

## 筋萎縮症の原因と推定されたウイルスの PCR による検出方法

筋萎縮症の病原体は未特定だが、近年の我々の解析で病原体由来と推定される遺伝子配列が取得されている (Accession No: LC506465)。病原体と推定されたウイルスの major capsid protein (BB054023. 1) と、TOPO isomerase (BB054088. 1) 遺伝子を対象に PCR 検出系を、major capsid protein 遺伝子を対象とした定量 PCR を構築した。

陽性対象配布の希望は増養殖研究所までご連絡ください。

### <方法>

#### 1. DNA の抽出

腹足筋や鰓から組織片(20-100mg 程度)を採取。

あるいは、体表粘液を綿棒で拭い取って採取。

QIAamp DNA mini kit (Qiagen)等を用いて DNA を抽出。

綿棒の場合は、綿棒先端部を切り離し、溶解液に入れて溶解する。綿棒は溶解ステップが終了した段階で取り出した。

100  $\mu$  L の DW で DNA を溶出した。

(DNA 抽出方法は任意の手法で可)

DNA 抽出液の原液、あるいは DW で 10~100 倍希釈し、1  $\mu$  L を 19  $\mu$  L の PCR mix に加えて PCR を行った。(最適な希釈率については未検討です)

#### 2. PCR

プライマーセット (2 種類の PCR を実施)

p72-F,R: major capsid protein の全長を増幅する(増幅サイズ: 1944bp)

TOPO-F,R: TOPOisomerase の内側に設計(増幅サイズ: 1207bp)

p72-F	ATGGCGGCAGGAGGACCCTTCATTTTGATAACAAAC
p72-R	TTATGCAGCATATCGCAAGATAGCTGATCCGTCGGTG

TOPOiso-F	GACTGTGTAAAAGGAGGCACTAATGGGATC
TOPOiso-R	ATTTTACCACACCCATCAAGATCTTGATCAACAC

KOD Fx (TOYOBO)を用いて以下のサイクルで PCR を行い、GelGreen(染色試薬, Wako)を含む 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動した。(泳動方法等は任意の手法で可)

98°C 30s

98°C 10s

65°C 30s

68°C 90s

×35 cycle

68°C 5min

### 3. シーケンス

プライマー-p72-FR による産物をゲルから抽出し、同プライマーを用いてダイレクトシーケンスし、筋萎縮症の原因と推定したウイルス遺伝子と比較した。

### 4. 定量 PCR

KOD sybr qPCR Mix を用いて組織中のウイルス遺伝子量を定量

プライマーセット : major capsid protein の一部領域を増幅

Q-ASFV-like-F4	cccggagcgcacctacagaa
Q-ASFV-like-R4	gcattccgacagcatcacag

反応液はキットのマニュアルの通り調整するが、プライマーのみ最終濃度  $0.5 \mu\text{M}$  に調整 (マニュアルでは  $0.2 \mu\text{M}$ )

DNA 抽出液原液、あるいは DW で 100 倍希釈した  $1 \mu\text{L}$  を  $19 \mu\text{L}$  の定量 PCR mix に加えて定量 PCR (Mx3000, Stratagene) を行った。

98°C 2分

98°C 10s

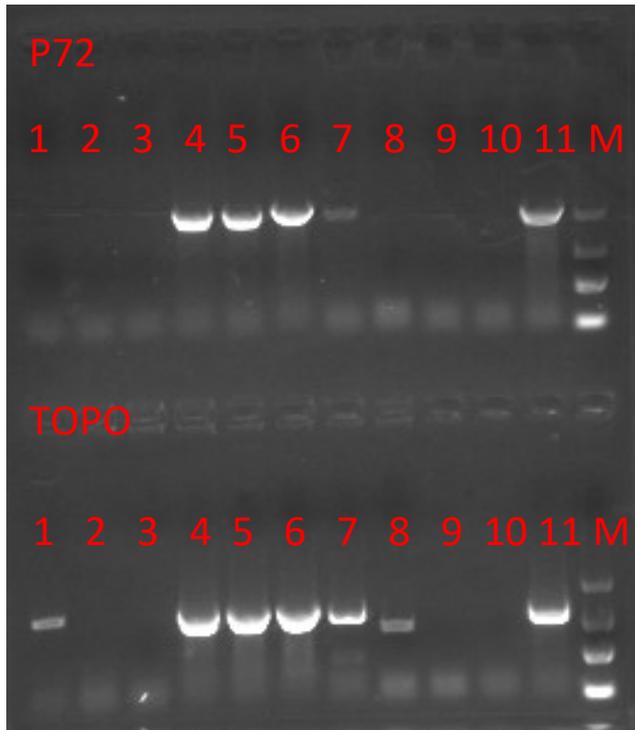
60°C 10s

68°C 30s

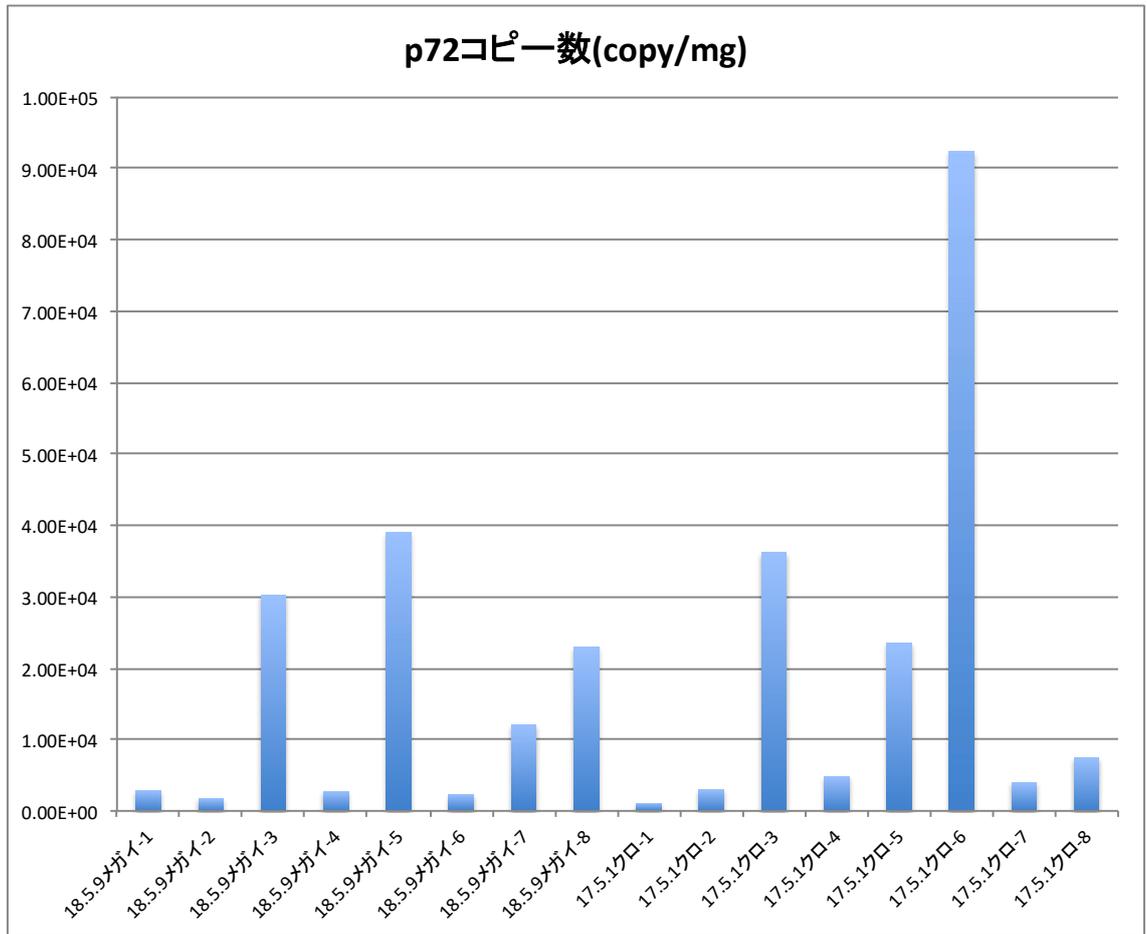
×30

<結果の例>

1. PCR



1~9:病員  
10:健常クロアワビ  
11:陽性対象(病員DNA)  
M:マーカー



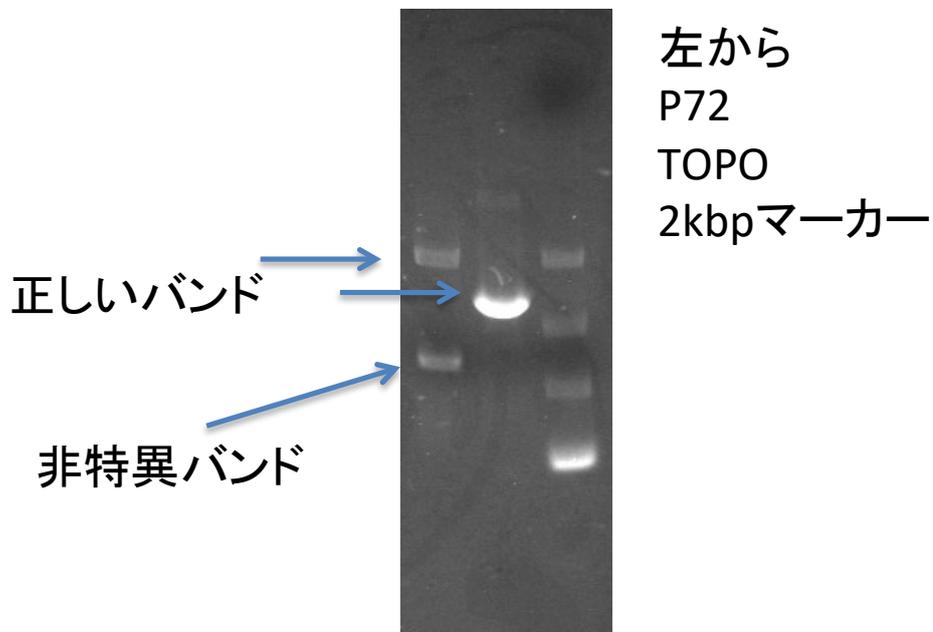
筋肉 1mg 当たり、 $10^4$  copy 程度のウイルスゲノムが検出された。  
 (例に示した PCR と定量 PCR は別サンプルです)

## ポジティブコントロールの PCR

p72 の陽性対照は、非特異産物が形成されます。理由は未検証です。

2 kbp 付近（1944bp）の上側のバンドが正しいプロダクトです。

この泳動像では、TOPO のバンドが濃く出ていますが、テンプレートを適当に添加したためです。通常は同程度の濃さに増幅されます。



pCR2.1 ベクターに組み込んだプラスミドです。

100 倍程度に希釈して、1 $\mu$ L をテンプレートにしてください。