

[成果情報名] アルカリ熱抽出法を用いた BKD 検査方法

[要 約] アルカリ熱抽出法でBKD原因菌からDNAを抽出しPCRを行っても従来法と同程度の検出感度があることを確認した。

[部 署] 山形県内水面水産試験場・生産開発部

[連絡先] TEL 0238-38-3214

[成果区分] 研

[キーワード] BKD、保菌検査、アルカリ熱抽出法、PCR、検出感度

[背景・ねらい] BKD（細菌性腎臓病）はサクラマスにとって危険な魚病であり、蔓延防止策として、そ上系サクラマス親魚やマス類放流種苗について定期的に保菌検査を実施している。BKD 原因菌（*Renibacterium salmoninarum* 以下 R. s）はグラム陽性菌であり、内水試で検査の際はリゾチームを使用した DNA 抽出キットでの抽出法（以下従来法）を行っている。従来法は使用する試薬、検査工程が多く時間がかかる。このため、より簡便な抽出方法について検討する。

[成果の内容・特徴]

1. R. s は平成 19 年に北海道立水産ふ化場から提供された株を使用した。5mL の R. s 培養上清添加 KDM2 液体培地 2 つに菌株を各 10 μ L 添加し 18°C で 14 日間培養した。培養後 1,000rpm で 5 分遠心分離し、きょう雑物を除去後、上清を 1（希釈なし）、10、100、1,000 倍希釈し PCR の試料とした。なお、試料は後述する試験で各 1mL 使用した。
2. 検討する方法として熱抽出法（熱抽出区）、アルカリ熱抽出法（アルカリ区）、QIAGEN DNeasy Blood&TissueKitの動物組織用プロトコール(kit区)、従来法としてQIAGEN DNeasyBlood&TissueKitのバクテリア用プロトコールB（従来区）で行った。なお、熱抽出区は試料を5,000rpmで5分遠心分離後、上清を捨て、100 μ Lの遺伝子検査用蒸留水を加え懸濁し、100°Cで5分間熱抽出後10,000rpmで5分で遠心分離した。アルカリ区は厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌O26、O111 及びO157 の検査法について」（食安監発0515 第3号）より引用し、kit区、従来区はキットのプロトコールに従い抽出した。
3. 抽出後、PCR、電気泳動し、バンドの出現状況で検出感度を比較した。
4. 結果を図 1 に示す。熱抽出区、kit 区では 10 倍以下でバンドが不明瞭であり検出感度が低いため抽出方法として不向きである。アルカリ区では 1,000 倍でもバンドが確認できた。従来区では 1000 倍でもバンドが確認できたが不明瞭になる場合があった。
5. アルカリ熱抽出法は従来法と比較し同等以上の検出感度を示した。また、従来法及び kit 法は 1 検体あたり 2 千円程度の経費がかかり、抽出に 2 時間程度要するが、アルカリ熱抽出法は安価な試薬を 3 種類（NaOH, HCl, Tris）用いるのみで、費用は 1 検体あたり数円で済み、抽出に要する時間も 45 分程度と短く、かつ抽出操作も簡易であった。
6. アルカリ熱抽出法は、現在のところ BKD 保菌検査において最も優れた DNA 抽出方法と考えられた。

[成果の活用面・留意点]

1. マス類の BKD 保菌検査に利用する。
2. 熱抽出された DNA は長期保存できない場合があるため、70%エタノール等で保存する必要がある。

[具体的なデータ]

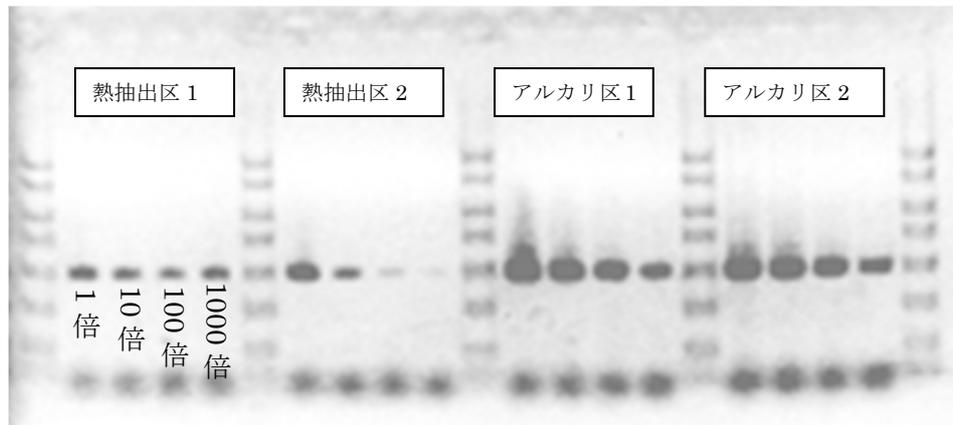


図 1-1 抽出法別検出感度
各左から 1,10,100,1000 倍希釈。

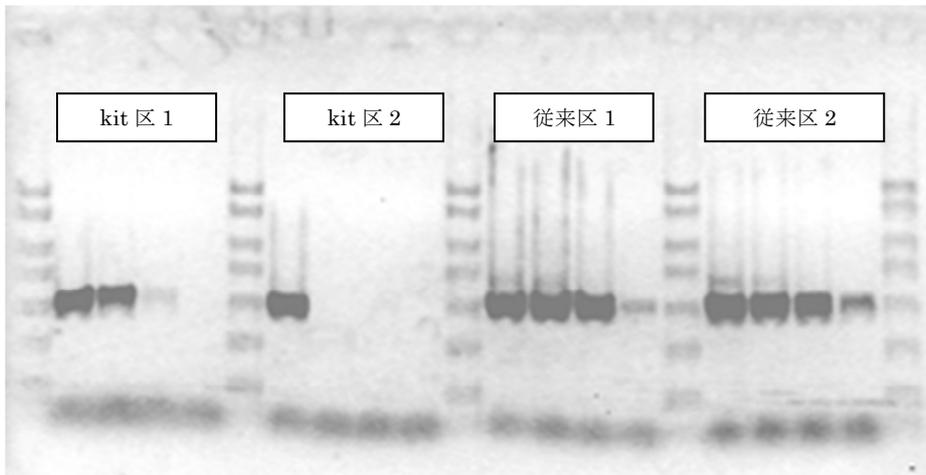


図 1-2 抽出法別検出感度
各左から 1,10,100,1000 倍希釈。

[その他]

研究課題名：増養殖技術指導

予算区分：県単

研究期間：平成 27 年度（平成 25～29 年度）

研究担当者：粕谷和寿

発表論文等：東北北海道ブロック魚類防疫合同検討会で発表予定。