

## 「THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit」を用いたRNAウイルスの検出事例

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 塩江 那佳

### はじめに

近年、RNAウイルスの検出法として、迅速で検出感度や特異性に優れるワンステップqRT-PCR法が広く用いられるようになりました。一方、本方法で検体中の微量なウイルスを高感度で検出するためには、プライマー・プローブおよび反応条件を高度に最適化する必要がありました。

「THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit」は2酵素系によるワンステップリアルタイムPCR用キットです。ターゲットの配列の影響を受けにくく、RNAを高感度に検出することができるという特長を有しています。

今回は本キットを用いてウイルスRNAを論文のプライマー・プローブ条件をそのまま用いて検出を行った例、および臨床検体から抽出したRNAサンプルを用いて異なる2種類のプローブによって検出およびタイピングを行った例をご紹介します。



### 方法

#### (1) さまざまなウイルスRNAの検出【使用機器：Applied Biosystems® StepOnePlus™】

下記の11種類（RSウイルスは2種類の亜型）のウイルスRNAについて、本キットと2社のワンステップキットを用い、TaqMan® probe法にて検出感度の比較を行いました。プライマー・TaqMan® probeは論文記載のものをそのまま使用しました。C型肝炎ウイルスのRNAは合成RNAを、C型肝炎ウイルス以外のウイルスRNAは、RNAコントロール（VIRCELL社）を、それぞれRNase free waterで段階希釈して用いました。

麻疹ウイルス\*1、ムンプスウイルス\*2、黄熱ウイルス\*3、エンテロウイルス\*4、ライノウイルス\*5、RSウイルスA型、RSウイルスB型\*6、チクングニアウイルス\*7、ウェストナイルウイルス\*8、C型肝炎ウイルス\*9、デングウイルス\*10

#### (2) 咽頭ぬぐい液中のRSウイルスA型・B型の同時検出【使用機器：Roche Diagnostics社 LightCycler® 96】

20検体の咽頭ぬぐい液から抽出したRNAについて本キットを用いてRSウイルスA型・B型の同時検出（qRT-PCR法）を行い、RT-PCR法、抗体検査法と比較しました。qRT-PCR法では、RSウイルスのA型とB型を判別できるよう、それぞれに特異的なプライマーと異なる色素で標識したTaqMan® probeを用いました。

##### 【反応液組成】

RNase free water	1.2 μl
2×Reaction Buffer	10 μl
DNA Polymerase	0.5 μl
RT Enzyme Mix	0.5 μl
10 μM Forward Primer	1 μl
10 μM Reverse Primer	1 μl
10 μM TaqMan® probe	0.4 μl
50×ROX Reference dye	0.4 μl
RNA溶液 (1) 及び (2)	5 μl
Total Volume	20 μl

##### 【PCRサイクル】

逆転写反応	50°C, 10min.
	↓
初期変性	95°C, 1min.
	↓
PCR変性	95°C, 15sec.
伸長（アニーリング）*	60°C, 45sec. (45cycles)

\*Data collectionは伸長ステップに設定しました。

※他社の試薬では、取扱説明書推奨の条件にて反応を行いました。なお、リアルタイムPCRの機種により最適ROX量が変わる可能性があります。取扱説明書をご参照ください。

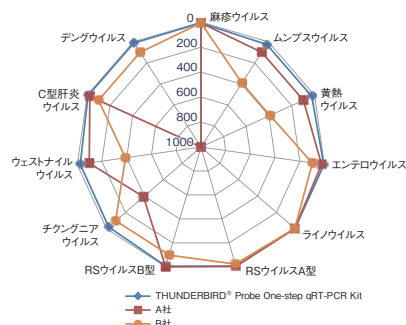
### 結果および考察

#### (1) さまざまなウイルスRNAの検出

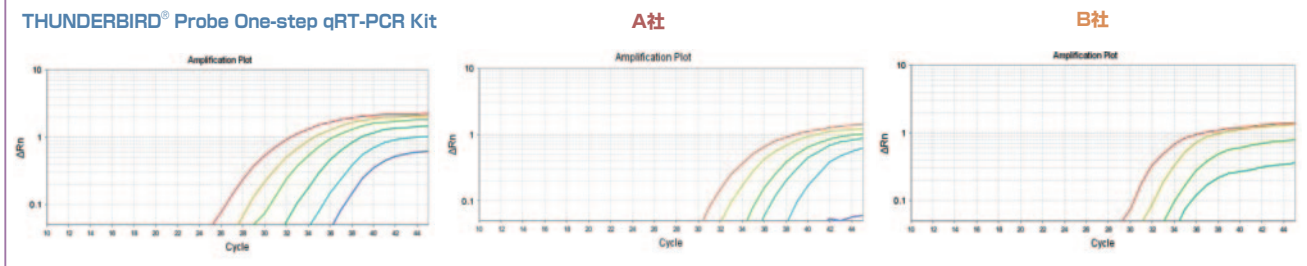
11種類のウイルスRNAの希釈系列を作製し、2社のqRT-PCRキットとの最小検出感度を比較しました。グラフは検出された最も低いコピー数を各試薬ごとにプロットしています。

実験の結果、本キットでは全てのターゲットを30コピー以下の感度で検出・定量することができました。一方、A社やB社のキットではターゲットの配列により検出感度にばらつきがみられました。

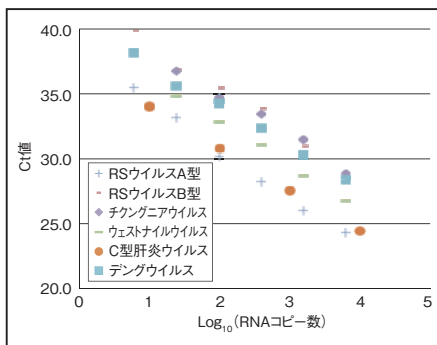
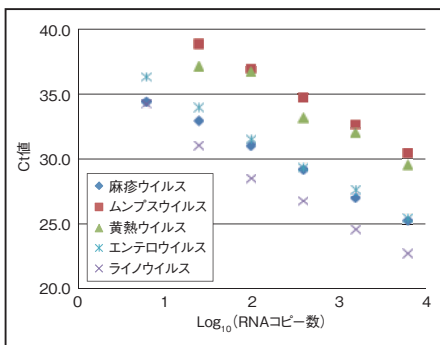
このように、本キットではターゲットの配列に左右されずRNAを高感度に検出することがわかりました。また、測定したほとんどのターゲットで良好なPCR効率と相関性を示し、優れた定量性が示されました。



【エンテロウイルスRNA検出時の増幅曲線】



【THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitでの検出時のPCR効率及びR<sup>2</sup>値】



ウイルスの種類	PCR効率	R <sup>2</sup> 値
麻疹ウイルス	98.6%	0.998
ムンプスウイルス	96.9%	0.999
黄熱ウイルス	90.8%	0.998
エンテロウイルス	90.1%	0.997
ライノウイルス	85.0%	0.988
RSウイルスA型	85.0%	0.993
RSウイルスB型	89.6%	0.988
チクングニアウイルス	107.0%	0.987
ウエストナイルウイルス	98.7%	0.998
C型肝炎ウイルス	103.0%	0.999
デングウイルス	107.0%	0.995

(2) 咽頭ぬぐい液中のRSウイルスA型・B型の同時検出

本キットでの解析の結果、抗体検査法で偽陰性と判定された検体(5、6、14、18、19、20)についても、RT-PCR法での定性試験と高い相関で感染の有無を確認でき、型判別の結果も完全に一致していました。

検体番号	抗体検査法	RT-PCR (定性・型判別)	qRT-PCR解析での定量値(コピー数)		検体番号	抗体検査法	RT-PCR (定性・型判別)	qRT-PCR解析での定量値(コピー数)		検体番号	抗体検査法	RT-PCR (定性・型判別)	qRT-PCR解析での定量値(コピー数)	
			A型検出	B型検出				A型検出	B型検出				A型検出	B型検出
1	+	+(A)	1.6×10 <sup>5</sup>	—	8	—	—	—	—	15	+	+(A)	3.9×10 <sup>3</sup>	—
2	—	—	—	—	9	+	+(A)	1.5×10 <sup>5</sup>	—	16	+	+(A)	2.4×10 <sup>5</sup>	—
3	+	+(A)	8.1×10 <sup>4</sup>	—	10	+	+(A)	6.7×10 <sup>5</sup>	—	17	—	—	—	—
4	+	+(A)	2.7×10 <sup>5</sup>	—	11	—	—	—	—	18	—	+(A)	4.2×10 <sup>4</sup>	—
5	—	+(A)	9.6×10 <sup>2</sup>	—	12	+	+(A)	1.6×10 <sup>5</sup>	—	19	—	+(A)	3.4×10 <sup>2</sup>	—
6	—	+(A)	3.6×10 <sup>3</sup>	—	13	+	+(A)	9.4×10 <sup>3</sup>	—	20	—	+(B)	—	9.6×10 <sup>3</sup>
7	+	+(A)	2.3×10 <sup>6</sup>	—	14	—	+(A)	9.5×10 <sup>3</sup>	—					

まとめ

今回の検討から、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitはターゲットの配列による影響を受けにくく、論文に掲載されたプライマー・プローブ配列をそのまま用いてもさまざまなRNAを検出することが可能であることがわかりました。また、臨床サンプルを用いる実験においても他法と高い相関を示しました。

また本キットは2×Reaction Buffer中にdUTPを含み、Uracil-N-Glycosylase (UNG) を添加することでキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することができます。また、上記実験でマルチプレックス系も可能なため、臨床検体の検出に適していると思われます。

是非一度、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitをお試しください。

文献

1. 高尾信一 他、広島県獣医学会雑誌 No.27 (2012)
2. J. D. Boddicker *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, Sept.**45** (9) : 2902-2908 (2007)
3. C. Drosten *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, July.**40** (7) : 2323-2330 (2002)
4. E. Haramoto *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, May **71** (5) : 2403-2411 (2005)
5. Duc H. Do *et al.*, *J. Mol. Diagn.*, Jan. **12** (1) : 102-108 (2010)
6. A. Hu *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, Jan. **41** (1) : 149-154 (2003)
7. B. Pastorino *et al.*, *J. Virol. Methods*, **124** (1-2) : 65-71 (2005)
8. 国立感染症研究所 ウェストナイルウイルス病原体 検査マニュアル (第4版)
9. H. Okamoto *et al.*, *Jpn. J. Exp. Med.*, Aug.**60** (4) : 215-222 (1990)
10. B. W. Johnson *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, Oct.**43** (10) : 4977-4983 (2005)

※TaqMan®, LightCycler®は、Roche Diagnostics K.K.の登録商標です。

※Applied Biosystems®, StepOnePlus™は、Thermo Fisher Scientific K.K.の登録商標または商標です。