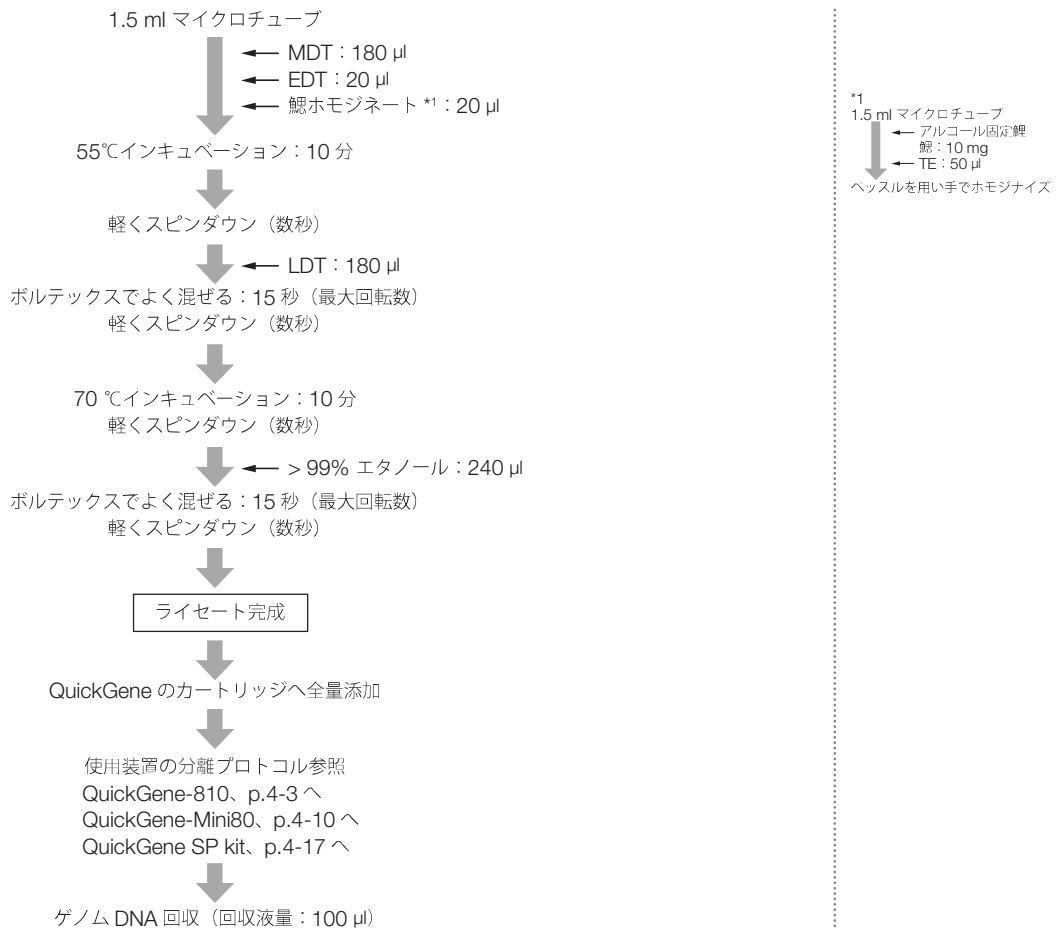


3-IX 章

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 (µg)
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

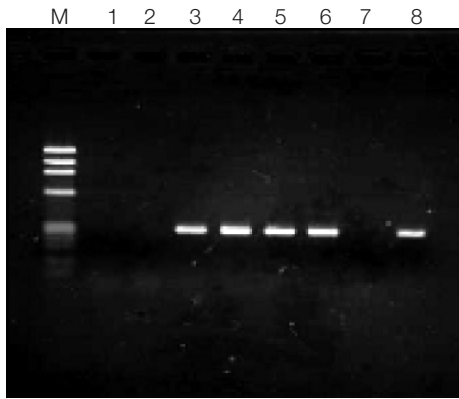
■ その他

● 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



M： λ x 174-*Hae* III digest

1：健康魚 No.1

2：健康魚 No.2

3：感染魚 No.1

4：感染魚 No.2

5：感染魚 No.3

6：感染魚 No.4

7：ネガティブコントロール

8：ポジティブコントロール

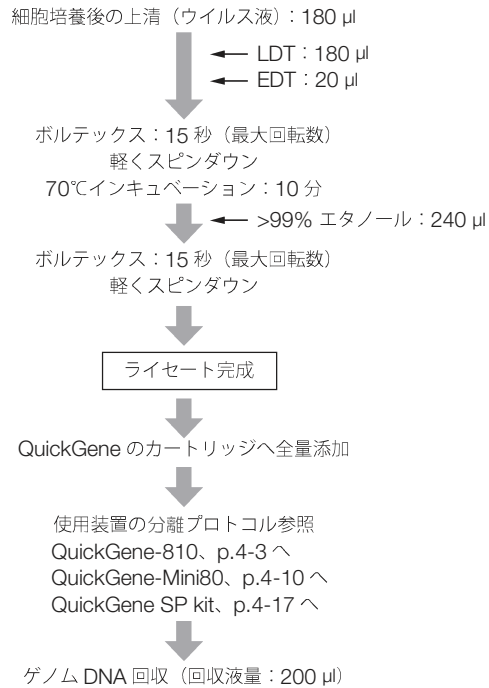
この PCR の結果、感染魚 No.1-4 でポジティブコントロールと同様の増幅産物が確認された。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

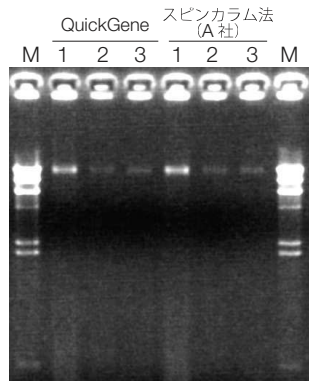
ヒト単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) ウイルス液からのゲノムDNA分離

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

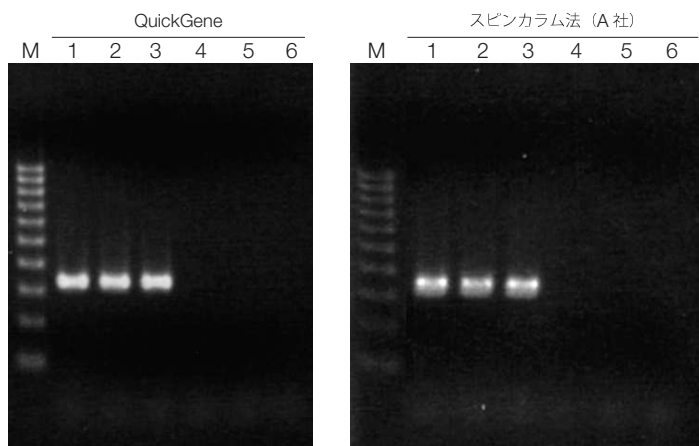
カオトロピック塩の混入 : A260/230

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

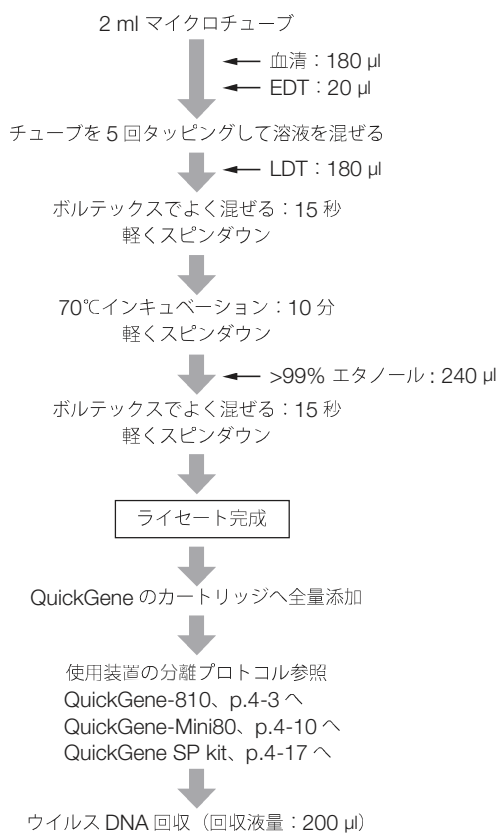
いずれのゲノム DNA から PCR 産物を検出できた。

■ 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

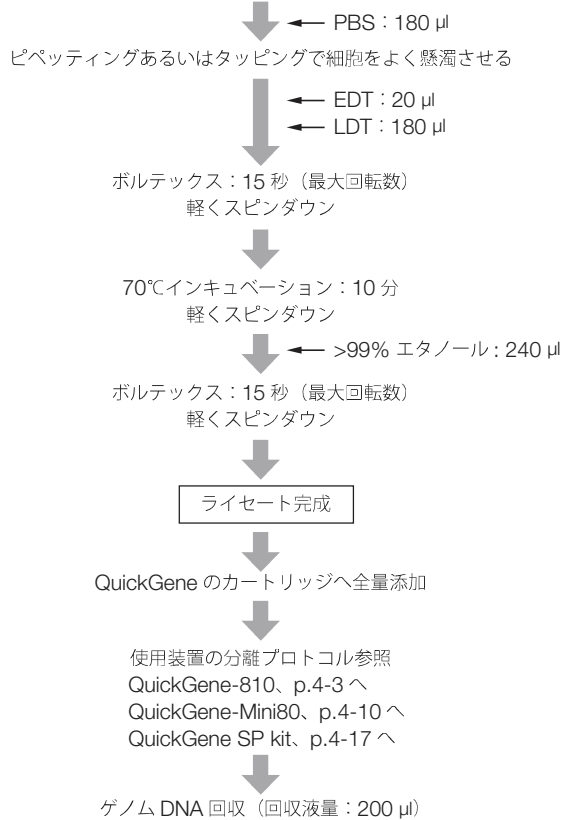
- 電気泳動図
データなし
- ウイルス DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230
データなし
- その他
データなし

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

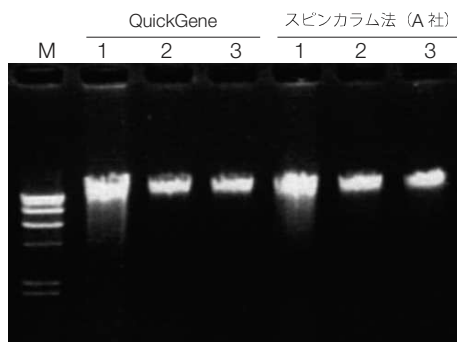
■ プロトコル

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

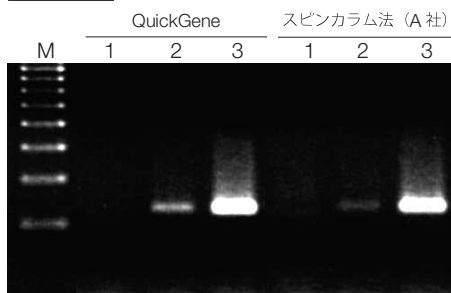
データなし

■ その他

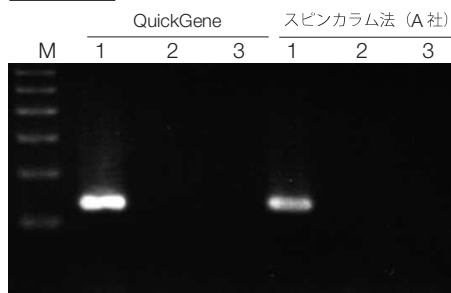
● PCR

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。

HPV 16 型



HPV 18 型



電気泳動条件：
2% アガロース / 1 × TAE

M : 100 bp DNA Ladder
1 : HeLa
2 : SiHa
3 : CasKi

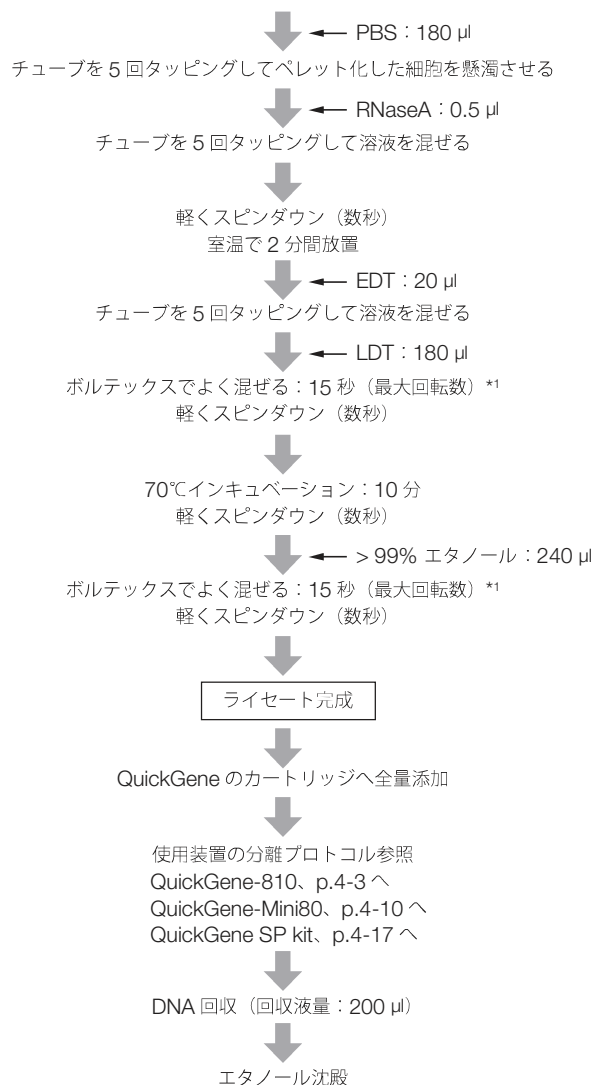
QuickGene システムを用いて分離した HPV 感染細胞 DNA から、感染細胞中 1 から 2 コピーの HPV ゲノム DNA を PCR により検出することができた。

■ 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、ピペッテ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 (µg)

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	1×10^5	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нкаラム (A社)	1.85	1.85	1.80	1.81	1.79	1.77	1.81	1.82

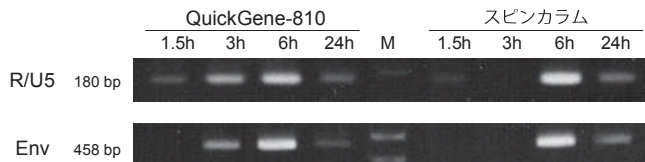
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● PCR の AGE・DNA の断片

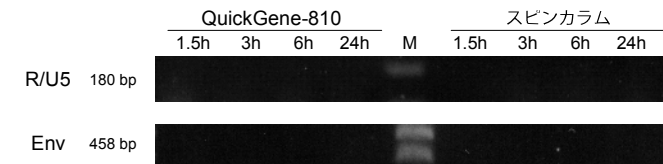
SIV 感染細胞



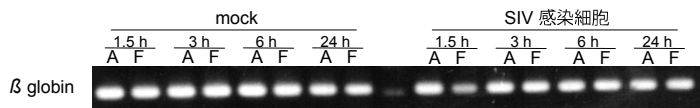
QuickGene システムおよびスピнкаラムを用いて、SIV 感染細胞から分離した DNA 1 µg で PCR を行った。

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нкаラム

■ 共通プロトコルサンプル

データなし