

ノロウイルス遺伝子型判別 (dual typing 法) の網羅性改善

○齋藤 憲介¹⁾ 左近 直美²⁾ 木村 博一³⁾

1) タカラバイオ株式会社、2) 大阪健康安全基盤研究所、3) 群馬パース大学大学院

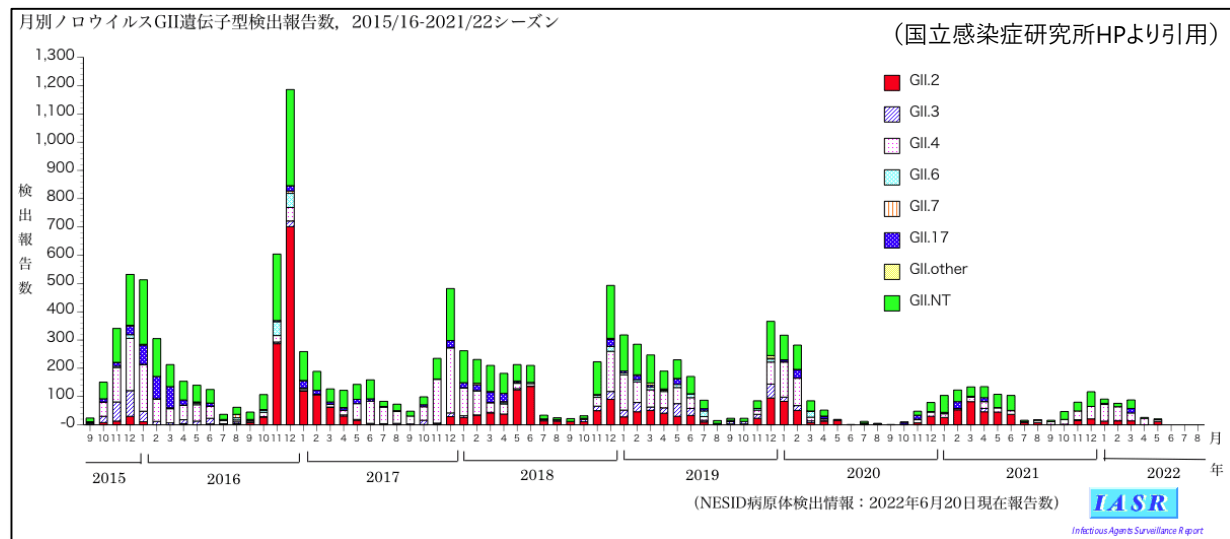
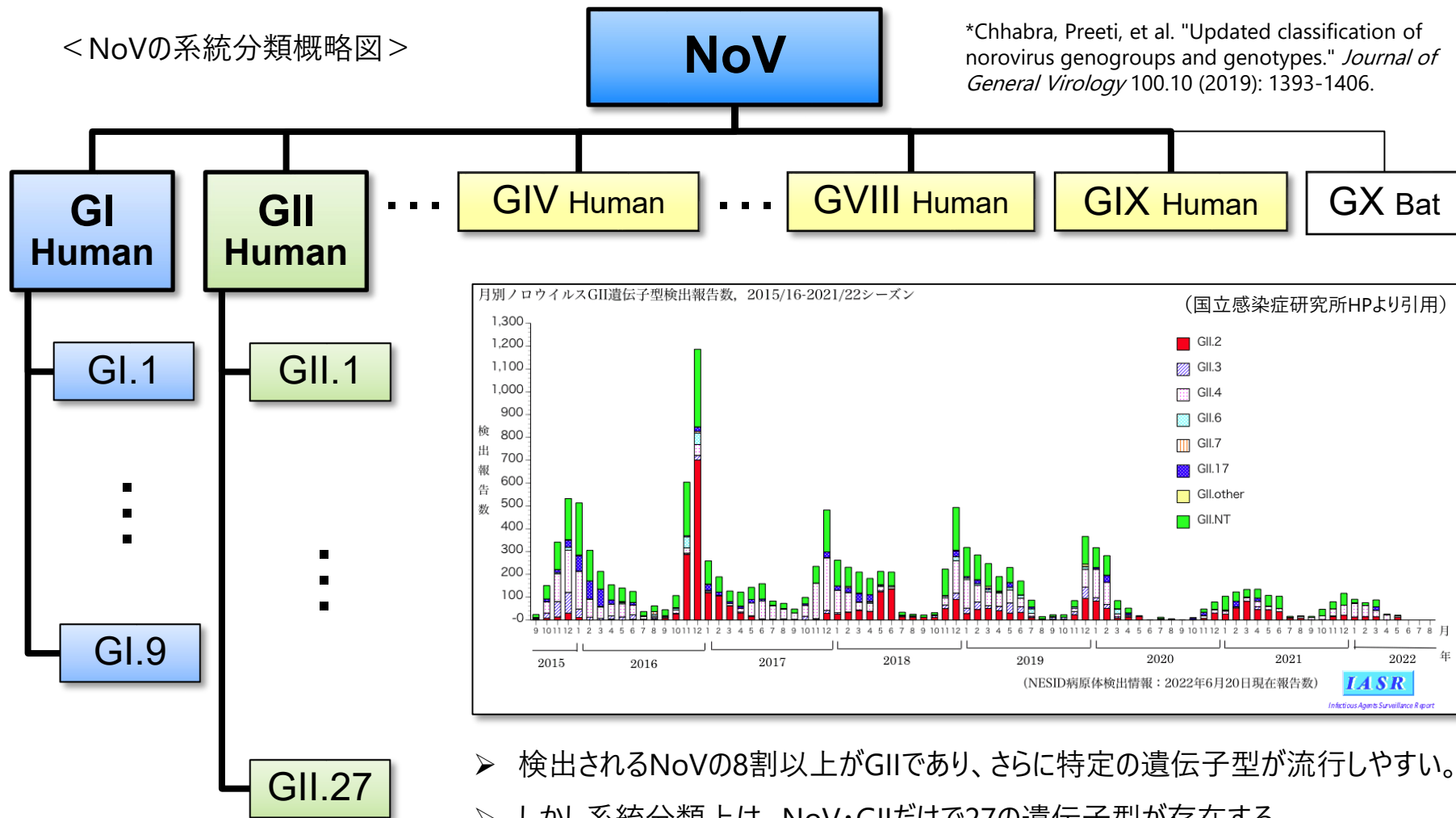
第43回日本食品微生物学会学術総会 (2022/9/29)

発表内容

1. ノロウイルス（NoV）の遺伝子型について
2. 遺伝子型判別（dual typing法）について
3. 本研究の目的
4. 人工合成遺伝子（DNA）を用いた網羅性確認
5. 実検体由来精製RNAを用いた検出確認
6. 増幅不良検体の反応性改善検討
7. まとめ

1. ノロウイルス(NoV)の遺伝子型について

< NoVの系統分類概略図 >

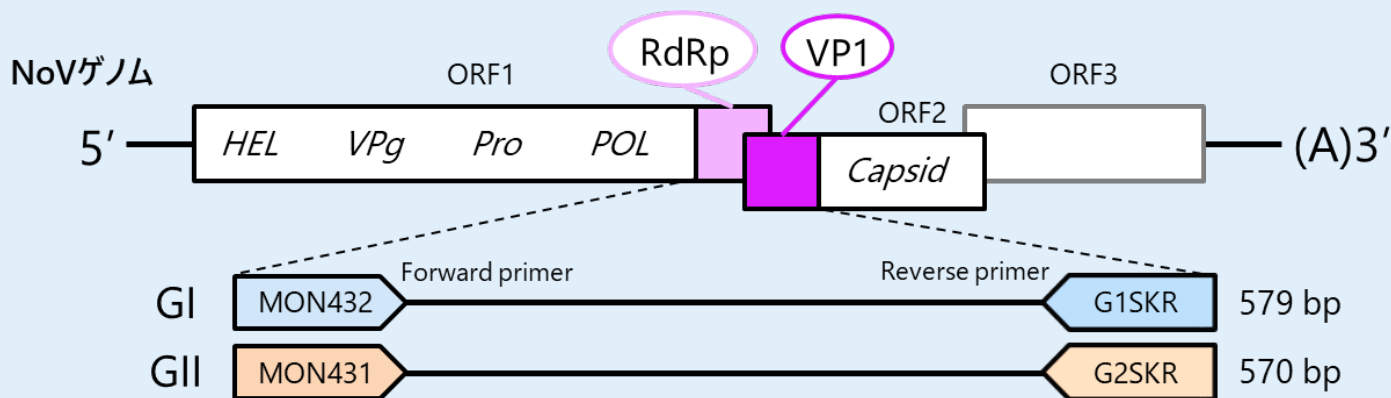


- 検出されるNoVの8割以上がGIIであり、さらに特定の遺伝子型が流行しやすい。
- しかし系統分類上は、NoV・GIIだけで27の遺伝子型が存在する。

2. 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



3. 本研究の目的

- ◆ 本法用のPCR増幅プライマーは、多様なNoVの遺伝子型を網羅するために、塩基配列中にイノシンや縮重塩基を多く含む。
 - ⇒ プライマーの結合度を高めるため、推奨アニール温度が低い（50°C）。
 - ⇒ 標的領域以外にも結合し、非特異的な増幅産物が生じる場合がある。



- 本法用プライマー配列を軽量化*することで、プライマー配列の特異性向上による高温条件でのPCR増幅を実現し、多様な遺伝子型を特異的かつ網羅的に検出可能な反応系へ改良する。

4. 人工合成遺伝子 (DNA) を用いた網羅性確認 - 方法 -

(1) 試薬組成

① 病原体検出マニュアル準拠の反応系 (以下、標準法)

2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	25 µl
KOD -Multi & Epi-®	1 µl
Forward primer (10 µM)* ¹	2.5 µl
Reverse primer (10 µM)* ²	2.5 µl
滅菌水	17 µl
人工合成遺伝子 (鋳型)	2 µl
Total	50 µl

② 当社NoV遺伝子型判別キット*³

(以下、当社既存品)

RT-PCR Mix (NV)	32 µl
Enzyme Mix (NV)	4 µl
GI or GII Primer Mix (NV)	2 µl
滅菌水	10 µl
人工合成遺伝子 (鋳型)	2 µl
Total	50 µl

③ 軽量化プライマーを含む②の改良品

(以下、当社改良品)

RT-PCR Mix (NV)-2	25 µl
Enzyme Mix (NV)	4 µl
GI or GII Primer Mix (NV)-2	2 µl
滅菌水	17 µl
人工合成遺伝子 (鋳型)	2 µl
Total	50 µl

*1 GI: MON432, GII: MON431 *2 GI: G1-SKR, GII: G2-SKR

*3 製品コード GI: RC120A、GII: RC121A

(2) PCR条件

① 標準法

94°C	2分	} 45サイクル
98°C	10秒	
50°C* or 52°C	15秒	
68°C	30秒	

* : 推奨温度

② 当社既存品、③当社改良品

94°C	1分	} 45サイクル
98°C	10秒	
48°C* or 52°C	15秒	
68°C	30秒	

* : ②の推奨温度

※ 鋳型DNAとして、GI.1~9およびGII.1~27、GXI.1 (旧GII.15) の人工合成遺伝子を 5×10^4 コピー/反応となるよう供した。

※ PCR産物の電気泳動には、3%アガロースゲルを使用し、増幅産物を5 µlアプライした。

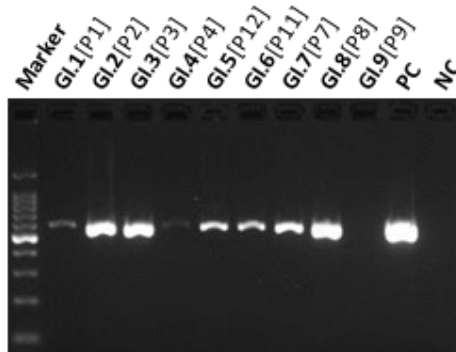
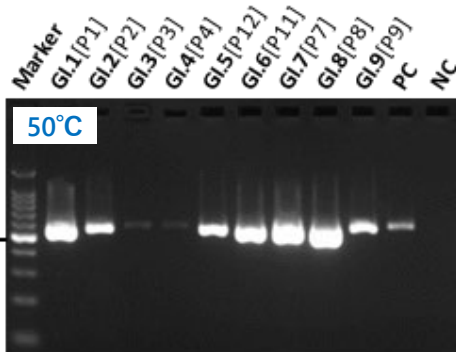
4. 人工合成遺伝子 (DNA) を用いた網羅性確認 - 結果 (GI) -

アニール温度

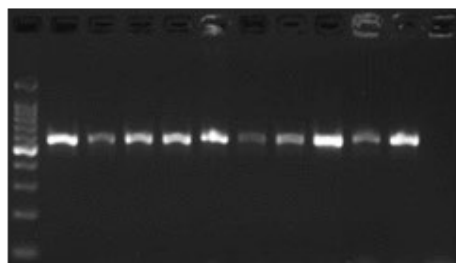
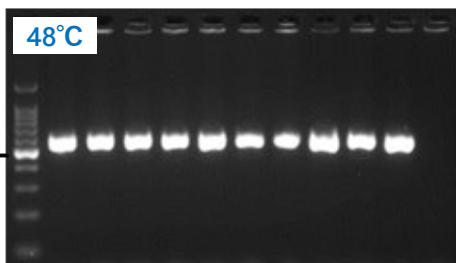
48°C or 50°C

52°C

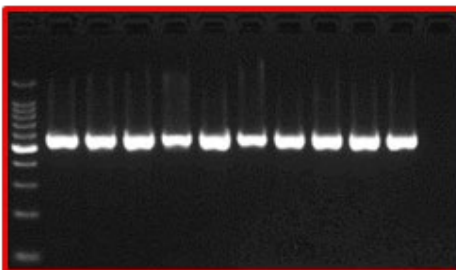
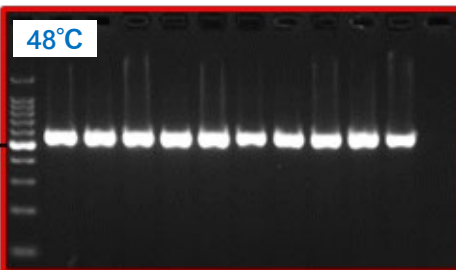
標準法



当社既存品



当社改良品



Marker: 100 bp ladder

GI目的産物鎖長: 579 bp

➤ GI遺伝子型により、増幅産物量に顕著な差が認められた。

➤ 至適なアニール温度の48°Cでは安定した増幅を示したが、高温条件 (52°C) ではバラつきが見られた。

➤ 48°Cはもとより、52°Cのアニール温度でも遺伝子型によらず、一定した増幅産物のバンドが確認された。

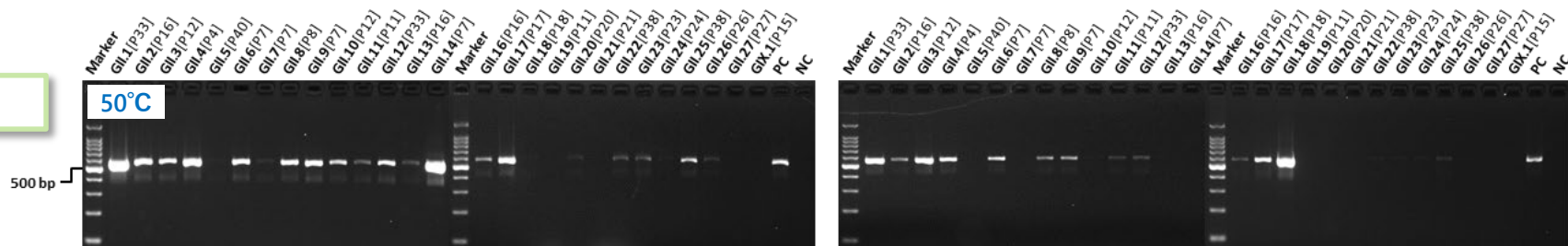
4. 人工合成遺伝子 (DNA) を用いた網羅性確認 - 結果 (GII) -

アニール温度

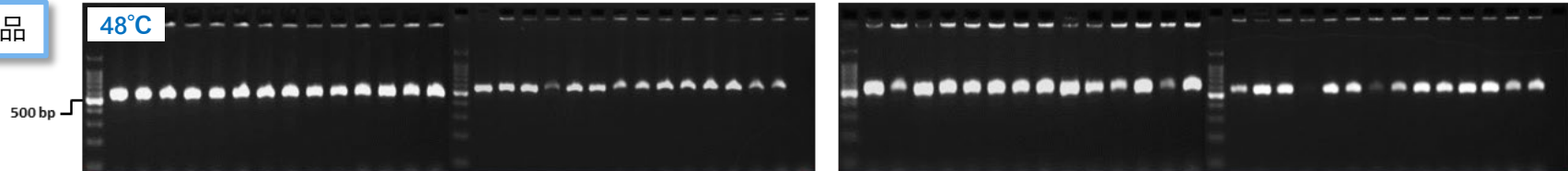
48°C or 50°C

52°C

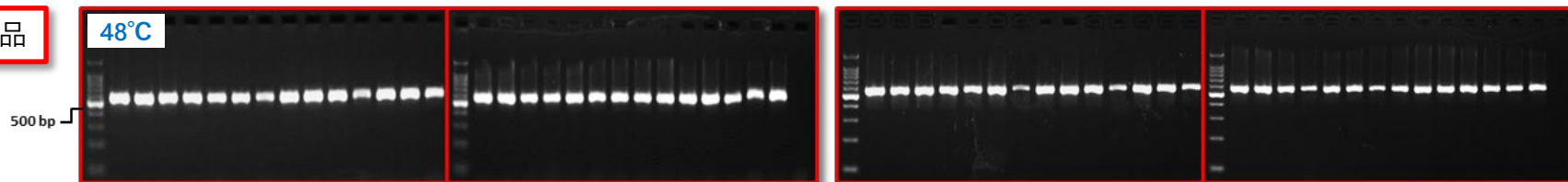
標準法



当社既存品



当社改良品



Marker: 100 bp ladder GII目的産物鎖長: 570 bp

- GIと同様に、軽量化プライマーを採用した改良品においては、遺伝子型によらず、安定した目的産物の増幅が確認された。

5. 実検体由来精製RNAを用いた検出確認 - 方法(1/2) -

(1) 試薬組成

① 標準法

2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	25 µl
KOD -Multi & Epi-®	1 µl
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µL)*1	0.2 µl
Forward primer (10 µM)*2	2.5 µl
Reverse primer (10 µM)*3	2.5 µl
滅菌水	16.8 µl
精製RNA (Template)	2 µl
Total	50 µl

② 当社改良品

RT-PCR Mix (NV)-2	25 µl
Enzyme Mix (NV)	4 µl
GI or GII Primer Mix (NV)-2*4	2 µl
滅菌水	17 µl
精製RNA (Template)	2 µl
Total	50 µl

*1 逆転写酵素を添加し、One step RT-PCR系として使用した。

*2 GI: MON432, GII: MON431

*3 GI: G1-SKR, GII: G2-SKR

*4 軽量化プライマーを含む。

(2) PCR条件

① 標準法

42°C	20分	} 45サイクル
94°C	2分	
98°C	10秒	
50°C	15秒	
68°C	30秒	

② 当社改良品

42°C	20分	} 45サイクル
94°C	1分	
98°C	10秒	
52°C	15秒	
68°C	30秒	

5. 実検体由来精製RNAを用いた検出確認 - 方法(2/2) -

< 鑄型 >

- ◆ 遺伝子型既知の検体（便乳剤）より、高～低コピーの21検体を任意に選定、NucleoSpin® Virus（製品コード U0983B）を用いてRNAを抽出した。

< GI >

- 上記操作により、得られた精製RNAのCt値*1は、19.6 ≦ Ct ≦ 35.3であった。
- 遺伝子型は、GI.2[P2], GI.3[P3], GI.4[P4], GI.6[PNA4], GI.7[P7]の5種を供した。

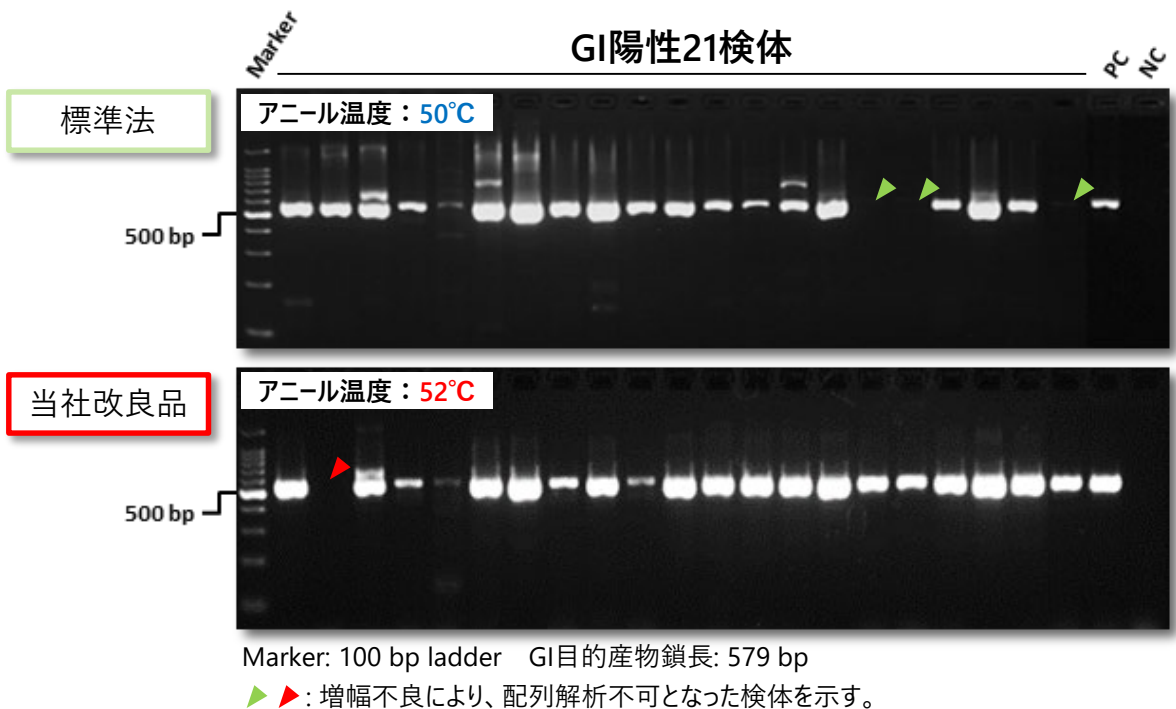
< GII >

- 上記操作により、得られた精製RNAのCt値*1は、19.1 ≦ Ct ≦ 37.7であった。
- 遺伝子型は、GII.2[P16], GII.3[P3], GII.3[P12], GII.3[P29], GII.4[P4], GII.4[P16], GII.4[P31], GII.5[P5], GII.6[P6], GII.6[P7], GII.10[P12], GII.12[PNA7], GII.17[P17]の13種を供した。

*1 Ct値の測定には、TaKaRaノロウイルスGI/GII検出キット（1液タイプ）Ver.2（製品コード RR204A）を使用した。

※ 電気泳動の条件は「3. 人工合成遺伝子（DNA）を用いた網羅性確認」と同様。

5. 実検体由来精製RNAを用いた検出確認 - 結果(GI)-

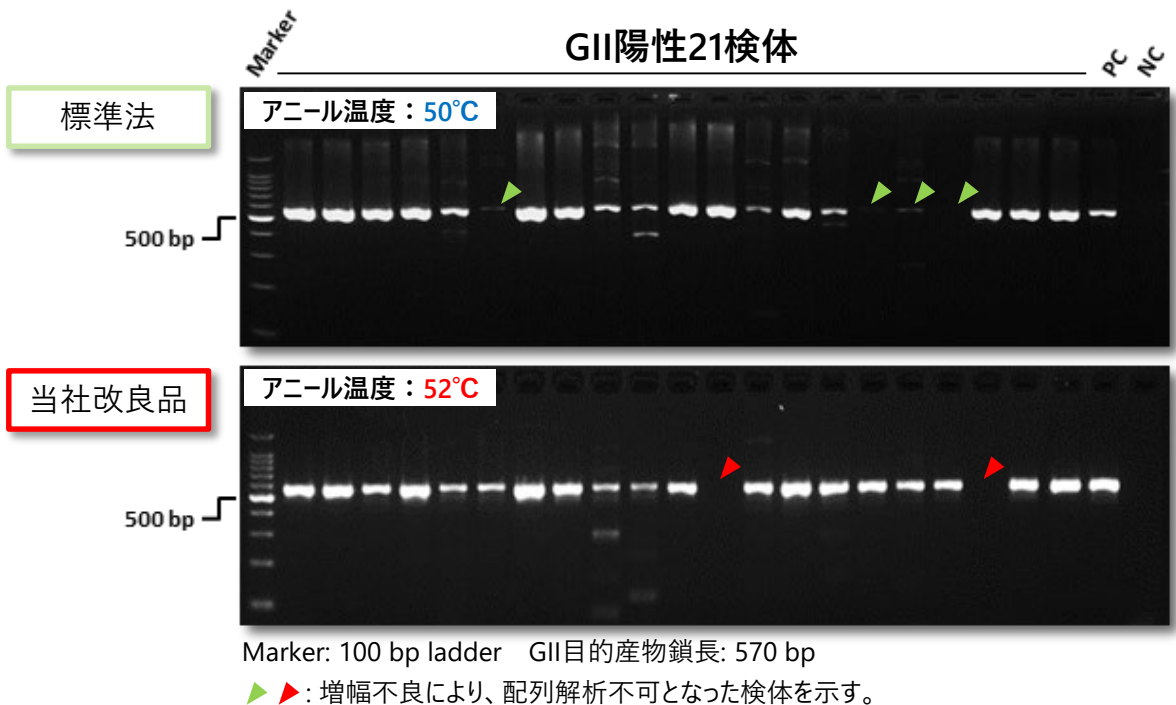


< 増幅産物の配列解析の可否 >

		標準法	
		+	-
当社改良品	+	17	3 ▲▲▲
	-	1 ▲	0

➤ 標準法では21検体中18検体（85.7%）、改良品では21検体中20検体（95.2%）で、増幅産物を用いた配列解析が可能であった。

5. 実検体由来精製RNAを用いた検出確認 - 結果(GII)-



< 増幅産物の配列解析の可否 >

		標準法	
		+	-
+	+	15	4 ▲▲▲▲
	-	2 ▲▲	0

➤ 標準法では21検体中17検体（81.0%）、改良品では21検体中19検体（90.5%）で、増幅産物を用いた配列解析が可能であった。

5. 実検体由来精製RNAを用いた検出確認 - 結果 -

< 使用した精製RNAの遺伝子型およびCt値と検出可否の一覧 >

No.	既知の遺伝子型	Ct値 (精製RNA)	標準法	当社改良品
1	GI.2[P2]	32.0	○	○
2	GI.3[P3]	26.9	○	× ▶
3	GI.3[P3]	30.2	○	○
4	GI.3[P3]	27.8	○	○
5	GI.4[P4]	33.7	○	○
6	GI.4[P4]	28.7	○	○
7	GI.4[P4]	24.8	○	○
8	GI.6[PNA4]	34.3	○	○
9	GI.6[PNA4]	19.6	○	○
10	GI.6[PNA4]	35.3	○	○
11	GI.7[P7]	28.5	○	○
12	GI.7[P7]	32.0	○	○
13	GI.7[P7]	28.1	○	○
14	GI.7[P7]	31.5	○	○
15	GI.7[P7]	25.8	○	○
16	GI.7[P7]	29.1	× ▶	○
17	GI.7[P7]	29.7	× ▶	○
18	GI.7[P7]	33.1	○	○
19	GI.7[P7]	23.4	○	○
20	GI.7[P7]	30.3	○	○
21	GI.7[P7]	33.5	× ▶	○

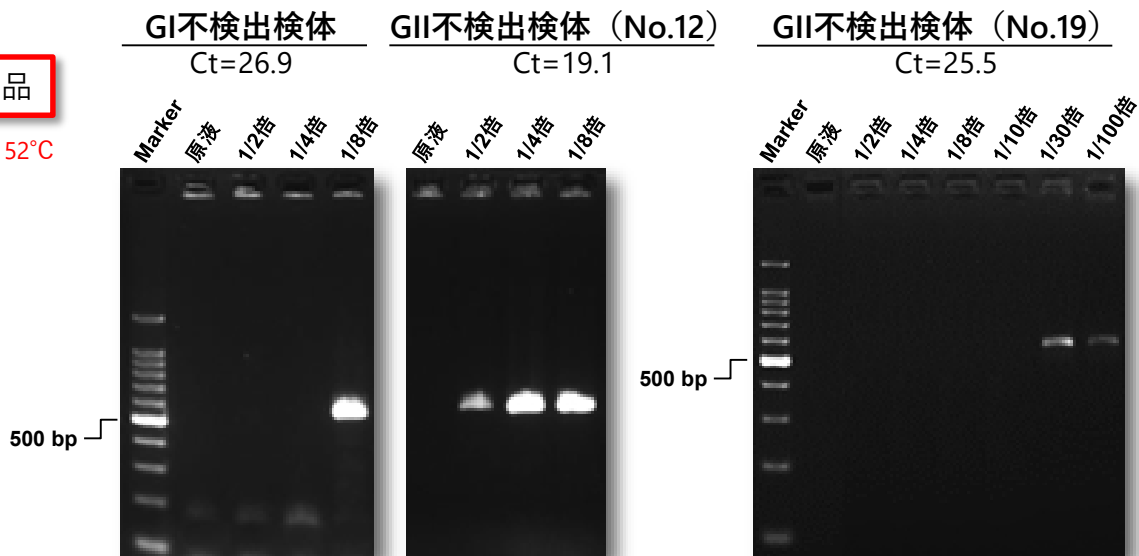
No.	既知の遺伝子型	Ct値 (精製RNA)	標準法	当社改良品
1	GII.2[P16]	29.2	○	○
2	GII.2[P16]	37.7	○	○
3	GII.3[P3]	22.3	○	○
4	(GII.3[P12])	21.8	○	○
5	GII.3[P12]	28.3	○	○
6	GII.3[P29]	27.5	× ▶	○
7	GII.4[P4]	23.6	○	○
8	GII.4[P16]	27.2	○	○
9	GII.4[P16]	26.4	○	○
10	GII.4[P31]	20.5	○	○
11	GII.5[P5]	26.2	○	○
12	GII.6[P6]	19.1	○	× ▶
13	GII.6[P7]	23.7	○	○
14	GII.6[P7]	19.5	○	○
15	GII.6[P7]	24.4	○	○
16	GII.6[P7]	25.1	× ▶	○
17	GII.6	27.4	× ▶	○
18	GII.6	25.7	× ▶	○
19	GII.10[P12]	25.5	○	× ▶
20	GII.12[PNA7]	25.7	○	○
21	GII.17[P17]	24.4	○	○

▶ 当社改良品にて不検出となった検体 (▶) は、いずれもCt < 30であり、また特定の遺伝子型によるものでもなかった。

6. 増幅不良検体の反応性改善検討

当社改良品

アニール温度：52°C



Marker: 100 bp ladder, PCR産物は5 μ lアプライした。 Ct : 各検体の精製RNA原液のCt値

- 当社改良品にて増幅不良となったGI 1検体とGII 2検体について、それぞれの精製RNAを滅菌水により2~100倍まで希釈し、本系に再度供した。
- 8倍までの鋳型希釈により、2検体で目的産物の増幅が認められた。
- 一方で、検体によっては、~100倍程度の鋳型希釈が有効であることも確認された。

7. まとめ

- Dual typing法で用いられるプライマー配列を軽量化し、
特異的かつ網羅的検出にフィットした反応系を構築した。
- GI遺伝子型9種 (P-type 9種) およびGII遺伝子型27種 (P-type 18種) の
現在確認されている遺伝子型全てを安定的に増幅することが出来た。
さらに、アニール温度を52°Cに設定することも可能であった。
- 実検体由来の精製RNAを供した場合にも、90%以上の検出率を示した。
不検出検体は、滅菌水により適宜希釈することで、検出可能となった。

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)



Norovirus (GI/GII) RT-PCR Kit
for genotyping Ver.2



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！

タカラバイオ展示ブースにもお立ち寄りください。