

PRDV検査におけるHot-Start-PCRとCool-Start-PCRの感度比較（短報）

濱田 豊市
(豊前海研究所)

Comparison of Hot-start-PCR and Cool-start-PCR Sensitivity in PRDV Inspection

Toyoichi HAMADA
(Buzenkai Laboratory)

現在、クルマエビ類の急性ウイルス血症（PAV；Penaeid acutu viremia）の迅速診断法の一つとして、各機関でPCR（polymerase chain reaction）法によるウイルス検査が実施されている。

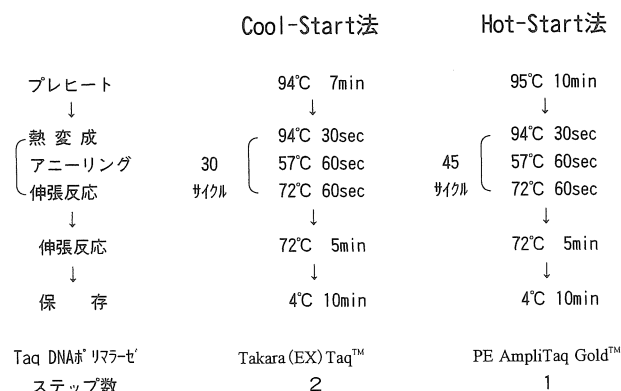
現法¹⁾の、Cool-Start法は2段階の増幅（2 Step-PCR）が必要であるため、1Step-PCRに比べコストが高く、2段階目となる再接種時に何等かの汚染（コンタミ）が生じる危険性もある。そこで、1Step-PCRで2 Step-PCRと同等の検査感度を得るために、増幅回数を増やすことができる耐熱性DNAポリメラーゼの特徴を利用するHot-Start-PCRを試験的に導入し、Cool-Start-PCRとの検査感度を比較した。

材料及び方法

Hot-Start-PCR（以下、H-Sと略記。）とCool-Start-PCR（以下、C-Sと略記。）のプロトコール（操作手順）を図1に対比させて示した。また、反応液の割合を表1に示した。

C-S法におけるTaq DNAポリメラーゼは、増幅サイクル後期になると熱により酵素の大半が失活してしまうため、その増幅可能回数には制限があるといわれている。一方、H-S法の耐熱性Taq DNAポリメラーゼは、増幅回数に合わせて活性が向上する特性を有しているので増幅回数を極限まで増やすことができるといわれている。したがって、目的増幅産物を多量に得るためには、C-S法は2ステップ（2段階）の増幅を必要とするのに対し、H-S法では1ステップでそれが可能である。

なお検査材料には、従来のC-S法で、1stでは陰性



* サーマルサイクラーは、パーキンエルマー社製（PCR System 2400）を使用

図1 プロトコールの違い（Hot, Cool-Start）

表1 反応液の割合（Hot, Cool-Start）

	Cool-Start法*1	Hot-Start法
滅菌蒸留水	79 μl	77 μl
10×反応バッファー	10 μl	10 μl
dNTP	8 μl	10 μl**2
プライマー	1 μl	1 μl
プライマー	1 μl	1 μl
Taq DNAポリメラーゼ*3	0.5 μl	0.5 μl

*1；水産庁研修による調整割合

*2；GeneAmp 10×PCR Buffer II & MgCl₂ Solution

*3；Hot-Start法；AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER)
Cool-Start法；Takara Taq™ (Takara)

でNested-PCRにおいてのみ陽性が確認された6社7種類の配合飼料及び1社4種類の原料（ただし、オキアミミールは試験的）を用いた。また、ヨシエビを用いて

配合飼料摂餌後の胃（内容物を含む）及び排泄物についても経時的に両方法による検査を行った。なお、試験に用いたヨシエビは、研究所内で種苗生産した平均全長が32.5mmのもの200尾で、1回当たりのサンプル数は10尾程度とした。試験中の飼育水温は21.0～21.1℃であった。

結 果

配合飼料及びその原料についてのPCR検査結果を表2に、示した。なお、陽性は1ポイント、陰性は0ポイントとし、感度を得点方式で集計した。同様に、配合飼料摂餌後の胃及び排泄物の経時的な検査結果を図2及び表3に示した。

表2に示したように、従来のC-S法のNested-PCRで配合飼料については5種類（4社）、原料についてはエビ殻ミールのみが陽性が見られ、7点であった。また、H-S法でも、同点の結果（7点）が得られた。

表2には、C-S法のNested-PCRでは5点であるのに対し、H-S法では7点とC-S法より高い得点が得られた。

考 察

C-S法とH-S法の検査感度得点の比較を表2、3の合計点でみると、H-S法は14点で、C-S法は12点とH-S法が2点多く、検査感度が優れていると考えられた。また、DNA増幅時間だけをとってみても、C-S法が1ラウンド2時間を2回実施するため、4時間程度を要するのに対し、H-S法では、一度の3時間程度と約1時間の短縮となり、二次増幅を実施する必要がないことからコンタミの危険性もなくなり、使用器具についても一度で済むため節約できる等、副次的効果も期待される。

以上のことから、現在実施しているPRDV（Penaeid rod shaped DNA virus）のDNA検出を目的としたPCR検査においては、同じプライマーを使用するという条件下では、H-S法の方がより簡便で感度も優れていると考えられた。

文 献

- 1) 木村武士ら；PCR法におけるPRDVの検出．魚病研究，31，93-98（1996）

表2 C-S法とH-S法の配合飼料と原料のPCR検査結果

サンプル	区 分	方 法	
		Cool-Start 段 階 プライマー	Hot-Start ネステッド 1st 3-4
ネガティブコントロール		-	-
配合飼料1	A社	+	+
配合飼料2	A社	+	+
配合飼料3	B社	-	-
配合飼料4	C社	+	+
配合飼料5	D社	+	+
配合飼料6	E社	-	-
配合飼料7	F社	+	+
原料1 魚粉	F社	-	-
原料2 イカミール	F社	-	-
原料3 エビ殻ミール	F社	+	+
原料4 オキアミミール	F社	-	-
配合飼料7'	F社	+	+
得 点		7	7

表3 C-S法とH-S法による胃と排泄物のPCR検査結果

サンプル	区 分	方 法		
		Cool-Start 段 階 プライマー	Hot-Start ネステッド 1st 3-4	
ヨシエビ(胃)	給餌前	-	-	
	給餌後	0時間	-	+
		1時間	+	+
		3時間	-	-
		6時間	+	+
		12時間	-	-
		20時間	-	-
		32時間	-	-
44時間	-	-		
ヨシエビ(排泄物)	給餌後	0～1時間	+	+
		1～3時間	+	+
		3～6時間	-	+
		6～12時間	+	+
		12～20時間	-	-
		20～32時間	-	-
		32～44時間	-	-
得 点		5	7	

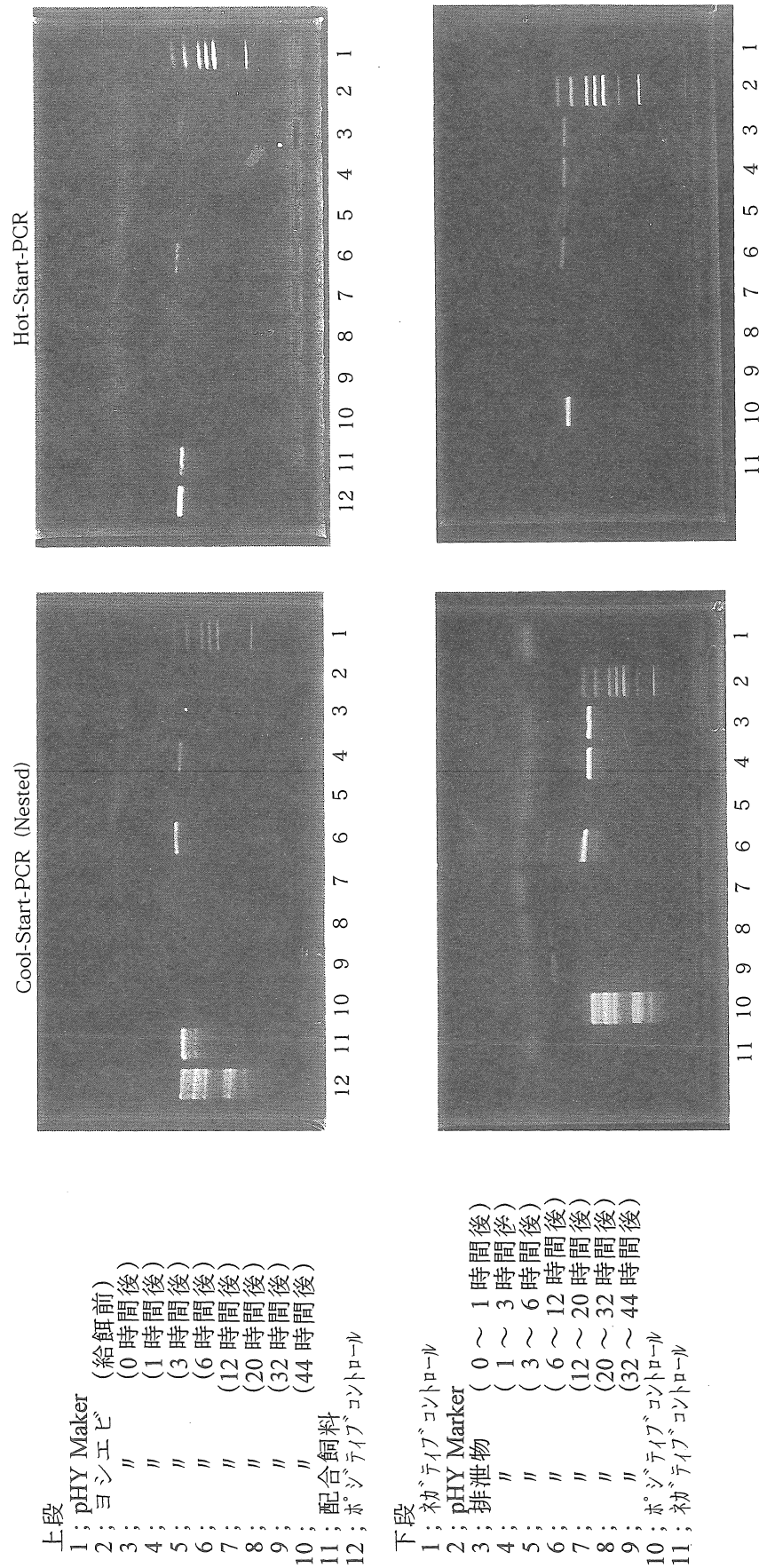


図2 PCR検査 (電気泳動) 結果