

地衛研 エンテロウイルスゲノム解析プロトコル

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

*本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

1. 概要

本プロトコルは、以下の参考文献を改変した PCR と次世代シーケンサー (NGS) を用いてエンテロウイルスのゲノム解析を行うことを目的としたものである。

参考文献: Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. Marie-Line Joffret, et al. *Frontiers in Microbiology*. September 2018 | Volume 9 | Article 2339

本プロトコルでは、図1のとおりエンテロウイルスゲノムを RT-PCR で 5′ 末端側の Fragment 1 と 3′ 末端側の Fragment 2 に分けて増幅し、それぞれの増幅産物を合わせて NGS を用いてゲノムデータを取得する。本プロトコルは、検出感度を得るために参考文献の方法を表 1 のとおり改変している。また、本プロトコルで用いる試薬を表2のとおり例示する。

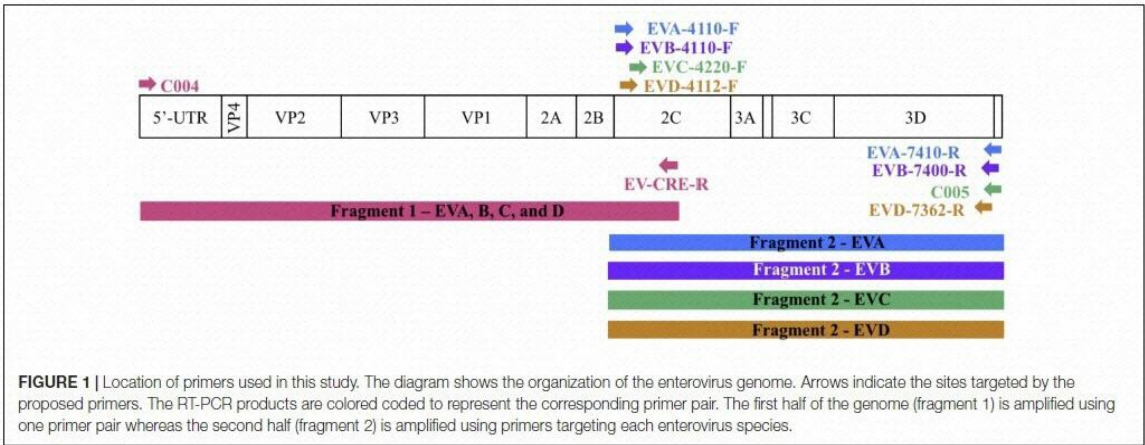


図1 参考文献 Figure 1 より抜粋

表1 参考文献の方法からの主な改変箇所

	参考文献	本プロトコル
逆転写反応	One-Step-RT-PCR	RT-PCR
PCR	Multiplex	single 2種類
Fragment 1 の Forward primer	C004	EVP2
Anneling 温度	55°C	一部 45°C

表2 使用試薬リスト(例示)

試薬の種類	品名	メーカー	コードNo	容量
逆転写反応試薬	SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	18090050	50反応
逆転写反応試薬	Random Hexamers (50 μ M)	Thermo Fisher Scientific	N8080127	5nmol
逆転写反応試薬	dNTP mix (10mM each)	Thermo Fisher Scientific	18427013	100 μ l
逆転写反応試薬	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	10777019	5000 unit
PCR	EmeraldAmp PCR Master Mix	Takara Bio	RR300A	160回用

1. Random hexamer primer、dNTP、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は例示と異なるメーカーのものを使用しても問題ない。
2. Random hexamer primer ではなく Oligo (dT) primer を用いることもできるが、Random hexamer primer と比較して Fragment 1 の検出感度が下がり、Fragment 2 の検出感度が上がる傾向がある。ウイルス株によっては、Fragment 1 の感度低下が大きく、EV-D68の一部のウイルス株で検出できなくなる例がみられた。
3. 例示されたPCR試薬以外を使用することもできるが、特に Fragment 1 で非特異的増幅がみられるので留意すること。またOne-Step-PCR 試薬を使用し逆転写反応とPCR反応を同時に行うことも可能であるが、こちらも非特異的増幅がみられるので留意すること。
4. EmeraldAmp PCR Master Mix は、過度な凍結融解の繰り返しにより活性が低下する場合があります。使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4°C 保存を推奨する。

2. 対象試料

培養細胞により分離されたエンテロウイルス株を用いる。本プロトコルの検出感度では臨床検体を解析するのは困難である。本プロトコルで増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型は表3のとおり。増幅産物の確認は、ゲノムワーキンググループ各施設が保有している遺伝子型のエンテロウイルス分離3株ずつ(施設BのEV-A71のみ5株)を用いて本プロトコルを実施し、標的とするバンドが検出されることで行った。

表3 増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型

		SPECIES A						SPECIES D
		CV-A2	CV-A4	CV-A6	CV-A10	CV-A16	EV-A71	EV-D68
施設A	Fragment 1		○ ○ ○				○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2		× × ×				× × ○	× × ×
施設B	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ × ○ ○	
	Fragment 2		○ ○ ○	○ ○ ×	× × ○	○ × ×	○ × × × ○	
施設C	Fragment 1					○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2					○ ○ ○	○ ○ ○	
施設D	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設E	Fragment 1	○ ○ ○						
	Fragment 2	○ ○ ○						
施設F	Fragment 1	○ ○ ○	○ ○ ○	× × ×	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2	× ○ ○	○ × ○	× × ×	○ × ×	× × ×	○ ○ ×	
施設G	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設H	Fragment 1						○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2						○ ○ ○	○ ○ ○

		SPECIES B											
		CV-A9	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	E-3	E-6	E-7	E-11	E-18	E-25	E-30
施設A	Fragment 1									× ○ ○			
	Fragment 2									× × ×			
施設B	Fragment 1												
	Fragment 2												
施設C	Fragment 1					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
	Fragment 2					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
施設D	Fragment 1	○ ○ ○					○ ○ ○	○ ○ ○			○ ○ ○		○ ○ ○
	Fragment 2	× ○ ○					× ○ ○	× × ×			○ ○ ○		○ ○ ×
施設E	Fragment 1								○ ○ ○			○ ○ ○	
	Fragment 2								○ ○ ○			○ ○ ○	
施設F	Fragment 1	○ ○ ○											
	Fragment 2	○ ○ ○											
施設G	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	× × ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
施設H	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	○ × ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			

標的とするバンドが検出されたものを ○ とした

3. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)等のRNA抽出キットを用いてエンテロウイルスRNAを対象試料から抽出する。Carrier RNAについては、添加していても問題ない。

4. 逆転写反応

本プロトコルでは、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) (以下SS4)でRandom hexamer primer を用いる方法を表4-1に示す^{注1)}。SS4には Random hexamer primer、dNTP mix (10mM each)、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は付属していないので別途用意が必要となる。

表4-1のとおり反応調製液を作成し、表4-2のとおり 65℃ 5分 反応させた後、少なくとも 1分 氷上でインキュベートし、annealed RNA 13 μlを作成する。

表4-1

Component	Volume
50 μ M Random hexamer primer	1 μ l
dNTP mix (10mM each)	1 μ l
Template RNA	11 μ l
Total	13 μ l

表4-2

temperature	Reaction time
65°C	5 min

表5-1のとおり反応調製液を作成し、annealed RNA 13 μ l と混合する。表5-2の条件で反応させ cDNA を作成する。

表5-1

Component	Volume
5 $\times$ SSIV Buffer	4 μ l
100 mM DTT	1 μ l
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μ l
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200U/ μ L)	1 μ l
annealed RNA	13 μ l
Total	20 μ l

表5-2

temperature	Reaction time
23°C	10 min
55°C	10 min
80°C	10 min

5. PCR反応

得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行う。参考文献では、Fragment 1 と Fragment 2 の primer を混合してPCRをしているが、Fragment 1 と Fragment 2の検出感度が異なること、非特異的増幅がみられることがありバンドの切り出しを必要とする場合があることから、本プロトコルではFragment 1 と Fragment 2を分けてPCRを行う。本プロトコルでは、非特異的増幅が少なかったことからPCR試薬に EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) を使用する。

5-1. Fragment 1 のPCR

Fragment 1 のPCRでは、検出感度が低いこと、ウイルス株によっては検出ができないことから、Forward primer を参考文献の C004 から EVP2 に変更している。EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されている primer である^{注2)}。表6-1のとおり反応調製液を作成し、表6-2の条件で反応させる^{注3)}。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い4060bp前後にバンドが認められるか確認する。用いる primer 配列は表10のとおり。

表6-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVP2 (Final conc 200nM)	0.5 μ l
10 μ M Reverse primer EV-CRE-R (Final conc 200nM)	0.5 μ l
Nucleotide Free Water	9.5 μ l
cDNA	2 μ l
Total	25 μ l

表6-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
55°C	30 sec	×30 cycle
72°C	4 min 30 sec	

5-2. Fragment 2 のPCR

Fragment 2 のPCRは、エンテロウイルスの種(EV-A、EV-B、EV-C、EV-D)により用いる primer が異なる。また、EV-A と EV-D のPCRでは、アニーリング温度を参考文献の 55°C では増幅がみられなかったことから 45°C に変更している。EV-Cについては、ウイルス株を用いた検証を行っていない為、本プロトコルでは示さない。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い標的とするバンドの有無を確認する。得られる遺伝子増幅産物は、どのPCRでも3300bp 前後である。用いる primer 配列は表10のとおり。

5-2-1. Fragment 2 EV-A のPCR

表7-1のとおり反応調製液を作成し、表7-2の条件で反応させる。

表7-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVA-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVA-7410-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表7-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
45°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

5-2-2. Fragment 2 EV-B のPCR

表8-1のとおり反応調製液を作成し、表8-2の条件で反応させる。

表8-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVB-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVB-7400-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表8-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
55°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

5-2-3. Fragment 2 EV-D のPCR

表9-1のとおり反応調製液を作成し、表9-2の条件で反応させる。

表9-1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 μ l
10 μ M Forward primer EVD-4112-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVD-7362-R (Final conc 400nM)	1 μ l
Nucleotide Free Water	7.5 μ l
cDNA	3 μ l
Total	25 μ l

表9-2

temperature	Reaction time	
98°C	10 sec	
45°C	30 sec	×35 cycle
72°C	3 min 30 sec	

表10 各 primer の配列

PCR	Primer name	5' -3' Sequence	Position
Fragment 1	EVP2	CCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAAT	※1
	EV-CRE-R	CGGBRTTTGSWCTTGAACTG	※2
Fragment 2	EVA-4110-F	AARAARTTYAAYGAYATGGC	4110 - 4130 ^{※3}
EV-A	EVA-7410-R	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	7410 - 7390 ^{※3}
Fragment 2	EVB-4110-F	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	4110 - 4130 ^{※4}
EV-B	EVB-7400-R	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	7400 - 7378 ^{※4}
Fragment 2	EVD-4112R	GGCTAKCMCAAAAAGATWGAC	4112 - 4132 ^{※5}
EV-D	EVD-7362-R	CCA AKTRACCAAAAATTACC	7362 - 7342 ^{※5}

※1 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 452 - 476

CV-B4 E2 (AF311939) : 450 - 474

EVD-68 Femon (AY426531) : 445 - 469

※2 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 4418 - 4437

CV-B4 E2 (AF311939) : 4375 - 4394

EVD-68 Femon (AY426531) : 4390 - 4409

※3 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065)

※4 CV-B4 E2 (AF311939)

※5 EVD-68 Femon (AY426531)

6. 遺伝子増幅産物の精製

Fragment 1、Fragment 2 それぞれのPCRで得られた遺伝子増幅産物を電気泳動し、標的バンドが認められるか確認する。標的バンドが認められたら、QIAquick PCR Purification Kit等による精製、もしくは AMPure XP (Beckman Coulter) 等による磁気ビーズ精製を行う。また、非特異的バンドが確認されず、明瞭な標的バンドが認められていれば、遺伝子増幅産物を Nucleotide Free Water等で5倍程度希釈することで精製工程を省略することができる。明瞭な非特異的バンドが認められた場合、標的バンドの切り出しとQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等を用いた精製を行うことで、標的遺伝子以外によるゲノムデータ圧迫を抑えることができる。

7. Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物の混合

精製した Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物を Qubit dsDNA HS Assay Kit 等でDNA濃度を測定する。Fragment 1 と Fragment 2 で同程度の濃度になるように調製して混合する。複数の検体を同時に解析する場合は、検体間で同程度の濃度に調製しておいた方がよい。

8. ライブラリ調製

新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル(国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター)に記載されている NGSライブラリ調製(QIAseq FX)の手順に従いライブラリ調製を行う。

9. シーケンシング

Illumina NGS のマニュアルに従い、ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。

10. ゲノムデータ解析

得られた Fastq データを用いてゲノム解析を行う。

注記

1. 多くの施設で使用しているPrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio)、LunaScript RT SuperMix Kit (NEB)の使用は避けた方がよい。
2. EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されているVP4-VP2-semi-nested RT-PCRの1st PCR で 使用されている。元の文献は以下のとおり。
Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 28, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
3. Fragment 1 と Fragment 2 で検出感度が異なる為、Fragment 1 PCRの primer 濃度、cycle 数、template 量を変更して検出感度を調整している。

Appendix

1. 本プロトコルで Fragment 2 の PCR 増幅不良の場合における代替法の一例

ワーキンググループ内の検証において、本プロトコルに記載した試薬類を使用した際に Fragment 2 の増幅がみられない施設が散見された。こういったケースにおいて異なる試薬を使用した場合の PCR 増幅についての事例を紹介するので解析を実施する際の参考にされたい。なお、RNA 抽出までは 3. と同様の手順で実施し、使用したプライマー配列も同一のものである。また、検証は EV-B の特定の種においてのみ実施したものである。

1-1. 使用試薬および機器

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara, #R026A)

1-2. Fragment 2 EV-B のPCR

表S1-1のとおり反応調製液を作成し、表S1-2の条件で反応させる。

表S1-1

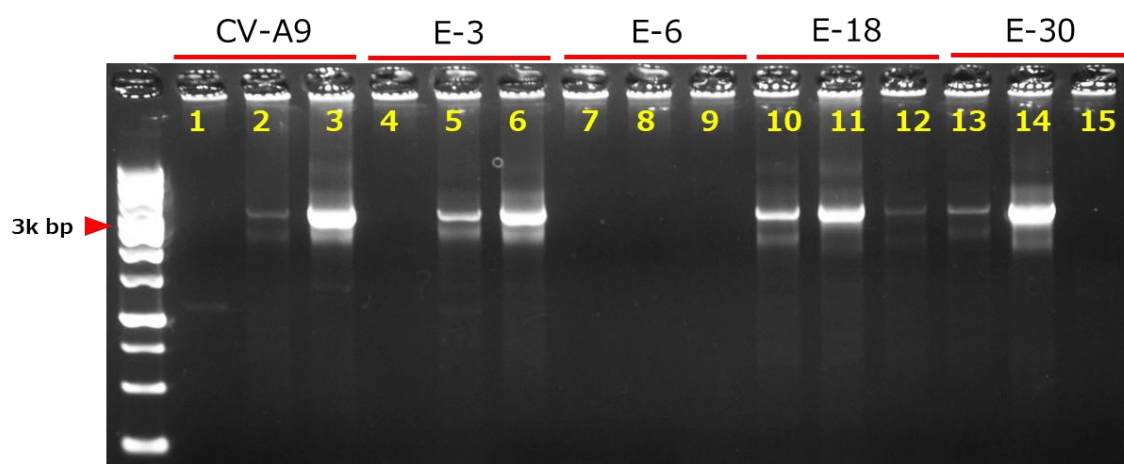
component	Volume
Nucleotide Free Water	3.0 μ l
2 $\times$ 1 step High Fidelity Buffer	12.5 μ l
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	2.0 μ l
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μ l
10 μ M Forward primer EVB-4110-F (Final conc 400nM)	1 μ l
10 μ M Reverse primer EVB-7400-R (Final conc 400nM)	1 μ l
RNA	5 μ l
Total	25 μ l

表S1-2

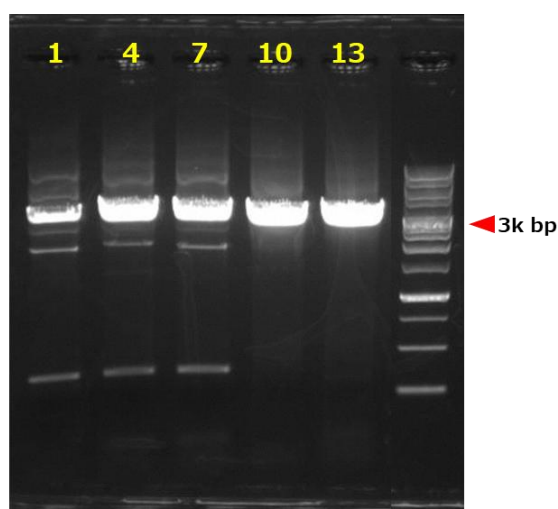
Temperature	Reaction time	
45°C	15 min	
94°C	2 min	
98°C	10 sec	
55°C	15 sec	$\times 40$ cycles
68°C	1 min	

1-3. PCR結果の比較

プロトコル本文の方法（以下、本法）で実施したFragment 2のPCR結果を図S1、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（以下、検証法）を使用して実施したPCR結果を図S2に示す。なお、検証法は各遺伝子型から1検体ずつを選抜して実施した。泳動図の検体番号はそれぞれ同一検体である。この検証は1施設のみで実施したものであり、施設間誤差や使用する機器の違いは考慮されていない。



図S1. 本プロトコルに従い実施したFragment 2の泳動図



図S2. PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを使用して実施したFragment 2の泳動図

本法で増幅不良であった検体番号1, 4, 7, 13について十分な増幅が確認された。一方で非特異増幅も複数確認された。また、図では示していないが、Fragment 1についても同じ試薬で検証したところ、増幅は確認されたものの、本法で実施した結果よりも非特異増幅が多かった。