

PCR 法による組換えアデノウイルス DNA の高感度検出法に関する標準操作手順書

1. 目的

- 1.1 本標準操作手順書は PCR 法による組換えアデノウイルス DNA の高感度検出法について述べたものである。
- 1.2 本試験で用いる組換えアデノウイルス DNA (粗抽出 DNA サンプル) の調製は Virus Bank SOP-AdV-001 の記載に従う。
- 1.4 本試験で用いるサーマルサイクラー (MJ Research, PTC-200) の詳細な取扱いは _____ に、デンストグラフ (アトー, AE-6920M-03 型) の詳細な取扱いは _____ に従う。

2. 原理

- 2.1 アデノウイルスベクターは、adenovirus type 5 (Ad5) ゲノム中の E1 遺伝子を発現ユニットに置換したベクターである。ベクターの DNA 配列には、外来性 (宿主細胞ゲノム DNA 配列および野生型アデノウイルス DNA 配列以外) の DNA 配列が存在する。そこで、発現させたい遺伝子 (cDNA) のクローニングサイトの両側にプライマーを設定し、cDNA を polymerase chain reaction (PCR) で増幅し、アガロースゲル電気泳動によって目的のサイズの PCR 産物を検出することにより組換えアデノウイルス DNA を検出する。

3. 試薬類

- 3.1 TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)、10 \times LA PCR Buffer (Mg²⁺ Free)、25 mM MgCl₂、2.5 mM each dNTP mixture (#RR002A) は宝酒造 (株)、分子量マーカー 1 kb Ladder (#15615-016) は GIBCO-BRL 社、50 \times TAE Buffer (#24710-030) は GIBCO BRL 社、10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液 (#15585-011) は GIBCO BRL 社、アガロース (#A6013) は Sigma 社製を使用する。

4. PCR プライマーの調製

- 4.1 cDNA 増幅用のプライマー PAXCAF1、PAXCAR1 はそれぞれ滅菌水に終濃度 10 μ M となるように溶解する。配列は以下の通りである。

PAXCAF1: 5'-GGCTTCTGGCGTGTGACCGGC-3'

PAXCAR1: 5'-CAGAGGGGAAAAAGATCTCAGTGG-3'

5. 操作手順

- 5.1 PCR 反応は以下の方法で実施する。即ち下記の組成の内、Template DNA を除いた 49 μ l の PCR 溶液を 200 μ l

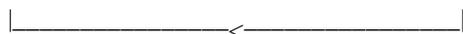
反応用チューブに分注し、種々の Template genomic DNA (50 ng/μl) 1 μl を添加する。下記に示すプログラムを設定したサーマルサイクラーにより PCR を実施する。なお、全ての操作において手袋を着用し、試薬類は氷上に置く。

●PCR 溶液 (1 サンプル当たり)

10×LA PCR buffer	5 μl
Template genomic DNA (50 ng/μl)	1 μl
PAXCAF1 (10 μM)	1 μl
PAXCAR1 (10 μM)	1 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μl
TaKaRa LA Taq (5 U/μl)	0.25 μl
滅菌蒸留水	37.75 μl
	<hr/>
	50 μl

●PCR におけるサーマルサイクラーのプログラム

94°C、1 分間 → 94°C、30 秒間 → 68°C、30 秒間 → 72°C、3 分間 → 72°C、7 分間 → 4°C、forever

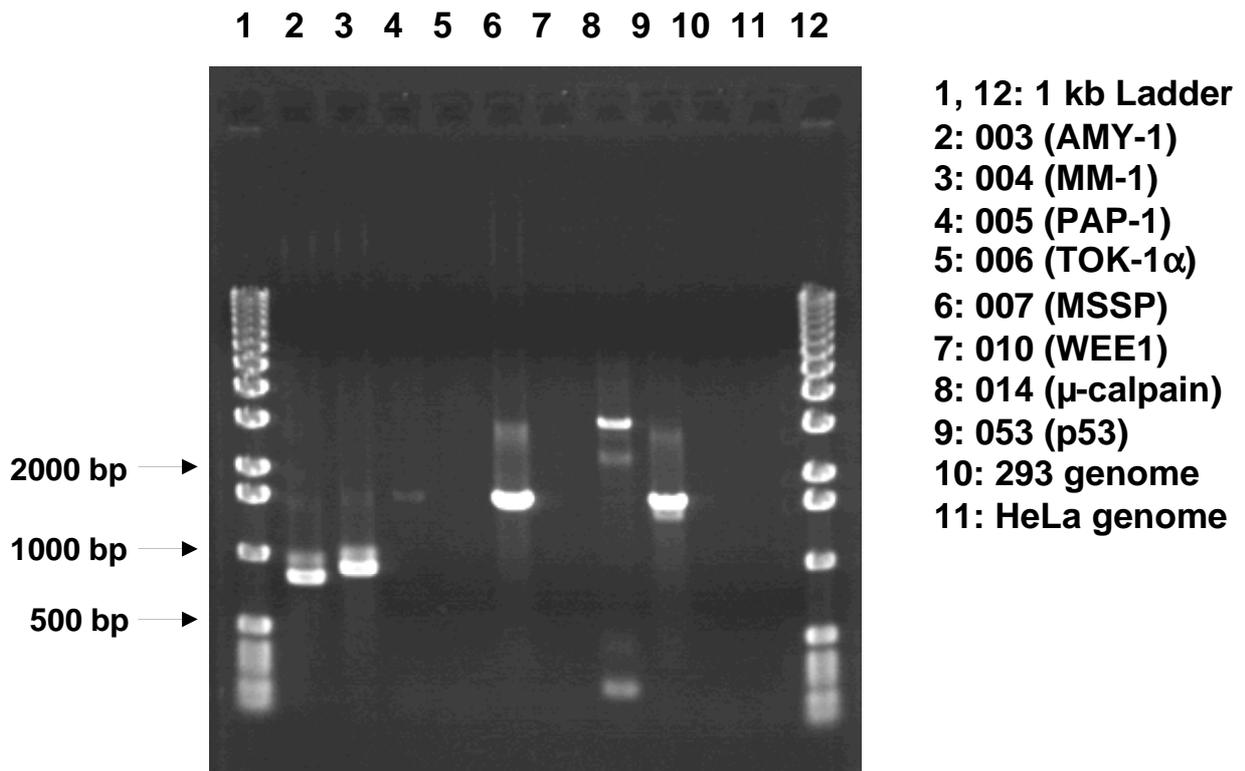


合計 30 サイクル

5.2 PCR 終了後の PCR 産物の検出はアガロースゲル電気泳動により実施する。泳動ゲルは以下の通り調製する。即ち、ミリ Q 水で希釈した 1×TAE Buffer に懸濁したアガロース (1%、w/v) を電子レンジ等により加熱し、完全にアガロースが溶解したのを確認し、室温で固まらない程度まで冷却する。Mupid-2 ゲルメーカーセット (アドバンス、#EM-2) にアガロースを流し込む。大プレート (W 107×L 60 mm) の場合 35 ml、小プレート (W 52×L 60 mm) の場合は 18 ml 使用する。コム (アドバンス、#COMB25、大プレート 25 ウェル、小プレート 12 ウェル) をセットしアガロースが固まるまで放置する。PCR 産物 5 μl に 6×Gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/30% glycerol) を 1 μl 添加し、そのうちの 5 μl をゲルにアプライして 1×TAE バッファー中、100 V で 30 分間泳動する。

5.3 終濃度 2 μg/ml のエチジウムブロマイドを添加したミリ Q 水に電気泳動後のゲルを浸し、室温で 5 分間放置する。その後、水道水で 5 分間洗浄する。UV (312 nm) 照射により、デンストグラフ (アトー、AE-6920M-03 型) にライブ画像を取り込み、PICT ファイルとして保存する。

5.4 解析結果を以下に示す。



**Detection of recombinant adenovirus DNA by PCR using TaKaRa LA Taq
(annealing temperature: 68°C)**