

アワビ稚貝のキセノハリオチス症原因菌の PCR による検出法
(第 2.03 版、平成 23 年 4 月 7 日作成、平成 24 年 3 月 16 日改訂)

1. サンプリング

健康診断を目的とした検査では、検査対象群毎に、無作為に抽出した 150 個体をサンプリングする。150 個体とは理論的に感染率 2% の無限個数の母集団からランダムに採取すると、その中に感染個体が含まれる確率が 95% となるために必要な検体数である。なお、本マニュアルでは 5 個体プールを基準として説明している。

2. 解剖と組織の採材

本菌は消化管の上皮細胞が感染部位であり、他の組織は検体に向かない。アワビの消化管は長くて、巻いているので、内臓のどの部分にでも含まれることが多いが、本菌は特に食道の後部が主要な感染部位とされているので、その部分が含まれる様に採材する。以下に稚貝（放流サイズ）からの組織の採材法を示す。標的器官である食道後部だけを稚貝から採取するのは困難なので、標的器官を含めた内臓組織を採取する（大型の貝の場合は標的器官だけを採取）。なお掲載した写真はわかりやすいように、比較的大きめの貝を用いて示している。

1) ヘラ等を用いて、体幹部を殻から外す。口吻部を上にして貝を軟体部側から見た時に内臓部分は向かって右側に位置するので、ヘラはその反対の左側から挿入する（写真 1）。

2) 食道後部は中腸腺と心臓の間に埋まっているので、この部分を含むように、写真 2 の丸で囲まれた部分の内臓すべて（筋肉以外）を採取する。採取量は DNA 抽出キットの指示書に従い、220 mg 以下とする。従って、5 個体をプールする際には、1 個体から約 40mg を採取するか、5 個体分の組織をホモジネートした後に、その 200 mg 程度を抽出に用いる。中腸腺は PCR を阻害するので、中腸腺の採取割合を全体の半分以下とする。使用するキット（下記）では、採取する臓器の重さは 180 - 220 mg に最適化されているが、それ以下の場合も、同じ方法で抽出して問題はない。

3. DNA の抽出

キアゲン社 QIAamp DNA Stool Mini Kit (50)(糞便用、Cat.No. 51504、50 検体分、30,000 円)を用いる。キットの指示書に従い、採取した組織から DNA を抽出し、100 μ L の elution buffer（キットに付属）に溶出する。なお、70°C で組織を溶解する時間は 10 分とする。

4. PCR

1) PCR 反応液の作製：

表に従い反応液を作製する。5 個体をプールして抽出を行った場合でも通常の反応系で検出できる。用意する PCR チューブは検体数+2（陽性対照*および陰性対照）とする。

*陽性対照は養殖研究所 魚病診断・研修センターより配布するので、配布希望する機関は当センター宛てに PCR 陽性対照分譲依頼書を送付すること。

2) プライマー配列 :

RA 5-1 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3'

RA 3-6 5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'

3) PCR 反応プログラム :

95°C, 5 min → 40 サイクル(95°C, 1 min → 62°C, 30 sec → 72°C, 30 sec)
→ 72°C, 10 min

5. 電気泳動および判定 :

エチジウムブロマイド (0.5µg/ml) を含む 2 %アガロースに分子量マーカーおよび PCR 増幅産物を入れ、100 V で 20 分間、電気泳動する。分子量 158 bp の位置に増幅バンドが観察された場合に陽性と判定する。

6. 陽性検体の養殖研究所への送付 :

陽性判定となった個体又はプール群について、その抽出液および PCR 増幅産物を養殖研究所 魚病診断・研修センター宛てに送付する。

7. 備考

なお、本マニュアルは OIE マニュアルに準拠した方法である。今後各メーカーのキットの検出感度について検証し、使用可能であれば追加する場合もある。

問い合わせ先 :

独立行政法人 水産総合研究センター 養殖研究所 魚病診断・研修センター
センター長 大迫 典久

電話番号 : 0599-66-1830

FAX : 0599-66-1962

e-mail : ohseko@fra.affrc.go.jp



写真1. ヘラを挿入する位置を示した写真。写真上方が口吻部。

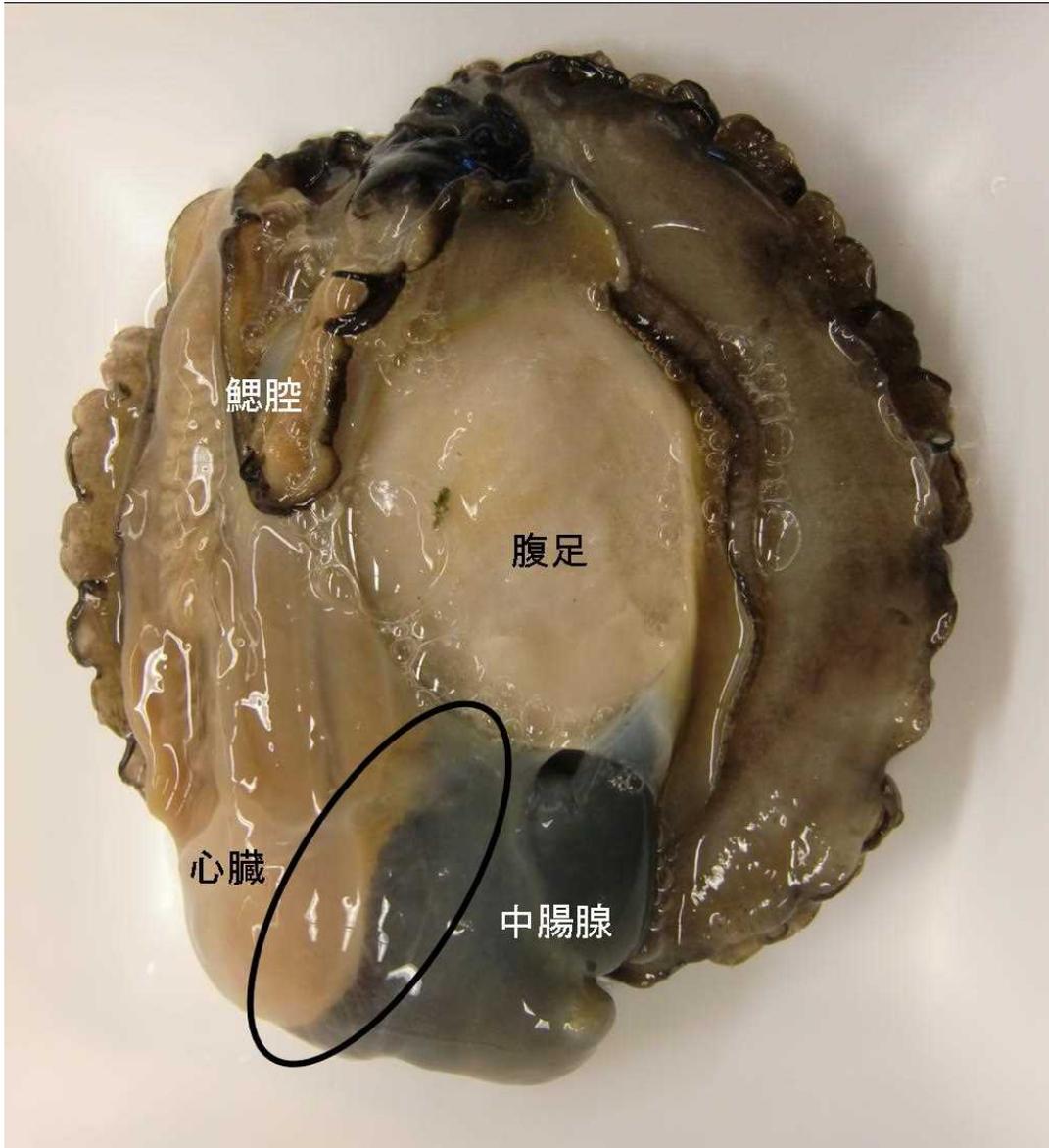


写真 2. 殻側からみた内臓諸器官。丸で囲んだ部分が採材部位。

表. PCR 反応液組成

OIE マニュアル準拠手法 (単位は μL)

	1 検体当たりの組成 (μL)
H ₂ O	9.28
Go Taq Flexi Buffer 5x	4
MgCl ₂ (25 mM)	1.2
dNTP's(10 mM each)	0.4
BSA (10 mg/mL)	0.8
RA3-6 (10 μM)	1
RA5-1 (10 μM)	1
Go Taq Flexi Taq	0.32
Template	2*

*テンプレートの最適な DNA 量は、200 ng/20 μL である。

各組成の製品名、メーカー、カタログ番号および価格

- Taq および MgCl₂ : Go Taq Flexi DNA Polymerase 100 U (5 U/ μL)(25 mM MgCl₂ 入)、Promega、Cat.No. M8291、7,000 円 (Buffer はキット添付のものを使用)
<注意> 1 ロット検査 (30 サンプル) には 2 セット購入する必要があります。
- dNTP's : dNTP Mix (10 mM each) 200 μL 、Promega、Cat.No. U1511、4,000 円
- BSA: BSA(20 mg/mL) 1 mL、Takara、Cat.No. 2320、15,000 円

(備考)

Promega 社の Go Taq と Go Taq Flexi の Taq ポリメラーゼは全く同じもので、違いは Go Taq に添付のリアクション Buffer には MgCl が添加済みな点です。従って Go Taq のセットを使用すれば MgCl の添加は不要となります。

	1 検体当たりの組成 (μL)
H ₂ O	10.48
Go Taq Buffer 5x	4
dNTP's(10 mM each)	0.4
BSA (10 mg/mL)	0.8
RA3-6 (10 μM)	1
RA5-1 (10 μM)	1
Go Taq Taq	0.32
Template	2*

*テンプレートの最適な DNA 量は、200 ng/20 μL である。

各組成の製品名、メーカー、カタログ番号および価格

- Taq : Go Taq DNA Polymerase 100 U (5 U/ μL)、Promega、Cat.No. M3001、7,000 円 (Buffer はキットに添付のものを使用)

・ dNTP's と BSA は上記と同じ。

<参考> OIE マニュアルに記された組成とは異なるが、試薬類の購入等利便性を考慮して増養殖研が追加した手法(ただし糞便検査については注意が必要#備考参照)。

増養殖研究所による追加手法 (単位は μL)

	1 検体当たりの組成 (μL)
H ₂ O	12.3
10x EX Taq Buffer	2
dNTP's(2.5mM) mix**	1.6
RA3-6 (10 μM)	1
RA5-1 (10 μM)	1
Takara EX Taq	0.1
Template	2*

*テンプレートの最適な DNA 量は、200 ng/20 μL である。

** 新製品の Ampdirect® Plus をバッファーに使用した場合は加えない。

各組成の製品名、メーカー

・ Taq : Ex Taq Hot Start Version、Takara、CodeRR006A 30,000 円
(Buffer、dNTP's はキットに添付のもの使用)

#備考:

「糞便検査」では プロメガの Taq を用いるか、または Takara の EX Taq を使用する場合は、PCR ミックス液に添付されているバッファーの代わりに Ampdirect (シマズ) を用いてください。(Ampdirect は PCR 阻害効果を抑制する働きがあります。)

*なお、Ampdirect はバッファー濃度が Takara と異なります。使用時には使用書をよく読んでからお使いください。また新製品 Ampdirect® Plus では dNTP mix がすでに含まれているので dNTP mix を加えないでください。

・ Ampdirect® Plus Shimazu, 型番号 241-08800-98
20 μ の系で 500 回分 定価 25,000 円