

農林水産省委託事業

魚類防疫技術書シリーズ XXIV

コイの特定疾病 (KHVD, SVC) 診断マニュアル

社団法人 日本水産資源保護協会

...the ...

目 次

コイヘルペスウイルス病の診断

コイヘルペスウイルス病の PCR 法による診断	1
-------------------------	---

コイ春ウイルス血症の診断

I. 細胞培養法	15
II. ウイルス分離法	26
III. 間接蛍光抗体法による診断	35
IV. RT-PCR 法による診断 (参考)	46

コイヘルペスウイルス病の診断

「コイの特定疾病診断マニュアル」の使用にあたって

1. 本書は、国際獣疫事務局（OIE）魚病委員会の定めた「水産動物疾病診断マニュアル（Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, 2003）」に基づいて診断法を記載していますが、「コイヘルペスウイルス病のPCR検査技術」および「コイの春ウイルス血症とその診断技術」研修会の実施結果も踏まえて加筆修正しました。したがって、同上マニュアル及び研修会資料とは一部異なる部分があります。
2. コイ春ウイルス血症の診断は、OIE マニュアルではまず最初に培養細胞によるウイルス分離を行うことになっているため、本書では細胞培養法、ウイルス分離法も記載しました。これらの手法は実施する研究機関等により多少異なるものと思われませんが、本書では養殖研究所 病害防除部 魚病診断・研修センターで実施している手法を参考までに記載しました。
3. 本書で使用している機器・試薬等は、同魚病診断・研修センターで使用しているものを参考までに記載したもので、同等のものであれば機種・メーカー等は問いません。

はじめに

当協会では、農林水産省の委託を受けて平成16年度養殖衛生対策センター委託事業を実施しており、その一環として魚類防疫・診断技術等に関する技術書を作製し、養殖衛生対策の推進及び防疫、診断技術の普及・指導等に利用していただいております。

本年度は、魚類防疫技術書シリーズXXIVとして「コイの特定疾病（KHVD、SVC）診断マニュアル」を作製いたしました。

平成15年度に、我が国で最初の「コイヘルペスウイルス病（KHVD）」が発生して大きな社会問題となりましたが、16年度には天然河川・湖沼などで多数確認され、養殖場等にも大きな被害をもたらしたところです。また、同じコイ科魚類の特定疾病に指定されている「コイ春ウイルス血症（SVC）」は、現在のところ我が国には未侵入ですが、侵入の可能性が懸念されている疾病です。

このような状況から、平成15年度にはKHVDの早期診断と蔓延防止を目的に独立行政法人 水産総合研究センター 養殖研究所の主催により「コイヘルペスウイルス病のPCR検査技術」研修会が、また平成16年度にはSVCの早期診断と侵入防止を目的に養殖研究所と当協会の共催による「コイの春ウイルス血症とその診断技術」研修会が開催されました。本書は、養殖研究所 病害防除部 魚病診断・研修センターの佐野元彦博士および湯浅 啓博士に依頼し、これらの研修会資料をとりまとめたもので、養殖現場等で魚病に対応する技術者がこれらの疾病の診断を行う際の手引書としていただくために作製いたしました。

本書の発行にあたり、養殖研究所長、同病害防除部長、佐野・湯浅両博士、ならびに同部研究員の方々に多大なご尽力をいただきましたことを記し、ここに深く感謝申し上げます。

平成17年3月

社団法人 日本水産資源保護協会
会 長 瀬 川 弘

コイヘルペスウイルス病の PCR 法による診断

1. 診断にあたっての注意
2. 必要な検査用機器と試薬類
 - (1) 試薬・器具
 - (2) 主な検査用機器
3. 手技
 - (1) 核酸の抽出
 - (2) PCR 反応
 - (3) 電気泳動
4. 参考資料

1. 診断にあたっての注意

- ・ サンプルの形態は生鮮・冷凍・エタノール固定（70%以上）のいずれでもよいが，エタノール固定の場合，固定材料を細断して固定し，冷蔵保存するのが望ましい。
- ・ 生の鰓を扱う場合には，ウイルスが存在する可能性を考え，作業後，殺菌・消毒できるような場所で行う。
- ・ 核酸抽出に用いる1検体当たりのサンプル量は5~10mg（米粒半分程度）とする。サンプル量が多いと核酸の純度が低下する恐れがある。
- ・ 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため，検体ごとにチップ，ピペットを換える。
- ・ 臭化エチジウムは強力な発ガン物質なので，取り扱い時には必ず手袋を着用する。粉末と溶液が市販されているが，粉末は吸引などの危険性があることから溶液を購入するのがよい。また，廃液は活性炭で吸着後，焼却処分する。

2. 必要な検査用機器と試薬類

(1) 試薬・器具



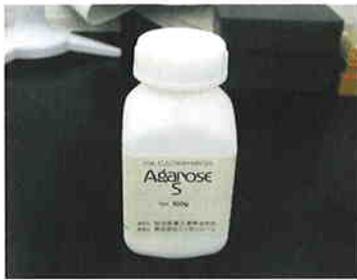
- ・ DNA抽出キット：Puregene Cell and Tissue Kit（Gentra systems/フナコシ総合カタログ 商品コード D-5500A）
- ・ プロテナーズ K（Takara 20mg/mL）



- ・ 2-プロパノール（特級）
- ・ 70%エタノール（特級をdDWで希釈）
- ・ dDW (DNase free)（インビトロジェン）



- ・ Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara)
（10倍緩衝液，dNTPが付属）



- ・ 電気泳動用アガロース HS (ニッポンジーン)



<サンプル処理用>

- ・ ホモジナイズペッスル
- ・ フィルター付きチップ(1,000 μ L, 200 μ L など)
- ・ オートピペッター (1,000 μ L, 200 μ L)
- ・ 解剖器具
- ・ バーナー (あるいはアルコールランプ)
- ・ チューブ立て



<核酸抽出・PCR用>

- ・ フィルター付きチップ(1,000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L など)
- ・ オートピペッター (1,000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L)
- ・ チューブ立て

その他

- ・ PCR プライマー：下表の配列のものをメーカーに合成依頼する。通常、合成されたプライマーは乾燥状態で納品されるので、dDW で溶解して使用する（ストック液は 100pmol/ μ L に調製し、小分けして-20 $^{\circ}$ Cで冷凍保存する）。

診断用プライマーの配列

プライマー名	配列
KHV Sph I-5 F	5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3'
KHV Sph I-5 R	5'-GACACATGTTACAATGGTCGC-3'

ストック液は 100pmol/ μ L に調製

- PCR 反応液：PCR 酵素は、TaqDNA ポリメラーゼには TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa) を使用する。PCR 反応液は使用する直前に所定の濃度になるよう調製する。

PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
10×EX Taq buffer	2.0μL
2.5mM dNTP mixture	1.6μL
dDW (滅菌超純水)	15.4μL
KHV Sph I-5 F primer(100pmol/μL)	0.2μL
KHV Sph I-5 R primer(100pmol/μL)	0.2μL
Takara EX Taq HS	0.1μL
合計	19.5μL

- 電気泳動用バッファー (TBE, Takara)：粉末を DW に溶解し使用する。
- 臭化エチジウム溶液 (10mg/mL, ニッポンジーン)：本液の 20 倍希釈液をアガロース 100mL に対し 20μL 添加する (最終濃度 0.1μg/mL)。臭化エチジウムは発ガン物質であるため、取り扱い時には手袋を着用する。
- マイクロチューブ (0.6 mL, 1.5 mL 用 高压滅菌済みのもの)
- PCR 用マイクロチューブ (PCR 用 0.2 mL 等, 高压滅菌済みのもの)
- DNA 分子量マーカー (フナコシなど)

(2) 主な検査用機器



- 冷却微量高速遠心機



- ブロックインキュベーター (アステックなど)



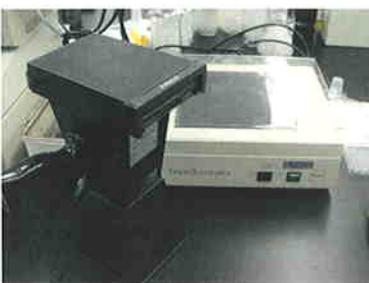
- オートクレープ



- PCR サーマルサイクラー (Takara など)



- ミニゲル電気泳動装置 (アドバンス社など)



- トランスイルミネーター (コスモバイオなど)
- 写真撮影装置 (Polaroid など)



- ・ CCD カメラ撮影装置（上記カメラで代用可能）

その他

- ・ 攪拌機（ボルテックスなど）
- ・ 滅菌缶

3. 手技

(1) 核酸の抽出



- ① オートクレーブ処理した 1.5mL マイクロチューブにサンプルの番号を書き, チューブ立てに準備する。



- ② 1.5mL マイクロチューブにキットの lysis buffer 100 μ L を加える。



- ③ 解剖器具を火炎滅菌（あるいは乾熱滅菌）する。



- ④ 鰓の粘液を少し落とす（鰓をビニール袋に入れた状態で、軽くハサミの背側で鰓組織が崩れない程度に粘液を取り除く）。



- ⑤ 鰓組織を約 5~10mg（米粒半分程度）切り取り， lysis buffer を加えた 1.5mL マイクロチューブに入れる。



- ⑥ オートクレーブ処理したホモジナイズペッスルを用い，ホモジナイズする（組織が完全に崩れなくてもよい）。



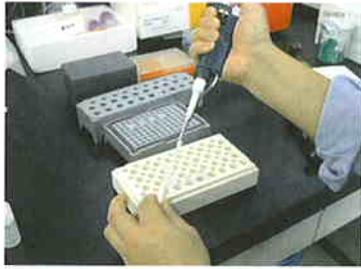
- ⑦ さらに 1,000 μ L オートピペッターを用いて， lysis buffer 500 μ L を加える。



- ⑧ 使用したホモジナイズペッスルは，滅菌缶に入れる（以降の操作で廃棄した器具と共にオートクレーブ処理する）。



- ⑨ ブロックインキュベーターを用い， 65 $^{\circ}$ C・30 分間インキュベートし，組織をある程度溶解させる。
この段階でウイルスは失活するので，これ以降，通常の場合で扱って構わない。



- ⑩ 200 μ L オートピペッターを用いて、プロテナーゼ K (20mg/mL) を 20 μ L 入れる (約 1 滴)。



- ⑪ ブロックインキュベーターを用い、55 $^{\circ}$ C・30 分以上インキュベートし、蛋白分解反応をすすめる (組織が完全に溶けるまで)。
- ⑫ 10 μ L オートピペッターを用いて、キット付属の RNase A 3 μ L を加える。



- ⑬ ブロックインキュベーターを用い、37 $^{\circ}$ C・30 分間インキュベートする。
- ⑭ 1,000 μ L オートピペッターを用いて、キットの蛋白沈殿剤を 200 μ L 入れる。



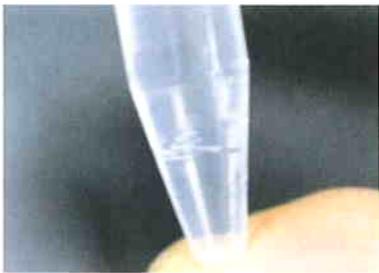
- ⑮ 攪拌機で 20 秒程度よく混合する。



- ⑯ 4°Cで 13,500rpm・3 分間, 遠心する。



- ⑰ 1,000 μ L オートピペッターを用いて上清 600 μ L を回収し (上清中の「もやもや」を吸わないように注意する), 新しいエッペンドルフチューブに移す。「もやもや」がひどく上清が取れないものは, ピペティングで混合後, もう一度遠心沈殿する。



- ⑱ 1,000 μ L オートピペッターを用いて, 上清に 600 μ L の 2-プロパノール (原液) を入れて, 攪拌機でよく混合し, DNA を析出させる。室温で 2 分間放置する。



- ⑲ 4°C, 15,000rpm・5 分間, 遠心沈殿する。白色ペレットがチューブの底に沈殿する。



- ⑳ 1,000 μ L オートピペッターを用いて, 上清を除去する。



⑳ 1,000 μ L オートピペッターを用いて、70%エタノール 500 μ L を入れて、軽く攪拌機で混ぜることで、DNA ペレットを洗浄する。

㉑ 15,000rpm・1～2 分間遠心沈殿し、上清をピペットで除去する。さらに 5,000rpm・数秒の遠心沈澱により水滴を完全に沈下させた後、200 μ L オートピペッターで完全に上清を除去すると次の乾燥が早い。



㉒ 室温から 37 $^{\circ}$ C 下で、軽く乾燥させる（白色ペレットが若干透明がかかるまで）。

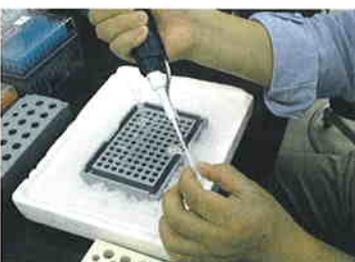
㉓ あらかじめ分注した dDW 50 μ L をチューブに加え、チューブ底部を指で弾いてペレットをよく溶かす（37 $^{\circ}$ C で暖めると溶けやすい）。完成したテンプレートは -20 $^{\circ}$ C で保存する。



ウイルスに汚染した器具等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理し、病魚の輸送に使用された発泡スチロール等は廃棄用の袋に入れ焼却処分する。



(2) PCR 反応



- ① オートクレーブ処理した PCR チューブにサンプルの番号を記入し準備する。準備するチューブ数は陽性対照と陰性対照を含め、サンプル数+2 となる。
- ② Takara Ex Taq Hot Start Version を使用し、PCR 反応液を調製する。
- ③ PCR 反応液を各 PCR チューブに 19.5 μ L ずつ分注する。
- ④ 準備したテンプレート液 0.5 μ L を反応液に加え、キャップをしっかりと閉める。
- ⑤ サーマルサイクラーのプログラムを開始し、94 $^{\circ}$ C になったらポーズで止める。PCR チューブをしっかりと挿入し、蓋を閉めて再スタートさせる。

プログラム

94 $^{\circ}$ C 30 秒

94 $^{\circ}$ C 30 秒

63 $^{\circ}$ C 30 秒

72 $^{\circ}$ C 30 秒

72 $^{\circ}$ C 7 分, 4 $^{\circ}$ C 保冷

} 40 サイクル

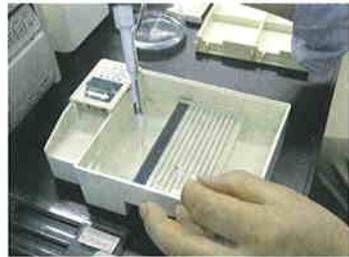
(3) 電気泳動



- ① TBE 緩衝液に終濃度 1%になるようアガロース HS (ニッポンジーン) を入れ, 電子レンジで完全に溶解させる。溶解中は突沸に注意する。
- ② アガロース溶液が 60℃程度になるまで放置し, 冷却する。冷却後, 20倍希釈臭化エチジウム溶液をアガロース 100mL に対し 20 μ L 加え混合する。
- ③ 上記のアガロースをゲルメーカーに流し込む。その際に, 気泡がコーム周辺に残らないように注意する。
- ④ 放置して十分に冷却させた後, ゲルメーカーのコームを抜く。
- ⑤ 電気泳動槽に TBE 緩衝液を入れ, 作製したアガロースゲルをセットする。臭化エチジウムには発ガン性があるので作業中は手袋を着用する。



- ⑥ PCR 反応が終了して保冷プログラムに入ったチューブを取り出し、各チューブに電気泳動用ローディングバッファー 3 μ L を入れ混合する。



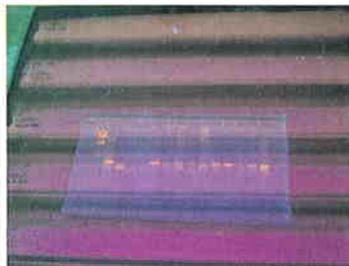
- ⑦ 上記の混液 7 μ L を泳動槽にセットしたアガロースゲルのウェルに入れる。この際、分子量マーカーも同時に泳動する。



- ⑧ 蓋を閉じ、スイッチを負電荷の核酸が泳動されるようサンプル側の電極をマイナス（反対側がプラス）にセットし、100V（定電圧）で泳動を開始する。



- ⑨ 先行の色素マーカーがゲルの半ばに来るまで（20分程度）泳動したところで、電源を切りゲルを取り出す。



- ⑩ ゲルを取り出し、トランスイルミネーター上に乗せ、UV が裸眼に触れないよう防護し、トランスイルミネーターの電源を入れる（紫外線波長は 300nm 付近が良い）。



- ⑪ 泳動像をポラロイドカメラ等で記録する。ウイルス遺伝子由来 290bp の増幅産物の有無を観察する。

4. 参考資料

- 1) バイオ実験イラストレイテッド③本当にふえる PCR,秀潤社
- 2) Molecular Cloning(third edition) ,CSHL PRESS
- 3) Gilad,O., S.Yun, K.B.Andree, M.A.Adkinson, A.Zlotkin, H.Bercovier, A.Eldar and R.P.Hedrick (2002): Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Dis.Aquat.Org.*, **48**, 101-108.
- 4) Gray,W.L., L.Mullis, S.E.LaPatra, J.M.Groff and A.Goodwin (2002): Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J.Fish Dis.*, **25**, 171-178.
- 5) Hedrick,R.P., O.Gilad, S.Yun, J.V.Spangenberg, G.D.Marty, R.W.Nordhausen, M.J.Kebus,H.Bercovier and A.Eldar (2000): A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J.Aquat.Animal Health*, **12**, 44-57.

コイ春ウイルス血症の診断

I. 細胞培養法

II. ウイルス分離法

III. 間接蛍光抗体法による診断

IV. **RT-PCR** 法による診断 (参考)

I. 細胞培養法

1. 注意事項

2. 必要な機器と試薬類

(1) 試薬・器具

(2) 主な機器

3. 手技

付録 1 : Hanks'培地の調製法

付録 2 : PBS(-)、EDTA 液の調製法

付録 3 : 細胞凍結保存

(1) 注意事項

(2) 必要な機器と試薬類

1) 試薬・器具

2) 主な機器

(3) 手技

1) 凍結保存

2) 細胞起こし

4. 参考資料

1. 注意事項

- ・ 使用培地の確認。密栓系（培養フラスコ）、開放系（24穴・96穴プレート）、炭酸ガス下それぞれの培養条件による適切な培地・緩衝系の選択。
- ・ ウイルス分離や培養に用いる細胞は、原則として2週間以内に分散したものを
用い、分散翌日にウイルスや検査試料を接種する。
- ・ 細胞はできるだけ凍結保存しておく(付録3)。

2. 必要な機器と試薬類

(1) 試薬・器具



- ・ 細胞（コンフルエントなもの）

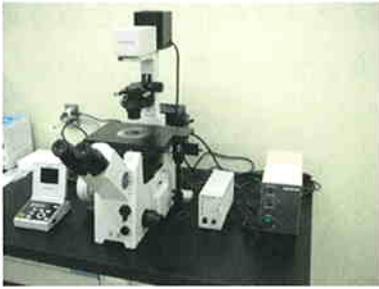


- ・ 培地
 - * すぐに使用できる液体培地が市販されている。
 - * 自分で調製する場合(付録1)：MEMはHanks'緩衝系培地を用いる（5～10%の血清を加えて使用，冷蔵保存）。
- ・ PBS (-) -EDTA 液（調製法は付録2）
- ・ 細胞分散液(トリプシン-EDTA 液)（冷蔵保存）
- ・ ピペット（滅菌済み）
- ・ 培養器(フラスコ・プレート)（滅菌済み）

(2) 主な機器



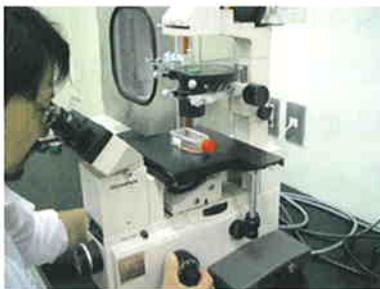
- ・ クリーンベンチ



- 倒立顕微鏡

- 冷蔵庫（培地類の保存）
- オートクレーブ
- インキュベーター

3. 手技



- ① 分散する細胞の状態と密度を確認する。分散倍数（1本から何本の培養フラスコに分散するか）を決める。細胞によるが、通常、3～5倍程度。



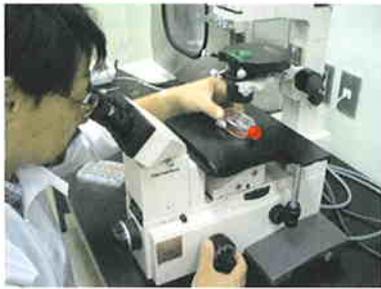
- ② 細胞培養フラスコ（器）および細胞分散の試薬瓶をアルコールスプレーしてクリーンベンチ内に搬入する。



- ③ 試薬瓶や培養液瓶を開けていく。キャップや瓶口は、バーナーで軽く火炎滅菌する。



- ④ 培養フラスコの培養液を抜き取る
(デカンティングでもよい)。
- ⑤ PBS(-)-EDTA 液を 5mL 程度フラスコに加え、細胞表面を洗い流すように PBS(-)-EDTA 液をなじませる。そのまま 1,2 分間程度静置する。BF-2 細胞では、洗い流すだけで十分。
- ⑥ PBS(-)-EDTA 液を抜き取った後、細胞分散液(トリプシン-EDTA 液)を 5 滴程度加え、細胞表面全体にいきわたらせ、静置する。時々細胞表面が乾かないように液をいきわたらせる。
- ⑦ 細胞が白く見えるようになってきたら、フラスコ側面を軽く叩いてみる。細胞がフラスコ面から容易に剥離するようであれば、トリプシンによる消化を終了させるため⑧へ進む。
- ⑧ 血清の添加された培地数 mL を加え、トリプシン反応を停止させる。ピペッティングを数回行うことにより物理的分散を行う。分散倍数(何本のフラスコとするか)に応じて必要量の培地をさらに加え、細胞浮遊液とする。(通常、3~5 倍程度)



⑨ 各フラスコに細胞浮遊液を入れる。25cm²では5~7mL, 75cm²では15~20mL, 24穴プレートでは各穴1mLを目安とする。

⑩ ラベルに細胞名, 継代数, 分散倍数, 培地(血清濃度), 日付を記入し, フラスコに貼る。

⑪ 細胞の分散状態を観察する。

⑫ 供試細胞・使用目的に応じた温度のインキュベーターに収容する。

付録1：Hanks'培地の調製法 粉末培地：ろ過滅菌



Hanks' MEM 粉末培地には抗生物質が含まれているものがあるので, 用途に応じて選択する。

① ろ過滅菌して調製する市販粉末培地。通常1L用。L-グルタミンなどは通常含まれているので, ろ過滅菌後, 血清と抗生物質を加えればすぐに使用できる。



② 1L の蒸留水を量り取ったビーカーを準備し、スターラーバーを入れ、スターラーを回しながら、粉末培地を徐々に投入し、よく溶解させる。炭酸水素ナトリウムおよび必要であれば抗生物質も添加する。

③ 粉末培地が完全に溶解したら、クリーンベンチに搬入し、培地瓶に 0.22 μm フィルターユニットを取り付け、減圧してろ過する。

④ ろ過後、必要であれば、血清を加える。冷蔵保存。

付録 2 : PBS(-)-EDTA 液の調製法



① 日水製薬ダルベッコ PBS(-)を 500mL 以下の培地瓶に量り取る。さらに、0.02%となるように EDTA・4Na を量り取り培地瓶に入れる。規定量の蒸留水を加え溶解する。

② 121°C, 15 分間のオートクレーブを行う。

③ 室温あるいは冷蔵庫で保存する。

付録3：細胞凍結保存

(1)注意事項

- ・ 凍結する細胞の密度に注意。原則としてクライオバイアル1本から25cm²フラスコへ細胞を起こす密度(25cm²フラスコ2本分)とする。それより細胞数が少ない場合には、起こすときに使用すべき培養器24穴あるいは12穴プレート用などをクライオバイアルのラベルに明記しておくこと。
- ・ 保存する細胞は、増殖期のものを使用する。
- ・ 複数のバイアルを一度に凍結保存し、数日後、その内の1本を起こし、生存状態などを観察して凍結保存が成功していることを確認すること。

(2)必要な機器と試薬類

1) 試薬・器具



- ・ 増殖期の細胞
例えば、5本保存する場合、25cm²フラスコを10本程度(75cm²フラスコならば3本)準備する。



- ・ 通常使用する培地
- ・ PBS(-)-EDTA液(調製法は付録2)
- ・ 細胞分散液(トリプシン-EDTA液)(冷蔵保存)
- ・ ピペット(滅菌済み)
- ・ 培養器(滅菌済み)
- ・ 凍結保存培地(セルバンカー(血清タイプ)など)



2) 主な機器

- ・オートクレーブ
- ・クリーンベンチ
- ・倒立顕微鏡
- ・遠心機（室温で 1,200rpm 程度の遠心ができればよい）
- ・-80℃超低温冷凍庫

(3)手技

1)凍結保存



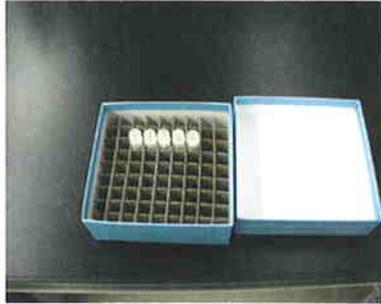
- ⑨ 細胞培養法—手技①～⑧の操作に従い，細胞浮遊液を調製する。



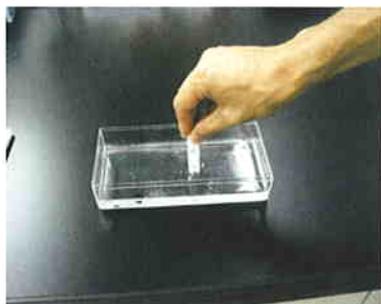
- ⑩ 細胞浮遊液を遠心管に入れ，室温，1,200rpm で3分間遠心する。



細胞が沈殿し，パックとなっていることを確認し，上清の培養液を除去した後，クライオバイアル1本あたり1mLの凍結保存培地で軽くピペッティングして細胞を浮遊させる。



2)細胞起こし



⑪ 直ちに、クライオバイアル 1 本に 1mL ずつ分注する。

⑫ そのまま -80℃超低温冷凍庫へ保存する。

数日したら、凍結保存が成功しているか、1 本溶かして細胞を起こして確認してみる。

⑬ クリーンベンチ内に培養液を準備する。培地の血清濃度は 10%程度と高い方がよい。25cm² フラスコおよび 15mL 容の滅菌済み遠心管も準備する。

⑭ -80℃超低温冷凍庫からクライオバイアル 1 本を取り出す。水に浸し、時々静かに揺り動かして融解させる。このときに、あまり激しく振ってかき混ぜて溶かしてはならない。



- ⑮ 融解したら、すぐにクリーンベンチに搬入する。



- ⑯ 直ちに細胞液を遠心管に移し、培養液を 9mL 程度加え、軽く混合する。



- ⑰ 室温, 1,200rpm で 3 分間遠心する。



- ⑱ 細胞が沈澱し、パックとなっていることを確認し、上清の培養液を除去する。



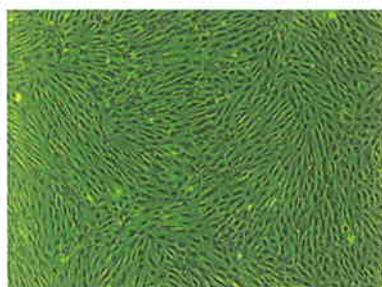
- ⑲ 培養液 5~7mL を加え、ピペットで細胞を静かに浮遊させる。



- ⑳ 25cm² 培養フラスコに細胞浮遊液を移す。



- ㉑ 顕微鏡で観察し，多数の細胞が輝きのある球形であることを確認する。



- ㉒ 至適温度で培養する。翌日に多数の細胞が底面に張付き，伸張していることを確認する。ほとんどの細胞が浮遊してしまっている場合には，凍結保存がうまくいっていない。もう一度，保存操作を行う。

一旦凍結保存が成功すれば，冷凍庫に事故のない限り，-80℃超低温冷凍庫内で1,2年以上は保存できる。生存状態を調べつつ，定期的に細胞を起こし，増殖させ，再度凍結保存する。定期的に起こした細胞を用いれば，細胞の性状の変化をあまり気にすることなく，一定の細胞継代数の範囲内で常に試験が可能となる。

4. 参考資料

- 1) 組織培養の技術（第二版），日本組織培養学会編，朝倉書店
- 2) 微生物学実習提要，東京大学医科学研究所学友会編，丸善株式会社
- 3) 魚病対策技術研修-ウイルス学実習の手引き-，（社）日本水産資源保護協会

Ⅱ. ウイルス分離法

1. 注意事項
2. 必要な検査用機器と試薬類
 - (1) 試薬・器具
 - (2) 主な検査用機器
3. 手技
4. 検査後の器具・機材の処理
5. 参考資料

1. 注意事項

- ・ 生の魚体組織試料を扱う場合には、何らかの病原体が存在する可能性を常に考え、検査後、殺菌・消毒できる場所で行う。
- ・ サンプルは新鮮なものを用いる（腐敗の著しいものは使用しない）。試料到着後、速やかに検査を行う。やむを得ず、後日検査する場合には、 -80°C に凍結保存する。
- ・ 特定疾病が疑われる試料では、検査方法、供試細胞、検査組織・部位などは、各疾病のマニュアルに従う。
- ・ 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペット類を替える。
- ・ 注射器を使用する場合には、使用時および使用後の取り扱いに注意する。

2. 必要な検査用機器と試薬類

(1) 試薬・器具



- ・ フィルター付きチップ($200\mu\text{L}$)
- ・ オートピペッター ($200\mu\text{L}$)
- ・ 解剖器具
- ・ 2ml 容クライオチューブ (滅菌済み)



- ・ ウイルス分離用培地 (使用する細胞と同じ MEM Hanks' に 2%FBS を添加のもの。)
- ・ ガラスホモジナイザー (滅菌済み)
- ・ 注射器(23G 程度の注射針付)
- ・ ピペット (滅菌済み)
- ・ 電子天秤
- ・ $0.45\mu\text{m}$ フィルターユニット
- ・ 抗生物質液 (抗生物質処理法の場合)
- ・ 1.5mL 容エッペンドルフチューブ (滅菌済み)



細胞：検査目的・対象により供試細胞は適宜選択する。例えば、

通常の高産魚検査：BF-2, CHSE-214, EPC, FHM, KRE-3 など

通常の高産魚検査：BF-2, CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2(サケ科魚類)など

その他、検査魚種と同じ魚種由来細胞があれば適宜供試する。(BB, EK-1 など)

培養器：使用する培養器(通常 25cm²培養フラスコあるいは 24 穴プレート)も検体数などにより適宜選択する。

分離に用いる細胞は検査個体数と陰性対照分の数として、検査の前日にプレートあるいはフラスコに準備する。

(2) 主な検査用機器

- ・ 冷却遠心機あるいは冷却高速微量遠心機
- ・ オートクレーブ
- ・ クリーンベンチ
- ・ 倒立顕微鏡
- ・ インキュベータ

3. 手技



- ① 前日に準備した細胞が使用できる状態に繁茂しているか否かを確認する。コンフルエント少し前がよい。



- ② ウイルス分離用の培地，ホモジナイザーをあらかじめ氷冷する。依頼先の資料や調書，検体数や検査部位等について確認する。



- ③ 解剖器具を火炎滅菌（あるいは乾熱滅菌）する。



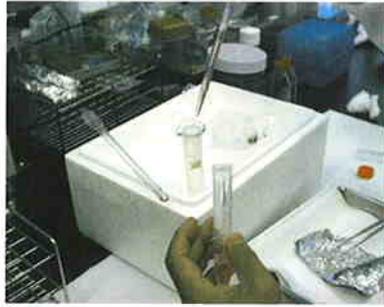
- ④ 検査魚の外観症状等を観察後，体長・体重を測定・記録する（診断依頼事項や必要に応じて，寄生虫検査や細菌検査を行う）。



- ⑤ 検査組織を採取する。稚魚では魚体全体を，少し大きな魚では筋肉部を除去して魚体前半部を，それよりも大きな個体では必要組織を採取する。特に指示のない場合には，腎臓，脾臓および脳を採取する。



- ⑥ ホモジナイズする組織重量を測定・記録する。



⑦ ホモジナイザーに検体を入れ、ウイルス分離用培地を添加する。通常、組織量の10倍量とするが、診断指針などで指示のある場合にはそれに従う。

⑧ 組織が乳化するまで磨砕する。使用した乳棒は滅菌缶へ入れる。

⑨ 磨砕液の中央部分付近から1mL採取し、滅菌済みの1.5mL容エッペンドルフチューブへ入れる。ピペットは、個体ごとに変え、使用後は滅菌缶へ。

⑩ 冷却遠心機で2,500rpm、5分間遠心分離する。

⑪ 遠心後、ペレットを乱さないように静かに取り扱う。



- ⑫ あらかじめ 2.5mL 容注射器に 23G の注射針を取り付け、1.8mL のウイルス分離用培地を吸い上げておく。

抗生物質処理を行う場合には、0.9mL 抗生物質液の入ったクライオバイアルを準備する。



- ⑬ エッペンドルフチューブの中央部分より注射器に 0.2mL 遠心上清を吸い込む。注射針の取扱いに十分に注意。



- ⑭ ピストンを最後まで引き上げ、空気を吸い込み、上下に転倒して液をよく混合する。これで採取組織の 1/100 濃度となる。

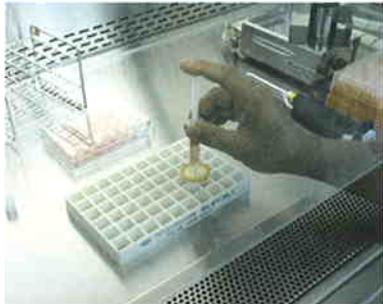
抗生物質処理する場合には、0.1mL の遠心上清をオートピペッターでとり、0.9mL 抗生物質液入りバイアルに加え、上下転倒させよく混合した後、所定の温度・時間（通常、4℃、一晚）で処理する。処理後、細胞へ接種する。



- ⑮ 注射器と遠心したチューブ（念のためまだ棄てない）を氷冷しておく。以降のろ過、細胞への接種は、必ずクリーンベンチ内で行う。



- ⑩ 注射器から注射針を取り除く。液が飛び散らないように注意する。



- ⑪ クリーンベンチ内で注射器を 0.45 μm フィルターユニットに取付け、クライオチューブへ必要量をろ過する。フィルターユニットの下側に触れてはならない。



- ⑫ ろ過が終わった注射器及びフィルターユニットは滅菌缶へ。



- ⑬ プレート蓋に接種サンプル名を記入しておく。



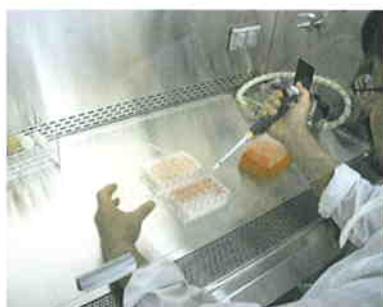
- ⑭ ろ過液の必要量を各細胞へ接種していく。通常は、準備細胞培養液の 1/10 量(24 穴プレートでは 0.1mL)接種する(最終濃度は採取組織の 1/1000 濃度となる)。1/100 濃度液(ろ過液)を細胞へ接種する場合には、準備した細胞の培養液を除去し、ろ過液を接種する。



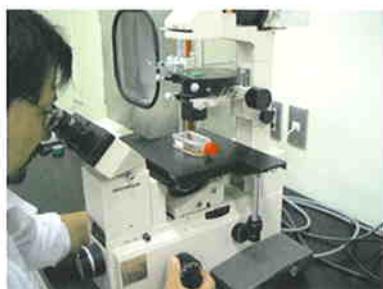
- ②1 プレートの蓋をビニールテープでシールし，インキュベータへ入れる。培養温度は，15,20,25℃の内，検査魚の飼育温度に近い温度を選択する。



- ②2 接種後，毎日観察する。細胞変性効果(CPE)が出現した場合には，分離ウイルスの同定を血清学的あるいは PCR などにより行う。



- ②3 CPE が出現しない場合には，もう一度新しく準備した細胞へ植え継ぐ（盲継代）。実施時期は，検査対象や診断指針などにより行うが，基本的には接種 7-10 日後に行う。



- ②4 盲継代実施の前日に細胞を準備し，当日，準備した細胞が使用できる状態か否かを確認する。
- ②5 必要量を対応するフラスコあるいは 24 穴プレート各穴へ接種していく。原則として接種する細胞培養液の 1/10 液量を接種する。
- ②6 盲継代実施後，元のフラスコあるいはプレートとともに毎日観察する。CPE が出現しなかった場合には，ウイルス検査は陰性と判定する。細胞変性効果(CPE)が出現した場合には，分離ウイルスの同定を血清学的あるいは PCR などにより行う。

4. 検査後の器具・機材の処理



ウイルスに汚染した器具，プレート等は，滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。



病魚の輸送に使用された発泡スチロール等は，廃棄用の袋に入れ焼却処分する。

5. 参考資料

- 1) 微生物学実習提要，東京大学医科学研究所学友会編，丸善株式会社

Ⅲ. 間接蛍光抗体法による診断

1. 注意事項
2. 必要な検査用機器と試薬類
 - (1) 試薬・器具
 - (2) 主な検査用機器
3. 手技
4. 検査後の器具・機材の処理
5. 参考資料

1. 注意事項

- 固定前の感染性を有する（SVC が疑われる）ウイルスを扱う場合には、クリーンベンチ内で行う。
- 特定疾病の病性鑑定指針 SVC の項に従って実施する。SVCV 間接蛍光抗体キットは、説明書に従うが、細胞の固定では、培養器いっぱい固定液を注ぎ込み、完全にウイルスを固定（不活化）するよう注意する。
- 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペット類を替える。
- 必ず陰性対照および陽性対照を設けて実施する。
- 蛍光倒立顕微鏡を使用して観察する場合には、カバースリップを用いず、24 穴プレートで実施できるが、鮮明な蛍光像ではないため、診断においてはカバースリップを用いて行う。

2. 必要な検査用機器と試薬類

(1) 試薬・器具



- EPC 細胞
- 検査する分離ウイルス培養液（遠心上清または 0.45 μ m フィルターろ過済みのもの）
- MEM Hanks' 培地（通常、血清濃度は 5% 程度）
- PBS(-)-EDTA 液
- 細胞分散液(トリプシン-EDTA 液)
- ピペット（滅菌済み）
- 24 穴プレート（滅菌済み）
- 24 穴用カバースリップ(コラーゲンコート済み）（滅菌済み）



- ・ Bio X 社製 BIO-FLUO SVC (コスモバイオ (株) BIO-K-12)
 - ・ 固定済み SVCV 感染 EPC 細胞カバースリップ (陽性対照)
- キットの固定液がなくなったら, アセトン:エタノール=3:7の液を準備する。

(2) 主な検査用機器

- ・ 冷却遠心機あるいは冷却高速微量遠心機
- ・ オートクレーブ
- ・ クリーンベンチ
- ・ 倒立顕微鏡
- ・ インキュベータ
- ・ 蛍光顕微鏡
- ・ 冷蔵庫

3. 手技



- ① 細胞浮遊液の調製は「細胞培養」
—手技の①～⑧に従う。ただし、
必要量は 24 穴プレート使用穴数
×1mL となる。



- ② 必要な数の 24 穴プレートに各穴
1 枚ずつカバースリップを入れて
おく。



- ③ 細胞浮遊液を各穴に 1mL ずつ加える。



- ④ プレートを揺り動かさないように注意して、ビニールテープでシールする（揺ると細胞が穴の中心に集まってしまう）。



- ⑤ 25°Cで一晩培養する。



- ⑥ 前日に準備した細胞がウイルス接種に使用できる状態に繁茂しているか否かを確認する。コンフルエント少し前がよい。



- ⑦ 分離ウイルス液（遠心上清あるいは 0.45 μ m フィルターでろ過済みのもの）を 1/100 および 1/1000 希釈し、それぞれ 0.1mL ずつプレートに接種する。陰性対照用穴にはウイルス液を接種しない。



- ⑧ ビニールテープでシールし，20℃で培養する。毎日観察し，細胞変性効果(CPE)が出現し始めたところで培養を終了し，固定する。通常，2～3日間の培養。



- ⑨ 24 穴プレートの培養液を抜き取る。細胞が乾いてしまわないよう手早く行う。



- ⑩ キットに添付の固定液をプレート穴に静かに注ぎ込み，穴いっぱいにする（キットの固定液がなくなったら，アセトン：エタノール=3：7の液を準備する）。



- ⑪ **固定液は穴いっぱいに注ぐこと。**ここから培養ウイルスは不活化されるので，通常の実験室で操作する。



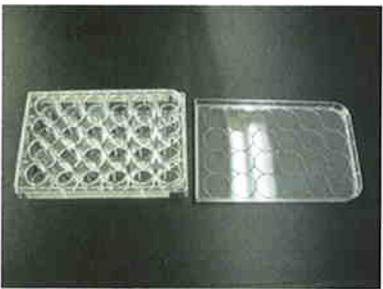
- ⑫ 4℃で20分間固定する。



- ⑬ キットの×10 洗浄液を蒸留水で10倍に希釈しておく。



- ⑭ 固定終了後，固定液を各穴から抜き取る。すぐに染色する場合には，⑰へ。



- ⑮ すぐに染色しない場合には，そのまま風乾で完全に乾かす。



- ⑯ 湿気が入らないよう蓋をシールする。冷凍庫に保存する。



- ⑰ 希釈した洗浄液を1mL程度加え，少しプレートを前後左右に傾けて洗浄する。



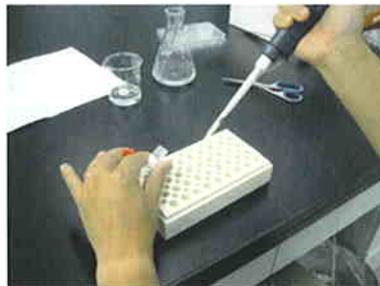
⑱ 洗浄液を容器にデカンティングする。



⑲ ペーパータオルで余分の洗浄液をぬぐい取る。もう一度、17番からの洗浄を繰り返す（計2回洗浄する）。



⑳ 陽性対照の固定 SVC 感染 EPC 細胞カバースリップを一つの穴に落とし込む。細胞面が必ず上になるように注意する。



㉑ キットの SVCV モノクローナル抗体液を洗浄液で 20 倍に希釈する。



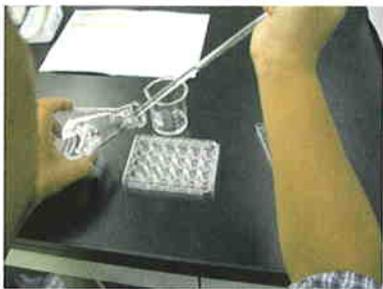
㉒ 希釈した抗 SVCV モノクローナル抗体液を各穴 200 μ L 加える。前後左右に傾けて、液をなじませる。



⑳ 室温で1時間静置し, 反応させる。



㉑ ペーパータオルにプレートをしゅくり返し, 抗体液を除く。



㉒ 希釈した洗浄液を1mL程度加え, 少しプレートを前後左右に傾けて洗浄する。数分間静置する。



㉓ 洗浄液を容器にデカンティングする。

㉔ ペーパータオルで余分の洗浄液をぬぐい取る。もう一度, 25番からの洗浄を繰り返す(計2回洗浄する)。



㉕ キットの二次抗体液を希釈液で20倍に希釈する。薄いブルーとなる。



- ②⑨ 希釈した二次抗体液を各穴 200 μ L 加える。上下左右傾けて、液をなじませる。



- ③⑩ 室温, 1 時間, 暗所 (引き出しの中など) に静置し, 反応させる。



- ③⑪ タオルにプレートをはっきり返し, 抗体液を除く。



- ③⑫ 希釈した洗浄液を 1mL 程度加え, 少しプレートを前後左右に傾けて洗浄する。数分間静置する。



- ③⑬ 洗浄液を容器にデカンティングする。
- ③⑭ タオルで余分の洗浄液をぬぐい取る。もう一度, ③⑬ からの洗浄を繰り返す (計 2 回洗浄する)。



- ③⑤ 乾かないように洗浄液を少量ずつ各穴に加える。



- ③⑥ スライドガラスに試料名を書き、マウント・メEDIUMを一滴ずつ少し離して滴下しておく（落射式蛍光顕微鏡を使用する場合、特に無蛍光スライドガラスを使用する必要はない）。



- ③⑦ 各穴からカバースリップを取り出す。細胞面を傷つけないように注意する。



- ③⑧ 取り出したカバースリップは、ひっくり返して、下面側（細胞面）に付いた水滴をタオルに軽くつけることにより取り除き、素早くマウントする。



- ③⑨ スライドガラスを細胞面を下にしてマウント・メEDIUMに片側からつけ、ゆっくりと倒しながら、気泡が入らないようにマウントする。



④⑩ アルミホイルで包むなどして強い明かりに当てないようにする。すぐに検鏡できない場合には、遮光して冷蔵庫に保存し、翌日には観察する。

④⑪ B 励起を用い、蛍光顕微鏡で観察する。細胞は全体に赤く観察されるが、陰性対照で緑色の蛍光がなく、陽性対照に蛍光があることを確認する。分離ウイルスを接種したカバースリップ試料について検鏡し、特異蛍光の有無を観察し、判定する。

4. 検査後の器具・機材の処理

ウイルスに汚染した器具、培養液、プレート等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。

5. 参考資料

- 1) 微生物学実習提要，東京大学医科学研究所学友会編，丸善株式会社
- 2) 特定疾病診断マニュアル，日本水産資源保護協会

IV. RT-PCR 法による診断 (参考)

1. 診断にあたっての注意
2. 必要な検査用機器と試薬類
 - (1) 試薬・器具
 - (2) 主な検査用機器
3. 手技
 - (1) 核酸の抽出
 - (2) RT-PCR 反応
 - (3) RT-PCR 増幅産物の電気泳動と判定
4. 付録 2 nd-PCR(Semi-Nested PCR)
 - (1) 必要な試薬類
 - (2) 手技
 - (3) 2 nd-PCR 増幅産物の電気泳動と判定
5. 参考資料

1. 診断にあたっての注意

- ・ 生のウイルス培養液を材料とするので、核酸抽出試薬と混合するまでは、無菌室内で作業を行う。
- ・ 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペットを替える。
- ・ 臭化エチジウムは強力な発ガン物質なので、取り扱い時には必ず手袋を着用する。粉末と溶液が市販されているが、粉末は吸引などの危険性があることから溶液を購入するのがよい。また、廃液は活性炭で吸着後、焼却処分をする。

2. 必要な検査用機器と試薬類

(1) 試薬・器具



<核酸抽出用試薬>

- ・ TRIzol[®] LS Reagent (インビトロジェン)
- ・ クロロホルム (特級)
- ・ 2-プロパノール (特級)
- ・ dDW (DNAse・RNAse free) (インビトロジェン)
- ・ 75%エタノール (特級を dDW で希釈)



<PCR 用試薬>

- ・ SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Tag (インビトロジェン)
- ・ Takara EX Taq HS (タカラ)

<電気泳動用試薬>

- ・ 電気泳動用アガロース HS (ニッポンジーン)
- ・ 電気泳動用バッファー (TBE, Takara) : 粉末を DW に溶解し使用する。
- ・ 臭化エチジウム溶液 (10mg/mL, ニッポンジーン) : 本液の 20 倍希釈液をアガロース 100mL に対し 20 μ L 添加する (最終濃度 0.1 μ g/mL)。臭化エチジウムは発ガン物質であるため、取り扱い時には手袋を着用する。
- ・ マイクロチューブ (0.5 mL, 1.5 mL 用 高圧滅菌済みのもの)
- ・ PCR 用マイクロチューブ (PCR 用 0.2 mL 等, 高圧滅菌済みのもの)

- ・ DNA 分子量マーカー（フナコシなど）

<核酸抽出用器具>

- ・ ディスポーザルピペット（5mL, 1mL）
- ・ フィルター付きチップ(1,000μL, 200μL など)
- ・ オートピペッター（1,000μL, 200μL）
- ・ チューブ立て

<RT-PCR 用器具>

- ・ フィルター付きチップ(1,000μL, 200μL, 20μL, 10μL など)
- ・ オートピペッター（1,000μL, 200μL, 20μL, 10μL）
- ・ チューブ立て

RT-PCR プライマー・反応液

- ・ RT-PCR プライマー：下表の配列のものをメーカーに合成依頼する。通常合成されたプライマーは乾燥状態で納品されるので、dDW 等で溶解して使用する（ストック液は 10pmol/μL に調製し、小分けして冷凍保存する）。

診断用プライマーの配列

プライマー名	配列
SVCV F1	5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3'
SVCV R2	5'-AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH* ACN* CAY* -3'

ストック液は 10pmol/μL に調製

*R:A または G H:A または C または T N:A または C または G または T Y:C
または T

- ・ RT-PCR 反応液：SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum^R Taq を用いて、使用する直前に所定の濃度になるよう調製する。

RT-PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
2×Reaction Mix (キット)	25μL
dDW (滅菌超純水)	10μL
SVCV F1 primer(10pmol/μL)	5μL

SVCV R2 primer(10pmol/μL)	5μL
RT Platinum ^R Taq Mix (キット)	1μL
合計	46μL

(2) 主な検査用機器

- 冷却微量高速遠心機
- オートクレーブ
- PCR サーマルサイクラー
- ミニゲル電気泳動装置
- トランスイルミネーター
- 写真撮影装置あるいは CCD カメラ撮影装置
- 攪拌機

3. 手技

(1) 核酸の抽出



- ① 倒立顕微鏡により，培養細胞の細胞変性効果（CPE）が完全に出現し，細胞がほとんど全て浮き上がっていることを確認する。



- ② ピペットを用いて，培養フラスコ内の組織培養液を遠沈管に移す。使用済み培養フラスコおよびピペットは滅菌缶に捨てる。



- ③ 遠沈管に回収した組織培養液を4℃で3,000 rpm・5分間，遠心分離する。



- ④ ピペットを用いて、遠心した上清 250 μ L を 1.5 mL チューブに移す。使用済み遠沈管およびピペットは滅菌缶に捨てる。



- ⑤ 1,000 μ L オートピペッターを用いて、TRIzol 750 μ L をチューブに加える (TRIzol にはフェノールが含まれているので手袋を着用)。



- ⑥ 十分攪拌した後、室温で 5 分間放置する。



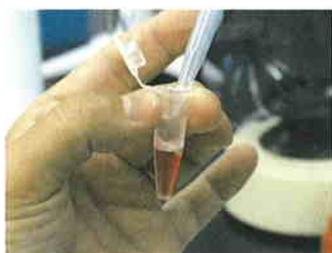
- ⑦ クロロフォルム 200 μ L を加え、15 秒間激しく攪拌し、その後、室温で 5 分間放置する。



- ⑧ 4 $^{\circ}$ C で 12,000 g \cdot 10 分間、遠心分離する。



- ⑨ 透明上層 (水相)、白色中間層 (DNA 相)、赤色下層 (フェノール相) の 3 層に分離されていることを確認する。分離されていない場合は、再度遠心分離する。



- ⑩ 白色中間層を吸わないように、水相のみを別の 1.5mL チューブに移す。全ての水層を採る必要はない。



- ⑪ 500 μ L の 2-プロパノール（原液）を入れ、軽く混合する。室温で 10 分間放置する。



- ⑫ 4 $^{\circ}$ C で 12,000 g \cdot 10 分間、遠心沈殿する。ペレットは確認できないことが多い。

- ⑬ 上清をピペット等で吸い取り除去した後、75%エタノール 1,000 μ L を入れて、軽く攪拌機で混ぜる。

- ⑭ 4 $^{\circ}$ C で 7,500 g \cdot 5 分間、遠心する。

- ⑮ 上清をピペットで除去し、遠沈管を乾燥させる（過剰乾固を避けるため、吸引器は用いない）。

- ⑯ サンプルに dDW (DNase \cdot RNase free) 100 μ L を加える。

- ⑰ 1.5mL チューブを指で弾いて、よく溶かす。RNA は分解されやすいので、溶解後は速やかに氷冷する。保存する場合は、-80 $^{\circ}$ C で行う。





- ⑱ ウイルスに汚染した器具等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。

(2) RT-PCR 反応



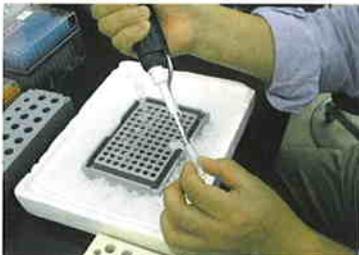
- ① オートクレーブ処理した PCR チューブにサンプルの番号を記入し準備する。陽性・陰性対照用チューブ（計2本）も加えて準備する（陽性対照にバンドが出ない、あるいは陰性対照にバンドが出たら、やり直し）。



- ② SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum^R Taq を使用し、総サンプル分の RT-PCR 反応液を調製する。



- ③ PCR 反応液 46 μ L を PCR チューブに分注する。



- ④ 抽出核酸サンプル液 4 μ L を PCR チューブに入れた RT-PCR 反応液に移入する。



- ⑤ チューブのキャップをしっかりと閉める。



- ⑥ サーマルサイクラーのプログラムを開始し、94℃に達したところでポーズして止める。PCR チューブをセットし、蓋を閉め、再スタートさせる。

プログラム		
50℃	30分	
94℃	2分	
94℃	30秒	} 35 サイクル
55℃	30秒	
72℃	1分	
72℃	7分, 4℃保冷	

(3) RT-PCR 増幅産物の電気泳動と判定

電気泳動による RT-PCR 増幅産物の確認と判定は、KHV 病診断 PCR 法に準ずる。



・付録の 2nd PCR を予定している場合には、反応が終わった PCR チューブには直接電気泳動用ローディングバッファーを入れず、パラフィルム上で、増幅産物 9 μ L と電気泳動用ローディングバッファー 1 μ L をピペッティングにより混合する。これを電気泳動用資料とする。



- ・判定：714bpの増幅産物を確認し，陽性と判定する。

4. 付録－2nd-PCR (Semi-Nested PCR)

2nd-PCRはRT-PCRで陽性バンドが得られなかった時にのみ実施する。

(1) 必要な試薬類

- ・ 2nd(Semi-nested)-PCR プライマー：下表の配列のものをメーカーに合成依頼する。通常合成されたプライマーは乾燥状態で納品されるので，dDW等で溶解し使用する（ストック液は10pmol/μLに調製し，小分けし冷凍保存する）。

Nested-PCR プライマーの配列

プライマー名	配列
SVCV F1	5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3'
SVCV R4	5'-CTG GGG TTT CCN* CCT CAA AGY* TGY*-3'

ストック液は10pmol/μLに調製

- ・ Nested-PCR 反応液：Takara EX *Taq* HS を用いて，使用する直前に所定の濃度になるよう調製する。

2 nd-PCR 反応液の調製

試薬	(1 検体分)
10x EX <i>Taq</i> buffer	5.0μL
2.5mM dNTP mixture	4.0μL
dDW (滅菌超純水)	28.25μL
SVCV F1 primer(10pmol/μL)	5.0μL
SVCV R4 primer(10pmol/μL)	5.0μL
Takara EX <i>Taq</i> HS	0.25μL
合計	47.5μL

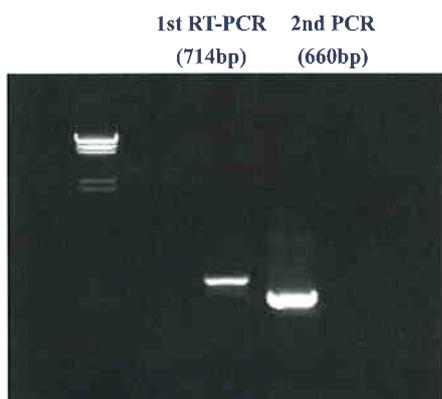
(2) 手技

- ① オートクレーブ処理した PCR チューブにサンプルの番号を記入し、準備する。
- ② Takara Ex Taq Hot Start Version を使用し、総サンプル分の PCR 反応液を調製する。
- ③ PCR 反応液 47.5 μ L を PCR チューブに分注する。
- ④ ここにサンプル(RT-PCR 反応液)2.5 μ L を PCR チューブに加える。ポジコンとネガコンを必ず作る。ポジコンにバンドが出ない、あるいはネガコンにバンドが出たら、やり直し。
- ⑤ チューブのキャップをしっかりと閉める。⑤
- ⑥ サーマルサイクラーのプログラムを開始し、94 $^{\circ}$ Cに達したところでポーズして止める。PCR チューブをセットし、蓋を閉め、再スタートさせる。

プログラム	
94 $^{\circ}$ C	30 秒
94 $^{\circ}$ C	30 秒
55 $^{\circ}$ C	30 秒
72 $^{\circ}$ C	1 分
} 30 サイクル	
72 $^{\circ}$ C	7 分, 4 $^{\circ}$ C保冷

(3) 2nd-PCR 増幅産物の電気泳動と判定

RT-PCR の方法に準ずる。目的増幅産物は 660bp である。また、増幅産物と電気泳動ローディングバッファーを混合する際、ローディングバッファー6 μ L を直接、反応終了後の PCR チューブに入れてもよい。



RT-PCR (左) および 2nd-PCR (右) による SVCV 核酸の増幅バンド。

判定：660bp の増幅産物を確認し、陽性と判定する。

5. 参考資料

- 1) バイオ実験イラストレイテッド③本当にふえる PCR, 秀潤社

- 2) Molecular Cloning(third edition) ,CSHL PRESS
- 3) Protocol for the proposed new confirmatory test for spring viraemia of carp, OIE 2004 proposal
- 4) The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses, spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses (1996) Bjorklund H.V. *et al. Virus Res.*, 42, 65-80.
- 5) Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp viruses and pike fry rhabdovirus isolates reveals four distinct piscine vesiculovirus genogroups (2002) Stone D.M. *et al. Dis. Aquat. Org.*, 53, 203-210.

平成 17 年 3 月

社団法人 日本水産資源保護協会

〒104-0054 東京都中央区勝どき二丁目 18 番 1 号

黎明スカイレジタルビル西館 303-2

TEL 03 (3534) 0681

FAX 03 (3534) 0684

<http://www.fish-jfrca.jp>