

マツカワ神経壊死症ウイルス遺伝子検出のためのone-step RT-PCR法の検討；従来法two-step RT-PCR法との感度の比較（資料）

伊藤慎悟*

北海道立総合研究機構中央水産試験

A comparison of the sensitivity of one- and two-step RT-PCR methods for the detection of the barfin flounder nervous necrosis virus gene (Note)

SHINGO ITO*

Central Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan

キーワード：マツカワ神経壊死症ウイルス， one-step RT-PCR法， two-step RT-PCR法， 感度

北海道立総合研究機構中央水産試験場（旧北海道立中央水産試験場）では1994年からマツカワ神経壊死症ウイルス（以下BFNNV）のT4領域の検出にtwo-step RT-PCR法が採用されてきた（北海道立中央水産試験場 1995）。しかし，two-step RT-PCR法は操作が煩雑なため，人為的なコンタミネーション（タカラバイオ 2017）や操作手順のミスなどを起こす危険性がある。そこで，操作が簡易なone-step RT-PCR法に移行するために，現在実施しているtwo-step RT-PCR法と感度を比較し，one-step RT-PCR法の条件を検討した。

材料と方法

従来のtwo-step RT-PCR法とキットの説明書の条件で実施したone-step RT-PCR法の感度の比較 two-step PCR 法にはGeneAmp® RNA PCR Core Kit（ライフテクノロジーズ）を使用した。プライマーはNishizawa et al.(1994)に記載のT4領域を検出するためのForward primer (F2)とReverse primer (R3)を使用した。逆転写は以下の手順で実施した。10×PCR Buffer II 0.975μLに，塩化マグネシウムを終濃度0.975μM，dATP，dCTP，dGTP，dTTPを各0.975μM，RNase Inhibiterを1U/μL，MuLV Reverse Transcriptaseを0.49U/μL，Reverse primer (R3)を0.51μM，テンプレート1μLを加え，RNase Free dH₂Oで10μLとした後，42℃で15分間逆転写した。その後，99℃で5分間の処理で逆転写酵素を失活させた後，PCR

法に供するまで4℃で保冷した。PCR法は以下の手順で実施した。逆転写後のサンプル10μLに10×PCR Buffer IIを3.925μL加え，塩化マグネシウム濃度を0.985μM，AmpliTaQ® DNA Polymeraseを0.025U/μL，Forward primer (F2)を0.985μMとなるように添加し，RNase free dH₂Oで50μLとしてPCR反応液とした。このPCR反応液に対し，Initial denaturationを95℃で2分間実施した後，PCRサイクル（Denatureを95℃で15秒，Annealを60℃で30秒）を35回実施し，Final extensionを72℃で7分間行い，4℃で冷却した。その後，電気泳動を行うまで-25℃で保存した。

One-step RT-PCR法にはPrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2（タカラバイオ）を使用した。プライマーはtwo-step RT-PCR法と同じプライマーを使用した。逆転写及びPCR法は以下の手順で実施した。Prime Script 1step Enzyme Mixを2μL，2×1 step Bufferを25μL加え，Forward primer (F2)とReverse primer (R3)を各0.4μMとなるように添加し，テンプレートを1μL加え，RNase free dH₂Oで50μLにして反応液とした。この反応液を50℃で30分間逆転写を行い，94℃で2分間加熱して，逆転写酵素を失活させたのち，PCRサイクル（Denatureを94℃で30秒，Annealを55℃で30秒，Extensionを72℃で1分間）を35回実施後，4℃に冷却した。その後，電気泳動を行うまで-25℃で保存した。ここでのAnneal温度はNishizawa et al.(1994)に従った。

なお，テンプレートはBFNNVに罹患したマダラ脳か

ラセパジーン（エーディア）で抽出した核酸をDW₂で10⁰（原液）～10⁶倍希釈したものをを用いた。また、陰性対照としてはRNase free dH₂Oを加えたものを使用した。電気泳動は2%アガロースゲルで泳動を行い、標的遺伝子の増幅状況を確認した。

one-step PCR法のAnneal温度の検討 one-step RT-PCR法のAnneal温度を55℃, 58℃, 60℃, 62℃に変えて増幅を行い、標的遺伝子の増幅状況を確認することで、非特異増幅産物の増幅されないアニーリング温度を検討した。なお、テンプレートはBFNNVに罹患したマダラ脳からセパジーン（エーディア）で抽出した核酸をDW₂で10⁰（原液）～10⁶倍希釈したものをを用いた。

one-step PCR法のプライマー濃度の検討 one-step PCR法のプライマー濃度を0.15, 0.2, 0.4μMとし、標的遺伝子の増幅状況を確認することで、非特異増幅産物の増幅されないプライマー濃度を検討した。使用したテンプレートはBFNNVに罹患したマダラ脳からセパジーン（エーディア）で抽出した核酸をDW₂で10⁰（原液）～10⁶倍希釈したものをを用いた。なお、さらに手順を簡便化するために、ここではPCRサイクルをtwo-step PCR法と同様の条件で行った（Denature温度95℃ 15秒, Anneal 温度60℃ 30秒, Extensionを省略）。

結果

従来法のtwo-step RT-PCR法とキットの説明書の条件で実施したone-step RT-PCR法の感度の比較 従来法であるtwo-step RT-PCR法と簡易法のone-step RT-PCR法で両者とも10⁴倍希釈したサンプルまで増幅産物が確認された。one-step RT-PCR法では目的とした増幅産物以外にも2本の非特異増幅産物が検出された（図1）。

one-step PCR法のAnneal温度の検討 Anneal温度を58～60℃にした場合においても、説明書条件の55℃の時と同じ位置に実験1と同様に非特異増幅産物が検出された（データ略）。また、62℃ではBFNNVのRNAのT4領域に相当するバンドの濃さが他に比べて薄かった。

one-step PCR法のプライマー濃度の検討 プライマーの終濃度0.15μMでは、従来法のtwo-step PCRと同様に、非特異バンドもなく、テンプレートの希釈率10⁰～10⁴倍希釈まで特異増幅産物のバンドが確認された（図2）。一方、プライマー終濃度0.2と0.4μMでは「従来法のtwo-step RT-PCR法とキットの説明書の条件で実施したone-step RT-PCR法の感度の比較」同様の非特異増幅産物が検出された（データ略）。今回確立したone-step PCR法の概要を図3と表1に示した。

なお、今回の実験は最終液量50μLで実施したが、追加試験で、最終液量20μLでも同様の結果が得られた。

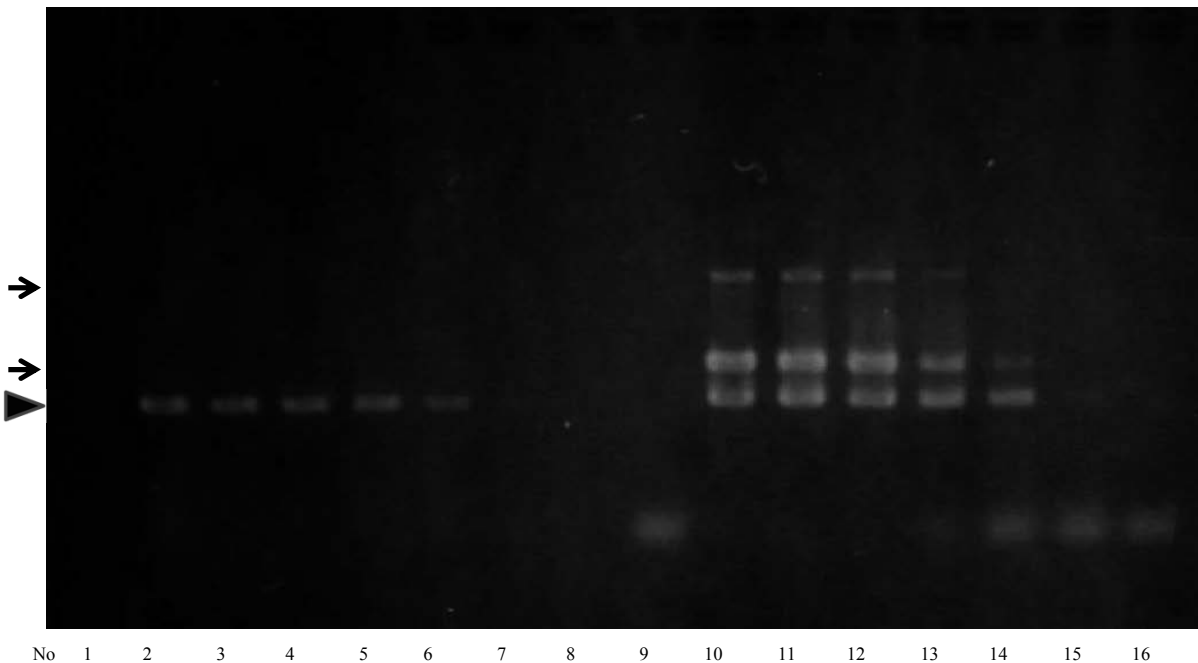


図1 プライマー濃度0.4μMのone-step RT-PCR法と従来法のtwo-step RT-PCR法との感度比較。

No 1～8はtwo-step RT-PCR産物の泳動結果（No 1：陰性対象, No 2～8：テンプレート希釈倍率10⁰～10⁶）, No 9～16はone-step RT-PCR産物の泳動結果（No 9：陰性対象, No 10～16：テンプレート希釈倍率10⁰～10⁶）, 矢頭 標的増幅遺伝子, 矢印 非特異増幅産物。

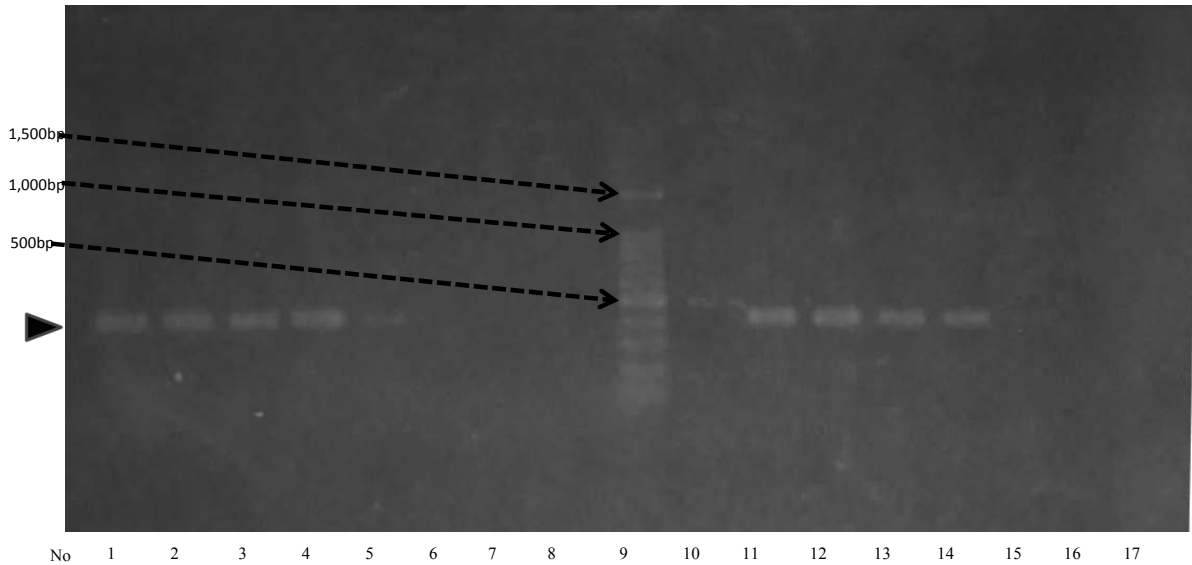
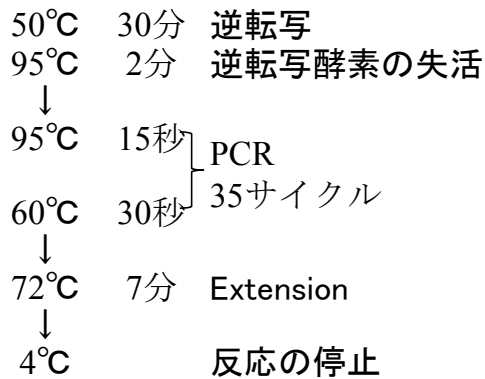


図2 One Step RT-PCR法のプライマー濃度を0.15 μ Mにしたときの既存の2step RT-PCR法との感度の比較
 No1~7. One Step RT-PCR法での核酸抽出物の希釈倍率が原液 (No.1) ~10⁶倍希釈 (No.7)、No8 空ウエル、
 No9 マーカー (TaKaRa 100bp)、No10 陰性対照、No11~17.2step RT-PCR法での核酸抽出物の希釈倍率が原液
 (No.11) ~10⁶倍希釈 (No.17), 矢頭 標的増幅産物 (426bp)



考 察

現在、中央水産試験場のマツカワ種苗のBFNNV検査では渡辺と吉水 (2002) によって発表された細胞培養法とtwo-step RT-PCR法を組み合わせる方法でウイルスの感染を確認している。two-step RT-PCR法の試薬キットは混ぜる試薬の濃度を個別に変更できるという利点がある一方で、マスターミックスなど自分で試薬の調製を行う必要があるため煩雑であり、あらかじめ大部分の試薬の調整が済んでいるone-step RT-PCRキットは作業的に簡易である。

これまで中央水産試験場では、two-step RT-PCRのマスターミックスを調整する際の試薬の入れ忘れで反応しなかったことが疑われ、検査が遅れたことがある。one-step RT-PCR法に移行することで作業が簡略化され、試薬の入れ忘れなどの危険性の減少も見込まれる。

今回の検討内容で一番重要なことは検出感度が従来の方法と遜色ないかである。one-step RT-PCR法でも感度については問題がないという結果が得られた。また、プライマー濃度が高い場合は、非特異増幅産物の増幅が確認できた。このように、濃度が不適切な場合は結果が曖昧になるという危険性もあると考えられる。今回の実験では、プライマーの終濃度が0.15 μ Mであれば、従来のtwo-step PCR法と同じ感度でなおかつ非特異増幅産物が検出されないことが判った。これらの事から、BFNNVの検出手法をtwo-step RT-PCRからone-step RT-PCR法へ移行することが可能である。

図3 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ) を用いた場合のBFNNVのRT-PCR法の反応条件

表1 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ) を使用したBFNNV のRT-PCR法の反応液の試薬

試薬名	添加量(μ L)	終濃度
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	2	0.8
2 \times 1 step buffer	25	10
Forward primer(10 μ M)	0.75	0.3 0.15 μ M
Reverse primer(10 μ M)	0.75	0.3 0.15 μ M
RNase Free DW2	20.5	7.6
テンプレート	1	1
合計	50	20

引用文献

- 北海道立中央水産試験場, 6. 海産魚介類の原因不明疾病の究明と防除に関する研究「平成6年度北海道立中央水産試験場事業報告書」, 余市. 1995 : 171-174
- タカラバイオ株式会社 : “TaKaRa PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 説明書” Download from (http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/rr055a_j.pdf) (2017.5.15)
- Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Furusawa I, Muroga K. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquatic.Org.* 1994; 18 : 103-107
- 渡辺研一, 吉水守.細胞培養法とRT-PCR法を組み合わせた神経壊死症ウイルスの検出.日本水産学会誌 2002 ; 68(2) : 197-200