

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究部門

1. 検査の概要

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法は、糞便中に含まれる PCR 阻害物質の影響で検査結果が偽陰性となった場合に、インターナルコントロール (IC) の増幅を指標として確認することができる反応系となっている。リアルタイム PCR は蛍光色素 (ResoLight) を用いたインターカレーション法であり、DNA 産物の融解曲線解析により標的遺伝子および IC の増幅を確認する。IC を含む反応系であるため、判定は陽性/陰性の定性判定とし、DNA 量の定量はできない。なお、PCR の標的遺伝子はヨーネ菌 IS900 であるが、現行の確定診断法とは異なる位置にプライマーを設計している。

また、スクリーニング遺伝子検査は、個体別の糞便だけでなく、複数の糞便をプールしたプール糞便検体にも応用可能であり、効率的に牛群検査を行うことができる (図 1)。

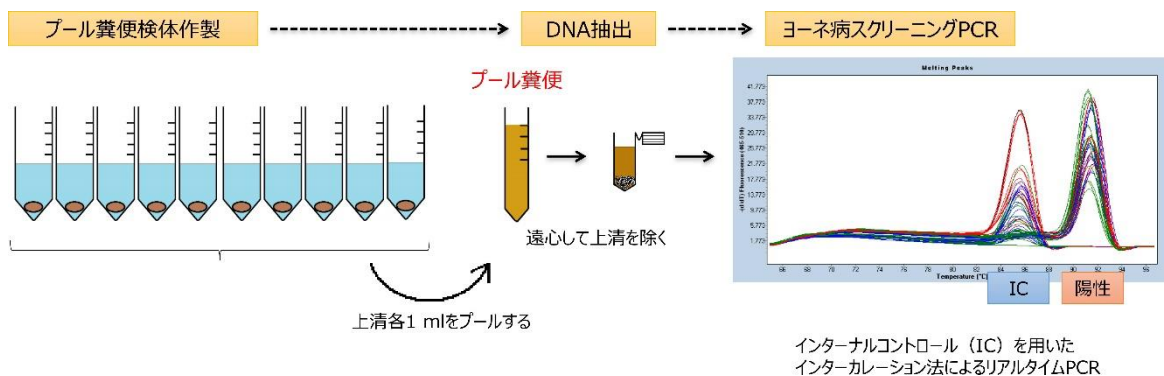


図 1. プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法の概要

2. 試薬・器具の準備

試薬類

- 1) ヨーネ菌 DNA 抽出キット「ヨースピン®ver2」 ((株)ファスマック) : 個別糞便使用
- 2) ヨーネ菌 DNA 抽出キット「ヨーフアース®」 (共立製薬(株)) : 個別糞便使用
- 3) ヨーネ菌 DNA 抽出キット「ヨネ・ピュアスピン」 ((株)ファスマック)
: 個別・プール糞便使用
- 4) ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査キット「ヨネプライマーセット RL」
(株)ファスマック)
- 5) ResoLight PCR 用反応液「GeneAce RL qPCR Mix with UNG」 ((株)ニッポンジーン)
- 6) 滅菌生理食塩水

器具機材類

1) リアルタイム PCR 装置

以下のリアルタイム PCR 装置について動作を確認している（表 1）。それ以外の機種については、参照陽性 DNA および陰性溶液（TE）を用いて、陽性および IC の解離温度を確認すること。

表 1. リアルタイム PCR 装置およびソフトウェア

メーカー名	機種名	備考
アジレントテクノロジー	Mx3000p	
アプライドバイオシステムズ	ABI7300	手動解析のみ可能
	ABI7500/7500Fast	解析には Software v2.0 以上を用いる
	StepOnePlus QuantStudio 3/5	
タカラバイオ	Dice TP800	
バイオラッドラボラトリーズ	iQ5	
	Chromo4	
	CFX96	
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 480	
	LightCycler 96	
	LightCycler nano	

2) 15 ml チューブ（プール検体作製用）

3) ビーズ式破碎装置

抽出キットにより使用可能装置および破碎条件が異なるので注意すること。

- ・ミニビードビーター（和研薬株式会社）
- ・マルチビーズショッカー（安井器械株式会社）
- ・シェイクマスター（株バイオメディカルサイエンス）
- ・シェイクマスターネオ（株バイオメディカルサイエンス）
- ・マイクロスマッシュ（トミー精工）
- ・ファーストプレップ（フナコシ）
- ・プリセリーズ 24（エムエス機器株式会社）
- ・その他、ビーズ式破碎機能を有する機器

4) 1.5 ml マイクロチューブ（DNA 低吸着チューブ）

5) ピペット、マイクロピペット、チップ（フィルター及び目盛り付き）等

6) PCR 用 96-well プレート及びキャップ（あるいはシール）

7) 遠心分離機（最高速度が 20,000×g 未満の機種については、最高速度で遠心分離を行い、遠心時間は以下の式を参考に算出する）

$$\text{遠心時間 (分)} = \frac{\text{プロトコール指定の遠心加速度 (×g)} \times \text{プロトコール指定の遠心時間 (分)}}{\text{実際の遠心加速度 (×g)}}$$

3. 検査方法

(1) プール糞便の作製および DNA 抽出

「ヨーネ・ピュアスピン」を用いるプール糞便検体からの DNA 抽出

1. 個体別に糞便およそ 1 g を 20 ml の滅菌蒸留水、あるいは滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合攪拌した後、30 分間静置する（個別糞便懸濁液）。
2. 1. で作製した個別糞便懸濁液上清のできるだけ上層部から 1.0 ml を採取し、新しい 15 ml チューブへプールする（プール検体）。プール数は 10 検体までとする。
3. 遠心（900×g、30 分間、室温）し、上清を 1.5 ml 残して除去した後、沈渣を残した上清で再懸濁する。
4. 2.0 ml チューブ（ビーズチューブ）に 3. の懸濁液を全量移し、遠心（20,000×g、5 分間、室温）した後、上清を除去する。
5. 400 μl の抽出液①-A を添加する。
6. ビーズ式破砕機に 5. のチューブをセットし、良く破砕する（破砕条件は下記の付記 1 参照）。
7. 遠心（20,000×g、5 分間、室温）し、上清を新しい 1.5 ml チューブへ移す。この際、多少ビーズを吸っても構わないので、上清はできるだけ多く回収する。
8. 200 μl の抽出液①-B を添加し、よく混和する。
9. 75 μl の抽出液②を添加し、直ちに 10~12 回チューブを転倒し、よく混和する。
10. 遠心（20,000×g、10 分間、室温）する。
11. 上清 500 μl を新しい 1.5 ml チューブに移す。
12. 400 μl の吸着液③を添加し、よく混和する（ピペッティングあるいは転倒混和後スピンドウン）。
13. 12. の混合液 900 μl をスピнкаラムに移し、遠心（13,000×g、60 秒間、室温）する。その後、スピнкаラムを新しいコレクションチューブにセットする。
14. 600 μl の洗浄液④を 13. で使用したスピнкаラムに添加した後、遠心（13,000×g、60 秒間、室温）する。
注）遠心後、洗浄液④がカラム内に残っている場合は、再遠心して完全に除去する。
15. スピнкаラムを新しい 1.5 ml チューブにセットする。
16. 50 μl の溶出液⑤をスピнкаラムに滴下した後、3 分間室温で静置する。
17. 遠心（13,000×g、60 秒間、室温）し、濾液を回収する。

注）抽出液①-B および吸着液③については、あらかじめチューブに分注しておくことも可能

（付記 1.）ビーズ式破砕装置及び処理時間：

・マルチビーズショッカー	4,000 rpm	2 分
・シェイクマスターネオ	1,500 rpm	15 分
・マイクロスマッシュ	4,600 rpm	3 分
・ファーストプレップ	6 m/sec	90 秒（45 秒×2）

(2) 個別糞便からの DNA 抽出

個別糞便の場合は、DNA 抽出キットとして「ヨーネスピン®ver2」、「ヨーネファース®」、「ヨーネ・ピュアスピン」が使用可能である。各キットの操作方法については、添付の取扱説明書ならびにヨーネ病検査マニュアルを参照する。

なお、個別糞便懸濁液は、プール糞便用に(1)-1. で作製したものを使用してもよい。その場合、懸濁液は 4℃で保存（2 週間以内）し、DNA 抽出操作の直前に vortex 等で攪拌後 30 分間静置してから上清を採取する。長期保存の場合は、(1)-1. で作製した糞便懸濁液の上清を採取して-20℃で保存する。

注）4℃に保存した糞便懸濁液は、培養検査には使用できない。

(3) リアルタイム PCR 検査 (スクリーニング PCR)

1) 反応液の調製

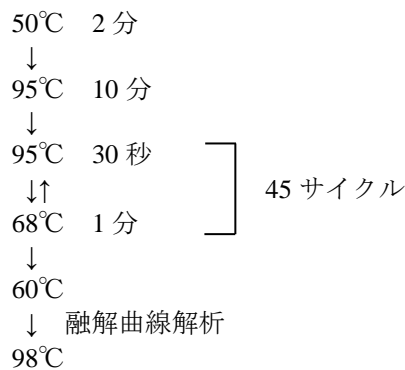
① 1 サンプルあたり以下のように反応液を調製する。

核酸増幅試薬 (2×GeneAce RL qPCR Mix)	25.0 μl
プライマー (IS900-3)	1.0 μl
プライマー (IS900-32)	1.0 μl
インターナルコントロール (3-32 IC)	1.0 μl
ウラシル - N - グリコシラーゼ (UNG)	0.5 μl
リボヌクレアーゼフリー水	16.5 μl
合計	45.0 μl

- ② 反応液を 1 well あたり 45 μl ずつ分注し、そこへ糞便抽出 DNA 液 5 μl を添加してマイクロピペットでよく攪拌する (50 μl / well)。
- ③ 2 種類の添付指示陽性 DNA (強陽性(SPC)および弱陽性(WPC))、および陰性溶液 (TE) 各 5 μl を反応液に添加し、よく攪拌する。
- ④ キャップ、あるいはシールを用いて密封した後、ヨーネ菌遺伝子の増幅を行う。

2) 反応条件

リアルタイム PCR 装置を用いて、PCR 条件を以下のように設定する。蛍光色素は SYBR green I あるいは FAM を選択する。融解曲線解析は使用機種 of 自動設定とする。



3) 試験成立条件

試験成立条件は以下のとおりとする。

- ① 指示陽性 DNA (強陽性) : 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において陽性の解離温度の範囲内にピークを認める。
- ② 指示陽性 DNA (弱陽性) : 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において陽性および IC の解離温度の範囲内に二峰性のピークを認める。
- ③ 陰性溶液 (TE) : 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において IC の解離温度の範囲内にピークを認め、かつ陽性ピークを認めない。

リアルタイム PCR 終了後の解析は、基本的に使用機種 of 自動設定で行う。ただし、アプライドバイオシステムズ of リアルタイム PCR 装置を使用するときは、パッシブプリファレンスダイを (none) とし、ROX による補正を行わない設定で解析する。また、リアルタイム PCR の機種によっては複数の解離温度を自動検出できないものがあり、手動での解析が必要となる (別紙参照)。

各リアルタイム PCR 装置における解離温度については表 2 を参照すること。また、参考として、典型的な融解曲線解析のグラフを下図に示す (図 2)。

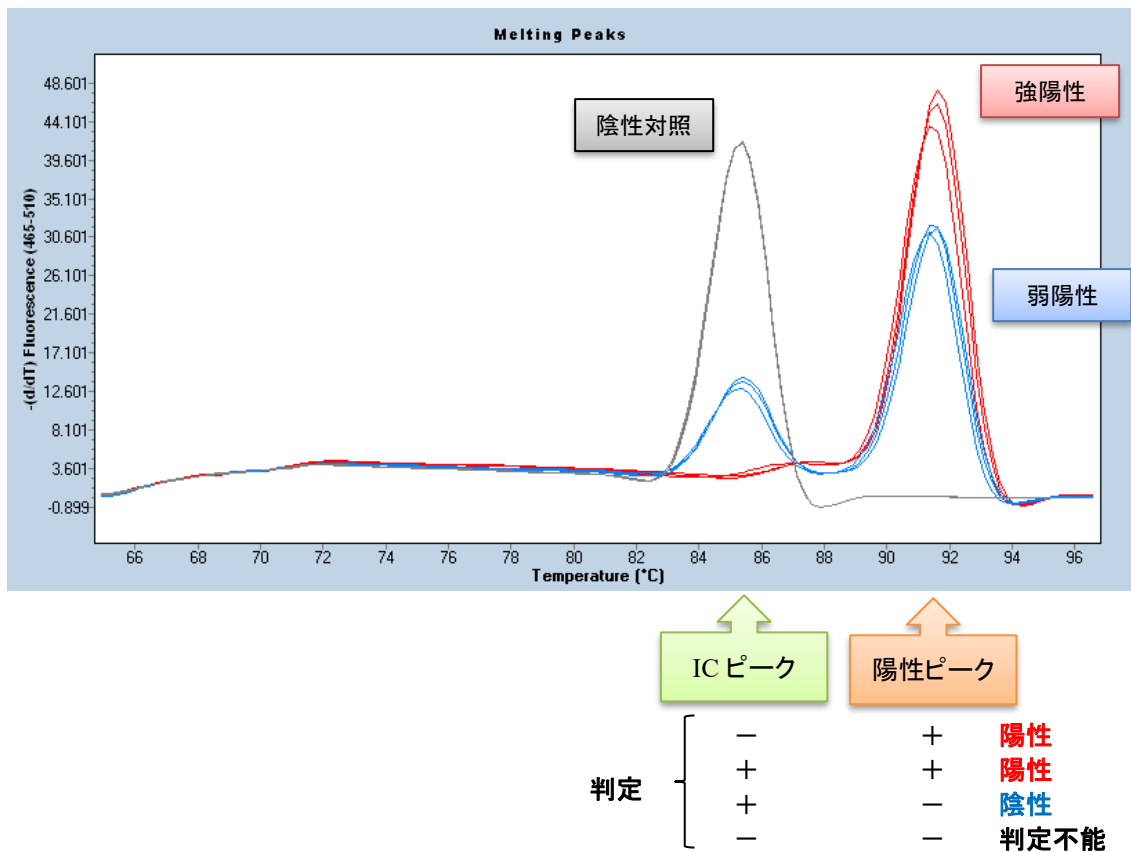


図 2. 融解曲線解析のグラフと判定

4) 判定方法

陽性：反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において陽性の解離温度の範囲内にピークを認める。

陰性：反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析においてICの解離温度の範囲内にピークを認め、かつ陽性ピークを認めない。

判定不能：蛍光強度の上昇を認めない。蛍光強度の上昇が認められた場合も、融解曲線解析におけるピークが所定の解離温度の範囲外である検体は判定不能とする。

表 2. 各リアルタイム PCR 装置における解離温度（参考値）

メーカー名	機種名	IC の解離温度	陽性の解離温度
アジレントテクノロジー	Mx3000p	84.5°C±1.5°C	90.0°C±1.5°C
	ABI7300	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
アプライドバイオシステムズ	ABI7500/7500Fast	83.0°C±1.5°C	88.5°C±1.5°C
	StepOnePlus	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
	QuantStudio 3/5	83.0°C±1.5°C	89.5°C±1.5°C
タカラバイオ	Dice TP800	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
	iQ5	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
バイオラッドラボラトリーズ	Chromo4	82.0°C±1.5°C	88.0°C±1.5°C
	CFX96	82.0°C±1.5°C	88.0°C±1.5°C
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 480	85.5°C±1.5°C	91.5°C±1.5°C
	LightCycler 96	85.5°C±1.5°C	91.0°C±1.5°C
	LightCycler nano	83.5°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C

上記以外のリアルタイム PCR 装置を使用する場合、指示陽性 DNA および陰性溶液（TE）を用いて、陽性および IC の解離温度を確認する。

参考文献：

Mita A, Mori Y, Nakagawa T, Tasaki T, Utiyama K, Mori H. (2016). Comparison of fecal pooling methods and DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiology open* Feb;5(1):134-142.

融解曲線解析で複数の解離温度を自動検出できない機種における手動解析方法

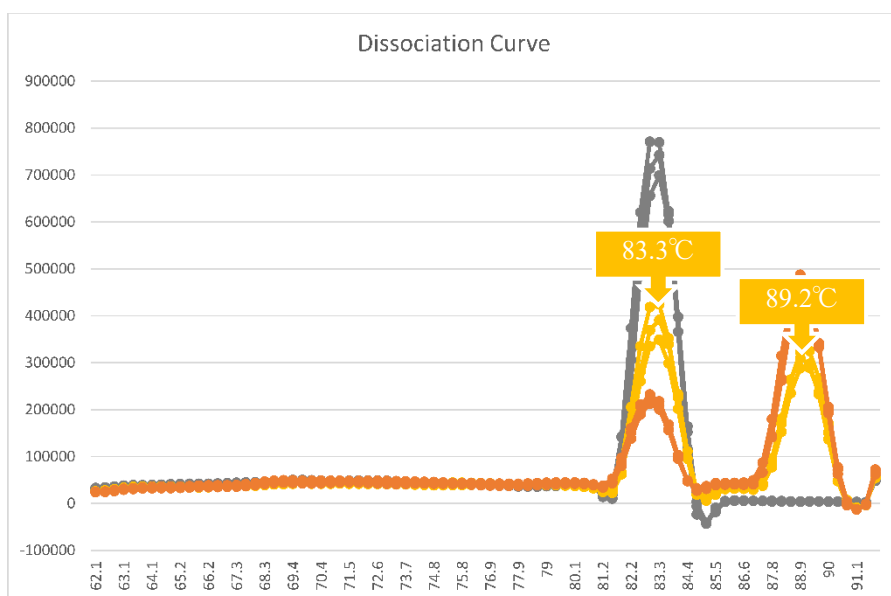
(例：ABI7300)

融解曲線解析の生データをエクセル等で解析（グラフ化）し、陽性およびICの解離温度をそれぞれ求める。

File → Export → Dissociation → Raw & Derivative Data → 保存 (.csv 形式)

→ エクセルでファイルを開く → 全 Derivative Data をプロットし融解曲線グラフを描画する

→ 表からピークの解離温度を求める



Well	Temperatures (Reading 1...84)																		
1	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
2	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
3	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
4	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
5	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
6	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
7	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
8	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
9	62.1	62.4	81.9	82.2	82.6	83	83.3	83.7	84.1	87.8	88.1	88.5	88.9	89.2	89.6	90			
Well	Raw Data (Reading 1...84)																		
1	6230461	6195956	3791650.25	3452614	2925069	228533	1613563	987524.4	481162.9	133886.0938	129055	124346.5	119925	115721.7	111689.2	107761.6			
2	5910593	5878203	3641654	3360996	2890176	2101747	543811.3	130453.7266	126337.4	122514	119265.1	115550.3	110715.2	106358.6	102923.4	99534.5			
3	5602044	5568778	3415686	3176851	2754545	2041834	552534.1	123275.2969	119265.1	115550.3	110715.2	106358.6	102923.4	99534.5	96142.9	92751.2			
4	6290410	6263136	3992235.25	3803091	3513863	2441342	2148052	1618725.625	1455985	1227755	110715.2	106358.6	102923.4	99534.5	96142.9	92751.2			
5	5884106	5858341	3742137.75	3599272	3372113	3091327	2789220	2498264	2249278	1736836.125	1582984	1353953	1078155	788949.4	519008.1	296233.4			
6	5799024	5773654	3729493.5	3582872	3337799	3028449	2691966	2365309	2084109	1557080.625	1418223	1212857	966632.9	709192	469236.8	273345.5			
7	6511933	6485916	4107910.75	3963202	3781880	3583434	3386747	3209799	3069200	2476875.25	2196476	1820695	1396477	974135.1	600350.6	315229.4			
8	6113334	6088396	3869875.25	3732049	3553792	3354517	3153677	2970883	2823733	2299031.75	2060263	1727855	1342844	951157.1	597119.8	319765.4			
9	5979530	5954746	3757244.5	3667970	3504914	3322099	3137391	2968616	2831777	2315978.25	2081571	1751729	1367212	974365.8	617515.1	335486.6			
Well	Derivative Data (Reading 1...84)																		
1	32669.77	34204.44	141896.2425	373338.9	620001.2	770873.9	769480.4	616337	366047.7	5140.5195	4771.421	4325.916	4152.263	4113.619	4097.398	4022.598			
2	30520.31	32256.26	104921.375	306132	546442.2	713577.4	742347.3	622901.9	397755.8	4092.2275	3742.395	3715.567	3933.431	4204.708	4324.044	4154.861			
3	31806.38	33147.05	79655.3125	258738.7	486599	655564.4	699030.4	601673.5	397784.6	4156.7222	3734.657	3609.664	3664.343	3754.71	3785.892	3692.26			
4	25640.77	27426.9	88244.8047	205110.4	334852.9	418419.2	424545.9	351689.3	225610.7	94776.1641	180013.9	263972.7	309074	297317.9	232300.5	136903.4			
5	24268.48	25618.16	65644.2109	153849.2	260068.8	334641.1	348962.5	298485.9	201692.7	84813.4063	169267.8	262563.1	322555.8	324614.1	267376.4	170958.5			
6	23673.03	25045.42	62165.4492	159097.7	280493.6	369250.1	391165.3	339372.7	232432.2	77019.8828	152132.5	235063.9	287890.4	288965.8	237396.7	151090.9			
7	24973.95	25350.66	97163.3125	160066.8	210511.6	228751.9	208586.6	157815.5	95299.95	179799.4063	314294.8	434101.7	487355.9	452579.8	341251.9	192578.1			
8	24038.93	24638.66	86655.6797	150967.4	207057.3	232158.1	217354.5	168179.1	102906	143930.8594	266530.1	384760.9	446892.8	427585.2	333031.4	197099.2			
9	23988	24506.47	79935.4375	138254.6	189302.6	212481	199893.9	156035.1	97232.66	141018.2188	261558.5	380476.5	445514.1	430162.6	339339.7	205028.2			