

DNA チップによる病原体の検出方法

養殖研 病害防除部 釜石 隆

DNA チップとは、様々な既知配列の DNA を基板に貼り付け、標識した試料の DNA とハイブリダイゼーションを行い、基板上のどこが陽性となるかを調べるものである。病原体の検出の場合、様々な病原体に特異的な DNA 配列を基板に貼り付け、病魚組織や分離された病原体の核酸を標識してハイブリさせ、どこが陽性反応を示すかによって、病原体の推測ができる。特徴として、既知の病原体を網羅的に検索できるということがある。当然のことながら未知の病原体には基本的に対処できない。

これまでに3種類のチップを検討した。一つは細菌類の種を推定する「16S チップ」と、次にビブリオ類の種を推定する「ビブリオチップ」、最後にウイルス類の種を推定する「ウイルスチップ」の3種類である。

16S チップは真正細菌類に共通した領域に設定したプライマーによって、16S rRNA の部分領域を PCR で増幅および標識する。これを、様々な既知細菌類の特異配列を貼り付けたチップとハイブリさせ、どのスポットが陽性反応を示したかによって、試料の細菌種を推定する。

ビブリオチップも同様に、ビブリオ類に共通の領域にプライマーを設定し、PCR で増幅および標識する。これを、既知ビブリオ類の特異配列を貼り付けたチップとハイブリさせ、試料がどのビブリオ類の何の種かを推定する。

一方、ウイルスチップは上記の2つとは異なっている。というのも、各種魚病ウイルスに共通した核酸領域はないため、基本的に各々のウイルスに特異的なプライマーを用意し、それらをまとめて PCR で増幅と標識を行う（マルチプレックス PCR）。次に何が増幅されてきたかを調べるために、ウイルスチップとハイブリダイゼーションを行う。ウイルスチップには各種ウイルス特異的なオリゴ DNA が貼り付けてある。ただし、あまり多くのプライマーを混在させると、PCR が阻害されることがあるので、ここでは、淡水魚用のウイルスプライマーセット、海水魚用のウイルスプライマーセットにわけてある。ウイルスには RNA ウイルスと DNA ウイルスがあるので、RT-PCR を行い増幅と標識を行う。これを、種々のウイルスの特異配列を貼り付けたチップとハイブリさせて種の推定を行う。

DNA チップによる病原体の検出

1 チップの作製 スポット方法（随時変更あり）

オリゴ DNA (50mer) を発注し、 $100\mu\text{M}$ ($100\text{ pmol} / \mu\text{l}$, $1.5\text{ pg} / \mu\text{l}$) に調整する。この溶液を 1/250-1,000 に TE で希釈する。

↓

$0.5\mu\text{l}$ ずつナイロン膜（プラスチャージ膜）にスポットする。0.1% BPB (w/v DW) 溶液を少量加えておくと（青色が分かる程度）、スポットした場所が分かり易い。BPB 溶液はハイブリには影響しない。

↓

UV (254nm , $120\text{ mJ} / \text{cm}^2$) を照射する。プラスチャージのナイロン膜であっても、ベーキングよりも UV クロスリンクの方が感度が良くなった。

↓

ナイロン膜は室温で長期保存可能。

2 核酸抽出

● 魚の腎臓や脾臓などの組織からの DNA 抽出

キアゲン社などから市販されている DNA 抽出キットを用いる。たいていの場合は、市販のキットで抽出が可能である。ただし、植物や無脊椎動物のように多糖類（ねばねばした物質）が多く含まれたサンプルから DNA を抽出する場合は、普通の抽出キットでは対応しきれない場合が多いので、植物用のキットなどを試す。海産無脊椎動物は、それでも困難な場合が多い。

無脊椎動物から抽出された DNA は、1/10, 1/100 に希釈して PCR を行う。希釈することによって、PCR を阻害している物質も希釈されるので、PCR が上手く行くことがある。PCR のサイクル数は標準的な 30 サイクルではなく、40-50 サイクルとする。

● 分離されている菌からの DNA 抽出

平板上で分離されている菌を用いる場合は、非常に簡便な熱水抽出で良い。コロニーをピペットで突いて、100 μ l ほどの TE バッファーに懸濁させる。懸濁した菌が目視できる程度の量があれば十分である。100°C で約 10 分温めて菌体を壊す。遠心して、菌の残滓を落とし、上清 1 μ l を PCR の鋳型として用いる。（腎臓や脾臓などの魚体組織からの熱水抽出は、うまく行かないことが多いので、市販の DNA 抽出キットを用いる。）

● RNA の抽出

市販のキットを用いる。トリゾルやアイソジェン、マスターピュアなどの試薬を用いると、DNA も同時に採ることが出来る。トリゾルが安い。

3 PCR および標識 (随時変更あり)

細菌の検出 (16S チップ、ヒブリオチップ)

分離菌などから抽出した DNA、魚類などから抽出した DNA など、比較的増幅されやすい核酸を鋳型に用いる場合は、下記の 2 回目の PCR から始める。

ただし、無脊椎動物から抽出した DNA のように、増幅困難な DNA を用いる場合は、2 回の PCR を行うと良い場合がある。両方の PCR で用いるプライマーは、真正細菌ユニバーサルプライマーである。一回目では通常増幅を行い、二回目は、PCR 産物を 100 倍以上に希釈したものを鋳型とする。ここでは、DIG が入った基質を用いて PCR をして、増幅と同時に標識を行う。

PCR が終わったら、1/3 量くらいを泳動する。ここで細菌の増幅バンドが見られる。何もバンドがないようなら、ハイブリのステップには進まない。ウイルスの場合は見えないときもある。

nested PCR の 1 回目

DNA 溶液	1	
10×buffer	1	
dNTP (2.5mM)	0.4	終濃度 100 μM
primer (100 μM)	0.1, 0.1	終濃度 1 μM (10pmol/10 μl)
10% Tween20	1	
Taq (5u/μl)	0.05	
DW	6.35	

total 10.0

通常の PCR (nested PCR の 2 回目) . . . 増幅と標識を行う。

DNA 溶液	1	(1 st PCR 産物を 1/100 以下に希釈)
10×buffer	1	
DIG-dNTP (2mM)*	0.5	終濃度 100 μM
primer (100 μM)	0.1, 0.1	終濃度 1 μM (10pmol/10 μl)
10% Tween20	1	
Taq (5u/μl)	0.05	
DW	6.25	

total 10.0

* ロシュ(株) の PCR DIG ラベリングミックス (Cat. No. 1 585 550) を用いる。

無脊椎動物などのように PCR で増幅しにくい試料からの増幅を行う場合は、島津社の Ampdirect (241-08800-97 16,500 円) を用いると良い。Ampdirect は Taq バッファーの代わりに用い、PCR を阻害する物質の影響を少なくさせる試薬である。もし nested PCR をするのなら、1 回目の PCR 反応の時に入れる。2 回目の PCR では、希釈によって阻害物質の量が少なくなっているので、Ampdirect を入れる必要はない。

DNA チップ以外にも、余裕があるのなら、PCR には常に Ampdirect を用いることが望ましい。終濃度 1% の Tween20 も反応を改善する場合があるので、常に入れる。

サンプル(鋳型 DNA)	1	
Ampdirect (5×)	2	(島津 Ampdirect 粗精製 DNA 用)
DIG-dNTP (2mM)*	0.5	
プライマー (100 μM)	0.1, 0.1	
10% Tween20	1	
Taq ポリメラーゼ	0.05	(タカラ Ex-Taq hot start version)
DW	5.25	

10 μl

サイクルの条件は、以下を基本とする。

```

94°C  2分  (ホットスタート用の Taq を用いた場合は 4分)
  ↓
94°C  30秒  ┌
55°C  30秒  │ 30~50 サイクル
72°C  1分   └
  ↓
72°C  7分   最後に 4°C にする必要はない。
  
```

☆ 16S チップのプライマーセット

nested PCR の 1 回目

```

EubB (20F)  5' - agagtttgatcmtggctcag -3'
EubA        5' - aaggagtgatccanccrca -3'
(1500R     5' - ggttaccttgttacgactt -3')
  
```

通常の PCR (nested PCR の 2 回目)

```

EubB (20F)  5' - agagtttgatcmtggctcag -3'
E360r       5' - attcyybactgcwgccyyccgtag -3'
  
```

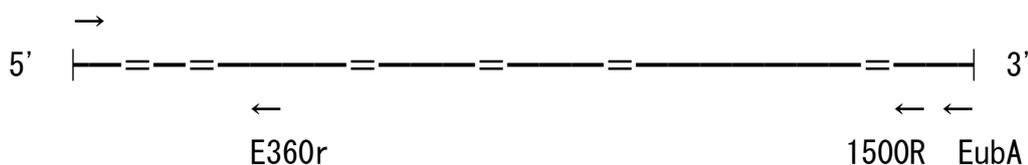
nested PCR をする際、1 回目の PCR では、EubB と EubA のプライマーを用いる。これで増幅されない時もあるので、その時は EubA を 1500R に変える。ただし、ほとんどの場合、ネステッド PCR は必要ない。

通常検出（もしくは nested PCR の 2 回目）では、EubB と E360r を用いる。20F は EubB と同じ配列なので、名前を統一しておいても良い。EubB と E360r の間にある 2 カ所の変異領域の違いをハイブリで検出する。

ここで用いるプライマーは全て真正細菌 16SrRNA ユニバーサルであることを目指している。というのも、これらのプライマーで増幅できない細菌は、検出系からもれてしまうからである。そのため、よりユニバーサルなプライマーがあれば、すぐに変更する予定である。

16S rRNA 領域（=は変異領域）

EubB (20F と同じ)



PCR を行った後、ハイブリダイゼーションを行う前に、アガロースゲル電気泳動して増幅産物の有無とサイズ（約 360bp 種によって異なる）を確認する。増幅産物が見られない場合は、鋳型 DNA を 1/10, 1/100, 1/1000 に希釈して PCR を行う。鋳型 DNA を希釈する理由は、PCR 反応を妨げている物質の濃度を薄くするためである。サイクルについては、30～50 の間で増減させる。

☆ ビブリオチップのプライマーセット

VITSF 5' - wrctctttaacaatttgga -3'
 VITSR 5' - cgstkagycacttaaccata -3'

ビブリオチップのプライマーは、F が ITS に、R が 23S の 5' 側に設定されている。基本的にビブリオしか増幅されないようになっている。



PCR 産物の大きさは、200-300bp であるが、シマアジ分離菌の増幅産物は 450bp となるなど、ビブリオの種によってかなり異なる。

PCR の試薬類は、鋳型 DNA 以外を混合し、PCR 用のチューブに分注して凍結しておく。必要に応じて解凍し、鋳型 DNA を入れて使用すると、PCR 溶液の調整に掛かる時間を節約できて便利である。

PCR 反応の総量が $10\mu\text{l}$ なので、プライマーは $0.1\mu\text{l}$ 、*Taq* は $0.05\mu\text{l}$ を採らない。しかし、実際にピペットで採れる溶液量は、 $0.3\mu\text{l}$ くらいが限度なので、ピペットで採るのは不可能である。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る。10 本をまとめて作ると、プライマーは $1\mu\text{l}$ 、*Taq* は $0.5\mu\text{l}$ となって、十分にピペッティングが可能となる。こうして作った PCR 反応液を $9\mu\text{l}$ 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する。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 $1\mu\text{l}$ 加えれば、すぐに PCR 反応を行うことが可能である。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る。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る。

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いる。経験的に、1-2 年は凍結保存していても大丈夫だが、陽性対照を入れて反応をさせる。

PCR チューブについては、自分の機械と「相性の良い」チューブを使用する。PCR チューブは、ブロックとの密着性が製品によって異なる。PCR の結果が機械によって左右される場合、機械の性能というよりもブロックとチューブの密着性の問題であることがほとんどである。密着性が悪い場合は、ブロックにミネラルオイルを滴下しておくが良い。

試薬や DNA 試料などが入ったマイクロチューブを開ける前には、必ず遠心機（ミリポア社チビタン、トミー社カプセルなど）でスピンドウンをする。チューブを手で振って液を落とすのは良くない。かえって溶液がフタに付くことになる。習慣的にスピンドウンを行うようにして、コンタミが起きる確率を少しでも減らすようにする。

ウイルスの検出（ウイルスチップ）

ウイルスチップは、各々のウイルスの特異プライマーを混合して増幅し、何が増幅されたかをハイブリダイゼーションで検出する。ウイルスは配列の特異性が高いため、細菌のような共通プライマーを用いた増幅ができないためである。

ただし、複数のプライマーセットを混合するとPCR (RT-PCR) の増幅効率が下がる。ここでは、便宜的に、淡水魚用 (FW16) と海水魚用 (SW18) の2つに分けてあり、目的に応じて使い分ける。プライマーは、100 μ M の原液を等量ずつ混ぜてあり、RT-PCRの際には、1 μ l 使用する。

核酸抽出は、RNA ウイルスと DNA ウイルスが存在するため、両方が一度に抽出できるものが望ましい。エアブラウン MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit もあるが、一般に RNA 抽出に用いるトリゾルなどでも両方が抽出できる。

海水魚用プライマーミックス SW18 (9ペア18コ)

RSIV _MCP	イリドウイルス	RSIV-1, RSIV-2, TRBIV, ISKNV を増幅
GIV _MCP	グルーパーイリドウイルス	
LCDV _MCP	リンホシスティスウイルス	LCDV-1, LCDV-2 を増幅
FHV	ヒラメ表皮増生症ウイルス	
HGRV _N	ホシガレイラブド	
HIRV _N	ヒラメラブド	
VNN _R2	VNNの7つの遺伝子型を増幅	
Birna_VP2	IPNV (2タイプ), YAV, VDV を増幅	
VHS _G	ウイルス性出血性敗血症	

淡水魚用プライマーミックス FW16 (8ペア16コ)

EHNV_MCP	流行性造血器壊死症ウイルス	
KHV_TK	コイヘルペス	
OMV_ORF61	サケ科魚類のヘルペスウイルス病	
IHNV_G	伝染性造血器壊死症	
SVC_G	コイの春ウイルス血症	
PFR_G	パイクフライラブド	
Birna_VP2	IPNV (2タイプ), YAV, VDV を増幅	
VHS_G	ウイルス性出血性敗血症	

RT-PCRの反応液組成例

OneStep RT-PCRキットを用いた場合

ちなみに、この反応条件では、キアゲン OneStep RT-PCRキット 25回分 (210210 ¥20,500-) の場合で、このプロトコールでは200回分使える。

Sample	0.5
5×buffer	2
DIG dNTP	1
primer	1
enzyme	0.25
DW	5.25

total	10 μl

上記の組成のうち酵素以外の全てを入れたら、98°C (沸騰水) 10分間加熱して、氷冷する。こうして2本鎖RNAウイルスのゲノムを1本鎖にする。この間、反応チューブから結構蒸発するので、適量のDWを足しておく。酵素を0.25 μl入れて、RT-PCR反応開始。

50°C 30 min (逆転写反応)
95°C 15 min (*Taq*の活性化)
↓
94°C 30 sec ┌
50°C 30 sec │ 50サイクル
72°C 1 min └
↓
72°C 7 min

PCRのあとに、アガロースゲル電気泳動で増幅産物を確認しようとしても、プライマーのダイマーなどの影響で、バンドが見えない場合がある。

4 ハイブリダイゼーション

ナイロン膜は素手では触ると非特異反応の原因となる。基本的にメンブレン用のピンセットを用いる。ナイロン膜の表裏と上下方向がわかるようにしておく。例えば、左上の一面を非対称に切り取ったり、鉛筆でサンプルの記載をしておく。鉛筆はBくらいの柔らかい芯が良い。油性のペンでは、ハイブリ液等に含まれる界面活性剤で文字が消えてしまう。

(プレハイブリダイゼーション)

*** このステップは省略可能であるので、次のハイブリから始める。**

ナイロン膜とハイブリ溶液を馴染ませるステップである。ナイロン膜をプラスチックバック（ハイブリバック）に入れ、ハイブリ溶液を入れてシールし、42°Cで5分以上プレハイブリダイゼーションをする。プレハイの時間は長くても問題ない。ハイブリ液はナイロン膜に十分に行き渡る位の液量を入れる。ナイロン膜の気泡を抜くようにしてハイブリ溶液をよく馴染ませる。

↓

(ハイブリダイゼーション)

標識 DNA 2 μ l/0.5-1ml ハイブリ溶液、の標識 DNA 濃度を目安に、ハイブリ溶液を用意する。この濃度から1桁ほど前後しても、判定可能な結果が得られる。ただし、発色の場合は若干感度が下がり、シグナルが薄くなることもあるため、標識 DNA 1 μ l/100 μ l ハイブリ溶液とするなどにして下さい。PCR の後の泳動でバンドが薄い場合は残りの反応液をすべてハイブリに用いる。ハイブリ溶液の量は、ナイロン膜に十分に液が行き渡り、ハイブリバック内で液が動くようであれば良い。ビブリオチップの場合で、600 μ l くらいである。98°Cで5-10分間、DNAを熱変成させ、氷に漬けて急冷する。この溶液をハイブリバックに入れてシールする。シールしたら、ナイロン膜の気泡を抜くようにして、ハイブリ溶液をナイロン膜によく馴染ませる。42°Cのインキュベータに入れて、適当な時間が経ったらハイブリ液を動かしてナイロン膜に馴染ませる。振盪機能のあるインキュベータが便利であるが、なくても良い。ハイブリの時間は、1-2時間あれば判定が可能となるが、一晩など、長い時間ハイブリダイゼーションをすると最大の効率を得られる。

熱シーラーでシールするとき、熱をかけ終わった後、2-3秒間、取手を押しつけたままにしてから、取手を離すときれいにシールできる。熱をかけ終わってすぐに取手を離すと、ビニールが溶けてシールが不完全になるときがある。

5 ナイロン膜の洗浄と免疫学的検出

ハイブリバックからナイロン膜を取り出す。ハイブリ液中の標識 DNA は、数回の再利用が可能なので、必要ならハイブリ液を回収して保存する（常温でも 1-2 年は大丈夫である）。

↓

2×SSC 0.1% SDS の洗浄溶液にナイロン膜を入れる。5分×2回
液はナイロン膜が動くだけの量があれば良い。容器はパラフィルムを折って作る。

↓

0.1×SSC 0.1% SDS 5分×2回

↓

buffer 1 0.3% (W/V) Tween20 添加洗浄液 2分

↓

buffer 2 20分 ブロッキング

ロッシュのバッファースセットに 10×Buffer2 があるので、1×Buffer1 で希釈する。

↓

アルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗 DIG 抗体 buffer 2 20分

1/5,000 に希釈する。ただし抗体はピペットで採る限界以下の容量となるときは、少々濃くても構わない。抗体溶液とナイロン膜を良くなじませるため強くこする。

↓

buffer 1 0.3% Tween20 5分×3回

ロッシュのバッファースセットに 10×溶液が入っているので DW で希釈して用いる。

↓

buffer 3 2分

↓

発色による検出では省略

ATTOGLOW などの発光基質液をナイロン膜に行き渡る量（約 $10\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ）サラップに滴下し、DNA が付いている面を下にして、発光液上にナイロン膜を載せる。ナイロン膜を上げ下げして発光液をナイロン膜全体に行き渡らせる。

↓
ナイロン膜を DNA が付いている面を上にしてポラロイドのホルダーに載せて、サラップでくるむ。CCD カメラでも同様。

↓
最初は 20 分ほど露光する。CCD カメラの場合は自動露光。

↓
様子を見て露光時間を調整する。シグナルは数時間、発光する。

↓

さらに、シグナルを発色させることもできる。

↓

ロッシュの発色試薬 (NBT/BCIP ストック溶液) を $20\mu\text{l}/\text{ml}$ buffer3 に調整し、ナイロン膜とハイブリバックの中に入れ、暗所に静置する。

↓

30 分ほどしたら様子を見て、シグナルの濃さが十分になるまで放置する。長くてオーバーナイトくらいであるが、それ以上長く置いても、バックグラウンドが上がるだけのことが多い。



TE バッファーで洗浄し、乾燥させる。乾燥したナイロン膜はハイブリバックなどに保存する。

- * 洗いのステップの時間は厳密ではない。
- * シグナルが出ていないナイロン膜は TE 溶液に保存して冷蔵しておけば、次回の検出にも使用できる。標識 DNA（ハイブリ液）は、数回の再利用可能である。
- * CDP-star が代表的であるが、ATTOGLOW（フナコシ）の方が、露光時間が短くて光りも強いので、ATTOGLOW を使用する。
- * 現在、ポラロイドフィルムの入手が困難であるが、再発売されるらしい。発光による検出の方が、早く検出できる場合が多い。保存状態によっては、ポラロイドフィルムは年月が経つと退色する場合がありますので、スキャナーなどでパソコンに取り込んでおくと良い。
- * シグナルが染色されたナイロン膜は、放置しておくともバックグラウンドが上がって、全体が青っぽくなり、シグナルが目立たなくなる。染色してシグナルが出たら、その日のうちに、スキャナーでパソコンに取り込んだ方が良い。

● 試薬

DNA 抽出キット 市販品の例

キアゲン DNeasy tissue kit (Cat. No. 69504)

RNA と DNA 抽出キット 市販品の例

エアブラウン MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (10 回)
Cat No. 89010 ¥8,000-

インビトロジェン トリゾル 100ml ¥21,600- Cat. No. 15596026

PCR 用試薬

Taq ポリメラーゼ, Taq 用 10×buffer, dNTP

dNTP (DIG 標識用 ロッシュ ¥45,400- Cat. No. 1585550)

各種プライマー

Ampdirect (島津 ¥16,500 商品番号 241-08800-97)

アガロースゲル泳動用試薬

アガロース (ゲル強度の強いものが扱いやすい)

10×TBE 溶液 Tris 108g, ホウ酸 55g, EDTA-2Na 9.3g を 1 リットルの DW に溶解。

臭化エチジウム溶液 (0.5mg/ml ストック溶液) このストック溶液を 20 μ l/100ml となるようにアガロースゲルに溶かして使用する。

AP 標識 抗 DIG 抗体 ロッシュ ¥18,800- (Cat. No. 1093274)

発色試薬 ロッシュ NBT/BCIP ストック溶液 8ml ¥13,200- (Cat. No. 1681450)

化学発光用の試薬 (化学発光が撮影できるカメラがあれば購入する)

フナコシ ATTOGLOW-450 50ml ¥15,000- (商品コード SAP450101E)

(アマシャム CDP-star Cat. No. RPN3682 でも代用可能。)

ハイブリ用試薬 (ロッシュのバッファーセットを購入すると良い)

ハイブリ溶液 (20% ホルムアミド)

5×SSC (20×SSC を 1/4 容量), 0.02% (w/v) SDS,

1% (w/v) ブロッキング剤 (or ロッシュ 10×Buffer 2 を 1/10 容量),

0.1% (w/v) N-Lauroylsarcosine (ナカライ 20116-22 25g ¥1,500-),

ホルムアミド以外を溶かした溶液 (1.25×) をオートクレーブし、冷ます。

20% (v/v) となるように、ホルムアミド (ナカライ 02020-64 100ml ¥3,000-) と混合して、4°C で保存する。

Buffer 1 0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl (pH7.5, 20°C)

ただしマレイン酸バッファーを作製する時は大量の NaOH を必要とする。

10×buffer1 を1リットル作る時 (マレイン酸 116.07g, NaCl 87.66g) に、pH調整には約83gのNaOHが必要で面倒である。
Buffer 1 は、0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl (pH7.5, 20°C) でも良い。これは作るのが簡単である。

Buffer 2 1% (W/V) となるようにブロッキング剤を buffer 1 に溶かしたもの。
1×Buffer2 は分注して冷蔵、長期保存用なら冷凍しておく。

Buffer 3 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl (pH 9.5, 20°C)
MgCl₂ を入れるプロトコールがあるが、入れなくても問題はない。
Buffer3 の組成は単純なので簡単に調整できる。

上記の Buffer 1, 2, 3 はロッシュのバッファーセットを購入すると良い。

DIG 洗浄およびブロックバッファーセット ロッシュ ¥27,800- (Cat. No. 1585762)

ハイブリ液のブロッキング剤も、バッファーセットの 10×buffer2 を用いる。ブロッキング剤粉末 (ロッシュ 50g ¥11,700- Cat. No. 1096176) は溶け難く、10×Buffer2 を作るのは大変なので、バッファーセットは便利である。

1×Buffer1 はバッファーセットの 10×Buffer1 を DW で 10 倍に希釈してオートクレーブする。1×Buffer2 は、バッファーセットの 10×Buffer2 を 1×Buffer1 で 10 倍に希釈してオートクレーブする。1×Buffer3 は、バッファーセットの 10×Buffer3 を DW で希釈してオートクレーブする。

他の試薬は自分で調合し、オートクレーブする。

20×SSC 3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム (pH 7.0, 20°C 塩酸で調整)

10% SDS w/v SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

TE 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0, 20°C)

2×SSC 0.1% SDS

0.1×SSC 0.1% SDS

● 機材

機材は基本的に他の用途にも使用できるような汎用性の高いものを選んでください。

- ・ピペットマン
- ・電気泳動槽（ミューピッド, コスモバイオ i-MyRun）
- ・サーマルサイクラー (PCR)
- ・ヒートシーラー（ハイブリバックのシールに用いる）
- ・インキュベーター（42°Cが維持できるものなら何でも良い）
- ・シェイカー
- ・ポラロイドカメラ（アマシャム ECL ミニカメラ Cat. No. RPN2069 など）
→ ポラロイドフィルムの生産終了により製造中止。残念！
- ・ブロックインキュベータ（アステック社製など）
- ・高速遠心機（核酸抽出用）
- ・卓上小型遠心機
（マイクロチューブのスピンダウン用 日本ジェネティクス NS-060 が一番安い）

● 消耗品

- ・チップ, チューブ
- ・チューブラック（1.5ml, 0.5ml・・・バイオビック TS-36）
（0.2ml・・・日本ジェネティクス 21521）
（0.2ml・・・ABI MicroAmp Base N801-0531 9,300円/10個 おすすめ）
- ・アイスラック（1.5ml, 0.5ml・・・イウチ IR-1）
（0.2ml・・・イウチ IR-2）
- ・ハイブリダイゼーションバッグ（コスモバイオの製品がベスト！ Cat. No. S-1021）
- ・ポラロイドフィルム（3200B）

* 実験の待ち時間には、いろいろなカタログを見て、良さそうな製品を物色することを普段から心懸ける(^_^)。

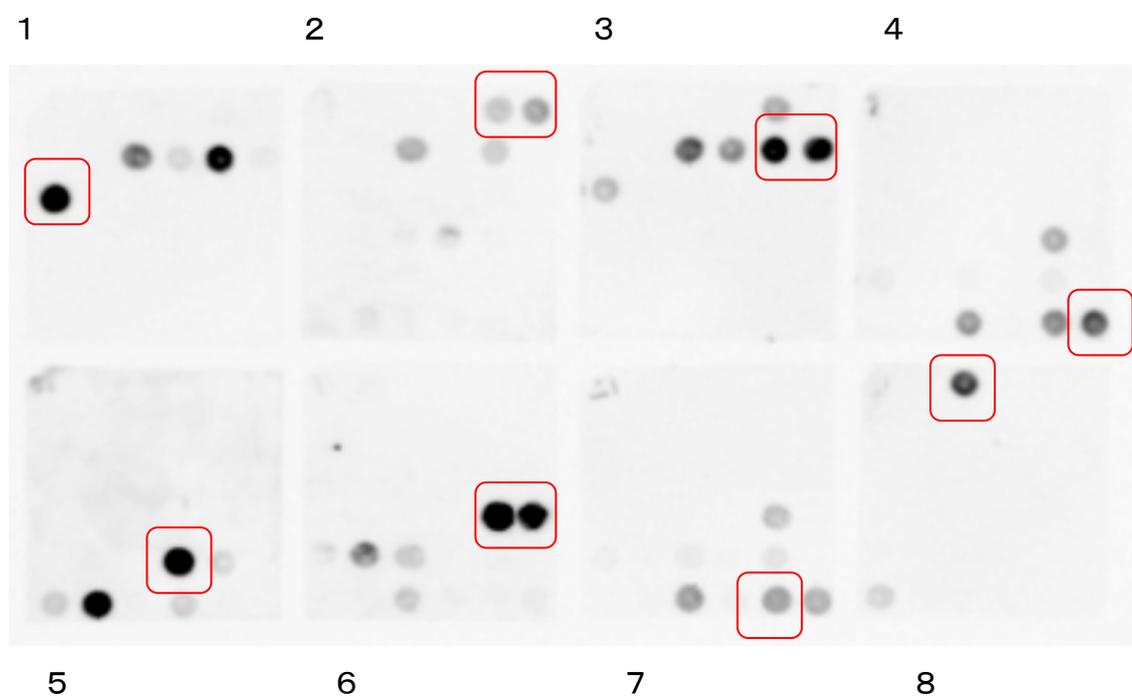
16S チップ (070703)

- 1 イサキからの分離菌 *Francisella* sp. 260r
- 2 メガイアワビ分離菌 *Francisella* sp. 230r (各種アワビから分離)
- 3 ピシリケッチア *Piscirickettsia salmonis* EM90 250r
- 4 細菌性腎臓病(BKD) *Renibacterium salmoninarum* 240r
- 5 *Streptococcus dysgalactiae* 110r
- 6 *Streptococcus dysgalactiae* 240r
- 7 *Lactococcus garvieae* 110r
- 8 *Lactococcus garvieae* 240r
- 9 *Streptococcus iniae* 110r
- 10 *Streptococcus iniae* 240r
- 11 *Streptococcus parauberis* 110r
- 12 *Streptococcus parauberis* 240r
- 13 *Streptococcus agalactiae* 250r
- 14 カラムナリス病 *Flavobacterium columnare* 1 250r
- 15 カラムナリス病 *Flavobacterium columnare* 2 250r
- 16 カラムナリス病 *Flavobacterium columnare* 3 250r
- 17 冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* 250r
- 18 細菌性鰓病(BGD) *Flavobacterium branchiophilum* 250r
- 19 細菌性溶血性黄疸の原因細菌 250r
- 20 滑走細菌 *Tenacibaculum maritimum* 250r
(ブリの血管内にいる菌も同様の配列である。)
- 21 *Mycobacterium marinum* (sp.) 250r
- 22 ノカルジア症原因菌 *Nocardia seriolae* 250r
- 23 *Vibrio anguillarum* 110r
- 24 *Vibrio anguillarum* 250r
- 25 類結菌 *Photobacterium damsela* 110r
- 26 類結菌 *Photobacterium damsela* 250r
- 27 日裁協シマアジ(2003.12) *Vibrio* sp. 110r
- 28 *Pseudomonas anguilliseptica* 250r
- 29 *Pseudomonas plecoglossicida* 250r
- 30 米国のアワビ筋萎縮症原因菌 CXC 250r
- 31 *Edwardsiella tarda* -E22 110r
- 32 *Edwardsiella tarda* -E22 250r
- 33 レッドマウス病(ERM) *Yersinia ruckeri* 110r
- 34 レッドマウス病(ERM) *Yersinia ruckeri* 250r
- 35 *Aeromonas hydrophila* 250r
- 36 *Aeromonas salmonicida* 250r

* は明確な病原性が確認されていない菌の配列。

スポットは36種類。1は赤色のオレンジGを混合 (BPBと混じって緑色になってしまった)。他はBPBの青色に着色。ほぼ正方形なので、向きがわかるように鉛筆(Bくらいの柔らかさが良い)で試料名などを書き込む。

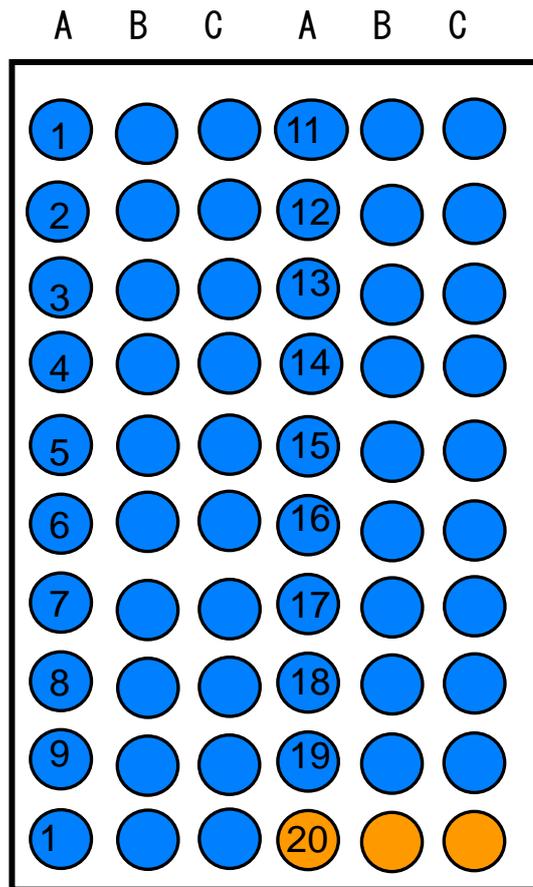
1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36



- 1 *Streptococcus agalactiae*
- 2 *Streptococcus dysgalactiae*
- 3 *Streptococcus parauberis*
- 4 *Aeromonas salmonicida*
- 5 *Pseudomonas anguilliseptica*
- 6 *Vibrio anguillarum*
- 7 *Aeromonas hydrophila*
- 8 *Piscirickettsia salmonis*

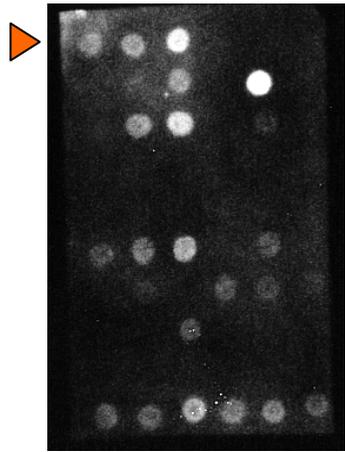
ビブリオチップ (070702)

- 1 *V. alginolyticus*
- 2 *V. anguillarum*
- 3 *V. carcariae*
- 4 *V. cholerae*
- 5 *V. fluvialis*
- 6 *V. harveyi*
- 7 *V. ichthyoenteri*
- 8 *V. nigripulchritudo*
- 9 *V. ordalii*
- 10 *V. parahaemolyticus*
- 11 *V. pelagius*
- 12 *V. penaeicida*
- 13 *V. salmonicida*
- 14 *V. splendidus*
- 15 *V. tapetis*
- 16 *V. tubiashii*
- 17 *V. vulnificus*
- 18 *P. damsela*
- 19 シマアジ由来菌
- 20 ポジティブコントロール

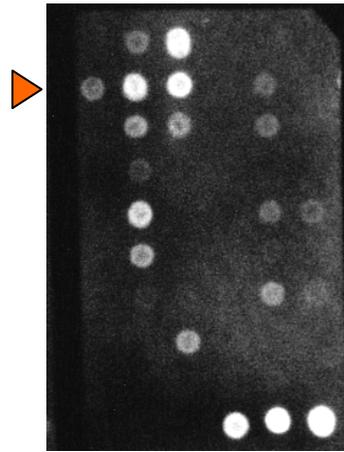


1種類のビブリオにつき、A, B, Cの3カ所の特異領域を選択し、オリゴDNAプローブを作製した。右下3つのポジコンはオレンジ色、他は青色のスポットである。

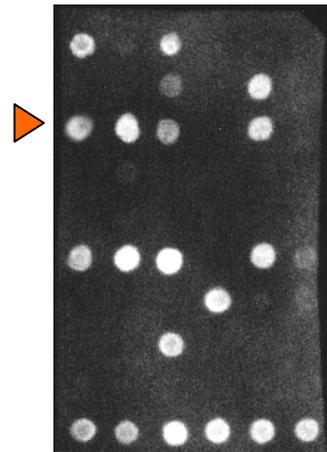
タイプストレインによるハイブリ結果-1



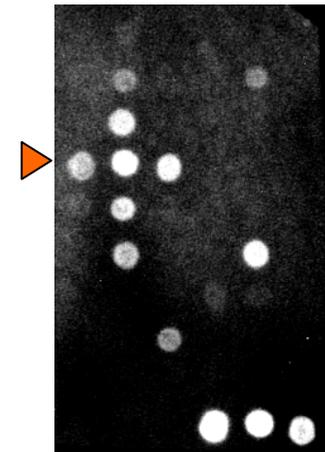
V. alginolyticus



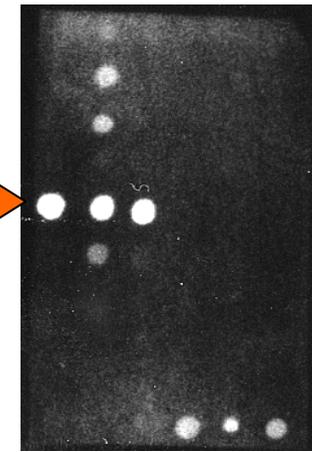
V. anguillarum



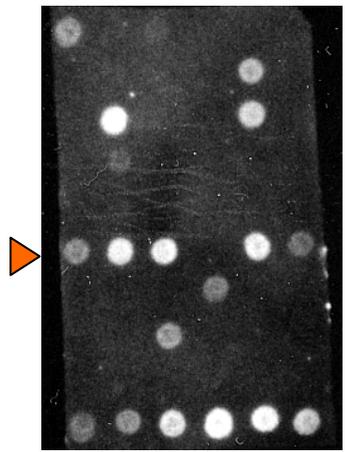
V. carcariae



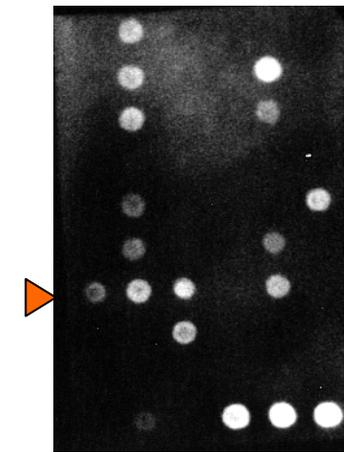
V. cholerae



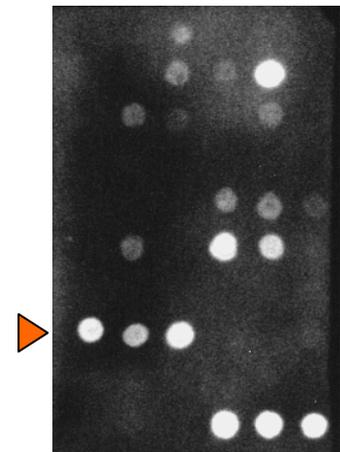
V. fluvialis



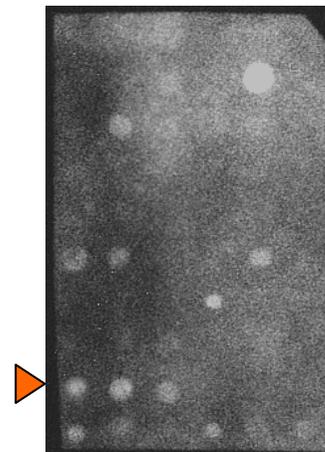
V. harveyi



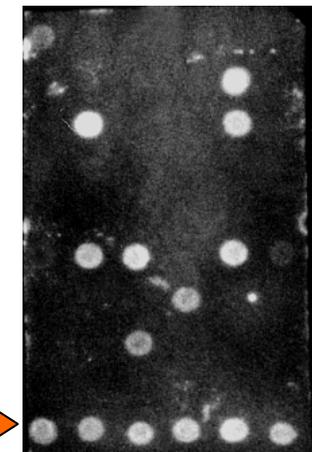
V. ichthyenteri



V. nigripulchritudo

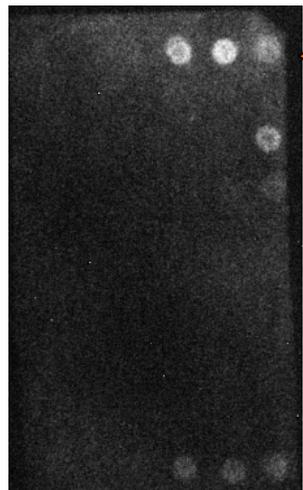


V. ordalii

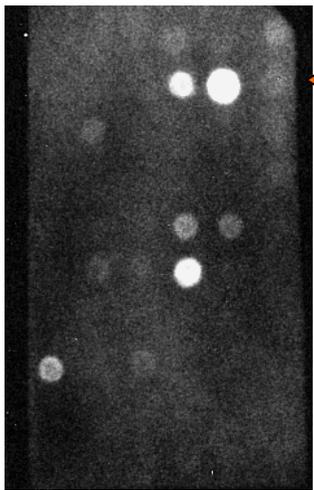


V. parahaemolyticus

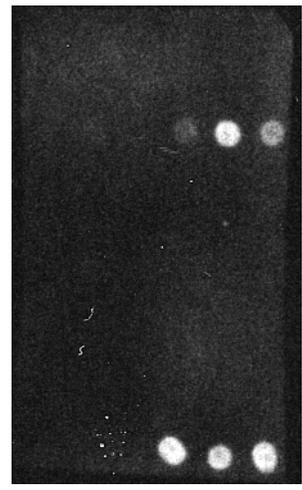
タイプストレインによるハイブリ結果-2



V. pelagius



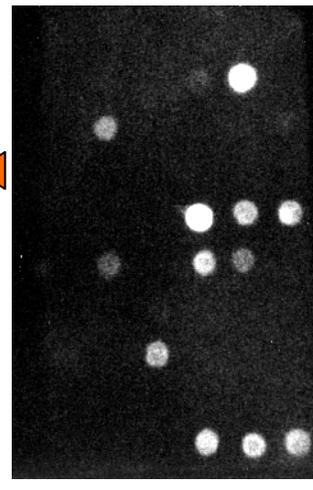
V. penaecida



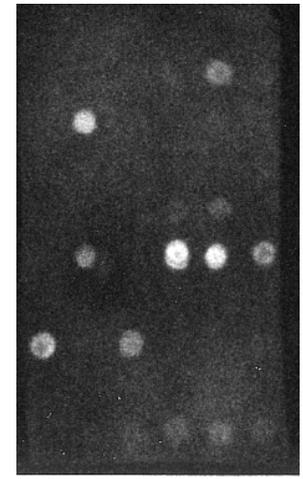
V. salmonicida



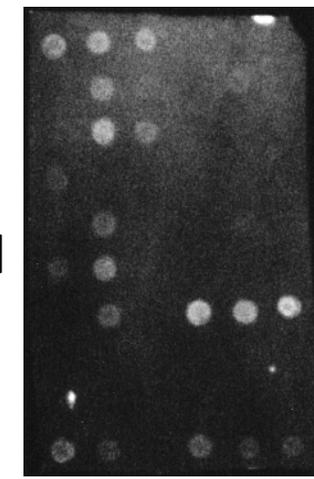
V. splendidus



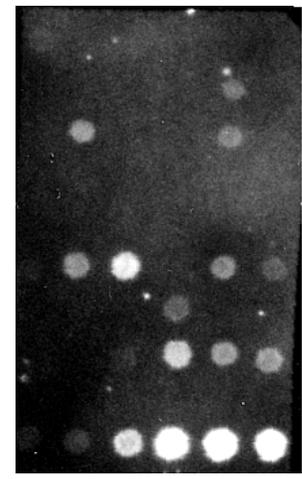
V. tapetis



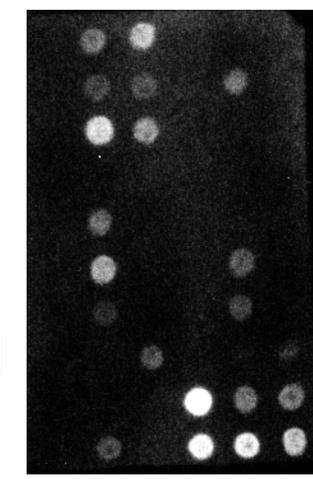
V. tubiashi



V. vulnificus



P. damsela



シマアジ菌

ウイルスチップ (061124)

1 IHN G-689r	2 IHN G-917r	3 IHN G-971r	4 KHV TK 600r	5 KHV TK 660r	6 KHV TK 720r	7 OMV 61 660r	8 OMV 61 780r	9 OMV 61 840r
10 EHN MCP 1200r	11 EHN MCP 1260r	12 EHN MCP 1320r	13 SVCV (アジア) G1-962r	14 SVCV (アジア) G1-1200r	15 SVCV (共通) G-1079r	16 SVCV (欧州) G23-962r	17 SVCV (欧州) G23-1200r	18
19 PFRV (一般) G1-186r	20 PFRV (一般) G1-366r	21 PFRV (一般) G1-483r	22 PFRV (F4) G2-186r	23 PFRV (F4) G2-366r	24 PFRV (F4) G2-483r	25 PFRV (V76) G3-186r	26 PFRV (V76) G3-366r	27 PFRV (V76) G3-483r
28 IPNV-Sp N1 VP2 956r	29 IPNV-Sp N1 VP2 1060r	30 IPNV-Sp N1 VP2 1119r	31 IPNV-Ja DRT VP2 956r	32 IPNV-Ja DRT VP2 1060r	33 IPNV-Ja DRT VP2 1119r	34 YAV-VDV VP2 956r	35 YAV-VDV VP2 1060r	36 YAV-VDV VP2 1119r
37 VHSV (I) G1-477r	38 VHSV (I) G1-539r	39 VHSV (I) G1-623r	40 VHSV (II) G4-477r	41 VHSV (II) G4-539r	42 VHSV (II) G4-623r	43 VHSV (III) G2-477r	44 VHSV (III) G2-539r	45 VHSV (III) G2-623r
46 VHSV (IV) G3-477r	47 VHSV (IV) G3-539r	48 VHSV (IV) G3-623r	49 HIRV N 1000r	50 HIRV N 1050r	51 HIRV N 1100r	52	53	54
55 LCDV 1 MCP 700r	56 LCDV 1 MCP 950r	57 LCDV 1 MCP 1000r	58 LCDV 2 MCP 700r	59 LCDV 2 MCP 950r	60 LCDV 2 MCP 1000r	61 GIV MCP 1180r	62 GIV MCP 1230r	63 GIV MCP 1310r
64 RSIV 1 MCP 730r	65 RSIV 1 MCP 800r	66 RSIV 1 MCP 850r	67 RSIV 2 MCP 730r	68 RSIV 2 MCP 800r	69 RSIV 2 MCP 850r	70 TRBIV MCP 730r	71 TRBIV MCP 800r	72 TRBIV MCP 850r
73 ISKNV MCP 730r	74 ISKNV MCP 800r	75 ISKNV MCP 850r	76 HGRV N 1050r	77 HGRV N 1150r	78 HGRV N 1250r	79 FHV 80r	80 FHV 150r	81 FHV 230r
82 VNN C1 R2 476r	83 VNN C1 R2 586r	84 VNN C21 R2 476r	85 VNN C21 R2 586r	86 VNN C22 R2 476r	87 VNN C22 R2 586r	88 VNN C23 R2 476r	89 VNN C23 R2 586r	90
91 VNN C2T R2 476r	92 VNN C2T R2 586r	93 VNN C2H R2 476r	94 VNN C2H R2 586r	95 VNN C3 R2 514r	96 VNN C3 R2 586r	97	98 λ 110r	99 λ 230r

No. 1 と No. 91 はオレンジ色のスポット。あとは青色。

