

血清・バルク乳からのウイルス RNA 抽出

～微量な BVD ウィルスを高効率に検出～



日本動物特殊診断株式会社

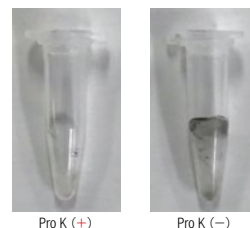
岩野 直美 先生
蛭沢 雅司 先生

牛ウイルス性下痢・粘膜病の清浄化を図るためには、①PI 牛の早期摘発 ②ウイルスの侵入防止（導入牛の着地検査）③感染予防（ワクチン、一般衛生管理など）が重要である。PI 牛の摘発法として、搾乳牛ではバルク乳を用いた定期的なスクリーニング、乾乳牛、育成牛、妊娠牛、新生子牛および導入牛については、血清、耳片、スワブなどを用いた遺伝子検査が有用である。これらの遺伝子検査は、PI 牛の早期発見のみならず、農場における BVD ウィルスの浸潤状況を把握するためにも、私たちは広く推奨したい。

ここが Maxwell 導入のポイント！

- バルク乳の場合、RT-PCR の電気泳動の結果、スピナカラムの核酸精製キットに比べ、**スメアなバックグラウンドが減少**し、明確な判別が可能であること。
- 血清の場合、溶血した血清でも判別可能であり、**精製能力が非常に高い**こと。
- 検査会社では、限られた時間内での多検体処理が求められるが、安定した品質での処理が可能であり、**装置への信頼性が高い**こと。
- 簡単なオペレーションで作業を自動化できるため、**ヒューマンエラーによるリスクを軽減**でき、作業効率や労働生産性が向上すること。
- キットやメソッドが充実しており、前処理方法の異なる多種多様なサンプル（バルク乳、血清、スワブ、耳片）にも対応できる**高い汎用性**を有すること。

図 -1 Pro k 処理による溶出液への
ビーズ持ち込み量の違い



Pro k 処理により溶出液への
ビーズ持ち込みが大幅に減少

バルク乳から効率よく RNA を抽出するためのポイント

- 乳汁は劣化が著しいため、素早い処理が重要である。
- サンプルの粘性が高いため、Proteinase K Solution 処理を行うことで溶出液へのビーズ持ち込みを抑えることができる（右上写真）。
- RNA を選択的に抽出するため、DNase I 処理が重要である。

ラボプロトコール

1 体細胞ペレットの作成

- 50 ml 遠沈管にバルク乳を入れ遠心（3,500 rpm、10 分）
- 上清を捨て、同作業を繰り返す
→ バルク乳 100 ml 分の体細胞を回収

2 体細胞ペレットの破碎

- 体細胞ペレットにビーズ、1-Thioglycerol/Homogenization Solution (TH Solution) および Lysis buffer を 200 μ l ずつ入れ組織破碎機にて破碎（血清の場合：血清 200 μ l に TH Solution、Lysis buffer 各 200 μ l および Proteinase K Solution 50 μ l を加え、室温で 15 分以上反応させて、ステップ 4 に進む）

3 Pro K 処理

- 体細胞破碎液を遠心（15,000 rpm、3 分）
- 上清 400 μ l を新しいチューブへ移し、Proteinase K Solution 50 μ l を加え、室温で 15 分以上反応

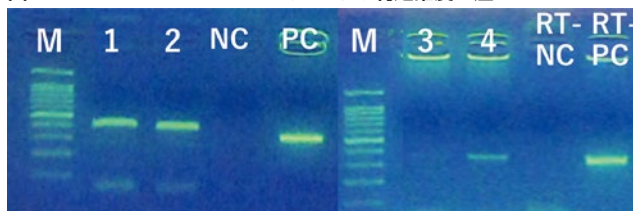
4 RNA 抽出

- ステップ 3 から全量を Maxwell® RSC カートリッジ（カタログ番号 AS1340）に加え、Maxwell® RSC での核酸自動抽出を実施
- 50 ～ 100 μ l の Nuclease-Free water にて溶出

5 判定

- RNA 抽出液を用いて、RT-PCR を実施
- 抽出および逆転写反応を確認するため、BVDV およびハウスキープینگ遺伝子を検出し、判定を行う

図 -2 Maxwell® とスピナカラムにおける判定確度の差



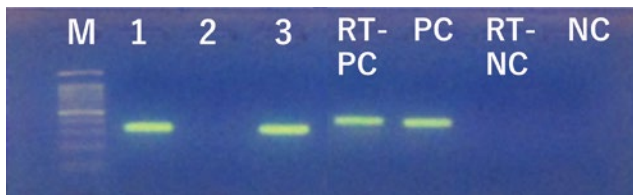
Maxwell®

スピナカラム

レーン No.	1	2	3	4
サンプル（血清）	A	B	A	B
判定（シグナル）	+++	+++	±	+

Maxwell® で回収したウイルス total RNA では、カラムで回収した RNA よりも明瞭なバンドが検出された。

図 -3 溶血した血清での判定確度が高い Maxwell® 回収 RNA



Maxwell®

レーン No.	1	2	3
サンプル（血清）	A （溶血あり）	B （陰性）	C （溶血なし）
判定（シグナル）	+++	-	+++

溶血の有無（No.1、3）に影響されことなく明瞭なバンドが検出された。