

**海洋生物科学技術論と実習 III**  
**操作テキスト**

## 日程

### 1日目

#### 1. 水域環境におけるウイルス群集とその役割についての講義

水域環境には極めて多様かつ多量のウイルス群集が存在することを理解する。  
微小な生物の研究法における最新の分子生物学的手法の有用性についても理解する。

#### 2. 広沢池にてサンプリング

環境試料の採取の仕方を学ぶ。

#### 3. 環境試水中からのウイルス画分の調製

フィルターを用いたろ過および超遠心を用いて環境のウイルス粒子を濃縮する。

#### 4. 藍藻ならびに藍藻感染性ウイルス定量的検出(DNAの調製)

細菌画分からのDNAの調製

9:00    10:00    11:00    12:00    13:00    14:00    15:00    16:00    17:00

1	講義	2	サンプリング・食事	3	ろ過	4	DNA抽出
---	----	---	-----------	---	----	---	-------

### 2日目

#### 1. 藍藻ならびに藍藻感染性ウイルスの定量的検出(DNAの調製・リアルタイムPCR)

- ・濃縮したウイルス画分からDNAを抽出する。
- ・抽出したDNAを鋳型にリアルタイムPCR法に供する

#### 2. 環境試水中の藍藻の観察(光学顕微鏡による観察)

藍藻を観察してスケッチする。

#### 4. 藍藻ならびに藍藻感染性ウイルス定量的検出(データのまとめ)

リアルタイムPCRで得られたデータを読み取り、環境試水中の藍藻と藍藻感染性ウイルスの密度を求める。

9:00    10:00    11:00    12:00    13:00    14:00    15:00    16:00    17:00

1	DNA抽出、リアルタイムPCR	2・3	顕微鏡観察	まとめ
---	-----------------	-----	-------	-----

## 1. 環境水からのウイルス画分の濃縮とDNAの抽出

- 1) 環境水30mLを0.22μ mヌクレポアフィルターでろ過する  
バクテリアは、0.22μ mより大きい。
- 2) ろ液5mL を2本の超遠心分離用チューブに移し、25,000gで30分間遠心してウイルス粒子を沈殿させる。  
超遠心分離は危険が伴うので、院生の指示を仰ぐ。
- 3) Proteinase K消化によりウイルスを溶解する  
超遠心分離で集めたウイルス粒子にProteinase K buffer(200μ g/ml Proteinase K、100mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH8.0), 25mM EDTA、0.5% SDS)を100μ L加え、1.5mlマイクロチューブに移し、37°Cで1時間反応させる。
- 4) DNA抽出キット(MagExtractor: TOYOBO)を用いてウイルスゲノムを抽出する。
  - ① 溶解・吸着液750μ lと磁性ビーズ40μ lを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、激しく混合する。
  - ② チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、上清を取り除く。
  - ③ チューブに洗浄液900μ lを加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、5秒間程度、激しく混合する。
  - ④ チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、上清を取り除く。
  - ⑤ ③～④のステップをもう一度行う。
  - ⑥ 70%エタノール900μ lを加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、5秒間程度、激しく混合する。
  - ⑦ チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、上清を取り除く。
  - ⑧ ⑥～⑦のステップをもう一度行う。
  - ⑨ 滅菌水100μ lを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、混合することによってGenomic DNAを溶出させる。
  - ⑩ チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、DNAが含まれる上清を新しい1.5mlマイクロチューブに回収する。

## 2. バクテリア画分からのDNAの抽出

1) 3mLの試料を1mLずつ3本のチューブに移して卓上遠心機にセットし、10,000rpmで5分間遠心分離した後、上清を取り除く。

藍藻にはガス胞を有する種があるので、遠心前に超音波でガス胞を壊す。

2) リゾチーム処理により細胞壁を溶解する

集めた菌体にリゾチームbuffer(10mg/mlリゾチーム、10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を100μL加え、1.5mlマイクロチューブに移し37°Cで1時間反応させる。

4) DNA抽出キット(MagExtractor:TOYOBO)を用いてバクテリアDNAを抽出する。

①溶解・吸着液750μLと磁性ビーズ40μLを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、激しく混合する。

②チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、上清を取り除く。

③チューブに洗浄液900μLを加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、5秒間程度、激しく混合する。

④チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、上清を取り除く。

⑤③～④のステップをもう一度行う。

⑥70%エタノール900μLを加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、5秒間程度、激しく混合する。

⑦チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、上清を取り除く。

⑧⑥～⑦のステップをもう一度行う。

⑨滅菌水100μLを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、混合することによってGenomic DNAを溶出させる。

⑩チューブを卓上遠心機にセットし、3000rpmで30秒間遠心分離した後、DNAが含まれる上清を新しい1.5mlマイクロチューブに回収する。

### 3. リアルタイム PCR 法

#### ① 反応液の調製

- A. 滅菌蒸留水、2 × SYBR Green Realtime PCR Master Mix、primer set (10 pmol/μL)の順に加えていき、混合液を作製(表 1)
- B. 専用チューブに 24μ μL ずつ分注する
- C. 目的のテンプレートを各チューブに添加する

テンプレートには、ウイルス・細菌画分をから抽出したDNAを用いる。  
ウイルス画分をから抽出したDNAの場合には、10μ Lを加える。

表 1 反応液の組成

試薬	容量
2 × SYBR Green Realtime PCR Master Mix	12.5μL
primer set (10 pmol/μL)	0.4 μL
Template DNA	1 μL
Ste. DW	11.1 μL
Final Volume	25 μL

- ② 知濃度の MaLMM01、ラン藻で作成した検量線に、各サンプルの Ct 値を代入して環境試水中のファージ、ラン藻の密度を算出する。