

# 魚病診断マニュアル

## メガイアワビの *Francisella* 属菌感染症の診断

### PCR

(平成 21 年 3 月 暫定版)

独立行政法人 水産総合研究センター  
養殖研究所 病害防除部, 魚病診断・研修センター

## PCRによるメガイアワビの *Francisella* 属細菌の検出

### サンプル(鋳型 DNA)の調整

無脊椎動物からの核酸抽出(精製)は、多糖類の混入などが原因で、非常に困難ですが、この菌をメガイアワビから検出するのは比較的楽です。まず、メガイアワビの血リンパ液を TE buffer (DW でも良い)などで 50-100 倍に希釈します。100 倍に薄めた時は PCR のサイクル数を 40 サイクル以上にして下さい。この希釈血リンパ液をブロックインキュベーターもしくは熱水に浸け、約 99°C で約 10 分加熱します。この時の温度も時間もそれほど厳密なものではありません。次に、この希釈血リンパ液を、15,000rpm で 5 分間遠心します。回転数も時間も厳密ではありません。余計なものを遠心で落とすだけなので、とくにやらなくても大丈夫です。この希釈して加熱した血リンパ液の上清 1  $\mu$ l を鋳型として、PCR を行います。以上のように、鋳型 DNA の調整は大変に容易です。

平板上で分離された菌についても同様です。コロニーをピペットの先で突いて、付着した菌を 20  $\mu$ l ほどの TE buffer (DW でも良い) に懸濁させます。菌量は液が濁る程度あれば十分すぎるくらいです。上記と同様に、これを熱して遠心して、サンプル(鋳型 DNA)とします。

### PCR 反応液の組成

サンプル(鋳型 DNA)	1	
10×バッファー	1	
d NTP	0.4	
プライマー (100 $\mu$ M)	0.1, 0.1	
10% Tween20	1	
<i>Taq</i> ポリメラーゼ	0.05	(タカラ <i>Ex-Taq</i> hot start version)
DW	6.35	

-----  
10  $\mu$  l

一般的な組成とは少し異なりますが、最近はこの組成の溶液を用いて PCR を行っております。Tween20 を入れることにより、無脊椎動物から抽出した DNA の増幅が「いくぶん」改善されたような気がします。

サンプル(鋳型 DNA)	1	
<b>Ampdirect (5×)</b>	2	(島津 Ampdirect 粗精製 DNA 用)
d NTP	0.4	
プライマー (100 $\mu$ M)	0.1, 0.1	
10% Tween20	1	
<i>Taq</i> ポリメラーゼ	0.05	(タカラ <i>Ex-Taq</i> hot start version)
DW	5.35	

-----  
10  $\mu$  l

上記は、10×バッファーの代わりに、島津の Ampdirect (商品番号 241-08800-97、¥16,500) を用いた場合です。Ampdirect は、PCR を阻害する多糖類などの物質の影響を少なくするため、PCR

反応を大幅に改善します。Ampdirect は、5×バッファーとして用います。予算に余裕があれば、こちらの仕様をおすすめします。

PCR 反応の総量が 10  $\mu$ l なので、プライマーは 0.1  $\mu$ l、*Taq* は 0.05  $\mu$ l を採らないといけません。しかし、実際にピペットで採れる溶液量は、0.3  $\mu$ l くらいが限度となりますので、ピペットで採るのは不可能となります。そこで、サンプル(鋳型 DNA)以外を調合した溶液をまとめて作ります。10 本をまとめて作ると、プライマーは 1  $\mu$ l、*Taq* は 0.5  $\mu$ l となって、十分にピペッティングが可能となります。こうして作った PCR 反応液を 9  $\mu$ l ずつ PCR 反応チューブに分注し、使わなかった残りは冷凍して保存します。これらの反応液入りのチューブを冷凍庫から出してサンプルを 1  $\mu$ l 加えれば、すぐに PCR 反応を行うことが可能です。このように PCR 反応液を分注して冷凍保存することにより、試薬調整の時間が節約できるため、迅速な対応が可能となります。試薬調整にともなうコンタミネーションの危険性も下がります。

こちらでは、日常的に用いるプライマーセットごとに、PCR 反応液を分注して凍結しております。経験的に、1-2 年は凍結保存していても大丈夫ですが、陽性対照を入れて反応をさせて下さい。

なお、*Taq* は好熱性の真正細菌 *Thermus aquaticus* から抽出された DNA 合成酵素です。これ以外にも様々な好熱細菌から抽出された耐熱酵素が市販されています。低コストで優れた特性を持つものもあります。興味のある方は連絡して下さい。

#### PCR の条件

94°C 4分 (ホットスタートの *Taq* を用いる時)  
↓  
94°C 30秒 —┐  
60°C 30秒 —┘ 40-50 サイクル  
72°C 60秒 —┐  
↓  
72°C 7分

最初の 94°C を 4 分しておりますが、これはホットスタートの *Taq* を用いた場合に、*Taq* に結合している抗体を不活化するためです。通常の *Taq* なら 94°C 2 分で良いです。サイクル数が 30 ではなく、40-50 サイクルにしてあるのは、多糖類などの影響によって、増幅率が悪いためです。最後の 72°C 7 分は、あってもなくても構いません。おまじないみたいなものです。PCR 反応が終わった後に、4°C でインキュベートする必要はありません。

#### プライマーの配列

数字は 16S rRNA の大体の位置で、480r の r は逆方向を意味しています。増幅されるバンドの大きさは、423bp です。

Megai-60	CGGTAACAGGAGAAGCTTGCTTCT	(T <sub>m</sub> 57°C)
Megai-480r	TCTTTGGGTAACGTCCTTCTCATG	(T <sub>m</sub> 56°C)