

RT-PCR 法による C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムの定量に関する 標準操作手順書

1. 目的

- 1.1 本標準操作手順書は RT-PCR 法による HCV 感染細胞中の HCV ゲノムの定量について述べたものである。
- 1.2 本試験で用いる HCV 感染細胞の調製は_____の記載に従う。
- 1.3 本試験で用いる competitor DNA の調製は_____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、デンシトグラフ (アトー, AE-6920M-03 型) の詳細な取扱いは_____に従う。

2. 原理

- 2.1 HCV 感染細胞より抽出した total RNA を鋳型として、competitor DNA を内部標準とした RT-PCR 法により、HCV ゲノム中で比較的塩基配列が保存されている 5' 非翻訳領域の cDNA を増幅し、さらに nested PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動にて内部標準の competitor DNA との比率から感染細胞中の HCV ゲノムの定量を行うものである。

3. 試薬類

- 3.1 ISOGEN (Cat. No. 311-02501) はニッポンジーン社、dNTP mixture (#27-2035-02) は Pharmacia Biotech 社、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 (#364-15) はナカライテスク社、AMV 逆転写酵素 (#120248) は生化学工業、AmpliTaq DNA Polymerases with buffer (#N-808-0160) は Perkin-Elmer 社、アガロース (#A6013) は Sigma 社、50×TAE バッファー (#24710-030)、5×First Strand Buffer、0.1 M DTT (#18057-018) は GIBCO BRL 社製を使用する。

4. PCR プライマーの調製

- 4.1 HCV ゲノム増幅用の 1st sense primer #5: 5'-AGTATGAGTGTCTGTCAGCCT-3'、1st antisense primer #8: 5'-GCACTCGCAAGCACCCCTATCA-3'、2nd sense primer #6: 5'-AGCCATAGTGGTCTGCGGAAC-3'、2nd antisense primer #7: 5'-TACCACAAGGCCTTTCGCGAC-3' を合成し、それぞれ DEPC 処理水に終濃度 10 μM となるように溶解する。

5. 操作手順

- 5.1 HCV 感染ヒト肝細胞を 1 ml の PBS で 3 回洗浄した後、ISOGEN 500 μl を添加し、十分ピペッティングする。ISOGEN 可溶化サンプルを 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブに移し、total RNA の調製に持ち込む。直ちに RNA 抽出を行わないサンプルは -80°C のフリーザーにストックする (少なくとも 1 ヶ月は保存可能)。

5.2 ISOGEN 可溶化サンプルにクロロホルム 200 μ l/チューブを添加し、vortex mixer で 15 秒間遠心後、室温で 3 分間静置する。次に 20,000 \times g (半径 9 cm, 14000 rpm)、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した後、上清(水相) 300 μ l をグリコーゲン添加エッペンドルフチューブ (2 μ l/チューブ、遠心中に準備)に加え、更にイソプロピルアルコール 300 μ l を添加後に 10 秒間攪拌する。攪拌したサンプルは- 80 $^{\circ}$ C に 30 分間放置する (overnight も可能)。20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心後、上清を除去 (多少上清が残っても良い) し、70 %エタノールを 700 μ l 添加する。攪拌せずに 20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した後、上清を除去し、そのまま 1 分間遠心して壁に付着したエタノールを完全に落とす。最後にマイクロピペットで完全に上清を除去する (この時完全に乾燥させないように注意する)。

5.3 RT (Reverse Transcription) 反応は以下の方法で実施する。即ち、下記の RT-1 溶液を抽出した total RNA に添加し (30 μ l/チューブ)、vortex mixer で攪拌溶解後、氷上に静置する。沸騰したお湯で 5 分間インキュベートし、氷水にて急冷した後 (5 分以上)、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で flash 遠心して壁に付着した水滴を落とす。2-3 回ピペッティングした後、12 μ l を RT-PCR 用チューブに分注し、下記の RT-2 溶液 8 μ l を添加後、ピペッティングする。43 $^{\circ}$ C に設定したサーマルサイクラー (MJ Research, PTC-200) で 30 分間インキュベートし、更に 99 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした後、4 $^{\circ}$ C で保存する (RT-1、RT-2 は RNA 抽出のクロロホルム添加後の遠心時に調製する。但し RT-2 への AMV-RTase 添加は本項の「沸騰したお湯で 5 分間インキュベートし、氷水にて急冷」中に実施)。

●RT-1 溶液の組成 (RNA サンプル 1 本当たり)

1st antisense primer #8 (10 μ M)	10 μ l	
<u>DEPC 処理水</u>	<u>20 μl</u>	
		30 μ l

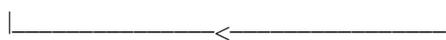
●RT-2 溶液の組成 (RNA サンプル 1 本当たり)

5 \times First Strand Buffer	4 μ l	
0.1 M DTT		2 μ l
dNTP mixture (10 mM each)		1 μ l
<u>AMV-RTase (30 U/μl)</u>	<u>1 μl</u>	
		8 μ l

5.4 RT 反応により得られた cDNA を以下の方法により増幅する (1st PCR)。即ち cDNA を 5 μ l ずつ 3 本の RT-PCR 用チューブに分注し、各濃度の内部標準 competitor DNA (10³、10⁴、10⁵ copies/チューブ) を含む 1st PCR 溶液を 45 μ l 添加する。ピペッティング後、以下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。

● PCR におけるサーマルサイクラーのプログラム

94 $^{\circ}$ C、2 分間 \rightarrow 94 $^{\circ}$ C、30 秒間 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、30 秒間 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、60 秒間 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、7 分間 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C、forever



合計 35 サイクル

● 1st PCR 溶液 (cDNA 1 サンプル当たり)

10×PCR buffer	5 μl
1st sense primer #5 (10 μM)	0.5 μl
1st antisense primer #8 (10 μM)	0.5 μl
dNTP mix (10 mM each)	1 μl
DEPC 処理水	27.75 μl
AmpliTaq DNA polymerase (5 U/μl)	0.25 μl
内部標準 cDNA (competitor)	10 μl
	<u>45 μl</u>

5.5 1st PCR 後のサンプル 5 μl を新しい PCR 用チューブに添加し、さらに以下に示す 2nd PCR 溶液 45 μl を添加し、ピペッティング後、1st PCR と同様のプログラムで 2nd PCR を実施する。

● 2nd PCR 溶液 (cDNA 1 サンプル当たり)

10×PCR buffer	5 μl
1st sense primer #6 (10 μM)	2.5 μl
1st antisense primer #7 (10 μM)	2.5 μl
dNTP mix (10 mM each)	1 μl
DEPC 処理水	33.75 μl
AmpliTaq DNA polymerase (5 U/μl)	0.25 μl
	<u>45 μl</u>

5.6 PCR 終了サンプルの cDNA 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 バッファーに懸濁したアガロース (3%、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) の大プレートに 40 ml のアガロースを流してゲルを作製する。2nd PCR 産物 10 μl に 6× Gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/30% glycerol) を 2 μl 添加し、そのうちの 10 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。

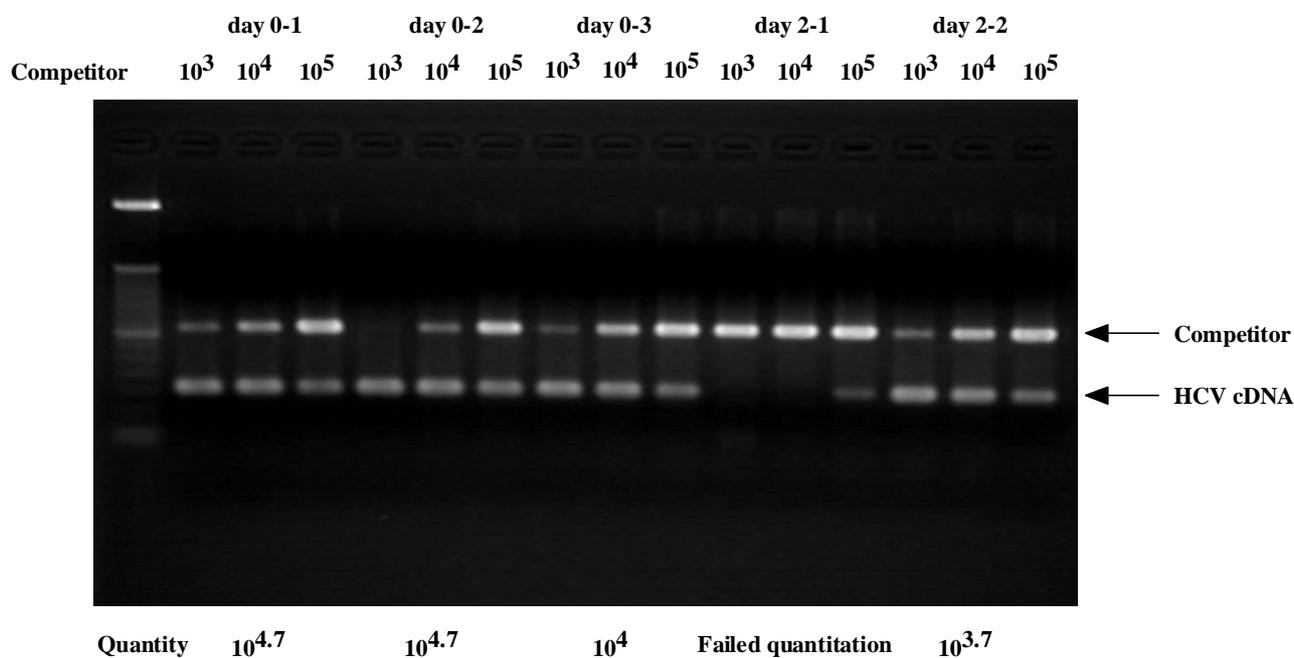
5.7 終濃度 2 μg/ml のエチジウムブロマイドを添加したミリ Q 水に電気泳動後のゲルを浸し、室温で 10 分間放置する。その後、水道水で 5 分間洗浄する。UV (312 nm) 照射により、デンストグラフ (アトー, AE-6920M-03 型) にライブ画像を取り込んだ後、解析ソフトウェア「ゾーンデンストメトリー」により HCV cDNA と competitor DNA のバンドの強度を定量する。データは Excel のテキストファイルとして保存する。

6. 計算

6.1 ゼーンデンシトメリーによる解析データをコンピューターソフトウェア“Microsoft Excel 5.0”を用いて HCV ゲノムのコピー数を算出する。例えば、 10^5 copies の competitor のバンドと HCV 由来の cDNA のバンドの比 (HCV ゲノム/competitor) が 1 ± 0.1 の範囲内であれば、最初に含まれる HCV RNA は competitor のコピー数と同じであると判断し、 10^5 と 10^4 copies の間であれば両者の中間値 $10^{4.7}$ copies であると判断する。得られた値を 10 倍した値がウエル当たりの HCV ゲノムのコピー数となる。

6.2 プリントアウトし、必要事項を記入し報告用紙とする。

6.3 測定例を以下に示す。



Lane No.	HCV genome	Competitor	HCV/Competitor	
Comp. 10^3	1	8780	4070	2.2
Comp. 10^4	2	9690	8450	1.1
Comp. 10^5	3	6680	15810	0.42
	4	10730	790	13
	5	10800	5940	1.8

Day 0-1

$10^{5.7}$ copies/well

Day 0-2

6	8300	14820	0.56	$10^{5.7}$ copies/well
7	11030	3330	3.3	
8	10380	11330	0.92	Day 0-3
9	7890	16270	0.48	10^5 copies/well
10	840	15360	0.054	
11	820	16950	0.048	Day 2-1
12	3990	17670	0.23	Failed
13	11480	4730	2.4	
14	10150	12240	0.83	Day 2-2
15	7280	14360	0.51	$10^{4.7}$ copies/well