

遺伝子検出法の概要及び手順

遺伝子検出法は、標的遺伝子の一部断片を PCR 等の増幅技術により特異的に検出するので、近年では研究に限らず、医療や感染症の診断、環境試験等の種々の目的で利用されている。この方法により標的遺伝子は存在の有無として定性的に、あるいはコピー数として定量的に検出される。選択培地による培養検出や、形態観察による顕微鏡検出等の他の検査法とは原理が異なり、遺伝子検出法は迅速、高感度等々の特長を有することから、広く応用が期待されている。

遺伝子検出法をクリプトスポリジウム及びジアルジア(以下、「クリプトスポリジウム等」という。)の耐塩素性原虫試験に取り入れる場合、試験は試料濃縮、精製、核酸抽出、遺伝子増幅反応、結果解釈から構成される。試料濃縮と精製は従来の顕微鏡検出法と同様であるが、精製の際は阻害物質に留意し、核酸抽出と遺伝子増幅反応の際は微量な液量を取り扱う丁寧な操作が求められる。遺伝子検出法は、検出方法の一つとして従来の顕微鏡法と併記し、いずれの検出方法も使用可能とすることを提案する。

遺伝子増幅には、LAMP 法、qPCR 法等が利用可能である。ただし、検出感度は高いことが望ましく、RNA の逆転写や rDNA 等の多コピーの鋳型から検出できる方法が有利であり、十分なコピー数から検出することによって結果の安定性や信頼性を高めていく。

試料採取からクリプトスポリジウム等の検出までの手順を以下に示す。

1. 上水 20L、あるいは原水 10L を試料とし、濃縮する。(顕微鏡検査と同じ操作を行う。
クリプトスポリジウム等は低濃度でも問題となることから、大容量の水試料を濃縮する必要がある)
2. 免疫磁気ビーズ法による精製(オーシスト以外の夾雑物を除く。特に遺伝子増幅は夾雑物による反応阻害が生じるので、洗浄操作を徹底する)

3. 核酸抽出

1. 凍結融解を繰り返し、クリプトスポリジウム等を破壊（オーシスト・シスト壁は物理化学的に安定で壊れ難いため、抽出開始時に物理的な破壊操作を行う）
 2. Proteinase K 反応液 50 μ L を添加し酵素溶解反応（ $\sim 60^{\circ}\text{C}$ ）（たんぱく質分解酵素で分解し、核酸を遊離させる）
 3. 超音波処理（物理的破壊を徹底する）
 4. 再加熱（溶解を徹底 $\sim 75^{\circ}\text{C}$ ）
 5. 95°C で5分間の熱処理と急冷（核酸増幅を阻害してしまう Proteinase K 酵素を失活させ、特に LAMP 法では急冷により核酸を変性状態にして反応性を高める）
 6. 遠心後、上清を核酸抽出液として、遺伝子検出に使用する（万一夾雑物が混入した場合には分離してから使用する）
4. 遺伝子増幅反応（試薬 20 μ L に核酸抽出物 5 μ L を混合し、装置で反応させる）
 5. 判定（遺伝子増幅を濁度・蛍光を指標に装置で読み取り、標的遺伝子の存否を判断する）

クリプトスピリジウム遺伝子検出法(案)

