

調査研究

Enterovirus CODE-HOP 法における Cycle Sequence について

ウイルス課 安藤 克幸

1 はじめに

エンテロウイルス (EV) は、ライノウイルス (一般的なかぜの原因ウイルス) と人の parechoviruses とともに、picornaviruses (ピコ、または小さな、RNA ウイルス) 科に属する。人の parechoviruses のタイプ 1 と 2 は以前 echovirus22 と 23 という名称であったが、今は分類し直されている。すべての EV には抗原的に異なる、広い地理的分布がある。

EV はおもに呼吸器分泌物と便で排出され、感染した患者の血液と脳脊髄液にも存在する場合がある。感染は通常呼吸器分泌物または便の直接接触によって伝搬されるが、汚染された環境源 (例えば、水) によって伝搬されることもある。

EV は、いろいろな症候群を引き起こすことが知られている。以下の症候群は、おもに、ほとんどの場合 EV に起因する。

- 流行性胸膜炎
- 手足口病
- ヘルパンギーナ
- 灰白髄炎

他の疾患 (例えば、無菌性髄膜炎、心筋炎) は、エンテロウイルスか、他の微生物に起因する場合がある。

種々の症候群を引き起こす EV には以下の型のウイルスが含まれる。

- ・Coxsackieviruses A1 to A21, A24, and B1 to 6
- ・Echoviruses (enteric cytopathic human orphan viruses) 1 to 7, 9, 11 to 21, 24 to 27, and 29 to 33
- ・Enteroviruses 68 to 71, 73 to 91, and 100 to 101
- ・Polioviruses types 1 to 3

このように多様な type が含まれるため、これまでも多くの分析方法が報告されてきている (1~8)。

このうち、Nix らにより、すべての血清型のエンテロウイルスのカプシド蛋白質 VP1 コード領域ゲノムを高感度に増幅する方法 (A reverse transcription-semi-nested PCR (RT-snPCR) assay) が開発された (7)。この中で用いられる CODE-HOP (the consensus degenerate hybrid oligonucleotide primer) 法では、関連する遺伝子を増幅するために、効率的な混合塩基プライマーが設計される (9)。

この混合塩基プライマーは、5' 側に異なる遺伝子型で高く保存されている塩基部分 (キメラプライマーのユニバーサル配列) と 3' 側に多くの混合塩基を有する部分を (キメラプライマーのターゲット遺伝子特異的配列) プライマーとして含む。

この CODE-HOP 法では、遺伝子解析によりその遺伝子型が判定されるが、Sequence 結果が解読できない場合がこれまでも認められている。

このため、既報 (「Chimeric primers を用いた呼吸器系感染症の Multiplex RT-PCR 法」: 平成 25 年所報) で報告のキメラプライマーの原理 (Fig1) を活用した Sequence 法について検討した。

調査研究

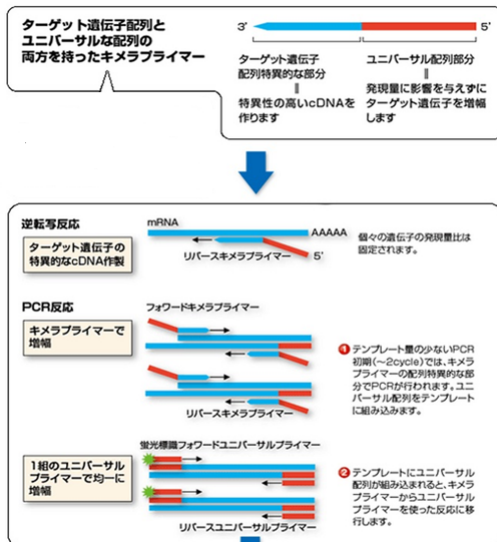


Fig1 キメラ primers の配列、逆転写反応及び PCR 反応

2 材料および方法

試薬類：

プライマー；通常の方法で作成したオリゴヌクレオチドを合成後、HPLC 精製した。

エンテロウイルス RNA；当所で検出し、抽出精製した RNA を用いた。

DNA polymerases；AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂

ゲル抽出；FastGene Gel/PCR Extraction Kit

Cycle sequence kits；BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Dye Terminator Removal；FastGene Dye Terminator Removal Kit

ポリマー；POP7

遺伝子増幅；GeneAmp® PCR System9700

シーケンサー；ABI XL3130

方法：

(1) プライマー

エンテロウイルスは前述の呼吸器分泌物と便中に排泄されるため、呼吸器分泌物を出発材料としてウイルスに対する感受性の高い細胞を用いて分離するのが一般的である。しかし、分離、同定に時間を要するため、咽頭ぬぐい液等から直接ウイルス RNA を検出する場合もある。よく用いられる方法としては VP4-VP2 領域を増幅する方法 4)、VP1 領域を対象としたもので、より高感度かつ PCR 増幅効率の高い CODE-HOP 法 7) も開発されている。

VP4-VP2 領域の増幅に使用される増幅用プライマーについては、混合塩基を用いている Fig2) が、プライマー OL68-1 では保存領域が中央部分に認められる。

Briefly, 5 μ l of the RNA mixed with 1 μ l of 50 μ M of each primer (EVP-2, 5'-CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA-3' and OL68-1, 5'GGT AAQ TTC CAC CAC CAY AA-3', Y is either C or T) was heated for 5 min at 95 °C and immediately put on ice. Then 43 μ l of reactive cocktail containing 5 μ l of 10X DNA polymerase reaction buffer, and 1 μ l of each of the following was added, 40 U of RNase inhibitor (Promega), 200 U MMLV (BRL), 2.5 U of cloned PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene) and 15 mM of dNTP (Amershan). The one-step RT-PCR program consisted of incubation for 1 h at 37 °C, for 5 min at 94 °C, 40 cycles of incubation for 1 min at 95 °C, 30 sec at 55 °C, 1 min at 72 °C, and followed by 5 min at 72 °C. The second PCR was performed at a final volume of 50 μ l including 2.5 U of cloned PfuTurbo DNA polymerase, 1 μ l of 15 mM dNTP, 4.5 μ l 10X Pfu reaction buffer, and 1 μ l of 50 μ M of each primer (EVP-4, 5'-CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT-3' and OL68-1) in the same PCR program. A fragment of approximately 650 base pairs spanning the 5'-noncoding region to one third of VP2 including the entire region of VP4 was amplified. Cycle sequencing was performed using the purified PCR products with the Prism Ready Reaction Dideoxy Terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Corporation-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the 207bp nucleotide sequence was determined with an automated sequencer (ABI Model 373A).

Fig2 VP4-VP2 領域増幅用プライマー (EVP-2, OL68-1, EVP-4)

調査研究

VP1 領域の増幅に使用される逆転写プライマーについても、混合塩基を用いている Table1, 2) が、AN89、AN88 では、前半部分に共通領域が認められる。(AN89 で 16 塩基、AN88 で 15 塩基) よって、この塩基配列を Universal Primers(AN250, AN251)として Cycle Sequence に使用した。

AN250 : CCAGCACTGACAGCAG

AN251 : TACTGGACCACCTGG

Primer	Sequence	Gene	Position
011	GCICCGAYTGITGICCAA	2A	3408-3389
012	ATGTAYGTICCCICGGIGG	VP1	2951-2970
040	ATGTAYRTICCMICGGIGC	VP1	2951-2970
187	ACIGCIGYIGARACIGGNCA	VP1	2612-2631
188	ACIGCIGTIGARACIGGNG	VP1	2612-2630
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	VP1	2612-2631
222	CICCGIGGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951

Table1 VP1 領域増幅用プライマー (RT, 1st, 2nd PCR 用汎用プライマー) (文献 4 より引用)

Primer	Sequence	Amino acid motif	Gene	Location
222	CICCGIGGGIAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPG(A/G)	VP1	2969-2951
292	MIGCIGYIGARACNGG	(Q/T)A(A/V)ETG	VP1	2612-2627
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	PALTA(A/V)E(I/T)G	VP1	2602-2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPGGPV	VP1	2977-2951

Table2 VP1 領域増幅用プライマー (CODE-HOP 法 2nd primers AN89, AN88) (文献 7 より引用)

(2) Cycle sequence の annealing 温度

Cycle sequence では、通常の annealing 温度は 50°C である Table3) が、Nix らの 2nd PCR の annealing 温度 (60°C) (7) と比較した。

Cycle Sequencing on the System 9700, 9600, 2700, or 2400

To sequence single- and double-stranded DNA on the GeneAmp® PCR System 9700 (in 9600 emulation mode), 9600, or 2400:

1.	Place the tubes in a thermal cycler and set to the correct volume.
2.	Perform an initial denaturation. <ol style="list-style-type: none"> a. Rapid thermal ramp to 96 °C b. 96 °C for 1 min
3.	Repeat the following for 25 cycles: <ul style="list-style-type: none"> • Rapid thermal ramp to 96 °C • 96 °C for 10 sec • Rapid thermal ramp to 50 °C • 50 °C for 5 sec • Rapid thermal ramp to 60 °C • 60 °C for 4 min
4.	Rapid thermal ramp to 4 °C and hold until ready to purify.
5.	Spin down the contents of the tubes in a microcentrifuge.
6.	Proceed to Chapter 4, "Purifying Extension Products."

*Rapid thermal ramp is 1 °C/second.

Table3 Cycle sequence standard protocol

(3) Incubation program

Cycle sequence で、通常行う 25cycles 96°C-10sec 50°C-5sec 60°C-4min の条件 Table3) を BAC DNA の Cycle sequence で推称される 30cycles 95°C-30sec 50~55°C-10sec 60°C-4min の条件 Table4) と比較した。(最終的に 50~55°C-10sec の条件は 60°C-20sec とし、60°C-4min は 70°C-4min とした。)

調査研究

Performing Cycle Sequencing To perform cycle sequencing on BAC DNA:

1.	Place the tubes in a thermal cycler and set the volume to 20 μ L.
2.	Heat the tubes at 95 $^{\circ}$ C for 5 minutes.
3.	Repeat the following for 30 cycles: [*] <ul style="list-style-type: none"> • Rapid thermal ramp[†] to 95 $^{\circ}$C • 95 $^{\circ}$C for 30 seconds. • Rapid thermal ramp to 50–55 $^{\circ}$C (depending on template) • 50–55 $^{\circ}$C for 10 seconds. • Rapid thermal ramp to 60 $^{\circ}$C • 60 $^{\circ}$C for 4 minutes.
4.	Rapid thermal ramp to 4 $^{\circ}$ C and hold until ready to purify.
5.	Spin down the contents of the tubes in a microcentrifuge.
6.	Proceed to Chapter 4, "Purifying Extension Products."

^{*}Some laboratories have found that increasing the number of cycles gives better results.

[†]Rapid thermal ramp is 1 $^{\circ}$ C/sec.

Table4 Cycle sequence BAC DNA protocol

(4) Sample (Template) volume

Cycle sequence の反応溶液量については、標準的な組成がメーカーから示されている Fig8) が、Template については quantity が示されている Fig7) のみで、容量については、示されていない。また、これまでに調査報告もなく、Quantity が低い場合は、Cycle sequence 反応に apply 可能な Template 容量についても重要であるため、この点について検討した。

DNA Quantity

Quantitating DNA If possible, quantitate the amount of purified DNA by measuring the absorbance at 260 nm or by some other method.

Template Quantity

The table below shows the amount of template to use in a cycle sequencing reaction.

Template	Quantity
PCR product:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng
Single-stranded	25–50 ng
Double-stranded	150–300 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 μ g
Bacterial genomic DNA	2–3 μ g

Note: In general, higher DNA quantities give higher signal intensities.

The template quantities stated above should work with all primers. You may be able to use even less DNA when using capillary instruments for detection. The amount of PCR product to use in sequencing also depends on the length and purity of the PCR product.

Using BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer

The BigDye[®] Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)^{*} is supplied at a 5X concentration. If you use it for sequencing reactions, be sure the final reaction volume is at a concentration of 1X. For example, for a half reaction in 20 μ L final volume, you would use 4 μ L of ready reaction premix and 2 μ L of BigDye sequencing buffer as shown below.

Reagent	Concentration	Volume
Ready Reaction Premix	2.5X	4 μ L
BigDye Sequencing Buffer	5X	2 μ L
Primer	–	3.2 pmol
Template	–	See "Template Quantity" on page 2-6.
Water	–	to 20 μ L
Final Volume	1X	20 μL

Note: The use of this buffer without optimization may result in deterioration of sequence quality. Applied Biosystems does not support diluted reactions or guarantee the performance of BigDye[®] chemistry when it is diluted.

Table5 Cycle sequence DNA Quantity

Table6 Reaction mixtures

3 結果

(1) プライマー

Cycle sequence の standard protocol (annealing 温度 50 $^{\circ}$ C) で反応プログラムを行った結果 Fig3) は、共通領域をプライマーとした AN251 が AN88 に比較してより解析可能であった。

調査研究



Fig3 Cycle sequence standard protocol の比較結果

(2) Cycle sequence の annealing 温度

Cycle sequence の annealing 温度を 50℃とした場合と annealing 温度を 60℃とした場合を比較した結果では、60℃の方がより解析精度が高かった。Fig4)

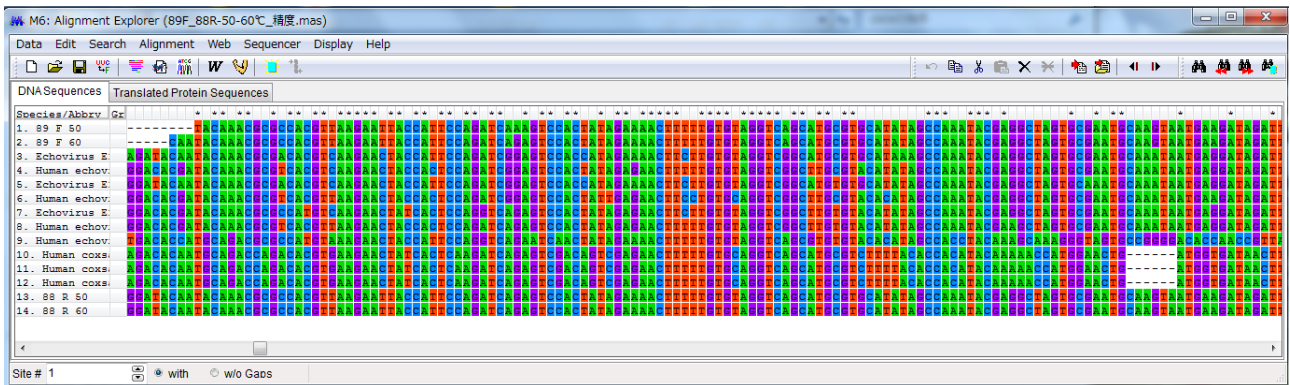


Fig4 Cycle sequence の annealing 温度の比較結果

(3) Incubation program

Cycle sequence で、通常行う 25cycles 96℃-10sec 50℃-5sec 60℃-4min の条件 Fig5)と BAC DNA で推称される 30cycles 95℃-30sec 50~55℃-10sec (60℃ 20sec) 60℃-4min (70℃-4min) の条件 Table4)を比較した結果では、BAC DNA の反応条件が混合プライマーの影響によるピークの重なりが抑制され、より解析が可能であった。Fig5)

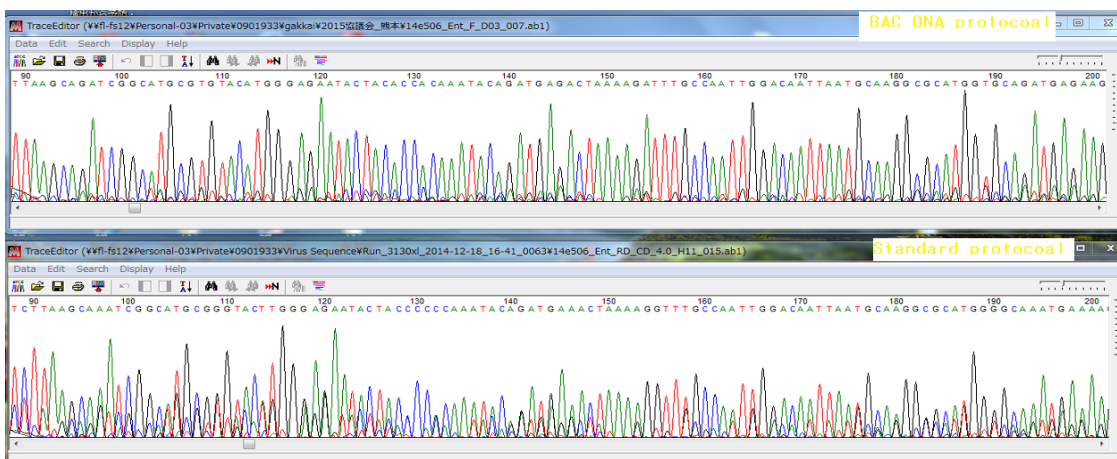


Fig5 Cycle sequence standard protocol と BAC DNA protocol の比較結果

調査研究

(4) Sample(Template) volume

Cycle sequence の反応が安定している Noro virus を Template として使用し、反応に apply できる容量をもとめた結果、Ready Reaction Premix $2\mu\text{l}$ 、BigDye Sequencing Buffer $1\mu\text{l}$ 、Primer3.2 pmol の反応系の場合、 $12\mu\text{l}$ まで増加することが可能であった。Fig6, Fig7)

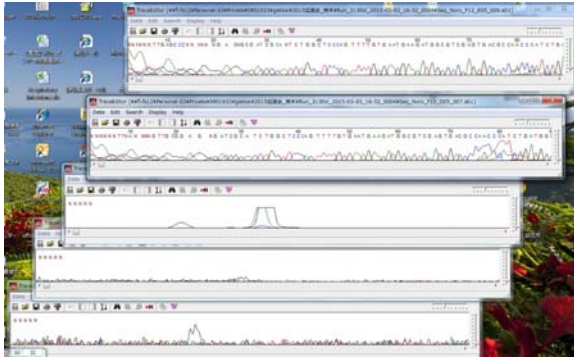


Fig6 Cycle sequencing forward primer(Noro virus)
(下から 6, 8, 9, 10, $12\mu\text{l}$ を apply)

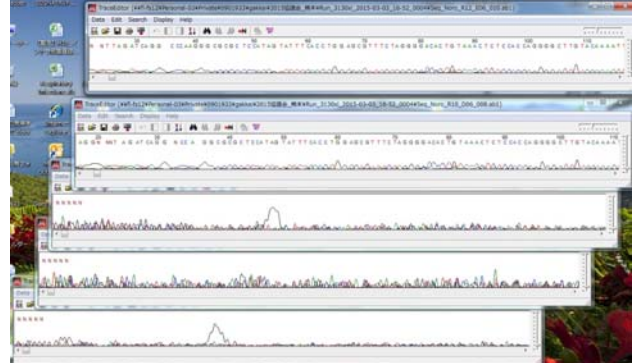


Fig7 Cycle sequencing reverse primer(Noro virus)
(下から 6, 8, 9, 10, $12\mu\text{l}$ を apply)

4 考察

エンテロウイルスには多様な型が含まれるため、解析が困難な株もある。一方、CODE-HOP 法で検出されたエンテロウイルス株のうち、AN89、AN88 のプライマーによる遺伝子解析が可能である株もある。Cycle sequence Standard protocol で解析が困難な場合の改良方法として、以下の項目が考えられた。

(1) AN89、AN88 のプライマーを使用

今回の結果である annealing 温度 60°C の反応系が annealing 温度 50°C に比較して、より解析可能であったこと (Fig4) とプライマー設計値で AN89 の T_m 値が 71.1、AN88 の T_m 値が 67.6 であることから、AN89、AN88 のプライマーによる Cycle sequence の解析が困難であった場合に改良する条件とし、annealing 温度を 60°C に変更することは、 T_m 理論値の点からも合致していると考えられた。

(2) AN250、AN251 のプライマーを使用

annealing 温度 50°C の反応系では、AN250、AN251 のプライマーの反応系が AN89、AN88 のプライマーの反応系に比較して、より解析精度が向上していたこと (Fig3) とプライマー設計値で AN250 の T_m 値が 55.6、AN251 の T_m 値が 52.4 であることから、AN89、AN88 のプライマーによる Cycle sequence の解析が困難であった場合の改良方法として、プライマー AN250、AN251 への変更では、annealing 温度を 50°C に設定することは、 T_m 理論値の点からも合致していると考えられた。

(3) Cycle sequence での BAC DNA protocol

(1)、(2) の条件で Cycle sequence を行う場合、Fig5) の結果からエンテロウイルスの Cycle sequence では、BAC DNA protocol の方が Standard protocol に比較して、より解析精度が向上すると考えられた。

(4) Sample(Template) volume

電気泳動でバンドが薄い場合 (Quantity が低い) は、Cycle sequence 反応に apply 可能な Template 容量についても重要である。Apply する Template が少量で、推奨される DNA quantity よりも低い場合は Cycle sequence の解析が不可能となる。

このため Apply する Template の Volume を増量して DNA quantity の量を増加することも必要である。

今回、Template を段階的に 6, 8, 9, 10 および $12\mu\text{l}$ に増量して検討した結果、Ready Reaction

調査研究

Premix 2 μ l、BigDye Sequencing Buffer 1 μ l および Primer 3.2 pmol に固定した条件で、最大 12 μ l (抽出溶液: 10mM Tris-Cl buffer) までの反応が可能であった。Fig6, 7)

当所のゲル抽出・精製キットは 20 μ l で抽出するため、Cycle sequence 反応の primer の Forward と reverse で最大 10 μ l までの apply となる。この制限があるため、段階増量で検討した Template の上限値は 12 μ l とした。

Nix ら 7) の報告以前の RT-PCR 法ではエンテロウイルス株を増幅できない場合もあったが、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では検出感度も高く、すべての既知の EV 血清型からテンプレート RNA を増幅することができる。この方法によるサンプルからのダイレクトな分子疫学的分析は集団の EV 関連疾病の発生初期における疫学的情報の取得に非常に有用となる。

特に、国内でも過去に流行している EV71 による脳炎、髄膜炎等の中枢神経症状や米国で流行している EVD68 による急性弛緩性脊髄炎 (関連が疑われている) に対しては早期の検出が望まれる。

しかし、この VP1 領域は GenBank 等で解析可能な範囲が約 350bp であるため、血清型の同定は可能であるが、各株間の系統樹解析では分類が困難な場合もある点に注意が必要である。

5 文献

- 1) Arola A, Santti J, Ruuskanen O, Halonen P, Hyypiä T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:313-318.
- 2) Chapman N M, Tracy S, Gauntt C J, Fortmueller U. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol.* 1990;28:843-850.
- 3) Glimåker M, Abebe A, Johansson B, Ehrnst A, Olcén P, Strannegård O. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in faecal samples from patients with aseptic meningitis. *J Med Virol.* 1992;38:54-61.
- 4) H. Ishiko, Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, N. Takeda: *J. Infect. Dis.* 185, 744-754 (2002)
- 5) Jin Li, Shunxiang Qi, Chen Zhang, et al. A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Sixteen Human Respiratory Virus Types/Subtypes. *Biomed Res Int.* Volume 2013 (2013), Article ID 327620, 8 pages.
- 6) Nicholson F, Meeto G, Aiyar S, Banatvala J E, Muir P. Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *J Virol Methods.* 1994;48:155-166.
- 7) Nix, W. A., M. S. Oberste, and M. A. Pallansch. : *J. Clin. Microbiol.* 44, 2698-2704 (2006)
- 8) Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA: *J Clin Virol* 26, 375-377 (2003)
- 9) Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M., Henikoff, S. : *Nucleic Acids Res.* 26, 1628-1635 (1998)