



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114080456 A

(43) 申请公布日 2022.02.22

(21) 申请号 202080049541.7

(22) 申请日 2020.07.08

(30) 优先权数据

2019-133045 2019.07.18 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.01.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/026646 2020.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/010239 JA 2021.01.21

(71) 申请人 株式会社岛津制作所

地址 日本京都府

(72) 发明人 小林慎一郎 四方正光 高冈直子

二宫健二

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

*C12Q 1/70* (2006.01)

*C12Q 1/686* (2018.01)

*C12N 15/10* (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

RNA病毒检测方法

(57) 摘要

本发明涉及通过逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction、RT-PCR)来检测RNA病毒的方法、及用于执行该方法的试剂盒。更具体而言,涉及:通过在氢氧化物的存在下将待检体与表面活性剂混合,进而添加RT-PCR反应液,由此检测RNA病毒的方法;以及,用于执行该方法的试剂盒。

1. 一种检测待检体中的RNA病毒的方法,其包括如下工序:
  - (1) 将待检体悬浮于蒸馏水、生理盐水或缓冲液的工序;
  - (2) 提取工序(1)中生成的悬浮液的离心上清液的工序;
  - (3) 将工序(2)中提取出的离心上清液与包含1种以上的表面活性剂的待检体处理液混合的工序;
  - (4) 将工序(3)中得到的混合液与包含逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应液混合,进行RT-PCR的工序;及
  - (5) 对所述RT-PCR产物进行检测的工序。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述RNA病毒选自由诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒和登革病毒组成的组。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述RNA病毒为诺如病毒。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述诺如病毒基因型为基因组I (GI) 或基因组II (GII)。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,所述待检体源自选自由生物试样、生物来源试样、环境试样和环境来源试样组成的组中的试样。
6. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,所述待检体源自选自由排泄物试样、排泄物来源试样、呕吐物和呕吐物来源试样组成的组中的试样。
7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,所述表面活性剂为阴离子表面活性剂。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述阴离子表面活性剂为选自由烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、多库酯、磺酸盐含氟表面活性剂、烷基苯磺酸盐、烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、烷基羧酸盐、月桂酰肌氨酸钠、羧酸盐含氟表面活性剂、胆酸钠和脱氧胆酸钠组成的组中的1种以上的阴离子表面活性剂。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述阴离子表面活性剂为烷基硫酸盐。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述烷基硫酸盐为十二烷基硫酸钠或十二烷基硫酸铵。
11. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法,其中,所述表面活性剂的浓度为0.02~0.5% (w/v)。
12. 根据权利要求1~11中任一项所述的方法,其中,所述待检体处理液包含氢氧化物。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述氢氧化物为氢氧化钠或氢氧化钾。
14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中,所述氢氧化物的浓度为10~100mM。
15. 根据权利要求1~14中任一项所述的方法,其中,所述工序(3)中的待检体与待检体处理液的混合比以体积比计为1:3~6。
16. 根据权利要求1~15中任一项所述的方法,其中,所述逆转录酶选自由AMV逆转录酶、MMLV逆转录酶、HIV逆转录酶和它们的突变体组成的组。
17. 根据权利要求1~16中任一项所述的方法,其中,所述DNA聚合酶选自由Taq DNA聚合酶、Tth DNA聚合酶、KOD DNA聚合酶、Pfu DNA聚合酶和它们的突变体组成的组。
18. 根据权利要求1~17中任一项所述的方法,其中,所述工序(5)通过实时测定而进行。

19. 根据权利要求1~18中任一项所述的方法,其中,所述工序(3)在1~60℃的温度下进行。

20. 根据权利要求1~19中任一项所述的方法,其中,所述工序(3)~(5)在同一容器内进行。

21. 根据权利要求1~20中任一项所述的方法,其中,所述工序(5)中,使用荧光滤光片测定RT-PCR产物的扩增曲线,判定待检体中RNA病毒的存在为阳性或为阴性。

22. 一种RNA病毒的检测试剂盒,其包含:含有1种以上的表面活性剂的待检体处理液、以及含有逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应液。

23. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中,所述RNA病毒选自由诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒和登革病毒组成的组。

24. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中,所述RNA病毒为诺如病毒。

25. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中,判断诺如病毒基因型为基因组I (GI)、或为基因组II (GII)。

26. 根据权利要求22~25中任一项所述的试剂盒,其中,所述表面活性剂为阴离子表面活性剂。

27. 根据权利要求26所述的试剂盒,其中,所述阴离子表面活性剂为选自由烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、多库酯、磺酸盐含氟表面活性剂、烷基苯磺酸盐、烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、烷基羧酸盐、月桂酰肌氨酸钠、羧酸盐含氟表面活性剂、胆酸钠和脱氧胆酸钠组成的组中的1种以上的阴离子表面活性剂。

28. 根据权利要求26所述的试剂盒,其中,所述阴离子表面活性剂为烷基硫酸盐。

29. 根据权利要求28所述的试剂盒,其中,所述烷基硫酸盐为十二烷基硫酸钠或十二烷基硫酸铵。

30. 根据权利要求22~29中任一项所述的试剂盒,其还包含试剂盒的操作步骤说明书。

## RNA病毒检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及通过逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction、RT-PCR)来检测RNA病毒的方法、及用于执行该方法的试剂盒。更具体而言,涉及:通过在氢氧化物的存在下将待检体与表面活性剂混合,进而添加RT-PCR反应液,由此检测RNA病毒的方法;以及,用于执行该方法的试剂盒。

### 背景技术

[0002] RNA病毒是具有RNA作为基因组的病毒,分为具有由脂双层构成的膜即包膜的冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒、登革病毒等;以及不具有包膜的诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒等,有很多具有致病性。

[0003] 诺如病毒是属于人杯状病毒科的病毒,在基因组中具有约7000个碱基的单链RNA。根据电子显微镜所观察到的形态学分类,该病毒也被称为小圆形病毒(Small Round Structured Virus,SRSV),而且是被称为诺瓦克样病毒(Norwalk-like virus)这一属名的病毒。属于诺如病毒的病毒被分为基因组(Genogroup) I (GI) 和基因组II (GII) 这2种基因组,进而分别被分为14个和17个、或更多的基因型(genotype)。

[0004] 若人感染诺如病毒,则出现呕吐、腹泻等急性肠胃炎症状。日本每年大约有一半的食物中毒患者是由诺如病毒引起的,其中约70%发生在11月~2月,已知诺如病毒是冬季型的肠胃炎和食物中毒的致病病毒。由诺如病毒所致的食物中毒主要是由于厨师污染食品而造成的。诺如病毒的传染性强、容易引发大规模的食物中毒等疫情。向人类的传播途径主要是经口感染。作为典型的感染源,可列举出感染者的粪便或呕吐物及被这些直接或间接污染的物品类、以及被诺如病毒污染的牡蛎或其它双壳贝类等食品类。因此,确定诺如病毒感染患者、被该病毒污染的污染物对于防止病毒感染的扩大尤为重要。

[0005] 作为用于检测由病毒所致的感染、污染的病毒检测,可使用检测病毒抗原的免疫学测定法、病毒基因扩增法(专利文献1~3、非专利文献1)。作为高灵敏度地测定诺如病毒的手段,可列举出利用RT-PCR扩增诺如病毒的RNA并测定扩增产物量的方法。例如,依据日本厚生劳动省医药食品局食品安全部监视安全课的通知(非专利文献2和3),广泛进行了利用RT-PCR法的诺如病毒的检测及利用实时PCR法的诺如病毒的定量检测。

[0006] RNA病毒粒子具有如下基本结构:由RNA基因组和蛋白质构成的核心被包封在被称为衣壳的蛋白质壳内。因此,为了利用基因扩增法检测病毒RNA,需要从病毒粒子中提取RNA。为了检测作为待检体的粪便中的诺如病毒,例如,以5~10% (w/v) 的浓度将粪便待检体悬浮于蒸馏水或生理盐水,从其离心上清液中,使用市售的病毒RNA提取试剂盒(例如,QIAamp(注册商标)Viral RNA Mini、QIAGEN公司)提取RNA并进行纯化(非专利文献2)。然而,在进行多个阶段的RNA的提取、纯化操作之后进行RT-PCR的检测过程是繁杂的。因此,提出了如下简单的检测法:将粪便悬浮液与待检体处理液混合,并进行短时间热处理从而去除壳蛋白,使内部的RNA游离,将游离的RNA直接供于RT-PCR(非专利文献4)。另一方面,为了对粪便悬浮液与待检体处理液的混合物进行热处理,需要用盖子将反应容器密闭以防止该

混合物的暴沸、蒸发且在热处理后去掉盖子并添加RT-PCR反应液的操作。为了改善这一点，提出了如下方法：将待检体与胍盐等离液剂混合，从而在不进行热处理的情况下利用RT-PCR来检测病毒(专利文献4)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:W02002/029119

[0010] 专利文献2:W02002/029120

[0011] 专利文献3:日本特开2004-301684

[0012] 专利文献4:日本特开2017-209036

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:Kageyama T, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol. 2003 Apr; 41 (4): 1548-57.

[0015] 非专利文献2:日本厚生劳动省医药食品局食品全部监视安全课食安监发第1105001号(平成15年11月5日)附件“ノロウイルスの検出法について(关于诺如病毒的检测法)”、最后修订:食安监发0514004号(平成19年5月14日)

[0016] 非专利文献3:日本厚生劳动省医药食品局食品全部监视安全课食安监发第1105001号(平成15年11月5日)附件“ノロウイルスの検出法について(关于诺如病毒的检测法)”、最后修订:食安监发1022第1号(平成25年10月22日)

[0017] 非专利文献4:Nishimura N, et al. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. J Virol Methods. 2010 Feb; 163 (2): 282-286.

## 发明内容

[0018] 发明要解决的问题

[0019] 本发明的目的在于提供简便的RNA病毒的检测方法。具体而言，提供如下方法：使用1种以上的表面活性剂，在不进行热处理的情况下由诺如病毒等RNA病毒粒子提取RNA，接下来利用游离的RNA的RT-PCR反应简便地进行病毒检测操作。另外提供如下检测方法：在同一容器内且在不开关容器的盖子的情况下从RNA病毒粒子中提取RNA和进行RT-PCR，从而更简便地检测RNA病毒的检测方法。

[0020] 用于解决问题的方案

[0021] 本发明的目的通过以下的发明而实现。

[0022] (1)

[0023] 一种检测待检体中的RNA病毒的方法，其包括如下工序：

[0024] (1) 将待检体悬浮于蒸馏水、生理盐水或缓冲液的工序；

[0025] (2) 提取工序(1)中生成的悬浮液的离心上清液的工序；

[0026] (3) 将工序(2)中提取出的离心上清液与包含1种以上的表面活性剂的待检体处理液混合的工序；

[0027] (4) 将工序(3)中得到的混合液与包含逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应

液混合,进行RT-PCR的工序;及

[0028] (5)对前述RT-PCR产物进行检测的工序。

[0029] (2)

[0030] 根据(1)所述的方法,其中,前述RNA病毒选自由诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒和登革病毒组成的组。

[0031] (3)

[0032] 根据(1)所述的方法,其中,前述RNA病毒为诺如病毒。

[0033] (4)

[0034] 根据(3)所述的方法,其中,前述诺如病毒基因型为基因组I(GI)或基因组II(GII)。

[0035] (5)

[0036] 根据(1)~(4)中任一项所述的方法,其中,前述待检体源自选自由生物试样、生物来源试样、环境试样和环境来源试样组成的组中的试样。

[0037] (6)

[0038] 根据(1)~(4)中任一项所述的方法,其中,前述待检体源自选自由排泄物试样、排泄物来源试样、呕吐物和呕吐物来源试样组成的组中的试样。

[0039] (7)

[0040] 根据(1)~(6)中任一项所述的方法,其中,前述表面活性剂为阴离子表面活性剂。

[0041] (8)

[0042] 根据(7)所述的方法,其中,前述阴离子表面活性剂为选自由烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、多库酯(docusate)、磺酸盐含氟表面活性剂、烷基苯磺酸盐、烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、烷基羧酸盐、月桂酰肌氨酸钠、羧酸盐含氟表面活性剂、胆酸钠和脱氧胆酸钠组成的组中的1种以上的阴离子表面活性剂。

[0043] (9)

[0044] 根据(7)所述的方法,其中,前述阴离子表面活性剂为烷基硫酸盐。

[0045] (10)

[0046] 根据(9)所述的方法,其中,前述烷基硫酸盐为十二烷基硫酸钠或十二烷基硫酸铵。

[0047] (11)

[0048] 根据(1)~(10)中任一项所述的方法,其中,前述表面活性剂的浓度为0.02~0.5%(w/v)。

[0049] (12)

[0050] 根据(1)~(11)中任一项所述的方法,其中,前述待检体处理液包含氢氧化物。

[0051] (13)

[0052] 根据(12)所述的方法,其中,前述氢氧化物为氢氧化钠或氢氧化钾。

[0053] (14)

[0054] 根据(12)或(13)所述的方法,其中,前述氢氧化物的浓度为10~100mM。

[0055] (15)

[0056] 根据(1)~(14)中任一项所述的方法,其中,前述工序(3)中的离心上清液与待检

体处理液的混合比以体积比计为1:3~6。

[0057] (16)

[0058] 根据(1)~(15)中任一项所述的方法,其中,前述逆转录酶选自由AMV逆转录酶、MMLV逆转录酶、HIV逆转录酶和它们的突变体组成的组。

[0059] (17)

[0060] 根据(1)~(16)中任一项所述的方法,其中,前述DNA聚合酶选自由Taq DNA聚合酶、Tth DNA聚合酶、KOD DNA聚合酶、Pfu DNA聚合酶和它们的突变体组成的组。

[0061] (18)

[0062] 根据(1)~(17)中任一项所述的方法,其中,前述工序(5)通过实时测定而进行。

[0063] (19)

[0064] 根据(1)~(18)中任一项所述的方法,其中,前述工序(3)在1~60℃的温度下进行。

[0065] (20)

[0066] 根据(1)~(19)中任一项所述的方法,其中,前述工序(3)~(5)在同一容器内进行。

[0067] (21)

[0068] 根据(1)~(20)中任一项所述的方法,其中,前述工序(5)中,使用荧光滤光片测定RT-PCR产物的扩增曲线,判定待检体中RNA病毒的存在为阳性或为阴性。

[0069] (22)

[0070] 一种RNA病毒的检测试剂盒,其包含:含有1种以上的表面活性剂的待检体处理液、以及含有逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应液。

[0071] (23)

[0072] 根据(22)所述的试剂盒,其中,前述RNA病毒选自由诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒和登革病毒组成的组。

[0073] (24)

[0074] 根据(22)所述的试剂盒,其中,前述RNA病毒为诺如病毒。

[0075] (25)

[0076] 根据(24)所述的试剂盒,其中,判断诺如病毒基因型为基因组I(GI)、或为基因组II(GII)。

[0077] (26)

[0078] 根据(22)~(25)中任一项所述的试剂盒,其中,前述表面活性剂为阴离子表面活性剂。

[0079] (27)

[0080] 根据(26)所述的试剂盒,其中,前述阴离子表面活性剂为选自由烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、多库酯、磺酸盐含氟表面活性剂、烷基苯磺酸盐、烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、烷基羧酸盐、月桂酰肌氨酸钠、羧酸盐含氟表面活性剂、胆酸钠和脱氧胆酸钠组成的组中的1种以上的阴离子表面活性剂。

[0081] (28)

[0082] 根据(26)所述的试剂盒,其中,前述阴离子表面活性剂为烷基硫酸盐。

[0083] (29)

[0084] 根据(28)所述的试剂盒,其中,前述烷基硫酸盐为十二烷基硫酸钠或十二烷基硫酸铵。

[0085] (30)

[0086] 根据(22)~(29)中任一项所述的试剂盒,其还包含试剂盒的操作步骤说明书。

[0087] 发明的效果

[0088] 根据本发明,通过将包含诺如病毒等RNA病毒粒子的待检体悬浮液的离心上清液与包含1种以上的表面活性剂的待检体处理液混合,从而能在不进行热处理的情况下使RNA高效地从病毒粒子中游离。因此,能够在同一容器内连续地进行使RNA游离的处理、及之后添加用于检测病毒存在的RT-PCR反应液的一系列的操作,能够简便地检测RNA病毒。进而,本发明中,RNA从病毒粒子中游离的效率高,因此病毒检测灵敏度高,能够精度良好地对病毒排出期进行检测。因此对于检测隐性感染、尤其是确定处于感染后的恢复期的感染患者是有用的。

### 具体实施方式

[0089] 本发明提供检测待检体中的RNA病毒的方法。该方法包括如下工序:(1)将待检体悬浮于蒸馏水、生理盐水或缓冲液的工序;(2)提取工序(1)中生成的悬浮液的离心上清液的工序;(3)将工序(2)中提取出的离心上清液与包含1种以上的表面活性剂的待检体处理液混合的工序;(4)将工序(3)中得到的混合液与包含逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应液混合,进行RT-PCR的工序;及(5)对前述RT-PCR产物进行检测的工序。

[0090] 本发明中,待检体中的成为检测对象的RNA病毒是具有RNA作为基因组的病毒,可列举出具有由脂双层构成的膜即包膜的冠状病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒、登革病毒等;以及不具有包膜的诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒等,但不限于于这些。包膜的主要成分为脂质,因此容易被醇等有机溶剂、表面活性剂破坏,但不具有这种包膜的诺如病毒等RNA病毒通常对有机溶剂、表面活性剂显示出抗性。

[0091] 作为本发明中的待检体,可列举出生物试样、生物来源试样、环境试样和环境来源试样等。作为生物试样,包含包括贝类的中肠腺等在内的动植物组织和血液、唾液、鼻涕、组织分泌液等体液。特别是贝类,作为由诺如病毒引起的食物中毒的致病食品而备受重视。作为生物来源试样,包括对前述生物试样进行了例如超声处理等处理所得者。作为环境试样,可列举出包括大气、土壤、尘埃、水等在内的所有试样。作为环境来源试样,包括对前述环境试样进行了例如超声处理等处理所得者。

[0092] 作为本发明的另一实施方式,作为待检体,可列举出排泄物试样、排泄物来源试样、呕吐物和呕吐物来源试样等。排泄物试样和呕吐物试样可以直接使用,也可以例如以10% (w/v) 悬浮于蒸馏水、生理盐水或缓冲液而制成乳剂来作为工序(1)。作为前述缓冲液,没有特别限定,可列举出磷酸缓冲液、Tris缓冲液、硼酸缓冲液、HEPES等Good's缓冲液。对于前述试样的乳剂,为了去除肠道内细菌等混杂物,例如可以以10000~12000rpm进行2~20分钟离心分离,将离心上清液用作待检体,来作为工序(2)。排泄物来源试样和呕吐物来源试样包括擦拭试样。擦拭试样是为了确认病毒污染而用棉棒、棉团等擦拭手指、餐具、砧板、菜刀、炊具、卫生间设备、住房设备等后洗脱于磷酸缓冲液等中而成者。可以将得到的洗

脱液超离心分离,将离心沉淀物悬浮或溶解后作为待检体使用(宗村佳子等、食品卫生学杂志、2017年第58卷第4号p.201-204)。

[0093] 本发明的工序(3)是将待检体与包含1种以上的表面活性剂的待检体处理液进行混合的工序。本说明书中,“表面活性剂”是指作用于物质的边界面、改变性质的物质的统称。表面活性剂具有在分子内含有亲水性部分和疏水性部分这两者的结构。表面活性剂分为阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂和非离子表面活性剂。作为阴离子表面活性剂,可列举出烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、多库酯、磺酸盐含氟表面活性剂、烷基苯磺酸盐、烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、烷基羧酸盐、月桂酰肌氨酸钠、羧酸盐含氟表面活性剂、胆酸钠和脱氧胆酸钠等,但不限于于这些。作为烷基硫酸盐,优选十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate、SDS)和十二烷基硫酸铵,更优选十二烷基硫酸钠。十二烷基硫酸钠也称为月桂基硫酸钠(Sodium Lauryl Sulfate、SLS)。作为阳离子表面活性剂,可列举出乙基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵和十四烷基三甲基溴化铵等,但不限于于这些。作为两性表面活性剂,例如可列举出甜菜碱和烷基氨基脂肪酸盐,但不限于于这些。作为非离子表面活性剂,可列举出壬基苯氧基聚乙氧基乙醇(NP-40)、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯(Tween(注册商标)80)、聚氧乙烯对叔辛基苯酚(Triton X-100(注册商标))等,但不限于于这些。

[0094] 表面活性剂以一定浓度以上添加到水溶液中时,表面活性剂单体会聚集而形成胶束。表面活性剂将会形成胶束时的浓度被称为临界胶束浓度。在水溶液中,蛋白质、脂质的疏水性区域进入表面活性剂胶束内部的疏水性区域中,从而蛋白质、脂质发生增溶。RNA病毒粒子中,作为蛋白质壳的衣壳、由脂质构成的包膜在临界胶束浓度以上的表面活性剂的浓度下发生增溶、变性或被破坏。其结果,包封在衣壳中的RNA容易成为暴露在水溶液中的状态。表面活性剂的临界胶束浓度根据表面活性剂的种类而不同,为了使病毒RNA高效地暴露,待检体处理液中的表面活性剂的浓度优选为0.02~0.5% (w/v),更优选0.05~0.2% (w/v),进一步优选0.1% (w/v)。

[0095] 待检体与待检体处理液的混合比以体积比计优选为1:3~6,更优选为1:4。通过将待检体与包含表面活性剂的待检体处理液混合,从而混合液中的表面活性剂的浓度降低,但表面活性剂的上述浓度维持临界胶束浓度。

[0096] 本发明的一实施方式中,前述待检体处理液包含氢氧化物。本说明书中,“氢氧化物”是指作为阳离子的金属离子与作为阴离子的氢氧根离子(OH<sup>-</sup>)以离子键结合而成的物质。金属为碱金属或碱土金属。作为氢氧化物,可示例出氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化镁、氢氧化钙和氢氧化钡,优选氢氧化钠和氢氧化钾。氢氧化物显示出强碱性,溶解于水中时产生氢氧根离子,因此也被称为碱。氢氧化物在水溶液中改变蛋白质分子中的天冬氨酸、谷氨酸等解离性氨基酸的带电状态,使蛋白质变性。通过该作用,对RNA病毒粒子进行碱处理时,发生衣壳破坏。其结果,包封在衣壳中的RNA容易成为暴露在水溶液中的状态。为了使病毒RNA高效地暴露,待检体处理液中的氢氧化物浓度优选为10~100mM,更优选为40~60mM,进一步优选为50mM。

[0097] 为了将衣壳、由脂质构成的包膜增溶、变性或破坏而使病毒RNA高效地暴露,优选使表面活性剂和氢氧化物在前述待检体处理液中共存。

[0098] 用于使病毒RNA高效地从衣壳中暴露的本发明的工序(3)优选在1~60℃的温度下

进行,更优选在1~50℃下进行,进一步优选在1~40℃下进行,最优选在1~30℃的室温下进行。优选将待检体与待检体处理液混合后放置3分钟以上。本发明的工序(3)不需要热处理,因此反应容器内的待检体与待检体处理液的混合液的暴沸、蒸发的危险性低,能够在不用盖子等将反应容器密闭的情况下开放地进行。

[0099] 本发明的工序(4)是将工序(3)中得到的混合液与包含逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应液混合并进行RT-PCR的工序。本发明的一实施方式中,工序(3)在不使用盖子的非密闭容器内进行,因此在该状态下对包含工序(3)中得到的混合液的容器直接添加前述一步法RT-PCR反应液而能够在同一容器内进行工序(3)和(4)。工序(3)中得到的混合液中包含的表面活性剂中,SDS的蛋白质变性效果尤其强。因此,在工序(4)中以高浓度带入SDS时,会抑制前述一步法RT-PCR反应液中包含的逆转录酶和DNA聚合酶的酶活性,RT-PCR可能会无法进行。同样地,对于工序(3)中得到的混合液中包含的氢氧化物而言,在被带入到工序(4)中的浓度高时,高pH也会导致前述酶活性的降低。因此,工序(3)中得到的混合液与前述一步法RT-PCR反应液的混合比以体积比计优选为1:2~6,更优选为1:4。

[0100] 本发明的工序(4)中,为了在短时间内分析多待检体,而采用一步法RT-PCR。在一步法RT-PCR反应液中预先混合有逆转录酶和DNA聚合酶,能够在同一容器内进行逆转录反应(单链cDNA合成)和PCR。

[0101] 前述一步法RT-PCR反应液中包含的逆转录酶是以病毒RNA作为模板而生成单链的互补DNA(cDNA)的酶,只要能催化逆转录反应就没有特别限定,可以使用禽成髓细胞瘤病毒(Avian Myeloblastosis Virus、AMV)、莫洛尼鼠白血病毒(Moloney Murine Leukemia Virus、M-MLV)和人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus、HIV)等RNA病毒来源的RNA依赖性DNA聚合酶以及它们的突变体。

[0102] 前述一步法RT-PCR反应液中包含的DNA聚合酶是嗜热菌来源的耐热性DNA聚合酶,可以使用Taq、Tth、KOD、Pfu和它们的突变体,但不限于于这些。为了避免由DNA聚合酶所致的非特异性扩增,也可以使用热启动DNA聚合酶。热启动DNA聚合酶例如是结合有抗DNA聚合酶抗体的DNA聚合酶或对酶活性位点进行了热敏感性化学修饰的DNA聚合酶,是在PCR中经过最初的变性步骤(90℃以上)后DNA聚合酶才会被激活的酶。

[0103] 前述一步法RT-PCR反应液中包含用于在适合条件下顺利进行逆转录反应和PCR的所有成分。作为该成分,至少包含:前述逆转录酶、逆转录反应引物、前述耐热性DNA聚合酶、PCR引物、dNTP混合物(脱氧核糖核苷-5'-三磷酸;由dATP、dGTP、dCTP和dTTP构成的混合物)和缓冲液。本发明的一实施方式中,前述反应液包含Tris缓冲液和镁。前述反应液中也可以添加RNA分解酶抑制剂。作为逆转录反应引物,可以使用对靶RNA序列具有特异性的引物、Oligo(dT)引物或随机引物。作为PCR引物,可使用对通过逆转录反应而生成的cDNA的序列具有特异性的引物对(正向和反向)。PCR引物可以与对靶RNA序列具有特异性的前述逆转录反应引物相同。另外,也可以根据待扩增的DNA区域、即靶序列的数量向前述一步法RT-PCR反应液中添加2种以上的PCR引物。作为包含前述成分的组合,可以使用根据试剂盒操作步骤说明书将诺如病毒检测试剂盒(探针法)(岛津制作所)中包含的试剂混合而成的RT-PCR反应液。

[0104] 在检测诺如病毒RNA时,例如,通过使用专利文献1和2、非专利文献3以及日本特开2018-78806中记载的PCR引物,从而能够检测诺如病毒基因型中的基因组I(GI)和基因组II

(GII),但不限于于此。前述诺如病毒检测试剂盒(探针法)中包含非专利文献3中记载的PCR引物。

[0105] RT-PCR中的逆转录反应的反应温度条件、和PCR条件(温度、时间和循环次数)可由本领域技术人员容易地进行设定。

[0106] 本发明的工序(5)是对来自工序(4)中进行的RT-PCR的产物进行检测的工序。本发明的一实施方式中,通过实时测定来检测PCR产物。进行该实时测定时,工序(4)的RT-PCR和工序(5)的检测该RT-PCR产物的工序在同一容器内进行。本发明的一实施方式中,工序(3)在不使用盖子的非密闭容器内进行,因此通过在该状态下对包含工序(3)中得到的混合液的容器直接添加一步法RT-PCR反应液,从而能够在同一容器内进行工序(3)和(4)。因此,本发明的一实施方式中,能够在同一容器内进行工序(3)~(5)。

[0107] PCR产物的实时测定也被称为实时PCR。实时PCR中,通常通过荧光来检测PCR扩增产物。荧光检测方法有:使用嵌入性荧光色素的方法和使用荧光标记探针的方法。作为嵌入性荧光色素,可使用SYBR(注册商标)Green I,但不限于于此。嵌入性荧光色素与通过PCR而合成的双链DNA结合,通过激发光的照射而发出荧光。通过测定该荧光强度,从而能够测定PCR扩增产物的生成量。

[0108] 作为荧光标记探针,可列举出TaqMan探针、分子信标(Molecular Beacon)、环状探针等,但不限于于此。TaqMan探针是5'末端被荧光色素修饰且3'末端被猝灭剂物质修饰的寡核苷酸。TaqMan探针在PCR的退火步骤中与模板DNA特异性杂交,但由于探针上存在猝灭剂,因此即使照射激发光,荧光的产生也被抑制。在之后的延伸反应步骤中,与模板DNA杂交的TaqMan探针因Taq DNA聚合酶所具有的5'→3'核酸外切酶活性而发生降解时,荧光色素从探针中游离,猝灭剂对荧光产生的抑制被解除,从而发出荧光。通过测定该荧光强度,从而能够测定扩增产物的生成量。作为前述荧光色素,可列举出FAM、ROX、Cy5,但不限于于此。作为前述猝灭剂,可列举出TAMRA(注册商标)和MGB,但不限于于此。为了将2种以上的DNA靶序列区分检测,使用分别结合有不同的荧光色素的2种以上的寡核苷酸探针(例如TaqMan探针)来进行PCR。

[0109] 在工序(5)中,使用对应于所用的荧光色素的荧光滤光片测定RT-PCR产物的扩增曲线。当荧光强度根据PCR循环次数而增加时,判断待检体中的作为分析对象的RNA病毒的存在为阳性,而当PCR中荧光强度不增加时,判断为阴性。

[0110] 本发明的一实施方式中,可提供RNA病毒的检测试剂盒,其包含:含有1种以上的表面活性剂的待检体处理液、以及含有逆转录酶和DNA聚合酶的一步法RT-PCR反应液。

[0111] 实施例

[0112] 接下来列举实施例对本发明进行详细说明,但本发明不限于于此。

[0113] 实施例1

[0114] (表面活性剂和氢氧化物对待检体中的病毒RNA暴露所产生的效果)

[0115] (1)待检体

[0116] 分别采集包含诺如病毒的人粪便(10例)100mg,悬浮于1mL的蒸馏水中,制成约10%(w/v)的粪便乳剂。将该粪便乳剂在室温下以10000rpm进行5分钟离心分离,将离心上清液作为待检体。

[0117] (2)待检体处理液

[0118] 制备了包含下述成分的待检体处理液。

[0119] 50mM氢氧化钠(NaOH)、

[0120] 0.1% (w/v) 十二烷基硫酸钠(SDS)、和

[0121] 625 $\mu$ M dNTP (dATP、dGTP、dCTP和dTTP)

[0122] (3-1) 待检体处理

[0123] 将上述待检体处理液4 $\mu$ L取至没有盖子的PCR反应管中,向其中加入上述待检体1 $\mu$ L后,在室温下放置3分钟。

[0124] (3-2) 伴有热处理的待检体处理

[0125] 作为比较,使用包含15mM NaOH但不包含SDS的待检体处理液,对待检体进行处理。作为该待检体处理液,使用诸如病毒检测试剂盒(探针法)(岛津制作所、产品编号241-09325-91)中包含的待检体处理液(Sample Treatment Reagent)。将前述待检体处理液9 $\mu$ L取至PCR反应管中,向其中放入上述待检体1 $\mu$ L并进行搅拌混合,通过小型离心分离器进行短暂离心(spin down)后,放置在90 $^{\circ}$ C的恒温装置内,进行5分钟加热处理。该热处理后,通过小型离心分离器对PCR反应管进行短暂离心,直接进行冰冷却。

[0126] (4) 一步法RT-PCR反应

[0127] 在包含上述3-1中得到的处理液5 $\mu$ L的PCR反应管中添加一步法RT-PCR反应液20 $\mu$ L;或者在包含上述3-2中得到的处理液10 $\mu$ L的PCR反应管中添加一步法RT-PCR反应液15 $\mu$ L,进行搅拌混合后,通过小型离心分离器进行短暂离心。然后,使用实时PCR装置(GVP-9600、岛津制作所)立即开始进行反应。

[0128] (5) 一步法RT-PCR反应液的组成

[0129] 在上述3-1中得到的处理液5 $\mu$ L中以成为下述反应液组成的方式添加一步法RT-PCR反应液。在上述3-2中得到的处理液10 $\mu$ L中添加一步法RT-PCR反应液,所述一步法RT-PCR反应液是将诸如病毒检测试剂盒(探针法)(岛津制作所、产品编号241-09325-91)中包含的试剂(NoV Reagent A、B和C)混合而制备的。反应中的组成如下所述。

[0130] 40mM Tris缓冲液

[0131] 0.025单位/ $\mu$ L Taq聚合酶

[0132] 1单位/ $\mu$ L逆转录酶

[0133] 3.75mM氯化镁

[0134] 400nM PCR引物对(COG1F/COG1R和COG2F/COG2R)(参照非专利文献3、表11)

[0135] 200nM荧光标记探针(TaqMan探针:G1A、G1B和G2)

[0136] (6) RT-PCR的设定条件

[0137] 在“45 $^{\circ}$ C/5分钟”的逆转录反应后,进行“95 $^{\circ}$ C/3分钟”的初始变性,接着将“95 $^{\circ}$ C/1秒-56 $^{\circ}$ C/10秒”的PCR进行45次循环。光学测定以56 $^{\circ}$ C/10秒的步骤进行。

[0138] (7) 结果和考察

[0139] 将光学测定结果示于表1。表1是对通过本发明的待检体处理液对待检体进行处理的情况与现有法即进行热处理的情况进行比较的图,示出了Ct值。Ct值是在实时PCR中扩增曲线与阈值(Threshold)发生交叉的循环次数。表1示出:在现有法即进行热处理的情况下和通过本发明的待检体处理液进行处理的情况下,对于所有待检体而言,Ct值几乎相同。该结果表明:在任意处理中,初始模板量均几乎相同。即,可知:通过使用表面活性剂和氢氧

化物、从而能够省略热处理的本发明的待检体处理,具有与进行热处理的现有法同等的病毒RNA暴露效果。

[0140] [表1]

待检体编号	Ct值	
	本发明的方法	进行热处理的现有方法
1	22.8	22.7
2	21.6	20.7
3	29.0	28.3
4	27.7	27.4
5	20.5	20.2
6	29.2	27.9
7	24.8	25.6
8	24.8	24.5
9	32.5	30.8
10	28.3	27.7

[0141]