

濃縮材料からのウイルス RNA の抽出・DNase 処理・逆転写反応

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス, A 型肝炎ウイルス等の食品媒介性 RNA ウイルス。

2) 対象食品

原則として, すべての食品・食材。

3) 本プロトコールの範囲

食品・食材等から得られた RNA 抽出用試料を対象として, RNA の抽出から, DNase 処理により混入 DNA を分解し, 逆転写反応により cDNA を合成するまでの工程。

なお, 試験の有効性判定に用いる内部コントロール(厚生労働省通知「ノロウイルスの検出法について」(平成19年5月14日食安監発第0514004号)および「A型肝炎ウイルスの検出法について」(平成21年12月1日食安監発1201第1号)ではエコーウイルス9型(Hill株)を使用)については, 本委員会において検討予定であることから, 本プロトコールでは記述しない。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

サーマルサイ클ラー等, 微量高速遠心分離機(20,000×g 程度), ボルテックスミキサー, マイクロピペットおよびチップ(2 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), 微量遠心管(0.2ml, 0.5ml, 1.5ml)

2) 試薬

High Pure Viral RNA Kit (Roche, 858- 882-001)

TURBO DNA-free Kit (Applied biosystems, AM2238)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied biosystems, 4374966)

(上記は, 本プロトコールにおいて例示として記載した方法で使用するキットである)

3. 操作法

1) RNA 抽出

RNA 抽出用試料液 200 μ l から RNA 抽出キットを用いて RNA 抽出を行う。以下、例示として High Pure Viral RNA Kit (Roche, 858- 882-001) を用いた方法について記載する。操作方法は、キットに添付されている説明書に従う。

A) 使用前に行う各種溶液の調製

下表に従い、各種溶液の調製を行う。

溶液の名称	溶液の再懸濁または調製	保存法および安全性	用途
ポリ(A)キャリア RNA	溶出バッファー(バイアル 5)0.4ml 中にポリ(A)キャリア RNA(バイアル 2)を溶解した後、少量(50 μ l 程度)に小分けする。	-15°C~-25°C	希釈溶液の調製。
	希釈溶液:小分けしていたポリ(A)キャリア RNA 保存液を融解し、必要量の結合バッファー(バイアル 1)に添加した後、よく混合する(結合バッファー5ml に対してポリ(A)キャリア RNA50 μ l の割合)。	常に用時調製する。保存はできない。	ステップ 1
阻害剤除去用バッファー	阻害剤除去用バッファー(バイアル 3a)に無水エタノール 20ml を加え、よく混合する。	15°C~25°Cにて、キットのラベルに表示される期限まで安定。	ステップ 5 の阻害物質の除去。
洗浄バッファー	各洗浄バッファー(バイアル 3)にエタノール 80ml を加え、よく混合する。	15°C~25°Cにて、キットのラベルに表示される期限まで安定。	ステップ 7, 9 の残存する不純物からの除去。

B) 操作法

- ① 1.5ml遠心管にキャリアーRNA 添加結合バッファーを400 μ l入れる。RNA抽出用試料液200 μ l を加え、ボルテックスミキサーで1分程度よく混合した後、スピンドウンする。
- ② High Pure フィルターチューブを回収用チューブに挿入する。試料の全量を、フィルターチューブにピペットで入れる。
- ③ High Pure フィルターチューブを回収用チューブに挿入したまま、微量遠心分離機を用いて、約8000 \times g , 15 秒間、遠心分離する。
- ④ フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てる。フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入する。
- ⑤ 阻害剤除去用バッファー500 μ l を、フィルターチューブに入れる。8000 \times g , 1 分間、遠心分離する。

- ⑥ フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てる。フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入する。
- ⑦ 洗浄バッファー450 μ l を、フィルターチューブに入れる。8000 \times g , 1 分間, 遠心分離する。
- ⑧ フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てる。フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入する。
- ⑨ 洗浄バッファー 450 μ l をフィルターチューブに入れる。8000 \times g , 1 分間, 遠心分離する。フィルターチューブを回収用チューブに挿入したまま遠心分離機内に設置し、最大スピード(約13,000 \times g)で、10 秒間遠心し、洗浄バッファーを完全に除去する。
- ⑩ フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てる。フィルターチューブを、新しいヌクレアーゼフリーの1.5 ml遠心管に挿入する。
- ⑪ 溶出バッファー(Elution Buffer) 50 μ l をフィルターチューブに入れる。フィルターチューブを1.5ml遠心管に挿入したまま、8000 \times g , 1 分間, 遠心分離する。
- ⑫ 1.5 ml 遠心管に回収された溶液を抽出 RNA とする。

2) DNase 処理

抽出 RNA から、DNase を用いて、検体に混入する食品等に由来する DNA を分解する。以下、例示として Turbo DNA Free Kit(Applied biosystems, AM2238)を用いた方法について記載する。操作方法は、キットに添付されている説明書に従う。

- ① 下表に従い試薬等を微量遠心管に分注し、混和する。反応系は20 μ l系から50 μ l系のいずれを用いてもよい。

試薬類	20 μ l 系	30 μ l 系	40 μ l 系	50 μ l 系
抽出 RNA	17	26	35	44
10X Buffer	2	3	4	5
DNase	1	1	1	1

- ② 37 $^{\circ}$ C, 20 分間, 静置する。
- ③ 反応液の1/10 量(20 μ l 系の場合は2 μ l)の DNase Inactivation reagent を加えて混和する。
- ④ 室温で、時々攪拌しながら、2 分間置く。
- ⑤ 10,000 \times g, 1.5 分間, 遠心分離する。

- ⑥ 沈渣を吸わないように注意して、上清を別の新しいヌクレアーゼフリーの微量遠心管に移す。
得られた反応液を DNase 処理 RNA として、逆転写反応に用いる。

3) 逆転写反応

DNase 処理 RNA から、逆転写反応およびランダムプライマー等を用いて cDNA の合成を行う。
以下、例示として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied biosystems, 4374966) を用いた方法について記載する。操作方法は、キットに添付されている説明書に従う。

- ① 下表に従い逆転写反应用の X2 マスターミックスを検体数分調製した後、微量遠心管に分注する。反応系は 20 μ l 系から 80 μ l 系のいずれを用いてもよい。

試薬類	20 μ l	30 μ l	40 μ l	50 μ l	80 μ l
-----	------------	------------	------------	------------	------------

X2 マスターミックス

10 \times RT Buffer	2	3	4	5	8
25 \times dNTP Mix (100 mM)	0.8	1.2	1.6	2	3.2
10 \times RT Random Primers	2	3	4	5	8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1	1.5	2	2.5	4
RNase Inhibitor	1	1.5	2	2.5	4
Nuclease-free DW	3.2	4.8	6.4	8	12.8
計	10	15	20	25	40

DNase 処理 RNA	10	15	20	25	40
--------------	----	----	----	----	----

- ② X2 マスターミックスと等量の DNase 処理 RNA を加え、混和する。
③ サーマルサイクラーに微量遠心管をセットし、25 $^{\circ}$ C-10 分、37 $^{\circ}$ C-1 時間、85 $^{\circ}$ C-15 秒反応後、4 $^{\circ}$ Cで保存する。
④ 得られた反応液を cDNA とする。直ちに、PCR 法、リアルタイム PCR 法に供さない場合は、-30 $^{\circ}$ C以下で凍結保存する。

4. 備考

本プロトコールにおいて、遠心分離における条件は、最大遠心加速度($\times g$)で記載してある。

作成日:平成 22 年 8 月 20 日