



Application

モバイルリアルタイムPCR装置を用いたエビの急性肝膵臓壊死症 (AHPND) の迅速検出

製品名

モバイルリアルタイムPCR装置 PicoGene®PCR1100 (Cat.No. PCR1100)

メーカー名

日本板硝子株式会社

下記のデータは、株式会社TBA 研究開発 川瀬研究室分室 小寺 拓也 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

エビの急性肝膵臓壊死症 (Acute hepatopancreatic necrosis disease : AHPND) は特殊な毒素タンパク質を産生するビブリオ属細菌が原因で発生する疾病で、死亡率が非常に高いことが特徴である。

この疾病が原因で、海外のエビ類養殖生産国では生産量が半減し、世界的にエビ類の価格が高騰した。^{*1}

日本における蔓延を防止するため、水産資源保護法や持続的養殖生産確保法で防疫の対象である「特定疾病」及び水産資源保護法の輸入防疫対象疾病に指定され、PCRでの診断法が確立されているが、今回現場での迅速診断を目的としてモバイルリアルタイムPCR装置を使用して系の確立を目指した。

*1水産防疫の対象疾病

https://www.maff.go.jp/j/syoutan/suisan/suisan_yobo/attach/pdf/index-3.pdf

目的

モバイルリアルタイムPCR装置とKAPA3G Plant PCR Kitを用いて、検出限界である40 copies/assayを目標としてAHPND感染エビの迅速検出法を確立する。

検証方法

ターゲット：AHPNDを引き起こすエビ病原菌 *Vibrio parahaemolyticus*

使用した検体：1) 感染エビ抽出サンプル / DNeasy® Blood & Tissue Kits (Qiagen社) 使用

2) *Vibrio* 培養菌コロニー / 水懸濁加熱処理

3) 感染エビ抽出サンプル / GenCheck® DNA Extraction Reagent (FASMAC社) 使用

使用した試薬：KAPA3G Plant PCR Kit (日本ジェネティクス株式会社)

使用装置：モバイル型リアルタイムPCR装置 PicoGene® PCR1100 ソフトウェア Ver.2.1.0 (日本板硝子株式会社)

● 使用したプライマーとプローブ (国際獣疫事務局 (World Organization for Animal Health : OIE) 登録済)

TUMSAT-Vp3_Fw 5'-GTGTTGCATAATTTGTGCA-3'

TUMSAT-Vp3_Rv 5'-TTGTACAGAAACCACGACTA-3'

VpPirA Probe 5'-FAM-AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGA-TAMRA-3'

● 反応組成

Template	1 μL
Buffer	8 μL
Polymerase	0.6 μL
25mM MgCl ₂	0.8 μL
5 μM Primer F/R	1.6 μL
2.5 μM Probe	1.6 μL
H ₂ O	2.4 μL
	16 μL

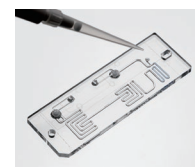
● 反応プログラム (実行時間28 min)

Hot Start	95°C / 15 sec	} 50 cycles
Denature	95°C / 5 sec	
Annealing	60°C / 20 sec	

※検出閾値は0.005とした

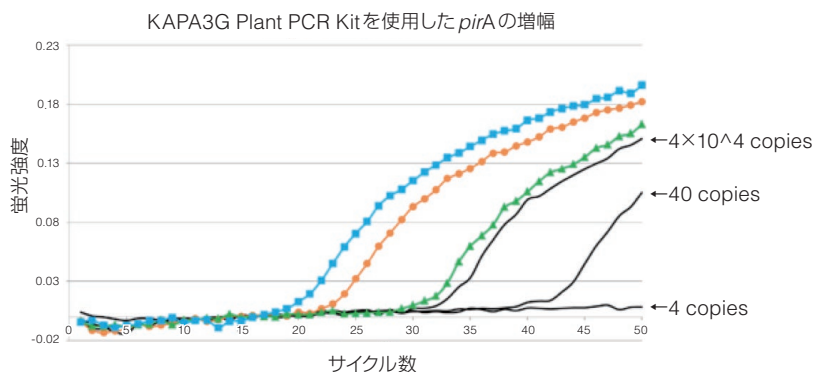


PicoGene®PCR1100



PicoGene®PCR1100用
測定用チップ

結果



緑: 1) 感染エビ Qiagen 抽出サンプル
 青: 2) Vibrioコロニー加熱処理サンプル
 橙: 3) 感染エビ GenCheck 抽出サンプル
 黒: ポジコン plasmid 4×10^4 copies, 40 copies, 4 copies

検体	Ct
1) 感染エビ Qiagen 抽出サンプル	32.9
2) Vibrioコロニー加熱処理サンプル	20.9
3) 感染エビ GenCheck 抽出サンプル	24.2
4) ポジコン plasmid 4×10^4 copies	31.4
5) ポジコン plasmid 40 copies	43.9

● まとめ

検出閾値を0.005にした場合、培養菌体および重度感染のエビ検体からAHPNDを30 min以内に検出する事ができた。
 また、ポジコンにおいては検出限界の40 copiesまで検出する事が確認できた。

補足資料1: 各Kitを使用したDNA抽出工程

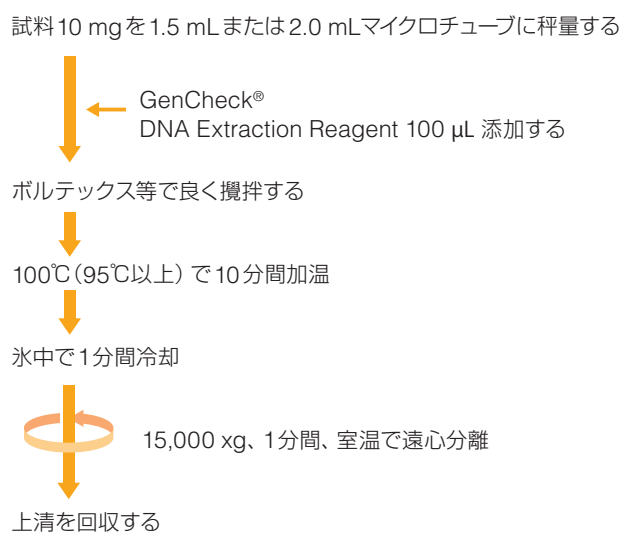
DNeasy® Blood & Tissue Kits (Qiagen社)

DNeasy® Blood & Tissue Handbookより引用



GenCheck® DNA Extraction Reagent (FASMAC社)

GenCheck® DNA Extraction Reagent 取扱説明書より引用





補足資料2: 検出感度の変更方法 (ソフトウェア Ver 2.3.0)

初期設定として、通常感度は1に設定されておりますが、検出感度を上げるため、マニュアルで変更していただく事が可能です。

【3.4.1 品種ファイルの数値を調整する】 モバイルリアルタイムPCR装置 Mobile qPCR ユーザーズマニュアル P.53 ~ P.54 参照

1. 品種ファイルは装置本体と付属の CD-ROM の両方に CSV 形式で保存されています。
2. 該当する閾値のセルに半角数字で励起光の Ct 検知感度を入力します。

例)

項目	値	説明
Device No. (装置番号)	0123456789ABCDEF	必須に応じて、半角英数字 1~16 字で任意の PCR 装置名などの ID を入力します。
Profile No. (品種番号)	1234	半角数字 0~65535 の範囲で任意の品種番号を入力します。
Profile name (品種名)	60c7H3	半角英数字 1~8 字で任意の品種名を入力します。品種名は、品種ファイルのタイトルとして本装置に表示されます。
RT temp. (反応域設定温度)	60.0℃	逆転写反応を行う場合に設定します。半角数字 40.0~75.0(小数点以下第 1 位まで入力可)の範囲で温度域(逆転写域)のヒーター温度(℃)を入力します。逆転写反応を行わない場合は、60.0℃が推奨です。
RT time (反応域保持時間)	1.0分	逆転写反応を行う場合に設定します。半角数字 1.0~3600.0(小数点以下第 1 位まで入力可)の範囲で温度域(逆転写域)の保持時間(分)を入力します。逆転写反応を行わない場合は、1 分が推奨です。
Denatur temp. (変性域設定温度)	95.0℃	半角数字 40.0~99.0(小数点以下第 1 位まで入力可)の範囲で温度域(変性域)の温度(℃)を入力します。
Hot start time (変性域保持時間)	15.0分	以下の範囲(半角数字、小数点以下第 1 位まで入力可)で変性域(変性域)の初期(キックスタート)保持時間(分)を入力します。 温度が 40.0 以上 95.1 未満: 1.0~30.0 温度が 95.1 以上 98.1 未満: 1.0~20.0 温度が 98.1 以上 99.0 以下: 1.0~10.0
Denatur temp. (変性域設定温度)	95.0℃	半角数字 40.0~99.0(小数点以下第 1 位まで入力可)の範囲で温度域(変性域)の温度(℃)を入力します。
Denatur time (変性域保持時間)	3.0分	以下の範囲(半角数字、小数点以下第 1 位まで入力可)で変性域(変性域)の 2 回目以降の保持時間(分)を入力します。 温度が 40.0 以上 95.1 未満: 1.0~5.0 温度が 95.1 以上 98.1 未満: 1.0~4.0 温度が 98.1 以上 99.0 以下: 1.0~3.0
An&Ex temp. (中温域設定温度)	60.0℃	半角数字 40.0~75.0(小数点以下第 1 位まで入力可)の範囲で中温域(アニーリング・伸長域)のヒーター温度(℃)を入力します。
An&Ex time (中温域保持時間)	7.0分	半角数字 3.0~120.0(小数点以下第 1 位まで入力可)の範囲で中温域(アニーリング・伸長域)の保持時間(分)を入力します。
Cycle (サイクル回数)	40回	半角数字 1~50 の範囲で PCR 反応のサイクル数を入力します。
Pump Lv. (ポンプ強度)	M	必要に応じて、半角英数字以下の値を入力します。 HH: 染料の粘性が非常に高く流れにくい H: 染料の粘性が高くて流れにくい M: 標準値 L: 標準値より入り遅く染料が流れやすい
Predetection Lv. (検出感度)	50%	PCR 反応前の染料 (FAM) の蛍光出力が 0.1 未満の場合に調整します。半角数字 1~100 (整数) の範囲で蛍光出力の 500 倍の値を入力します。
Det. sens. (検出感度)	2	必須に応じて、青緑色表示範囲の Ct 検知感度として、半角数字で以下の値を入力します。増幅効率が高い場合に感度を上げてください。 0.5, 1, 2, 3, 10 (初期値: 1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Device No.	Profile No.	Profile name	Cycle	Det. sens.	RT temp.	RT time	An&Ex temp.	An&Ex time	Denature temp.	Hot start time	Denature time	Pump Lv.	Predetection Lv.	File rev.
1	01234 56789 ABCD EF	1234	60c7H3	40	2	60	1	60	7	95	15	3	M	50	
2															

※新 FW ではこちらの設定を 1→2 に変更することで、今回の実験で検証した検出域値を 0.005 とした設定と同等となります。

3. CSV で保存してください。

注意!! 品種ファイルの数値は初期値に戻せません。

品種ファイルの数値を変更する前に、必ずバックアップを取るなどして元のファイルを保存してください。



お客様のコメント

装置重量が軽いので携帯性は非常に優れていた。
一度に多検体の検査を行う場合、検査系の実行時間は10分以内でできれば実用性は向上すると思う。
測定結果の履歴をPCR1100本体で確認できるようになれば、より使い勝手が向上すると感じた。