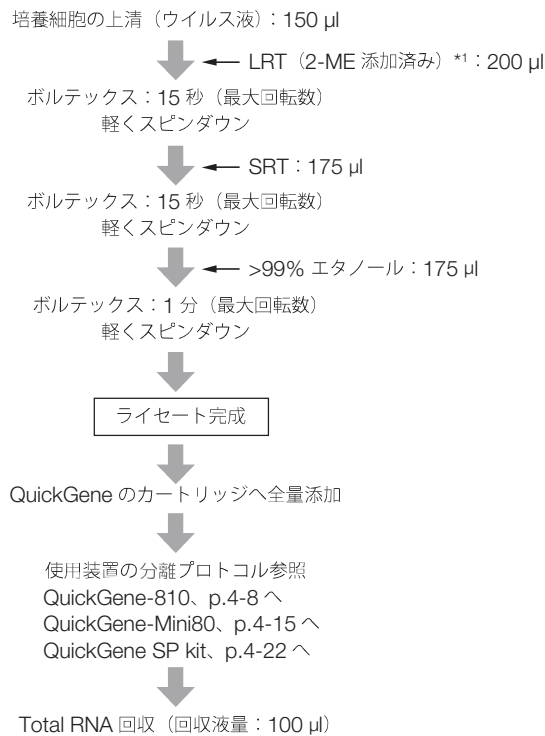
## 共通プロトコルサンプル

HCV



## インフルエンザウイルス液からの total RNA分離

## プロトコル



\*1 1mlのLRT当たり10 $\mu$ lの  
2-MEを加える。

## 結果

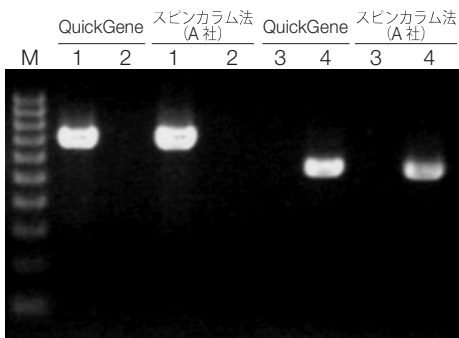
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし

■ その他

● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピナラム法 (A 社) を用いてインフルエンザウイルス液から分離した total RNA で AH3 型インフルエンザ特異的プライマーと B 型インフルエンザ特異的プライマーを使用した RT-PCR を行った。

ウイルス型選択性の確認



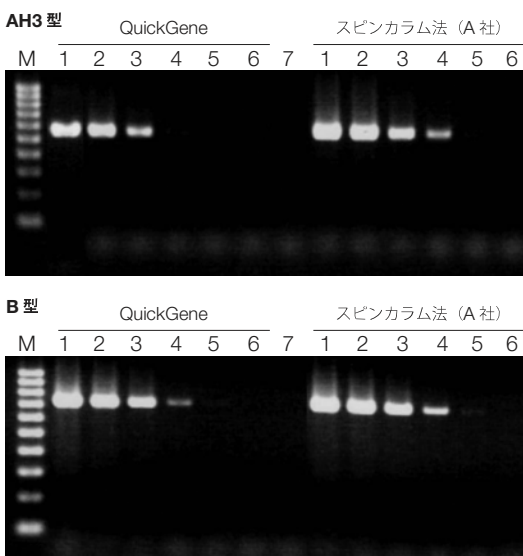
電気泳動条件：2.0% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder  
 1：AH3 型インフルエンザウイルス RNA  
 2：B 型インフルエンザウイルス RNA  
 3：AH3 型インフルエンザウイルス RNA  
 4：B 型インフルエンザウイルス RNA

プライマー：1,2 AH3 型インフルエンザ特異的プライマー  
 3,4 B 型インフルエンザ特異的プライマー

各 total RNA は特異的プライマーでのみ RT-PCR 産物が検出された。

ウイルス RT-PCR の確認



電気泳動条件：2.0% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder  
 1：インフルエンザウイルス、 $10^6$  pfu/ml  
 2：インフルエンザウイルス、 $10^5$  pfu/ml  
 3：インフルエンザウイルス、 $10^4$  pfu/ml  
 4：インフルエンザウイルス、 $10^3$  pfu/ml  
 5：インフルエンザウイルス、 $10^2$  pfu/ml  
 6：インフルエンザウイルス、 $10^1$  pfu/ml  
 7：ネガティブコントロール

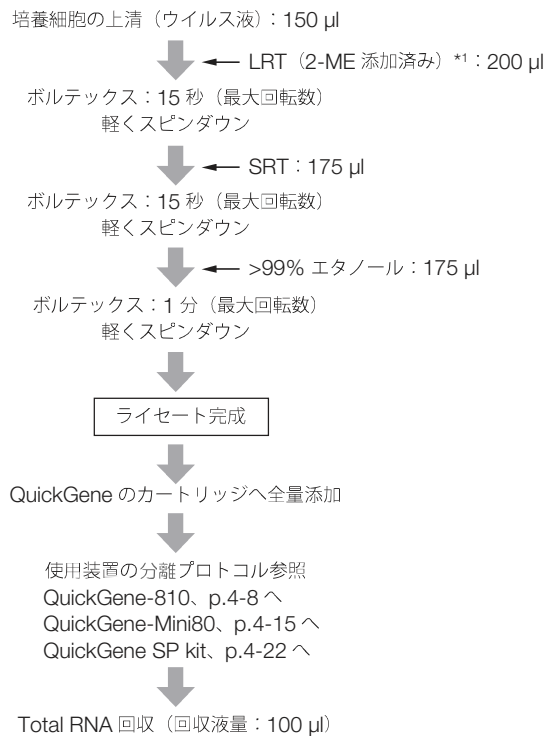
各 total RNA から AH3 型インフルエンザと B 型インフルエンザの RT-PCR 産物が検出された。

共通プロトコルサンプル

麻疹ウイルス、RS ウイルス

## 麻疹ウイルス液からの total RNA分離

## プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

## 結果

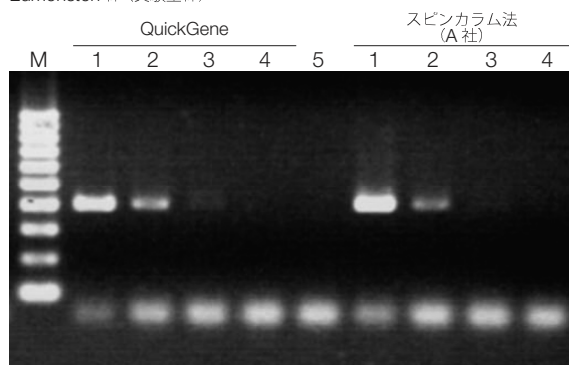
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし

■ その他

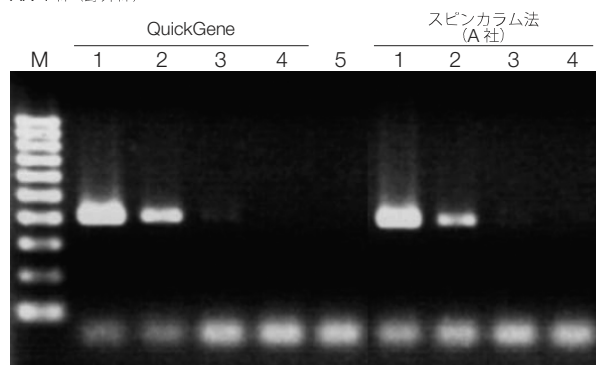
● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて麻疹ウイルス液から分離した total RNA でウイルスヘマグルニチン (HA) に特異的なプライマーを使用した RT-PCR を行った。

Edmonston 株 (実験室株)



AK-1 株 (野外株)



電気泳動条件：2.0% アガロース / 1 × TAE

M：100bp DNA Ladder

1：麻疹ウイルス、 $10^5$  pfu/ml

2：麻疹ウイルス、 $10^4$  pfu/ml

3：麻疹ウイルス、 $10^3$  pfu/ml

4：麻疹ウイルス、 $10^2$  pfu/ml

5：ネガティブコントロール

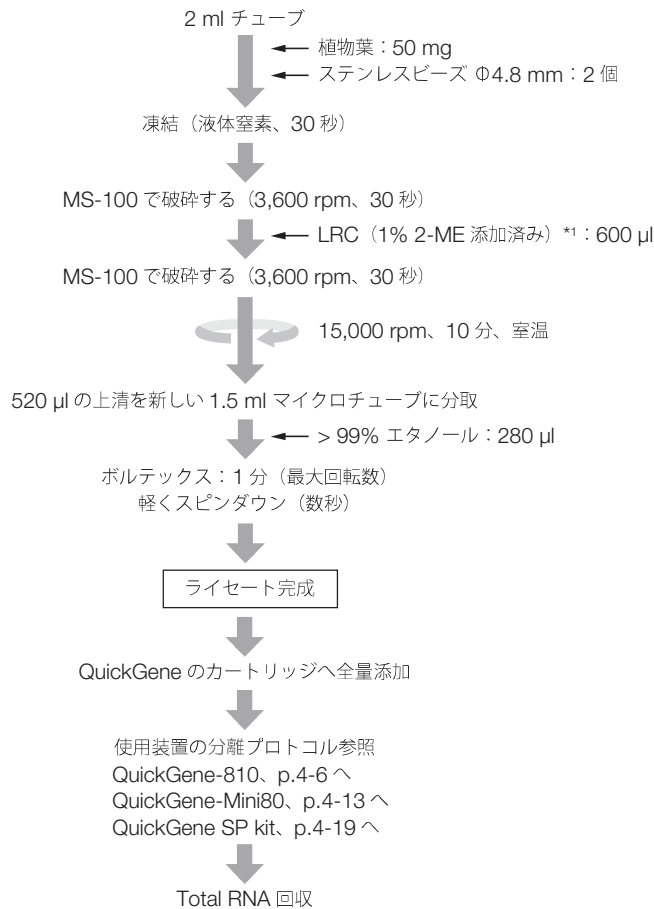
いずれの total RNA からでも HA の RT-PCR 産物を検出できた。

## 共通プロトコルサンプル

インフルエンザウイルス、RS ウイルス

## 植物ウイルスからの total RNA分離

## プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

## ■ 電気泳動図

データなし

## ■ Total RNA 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

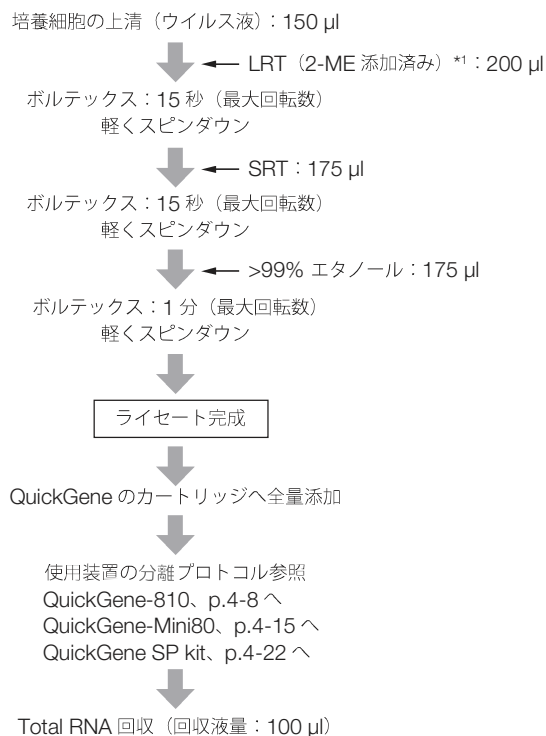
データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

## RS (Respiratory Syncytial) ウイルス液からの total RNA分離

### プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

### 結果

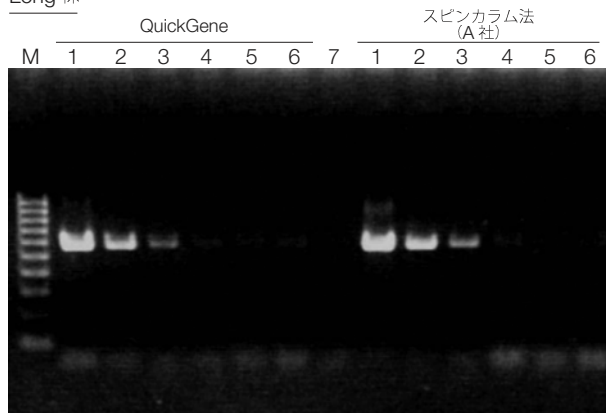
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし

## ■ その他

### ● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A 社) を用いて RS ウイルス液から分離した total RNA で、RS ウイルスの G タンパク質遺伝子に特異的なプライマーを使用した RT-PCR を行った。

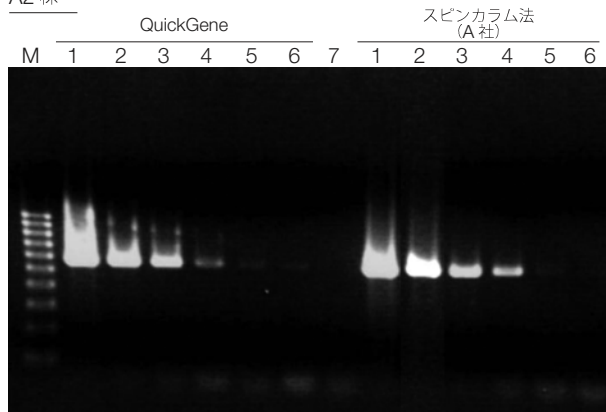
#### Long 株



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder  
 1：RC ウイルス、 $10^5$  pfu/ml  
 2：RC ウイルス、 $10^4$  pfu/ml  
 3：RC ウイルス、 $10^3$  pfu/ml  
 4：RC ウイルス、 $10^2$  pfu/ml  
 5：RC ウイルス、10 pfu/ml  
 6：RC ウイルス、1 pfu/ml  
 7：ネガティブコントロール

#### A2 株



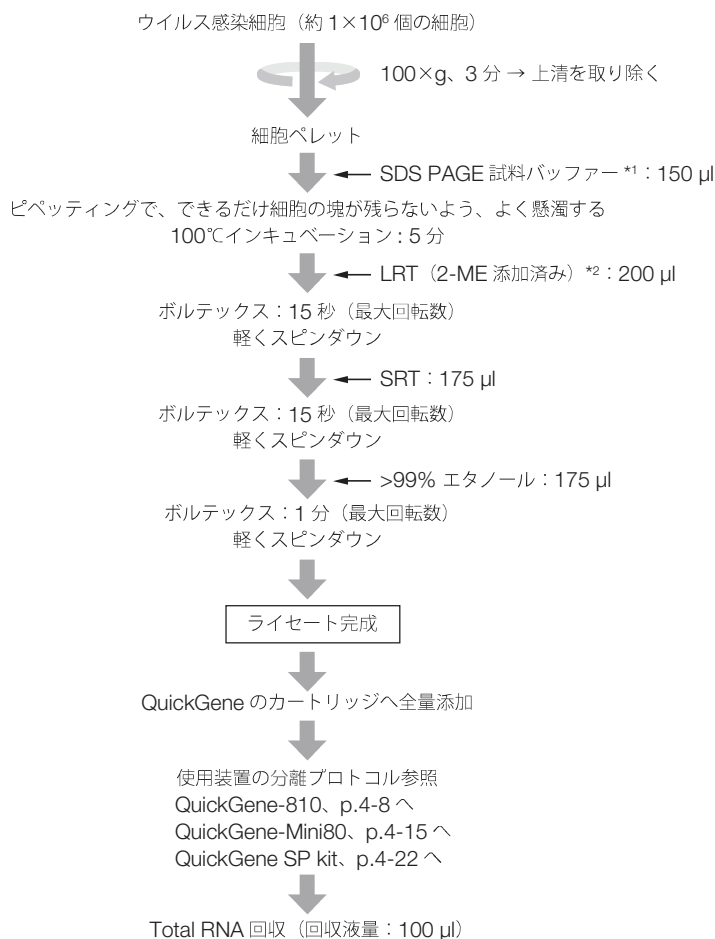
いずれの total RNA からも RS ウイルスの G タンパク質遺伝子の RT-PCR 産物を検出できた。

## ■ 共通プロトコルサンプル

麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス

# SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 感染細胞からの total RNA分離

## プロトコル



\*1 試料バッファーの組成：  
0.125 M トリス - 塩酸 (pH 6.8)、  
10% (v/v) 2-メルカプトエタノール、  
4% (w/v) SDS、10% (v/v) グリセロール、0.01% (w/v) プロモフェノールブルー

\*2 1 ml の LRT 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

サンプル	No.1	No.2
QuickGene	9.4 μg	7.1 μg
スピнкаラム法 (A社)	7.6 μg	7.8 μg

### タンパク質の混入 : A260/280

サンプル	No.1	No.2
QuickGene	1.93	1.90
スピнкаラム法 (A社)	1.80	1.88

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

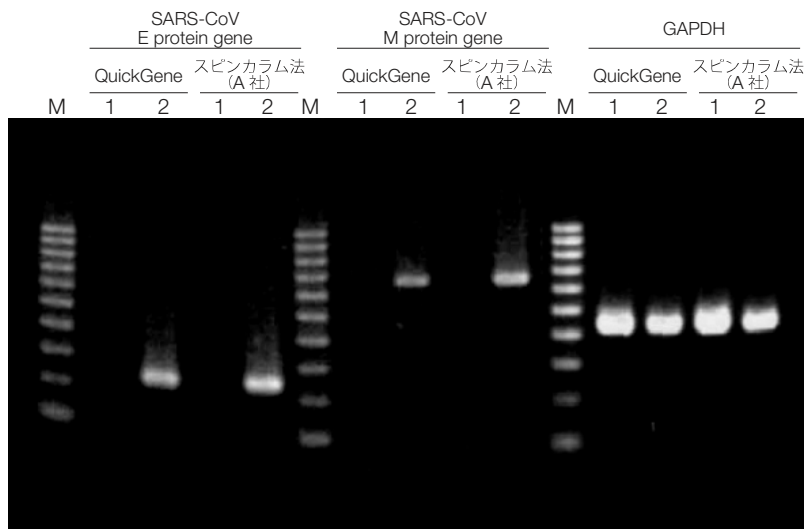
データなし



## ■ その他

### ● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A社) を用いて SARS-CoV 感染細胞から分離した total RNA で、SARS-CoV の E タンパク質遺伝子と M タンパク質遺伝子、GAPDH 遺伝子に特異的なプライマーを使用した RT-PCR を行った。



電気泳動条件：

2% アガロース / 1 × TAE

M : 100 bp DNA Ladder

1 : No.1 非感染 Caco-2 細胞

2 : No.2 SARS-CoV 感染 Caco-2 細胞

いずれの SARS-CoV 細胞 total RNA からも SARS-CoV の E タンパク質遺伝子と M タンパク質遺伝子の RT-PCR 産物を検出できた。

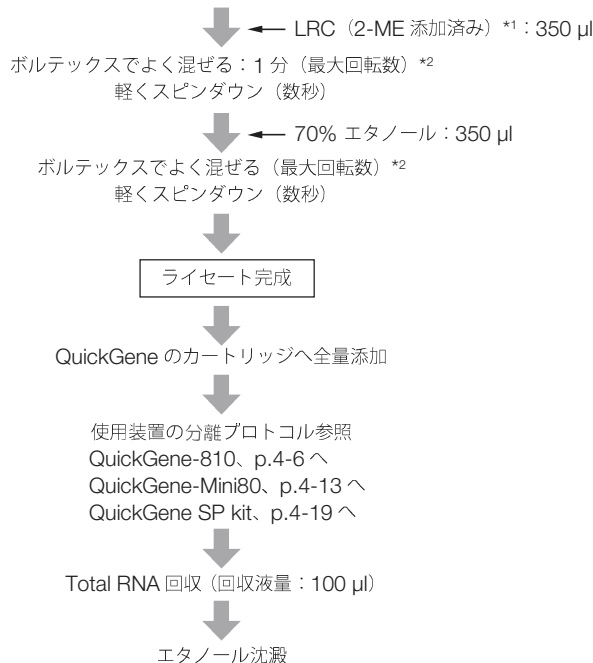
## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

# サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染細胞からの total RNA分離

## プロトコル

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



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

\*2 最大回転数ボルテックスで完全に混合してください。ボルテックスで混合不十分ならば、タッピング、ピペティングあるいは転倒を使用してください。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### ウイルス RNA の収量 (μg)

ウイルス	実験 1			実験 2			
	mock	SIV clone 1	SIV clone 2	mock		SIV clone 2	
QuickGene-810	5.6	3.8	7.0	8.0	3.6	6.0	9.5
スピнкаラム	-	-	-	7.1	0.8	4.5	4.7

### タンパク質の混入 : A260/280

ウイルス	実験 1			実験 2			
	mock	SIV clone 1	SIV clone 2	mock		SIV clone 2	
QuickGene-810	1.86	1.82	1.84	1.90	1.86	1.77	1.91
スピнкаラム	-	-	-	1.92	1.66	1.82	1.88

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

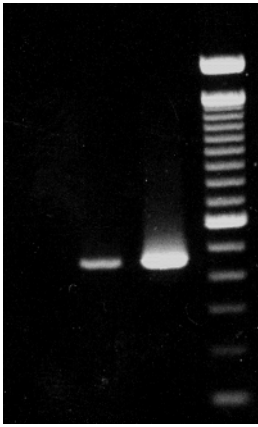
## ■ その他

## ● RT-PCR

SIV clone 1 あるいは SIV clone 2 感染細胞から分離した SIV-RNA 使用の RT-PCR の AGE

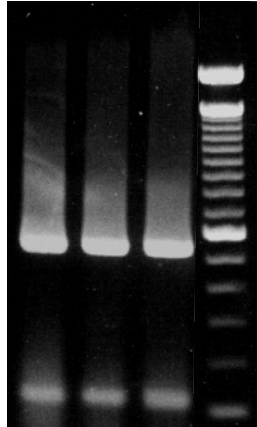
実験 1 : SIV clone 1 あるいは SIV clone 2 感染細胞からの SIV-RNA 検出

mock clone1 clone2



env  
458bp

mock clone1 clone2



GAPDH  
588bp

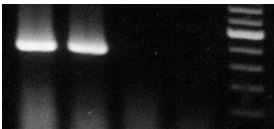
1  $\mu$ g の分離 total RNA を使用して RT-PCR を行った。

Total RNA を用いて RT-PCR 増幅に成功した。

SIV clone 2 には SIV clone 1 よりも高い伝染性があるので、より多量の SIV-RNA が SIV clone 2 感染細胞から分離できる。

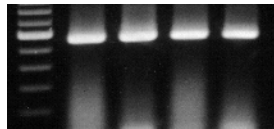
実験 2 : QuickGene-810 とスピンカラムの比較

SIVclone2    mock  
F    A    F    A



env  
458bp

SIVclone2    mock  
F    A    F    A



GAPDH  
588bp

F : QuickGene-810  
A : スピンカラム

env および GAPDH 遺伝子増幅のための RT-PCR テンプレートに、分離した S2V-RNA を用いた。

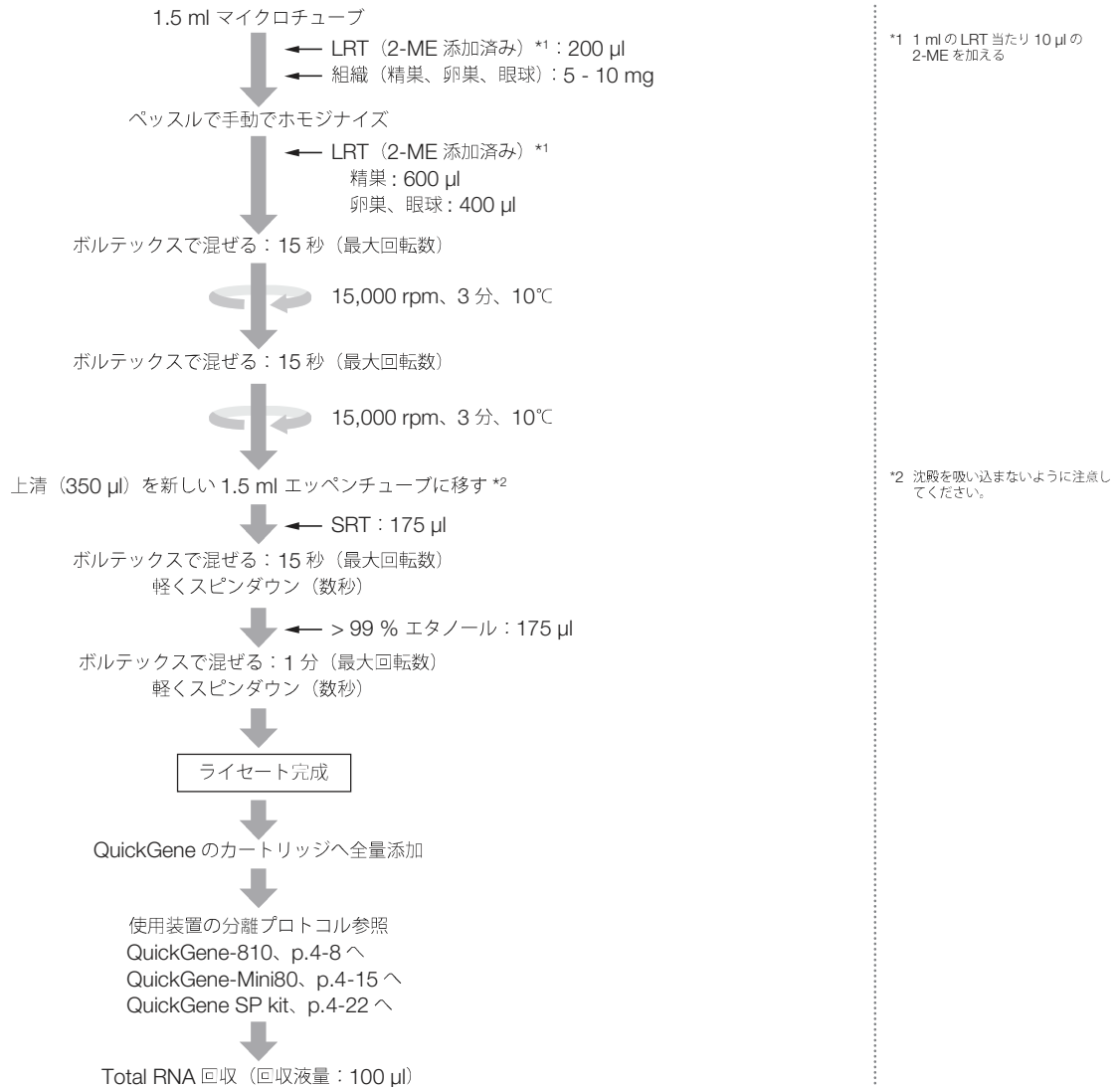
## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

RH-10

# アマダイからのVNN (ウイルス性神経壊死症 (Viral Nervous Necrosis)) RNA分離

## プロトコル



## 結果

- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA 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

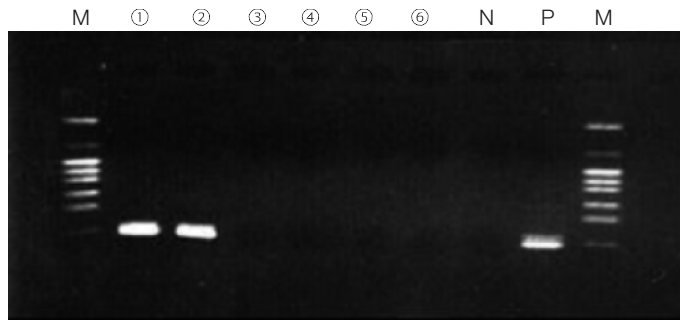
## ■ その他

### ● RT-PCR

RT-PCR：分離した RNA で RGNNV 外皮タンパク遺伝子の T4 領域をターゲットにし、増幅を行った。

Nested PCR：4つのベータナドウイルスの遺伝子型のうち、RG型に特異的なプライマーを用いて増幅を行った。

サンプル：天然アマダイ ♀ 3尾、卵巣、眼球（各部位は同一個体から採取）



M：pHY マーカー（タカラバイオ社製）

①：アマダイ No.1 卵巣

②：アマダイ No.2 卵巣

③：アマダイ No.3 卵巣

④：アマダイ No.1 眼球

⑤：アマダイ No.2 眼球

⑥：アマダイ No.3 眼球

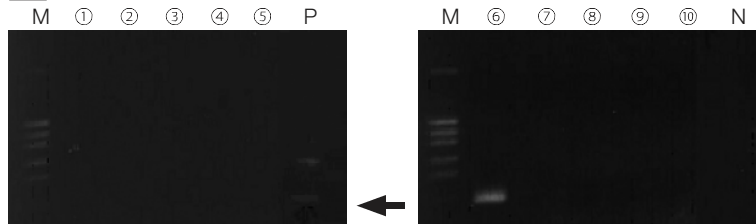
N：ネガティブコントロール

P：ポジティブコントロール

結果：No.1、2の卵巣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。

サンプル：天然アマダイ ♂ 10尾、精巣、眼球（各部位は同一個体から採取）

#### 精巣



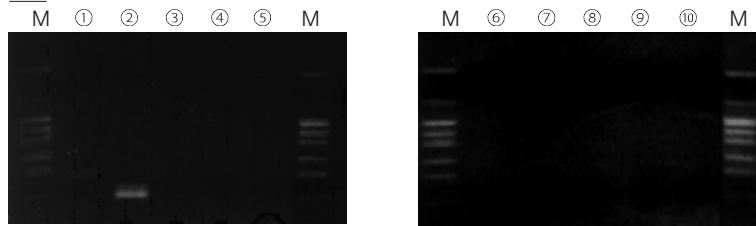
M：pHY マーカー（タカラバイオ社製）

① - ⑩：アマダイ No.1 精巣～No.10 精巣

N：ネガティブコントロール

P：ポジティブコントロール

#### 眼球



M：pHY マーカー（タカラバイオ社製）

① - ⑩：アマダイ No.1 眼球～No.10 眼球

結果：No.6の精巣とNo.2の眼球から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

