

ノロウイルス遺伝子型判別 (dual typing 法) の省力化

タカラバイオ株式会社

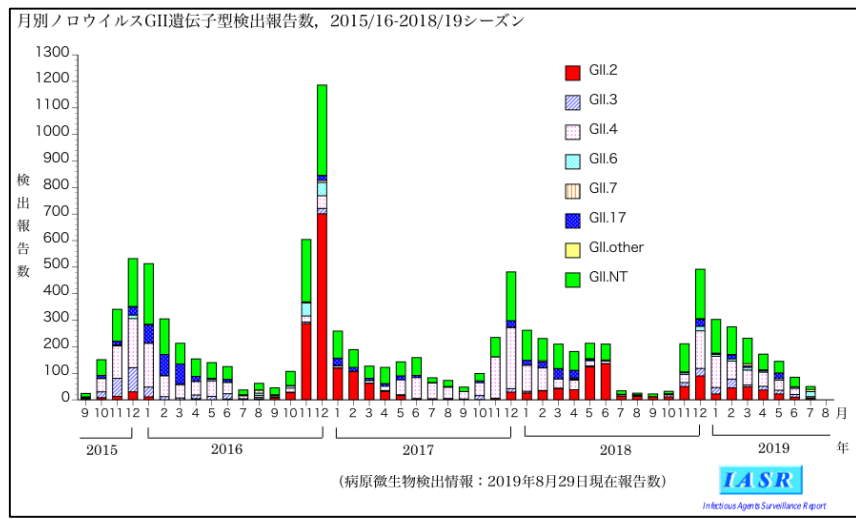
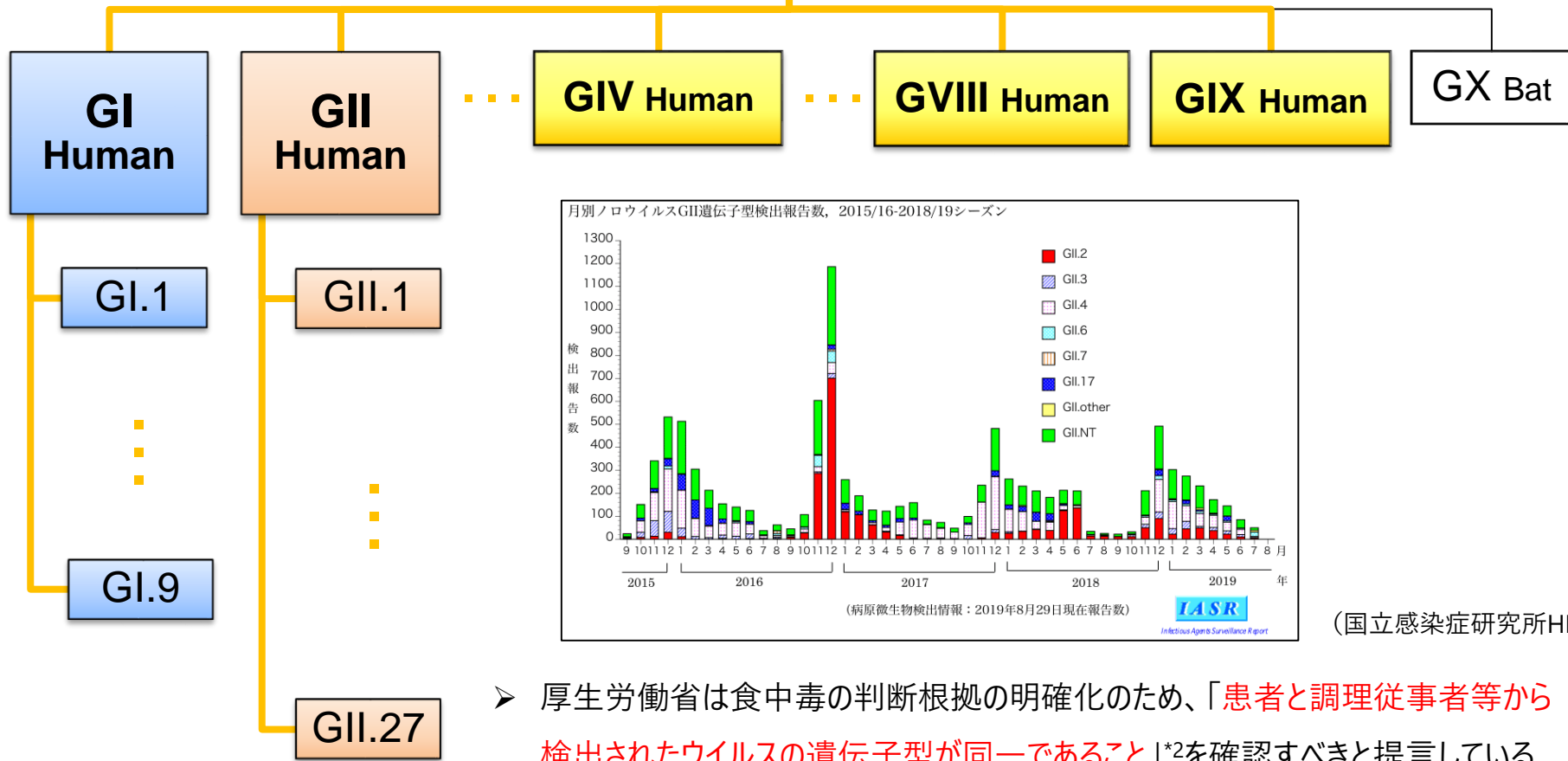
○齋藤憲介、吉崎美和、松本裕之、上森隆司

第40回日本食品微生物学会学術総会 (2019/11/28)

ノロウイルス (NoV) の遺伝子型について

NoV

*1 Chhabra, Preeti, et al. "Updated classification of norovirus genogroups and genotypes." *Journal of General Virology* 100.10 (2019): 1393-1406.



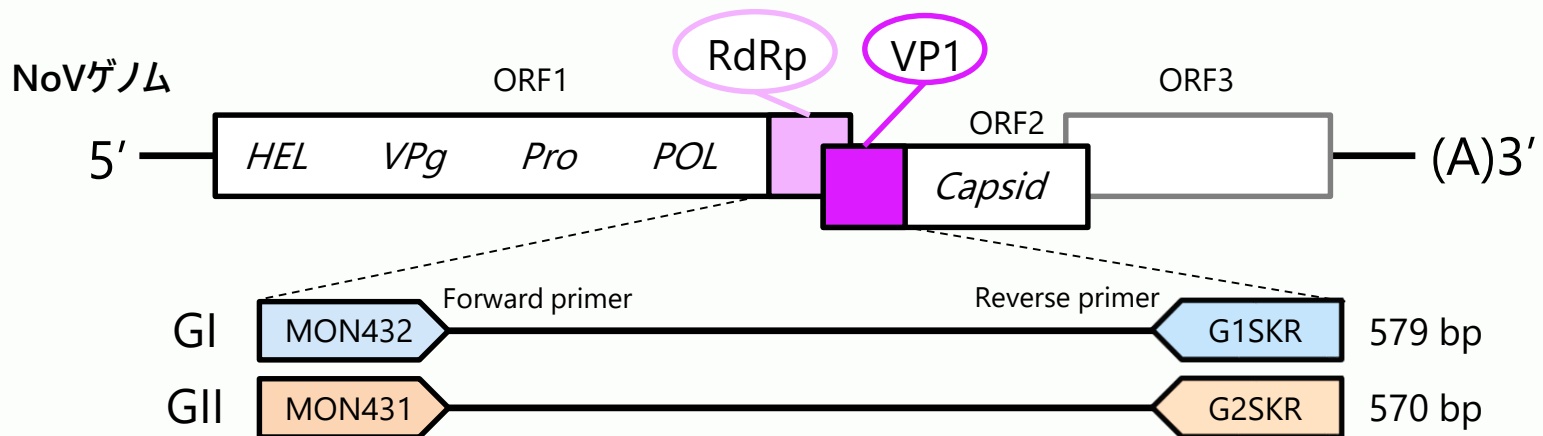
(国立感染症研究所HP)

- 厚生労働省は食中毒の判断根拠の明確化のため、「患者と調理従事者等から検出されたウイルスの遺伝子型が同一であること」*2を確認すべきと提言している。

遺伝子型判別 (dual typing法) について

dual typing法 (「病原体検出マニュアル ノロウイルス (第1版)*」収載)

- RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 領域の一部と capsid領域の一部 (VP1) の両方の遺伝子型をタイピング可能な手法。
 - ◆ RdRp領域とVP1領域の間 (ジャンクション領域) ではゲノムの組換えが頻発する。
 - ◆ この組み換えがウイルスの流行に影響することが示唆されている (GII.2[P16]等)。
- ⇒VP1領域だけでなく、キメラウイルスも確認出来るRdRp領域を含めたタイピングが必要！



RT-PCR法の操作手順の比較（dual typing法の場合）

Two step RT-PCR法（「病原体検出マニュアル ノロウイルス（第1版）」収載）

検便懸濁液の調製

RNA抽出

cDNA合成

Conventional PCR

- ▶ cDNA合成とPCR増幅は異なるチューブで行われる。



One step RT-PCR法

検便懸濁液の調製

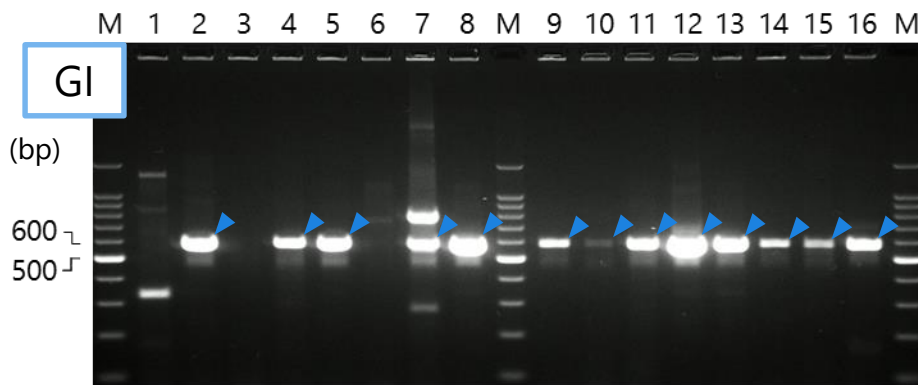
RNA抽出

~~cDNA合成~~

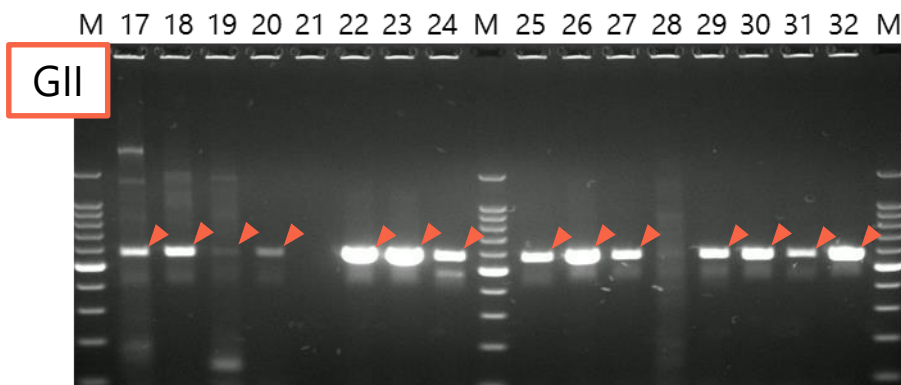
RT-PCR

- ▶ cDNA合成（RT反応）とPCR増幅が同一チューブ内で完了する。
 - ✓ ピペティング等の操作が少ないため、同時に多検体を処理するのが容易である。
 - ✓ チューブフタの開閉が少ないため、サンプル間のコンタミネーションを抑制できる。

One step RT-PCR法によるNoV標的領域の増幅結果



M: 100 bp ladder marker PCR産物は5 μ lアプライした。



M: 100 bp ladder marker PCR産物は5 μ lアプライした。

< PCR条件 >

42C, 20 min

94C, 1 min

98C, 10 sec

48C, 15 sec

68C, 30 sec

x45

Total : 1時間45分

- ✓ 2018/2019シーズンの遺伝子型既知の検体より、高～低コピー (Ct=13.0~29.8) のものを任意に選出し、NucleoSpin® Virusを用いてRNAを抽出後、One step RT-PCR法による標的領域の増幅を試みた。
- ✓ GIはGI.2[P2], GI.7[P9]、GIIはGII.2[P16], GII.6[P7], GII.17[P17]を供試した。
- GIは16検体中13検体 (81%)、GIIは16検体中14検体 (88%) で、期待する増幅サイズのバンドがアガロースゲル電気泳動により確認された (上図矢尻)。

PCR産物のシーケンス解析結果

< Exo-SAP処理 >

Exonuclease I (5 U/μl)	1 μl
Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/μl)	1 μl
PCR産物	20 μl
Total	22 μl

↓
37C, 1時間
80C, 15分
4C, ∞

< シーケンス用組成 >

上記処理済みPCR産物	3 μl
F or R primer (7.5 μM)	1 μl
H ₂ O	11 μl
Total	15 μl

↓
プレミックスシーケンス解析へ

GI	Ct値	判別可否*	
		RdRp領域	Capsid領域
1	26.3	×	×
2	20.0	○	○
3	24.5	×	×
4	23.5	○	○
5	22.9	○	○
6	28.9	×	×
7	24.8	○	○
8	20.0	○	○
9	22.2	○	○
10	22.8	×	×
11	25.0	○	○
12	17.5	○	○
13	23.5	○	○
14	23.7	○	○
15	28.3	○	○
16	22.5	○	○

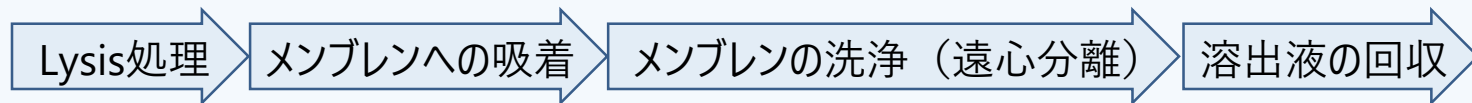
GII	Ct値	判別可否*	
		RdRp領域	Capsid領域
17	18.2	○	○
18	25.0	○	○
19	22.0	×	×
20	18.9	×	×
21	19.2	×	×
22	13.0	○	○
23	14.5	○	○
24	20.2	○	○
25	25.7	○	○
26	16.5	○	○
27	25.7	○	○
28	29.8	×	×
29	25.1	○	○
30	19.2	○	○
31	17.2	○	○
32	20.3	○	○

➤ 全ての検体のPCR産物をシーケンス解析に供試したところ、GI・GII共に16検体中12検体（75%）の遺伝子型を判別することが出来た。

RNA簡易抽出法によるdual typing法のさらなる省力化

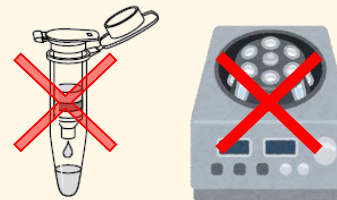


従来のRNA抽出法（「病原体検出マニュアル ノロウイルス（第1版）」収載）



- 市販のRNA抽出キットおよび遠心分離操作が必要であり、操作が煩雑である。

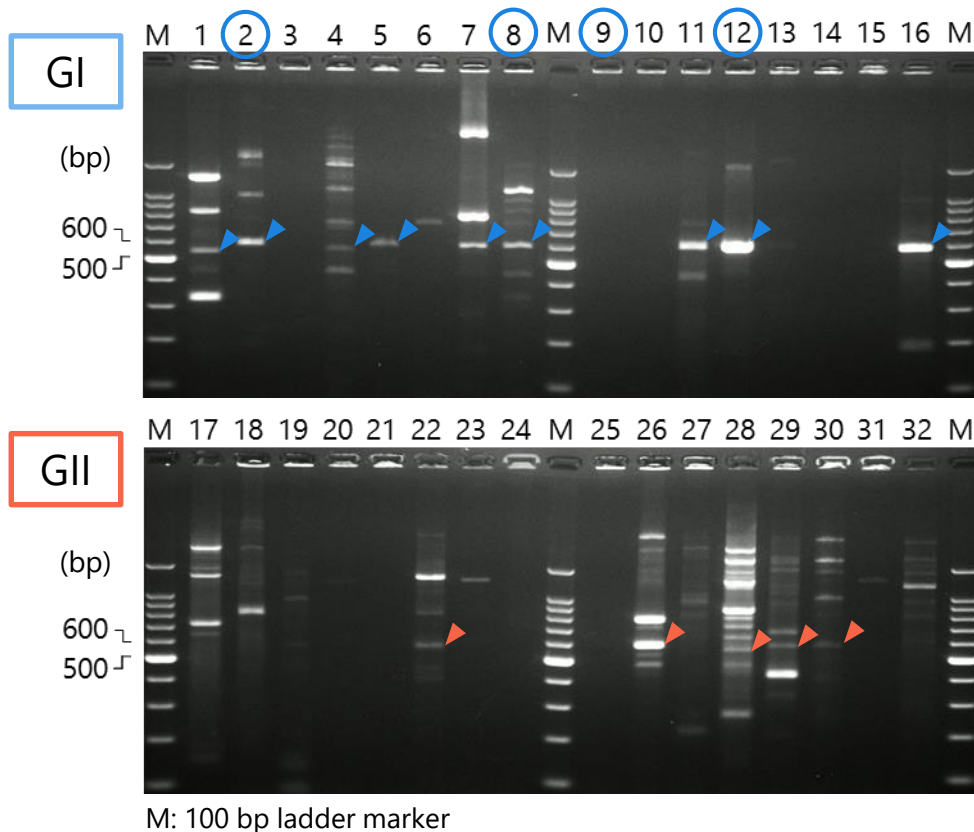
Lysis Bufferを用いたRNA簡易抽出法



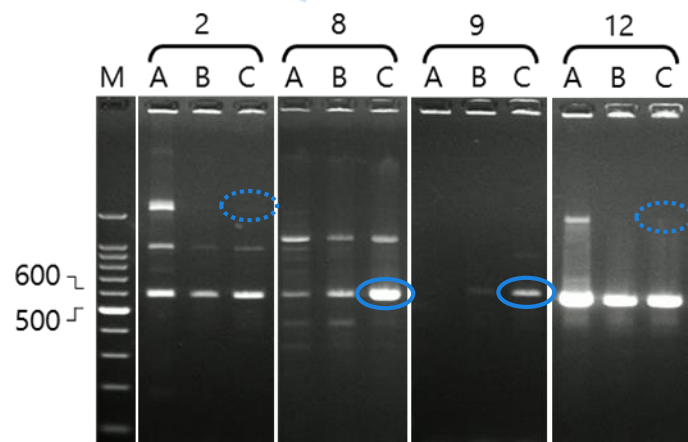
★96検体を処理する場合・・・
従来法：～数時間
簡易抽出法：30分！

- 市販のキットや遠心分離操作が不要であり、操作が非常に簡便かつ短時間で済む。
- 得られたLysis溶液にRT-PCR反応液を直接添加して、すぐに反応を開始できる。

RNA簡易抽出法と組み合わせた場合の One step RT-PCR法によるNoV標的領域の増幅結果



検便上清を生理食塩水で
適宜希釈すると・・・



- GIは16検体中9検体（56%）、GIIは16検体中5検体（31%）で標的増幅産物と思われるバンドが検出された。
- 増幅不良や非特異的増幅が見られた検体でも、生理食塩水で希釈したのち供試することで反応性が改善された。

今回のまとめ

One step RT-PCR法によるNoV遺伝子型判別

- 病原体検出マニュアル収載の遺伝子型判別（dual typing法）を基に、One step RT-PCR反応系を最適化した。
- 同一チューブ内での連続した反応工程により、Two step RT-PCR法と比べ、**操作性向上とコンタミネーション抑制**を達成した。
- 増幅産物の配列を解析すると、GI/GII共に各種遺伝子型を判別可能であった。

RNA簡易抽出法によるNoV遺伝子型判別

- Lysis Bufferにより、市販のRNA精製キットや遠心分離操作が**不要**で、**簡便かつ短時間**でRNAの取得が可能な簡易抽出法が適用出来ることを確認した。
- 適度な検体濃度であれば、RNA簡易抽出法で増幅出来る可能性が高い。

ご清聴ありがとうございました

検便懸濁液
の調製

RNA抽出

RT-PCR

シーケンス解析



NucleoSpin® Virus
(# U0983B)



or Lysis Buffer

One step RT-PCR Kit
for Dual typing(仮)



Coming soon!

プレミックスシーケンス解析

- ・8連チューブ
- ・96ウェルプレート

- ◆ Exo-SAP処理したPCR産物
 - ◆ Seq用Primer (F or R)
- この2つを混ぜて送るだけ！

☆煩雑な遺伝子型判別もTaKaRa製品でラクラク！