

ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法 操作手順

1 各工程に必要な試薬

(1) 試料の調製・前処理

- ア α -Amylase
No. 017-26371 (Wako)
- イ Polyethylene Glycol 6,000
No. 169-22945 (Wako)
- ウ Sodium Chloride
No. 191-01665 (Wako)
- エ Zwittergent® 3-14 Detergent
No. 693017-5GM (Calbiochem)
- オ RNase ONE™ Ribonuclease
No. M426A (Promega)
- カ Distilled Water, Deionized, Sterile
No. 318-90105 (Nippon Gene)
- キ 10 x PBS Buffer
No. 314-90185 (Nippon Gene)
- ク Glycerine
No. 075-00616 (Wako)

(2) RNA 抽出・DNase 処理

- ア High Pure Viral RNA Kit
No.11858882001 (Roche)
- イ RTmate
No.315-05941 (Nippon Gene)
- ウ DNase I recombinant, RNase-free
No. 04716728001 (Roche)

(3) cDNA 合成 (逆転写反応)

- ア High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits
No. 4358814 (Appliedbiosystems)
もしくは
Prime script RT reagent kit (タカラバイオ)
No.RR037A
- イ Oligo (dT)12-18
No. 18418-012 (Appliedbiosystems)

2 使用する代表的な機材・用具

サンプリングバック
ヘラ
ハサミ
メス
フェザーナイフ
ピンセット
ろ紙
葉さじ
メスシリンダー
遠心管
エッペンドルフチューブ
孔径 0.22 μm の滅菌フィルター
チップ

3 試料の調製・前処理

- (1) 殻付きのカキはヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- (2) カキの外套膜を取り除き、中腸腺の周りに付いているグリコーゲンや脂質を含む白色部分をフェザーナイフ、ハサミ等で可能な限り取り除く。
- (3) カキから中腸腺を全部摘出し、試験に供する試料とする。この時できる限り周りの白色の組織を取り除く。
* 研究用にカキを個体別に分析することもあるが、検査時には3～10個程の検体（中腸腺）を合わせて1検体として分析する。
- (4) ホモジナイザーまたはストマッカー用のサンプリングバッグに中腸腺を入れ、9倍量のPBS(-)（例：中腸腺 1 g に 9 mL のPBS(-)）を加えホモジナイズする。この時、ストマッカーでは十分に懸濁できないことがあるため、ローラーなどを用いて十分に懸濁する。
- (5) ホモジナイズした試料を 15 mL 容の遠心管に移す。なお、上清が 15 mL 以上ある場合、10 mL を別の 15 mL 容の遠心管に採取する。その際、使用しなかった上清の容量も記録する。
- (6) ホモジナイズした試料に、 α -Amylase 溶液^{※1}の最終濃度が 0.25 mg/mL となるように添加し（例：ホモジナイズした試料 10 mL に対して α -Amylase 溶液 20 μL の割合で添加する）、よく混合後、恒温水槽で 1 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ の温

浴で反応させる。

- (7) 1 時間放置して反応させた懸濁液は、ボルテックスミキサーで攪拌し、均一にしてから、8,000 G で 20 分間 (4 °C) 遠心分離する。
- (8) (7) の上清を新たな 15 mL 容の遠心管に採取する。
- (9) 採取した上清 1 mL に対して Polyethylene Glycol 溶液^{※2} を 0.4 mL 加え (例えば、上清が 10 mL ある場合、Polyethylene Glycol 溶液を 4 mL 加える。)、ボルテックスミキサーで十分に混合後、4 °C で一晩放置する。
- (10) 8,000 G で 20 分間 (4 °C) 遠心分離し、上清を除去する。沈殿物に 0.5 % Zwittergent 添加リン酸緩衝液^{※3} を 400 µL 加え、沈殿物を再浮遊させ、ボルテックスミキサーで十分に混合する。8,000 G で 5 分間 (4 °C) 遠心分離した上清を濃縮ウイルス液とする。

※1 α-Amylase 溶液

α-Amylase (Wako 017-26371) 1 g を 15 mL 容の遠心管に入れる。
リン酸緩衝液 (10 x PBS Buffer (Nippon Gene 314-90185) を超純水 (Nippon Gene 318-90105) で 10 倍希釈したもの) 4 mL を加え、よく混合する。8,000 G で 20 分間 (4 °C) 遠心分離した上清を別の 15 mL 容の遠心管に移し、孔径 0.22 µm の滅菌フィルターで濾過する。得られたろ液と等量の Glycerine (Wako 075-00616) を加えて混合する。最終溶液を 1.5 mL 容の遠心管に分注し、-80 °C で保管する。

※2 Polyethylene Glycol 溶液

Polyethylene Glycol 6,000 (Wako 169-22945) を 30 g、Sodium Chloride (Wako 191-01665) を 14.61 g それぞれ量りとり、超純水で溶解後 100 mL にメスアップし、高圧蒸気滅菌して常温で保管する。

※3 0.5% Zwittergent 添加リン酸緩衝液

Zwittergent[®] 3-14 Detergent (Calbiochem 693017) 0.5 g をリン酸緩衝液 (10×PBS Buffer (Nippon Gene 314-90185) を超純水 (Nippon Gene 318-90105) で 10 倍希釈したもの) で溶解後、100 mL にメスアップし、高圧蒸気滅菌して常温で保管する。

4 RNase 処理

- (1) 濃縮ウイルス液 70 µL に RNase ONE[™] ribonuclease (Promega M4261) 1.4 µL、×10 Reaction Buffer 10 µL 及び蒸留水 (Takara RNase-free Water 9012) 18.6 µL を加える。混合後、アルミブロック恒温槽で 37°C、1 時間放置して反応させる。
- (2) 反応後の溶液にリン酸緩衝液を 100 µL 加えて 200 µL とし、その溶液を RNA 抽出用検体とする。

5 RNA抽出

- (1) RNA 抽出用検体の全量 (200 μ L) に HighPure Viral RNA Kit (Roche 11858882001) の Binding buffer に RTmate を添加したもの^{※1}を 400 μ L 加えてボルテックスミキサーでよく混合する。
- (2) 軽くスピンドウンして泡を抜いた後、室温で 10 分間放置する。
- (3) 混合液の全量をカラムに移し、8,000 G で 15 秒遠心する。カラムを新しい 2 mL 容の遠心管に移す。DNase 処理液^{※2} 100 μ L をカラムに添加後、室温で 15 分間放置する。
- (4) カラムに Inhibition removal buffer I を 500 μ L 添加し、8,000 G で 1 分間遠心する。
- (5) カラムを新しい 2 mL 容の遠心管に移す。
- (6) カラムに Washing buffer を 450 μ L 添加し、8,000 G で 1 分間遠心する。
- (7) カラムを新しい 2 mL 容の遠心管に移す。
- (8) カラムに Washing buffer を 450 μ L を添加し、8,000 G で 1 分間遠心する。
- (9) 再度、13,000 G で、10 秒間遠心する。
- (10) カラムを新しい滅菌済み 1.5 mL 容の遠心管に移し、カラムフィルター上に Elution buffer を 50 μ L 添加する。
- (11) 蓋をして 1 分間、室温放置した後、8,000 G で 1 分間遠心し、溶出液を精製 RNA 液として直ちに逆転写反応を行う。

※1 RTmate添加済みBinding buffer

Binding buffer 400 μ LにRTmate (Nippon Gene 315-05941) を 8 μ L添加する。Binding bufferは粘性が高く混ざりにくいため、添加の際にはボルテックスミキサーでよく混合し、軽くスピンドウンして、泡を抜くこと。High Pure Viral RNA Kit(Roche 11858882001)に添付されているキャリアRNAは使用しない。なお、High Pure RNA Isolation Kit(Roche No. 11828665001)であれば、キャリアRNAは添付されていないため代用が可能。

※2 DNase処理液

DNase I recombinant, RNase-free (Roche 04716728001) 1 μ L、
10 $\times$ Incubation buffer 10 μ L及び蒸留水
(Takara RNase-free Water 9012) 89 μ Lを混合したもの。

6 cDNA 合成 (逆転写反応)

(1)-1 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いる場合

精製 RNA 液 25 μ L に High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems 4368814) の逆転写反応液 25 μ L (10 $\times$ RT Buffer 5 μ L、25 $\times$ dNTP Mix (100 mM) 2 μ L、Reverse Transcriptase 2.5 μ L、滅菌水 15 μ L、Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen 18418-012) 0.5 μ L を混合したもの) を加える。

10 $\times$ RT Buffer	5 μ L
25 $\times$ dNTP Mix (100 mM)	2 μ L
Reverse Transcriptase	2.5 μ L
Distilled water	15 μ L
Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen)	0.5 μ L
精製 RNA 液	25 μ L
計	50 μ L

(1)-2 **Primescript RT reagent kit** (タカラバイオ) を用いる場合

精製 RNA 液 25 μ L に Primescript RT reagent kit (タカラバイオ RR037A) の逆転写反応液 25 μ L (5 $\times$ PrimeScript Buffer 10 μ L、PrimeScript RT Enzyme mix 2.5 μ L、Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen 18418-012) 0.5 μ L、滅菌水 12 μ L を混合したもの) を加える。

5 $\times$ PrimeScript Buffer	10 μ L
PrimeScript RT Enzyme mix	2.5 μ L
Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen)	0.5 μ L
Distilled water	12 μ L
精製 RNA 液	25 μ L
計	50 μ L

- (2) タッピングにより攪拌し、軽くスピンドウンして遠心管壁面についた液体を落とす。
- (3) サーマルサイクラーにより逆転写反応を行う。その際、反応時間は37 $^{\circ}$ C、2時間とする。
- (4) 逆転写反応が終了した溶液を cDNA 溶液とし Realtime PCR による定量試験を行う。保管する場合は、-80 $^{\circ}$ Cとする。

7. Realtime PCRによる定量試験

(1) Realtime PCR による定量試験

定量試験を実施する場合、「ノロウイルスの検出法について」厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課(平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号別添 最終改正:平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号)に基づく方法を利用

することが可能である。その際、6で合成した cDNA を鋳型にすることができる。qPCR 試薬には、Norovirus GI/GII typing kit Ver.2(タカラバイオ No. RR265A)もしくはPremix Ex Taq probe qPCR(タカラバイオ No. RR390A)が適している。Norovirus GI/GII typing kit Ver.2には上記方法用のプライマーおよびプローブが含まれている。また、検量線作成用の標準 DNA には、*Norovirus* (GI/GII) Positive Control DNA(タカラバイオ No. RR251A)が精度および操作性で優れている。