

# クリプトスポリジウムのマイクロプレート核酸定量法の開発

原弘之<sup>1</sup>, 大田美咲<sup>1</sup>, 藤井貴章<sup>1</sup>, 小林美佐子<sup>1</sup>, 白井勝久<sup>1</sup>, 保科定頼<sup>2</sup>, 鶴岡誠<sup>3</sup>, 平田強<sup>4</sup>, 中井裕<sup>5</sup>

<sup>1</sup>東和科学(株), <sup>2</sup>東京慈恵医大, <sup>3</sup>広島市先端研, <sup>4</sup>麻布大, <sup>5</sup>東北大

Detection of *Cryptosporidium parvum* RNA using NASBA and microplate capture hybridization

Hiroyuki HARA<sup>1</sup>, Misaki OHTA<sup>1</sup>, Takaaki FUJII<sup>1</sup>, Misako KOBAYASHI<sup>1</sup>, Katsuhisa SHIRAI<sup>1</sup>, Sadayori HOSHINA<sup>2</sup>, Makoto TSURUOKA<sup>3</sup>, Tsuyoshi HIRATA<sup>4</sup>, Yutaka NAKAI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Towa kagaku. Co. Ltd., <sup>2</sup>Jikei Univ. Sch. Med., <sup>3</sup>Adv. Sci. Tech. Lab. Hiroshima City, <sup>4</sup>Azabu Univ., <sup>5</sup>Tohoku Univ.

## 1. はじめに

*Cryptosporidium parvum* の RNA を NASBA とドットプロットハイブリダイゼーションにより検出する方法を開発しているが、本法のプライマー、プローブを使用してマイクロプレートでのハイブリダイゼーションにより *C. parvum* の RNA を定量する方法を検討した。

## 2. 方法

### プローブの作製

プローブ(196-458)は、ランダムプライム法によりピオチン標識したものを作製した。

### 核酸増幅

プライマー(82f、T7-511r)を用いて NASBA 法により検出対象領域を増幅した。

### マイクロプレート法による定量

NASBA 増幅産物をマイクロプレートに固定化後、ピオチン標識プローブとハイブリダイゼーションした。このプローブ量を、ペルオキシダーゼ発色反応により、プレートリーダーでの吸光度 (OD<sub>405</sub>) で測定した。

## 3. 結果

### プローブの標識方法の検討

ピオチン標識法を変えて単数標識プローブと多数標識プローブを作製し、各々のプローブについてマイクロプレート法による定量を検討した結果、多数標識プローブの場合の 吸光度\* が単数標識プローブの場合の約 2 倍であった。

### プローブ作製時における酵素処理時間の検討

多数標識プローブを作製する際の酵素処理時間 1, 10, 20 時間を比較した結果、20 時間処理プローブの場合の吸光度\* が最も高かった。

### ハイブリダイゼーション温度の検討

ハイブリダイゼーション温度 40, 42, 45, 50, 55 を比較した結果、40 ハイブリダイゼーションの場合が最も 吸光度\* が高かった。

### プローブ濃度の検討

プローブの濃度 1, 5, 10, 50pg/ml を比較した結果、10pg/ml のプローブ濃度の場合が最も 吸光度\* が高かった(図 1)。

### 検量線の作成

最適条件(多数標識プローブ、酵素処理時間 20 時間、

ハイブリダイゼーション温度 40、プローブ濃度 10pg/ml) では、図 2 の検量線を作成できた。*C. parvum* の RNA 量 4.3E-14g(オーシスト 1 個に相当)から 4.3E-10g まで、両対数目盛ではあるが、ほぼ直線関係となった。RNA 量 4.3E-14, 4.3E-13, 4.3E-12, 4.3E-11, 4.3E-10g における標準偏差は各々 8.9, 9.1, 3.9, 0.5, 2.1%であった。

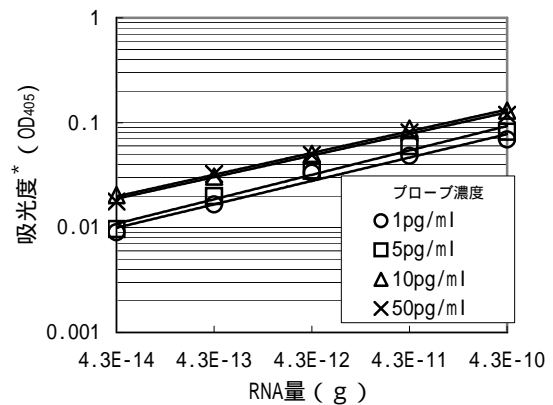


図 1 プローブ濃度の検討

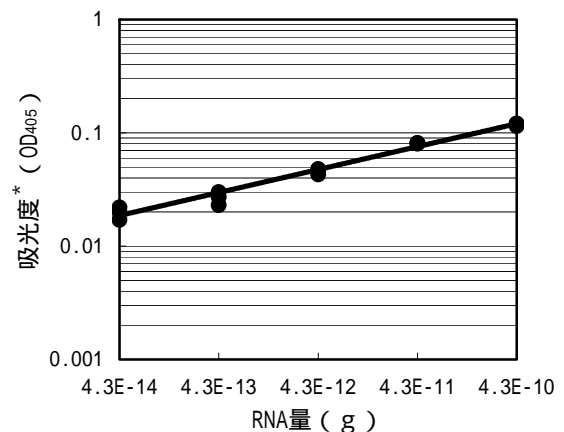


図 2 最適条件での検量線

\* 吸光度=(サンプルの吸光度 - コントロール)