

オリゴヌクレオチドフィンガープリント法による 日本脳炎 (JE) ウイルスの分子疫学的研究

堀 博 之

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

Oligonucleotide Fingerprint Analysis on Japanese Encephalitis (JE) Virus Strains of Different Geographic Origins

Hiroyuki HORI (*Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*)

Abstract: Genetic variation in Japanese encephalitis virus isolates from various geographic areas was examined by oligonucleotide fingerprint of the 42S genome RNA. Isolates in the same geographic areas and in the same years were very similar but differed from those in other areas or in different years in the same areas. Japanese isolates were rather similar to each other and similarity between strains was greater as the years of isolations were closer. Recent isolates from Thailand and Vietnam were similar to each other, however, they were quite different from Japanese isolates. Two Taiwan isolates in 1981 with high similarity to each other were also quite different from Thai and Vietnamese isolates, although one of them showed relative closeness to recent Japanese isolates. From these results, it was presumed that mutations and selections of JE virus genome would have progressed independently in geographically distant areas. Nakayama (Japan, 1935) and Peking-1 (China, 1949) strains were rather similar, suggesting that early Japanese strains may have some relationships to early Chinese strains.

Key words: Japanese encephalitis virus, Oligonucleotide fingerprint, Molecular epidemiology

Trop. Med. 28 (3), 179-190, September, 1986

Received for Publication, June 20, 1986

長崎大学熱帯医学研究所業績 第1809号

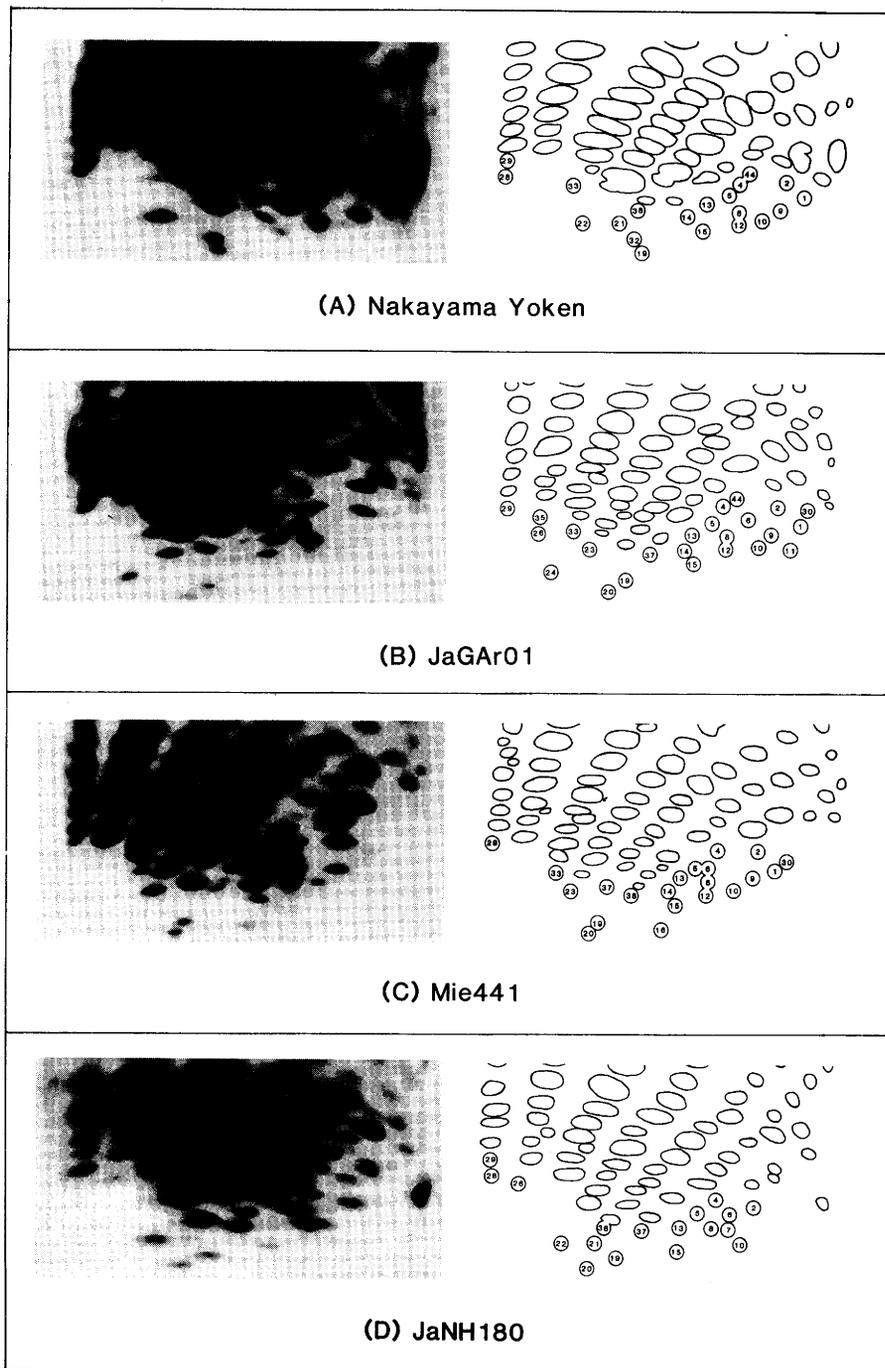


Fig. 2. RNase-T1-resistant oligonucleotide fingerprint patterns and their schemas of 4 representative Japanese strains. Unique large oligonucleotide spots in each fingerprint were arbitrarily numbered as shown in order to compare them among examined strains. (A) Nakayama Yoken (Tokyo, 1935), (B) JaGAR01 (Gunma, 1959), (C) Mie441 (Mie, 1969), (D) JaNH180 (Nagasaki, 1980).

Table 1. JE virus strains used in comparative oligonucleotide fingerprint studies

strain	year	place	source
Japanese isolations			
Nakayama RFVL	1935	Tokyo	Human brain
Nakayama Yoken	1935	Tokyo	Human brain
Kajinina	1935	Tokyo	Human brain
JaGAR01	1959	Gunma	Mosquito
JaGAR02	1959	Gunma	Mosquito
JaTH160	1960	Tokyo	Human brain
Kamiyama	1966	Fukuoka	Human brain
JaOH0566	1966	Osaka	Human brain
ML17	1966	Osaka	Attenuated vaccine
JaOH3767	1967	Osaka	Human brain
Mie441	1969	Mie	Mosquito
JaOArB3279	1979	Osaka	Mosquito
JaNH179	1979	Nagasaki	Human brain
Kumamoto	1979	Kumamoto	Mosquito
JaOArI8980	1980	Osaka	Mosquito
JaNH180	1980	Nagasaki	Human brain
JaNAr12480	1980	Nagasaki	Mosquito
JaNAr15980	1980	Nagasaki	Mosquito
JaNAr17780	1980	Nagasaki	Mosquito
JaOArI6981	1981	Osaka	Mosquito
JaNAr5681	1981	Nagasaki	Mosquito
JOArS982	1982	Osaka	Mosquito
JaNAr9183	1983	Nagasaki	Mosquito
Foreign isolations			
Peking-1	1949	China	?
Muar	1952	Singapore	Human brain
Tengah	1953	Singapore	?
S705/64	1964	Singapore	?
Chiangmai	1964	Thailand	Human brain
Th2372	1972	Thailand	Human brain
ThCMP1982	1982	Thailand	Human brain
KE083	1983	Thailand	Human CSF
KE087	1983	Thailand	Human CSF
KE093	1983	Thailand	Human CSF
SUBIN	1983	Thailand	Human brain
Vietnam129	1980	Vietnam	Mosquito
Vietnam136	1980	Vietnam	Mosquito
Tansui236	1981	Taiwan	Swine blood
Tansui263	1981	Taiwan	Swine blood

に示したように、1935年から1983年迄に、国内各地で分離された23株と、1949年から1983年迄に、中国、シンガポール、タイ、ヴェトナム、及び台湾で分離された外国（図1）の15株、総計38株である。Tengah株、S705/64株、Vietnam129株、Vietnam136株、Tansui236株とTansui263株は、国立予防衛生研究所ウイルスリケッチャ部の大谷部長及び緒方博士より、JaOH0566株、ML17株、JaOH3767株、Peking-1株、Chiangmai株、Th2373株、KE083株、KE087株、KE093株とSUBIN株は、阪大微生物病研究会より、JaOArI8980株、JaOArI6981株、JaOArS982株は、大阪府立公衆衛生研究所より、Nakayama RFVL株、Kalinina株、JaGAr02株、Kamiyama株、Mie441株、Kumamoto株とMuar株は、愛媛大学医学部第一内科、小林教授より、それぞれ分与して頂いた。Nakayama Yoken株、JaGAr01株、JaTH160株、JaOArB3279株、JaNH179株、JaNH180株、JaNAr12480株、JaNAr15980株、JaNAr17780株、JaNAr5681株、JaNAr9483株とThCMP1982株は、当部門にて分離ないしは保存されていた株である。各株はC6/36細胞に接種して、感染価約 10^8 PFU/mlの種ウイルスを作成した。

ウイルスの濃縮：20mg/mlのマイクロキャリアー（CytoDEX-1, Pharmacia, Sweden）を加えた500mlの増殖用培地を用いて、C6/36細胞の大量浮遊培養を28℃で行い、48時間後、増殖用培地を除き、細胞に20mlの種ウイルスを感染させた。ウイルス吸着を2時間室温で行い、450mlの維持培地（細胞増殖培地のウシ胎児血清濃度を2%としたもの）を加え、28℃にて48時間培養した後、感染培養液を採取し、細胞とマイクロキャリアーを低速遠心（2,500rpm, 15分）にて除去した。その上清にポリエチレングリコール6,000とNaClをそれぞれ最終濃度6g/dlと2.2g/dlになるように加え溶解し、高速遠心（10,000×g, 30分）した。上清を除き沈澱を8mlのSTE buffer（0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 0.001M EDTA, pH7.6）に再浮遊し、低速遠心（2,500rpm, 15分）にかけ、その上清を15%シヨ糖を含むSTE buffer溶液に重層し、Beckman L5-50（ローター；SW-41）にて超遠

心（37,000rpm, 120分）し、ウイルスを濃縮した。ウイルスRNAの抽出精製：0.1% SDS（sodium dodecyl sulfate）を含むSTE bufferに濃縮沈澱されたウイルスを溶解し、等量のSTE buffer飽和フェノールで2回抽出（15,000rpm, 5分）した。上層のRNAを含む水層を採取し、2倍量の冷エタノールを加え、-20℃にて一晚沈澱させ、遠心（15,000rpm, 30分）後、上清を除き沈澱したRNAを真空乾燥した。次にRNAを、0.1% SDSを含む0.2mlのSTE bufferに溶解し、0.1% SDSを含むSTE bufferで作成した15-30%シヨ糖密度勾配に重層して、SW-50.1ローターで20℃にて超遠心（45,000rpm, 180分）した。ISCO gradient fractionator, model 640を用いて分画し、254nmのピークを指標に42SウイルスRNAの分画を集め、再びエタノール沈澱と乾燥を行った。

オリゴヌクレオチドフィンガープリント法：ラベリングとフィンガープリントの方法は、本質的にPedersen and Haseltine（1980）が述べたものと同じである。精製したRNAを37℃にて60分、10 unitsのRNase-T1（三共純薬）を用いて切断した。オリゴヌクレオチドの5'末端に、2.5 unitsのpolynucleotide kinase（Boehringer Mannheim）の存在下に、 $10\mu\text{Ci}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ （5,000 Ci/mmol, Amersham International plc, England）を、37℃で6時間ラベルした。その反応混合物に、酢酸アンモニウムとyeast RNAの混合液を最終濃度0.3Mと1mg/mlになるように加えて反応を停止させ、エタノール沈澱及び真空乾燥した。 ^{32}P ラベルしたオリゴヌクレオチドの二次元電気泳動は、Wachter and Fiers（1972）の方法に若干の改良を加え行った。一次元電気泳動は、6M尿酸を含む7.2%（W/V）ポリアクリルアミドゲルをホウ酸にてpH3.3とし用い、4℃にてマーカー（BPB: Bromophenol blue）が15cm移動する迄行い、二次元電気泳動は、50mM Tris-borate（pH8.2）を含む22%（W/V）ポリアクリルアミドゲルを用い、室温にてBPBが22cm移動する迄行った。分離したオリゴヌクレオチドはX線フィルムを用いたオートラジオグラフィにより検出した。

類似性の計算：二株間の類似性 (SR: Similarity Ratio) については, Morita and Igarashi (1984) によって述べられた方法を用いた。即ち, 一方の株の特徴的なオリゴヌクレオチドスポット数をA, 他方の株の特徴的なオリゴヌクレオチドスポット数をB, それらのうち両株に共通なスポット数をCとし, $SR=2C/(A+B)$ と表した。

結 果

図2はオリゴヌクレオチドフィンガープリントの写真, 及びそれぞれのシェーマを, 日本の4株について示し, 図3は同様に外国の4株について示してある。このように, 実験に供した全株のスポットを比較し, 特徴的なスポットに番号を付けた。図4は全38株で観察されたこれらのスポットの一覧表である。全ての日本の株は, いくつかの同一スポット (No. 4, 5, 8, 15) を有している。一方, 他のいくつかのスポットは一株か数株にしか観察されない。例えば, スポット No. 11は, JaGAR01株 (Japan, 1959) と Kamiyama株 (Japan, 1966) に存在する。スポット No. 17は, Kamiyama株と1964年以降に分離された数個の外国の株に存在する。スポット No. 19は, ほとんどの日本の株と1964年以前に分離された数個の外国の株に存在する。スポット No. 31は, 1952年と1953年のシンガポールの Muar株と Tengah株にのみ存在する。スポット No. 34は, Nakayama RFVL株 (Japan, 1935), Kalinina株 (Japan, 1935), と Peking-1株 (China, 1949) に存在し, これら3株はいずれも1949年以前に分離されたものである。いくつかの外国の株は5個のユニークなスポット (No. 39, 42, 43, 46) を有している。最近のタイとヴェトナムの株は, スポットNo. 39を共有している。1980年にヴェトナムで分離された2株は, スポット No. 42を共有している。Muar株 (Singapore, 1952) のみは, スポット No. 43を有している。同様に, Tansui236株 (Taiwan, 1981) のみは, スポット No. 46を有している。JaOH0566株とその弱毒生ワクチン ML17株は, 多くの共通スポットを有していたが, 両者のフィンガープリン

トは必ずしも完全には一致していなかった。

図5は図4の一覧表を基に株間の類似性を求め示したものである。0.8以上のSRを示したものを■, 0.7以上0.8未満を□, 0.5以上0.7未満を-, 0.5未満を☆と表した。Peking-1株 (China, 1949) は, 実験に供した他のどの株 (SR: 0.34-0.78) とよりも, Nakayama Yoken株 (Japan, 1935) に対してより高いSR (0.80) を示した。全ての日本の株どうしは, かなり似ており (SR: 0.55以上), 分離年代が近ければ, 類似性は更に高かった。例えば, 1959年から1969年までの株間におけるSRは高く (SR: 0.63-0.68のSRを示す4通りの組み合わせを除けば, 0.70以上である。), 特に同一地域, 同一年代の株間では, 高いSRを示していた。JaGAR01株と JaGAR02株 (どちらも, Gunma, Japan, 1959)間では, $SR=0.93$ を示し, JaNH180株, JaNAr12480株, JaNAr15980株と JaNAr17780株 (いずれも, Nagasaki, Japan, 1980)間では, 0.84から0.95のSRを示していた。JaOH0566株とその弱毒生ワクチン ML17株のSRは0.88であった。地理的に近いタイとヴェトナムでの最近 (1980年-1983年) の分離株は, とてもよく似ていた (SR: 0.65-0.92)。特に, 1980年 Vietnam で分離された Vietnam129株と Vietnam136株間のSRは0.92と非常に高かった。これら最近のタイとヴェトナムの分離株は1960年以降の日本の株に対して, 概して低いSRを示した (SR: 0.28-0.67)。また, 1981年台湾で分離された Tansui236株と Tansui263株間のSRも0.87と高い値を示した。日本の株は, Peking-1株, S705/64株, Chiangmai株と Tansui263株に対して, 少し高いSRを示すものもあるが, ほとんどの日本での分離株は, タイ, ヴェトナム, 台湾及びその他の外国の分離株に対してかなり低い類似性を示した。図6は Nakayama RFVL株と他の株とのSRと, ウイルスが分離された国の首都間の距離の関係を示したものである。殆どの株は, ほぼ平行な二直線の間に入り, 分離された場所の距離が遠くなるほど, SRは低くなる傾向を示した。

緒 言

JE ウイルスは42S の (+) 極性の一本鎖 RNA 遺伝子を持つフラビウイルスである。このウイルスは、1935年東京での大流行以来、多くの株が、カ、ブタ、ウマ、ヒトより分離されてきた。現在、日本での患者発生数は年間数十名程度であるが、韓国、中国、台湾、タイ、ヴェトナム、インド、ネパール、スリランカなど東アジアから東南アジアさらには南アジアにかけて多数の患者発生があり、高い死亡率を示し重篤な後遺症を残す事から大問題となっている (Umenai *et al.*, 1985)。日本脳炎に関して、これまで疫学、病理学分野から分子生物学分野に至るまで、さまざまな研究がなされてきた。しかしながら、その自然生態、ことに温帯におけるウイルスの越冬様式は、いまだ解明されてない。RNase-T1 抵抗性オリゴヌクレオチドフィンガープリント法 (Wachter and Fiers, 1972) によるウイルス RNA 遺伝子の解析は、生態学上及び疫学上有益な方法であることは、インフルエンザウイルス (Nakajima *et al.*, 1980)、ポリオウイルス (Nottay *et al.*,

1981)、セントルイス脳炎ウイルス (Trent *et al.*, 1981)、デング1型ウイルス (Repik *et al.*, 1983)、デング2型ウイルス (Trent *et al.*, 1983)、黄熱17D ワクチン (Monath *et al.*, 1983)、そして、エンテロウイルス70 (Takeda *et al.*, 1984) などによって述べられてきた。本研究の目的は、JE ウイルスは、冬期、日本で越冬するのか、あるいは、毎夏、熱帯地方から渡ってくるのかの問題に対して手がかりを得るため、地理的、年代的に分離歴の異なる JE ウイルス 38株のオリゴヌクレオチドフィンガープリントの解析を行い、株間の類似性を遺伝子レベルで検討する事であった。

材料と方法

細胞：ヒトスジシマカ培養クローン C6/36 細胞 (Igarashi, 1978) を、10%ウシ胎児血清と各 0.1 mM の非必須アミノ酸加 Eagle 培養液 (Eagle, 1959) を増殖用培地として、28°Cにて培養した。

ウイルス：実験に供した JE ウイルス株は、表1

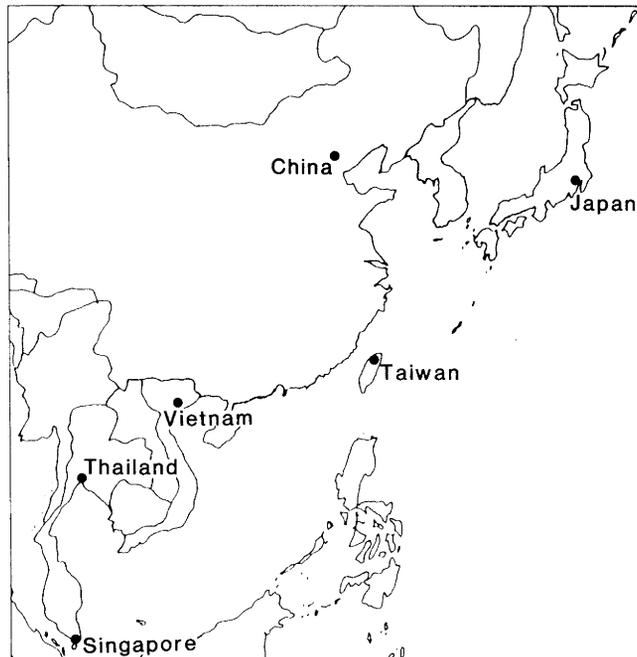


Fig. 1. Map of East to Southeast Asia. Only the capitals of countries where strains were isolated are shown.

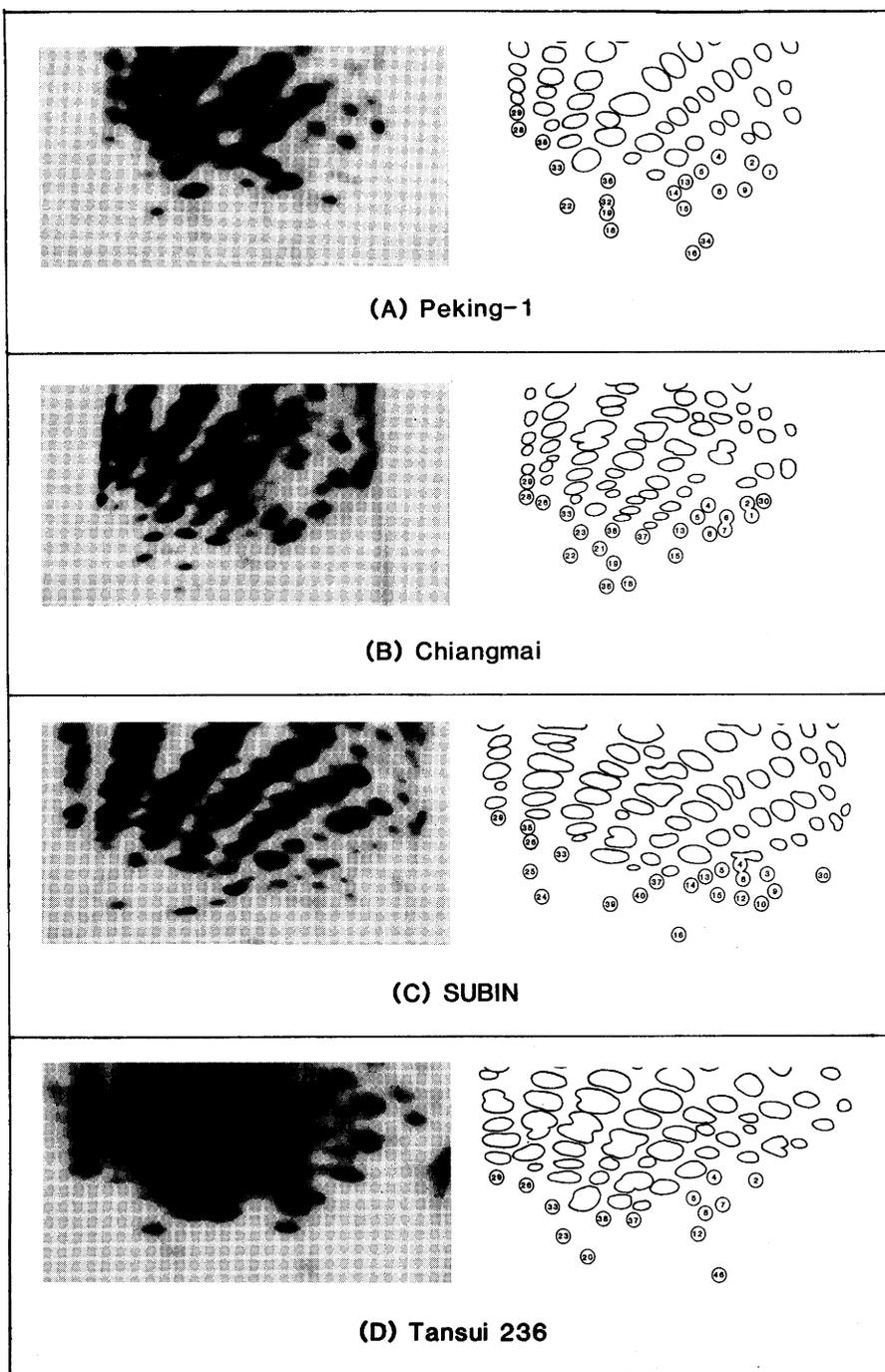


Fig. 3. Oligonucleotide fingerprint patterns and their schemas of 4 representative foreign strains. (A) Peking-1 (China, 1949), (B) Chiangmai (Thailand, 1964), (C) SUBIN (Thailand, 1983), (D) Tansui 236 (Taiwan, 1981).

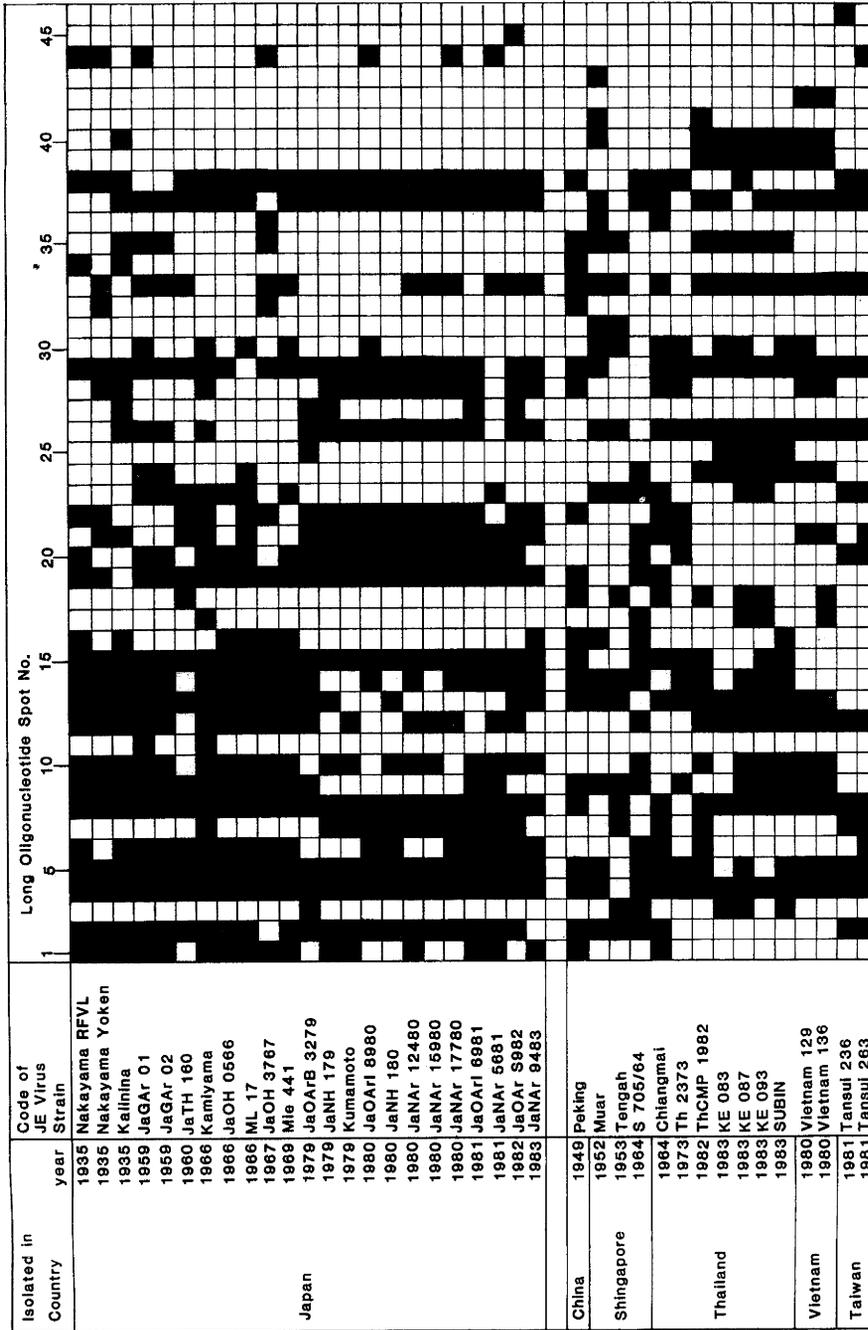


Fig. 4. Comparison of large oligonucleotide spots in 38 strains of JE virus. The symbol (■) indicates the existence of a spots.

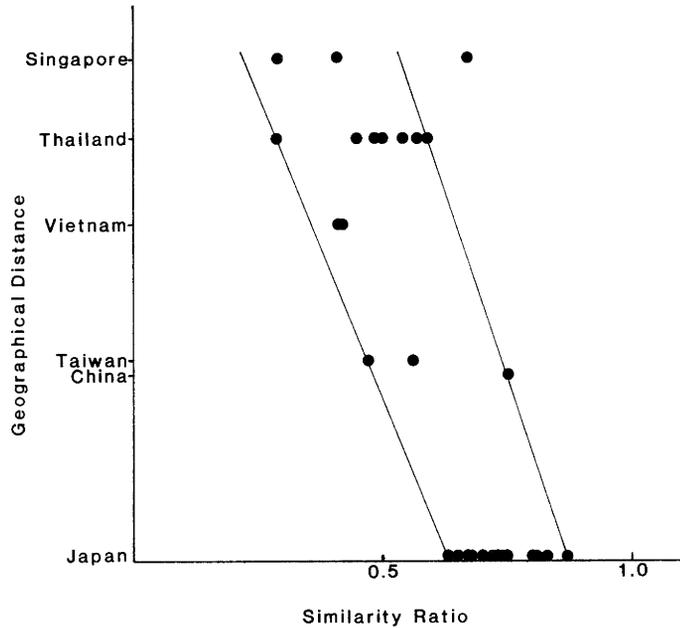


Fig. 6. Relationship between similarity ratios of JE virus isolates to Nakayama RFVL and their geographical distances. Each dot represents each isolate.

考 察

今日までいくつかのウイルスに関する生態学的及び疫学的研究において、RNase-T1 抵抗性オリゴヌクレオチドフィンガープリント法によるウイルス遺伝子 RNA の解析は、有益な情報を与えることが示されてきた。その結論の一つとして、地理的に同一地域、かつ同一年代に分離された株間はとても似ているが、他の地域、または同一地域でも年代が異なると、株間の類似性は低くなると報告されている。このことは次の人々によりなされた。セントルイス脳炎ウイルスにおける Trent *et al.*, (1981)、デング1型ウイルスにおける Repik *et al.*, (1983)、デング2型ウイルスにおける Trent *et al.*, (1983)、そしてゲタウイルスにおける Morita and Igarashi (1984) の報告に述べられている通りである。また、Nottay *et al.*, (1981) は、ヒトでの感染で継代された際にポリオウイルスの遺伝子に変化して行く様子を示した。そして、Monath *et al.*, (1983) は、ふ化鶏卵で継代された際の黄熱17D ワクチン株の遺伝子変化を示した。

Takeda *et al.*, (1984) はエンテロウイルス70の解析結果に基づき、ウイルス RNA の塩基変化をウイルス分離の時間軸と分離地点の地理的距離に応じて、三次元的に分離ウイルス株を配置し、円錐型の中に分離ウイルスが配置される事を示し、このウイルスが西アフリカのある地域で発生し、その後世界中に伝播し変異を繰り返してきた状況を考察した。本論文で示した通り1960年以後の日本の株と、古い(1964年)タイの株とは若干似ているものの、殆どの最近の日本の株は、タイやヴェトナム等、東南アジアの株とは明らかに異なる遺伝子 RNA を有すると考えられる。これらのことは、自然界に於てウイルス遺伝子の変異と撰択とが、地理的に充分離れた地域では、それぞれ独立して進行したことを示唆している。Nakayama Yoken株 (Japan, 1935) と Peking-1株 (China, 1949) はかなり似ていることより、古い日本の株と古い中国の株は、その進化の上で近縁であったのかもしれない。このことに関して、更に多くの当時から最近にかけての中国の株や他の東アジアの株の解析が必要かと考える。

Nakayama RFVL株に対する各株のSRと距離のグラフ(図6)に示されているように、分離年代その他の要因により同一地域で分離されたウイルス株のSRはある程度の変動幅を示すが、その変動にはほぼ一定の限界があり、株間の地理的差異は、分離場所の距離にほぼ比例して大きくなることが判明した。今回の研究で、同年代に日本と熱帯地方で分離された株間における日本脳炎ウイルス遺伝子RNAの類似性は低いが、同年代のそれぞれの地域の株間ではかなり高い類似性を示したことは、日本脳炎ウイルスが、毎夏、熱帯地方より日本その他の温帯へ移入されるのではなく、何らかの方法でウイルスは温帯地域で越冬しているのではないかという、いわゆるウイルス土着説に有利な知見である。最近、長谷川(1982)、小林ら(1983)、そして、Kimura-Kuroda and Yasui(1983)は、モノクローナル抗体による日本脳炎ウイルスの分類を報告した。また、高木ら(1984)は、日本脳炎ワクチン株が産生する中和抗体産生能力よっての日本脳炎ウイルスの分類を報告した。これらの分類によると、JaOH0566株とMie441株はNakayama株と似ており、一方、JaGAR01株、JaOH3767株とChiangmai株はPeking-1株に似ている。これらは、必ずしも、今回のフィンガープリントの結果とは完全には一致していない。しかしながら、抗原性の変化ない

しは類似性は、ウイルス構造蛋白特にウイルス粒子表面の糖蛋白、GP58(Trent, 1977)によるので、抗原解析の結果は全遺伝子RNAにおける変化を反映しているフィンガープリントの結果とは、必ずしも一致する必要はない。

結 語

地理的、年代的に異った分離歴を有する日本脳炎ウイルスについて遺伝子の異同の程度を、RNAのオリゴヌクレオチドフィンガープリント法により解析した。同一地域かつ同年代の分離株は互いにとても似ている。しかしながら、異なる地域での分離株間や、同一地域でも年代が異なった分離株間では、類似性が低くなる。日本での分離株は互いによく似ており、分離年代が近いと更に高い類似性を示している。地理的に隣接しているタイとヴェトナムにおける最近の分離株は互いによく似ているものの、日本における最近の分離株とは似ていない。これらのことより、自然界においてウイルス遺伝子の変異と撰択とが、地理的に充分離れた地域ではそれぞれ独立して進行したことを示唆している。Nakayama Yoken株(Japan, 1935)とPeking-1株(China, 1949)はかなり似ていることより、以前は、日本と中国の日本脳炎ウイルスは、近縁であったことを示すのかもしれない。

謝 辞

稿を終わるに当たり、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました当部門五十嵐章教授と、ウイルス株分与に関し、国立予防衛生研究所大谷明部長、緒方隆幸博士、愛媛大学小林譲教授、阪大微生物病研究会、大阪府立公衆衛生研究所に深甚の謝意を捧げます。また実験に際して御協力頂いた教職員各位に心より謝意を表します。

文 献

- 1) Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432-437.
- 2) 長谷川均 (1982): 細胞融合法によって作成された日本脳炎ウイルスに対するモノクローナル抗体の性状. *感染症学雑誌*, 56, 855-866.
- 3) Igarashi, A. (1978): Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone Sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, 40, 531-544.
- 4) Kimura-Kuroda, J. & Yasui, K. (1983): Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3 (E) of Japanese encephalitis virus, using monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 45, 124-132.
- 5) 小林 譲, 長谷川均, 小山 孝, 玉井伴範, 城口朝雄, 草場公宏 (1983): モノクローナル抗体による日本脳炎ウイルスの免疫学的性状の解析. *感染症学雑誌*, 57, 519-530.
- 6) Monath, T. P., Kinney, R. M., Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W. & Bres, P. (1983): Ontogeny of yellow fever 17D vaccine; RNA oligonucleotide fingerprint and monoclonal antibody analyses of vaccines produced world-wide. *J. Gen. Virol.*, 64, 627-637.
- 7) Morita, K. & Igarashi, A. (1984): Oligonucleotide fingerprint analysis of strains of Getah virus isolated in Japan and Malaysia. *J. Gen. Virol.*, 65, 1899-1908.
- 8) Nakajima, S., Nakajima, K., Takeuchi, Y. & Sugiura, A. (1980): Influenza surveillance based on oligonucleotide mapping of RNA of H1N1 viruses prevalent in Japan. 1978-1979. *J. Infect. Dis.*, 142 (4), 492-502.
- 9) Nottay, B. K., Kew, O. M., Hatch, M. H., Heyward, J. T. & Objieski, J. F. (1981): Molecular variation of type 1 vaccine-related and wild polioviruses during replication in humans. *Virology*, 108, 405-423.
- 10) Pedersen, F. S. & Haseltine, W. A. (1980): Analysis of the genome of an endogenous, ecotropic retrovirus of the AKR strain of mice: micromethod for detailed characterization of high-molecular-weight RNA. *J. Virol.*, 33, 349-365.
- 11) Repik, P. M., Dalrymple, J. M., Brandt, W. E., McCown, J. M. & Russell, P. K. (1983): RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32, 577-589.
- 12) 高木光生, 合田英雄, 大西敏之, 森千里, 高延壮男, 吉田巖, 深井孝之助, 国田信治 (1984): 改良日本脳炎ワクチンの試作. 第32回日本ウイルス学会総会演説抄録, 1011.
- 13) Takeda, N., Miyamura, K., Ogino, T., Natori, K., Yamasaki, S., Sakurai, N., Nakazono, N., Ishii, K. & Kono, R. (1984): Evolution of enterovirus type 70: oligonucleotide mapping analysis of RNA genome. *Virology*, 134, 375-388.
- 14) Trent, D. W., Grant, J. A., Vorndam, A. V. & Monath, T. P. (1981): Genetic heterogeneity among Saint Louis encephalitis virus isolates of different geographic origin. *Virology*, 114, 319-332.
- 15) Trent, D. W., Grant, J. A., Rosen, L. & Monath, T. P. (1983): Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*, 128, 271-284.
- 16) Umenai, T., Krzyski, R., Bektimirov, A. & Assaad, F. A. (1985): Japanese encephalitis: current worldwide status. *Bull. WHO.*, 63, 625-631.
- 17) Wachter, R. D. & Fiers, W. (1972): Preparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ³²P-labeled RNA. *Anal. Biochem.*, 49, 184-197.