

A2 ウイルス性食中毒 S R S V 検査法のプロトコール

分担研究者 篠川 旦

新潟県保健環境科学研究所ウイルス

科長

1 RT-PCR 法

Nuclease free water 28.0 μ l

10x Reaction buffer 5.0

25mM MgCl₂ 5.0

10mM dNTPs 2.0

AMV RT enzyme (20U/ μ l) 1.0

Rnasin (40U/ μ l) 1.0

Primer (+) 50pmol 1.0

Primer (+) 50pmol 1.0 (プライマーは、(+)側に複数設定する)

Primer (-) 50pmol 1.0

RNA sample 5.0

42 °C 1 時間 逆転写反応後、0.5 μ l の taq polymerase を加える。

2 PCR 法

1 1 回 94 °C 4 分

2 5 回 94 °C 1 分

45 °C 2 分

60 °C 4 分

3 30 回 94 °C 1 分

45 °C 1 分

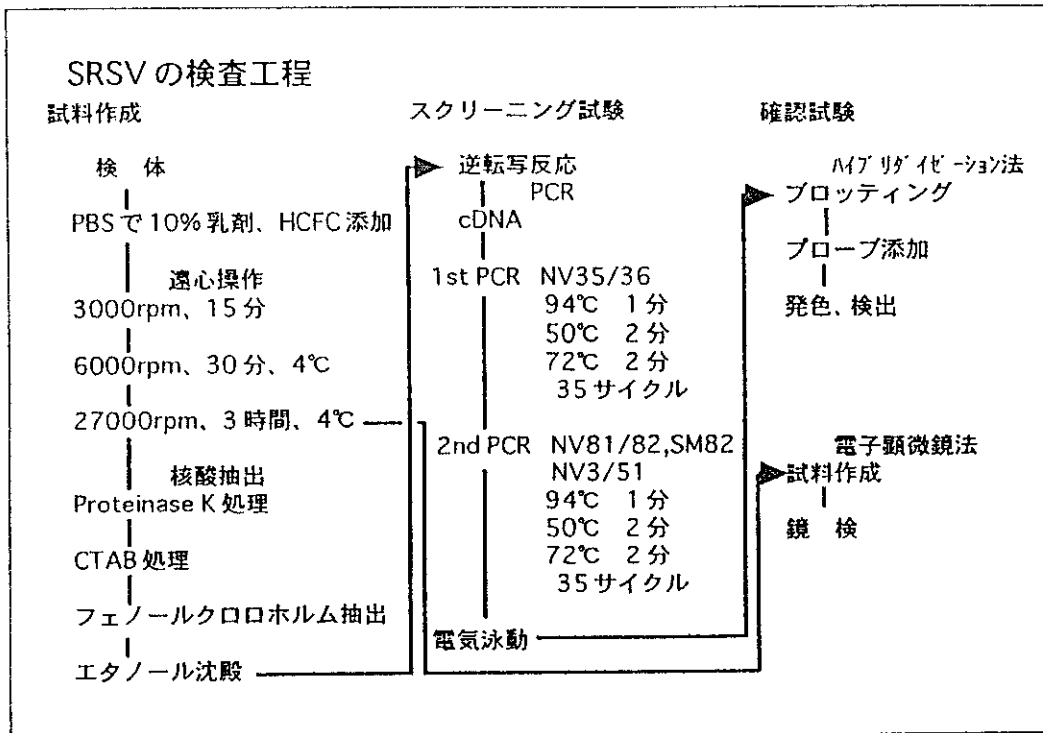
72 °C 1 分

4 72 °C 5 分 以後 5 °C に保持

3 Nested PCR

必要に応じて、1 μ l の 1st PCR 産物について Nested PCR を行う。

1998 年陽性検体は上記の方法で、すべて 1st PCR で検出された。



S R S V PCR工程表

検査数: _____

- sample: 6,000rpm sup 6ml
- 24%PEG-1.2M NaCl 3ml
- ↓
- 4°C 2時間 (一夜)
- 10,000rpm 30分
- ↓
- 沈渣
- DDW 200μl
- ↓
- 沈渣+DDW 100μl
- 2×ProtenaseK buffer 100μl
- 20mg/ml ProtenaseK 5μl
- ↓
- ホルテックス
- ↓
- 37°C 30分
- ↓
- 10%CTAB 100μl
- 4M NaCl 100μl
- ↓
- ホルテックス
- ↓
- 56°C 30分
- ↓
- フェノクロイソamil(25:24:1) pH5.2 400μl
- ↓
- ホルテックス
- ↓
- 14,000rpm 室温 15分
- ↓
- 水層 350μl
- フェノクロイソamil(25:24:1) pH5.2 350μl
- ↓
- ホルテックス
- ↓
- 14,000rpm 室温 15分
- ↓
- 水層 300μl
- ↓
- 3M NaOAC 30μl
- Glycogen 20mg/ml 1μl
- EtOH (上清×2.5) 750μl
- ↓
- 転倒混和
- ↓
- 80°C 2時間(一夜)
- ↓
- 14,000rpm 4°C 15分
- ↓
- 沈渣+70% EtOH 500μl
- ↓
- 14,000rpm 4°C 15分
- ↓
- 沈渣乾燥 37°C 30分
- ↓
- DDW 8μl

試薬類必要量=検査数×1.1×1件当り必要量

RT mix	1件当り	必要量
<input type="checkbox"/> DDW	4.3 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 10×RT buffer	1.5 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 2.5mM dNTPs	4.0 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 40U/μl RNase inhibitor	0.5 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 27U/μl AMV RT	5U 0.15 μl	_____ μl

<input type="checkbox"/> RNA sample	4 μl	
<input type="checkbox"/> 50 μM NV35, NV35A, NV35C	各 0.2 μl	_____ μl

70°C 10分

0°C 10分

RT Mix 10.4 μl

41°C 60分

94°C 10分

0°C 10分

1st PCR mix	1件当り	必要量
<input type="checkbox"/> DDW	72.9 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 10×PCR buffer	8.5 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 50 μM NV36	0.2 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 2.5mM dNTP	4.0 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 5U/μl Taq DNAPolymerase	0.4 μl	_____ μl

1st PCR mix 85 μl

cDNA 15 μl

1st PCR

94°C 5分

94°C 1分

50°C 2分

72°C 2分

72°C 10分

20°C 5分

↓

2nd PCR mix	1件当り	必要量
<input type="checkbox"/> DDW	35.4 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 10×PCR buffer	5.0 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 2.5mM dNTP	4.0 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 50 μM NV81	0.2 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 50 μM NV82, SM82	各 0.2 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 50 μM NV3, NV51	各 0.2 μl	_____ μl
<input type="checkbox"/> 5U/μl Taq DNAPolymerase	0.2 μl	_____ μl

1st PCR product

94°C 10分

0°C 10分

2nd PCR mix 46 μl

1st PCR product 4 μl

↓

2nd PCR

94°C 5分

94°C 1分

50°C 2分

72°C 2分

72°C 10分

20°C 5分

↓

- loading solution 2 μl + 2nd PCR product 13 μl
- loading solution 2 μl + 100base marker 1 μl

A) ウイルス性食中毒 SRSV 検査法の適正標準化

分担研究者 野口有三、宇宿秀三、宗村徹也
横浜市衛生研究所

(1) フローチャート

1. 糞便材料

10%糞便乳剤 (PBS)

↓
冷却遠心 (15,000rpm, 20分, 4°C)

↓ ← 30% sucrose 2ml

↓ ← 上清 3mlを重層

超遠心 (40,000rpm, 120分, 4°C)

↓
滅菌蒸留水 50 μl に浮遊 (sample)

↓ → 電顕用試料に使用

↓
RNA抽出用試料

↓
sample (25 μl) を 1.5ml tube に採取

↓ ← 24% PEG (125 μl),

↓ ← DEPC H₂O (225 μl), vortex

4°C, 90分以上静置

↓

12,000rpm, 20分, 4°C

↓ 上清を除去

沈渣

↓ ← DEPC H₂O (50 μl), vortex

↓ ← 2x Proteinase K Buffer (50 μl), Proteinase K (20mg/ml) (4 μl)

↓ vortex

37°C, 15分 加温

↓ ← 6% CTAB (40 μl), 4M NaCl (25 μl), vortex

56°C, 15分 加温

↓ ← Phenol/CHCl₃/isoAmOH (25:24:1) (100 μl), vortex

12,000rpm, 15分, 4°C

↓

上清を New 1.5ml tube に採取

↓ ← EtOH (250 μl), 3M NaOAc (3.3 μl), Glycogen (1 μl), vortex

-70°C, 30分 静置

↓

12,000rpm, 30分, 4°C

↓ 上清を除去

沈渣

↓ ← DEPC H₂O (30 μl)

↓
RNA solution

↓
RT 反応, 42°C, 60分

↓
1st PCR

↓
2nd PCR

↓
SRSV 遺伝子の確認

2. 食品材料

20%食品乳剤 (PBS)

↓

ホモジネート (ストマッカー, 3分)

↓

HCFC-141b 処理

↓

冷却遠心 (15,000rpm, 20分, 4°C)

↓ ← 30% sucrose 2ml

↓ ← 上清 3mlを重層

超遠心 (40,000rpm, 120分, 4°C)

↓

滅菌蒸留水 50 μl に浮遊 (sample)

↓

以下, 糞便材料と同様に **RNA抽出用試料** として使用

1st PCR, 2nd PCR の反応条件

94°C	3分間	1回	
94°C	1分間	} 40サイクル	
55°C	1分間		
72°C	1分間		
72°C	15分間	1回	

1st PCR 用プライマー (35/36)

2nd PCR 用プライマー (NV81, NV82, SM82)

A) ウイルス性食中毒 S R S V 検査法の適正標準化

分担研究者 野口有三、宇宿秀三、宗村徹也
横浜市衛生研究所

(2) プロトコール

1. cDNAの合成

試薬	1 sample
DDW	11.3 μ l
10 \times RT buffer	3.0 μ l
2.5mM dNTPs	8.0 μ l
10 μ M Primer (35)	1.5 μ l
40U/ μ l RNase inhibitor	1.0 μ l
27U/ μ l AMV RT	0.2 μ l
RNA sample	5.0 μ l
total	30.0 μ l

2. 1st PCR

試薬	1 sample
DDW	61.0 μ l
10 \times PCR buffer	7.0 μ l
10 μ M Primer (36)	1.5 μ l
5U/ μ l Taq polymerase	0.5 μ l
RNA sample	30.0 μ l
total	100.0 μ l

3. 2nd PCR

試薬	1 sample
DDW	37.3 μ l
10 \times PCR buffer	5.0 μ l
2.5mM dNTPs	4.0 μ l
50 μ M Primer (NV81)	0.5 μ l
50 μ M Primer (NV82)	0.5 μ l
50 μ M Primer (SM82)	0.5 μ l
5U/ μ l Taq polymerase	0.2 μ l
RNA sample	2.0 μ l
total	50.0 μ l

4. 試薬リスト

- 1) 24% Polyethlen Glycol 溶液 (24% PEG in 1.2M NaCl)
Polyethlen Glycol 6000: 和光
- 2) 20mg/ml Proteinase K (タカラ 9032 5ml)
- 3) 2 \times Proteinase K Buffer (0.3M NaCl, 2mM EDTA, 2% SDS, 0.2M TrisHCl pH7.6)
- 4) 6% CTAB 溶液 (6% CTAB in 0.4M NaCl)
Hexadecyltrimethylammoniumbromide (Sigma H-5882 500g 入り)
- 5) 4M NaCl
- 6) 10 \times RT buffer (TOYOBO AMV 逆転写酵素の添付品)
- 7) 2.5mM dNTPs (TaKaRa EX Taq の添付品)
- 8) RNase inhibitor (TOYOBO SIN 101)
- 9) AMV Reverse transcriptase (TOYOBO LME 704)
- 10) 10 \times PCR buffer (TaKaRa EX Taq の添付品)
- 11) エタチンメイト

5. 機器類 (サーマルサイクラー)

- 1) パーキンエルマー GeneAmp 2400

1、抗アイチウイルスプレートの作成

1次コーティング：抗愛知ウイルスモノクロナール抗体（Ai/2）と抗ツツガ虫病リケッチアモノクロナール抗体（Kp/1C10；陰性コントロール）をPBSで1：10,000に希釈し96穴アッセイプレートの各ウェルに100 μ lずつ添加後、湿潤箱に入れ4 $^{\circ}$ Cで1夜置く。

2次コーティング：プレートのモノクロナール抗体をすて、PBS-Tで2回洗浄後0.2%BSA加PBS-T（0.02%アジ化ナトリウム加）を各ウェルに200 μ lずつ添加し4 $^{\circ}$ Cで1夜以上置く（この状態で保存可）。

2、試料の添加

2次コーティング液を捨て、アッセイ用試料を各ウェルに100 μ lずつ添加し4 $^{\circ}$ Cで1夜置く。

3、2次抗体の添加

アッセイ用試料を捨て、PBS-Tにて3回洗浄後、抗アイチウイルスモルモット血清を0.2%BSA加PBS-Tにて1：20,000に希釈したものを各ウェルに100 μ lずつ添加し、37 $^{\circ}$ C、2時間置く。

4、ラベル血清の添加

5、酵素反応基質液の添加

6、吸光度の測定

7、判定

両対数表にて縦軸に陽性ウェルのOD値、横軸に陰性ウェルのOD値をとる。（陽性；陰性）
=（0.05；0.004）および（0.2；0.09）の点を通る直線を引く。陽性ウェルのOD値が0.1以上で、作成した表に各試料の陽性ウェルと陰性ウェルOD値に基づきプロットした時直線より上に来た場合陽性と判断する。

参考文献：Yamashita, T. et al. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. J. Clin. Microbiol. 31:2938-2943, 1993.

試薬

- 1、プライマー
C94B vs 264K (3C-3D region)
- 2、リバーストランスクリプタゼ (RT)
BRL社 M-MLVRT
- 3、Rnase インヒビター : RNA to RNA社
- 4、Taq. DNA polymerase : Boehringer社
- 5、DNA marker : タカラ社
- 6、アガロース
- 7、グリコーゲン : Boehringer社
- 8、TRIzol-LS : Gibco社、核酸抽出用

ストック液

- 1、TAE液 (50X) : 100ml → 高圧滅菌
24.2g Tris base
5.71ml acetic acid
10ml 0.5M EDTA (pH8)
- 2、TE液 (PH8) : 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH8)
0.5M および1M液を高圧滅
- 3、2.5 or 10 mM dNTP : タカラ社100mM dNTPs を混合
- 4、5x Denhardt溶液 : 1% BSA, 1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidone
- 5、プレハイブリダイゼーション液 : 5x SSC, 1% SDS, 1x Denhardt
- 6、ハイブリダイゼーション液 : 0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8), 2.5mM EDTA, 1% SDS, 1x Denhardt, 50 μ g/ml サケ精子

方法

1、TRIzolによる抽出

1ml エッペンドルフチューブにTRIzol液0.75ml とサンプル液0.25mlを加え5分間混合する。クロロホルム0.2mlを加え2分間混合する。12K, 10min. 遠心分離し、上清（水層）を1.5mlチューブに採取する。2 mLのグリコーゲンと0.5mlのイソプロピルアルコールを加え室温に10分置く。14K で10分遠心して上清を除き、70%エタノールで1回洗浄後ペレットを乾燥させる。

2、cDNAの作成

oligo dT(15) & random primer混合液20 μ lを、先のチューブに加え100℃で1分加熱後0℃に急冷(5分)する。RT 混合液10 μ lを加え37℃、1時間反応させる。

4、PCR 反応

45 μ lのPCR混合液に上記RT反応液5 μ lを加えPCR反応を行う。

アガロースゲル電気泳動で266bpのPCR産物を確認する。

5、サザントランスファー法による確認

アガロースゲル電気泳動にて陽性のサンプルをナイロンフィルターに転写し、UV照射で固定する。水で膜を湿らせた後、3xSSCで60℃、30分インキュベートする。プレハイブリダイゼーション液で60℃、2時間インキュベートする。プローブをハイブリダイゼーション液で100倍に希釈し60℃で一晩インキュベートする。洗浄後ビオチン-アビジン反応で特異バンドを確認する。

6、塩基配列による確認を行う場合、標準株の配列 (assecion no.: AB010145) と90%以上の相同性があれば良い。

参考文献：山下照夫ら、胃腸炎患者から分離された新型ピコルナウイルス（アイチウイルス）のRT-PCR法による検出、臨床とウイルス（投稿中）

食品衛生法にアイチウイルス検査指針を加えるべきか否かについて

疫学調査が愛知県でしか行われておらず、その重要性についての客観的な判断がなされていない現時点では時期尚早であるという結論となりました。他の機関においても調査が行われ食品衛生に重要なウイルスであることが確認されてからでも遅くはないと考えます。

RT Method for Enteric RNA Virus RNA Extraction

山下照夫 (愛知県衛生研究所)

750 μ l Trizol-LS (GIBCOBRL)
250 μ l Sample
↓
Vortex
↓
Incubate 5min at RT
↓
Add 200 μ l of chloroform
↓
Vortex
↓
Incubate 2min at room temperature
↓
cfg 12,000 rpm for 10 min --> sup
↓
Transfer the aqueous phase to new tube
↓
Add 2 μ l Glycogen
Add 500 μ l Isopropyl Alcohol
↓
Incubate 10min at room temperature
↓
cfg 14,000 rpm for 10 min --> ppt
↓
Rinse by 1000 μ l of 70% EtOH
↓
cfg 14,000 rpm for 5 min --> ppt
↓
Dry up

Revers Transcription

Add 14 μ l DDW
4 μ l X5 RT buffer
1 μ l Oligo dT(15) (100 μ g/ml)
1 μ l Random primer (10 OD)
↓
boil for 1 min
↓
Quick chill and short spin
↓
Add 4 μ l DDW
2 μ l X5 RT buffer
2 μ l 10mM dNTPs
1 μ l MMLV-RT
1 μ l RNAsin
↓
37°C for 60min

PCR reaction for Aichi virus

山下照夫 (愛知県衛生研究所)

33.5 μ l DDW
 5 μ l X10 Buffer(Boehringer)
 5 μ l 2.5mM dNPTs
 0.5 μ l primer (c94b)
 0.5 μ l primer (264k)
 0.5 μ l Taq pol(Boehringer)
 5 μ l Sample

↓

94°C	2 min	
94°C	0.5 min	←
		30 cycles
60°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C		

Transfer to nylon membran by Vacuum Blotting

Southern Hybridization at 60 °C, 20h.

Primer Sequences

+Primer (C94b):5' -gacttccccggagtcgtcgtct
 -Primer (264K):5' -gacatccggttgacgttgac

Probe Sequence

AiPrb2:5' -Biotin-accttcgaaggtctgtgcgg

1st PCR reaction for Norwalk-like viruses

栄 賢司 (愛知県衛生研究所)

28 μ l DDW
 10 μ l X5 Amp direct A(Shimazu)
 5 μ l 2.5mM dNPTs
 0.5 μ l primer (G1F1 or G2F1 10 OD)
 0.5 μ l primer (G1R1 or G2R1 10 OD)
 0.5 μ l BSA
 0.25 μ l Taq pol(TOYOBO)
 5 μ l Sample

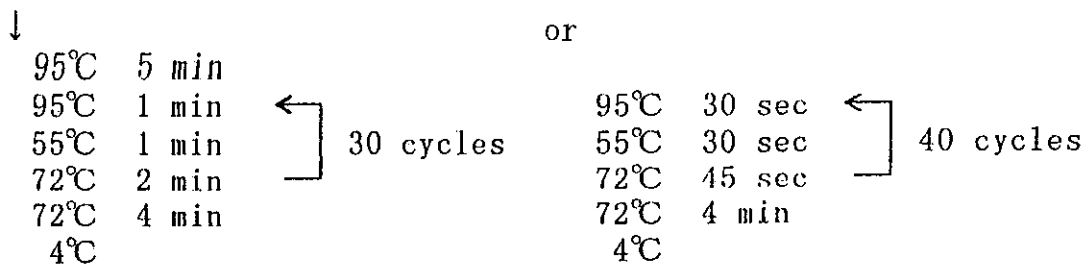
↓

95°C	5 min		or		
95°C	1 min	←		95°C	30 sec
55°C	1 min	30 cycles		55°C	30 sec
72°C	2 min			72°C	45 sec
72°C	4 min			72°C	4 min
4°C				4°C	

40 cycles

2nd PCR reaction

29 μ l DDW
 9 μ l X5 Amp direct A(Shimazu)
 5 μ l 2.5mM dNPTs
 0.5 μ l primer (G1F2 or G2F2 10 OD)
 0.5 μ l primer (G1R1 or G2R1 10 OD)
 0.5 μ l BSA
 0.25 μ l Taq pol(TOYOBO)
 5 μ l Sample



Amplified 314bp of G1 or 313bp of G2

Primer Sequence

Genogroup 1

- G1F1 20mer
5' - TgC CCg AAT TCg TAA ATg AT -3'
- G1F2 20mer
5' - TgA TgA Tgg CgT CTA Agg AC -3'
- G1R1 23mer
5' - CCA ACC S*AR* CCA TTR* TAC ATT Tg -3'

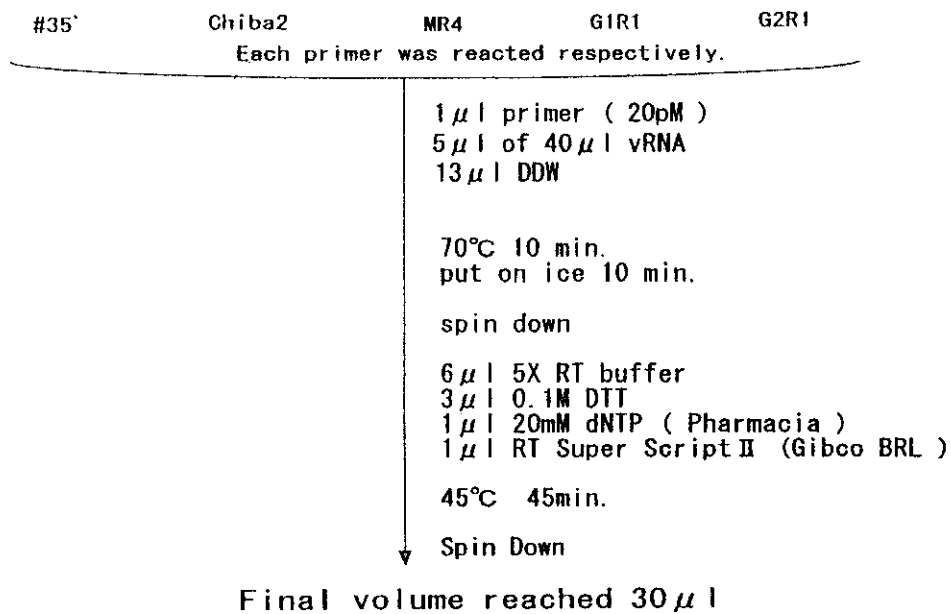
Genogroup 2

- G2F1 20mer
5' - Tgg gAg ggC gAT CgC AAT CT -3'
- G2 20mer
5' - gTg AAT gAA gAT ggC gTC gA -3'
- G2R1 20mer
5' - gCA TAA CCA TTR* TAC ATT CT -3'

(R=A or g, S=g or C)

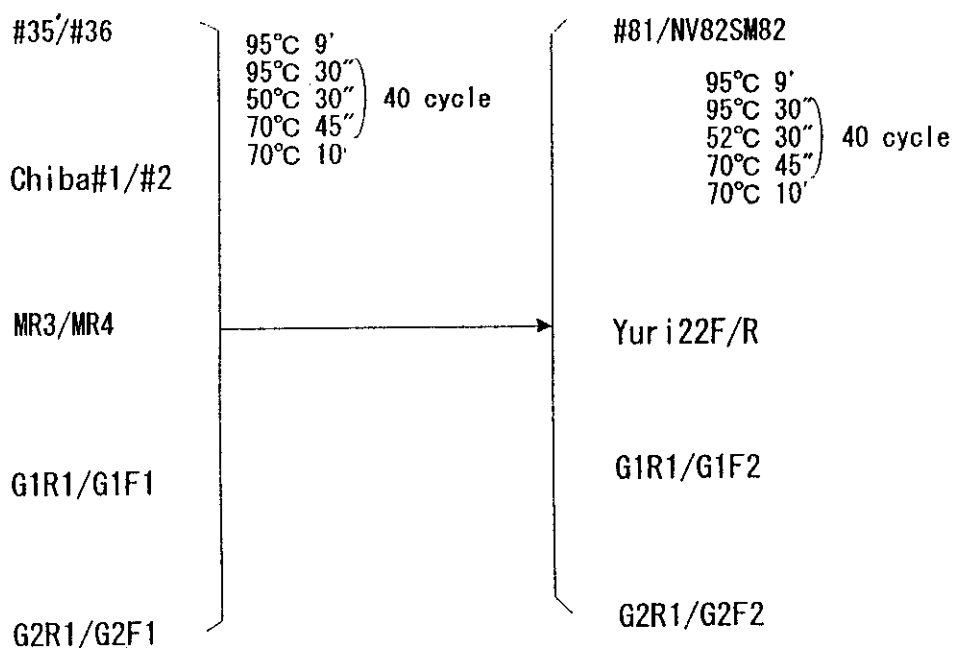
vRNA was extracted by modified method of Beilar medical college.

Reverse Transcription



PCR装置 Perkin Elmer Gene Amp System 9700, 2400
PCR酵素 Perkin Elmer Ampli Taq Gold

Amplification method



SRSV 核酸抽出法(CTAB 法)

1. 10~50%糞便乳剤 約 1,000 μ l
軽く遠心(ピペットで吸い取りやすくするため 3,000 r.p.m. 10 sec.) この上清 200 μ l をスタートとする。
2. 200 μ l フルオロカーボンを加え十分に攪拌する。13,000 r.p.m. 5 min. 4 $^{\circ}$ C
3. Sup. に 0.8M NaCl 16% PEG 6000 混合液を 200 μ l 加え、氷中に 30min. その後 13,000 r.p.m. 30 min. 4 $^{\circ}$ C 遠心を行いペレットにする。
4. ペレットに DDW 70 μ l, 5X PK バッファー 20 μ l, PK(20mg/ml) 10 μ l を入れ、指で弾いてペレットをほぐす。
5X PK バッファー : 0.5M Tris-HCl pH 7.5, 63mM EDTA, 0.75M NaCl, 5% W/V SDS を混合、分注して室温保存。
5. 0.4M NaCl を添加した 6% CTAB 液 50 μ l を加えタッピングして混合。白濁したら室温で 5min. 放置。
6% CTAB 液は、0.5M NaCl 80ml, CTAB 6g を溶かした後メスアップして 100ml とする。
6. 200 μ l フェノール・クロロフォルム混合液を加え、ボルテックスで十分に混和する。
13,000 r.p.m. 5 min. 4 $^{\circ}$ C 遠心し、上清を新しいチューブに取る。
6. クロロフォルム 200 μ l を加えボルテックスで十分に混和する。13,000 r.p.m. 5 min. 4 $^{\circ}$ C
7. 新しいチューブには、あらかじめ、エタ沈メイト (日本ジーン) の、エタ沈メイト 1.5 μ l, Sodium Acetate 5.0 μ l を加えておき、そのチューブに遠心上清を加える。
8. さらに 400 μ l のエタノールを加えてボルテックスで十分に混和した後に-30 $^{\circ}$ C のフリーザーで一晩置く。
9. 13,000 r.p.m. 30 min. 4 $^{\circ}$ C で遠心を行いペレットにして RNA を回収する。
10. 乾燥は、真空乾燥機を使用せず、インキュベーターで乾燥する。15~30 min.
11. 乾燥したチューブに、20u Rnase Inhibitor (Promega N2511)を含む DEPC 処理 DDW を 40 μ l 加える。タッピングしてペレットをほぐし、さらに氷中で 30 min. 程度放置しておく。

逆転写反応とPCR

1. 逆転写に使用するプライマーは、#35', Chiba, MR4, G1R1, G2R1 の5種類のアンチセンスプライマーを使用する。

逆転写反応液組成 No. 1 (μl)

Primer (20 μM) 1.0
 vRNA 5.0 抽出 vRNA 5 μl を逆転写反応に用いる。
 DDW 13.0

以上の組成で混合し、14.0 μl/tube とし、70°C ヒートブロックで5分間加熱後、氷中で急冷する。(氷中には10分程度置いておく。) この間に、逆転写反応液 No.2 を用意する。

2. 逆転写反応液 No.2 (μl)

5X RT buffer 6.0
 0.1M DTT 3.0
 dNTP 1.0
 Super Script II 0.5 GIBCO BRL 18064-014
 DDW 0.5

マイクロ遠心機により遠心する。その後、逆転写反応液を tube に 11 μl/tube 分注する。軽く攪拌して液を混合した後に 50°C に加温したヒートブロックに入れ、30~60min. インキュベートする。マイクロ遠心機で遠心し、cDNA の出来上がり。

1st PCR プライマーペアは、#35'/#36, Chiba1/2, MR3/4, G1F1/G1R1, G2F1/G2R1 の5種類を行う。

① PCR 反応液の調整 (プライマーは 20 μM)

10X buffer	5.0 μl	
dNTP	5.0	
sense Primer	1.0	
antisense Primer	1.0	
Ampli Taq Gold	0.25	ABI
DDW	32.75	
DNA	5.0	

② チューブを攪拌後マイクロ遠心機でスピンドウンする。

③ これらチューブを Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 で、

1	95°C	9 min.
2	95°C	30 sec. 2~4 のステップを 40 サイクル
3	50°C	30 sec.
4	70°C	60 sec.
5	70°C	10 min.
6	4°C	hold

2nd PCR 実施分

① 2nd PCR 用混合液作成

プライマーペアは、NV81/NV82/SM82, Yuri22F/R, G1F2/G1R1, G2F2/G2R1 の4組みのプライマーペアを使用する。

10X buffer 5.0

dNTP(10X) 5.0

Primer #1 1.0

Primer #2 1.0

Ampli Taq Gold 0.25

DDW 36.75

1st PCR product 1.0

軽く混合した後に水滴を落とすため軽く遠心しする。

② これらチューブを Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 で、

1 95°C 9 min.

2 95°C 30 sec. 2~4 のステップを 40 サイクル

3 52°C 30 sec.

4 70°C 60 sec.

5 70°C 10 min.

6 4°C hold

アガロースゲル電気泳動で確認する。

SRSV検査法プロトコール

福井県衛生研究所

分担研究者 松本 和男

協力研究者 東方 美保

1. 材料の前処理

糞便(1~1.5g)

- ↓ DDWで10%乳剤に調製
- ↓ 3,000 rpm, 4°Cで10分遠心
- 上清(300 μ l)

生力糞(中腸腺5コ=1ロット)

- ↓ 凍らせてからDDW (37°C) を加えかきまぜて、固形物を取り除く
- ↓ 3,000 rpm, 4°Cで10分遠心
- 上清(300 μ l)
- ↓ トリフルオロカーボン処理

上清(250 μ l)

- ↓ ポリエチレングリコール処理 (最終濃度 8%・4°Cで2時間~オーバーナイト静置)
- ↓ 12,000 rpm, 4°Cで30分遠心

沈査

- ↓ DDWでとかし、2 \times ProK buf. (0.3M NaCl, 2mM EDTA, 2% SDS, 0.2M Tris HCl pH 7.6)を同量加える
- ↓ Proteinase K 処理 (最終濃度 80 μ g/mL・37°Cで15分静置)
- ↓ CTAB 処理 (50mM NaCl存在下 最終濃度 1.25%・56°Cで15分静置)

RNA抽出用 sample

2. RNA抽出:

RNA抽出用 sample

- ↓ TRIZOL LS Reagent 750 μ L を加え vortex
- ↓ クロロホルム 200 μ L を加え、15秒間激しく混和する
- ↓ 15~30°C(室温)に15分静置
- ↓ 12,000 rpm, 4°Cで15分遠心

上清

- ↓ 20mg/mL グリコーゲン 2 μ L、イソプロパノール 500 μ Lを加えvortex
- ↓ 15~30°C(室温)に10分静置
- ↓ 12,000 rpm, 4°Cで15分遠心

沈査

- ↓ 70% エタノール 1 ml を加える
- ↓ 12,000 rpm, 4°Cで10分遠心

沈査 (エタノール完全に除去)

- ↓ DDW 50 μ Lでとかす

RNA

3. DNase I 処理・逆転写反応

5 \times RT bf.	4 μ L
DNase I (1U/ μ L)	1 μ L
RNase inhibitor	10 Unit分
0.1M DTT	1 μ L
RNA	2 μ L
DDW	/14 μ L

37°C	10分
65°C	5分
4°C	hold

DNase I 処理検体

p(dT) ₁₅ (0.1 μ g/ μ L)	1.0 μ L
20 μ M Random nonamers	2.5 μ L
20mM dNTPs	1.0 μ L
M-MLV (200U/ μ L)	1.0 μ L
DDW	/ 6 μ L

DNase I 処理検体 に加える	
30°C	10分
37°C	60分
98°C	5分
4°C	hold

cDNA

試薬リスト

TRIZOL LS Reagen: GIBCO BRL
 RNase inhibitor: TaKaRa
 p(dT)₁₅: Boehringer Mannheim

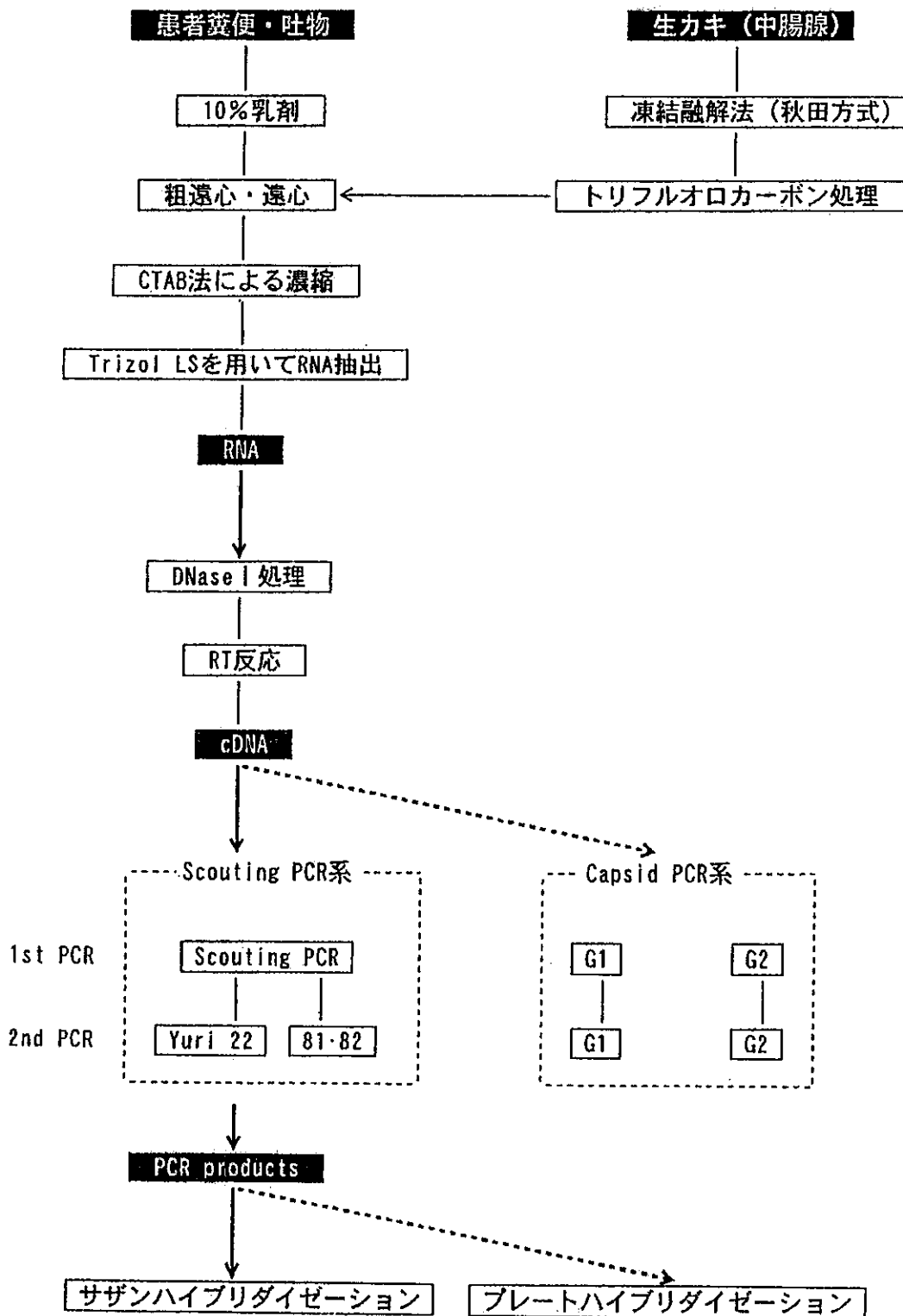
DNase I: ニッポンジーン
 M-MLV: GIBCO BRL
 Random nonamers: TaKaRa

SRSV検査法フローチャート

福井県衛生研究所

分担研究者 松本 和男

協力研究者 東方 美保



4. 1st PCR・2nd PCR

福井県衛生研究所
 分担研究者 松本 和男
 協力研究者 東方 美保

10× Ex Taq bf.	2.0 μL
20mM dNTPs	0.25 μL
10μM primer set	1.0 μL
Ex Taq (5U/μL)	0.1 μL : TaKaRa
cdNA or 1st PCR product	5.0 μL
DDW	/ 25 μL

Scouting系

1st PCR primer: Scouting Set

2nd PCR primer: Yuri22 or 81/82

<Scouting Set>		Yuri52F	<Yuri22>	Yuri22F																
		Yuri52R		Yuri22R																
		MR3	<table border="0"> <tr><td>94°C</td><td>5分</td></tr> <tr><td>94°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>45°C</td><td>2分</td></tr> <tr><td>60°C</td><td>4分</td></tr> <tr><td>94°C</td><td>1分</td></tr> </table>	94°C	5分	94°C	1分	45°C	2分	60°C	4分	94°C	1分	} 5 cycles						
94°C	5分																			
94°C	1分																			
45°C	2分																			
60°C	4分																			
94°C	1分																			
		MR4																		
		36CY																		
		35CY																		
		Chiba#1																		
		Chiba#2C	} 30 cycles																	
		Chiba#2N																		
<table border="0"> <tr><td>94°C</td><td>5分</td></tr> <tr><td>94°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>45°C</td><td>2分</td></tr> <tr><td>60°C</td><td>4分</td></tr> <tr><td>94°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>50°C</td><td>1分 20秒</td></tr> <tr><td>72°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>72°C</td><td>15分</td></tr> </table>	94°C	5分	94°C	1分	45°C	2分	60°C	4分	94°C	1分	50°C	1分 20秒	72°C	1分	72°C	15分	} 5 cycles	<81/82>		NV82
	94°C	5分																		
	94°C	1分																		
	45°C	2分																		
	60°C	4分																		
	94°C	1分																		
	50°C	1分 20秒																		
72°C	1分																			
72°C	15分																			
				SM82																
				NV81																
		<table border="0"> <tr><td>94°C</td><td>5分</td></tr> <tr><td>94°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>48°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>72°C</td><td>2分</td></tr> <tr><td>72°C</td><td>15分</td></tr> </table>	94°C	5分	94°C	1分	48°C	1分	72°C	2分	72°C	15分	} 35 cycles							
94°C	5分																			
94°C	1分																			
48°C	1分																			
72°C	2分																			
72°C	15分																			

Capsid PCR系 愛知衛研 榮 先生 より分与の primer使用

1st PCR primer:	G1F1 or G2F1	<table border="0"> <tr><td>94°C</td><td>5分</td></tr> <tr><td>94°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>55°C</td><td>1分</td></tr> <tr><td>72°C</td><td>2分</td></tr> <tr><td>72°C</td><td>15分</td></tr> </table>	94°C	5分	94°C	1分	55°C	1分	72°C	2分	72°C	15分	} 35 cycles
94°C	5分												
94°C	1分												
55°C	1分												
72°C	2分												
72°C	15分												
	G1R1 or G2R1												
2nd PCR primer:	G1F2 or G2F2												
	G1R1 or G2R1												

サザンハイブリダイゼーションについては、

Ando T, et al.: Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization に、

プレートハイブリダイゼーションについては、

国立公衆衛生院 西尾先生によるマニュアル(98年度版) にしたがう。

ウイルス性食中毒検査法フローチャート

分担研究者 山崎謙治
大阪府立公衆衛生研究

所

A. 糞便からの検出法

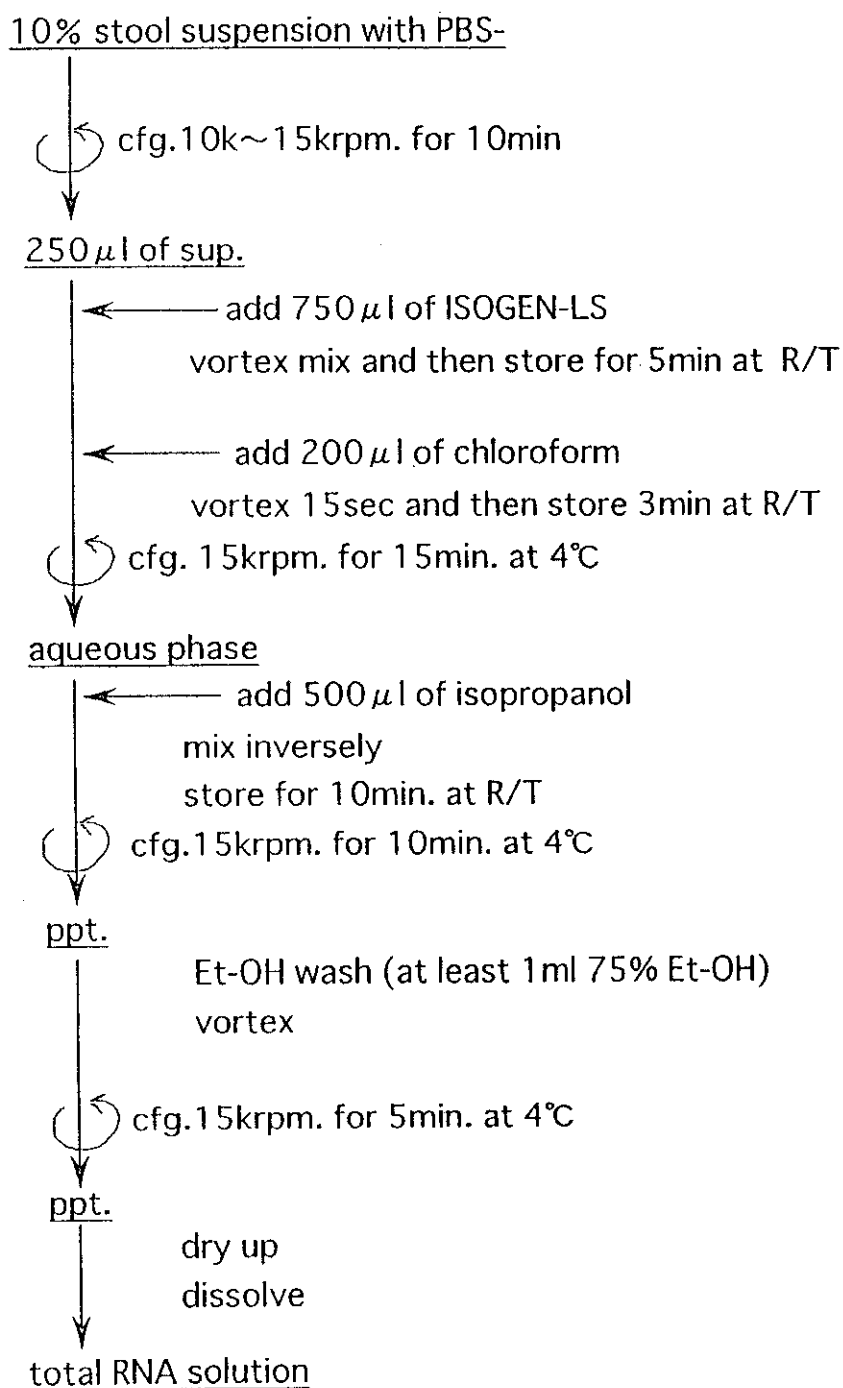
- 1、RNA抽出 ISOGEN-LS
- 2、RT-PCR
RT Primer; NV81 or Yuri22R
PCR Primer; NV81/NV82/SM82 or Yuri22R/
Yuri22F

- 3、電気泳動
- 4、Direct Sequenceによる塩基配列の解析

B. カキからの検出法

- 1、RNA抽出
- 2、RT-PCR
RT Primer; SR2
PCR Primer; SR2/SR1'
- 3、Nested-PCR
Primer; 82SM/81COM2
- 4、電気泳動およびTransfer
- 5、Hybridization DIG system
Probe; KY89/JN16

Extraction of RNA from stool sample



RNAの抽出にはグアニジンを含むフェノール系試薬、ISOGEN-LS(日本ジーン)を使用した。要する時間は1時間強である。
核酸の抽出法として、一般にフェノール抽出法が用いられているため、また従来のCTAB法に用いてきた試薬と変わらないので、操作法に抵抗を感じることも少ないと思われる。さらに秋田衛研の斎藤の報告にあるようにRNAの各抽出方法の比較においてRT-PCRを行ったところ、非常に高感度であったことから、CTAB法にかわる迅速な抽出方法であると考えられた。