

図 2. espA 遺伝子のマルチプルアラインメントと設計したプライマーの位置

AJ225018_0111_H2_espA	1	ATGGATACATCAACTGCAACATCAGTTGCTAGTGCGAACGCCGAGTACTTCGACATCGACA
U80908_espA_015_HNM	1	.....
AF054421_0103_H2_espA	1	.....
Y13859_espA	1	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	1	.....
AJ225015_0119_H2_espA	1	.....GC.....T.....
AJ225021_0128_H2_espA	1	.....G..
U65681_espA_4221	1	.....
AF064683_espA_1390	1	.....
AF022236_E2348/69_espA	1	.....A..G.....T.....A..TG
Z54352_espA_E2348/69	1	.....A..G.....T.....A..TG
AJ225019_055_H6_espA	1	.....A..G.....T.....A..TG
AJ225020_055_H7_espA	1	.....T..A..A..G.....A...T.....CTG
AF311901_C.rodentium_espA	1	.....ATG.....G.....G.....TG
AJ225016_0119_H6_espA	1	.....AT...GT..A..T....A..T.....ATG.....TG
AJ225018_0111_H2_espA	61	GTCTATGACTTAGGCAGTATGTCGAAAGACGAAGTAGTTCAGCTATTTAATAAAGTCGGT
U80908_espA_015_HNM	61	.....
AF054421_0103_H2_espA	61	.....
Y13859_espA	61	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	61	.....
AJ225015_0119_H2_espA	61	.....
AJ225021_0128_H2_espA	61	.....A.....
U65681_espA_4221	61	.....
AF064683_espA_1390	61	.....
AF022236_E2348/69_espA	61	.C.....T....G..C.....T..C..TA..G..T.....C....
Z54352_espA_E2348/69	61	.C.....T....G..C.....T..C..TA..G..T.....C....
AJ225019_055_H6_espA	61	.C.....T....G..C.....T..C..TA..G..T.....C....
AJ225020_055_H7_espA	61	AC.....T....G..C.....TC..G..T...G..A....C.....C....
AF311901_C.rodentium_espA	61	AC.....T....A..C.....AA...TA..G...T...GCA....T..C
AJ225016_0119_H6_espA	55	AC.....T....G..AC.....T....T...G...G....A....T..C
espAks1m		TATATGTATYAGGCACAAAGCG
AJ225018_0111_H2_espA	121	GTTTTTCAGGCTGCGCTTCTCATGTTTGCCTATATGTATCAGGCACAAAGCGATCTGTCC
U80908_espA_015_HNM	121	.....
AF054421_0103_H2_espA	121	.....
Y13859_espA	121	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	121	.....
AJ225015_0119_H2_espA	121	.....
AJ225021_0128_H2_espA	121	.....
U65681_espA_4221	121	.....
AF064683_espA_1390	121	.....
AF022236_E2348/69_espA	121	.....AA.....
Z54352_espA_E2348/69	121	.....AA.....
AJ225019_055_H6_espA	121	.....AA.....
AJ225020_055_H7_espA	121	.....T.....
AF311901_C.rodentium_espA	121	..A.....A.....AG.....T...C.....A.....
AJ225016_0119_H6_espA	115	..A.....A.....T.....C.....G..A..T

AJ225018_0111_H2_espA	181	ATTGCAAAGTTTGTGTATGAATGAGGCATCTAAGGAGTCAACCACAGCCCAAAAAATG
U80908_espA_015_HNM	181	.....
AF054421_0103_H2_espA	181	.....
Y13859_espA	181	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	181	.....
AJ225015_0119_H2_espA	181	.....
AJ225021_0128_H2_espA	181	.....
U65681_espA_4221	178	.....
AF064683_espA_1390	178	.....
AF022236_E2348/69_espA	181	..... T.....
Z54352_espA_E2348/69	181	..... T.....
AJ225019_055_H6_espA	181	..... T.....
AJ225020_055_H7_espA	181	..... C..... C..... T.....
AF311901_C.rodentium_espA	181	..... A..... C..... C..... T..... G.....
AJ225016_0119_H6_espA	175	..... T.CA.A...A...C.....T.....A...C...GAG...A.....

AJ225018_0111_H2_espA	241	GCTAATCTGTGGATGCTAAAATTGCTGATGTTTCAGAGTAGTTCTGACAAGAATAAGAAA
U80908_espA_015_HNM	241	.....
AF054421_0103_H2_espA	241	.....
Y13859_espA	241	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	241	.....
AJ225015_0119_H2_espA	241	.....
AJ225021_0128_H2_espA	241	.....
U65681_espA_4221	238	..... GCA...
AF064683_espA_1390	238	..... GCA...
AF022236_E2348/69_espA	241	..... A..... C..... C..... GC...
Z54352_espA_E2348/69	241	..... A..... C..... C..... GC...
AJ225019_055_H6_espA	241	..... A..... C...C..... C..... GC...
AJ225020_055_H7_espA	241	.. G..... G..... G..... C...C..... GC... G
AF311901_C.rodentium_espA	241	.. C..... A..... C..... C..... GC... G
AJ225016_0119_H6_espA	235	.. C...T.G.....C.G.C...A.....TC.....G.A...G...A.G

AJ225018_0111_H2_espA	301	GCCAACTTCTCAAGAAGTGATTGACTATATAAATGATCCTCGCAATGACATTACAGTA
U80908_espA_015_HNM	301	.....
AF054421_0103_H2_espA	301	.....
Y13859_espA	301	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	301	.....
AJ225015_0119_H2_espA	301	..... T.....
AJ225021_0128_H2_espA	301	..... G.....
U65681_espA_4221	298	..... A...A.....
AF064683_espA_1390	298	..... A...A.....
AF022236_E2348/69_espA	301	.. TC..... G.T..... TCA..... A...
Z54352_espA_E2348/69	301	.. TC..... G.T..... TCA..... A...
AJ225019_055_H6_espA	301	.. TC..... G.T..... TCA..... A...
AJ225020_055_H7_espA	301	.. TC..... A..... C..... G..... A...
AF311901_C.rodentium_espA	301	..... T..... G...T..... AGT.....
AJ225016_0119_H6_espA	295	.. T..... G.C...A...AGT...TC.A...T.A...A...GG...T.C...

AJ225018_0111_H2_espA	361	AGTGGTATTAGCGATCTAAATGCTGAATTAGGCGCTGGTATTGCAAACGGTGAAGGCC
U80908_espA_015_HNM	361	.....
AF054421_0103_H2_espA	361	.....
Y13859_espA	361	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	361	.....
AJ225015_0119_H2_espA	361	.....
AJ225021_0128_H2_espA	361	.....
U65681_espA_4221	358	.....
AF064683_espA_1390	358	.....
AF022236_E2348/69_espA	361	..... GA.A...A.....C.....A..A
Z54352_espA_E2348/69	361	..... GA.A...A.....C.....A..A
AJ225019_055_H6_espA	361	..... GA.A...A.....C.....A..A
AJ225020_055_H7_espA	361	..... C.....C.....A..A
AF311901_C.rodentium_espA	361	..... T.....TGGC...G...A...C.....C.....T
AJ225016_0119_H6_espA	355	...A...GA...TT...CA.C.CCAAA...G...G...T.....CC.....C...A...T

AJ225018_0111_H2_espA	421	GCTATTTTCGGCCAAATCGAATATCTTGACCACGGTAGTGAATAATAGCCAGCTTGAAATA
U80908_espA_015_HNM	421	.....A.....
AF054421_0103_H2_espA	421	.....A.....
Y13859_espA	421	.....A.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	421	.....A.....
AJ225015_0119_H2_espA	421	.....A.....
AJ225021_0128_H2_espA	421	.....A.....
U65681_espA_4221	418	.....A.....
AF064683_espA_1390	418	.....A.....
AF022236_E2348/69_espA	421	.....A..T...G.....AT.....A..ACG..C.....
Z54352_espA_E2348/69	421	.....A..T...G.....AT.....A..ACG..C.....
AJ225019_055_H6_espA	421	.....A..T...G.....AT.....A..ACG..C.....
AJ225020_055_H7_espA	421	.....A..TC..G.....AT.....A..ACG.....
AF311901_C.rodentium_espA	421	T.....T...G.....AT.....A..ACG..G.....GT.....T...
AJ225016_0119_H6_espA	415	.....A..A...G..A...A..C...A..ACG.....A.....ACGT..G

espAcomkas		ACAGCAAATGTCAAATACGTT	(AAATGCTCGTTCAGATATGC)
AJ225018_0111_H2_espA	481	<u>CAGCAAATGTCAAATACGTTAAACCTATTAACGAGTGCACGTTCTGATATTCAGTCACTG</u>	
U80908_espA_015_HNM	481	.....	
AF054421_0103_H2_espA	481	.....	
Y13859_espA	481	.....	
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	481	.....	
AJ225015_0119_H2_espA	481	.....	
AJ225021_0128_H2_espA	481	.....	
U65681_espA_4221	478	.....	
AF064683_espA_1390	478	.....	
AF022236_E2348/69_espA	481	.....	G.....
Z54352_espA_E2348/69	481	.....	G.....
AJ225019_055_H6_espA	481	.....	G.....
AJ225020_055_H7_espA	481	.....	G.....
AF311901_C.rodentium_espA	481	.....G...A.....T.....G.....T.....T.....T..A	
AJ225016_0119_H6_espA	475	.....T.....C..G..TT.....A..A...T.....A.....G.....GT..	
espA119as			AAATGCTCGTTCAGATATGC

AJ225018_0111_H2_espA	541	CAATACAGAACTATTTTCAGCAATATCCCTTGGTAAATAA
U80908_espA_015_HNM	541	.....
AF054421_0103_H2_espA	541	.....
Y13859_espA	541	.....
AF200363_espA_015HNM_RDEC-1_	541	.....
AJ225015_0119_H2_espA	541	.....
AJ225021_0128_H2_espA	541	.....
U65681_espA_4221	538	.....
AF064683_espA_1390	538	.....
AF022236_E2348/69_espA	541	.....T.....G.....
Z54352_espA_E2348/69	541	.....T.....G.....
AJ225019_055_H6_espA	541	.....T.....G.....
AJ225020_055_H7_espA	541	.....T.....A...T.....
AF311901_C.rodentium_espA	541	.....G.....C..A...C.....
AJ225016_0119_H6_espA	535	.....TC.....CAG.....AGTT.....

図3. PCR産物の電気泳動パターン

13% PAGE

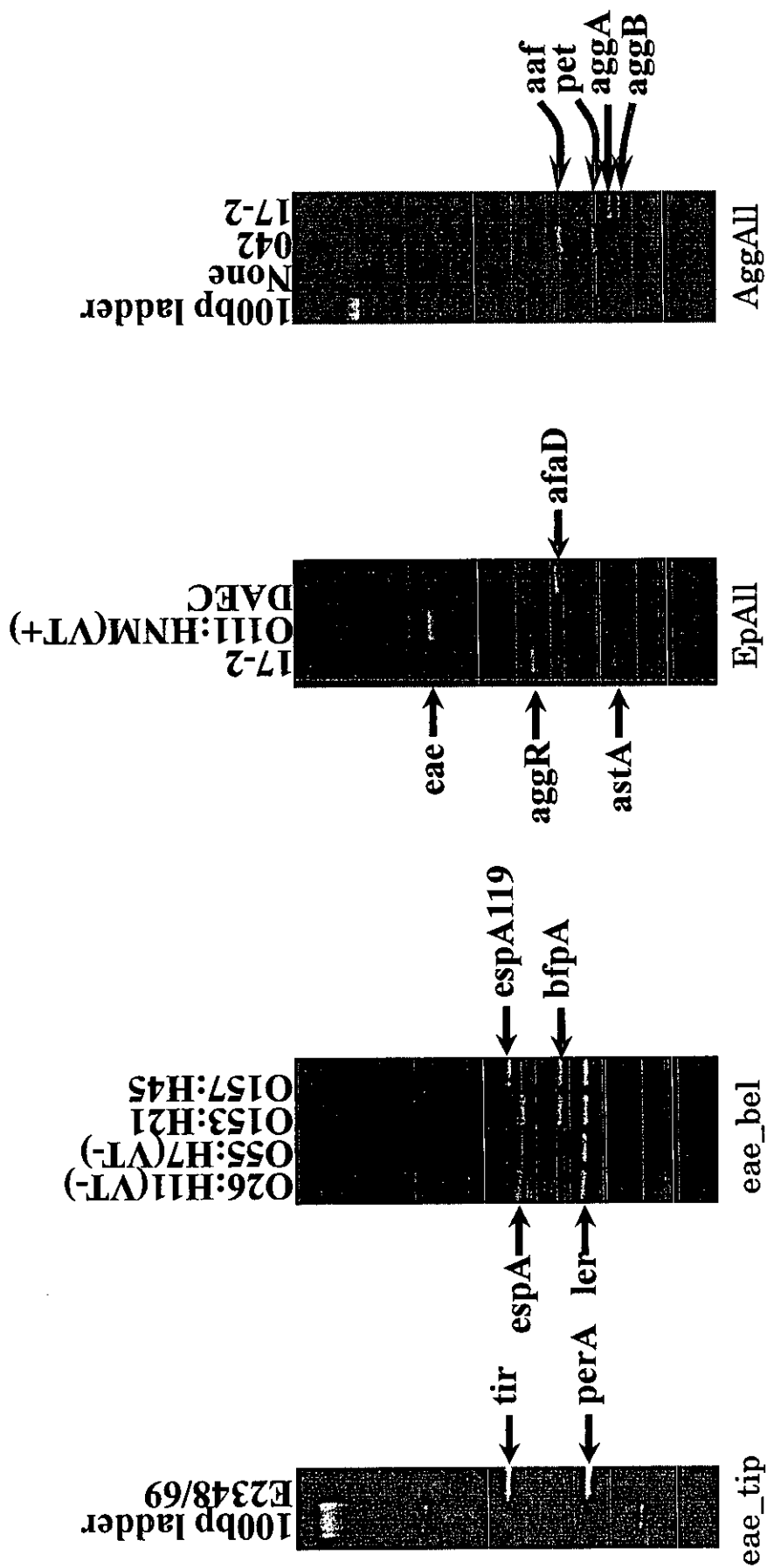


図4. 漬物の汚染状況概要

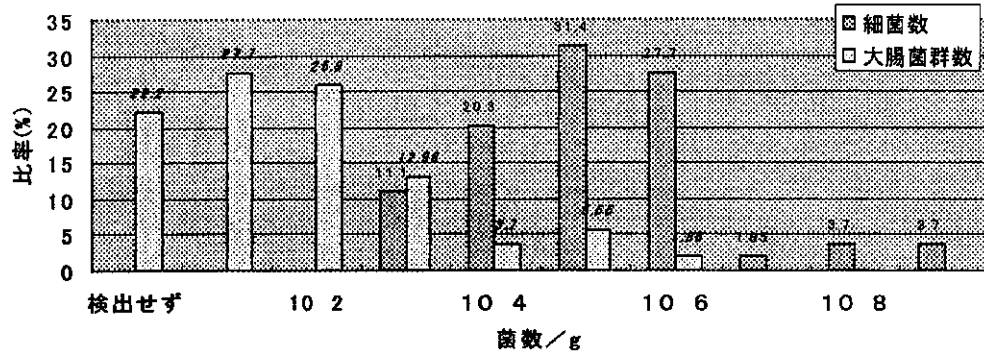


図6. 漬物種類別 E.coli 検出状況

□ E.coli 未検出  
■ E.coli 検出

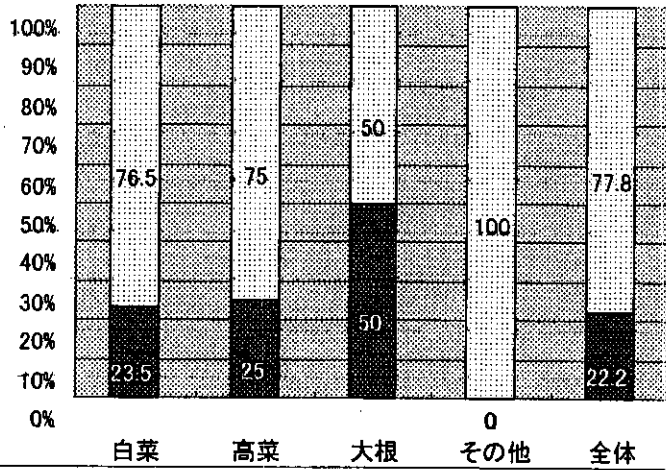
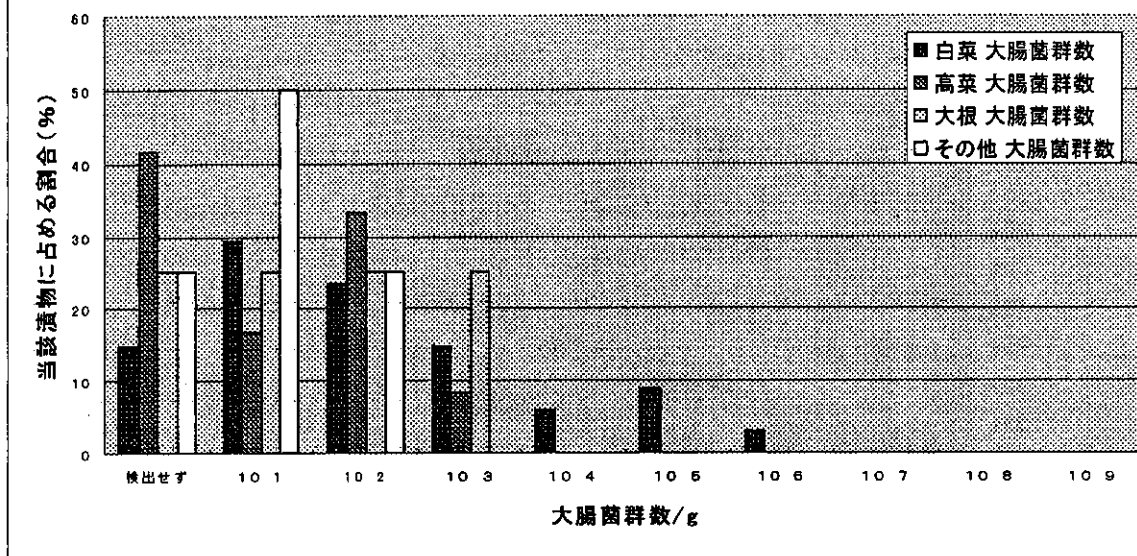


図5. 漬物の種類別汚染状況(大腸菌群)



**Ⅲ**

**付録**

**ノーワークウイルス検査法マニュアル**



## ノーウオークウイルス (NLV) の RT-PCR 法

### 1. 必要な器具と試薬

#### 1) 器具

サーマルサイクラー、超遠心器、冷却遠心器 (5,000rpm)、マイクロ冷却遠心器 (15,000rpm)、ホモジナイザーあるいはストマッカー、Vortex、恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、マイクロプレートリーダー、UV 防御メガネ、ヘラ、ハサミ、メス、マイクロピペット (2、20、200、1000  $\mu$ l)、チューブ (0.5ml、0.2ml、1.5ml)、1ml 注射器、18G 注射針。

#### 2) 試薬

SV Total RNA isolation system (Promegam, Cat.#Z3100)、エタノール、グリコーゲン (Boehringer Mannheim 901393)、NLV プライマー、ショ糖、ポリエチレングリコール 6,000、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸二ナトリウム、核酸フリー精製水、EDTA・2NA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)、電気泳動用アガロース ME (岩井科学、250g 入り Cat. No. 50013R)、TAE、エチジウムブロマイド、酢酸ナトリウム、イソプロピルアルコール、

M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Cat. No. 28025-013)

Random primer hexamer (Amersham Pharmacia, Cat. 27-2166-01)

Oligo dt primer (Oligo dt(12-18) primer, Gibco BRL, Cat. No. 18418-012)

Super Script II (Gibco BRL, Cat. No. 18064-014)

100mM DTT (Super Script II に添付)

QIA Viral RNA Mini Kit (Qiagen Cat.No.52904)

DNase I (Takara, Cat. No. 2 215A)

Ribonuclease Inhibitor (Takara, Cat. 2310A)

Takara EX Taq (Takara, Cat. No. No.RR001A)

50 倍濃度 TAE buffer [Tris 242g、氷酢酸 57.1ml、0.5M EDTA・2NA (pH8.0) 100 ミリリットルを蒸留水で 1,000 ml とする]。

5 倍濃度 TBE [Tris 54g、ほう酸 27.5g、0.5M EDTA・2NA (pH8.0) 20ml を蒸留水で 1,000ml とする]。

## 2. カキの前処理

本項では食品として最も重要視されているカキの方法について記す。他の食品においても基本的にはこの方法に準じて行える。

- 1) 殻付きカキはヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- 2) カキの外套膜を取り、次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をメス、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。中腸腺を摘出する際にはできる限り周りの白い組織(脂肪)を取り除くこと。
- 3) ホモジナイザーまたはサンプリングバッグに中腸腺をいれ、次いで5～10倍量PBS(-)を加え良く粉砕する。
- 4) 粉砕した試料を遠心管に移す。

↓10,000 rpm. 20分間冷却遠心し、上清を新しい試験管に取る。

- 5) 超遠心用遠心管に30%シヨ糖溶液を遠心管の10%程度入れ、それに4)の遠心上清を静かに重層させる(シヨ糖層を壊さないように初めは特に注意して少量ずつ入れる)

↓35,000 rpm. 180分間あるいは40,000 rpm. 120分間冷却遠心する。

- 6) アスピレーター、注射器等で液層を吸引し、沈渣のみとする。
- 7) 遠心管の管壁をPBS(-)で軽く洗い、管壁の周りの水分を滅菌した濾紙で吸い取る。
- 8) 沈渣に200 $\mu$ lのDDW(滅菌後、0.2 $\mu$ mで濾過したもの)を加え、浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。

(浮遊液に不純物が多いときには10,000 rpm. 20分間遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる)

**注) 超遠心器を使えない時には以下の操作を行う。**

前処理4)の遠心上清にポリエチレングリコール 6,000を8%量加え、NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌後、4℃の冷蔵庫に一晩置く、または室温で2時間攪拌する。

↓5,000～12,000 rpm. 20分間、冷却遠心する。

上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとし、管壁の周りの水分を濾紙(滅菌したものをを用いる)で吸い取る。

沈渣に200 $\mu$ lのDDWに浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。浮遊液に不純物が多いときには10,000 rpm. 20分間の遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。

### 3. RNA の抽出

RNA の抽出には多くの方法があり、またキットも多数市販されている。それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。

#### A. SV Total RNA isolation system による方法

ウイルス RNA の抽出キットは、ここでは SV Total RNA isolation system について紹介する。このキットはふん便材料のフロン処理が不要であり、DNase の処理も含まれ、食品中に含まれている様々な DNA を消化するので非特異バンドの出現を抑える。また、他のキットを用いる時に DNase 処理が含まれていないものでは、DNase 処理を行った方が良い(DNase 処理の項を参照)。なお、DNase を取り扱うマイクロピペットは専用のものを用いる。

また、PCR を行う際には手袋をし、チューブの蓋を開ける時にはその前に軽く遠心した後、オープナーを用いること、また、RT-PCR の調製をする部屋と PCR 産物の電気泳動の部屋を分ける。それができない時にはそれぞれのクリーンベンチで行う。クリーンベンチで行う際にファンは止めて行う。コンタミ防止と RNase の混入の防止に細心の注意を払う。

#### 1) 使用前に行う試薬の調製

添付のβ-メカルプトエタノール(BME)を SV RNA Lysis buffer に加える。

95% エタノールを SV RNA Wash Solution と SV DNase Stop Solution に加える。

凍結乾燥の DNase I の入っている瓶に Nuclease-Free water を入れて、溶解する(Vortex はしない)。

#### 2) 操作法

食品あるいはふん便の遠心上清を用いる(フロン処理は不要)。また、ふん便は乳剤でないものでも直接行える。

(1) 滅菌チューブ(1.5ml)に SV RNA Lysis Buffer( BME を加えてあるもの)350μl 入れる。それに検査材料を 100μl とポリオ 2 型ウイルス(Sabin 株、10,000 個程度の粒子数)を 2μl 入れた後、上下混合を 3~4 回行い、軽く遠心する。ふん便を直接用いるときには重量を測定し、175μl/30mg に比例して SV RNA Lysis Buffer を

加える。

- (2) 次に SV RNA Dilution Buffer を  $350\ \mu\text{l}$  入れ、攪拌する。ふん便材料の時には完全に溶解させるため、良く混合する。溶解しない時には Vortex にかける。
- (3) チューブを  $70^{\circ}\text{C}$  の water bath に 3 分間、直ちに on ice する。

↓  $12,000\sim 14,000\text{Xg}$  で 10 分間遠心する。

- (4) 新しい  $1.5\text{ml}$  のチューブに 95% エタノールを  $300\ \mu\text{l}$  (ふん便  $30\text{mg}$  を用いたときには  $200\ \mu\text{l}$  を入れ、それに遠心上清を加え、攪拌(3~4 回上下混合)、軽く遠心。
- (5) 新しい  $1.5\text{ml}$  チューブに Spin Basket Assembly (Basket) をセットし、その Basket に(4)の溶液を入れる。

↓  $12,000\sim 14,000\text{Xg}$  で 1 分間遠心し、下のチューブ液を捨てる。

- (6) Basket に SV RNA Wash Solution を  $600\ \mu\text{l}$  入れる。
- (7) Basket に DNase incubation mix を  $50\ \mu\text{l}$  入れ、室温に 15 分間置く。(この時間は厳守する)
- (8) Basket に SV DNase Stop solution を  $200\ \mu\text{l}$  入れる。

↓  $12,000\sim 14,000\text{Xg}$  で 1 分間遠心、チューブの液を捨てる。

- (9) Basket に SV RNA Wash Solution を  $600\ \mu\text{l}$  加える。
- (10) Basket に SV RNA Wash Solution を  $200\ \mu\text{l}$  加える。

↓  $14,000\text{Xg}$  で 2 分間遠心する。

- (11) Basket を新しいチューブ(Elution チューブ)にセットし、蓋を 2 分間開け、エタノールを飛ばす。
- (12) 次いで Basket に食品の時には核酸フリー精製水を  $100\ \mu\text{l}$ 、ふん便材料は  $40\ \mu\text{l}$  を Basket に入れ、2 分間置く。

↓  $12,000\text{Xg}$  で 2 分間遠心する。

チューブに溜まった液が抽出 RNA で、ふん便材料はこれを RT-PCR に用いる。

**注) 食品の時には以下の操作を続けて行う。**

- (13) Elution チューブに 95%エタノール  $300\ \mu\text{l}$ 、グリコーゲン  $2\ \mu\text{l}$  および 3M 酢酸ナトリウム  $40\ \mu\text{l}$  を加え上下混合し、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下に 30 分置く (over night の

ときは-20℃に置く)。

↓15,000rpm. で30分間遠心し、上清を完全に除く。

(14) チューブに75% エタノールを400 $\mu$ l 加え、上下混合する。

↓15,000rpm. で20分間遠心する。

(15) 上清を完全に除いた後、乾燥させる(完全に乾燥させない)。

(16) 核酸フリー精製水30 $\mu$ l 加えたのち、70℃に5分間置き、RNAを溶解させる。

これをDNase処理済み抽出RNAとし、RT-PCRに用いる。-20℃以下で保存する。

## B. QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出

このキットはRNA抽出にCarrier RNAが含まれており、RNA抽出効率はSV Total RNA isolation systemより10倍程度良い。しかし、10%ふん便乳剤を作製し、遠心する必要がある。またこのキットにはDNase処理が含まれていないので、各自が行わなければならない。

### 1) 使用前に行う試薬の調整

サンプルを室温(15~20℃)に戻しておく、Buffer AVEを室温に置く。

Buffer AW1は96~100%エタノールを25ml加える)、Buffer AW2(Kit No. 51104では96~100%エタノール30mlを加える)およびCarrier RNA(凍結乾燥品)のチューブにBuffer AVL 1ml添加し、Carrier RNAを溶解させ、Buffer AVLに全量を添加する。添加したBuffer AVL/Carrier RNAは室温で2週間、2-8℃で6ヶ月間安定。Buffer AVL/Carrier RNA中に沈殿物がある場合には、加熱(80℃)により溶解し(但し、5分間以内で、6回以上の加熱は行わない)、使用前に室温に戻す。

### 2) 操作法

以下の操作は室温で行う。

(1) 1.5ml チューブにBuffer AVL/Carrier RNA 560 $\mu$ lを入れる。

(2) 10%ふん便乳剤遠心上清(10,000rpm. 10分間)を138 $\mu$ l(増量にすることも可能である。詳細はキットの添付マニュアルを参照)とポリオウイルス2型(Sabin株)を2 $\mu$ l(10,000個程度の粒子数)入れ、サンプルとBufferを充分混合するため15秒間Vortexにかけ、室温(15-25℃)に10分間置く。チューブをスピンドウンする。

- (3) エタノール(96~100%)560  $\mu$ l をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。液が混濁した時には 9,000Xg(10,000rpm)5 分間遠心する。
- (4) (3)の液 630  $\mu$ l を QIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブ)に注入し、蓋を閉め、6,000Xg(8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの(3)の液 630  $\mu$ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う(この操作は 2 回で終わる)。
- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500  $\mu$ l を入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000Xg(8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500  $\mu$ l を加え、20,000Xg(14,000 rpm)で 3 分間遠心する。Buffer AW2 とろ液等が接触した時には(8)を行う(このような事は通常起きない)。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する(必ずしも必要でない)。
- (9) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60  $\mu$ l を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000Xg(8,100 rpm)で 1 分間遠心する。
- (10) このろ液が抽出 RNA であり、RNA は-20°C以下で 1 年間は安定。

#### 4. DNase 処理

食品、人のふん便中には様々な DNA が含まれており、しばしば PCR で非特異バンドが出現するので、それらを抑制するため DNase 処理を行う。またこの時点までに DNA の混入が起きた時でも、それらを消化することができる。従って、キットに DNase 処理が含まれていない時にはこの操作を行うことが望ましい。注意として DNase I を使用するマイクロピペットは専用のものを用い、可能であればオートクレイブができるものが良い。検査終了後使用した DNase の含まれている液、チューブ等は全てオートクレイブにかける。

- 1) 表 1 に示したように DNase 処理混合液の調製を行う。

表 1. DNase 処理混合液

反応液量	15 $\mu$ l	30 $\mu$ l
Sample RNA	12.0 $\mu$ l	24 $\mu$ l
5XAMV Buffer 注	1.9 $\mu$ l	3.8 $\mu$ l
DDW	0.1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
DNase I (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l

注)使用する Reverse Transcriptase の buffer を用いる。

- 2) 混合液調製後、37°Cに 30 分間置く。
- 3) 次いで 75°Cに 5 分間置く。
- 4) 直ちに on ice(または 4°C)する。これが DNase 処理済み抽出 RNA である。

## 5. RT 反応

### A. M-MLV RT(Gibco BRL)を用いる時

#### 1) 操作法

表 2. A 混合液

1. Primer		
Oligo(dt) (12-18) (0.5 $\mu$ g)		1 $\mu$ l
NLV(-)プライマー(25 $\mu$ M)		1 $\mu$ l
SB2-R1(25 $\mu$ M)		1 $\mu$ l
2. DNase 処理抽出 RNA		5 $\mu$ l

表 3. B 混合液

1. 5 X RT Buffer	4 $\mu$ l
2. 0.1M DTT	1 $\mu$ l
3. 2.5mM dNTP	4 $\mu$ l
4. M-MLV RT(200unit/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
5. RNase inhibitor(38unit/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

注 #1) NLV の RT 反応を行う時に(-)プライマー(アンチセンスプライマー)の代わりに ORF1 領域を増幅する際にはランダムプライマーを、ORF2、ORF3 では Oligo(dt) (12-18)プライマーを用いて cDNA を作製するとプライマー毎の cDNA を作製しなくても良い。

ポリオウイルスの PCR はウイルス抽出のコントロールである。

- (1) A と B 混合液作製し 70 °Cに 10 分間置いた後、on ice する。
- (2) 次いで B 混合液を加える。

- (3) 37 °Cに1時間、次いで98 °Cに5分間、直ちに on ice する。  
 (4) cDNA の作製終了

B. Super Script RT II (GibcoBRL) を用いる時

1) 操作法

- (1) 表4のRT反応調製液を作製する。

表4. RT反応液調製液( Super Script RT IIを用いる時)

反応液量	15 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	50 $\mu$ l
DNase 処理 RNA	7.5 $\mu$ l	10.0 $\mu$ l	15.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
5X SS II Buffer	2.05 $\mu$ l	2.74 $\mu$ l	4.1 $\mu$ l	6.85 $\mu$ l
10mM dNTPs	0.75 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Random Primer(1.0 $\mu$ g)	0.375 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l
RNAasin(33unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	0.67 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.67 $\mu$ l
100m M DTT#	0.75 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Super Script RT II (200u/ $\mu$ l)	0.75 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
DDW	2.325 $\mu$ l	3.09 $\mu$ l	4.65 $\mu$ l	7.73 $\mu$ l

注)Random Primer の代わりに NLV(-)プライマーを用いても良い。

- (2) 反応は 42°Cで 30分から 2時間行う。  
 (3) 次いで 99°Cで 5分間加熱し、on ice(または 4°C)する。



## 6. 1st PCR

1) 1st PCRはNLVとポリオウイルスの2つのA,B混合液を作製する。

表5. A ノーウォークウイルス (NLV)

1. DDW	33.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 $\mu$ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. NLV primer (25 $\mu$ M) <sup>注)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. NLV primer (25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. cDNA (Template)	5.0 $\mu$ l
7. EX Taq (5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

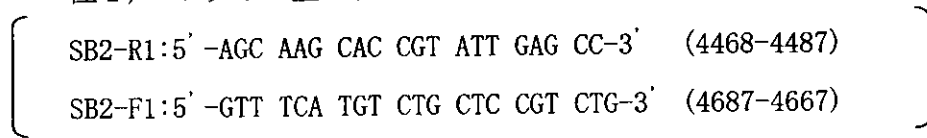
表6. B ポリオウイルス

1. DDW	33.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffe	5.0 $\mu$ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. SB2-R1primer (25 $\mu$ M) <sup>注1)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. SB2-F1 Primer (25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. cDNA (Template)	5.0 $\mu$ l
7. EX Taq (5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

注) primerは最適と思われるものを選択して用いる。なお、2種類以上のプライマーを用いる時にはプライマー毎にA液を作成する。現在のところ患者のふん便ではNLVを検出するのにCOG1F/COG1R、COG2F/COG2Rの両方を用いるのがよいようである。COG1F/COG1Rはgenotype 1 (G1)を、COG2F/COG2Rはgenotype 2 (G2)を検出する。遺伝子型を調べるにはキャプシド領域のG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRを用いると良い。またポリメラーゼ領域には36/35'、MR3/MR4、NV82、SM82/NV81、Yuri22F/ Yuri22R、P1, 2, 3、Y1/Y2、SR33, 46, 48, 50, 52等のプライマーを用いる。

食品の1st PCRでは、G1はCOG1FとG1-SKR、G2はCOG2FとG2-SKRで行い、Nested PCRではG1はCOG1F/COG1RおよびG1-SKF/G1-SKR、G2はCOG2F/COG2RおよびG2-SKF/G2-SKRで行う。確認試験はCOGプライマーで増幅したものはRING1(a, b)およびRING2プローブ(図2、表8参照)を用いたハイブリダイゼーションで、G1-SKF/G1-SKRおよびG2-SKF/G2-SKRはシーケンスで行うのが現状ではよいと考えられる。さらに検査精度を高めるためにポリメラーゼ領域に(ポリメラーゼ領域のプライマーは図1および表8を参照)についても行うことが望ましい。また、各自が最も良いと判断したプライマーを用いて行って良い。

注1) ポリオ2型プライマー<sup>文献1)</sup>



AとBの混合液を作製し、以下の条件で増幅を行う。

## 2) PCR 反応

増幅は 94°C 3分を1 サイクル、94°C 1分、50°C 1分、72°C 2分を40 サイクル、72°C 15分を1 サイクルで行う。増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適な条件で行うと良い。PCR の陽性コントロールは大腸菌にNLVを組み込んだものを用いるとよい。

## 3) 電気泳動

PCR 産物 8 $\mu$ l と5倍 Loading buffer 2 $\mu$ l を混合し、1.5%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動 buffer はTAEを使用する。

## 4) アガロースゲル染色

泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色液(TAE 溶液 100ml にエチジウムブロマイド 10mg/ml のものを 10 $\mu$ l 加えた溶液)に 20 分間入れておく。この時に緩やかに揺ると良い。

## 5) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。食品では 1st PCR でバンドが見られなかった時には(多くの例では見られない)、次に Nested PCR を行う。

## 7. Nested PCR法

### 1) Nested PCRの調製

表7. Nested PCRの混合液

1. DDW	36.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 $\mu$ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. NLV primer (25 $\mu$ M) <sup>注)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. NLV Primer (25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. 1st PCR産物	2.0 $\mu$ l
7. EX Taq	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

注) NLVプライマーは1st PCRに用いたものの内側に設定されたプライマーあるいはセミNested PCRで行う。

1) 表7の混合液を作製する。

2) PCR反応、電気泳動

増幅は1st PCRと同様に行うが、サイクル数は35とする。

Nested PCR産物の電気泳動、UV照射で写真撮影、バンドの確認は1st PCRと同様に行う。

## 8. PCR結果の判定

1) PCR法ではRNA抽出のコントロールとして入れた、ポリオSabin株2型(粒子数10,000個)のPCRで目的とするバンドが認められること(RNAの抽出に問題はない)。

2) 検査材料の代わりにDDWを入れた陰性コントロールでバンドが見られない(遺伝子の混入が無い)。

3) 陽性コントロールで目的とするバンドが見られる(PCRがうまく行われた)。

以上の条件が満たされた時にPCRの判定を行う。

なお上記条件が満たされないときには再試験を行う。

PCR陽性と判定されたときに確認試験としてハイブリダイゼーションあるいは遺伝子

配列を調べる。ハイブリダイゼーションで陽性、あるいは遺伝子配列で既知のノーウ  
ークウイルス株と同じ系統に属する配列が認められた時に陽性とする。

図1. NLV ORF1部分のプライマーの位置

図2. NLV ORF2部分のプライマーの位置

表8. NLVのプライマーとプローブの塩基配列

## II. ハイブリダイゼーション

### A. マイクロプレートハイブリダイゼーション法

ここではPCR産物の確認試験としてのマイクロトレイハイブリダイゼーション法につ  
いて記す。この方法はマイクロプレート上でハイブリダイゼーションを行うもので、洗  
いが簡単であり、反応は通常の酵素抗体法と同一である<sup>文献11)</sup>。42°Cでハイブリダイ  
ゼーションを行うと、80%以上の相同性のときに陽性となる。ハイブリダイゼーシ  
ョンの温度を上げるとさらにその感度は高まる<sup>文献12)</sup>。

#### 1. 必要な器具と試薬

##### 1) 器具

恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、マイクロプレート  
リーダー、UV防御メガネ、サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、ウ  
ォーターバス、ヘラ、ハサミ、メス、マイクロピペット(2、20、200、1000 $\mu$ l)、  
マイクロプレート(NUNC-IMMUNO PLATE、Cat. No. 442404)

##### 2) 試薬

MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN Cat.No. 28604)、フナゲルチープ、ホルム  
アミド、Tween20、サケ精子DNA、マイクロプレートシール、ペーパータオル、ストレブ  
トアビジン標識ペルオキシダーゼ(BIOSOURCE, Cat. #SNN1004)、リン酸水素二ナトリウ  
ム、クエン酸、30%過酸化水素、硫酸、T3, 3, 5, 5'-Tetramethylbenzidine(TMB)、ジメ  
チルスルホキシド(SDS)、ウシ血清アルブミン(SIGMA, Cat No. A-2153)、3M酢酸ナトリ