

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 (Applied biosystems)
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 (Applied biosystems)

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 °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℃)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℃で一晩放置する。
- (10) 8,000 Gで20分間(4℃)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℃)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℃)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℃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 x 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℃、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 μL) に HighPure Viral RNA Kit (Roche 11858882001)の Binding buffer に RTmate を添加したもの^{※1}を 400 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL にRTmate (Nippon Gene 315-05941)を8 μL 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 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 μL 、
10 x Incubation buffer 10 μL 及び蒸留水 (Takara RNase-free Water 9012)
89 μL 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 μL 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 RR265A)もしくは Premix Ex Taq probe qPCR (タカラバイオ 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 RR251A)が精度および操作性で優れている。