

二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス, A型肝炎ウイルス等の食品媒介性ウイルス。

2) 対象食品

二枚貝(原則として, カキ)。

3) 本プロトコールの範囲

二枚貝(カキ)から遠心分離等によりウイルス粒子を分離, 濃縮し, RNA抽出のための試料を作製するまでの工程。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

高速冷却遠心分離機(16,000×g程度), 超高速冷却遠心分離機(220,000×g程度), ストマッカー, フィルター付き滅菌バッグ, ボルテックスミキサー, 振とう器付恒温水槽(または 37℃恒温器, ローテーター), ヘラ, ハサミ, メス, ピンセット, マイクロピペットおよびチップ(1000 μl), ピペット(10ml), 微量遠心管(1.5ml), 遠心管(15~50ml程度), 超遠心分離用遠心管(12ml程度)

2) 試薬

リン酸緩衝液(PBS(-), 高圧滅菌済), αアミラーゼ(和光純薬, 013-03732), ポリエチレングリコール 6,000, 塩化ナトリウム(NaCl), 30%(w/v)ショ糖溶液(高圧滅菌済), 遺伝子解析用蒸留水(滅菌済, DNase 活性および RNase 活性が認められないもの)

3. 操作法

- ① 殻付き貝類はヘラ, メス等で貝柱を切り, 殻を開く。貝の外套膜を取り, 次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をメス, ハサミ等で可能な限り取り除き, 中腸腺を取り出す。中腸腺を摘出する際はできる限り周りの白い組織(脂肪・グリコーゲン)を取り除く。
- ② ①の方法で, カキ5個体から, ほぼ同じ重さの中腸腺計2~5g程度をフィルター付き滅菌

バッグに採取し、中腸腺の重量を測定する。

- ③ 9 倍量の PBS(-)を加える。
- ④ ストマッカーで、1 分間処理し、乳剤とする(10%乳剤)。
- ⑤ 10%乳剤 1ml 当たり 2.5mg(例:20ml の場合:50mg)の α -アミラーゼを加え、よく混和した後、37°C、1 時間、振とう器付恒温水槽で、40 回/分程度の速度で振とうし、グリコーゲンの消化を行う。振とう器付恒温槽がない場合は、15 分毎に攪拌しながら、37°C恒温器中で 1 時間静置するか、あるいは乳剤液を遠心管に移し 37°C恒温器中でローテーターを用い 6 回/分程度で回転させる。
- ⑥ フィルター付き滅菌バッグからフィルター濾液約 12ml を遠心管に採取する。
- ⑦ 約 10,000~16,000×g, 20 分間、4°Cで冷却遠心分離する。
- ⑧ 沈殿物に注意して遠心上清(水層)10ml を採取する。

濃縮操作は、ポリエチレングリコールによる濃縮法または超遠心分離による濃縮法のいずれかの方法で行う。

	ポリエチレングリコールによる濃縮法	超遠心分離による濃縮法
⑨	⑧で採取した遠心上清 10ml を別の新しい遠心管に移す。	約 1ml の 30%ショ糖溶液を超遠心分離用遠心管の管底に入れる。
⑩	ポリエチレングリコール 6,000 を 1.2g, 塩化ナトリウムを 0.58g 加え、完全に溶解させる。	⑧で採取した遠心上清 10ml を、30%ショ糖溶液の上に静かに重層する。
⑪	約 10,000~16,000×g, 30 分間、4°Cで冷却遠心分離する。	約 200,000~220,000×g(スイングロータで 35,000rpm, アンクルロータで 47,000rpm 程度), 120 分間、4°Cで冷却遠心分離する。

- ⑫ 上清をほぼ完全に捨てて、沈渣のみとする。
- ⑬ 沈渣に 400 μ l の遺伝子解析用蒸留水*1を加え、ピペッティング等により再浮遊させる。使い捨てピペットを遠心管に入れた状態でボルテックスミキサーにかけると、再浮遊させやすい。
- ⑭ 再浮遊液を 1.5ml 遠心管に移し、再浮遊液の重量を測定する。得られた重量(g)を再浮遊液の容量(ml)とみなし、リアルタイム PCR 法等による RNA 定量値(コピー数)の算出の際に

用いる。

- ⑮ 再浮遊液を RNA 抽出材料とし、速やかに RNA 抽出を行う。直ちに RNA 抽出を行わない場合は、速やかに-30℃以下で冷凍保存する。

4. 備考

本プロトコールにおいて、遠心分離における条件は、最大遠心加速度(×g)で記載してある。

(注意)

*1:本ステップで用いる遺伝子解析用蒸留水については、SDS-トリス・グリシン緩衝液、その他について現在その有用性を検討中であり、今後変更される可能性がある。

作成日:平成 22 年 8 月 20 日