

蛍光プローブ PCR 法 (TaqMan システム法) による PRDV の検出

筑紫 康博・岩渕 光伸・白石 日出人
(研究部)

Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by Fluorescent Probe PCR

Yasuhiro CHIKUSHI, Mitunobu IWABUCHI and Hideto SHIRAISHI
(Research Department)

現在、クルマエビ類の生産に関係するほとんどの都道府県研究機関においては、クルマエビの急性ウイルス血症(PAV)への感染の有無を確認するために、PCR法による検査が行われている。

本県においても、PAV防疫・指導體制の一環として、1996年以降、種苗生産から中間育成・放流までの間、数回にわたってPCR法による検査を実施している。

この検査の手順として、1)検体からウイルスDNAを抽出する。2)抽出したウイルスDNAを鋳型としてPCR反応を行う。3)反応液を電気泳動ゲルにピペッティングし、泳動する。4)ゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、UVランプ上で観察する。さらに、5)増幅産物を鋳型として、Nested反応を行い、再び3)~4)の操作を行う。という一連の作業が必要である。

このように本法では、検査結果を得るために煩雑で長時間にわたる操作を要し、また、大量の検体の処理にも難点がある。

しかし、実際の育成現場では、PAV感染の有無を速やかに判断する必要に迫られることが多く、検査の現状を改善する方法として、今回、PCR反応増幅産物の確認段階において、より簡便で迅速性のあるABI PRISM 7200 Sequence Detectorを用いた蛍光プローブPCR法^{1,2)}によって、PRDV(クルマエビ類の桿状DNAウイルス)の検出を行ったところ、その有効性について新たな知見を得たので報告する。併せて、この検出法を用いて実際の検体検査を行ったので結果を報告する。

材料及び方法

従来のPCR法では、プライマー対に挟まれた遺伝子

中の標的領域を増幅し、その増幅産物を電気泳動後、染色し、UVランプ上で泳動像を観察することによって確認している。

蛍光プローブPCR法は、この標的領域の中にさらに、蛍光プローブをアニーリングさせる。PCR増幅の伸張反応に伴って、プローブが切断され、それによって蛍光値が増大する。これを蛍光光度計で測定することによって、PCR増幅反応の陽性、陰性を判定するというものである。

1. プライマー及びプローブの設計

木村らが明らかにしたPRDVのDNA配列³⁾をもとに、PRDV検出に適用できるプライマー及びプローブの組み合わせを、TaqMan Probe 検索用ソフトウェアABI PRISM Primer Expressによって検討し、候補を選出した。それぞれの組み合わせを用いて、病エビ由来のDNA液からのPRDVの検出を試みた。

蛍光プローブPCR法の反応時間は、初回のステップは、50℃で2分、95℃で10分とし、次のステップは、熱変性95℃で15秒、アニーリング及び伸張反応60℃で1分の40サイクルとした。反応液の量及び組成については、反応液量50 μ l、組成はTaqMan Universal PCR Master Mix (2 \times) 25 μ l (最終濃度3.5mM MgCl₂, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.4mM dUTP, 0.5unit AmpErase UNG, 1.25unit AmpliTaq Gold, 1 \times Optimized Buffer)、各プライマーは200nM、プローブ(Single Reporter (FAM))は100nM、DNA液を5 μ lとした。

PCR反応の前後に、ABI PRISM 7200 Sequence Detectorによって蛍光強度の測定を行い、増幅の有無の判定を行った。(図1)

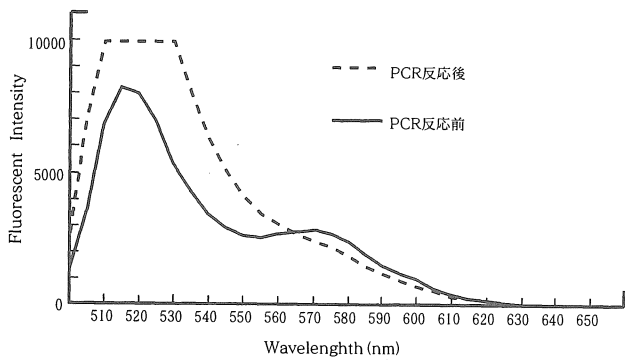


図1 蛍光強度の測定結果

2. PRDV 検出感度の検討

病エビ由来の階段希釈した DNA 液（濃度未知）を用いて、木村らの方法に準じた従来の PCR 法（以下 Nested PCR 法という。）と蛍光プローブ PCR 法の両方で同時に検出を試みた。DNA 液の希釈倍率は 1～1010 であった。

Nested PCR 法の反応時間は、最初の熱変成を、94℃で7分とし、以後は、熱変性94℃で30秒、アニーリング57℃で1分、伸張反応72℃で1分の30サイクルとした。反応液の組成については、木村らの方法に準じて、10mM トリス塩酸、pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.25mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、0.125unit Takara Taq とし、各プライマーは、500mM、DNA 液は1μl とした。反応液量は50μl、プライマーは表1のとおりである。

P1とP2のプライマーによって PCR を行い、さらに

表1 PCR 法におけるプライマーの塩基配列

Name	Sequence
P 1	5'-ATCATGGCTGCTTCACAGAC-3'
P 2	5'-GTGGCTGGAGAGACAAGAC-3'
P 3	5'-TCTTCATCAGATGCTACTGC-3'
P 4	5'-TAACGCTATCCAGTATCACG-3'

この反応液について、P3とP4のプライマーによって Nested PCR を行った。それぞれの増幅反応終了後は、反応液の10μlについて2%TAE（40mM トリス酢酸、1 mM EDTA, pH8.0）アガロースゲルとバッファ液を用いて電気泳動を行い、泳動バンド（増幅断片）を確認した。

蛍光プローブ PCR 法の反応時間、増幅の確認は、前述のとおりである。

3. 現場での PAV 検査への応用

クルマエビ、ヨシエビについて、栽培漁業公社から入手した親エビ、稚エビ及び中間育成中の種苗の検査を蛍光プローブ PCR 法によって行った。

結 果

1. プライマー及びプローブの設計

検索によって AB 2組の候補を選出した（表2）。A区では反応前後の蛍光強度に変化は見られず、陽性とする事ができなかった。しかし、この反応液で電気泳動を行ったところ、増幅断片が出現し、増幅反応が行われていることが確認された。B区では、蛍光強度の変化がみられ、陽性を検出することができた。よって、以後はB区のプライマーとプローブの組み合わせを用いて試験を行った。

2. PRDV 検出感度の検討

検出感度の比較結果を図2に示した。

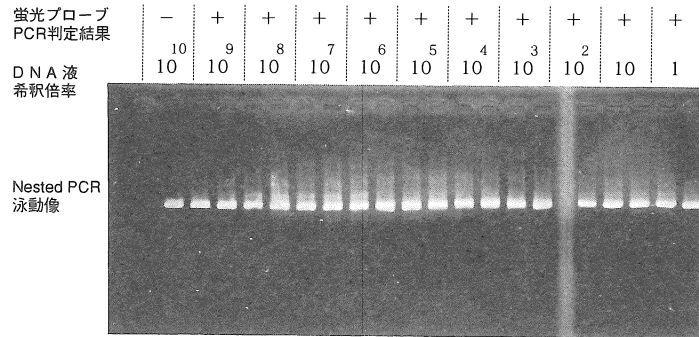
Nested PCR 法では、109の希釈倍率まで増幅産物が確認され、蛍光プローブ PCR 法での検出も同じ結果となった。このことから、B区のプライマーとプローブを用いた蛍光プローブ PCR 法は従来法と同等の検出感度であることが確認された。

3. 現場での PAV 検査への応用

1998年8月から11月までの期間に、230検体、12回の検査を蛍光プローブ PCR 法によって行った。そのうちヨシエビの親エビから6検体の陽性が確認された。この検査において、一度に、88検体までの検査が可能であり

表2 蛍光プローブPCR法におけるプライマーとプローブの組合せ候補

Group	Primer	Probe
A	Name Sequence	PRDF-471F 5'-TCGTCGTCATACTCAGTAGCGTCT-3'
	Name Sequence	PRDF-496T 5'-CCTCCTTCGCCTCCTGTTCCTCTTTCTT-3'
B	Name Sequence	PRDF-550R 5'-GTGAAGGAAGCAGCAGCAGAA-3'
	Name Sequence	PRDF-521T 5'-CTTTTCTTCTTCTGCTGCTTTCCTTCAC-3'
	Name Sequence	PRDF-475F 5'-CGTCATACTCAGTAGCGTCTCC-3'
	Name Sequence	PRDF-597R 5'-CTGCCGTTAAGAAGGTGAAGC-3'



(図2 蛍光プローブPCR法とNested PCR法の比較)

(96穴プレート中、陰性対照6検体、陽性対照2)、PCR 反応開始から結果を得るまでに要した時間は、約2時間であった。

考 察

プライマー及びプローブの設計実験において、A区では、PRDVの検出ができなかったが、これは、プローブの2次構造等の不適合、あるいは、プローブの位置がプライマーと極めて近接していたため、これが、プローブのアニーリングを阻害したと考えられた。

また、PRDV 検出感度の比較実験において、蛍光プローブPCR法の検出感度は、Nested PCR法と同等で有効であり、今後さらにプライマー・プローブの候補や最適なプライマー・プローブ濃度を検討することによって、より高い検出感度を得る可能性があると考えられる。

さらに、従来の検査法では、PCR 反応のみで5時間以上を要していたのに対して、本法では約2時間で最終的な結果を得ることが可能となった。

また、従来法でも、92検体までの検査は可能であったが(96穴プレート中、陰性対照2検体、陽性対照2)、さらに、Nested PCRを行うための、反応チューブへのピペッティング、ゲルでの電気泳動、増幅産物の確認の作業と、煩雑な操作を必要としていた。しかし、本法では、初回のサンプルDNA液のピペッティングのみで操作が大幅に簡便化された。

80~90検体の検査を実施する場合、DNA液の反応チューブへの1回のピペッティングに30~50分、ゲルのウェルにサンプルを入れるために約30~50分、電気泳動・増幅産物の確認に約30~40分を要する(一つの装置で泳動

できるサンプル数も約15検体と限られる。)ので、従来法ではDNA液から結果が得られるまでの時間は、約6時間半~7時間半以上であるが、本法では現場でのPAV検査結果に見られるように、約2~3時間となった。

このように、この検査法を採用したことによって、大量の検体を簡便、迅速に処理できるようになり、検査労力の大幅な軽減が図られた。

中でも特に、種苗生産の現場では、大量の検体を迅速に検査する必要がある、これで、人的・時間的制約によってできなかった検査についても実施可能となった。現在、より一迅速な検査結果を必要とする採卵時の検査体制への応用を検討している。また、クルマエビ中間育成場の周辺に生息する生物等のスクリーニングを実施中である。

要 約

- 1) 蛍光プローブPCR法 (TaqMan システム法) によるPRDV 検出が、従来法と同等の検出感度で可能となった。
- 2) 本法によって、PCR 増幅及び増幅産物の確認までに要する時間が大幅に短縮された。
- 3) 本法を用いることによって、大量の検体を簡便、かつ迅速に処理できるようになった。

文 献

- 1) Holland P. M. , Abramson, R. D. , Watson, R. and Gelfand, D. H : Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the

- DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S), 88, pp. 7276-7280(1991).
- 2) 木村凡：蛍光プローブ PCR (TaqMan™ システム法) による食中毒迅速検出法, 月刊フードケミカル2月号, 106-110 (1997) .
- 3) 木村武志・山野恵祐・中野平二・桃山和夫・平岡三登里, 井上潔：PCR 法による PRDV の検出. 魚病研究, 31 (2) , 93-98 (1996) .