

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(平成 22～24 年度)
検査法マニュアル

カキ中腸腺からのウイルス抽出方法

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス, サポウイルス等カキ中腸腺から検出されるウイルス

2) 対象検体

カキ

3) 本プロトコールの範囲

蒸留水 2.5ml で中腸腺乳剤を作成し, その後細胞破碎装置で 3,500rpm・10 秒破碎する。破碎後 10,000rpm・10 分遠心した上清をウイルス抽出液とする。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

滅菌済みハサミ, ラップ, トレイ, ディスポーザブル手袋

必要に応じカキ剥き用ヘラ等

マイクロピペット及びチップ (1000 μ l) 又はピペッター及びディスポーザブルピペット (5ml)

滅菌済みチューブ (ザルスタット 5ml V底自立型チューブ)

ビーズ式細胞破碎装置 (トミー精工 Micro Smash TM MS100)

微量高速遠心機 (トミー精工 TX201)

破碎用ビーズ (トミー精工 SUB-30 ステンレス製 3.2mm)

2) 試薬

Distilled water, DW (脱イオン蒸留水, RNase & DNase free, 和光純薬工業, 318-90105)

3. 操作法

- 1) 中腸腺 1 個を 1 検体とし検査を行なう。
- 2) 殻付きの場合はヘラ等で貝柱を切り、殻を開く。
- 3) トレイにラップを敷き、むき身をトレイにのせる。
- 4) ディスポーザブル手袋を着用し、滅菌済みのはさみを用いて中腸腺を切り取る。その際、貝の外套膜を取り、次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。

なお、滅菌済みはさみは 1 個体毎に取り換える。

- 5) 取り出した中腸腺を予め破砕用ビーズ 2 粒入れた 5ml チューブに入れ、DW2.5ml を加え、細胞破砕装置に 3500rpm で 10 秒間かける。
- 6) 破砕した試料を 10,000rpm, 10 分間、冷却遠心分離する。
- 7) 遠心分離した上清をウイルス RNA の抽出に用いる。
- 8) 得られたウイルス抽出液からの RNA の抽出以降の操作は、「ノロウイルスの検出法 (平成 15 年食安監発第 1105001 号)」に準じて行う。

4. 備考

細胞破砕装置で中腸腺を破砕する場合には、5ml チューブの蓋が適切に閉められていない場合、破砕時にチューブが首のところで破損してしまうことがあるので、注意を要する。装置に入れる前に蓋が適切に閉まっているか確認した上で、容器を上下に振って漏れないかを確認した後に破砕するとよい。さらに中腸腺の重さの個体差が大きい場合には、おおよそのバランスを取って破砕装置にかけるとよい。また、中腸腺を凍結後解凍して使用する場合は、適切に破砕されるよう十分に解凍してから破砕装置にかけるとよい。

参考文献

Yo UEKI, Daisuke S, Toru W, Kazuo A, Tatsuo O, : Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. Water Reserch 39 4721-4280 (2005)

連絡先

宮城県保健環境センター 植木 洋，川端淑子

作成日：平成 25 年 2 月 20 日

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(平成 22～24 年度)

検査法マニュアル

牛血清アルブミンとポリエチレングリコールを使用した 水性二相分配法によるノロウイルスの濃縮法

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス

2) 対象検体

拭き取り液等の比較的清浄な検体

3) 本プロトコールの範囲

拭き取り検体などの比較的清浄な検体から、ノロウイルスを濃縮して、リアルタイム PCR 法で定量する。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

高速冷却遠心機(大型又は小型、15ml 又は 50ml の遠沈管がかかるもの)、恒温槽(50℃水浴)、マイクロピペッター、遠心管(15ml、50ml)、スポイト(栄研3号)、1.5ml マイクロチューブ

2) 試薬

ポリエチレングリコール 6000、Albumin, from bovine serum(牛血清アルブミン, lyophilized powder, globulin free, SIGMA 社、A3059-100G)、塩化ナトリウム、QIA Viral RNA mini kit (QIAGEN)

3. 操作法

- 1) 拭き取り検体を 9000rpm、20min 遠心し、ゴミ、綿、ガーゼの繊維等を除去する。
- 2) 別の遠心管に、上清を 8ml 採取する。
- 3) 上清に結晶牛血清アルブミンを 0.2g (2.5%濃度) 添加後、45°Cの 恒温槽で加温溶解する。
- 4) スピンダウンした後、ポリエチレングリコール 6000 を 0.96g (12%濃度)、NaCl を 0.46g (1M 濃度) を入れて加温溶解後、冷蔵で 1 時間静置する (オーバーナイト可能)。
検体の量によって、以下の濃度に調整する。

検体量	牛血清アルブミン	ポリエチレングリコール	NaCl
8ml	0.2g (2.5%)	0.96g (12%)	0.46g (1M)
35ml	0.61g (1.75%)	4.2 g (12%)	2.04g (1M)

- 5) 10000rpm(15800g) 30min 遠心する。
- 6) 遠心後、上層のポリエチレングリコール層をスポイトを用いてできるだけ除去し、
下層の牛血清アルブミン層を 1.5ml マイクロチューブにとる。
- 7) マイクロチューブを、14000rpm(17,000g)、5min 遠心する。
- 8) 上層のポリエチレングリコール層を、マイクロピペッターで完全に除去する。
- 9) 牛血清アルブミン層は、50~70 μ l となるので、PBS で希釈して約 140 μ l とする。
- 10) QIA Viral RNA mini kit で RNA を抽出する。
- 11) 通知法に従って、逆転写後、リアルタイム PCR 法で定量する。

4. 備考

- 1) ポリエチレングリコール沈殿法は、タンパクなど、ウイルスを共沈させる物質が無いと、沈殿を形成しない。清浄な検体であれば、超遠心機による沈殿法も適用できるが、超遠心機を使えない場合には本法が適用できる。
- 2) QIA Viral RNA mini kit を使用して抽出時、AVL を入れて 10 分経過後、エタノールを入れる工程がある。エタノールを入れると液体の粘度が高くなり、カラムを通過しづらくなる場合がある。このような場合は、9)の工程で、PBS による希釈を 1.5 倍等、希釈率を上げ、抽出時も AVL を 1.5 倍量とする。
- 3) 本法は、超遠心によらないソフトなウイルスの濃縮法の応用である。感染性粒子を精製する場合には、文献 2)の方法を参照すること。

参考文献

- 1) Asenjo J.A., Andrews B.A. : J. Chromatogr. A., 1238, 1(2012).
- 2) Shichijo A. : Trop. Med., 18, 1(1976).
- 3) Grindrod J., Cliver D.O. : Arch. Gesamte.Virusforsch., 31, 365(1976).

連絡先

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科 田村 務

作成日：平成 25 年 2 月 20 日

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(平成 22～24 年度)
検査法マニュアル

蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス GI, ノロウイルス GII, サポウイルス, アストロウイルス, アイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルス, A 群ロタウイルス, C 群ロタウイルス, アデノウイルス

2) 対象検体

糞便

3) 本プロトコールの範囲

急性胃腸炎患者の便検体から抽出した核酸を逆転写反応後に、複数の蛍光色素で標識したプライマーセットで 3 つのマルチプレックス PCR 反応を行い、増幅産物のサイズと蛍光色から 10 種の下痢症ウイルスを包括的に検出するまでの工程。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

マイクロピペット及びチップ (1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l)

ディスポーザブル微量遠心管 (1.5ml)

ディスポーザブル遠心管 (15ml 程度)

ディスポーザブルスポイト (3ml)

1.5ml 微量遠心管用遠心分離機

低速遠心分離機 (15ml ディスポーザブル遠心管を 1,870 \times g(3,000rpm 程度)で遠心できる機器)

サーマルサイクラー

ヒートブロック (97°Cまで加温可能なもの)

電気泳動装置

UV トランスイルミネーター

デジタルカメラ

紫外線吸収フィルター (Fuji Film, SC46)

2) 試薬

下記の試薬のうち、アンダーラインを付したものについては、本プロトコールでの使用において同等以上の性能を有することが確認された場合は、他社メーカーの試薬を使用しても差し支えない。

エタノール

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)

ReverTra Ace (TOYOBO, TRT-101)

RNase Inhibitor, recombinant (TOYOBO, SIN201)

2.5mM each dNTPs

Random primer 9mers (TaKaRa, 3802)

Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa, RR060A)

プライマー (表 1 に従い、プライマーの 5'端を Alexa 蛍光で標識する*1。表 2 に示した配合によりプライマーミックスを作製し、-20°Cで保存。)

Nuclease Free 水 (高圧滅菌済, DNase フリー, RNase フリー)

100Base-Pair Ladder (GE Healthcare Life Sciences, 27-4007-01)

EzVISION Three (Amresco, N313-KIT)

電気泳動用アガロース

*1 Alexa 蛍光のプライマー標識はプライマー合成を扱う試薬会社へ依頼。

表 1. マルチプレックスPCR使用プライマー

使用プライマー	配列 (5' → 3')	標識蛍光	引用	
Set A ノロウイルスGI	G1SKF G1SKR	CTGCCCGAATTYGTAAATGA CCAACCCARCCATTRTACA	Alexa488	1)
ノロウイルスGII	G2SKF G2SKR G2ALSKR	CNTGGGAGGGCGATCGCAA CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT CCACCAGCATATGAATTGTACAT	Alexa594	1) 2)
サポウイルス	SV-F21 SV-R2	ANTAGTGTTTGARATGGAGGG GWGGGRTCAACMCWGGTGG	Alexa532	3)
アストロウイルス	AC1' AC230	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG GGTTTTGGTCCTGTGACACC	Alexa350	4)
Set B アイチウイルス	C(+) 6261 C(-) 6779	ACACTCCGACCTCCGCGCAGTA GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA	Alexa488	5)
ボカウイルス	HBoV 01.2 HBoV 02.2	TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG GCCGCGTGAACATGAGAAACAGA	Alexa546	6)
パレコウイルス	AN345 AN344	GTAACASWGCCTCTGGGSCCAAAG GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT	Alexa594	7)
Set C A群ロタウイルス	RotaA-fwd1 RotaA-fwd2 Rota rev1 Rota rev2	GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAAA GGAGGTTCTGTACTCATTGTCAAAAA TCCAGTTTGGAACTCATTTCGA TCCAGTTTGAAGTCATTTCATT	Alexa488 Alexa488	8)
O群ロタウイルス	G8NS1 G8NA2	ATTATGCACAGACTATCGCCAC GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC	Alexa594	9)
アデノウイルス	Ad-A1m Ad-A2	GCCGCARTGGTCTTACATGCACATC CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	Alexa546	10) (slightly modified)

表 2. プライマーミックスの調製(100反応分)

Set A primer mix		Set B primer mix		Set C primer mix	
G1SKF(100 μM)	20 μl	C(+)-6261(100 μM)	20 μl	RotaA-fwd1(100 μM)	20 μl
G1SKR(100 μM)	20 μl	C(-)-6779(100 μM)	20 μl	RotaA-fwd2(100 μM)	20 μl
G2SKF(100 μM)	20 μl	HBoV 01.2(100 μM)	10 μl	RotaA rev1(100 μM)	20 μl
G2SKR(100 μM)	20 μl	HBoV 02.2(100 μM)	10 μl	RotaA rev2(100 μM)	20 μl
G2ALSKR(100 μM)	10 μl	AN345(100 μM)	20 μl	G8NS1(100 μM)	20 μl
SV-F21(100 μM)	10 μl	AN344(100 μM)	20 μl	G8NA2(100 μM)	20 μl
SV-R2(100 μM)	10 μl	Nuclease free water	400 μl	Ad-A1m(100 μM)	10 μl
AC1'(100 μM)	10 μl			Ad-A2(100 μM)	10 μl
AC230(100 μM)	10 μl			Nuclease free water	560 μl
Nuclease free water	520 μl				
	650 μl		500 μl		700 μl

3. 操作法

- 1) 糞便 10%乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用してウイルス RNA を抽出する。
抽出手順はキットのマニュアルに順ずる。直ぐに逆転写反応に供試しない場合は、抽出 RNA を使用まで -80°C で保存する。
- 2) Set C の逆転写反応に供試する RNA については 1/10 容の DMSO (Dimethyl sulfoxide)

を加え、97°Cで5分間の熱変性を行った後、逆転写反応液に加えるまで氷水中に静置する。(Set A 及び Set B の逆転写反応に供試する RNA にはこの過程は不要。)

- 3) 逆転写反応液を調製する。ReverTra Ace を使用する場合は表3に示した通りに調整する。

表3. 逆転写反応液組成(1反応分)

試薬	
5× RT buffer	4 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
Random primer 9mer (50 μ M)	1 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
ReverTra Ace (100U/ μ l)	1 μ l
抽出RNA	9.5 μ l
total	20 μ l

- 4) 次の条件で逆転写反応を行い、cDNA を合成する。(30°C・10分の後→42°C・60分→99°C・5分→冷却)
- 5) 表4に示した Set A, B, C の各マルチプレックス PCR 反応液を調製し、4) の過程で合成した cDNA をテンプレートとして加える。

表4 マルチプレックスPCR反応液組成(1反応分)

試薬	Primer Set		
	Set A	Set B	Set C
Multiplex PCR Mix2	25 μ l	25 μ l	25 μ l
Primer mix	6.5 μ l	5 μ l	7 μ l
Multiplex PCR Mix1	0.25 μ l	0.25 μ l	0.25 μ l
DW	16.25 μ l	17.75 μ l	15.75 μ l
template cDNA	2 μ l	2 μ l	2 μ l
	50 μ l	50 μ l	50 μ l

- 6) 表5の条件でPCR反応を行う。

表5. マルチプレックスPCR反応条件

Primer Set	Initial activation	3 step cycling			Number of cycles	Final extension
		Denaturation	Annealing	Extension		
A, C	94°C/60秒	94°C/30秒	57°C/90秒	72°C/90秒	40	72°C/10分
B			55°C/90秒			

- 7) PCR 反応後に 2%アガロースゲルで電気泳動する。PCR 反応液のアプライ量は 10 μ l。マーカーには 100Base-Pair Ladder 1.5 μ l に EzVISION を 1 μ l 混合したものをアプライする。一番低分子のトラッキングダイがアガロースから流れきるまで (未反応の蛍光標識プライマーがゲルから流れ出るまで)、電気泳動を行う。未反応の蛍光標識プライマーがゲルに残っていると、この蛍光の発光により増幅したバンドの蛍光が見えにくくなる。
- 8) UV トランスイルミネーター上にゲルを置き、蛍光バンドを観察する。各ウイルスの検出

バンドの出現位置と色は図1の通り。

Set Aでは、ノロウイルスGI、ノロウイルスGII、サポウイルス、アストロウイルスは、それぞれ330bp (緑)、344bp (赤)、430bp (黄)、230bp (青) にバンドが現れる。

Set Bでは、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルスは、それぞれ519bp (緑)、291bp (橙)、195bp (赤) にバンドが現れる。

Set Cでは、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス、アデノウイルスは、それぞれ145bp (緑)、351bp (赤)、300bp (橙) にバンドが現れる。

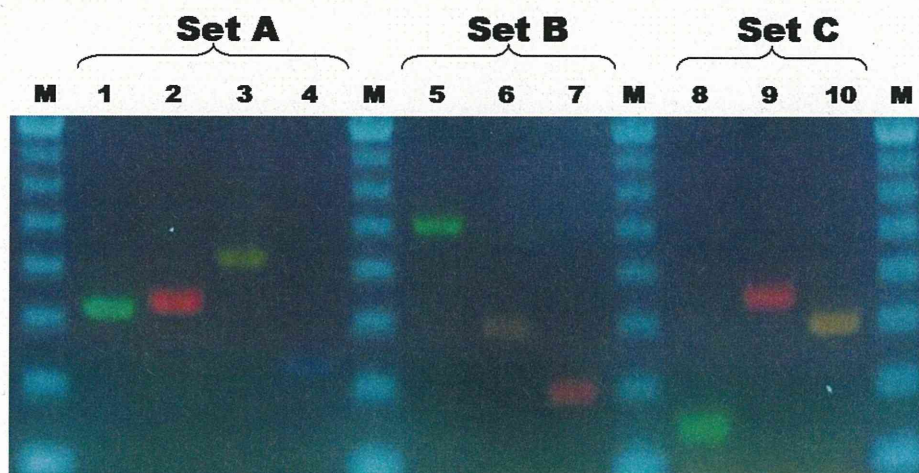


図1. 蛍光RT-マルチプレックスPCR(Set A, B, C)の電気泳動像

M100bpラダー, 1:ノロウイルスGI, 2:ノロウイルスGII, 3:サポウイルス, 4:アストロウイルス,
5:アイチウイルス, 6:ボカウイルス, 7:パレコウイルス, 8:A群ロタウイルス, 9:C群ロタウイルス,
10:アデノウイルス

- 9) 写真撮影を行う際は、市販のデジタルカメラに紫外線吸収フィルターSC46を装着して撮影する。バンドが薄い場合は、エチジウムブロマイド染色して再確認しても良い。

4. 備考

Alexa 蛍光標識により PCR の増幅が阻害される場合もあるので、表1のプライマー組み合わせ以外で Alexa 蛍光を標識する場合には反応性を確認する必要がある。また、Alexa350を別のプライマーに標識する場合は、G、C 端に標識しないようにする (G による消光現象で蛍光が消光する)。デジタルカメラでの撮影時に紫外線吸収フィルターを使用しないと画像に UV トランスイルミネーターの紫外線蛍光管が画像に写り込む。

参考文献

- 1) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, 100, 107-114 (2002).
- 2) Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H. and Kimura, H.: Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 51, 177-184 (2007).
- 3) Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T. and Kaiho, I.: Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch. Virol.*, 147, 1445-1451 (2002).
- 4) Sakon, N., Yamazaki, K., Utagawa, E., Okuno, Y. and Oishi, I.: Genomic characterization of human astrovirus type 6 katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J. Med. Virol.*, 61, 125-131 (2000).
- 5) Yamashita, T., Sugiyama, M., TSUZUKI, H., Sakae, K., Suzuki, Y. and Miyazaki, Y.: Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2955-2961 (2000).
- 6) Albuquerque, M.C., Rocha, L.N., Benati, F.J., Soares, C.C., Maranhao, A.G., Ramirez, M.L., Erdman, D. and Santos, N.: Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1756-1758 (2007).
- 7) Nix, W.A., Maher, K., Johansson, E.S., Niklasson, B., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A. and Oberste, M.S.: Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 2519-2524 (2008).
- 8) Logan, C., O'Leary J.J. and O'Sullivan, N.: Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3189-3195 (2006).
- 9) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉肇.: 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. *感染症学雑誌*, 77, 53-59 (2003).
- 10) Allard, A., Albinsson, B. and Wadell, G.: Detection of adenoviruses in stools

from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. J. Med. Virol., 37, 149-157 (1992).

連絡先

広島県立総合技術研究所・保健環境センター 重本直樹

作成日：平成 25 年 2 月 28 日

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(平成 22～24 年度)
検査法マニュアル

Multiplex real-time PCR による腸管系ウイルスの一斉検索法

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

サポウイルス (SaV) , アストロウイルス (AstV), A 群ロタウイルス (RVA), C 群ロタウイルス (CRV), アデノウイルス (AdV), エンテロウイルス (EntV)

2) 対象検体

糞便等から抽出したウイルスの DNA あるいは RNA

3) 本プロトコールの範囲

検体からウイルスの DNA あるいは RNA を抽出した後, 逆転写処理により PCR の鋳型となる cDNA を合成し, Multiplex real-time PCR により, ウイルスの検索を実施するまでの工程.

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

マイクロピペットおよびチップ (1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l)

ディスポーザブル微量遠心管 (2.0ml, 1.5ml, 0.2ml あるいは 0.5ml)

微量遠心管用遠心分離機

温度コントローラー (恒温槽でも可)

StepOne Plus リアルタイム PCR 装置 (life technologies) (3 色以上 Reporter 色素を検出可能な装置)

96well プレート用遠心分離機

MicroAmp Fast 96 well Reaction Plate (life technologies, 4346907)

MicroAmp Optical Adhesive Film (life technologies, 4311971)

Adhesive Seal Applicators (life technologies, 4333183)

2) 試薬

QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)

Super Script[®]III Reverse Transcriptase (life technologies, 18080-044)

RNase inhibitor (Wako, 181-01821)

dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 10mM になるように混合)

Random Primer (Nona-deoxyribonucleotide mixture) (TaKaRa, 3802)

遺伝子解析用蒸留水 (高压滅菌済, DNase フリー, RNase フリー)

QuantiTect[®] Multiplex PCR Master mix (QIAGEN, 204541)

Multiplex real-time PCR 用プライマー

Primer	塩基配列 (5' -3')	sense	文献
SaV124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	+	1
SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	+	1
SaV5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	+	1
SaV1245R	CCCTCCATYTCAAACACTA	-	1
Hast.fwd	TCAACGTGTCCGTAAMATTGTCA	+	2
HastV.rev	TGCWGGTTTGGTCCTGTGA	-	2
JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	+	3
JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA	-	3
CRV7F	GCTGCATTGGTAGTACTGYGA	+	4
CRV7R	AGTTTCTGTACTAGCCGGTGAACA	-	4
JTVXF	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG	+	5
JTVXR	ACIGTGGGTTTCTGAAGTTGTT	-	5
EnteroPrimer1F	TCCTCCGGCCCCTGA	+	6
EnteroPrimer1R	RATTGTCACCATAAGCAGCCA	-	6

Multiplex real-time PCR 用プローブ

Probe	塩基配列 (5' -3')	reporter	quencher	sense	文献
SaV124TP	CCRCCTATRAACCA	FAM	MGB	+	1
SaV5TP	TGCCACCAATGTACCA	FAM	MGB	+	1
HastV.probe1+2	CAACTCAGGAAACARG	VIC	MGB	+	2
JVKP	ACAACCTGCAGCTTCAAAGAAGWGT	TAMRA	BHQ	+	3
CRV7	TCTGTCTGTCCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG	TAMRA	BHQ	+	4
JTVXP	CTGGTGCAGTTCGCCCCGTGCCA	VIC	MGB	+	5
EnteroTaqman1	CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCGT	FAM	MGB	+	6

3. 操作法

- 1) 糞便等の検体から QIAamp Viral RNA mini kit[QIAGEN]等を用いて抽出した核酸を用いる。または、 -80°C 以下で冷凍保存してある RNA を用いる。
- 2) 抽出した核酸をテンプレートとして、逆転写反応を実施する。逆転写反応は、厚生労働省から通知されている「ノロウイルスの検出法(食安監発第 1105001 号)」に準じた方法等で実施する。以下、逆転写反応について Super Script[®] III Reverse Transcriptase を用いた場合について例示する。
- 3) 表 1 のとおり、0.2ml あるいは 0.5ml の微量遠心管を用いて逆転写処理混合液の調製を行う。

表 1 逆転写処理混合液 (Super Script[®] III Reverse Transcriptase を用いる場合)

試薬等	1 検体当たりの使用量 (μl)			
	15 μl 系	20 μl 系	30 μl 系	50 μl 系
抽出 RNA	7.5 μl	10.0 μl	15.0 μl	25.0 μl
5X First Strand Buffer*	3.0 μl	4.0 μl	6.0 μl	10.0 μl
10mM dNTPs	0.75 μl	1.0 μl	1.5 μl	2.5 μl
Random Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Nona-deoxyribonucleotide mixture)	0.375 μl	0.5 μl	0.75 μl	1.25 μl
RNase inhibitor (20 U/ μL)	0.188 μl	0.25 μl	0.36 μl	0.63 μl
100mM DTT*	0.75 μl	1.0 μl	1.5 μl	2.5 μl
Super Script III RT (200u/ μl)	0.75 μl	1.0 μl	1.5 μl	2.5 μl
遺伝子解析用蒸留水	0.937 μl	1.25 μl	1.87 μl	3.12 μl

* Super Script III RT に添付のものを用いる。

- 4) 30°C で 10 分置いた後、 50°C で 60 分間逆転写反応を行い、 98°C 、5 分加熱後速やかに冷却する。これで cDNA 合成が完了する。
- 5) 表 2 のとおり、0.2ml あるいは 0.5ml の微量遠心管を用いて、Multiplex real-time PCR に利用する primer/probe mix の調製を行う。混合液中の primer および probe は各 4 μM になるように調整する。

表2 primer/probe mix (20×premix 1ml を作製する場合)

20×SaV primer/probe mix		
Forward primer : SaV124F	(20pmol/μl)	20 μl
Forward primer : SaV1F	(20pmol/μl)	20 μl
Forward primer : SaV5F	(20pmol/μl)	20 μl
Reverse primer : SaV1245R	(20pmol/μl)	20 μl
Taq Man probe : SaV124TP	(10pmol/μl)	40 μl
Taq Man probe : SaV5TP	(10pmol/μl)	40 μl
遺伝子解析用蒸留水		840 μl

20×AstV primer/probe mix		
Forward primer : Hast.fwd	(20pmol/μl)	20 μl
Reverse primer : Hast.rev	(20pmol/μl)	20 μl
Taq Man probe : Hast.probe1+2	(10pmol/μl)	40 μl
遺伝子解析用蒸留水		920 μl

20×RVA primer/probe mix		
Forward primer : JVKF	(20pmol/μl)	20 μl
Reverse primer : JVKR	(20pmol/μl)	20 μl
Taq Man probe : JVKP	(10pmol/μl)	40 μl
遺伝子解析用蒸留水		920 μl

20×RVC primer/probe mix		
Forward primer : CRV7F	(20pmol/μl)	20 μl
Reverse primer : CRV7R	(20pmol/μl)	20 μl
Taq Man probe : CRV7	(10pmol/μl)	40 μl
遺伝子解析用蒸留水		920 μl

20×AdV primer/probe mix		
Forward primer : JTVXF	(20pmol/μl)	20 μl
Reverse primer : JTVXR	(20pmol/μl)	20 μl
Taq Man probe : JTVXP	(10pmol/μl)	40 μl
遺伝子解析用蒸留水		920 μl

20×EntV primer/probe mix		
Forward primer : EnteroTaqMqn1F	(20pmol/μl)	20 μl
Reverse primer : EnteroTaqMqn1R	(20pmol/μl)	20 μl
Taq Man probe : EnteroTaqMqn1	(10pmol/μl)	40 μl
遺伝子解析用蒸留水		920 μl

- 6) 表3のとおり, Multiplex real-time PCR 反応液 (Set A もしくは Set B) を 1.5ml あ
るいは 2.0ml の微量遠心管を用いて調製を行い, MicroAmp Fast 96 well Reaction Plate
に 18 μ l/well ずつ分注する。

表3 Multiplex real-time PCR 反応液

(2×Master mix に、QuantiTect® Multiplex PCR Master mix を用いる場合)

Set A (SaV/AstV/RVC 検出系)		Set B (EntV/AdV/RVA 検出系)	
2×Master mix	10.0 μ l	2×Master mix	10.0 μ l
20×SaV primer/probe mix	1.0 μ l	20×EntV primer/probe mix	1.0 μ l
20×AstV primer/probe mix	1.0 μ l	20×AdV primer/probe mix	1.0 μ l
20×RVC primer/probe mix	1.0 μ l	20×RVA primer/probe mix	1.0 μ l
遺伝子解析用蒸留水	5.0 μ l	遺伝子解析用蒸留水	5.0 μ l

- 7) 陽性コントロール, 陰性コントロール, 被験検体を各 2 μ l ずつ, PCR 反応液を分注し
た well に, 2well ずつ添加し, PCR 反应用プレートを作製する。
- 8) MicroAmp Optical Adhesive Film で PCR 反应用プレートを覆い, Adhesive Seal
Applicators を用いて密閉する。96well プレート用遠心分離機を用いて, PCR 反应用
プレートを 1,800rpm で 2 分間遠心を行い, 反応液を well の底に沈める。
- 9) StepOne Plus 本体および制御用コンピューターの電源を入れる。
- 10) StepOne Plus ソフトウェアを立ち上げ, メインメニューの Set Up から, PCR 反応条件
等を設定する。(Reporter 色素設定, サンプルタイプ設定と well の指定, サンプル名
の入力等)
- 11) PCR 反应用プレートを, real-time PCR 装置の規定の位置に設置し, Run を開始する。
- 12) 95 $^{\circ}$ C : 15 分処理後, 94 $^{\circ}$ C : 60 秒と 57 $^{\circ}$ C : 90 秒を 45 回処理する反応条件で Multiplex
real-time PCR 反応を実施する。
- 13) PCR 終了後, Data を保存する。
- 14) Analyze メニューから Analyze を選択し, データ解析を行う。
- 15) 陽性コントロールが 2well とともに検出され, 陰性コントロールが 2well とともに検出
されていないことを確認する。

16) 被験検体については、2well ともに検出されれば陽性、2well ともに検出されなければ陰性と判定し、1well のみの検出であれば再試験を実施する。

4. 備考

参考文献

- 1) T.Oka et al.: Detection of Human Sapovirus by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, J. Med. Virol. 78. 1347-1353 (2006)
- 2) C. Logan et al.: Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis, J. Virol. Methods. 146. 36-44 (2007)
- 3) N. Jothikumar et al.: Broadly reactive TaqManR assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples, J. Virol. Methods. 155. 126-131 (2009)
- 4) K. Mori et al.: Multiplex real-time PCR assay for the detection of group C rotavirus, astrovirus, and Subgenus F adenovirus in stool specimens, J. Virol. Methods. 14. (2012)
- 5) N. Jothikumar et al.: Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41, Appl. Environ. Microbiol. 71. 6. 3131-3136 (2005)
- 6) M. Nijhuis et al.: Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR, J. Clin. Microbiol. 40. 10. 3666-3670 (2002)

連絡先

福井県衛生環境研究センター 小和田和誠

作成日：平成 25 年 2 月 18 日

III 研究成果の刊行に関する一覧表