

PCR検査法におけるPAV病原ウイルスPRDVのDNA増幅条件

筑 紫 康 博
(筑前海研究所)

Amplification Condition of PRDV-DNA by PCR

Yasuhiro CHIKUSHI
(Chikuzenkai laboratory)

クルマエビ、ヨシエビは本県の重要な栽培漁業種であり、県栽培漁業公社での種苗生産から各漁協施設での中間育成・放流まで、一連の事業化がなされている。

しかし、1995年にクルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) が、県内のクルマエビ中間育成場に初めて発生し、大きな被害を与えたこと¹⁾は、その後の栽培漁業の推進を左右しかねない脅威となった。このため、'96年から本県では、この疾病の防止のために、全県的な防疫体制を組み、クルマエビ、ヨシエビの種苗生産や中間育成施設の消毒と、PCR法による種苗のウイルス検査を実施している。このうち、PCR検査については、親エビをはじめふ化幼生から放流直前の種苗までの各段階で多数回の検査を実施し、原因ウイルスであるPRDVの有無を確認している。ウイルスが確認された場合は、いずれの段階であっても全て殺処分することとしている。

これらの防疫体制を円滑に実施するためには、PCR検査の迅速性と検査時間の短縮が必要であり、また、検査自体は検出感度が高く確実なものでなければならない。しかし、本県で使用しているサーマルサイクラーは、検査法が開発された²⁾ものとは機種が異なるため、本機種での最適なDNA増幅条件を知る必要が生じた。そこで、反応時間と温度について、種々の検討を行ったところ、短い反応時間で最適な増幅を行うことができる十分条件が明らかになったので報告する。

方 法

使用したサーマルサイクラーはパーキンエルマー社のGeneAmp PCR System 2400である。

鋳型DNA液 (増幅しようとするDNAサンプル) には、

病エビ由来の濃淡2種のDNA抽出液 (DNA濃度未知) を用いた。この2つのサンプルは、全ての設定条件において、同時に用い、濃淡の比較対象とした。

反応時間は、熱変性30秒、アニーリング1分、伸張反応72℃・1分、サイクル数は30とした。設定温度は、従来の方法²⁾による条件 (熱変性93℃、アニーリング57℃) を基準に、熱変性93、94、95℃、アニーリングを55、56、57、58℃と条件をかえて増幅を行い、それぞれの条件で得られた増幅断片の出現や明瞭さの有無を比較し、最適な温度条件を検討した。

さらに、最適な温度条件を特定した後は、反応に要する時間を縮小するために、熱変性30秒、1分、アニーリング30秒、1分、1分30秒、伸張反応30秒、1分と条件をかえて同様に増幅断片を比較し、最適な反応時間を検討した。

反応液の量と組成及びプライマーについては、既報の木村らの方法²⁾に準じて、反応液量を100 μ l、組成は、10mMトリス塩酸、pH8.3、50mM KCl 、1.5mM MgCl_2 、0.2mM dNTP 、ポリメラーゼ (Takara Taq) 2.5unit、各プライマーは500nMとした。増幅反応終了後は、反応液の10 μ lについて2%TAE (40mMトリス酢酸、1mMEDTA、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。

結 果

反応設定条件を表1に、各設定条件における増幅断片像を図1に示した。

薄い鋳型DNA液を用いて反応を行うと増幅の差異が

表1 PRDV-DNAのPCR検査における増幅の試験条件

鋳型DNA液No.		熱変性		アニーリング		伸張反応	
うすい	こい						
1	11	93℃	1分	57℃	1分30秒	72℃	1分
2	12	93℃	30秒	57℃	1分	72℃	1分
3	13	94℃	30秒	55℃	1分	72℃	1分
4	14	94℃	30秒	56℃	1分	72℃	1分
5	15	94℃	30秒	57℃	1分	72℃	1分
6	16	94℃	30秒	58℃	1分	72℃	1分
7	17	95℃	30秒	57℃	1分	72℃	1分
8	18	94℃	1分	57℃	1分30秒	72℃	1分
9	19	94℃	30秒	57℃	30秒	72℃	1分
10	20	94℃	30秒	57℃	30秒	72℃	30秒

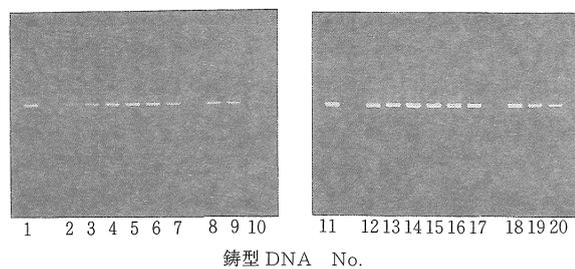


図1 各設定条件における増幅断片像

明瞭になった。

熱変性温度を93℃から94℃とすると、増幅断片が明瞭となった。しかし、94℃と95℃との大きな差異は見られなかったが、94℃で最も明瞭であった。アニーリング温度は、55℃から56℃とすると増幅断片が明瞭となった。56～58℃では大きな差異は見られなかったが、57及び58℃で最も明瞭となった。また、検討した反応時間の中では、熱変性30秒、アニーリング1分、伸張反応1分では、熱変性1分、アニーリング1分30秒、伸張反応1分としたときと同等の十分な増幅が見られた。しかし、アニーリングを30秒としたときの増幅は不十分であった。

これらのことから、当該機種によってPRDVのPCR検査を行う場合のDNA増幅条件は、熱変性94℃・30秒、アニーリング57または58℃・1分、伸張反応72℃・1分

の増幅条件が適当という結果になった。従来は、熱変性93℃・1分、アニーリング57℃・1分30秒、伸張反応72℃・1分の条件で検査を行っていたが、これにより検査時間の短縮と感度の向上を図ることができた。

考 察

本県のサーマルサイクラーを用いてPRDVのPCR検査を行う場合、従来の方法に比べて、熱反応・アニーリングが短い時間で十分で、設定温度も異なることが明らかとなった。これらの要因は、当該機種が、ヒートブロック（反応チューブが密着するような穴の空いた加温・冷却機能のあるブロック）の温度（検査法開発機種）ではなく、サンプル自体の温度で温度制御を行うものであることから、温度制御の精度や反応時間の違いが増幅条件の違いとして現れたものと考えられる。

クルマエビやヨシエビの栽培漁業を実際に進めていく上で、PAVの防疫体制をさらに実のあるものとするためには、PCR検査法におけるPRDVの検出限界を把握しておく必要がある。さらには、今後DNA抽出からの一連の操作の中で、検出限界をあげるとともに、サイクル数の検討など、作業時間の短縮も図る必要がある。

要 約

- 1 パーキンエルマー社のサーマルサイクラー「Gene Amp PCR System2400」を用いて、PCR検査におけるPRDVのDNA増幅条件を検討した。
- 2 熱変性94℃・30秒、アニーリング57または58℃・1分、伸張反応72℃・1分の増幅条件が適当であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 佐々木和之, 大津隆一, 的場達人: 陸上中間育成施設で発生したクルマエビのRV-PJによる疾病, 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 25-29 (1996)
- 2) 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).