

こんなシチュエーションにもリアルタイム PCR 検出

蛍光物質を使用して PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし解析するリアルタイム PCR 法は、検出感度が高いこと、従来の PCR 法のようにゲル電気泳動を必要とせず解析が閉鎖系で行えること、結果が数値データとして得られることなど、検査に適した多くの利点を有しています。さらに、装置と試薬さえあれば初心者でも気軽に始められる簡便性、反応開始から数時間で結果判定ができる迅速性、検査で重要視される反応特異性の高さから、現在では食品検査や微生物検査などにおいても一般的な手法として普及しつつあります。特に、ターゲット遺伝子に特異的なプローブを用いる特異性の高い検出方法は、近縁種の存在する病原微生物の検出や加工食品での肉種判定などにも利用でき、今後ますます幅広い分野での応用が期待されます。

本稿では、非常に特異性の高いサイクリングプローブ法を用いた CycleavePCR® 試薬による、さまざまなシチュエーションでのリアルタイム PCR 検出例をご紹介します。

■ ドライソーセージから原料肉種を判別

CycleavePCR® 肉種判別キット (6 種) は、ミトコンドリア DNA 上にある cytochrome c oxidase subunit I (cox I) 遺伝子領域の動物種間の多型をもとにして、原料肉のウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ウサギの 6 種の種判別を行うためのキットです。ここでは、DNA 調製キットである FastPure® DNA Kit を使用して加工食肉製品のドライソーセージから DNA 調製を行った後、リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice® Real Time System を使用して Plus/Minus Assay により含有肉種の判別を行った例をご紹介します。

【方法】

ドライソーセージ 10 mg から、FastPure® DNA Kit (動物組織からの DNA 抽出プロトコールで実施) を用いて DNA 調製を行い、24.4 ng/μl の濃度で DNA サンプルを得た。これを 2 ng/μl 濃度に調整し、CycleavePCR® 肉種判別キット (6 種) の反応に 5 μl を使用して (10 ng/反応)、肉種判別を行った。

【結果】

ドライソーセージの製品に記載されている原材料のうち、食肉原材料は畜肉 (豚肉、マトン、牛肉)、鶏肉となっており、今回の判定結果ではこれら 4 種類のシグナルが確認されました (図 1)。このように、FastPure® DNA Kit により加工食肉製品から簡単に DNA を調製することができ、CycleavePCR® 肉種判別キット (6 種) を用いることで、迅速に原材料肉の肉種を判定できることが確認できました。

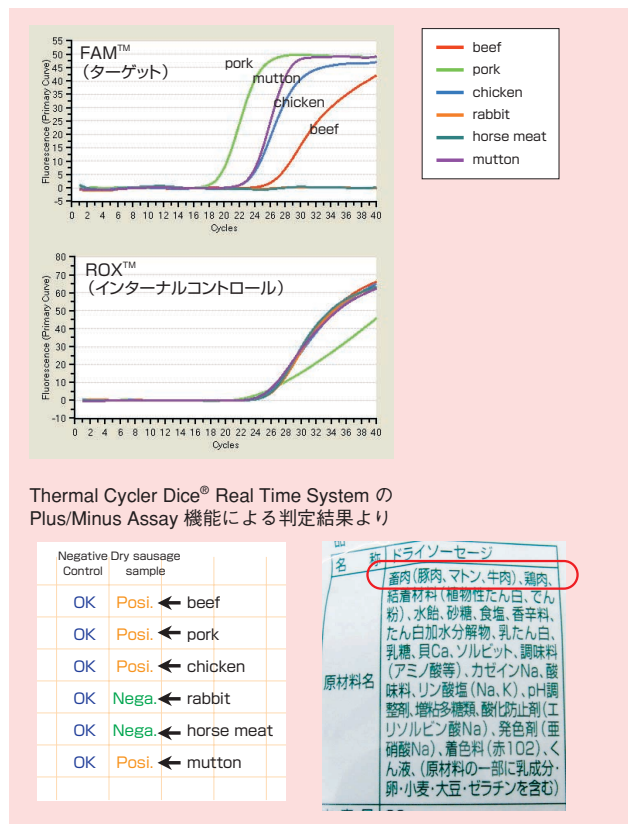


図 1 Thermal Cycler Dice® Real Time System と CycleavePCR® 肉種判別キット (6 種) を用いたドライソーセージサンプルの肉種判別結果

■ 上咽頭拭いサンプルから呼吸器系感染症起因ウイルスを検出

呼吸器感染症の原因ウイルスは、臨床症状だけでは特定が難しく、同定のために血清学的検査など時間を要する検査が必要です。CycleavePCR® 呼吸器系感染症起因ウイルス検出キットは、北里大学北里生命科学研究所 生方公子教授監修の下に開発された製品で、呼吸器系感染症の原因となるウイルスを迅速に検出することができます。

11 種類の呼吸器系感染症原因ウイルス:

- Human respiratory syncytial virus subtype A (RS ウイルス A 型)、
- Human respiratory syncytial virus subtype B (RS ウイルス B 型)、
- Human parainfluenza virus 1 (パラインフルエンザウイルス 1)、
- Human parainfluenza virus 2 (パラインフルエンザウイルス 2)、
- Human parainfluenza virus 3 (パラインフルエンザウイルス 3)、
- Human metapneumovirus (メタニューモウイルス)、
- Influenza A virus (インフルエンザウイルス A)、
- Influenza B virus (インフルエンザウイルス B)、
- Human adenovirus (アデノウイルス)、
- Human bocavirus (ボカウイルス)、
- Human rhinovirus (ライノウイルス) を検出可能です (表 1)。

表1 CycleavePCR® 呼吸器系感染症起因ウイルス検出キットを用いて検出できるウイルス

Probe/Primer Mix	FAM™フィルター	ROX™フィルター
Mix-1	RS ウイルス A 型	RS ウイルス B 型
Mix-2	パラインフルエンザウイルス 1	パラインフルエンザウイルス 2
Mix-3	メタニューモウイルス	パラインフルエンザウイルス 3
Mix-4	インフルエンザウイルス A	インフルエンザウイルス B
Mix-5	アデノウイルス	ボカウイルス
Mix-6	ライノウイルス	—

調製した核酸サンプル*からキット添付の酵素を用いて逆転写反応を行った後、1サンプルについて6種類のProbe/Primer Mixを使用してリアルタイムPCR反応を行い、それぞれの蛍光シグナル (FAM™、ROX™) より、11種類のウイルスの検出を行います。図2で用いたサンプルでは、Probe/Primer Mix-3を使用したリアルタイムPCRでFAM™のシグナルが確認され、Human metapneumovirus (メタニューモウイルス) の存在が示されました。

*:本キット使用時にはサンプルから全核酸調製キット (RNAおよびDNAを同時に調製できる試薬:東ソー EXTRAGEN II など) を用いてDNA/RNAを調製する必要があります。

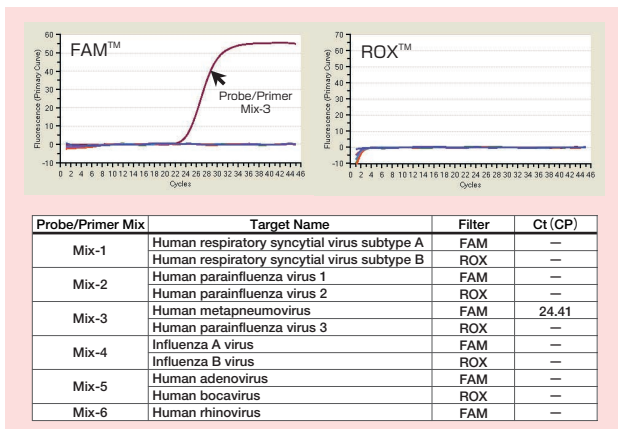


図2 Thermal Cycler Dice® Real Time System を用いた呼吸器系感染症起因ウイルスの検出

また、本キットと CycleavePCR®呼吸器系感染症起因菌検出キットを組み合わせることで、呼吸器系感染症の原因となる細菌、ウイルスの検出を併せて行うことができます。

■ 血液サンプルを用いてウシ白血病ウイルスを検出

新発売の CycleavePCR® ウシ白血病ウイルス (BLV) 検出キットは、ウシの血液や乳汁のBリンパ球のDNAにプロウイルスとして組み込まれるレトロウイルス、ウシ白血病ウイルス (bovine leukemia virus : BLV) を検出するキットです。日本におけるウシ白血病ウイルスの感染率は約20%と言われており、感染してから発症までが5~10年以上と長く、また、治療法が確立されていないことから、このウイルスが引き起こす畜産農家への経済的損失は非常に深刻な問題となっています。

本キットは、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所との共同研究の成果に基づき、タカラバイオが製品化しました。ウシの血液より調製したDNA

を鋳型として使い、ウシ白血病ウイルスの tax 遺伝子をターゲットとするプライマーとプローブ (FAM™ 標識) でリアルタイムPCR検出を行います。キット添付の Positive Control を段階希釈したものを鋳型としてリアルタイムPCRを行い検量線を作成することで、反応に使用したサンプル中のウシ白血病ウイルスのコピー数 (概算) を算出することもできます。図3の反応例では、Positive Control 段階希釈液による増幅曲線、それより作成した検量線、およびサンプルでの増幅曲線を示しています。

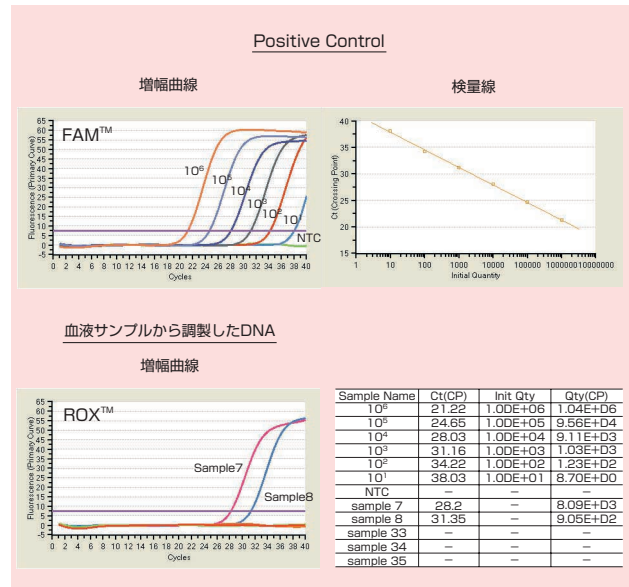


図3 Thermal Cycler Dice® Real Time System での増幅曲線と検量線