

鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス
検出マニュアル
(第2版)

(平成25年6月更新)

国立感染症研究所
インフルエンザウイルス研究センター

目次

1 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出 (参考)	-----	3
2 リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)による鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス の検出方法	-----	4
3 Conventional RT-PCR 法による鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの検出方法	-----	7
4 RT-LAMP 法による鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの検出方法 (参考)	-----	10

第1版からの変更点

- ・RT-LAMP 法による鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの検出方法 (参考) を追記した

1 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出（参考）

1.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット（200、1000 μ l）、100%エタノール、滅菌微量遠心チューブ（1.5ml）、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN Cat#52904）

1.2 RNA 抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行う場合のプロトコールを下記に示した。なお、注意事項、詳細についてはキットに付属のマニュアルを参照すること。

1) 140 μ l の検体またはウイルス培養液をキャリア RNA 添加済みの Buffer AVL 560 μ l と混合し室温で 10 分間インキュベートする。

↓

2) スピンドウンした後、100%エタノール 560 μ l を添加し、15 秒間ボルテックスする。再びスピンドウンして溶液を回収する。

↓

3) 混合液 630 μ l を QIAamp スピンカラムに注入し、キャップを閉めて 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移す。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。この作業をもう一度繰り返す。

↓

4) Buffer AW1 500 μ l を添加し、キャップを閉めて 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。

↓

5) Buffer AW2 500 μ l を添加し、キャップを閉めてフルスピード（20000 \times g、14000rpm）で 3 分間遠心する。

↓

6) カラムを新しいコレクションチューブに移し、フルスピード（20000 \times g、14000rpm）で 1 分間遠心する。

↓

7) カラムを新しい 1.5ml チューブに移し、Buffer AVE 60 μ l を添加する。キャップを閉めて室温で 1 分間インキュベートした後、6000 \times g（8000rpm）で 1 分間遠心する。

抽出した RNA は速やかに遺伝子検査に使用し、保存する場合はできるだけ-70°C以下で保存する。

2 リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)による鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの検出方法

2.1 機材および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (10、20、200、1000 μ l)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※1}、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well リアルタイム PCR 反応プレート等、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、リアルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プローブ、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN Cat#204443)、RNase Inhibitor 20Units/ μ l(100 μ L) (ABI Cat#N808-0119)

※1 RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

2.2 リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブについて (A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

MP-39-67For	5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
MP-183-153Rev	5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
MP-96-75ProbeAs	5'-(FAM)ATYTTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ：146bp

(H7 亜型同定用)

H7 HA 遺伝子 (ユーラシア系統) 検出用プライマーおよびプローブ：

NIID-H7 TMPrimer-F1	5'-TGTGATGAYGAYTGYATGGCCAG
NIID-H7 TMPrimer-R1	5'-ACATGATGCCCCGAAGCTAAAC
NIID-H7 Probe1	5'-(FAM)ATCTGTATTCTATTTTGCATTGCYTC(MGB)

PCR 産物の長さ：156bp

2.3 リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)反応

QIAGEN 社の QuantiTect® Probe RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量	最終濃度
2× QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5 µl	1×
Forward primer (10 µM)	1.5 µl	0.6 µM
Reverse primer (10 µM)	1.5 µl	0.6 µM
Probe (5 µM)	0.5 µl	0.1 µM
QuantiTect RT Mix	0.25 µl	
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0.1 µl	
RNase free Water	3.65 µl	
RNA template	5.0 µl	
Total 容量	25 µl	

<反応条件>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認をしておく必要がある。以下に、試薬に QIAGEN 社 QuantiTect® Probe RT-PCR Kit、リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムもしくは Roche Diagnostics 社 LightCycler 480 II を使用する場合の反応条件を示した。

Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合

(Standard モードで使用)

50°C	30min.	
	↓	
95°C	15min.	
	↓	
94°C	15sec.	} ×45 cycles
56°C	75sec.(Data Collection)	

LightCycler 480 II を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	30min.	4.4	None
Denature	None	1	95	15min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	94	15sec.	1.5	None
			56	75sec.	1	Single
Cooling	None		40	30sec.	4.4	None

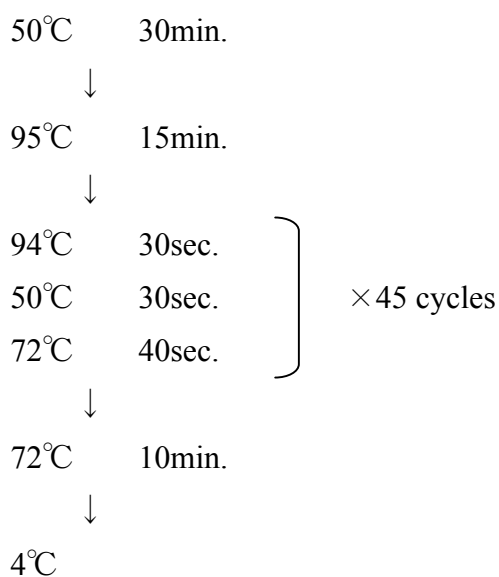
3.3 One Step RT-PCR 反応

QIAGEN 社の OneStep RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量
RNase free Water	9.5 μ l
5 \times QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 μ l
dNTP混合液 (containing 10mM of each dNTP)	1.0 μ l
Forward primer (10 μ M)	1.5 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1.5 μ l
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U/ μ l)	1.0 μ l
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	0.5 μ l
RNA template	5.0 μ l
Total 容量	25 μ l/test

<反応条件>

使用するサーマルサイクラー、試薬、反応容器等によって最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認を行っておく必要がある。以下は、試薬に QIAGEN 社 OneStep RT-PCR kit、サーマルサイクラーに ABI 社 GeneAmp® PCR System 9700 を使用する場合の反応条件である。



3.4 PCR産物のアガロースゲル電気泳動による確認

電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、電気泳動用アガロース（1.5～2.0%で使用）、分子量マーカー（100 bp DNA ladder, Promega 社 Cat#2101）、エチジウムブロマイド、1×TAE 電気泳動バッファー（50×TAE ニッポンジーン社 Cat#313-90035 を希釈して使用）、6×Gel loading dye（Promega 社 Cat#G1881）。

One Step RT-PCR にて増幅後、6×Gel loading dye 2 μ l と PCR 増幅液 10 μ l をよく混合（ピペティング）し、1.5%から 2.0%に調製したアガロース（以下、「ゲル」とする。）のウェルに混合液を 10 μ l 入れる。他のウェルに分子量マーカーを入れる。

↓

電気泳動装置で 100V、30～40 分間、-から+へ電気泳動する。

↓

泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色液に入れ、15～30 分間染色する。染色後、ゲルを 5～10 分間水洗し、UV 照射装置にセットし、UV を照射して写真撮影する。

4 RT-LAMP 法による鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの検出方法 (参考)

RT-LAMP 法は同一反応チューブ内において逆転写反応(Reverse transcription:RT)から Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) を等温反応で行う核酸増幅法であり、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの濁度測定、もしくは紫外線照射により発生する蛍光の目視観察により、増幅した核酸を検出することができる。

今回のプライマーは 2013 年 3 月に中国で人への感染例が報告された鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスに特化設計したものであり、H7 亜型のインフルエンザウイルスを広範に検出できるものではない。RT-LAMP 法に限らず、検査で陰性となった場合は、ただ単に目的物(今回はウイルス RNA)が検出されなかったに過ぎず(検出限界以下)、必ずしもウイルス感染を否定するものではない事に留意する必要がある。また、検出方法によって検出感度や特異性に違いがある事を考慮して結果を判断する必要がある。

4.1 機材および試薬

滅菌微量遠心チューブ (0.5 又は 1.5mL)、マイクロピペット、フィルター付きチップ、Loopamp 反応チューブ、反応チューブ用アルミ製ラック、アイスボックス、マイクロ遠心機、8 連マイクロチューブ用簡易遠心機、ボルテックスミキサー、Loopamp リアルタイム濁度測定装置または又はインキュベーター(温度精度が±0.5°C 以内:ホットボンネット付)、RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP) (栄研化学(株) Code No. LMP244、245、246)、UV 照射装置(波長 240~260nm, 350~370nm)、Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学(株) Code No. LMP221)、ヒートブロック(反応停止用)

4.2 プライマーについて

(鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス亜型同定用)

AH7N9-F3	TTCCTGAGATTCCAAA
AH7N9-B3	GGTTGGTTTTTCTATAAGCCG
AH7N9-Loop-F	CCCATCCATTTTCAATGAAAC
AH7N9-Loop-B	ACTGCTGCAGATTACAAAAG
AH7N9-FIP*	ACCAACCATCAATTAGGCCTTCTATTTGGTGCTATAGCGG
AH7N9-BIP*	GGTTTCAGACACCAGAATGCACACCTGTTATTTGATCAATTGCCG

*少なくとも FIP、BIP は HPLC 精製グレードによる合成を推奨する。

4.3 RT-LAMP 反応

栄研化学(株)の RNA 増幅試薬キットを用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量
2×Reaction Mix. (RM)	12.5 µl
10×Primer Mix ^{*2}	2.5 µl
Enzyme Mix. (EM)	1.0 µl
Distilled Water	4.0 µl
RNA template	5.0 µl
Total 容量	25.0 µl^{*1}

^{*1} 蛍光目視検出の場合は、Loopamp 蛍光・目視検出試薬を 1 µl 添加し、トータル 25 µl とする。

^{*2} 10×Primer Mix (調合後は冷凍保存)	容量
AH7N9-FIP(100 µM)	0.4 µl
AH7N9-BIP(100 µM)	0.4 µl
AH7N9-Loop-F (100µM)	0.2 µl
AH7N9-Loop-B(100µM)	0.2 µl
AH7N9-B3(100µM)	0.05 µl
AH7N9-F3(100µM)	0.05 µl
Distilled Water	1.2 µl
Total 容量	2.5 µl

<反応条件>

Loopamp リアルタイム濁度測定装置又はインキュベーター(ホットボンネット付き)で 62.5°C で 35 分間反応させ、80°C で 5 分間又は 95°C で 2 分間のインキュベートにより酵素を失活させて反応を停止させる。なお、Loopamp リアルタイム濁度測定装置を利用する場合は、Avian Flu H7 用のプログラムを選択する。(LA-200 を使用する場合は閾値 0.1 に設定する)。