

# illumina COVIDSeq™ Assay (96 samples) の使用による パフォーマンスの向上

ARTIC v4プライマープールを用いた  
SARS-CoV-2変異株に対する  
ゲノムカバレッジの向上

illumina®

## COVID-19サーベイランスにアクセス可能

COVID-19パンデミックは、1年以上の間世界中で猛威を振るっています。<sup>1</sup> デルタ変異株の発生や、より感染性が高いまたはより致死的な、おそらくその他の新しいSARS-CoV-2変異株発生により、公衆衛生活動、特定の診断検査およびこのパンデミックと闘うために開発されるワクチンに関する関心が高まっています。<sup>2</sup> このことから、新しいSARS-CoV-2変異株を同定し、モニタリングするためのゲノムサーベイランスの必要性は明らかです。サーベイランスを実施したい一方で、ハイスループットシーケンスシステムおよび大規模なフォーマットのライブラリー調製キットの費用について経済的障壁に直面しているラボのために、イルミナはIllumina COVIDSeq Assay (96 samples)を提供しています。このロースループットからミッドスループットのアンプリコンベースの次世代シーケンス (NGS) アッセイは、少数サンプルに対応し、小規模な臨床研究ラボが新規SARS-CoV-2変異株と系統の発生と蔓延率を同定、追跡することができます。

Illumina COVIDSeq Assay (96 samples)は、SARS-CoV-2 RNAを検出し特徴づけるために、検証済みかつ公開されているARTICマルチプレックスPCRプロトコールに基づいたプライマープール (ARTIC v3) を含んでいます。変更型の最適化されたプライマープール (ARTIC v4) は、SARS-CoV-2検出とバリエーションコールに対するIllumina COVIDSeq Assay (96 samples)の性能が向上するようにデザインされました。本テクニカルノートでは、COVID-19サーベイランスにIllumina COVIDSeq Assay (96 samples)を使用したときのウイルス検出の解析感度の向上およびARTIC v4プールのウイルスゲノムカバレッジの増加を説明します。

## 実験デザイン

### サンプル調製

4種類の人工サンプルは、バックグラウンドとしてのUniversal Human Reference RNA (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号QS0639) に、異なるCOVID変異株を代表するTwist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control (表1) のウイルス200コピーを添加して調製しました。qPCR (Ct値30以下) でCOVID-19陽性と判定された鼻咽頭 (NP) スワブサンプルから抽出したRNAサンプルも評価に加えしました。

表1: 人工SARS-CoV-2サンプル

Twist Synthetic RNA Control	Pangolin 命名法 <sup>a</sup>	WHO表記 <sup>b</sup>	Twist社カタログ番号
15	B.1.1.7	α	103909
16	B.1.351	β	104043
17	P.1	γ	104044
23	B.1.617.2	Δ	104533

a. [Pangolin](#) (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages) は、SARS-CoV-2系統を動的に命名するために開発されました。

b. [世界保健機関 \(WHO\)](#) は、学術的でないSARS-CoV-2変異株に関する議論には、ギリシャ文字を使用することを推奨しています。

### ライブラリー調製

Illumina COVIDSeq Assay (96 samples)とARTIC v3プライマープール (キットに同梱) およびARTIC v4プライマープール (付属品として購入可能) を用いて、すべてのサンプルに対するライブラリーを並行して調製しました。

### シーケンス

調製したライブラリーは、NextSeq 500/550 Mid-Output v2.5 Kit (150または300サイクル) を使用し、NextSeq™ 550Dxシステムで74 bp×2および150 bp×2のリード長でシーケンスしました。ARTIC v4プライマープールは、iSeq 100システムからNovaSeq 6000システムまでの全イルミナシーケンスシステムでCOVIDSeq Test (RUO) およびCOVIDSeq Assay (96 samples)を用いて検証されており、プラットフォーム間でパフォーマンスの有意な差は認められませんでした (データ省略)。

### DRAGEN™ COVID Lineageアプリを用いた解析

NextSeq 550DxシステムからのFASTQシーケンスファイルを、BaseSpace™ Sequence HubのIllumina DRAGEN COVID Lineage App v3.5.4に入力し、SARS-CoV-2リファレンスゲノムにアライメントしました。このアプリでは、FASTQファイルから開始することで、マッピング/アライメント、バリエーションコールおよび共通配列生成を実施します。系統および分岐群 (系統発生) のコールは、FASTAの共通配列にアクセスし、この共通配列とPangolinの最新版とを比較することで生成されます。

## 結果

### 人工サンプルにおけるパフォーマンスの向上

ARTIC v4プライマープールのパフォーマンスは、Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Controlを用いて調製した人工サンプルを用いて評価しました。ウイルスゲノムカバレッジの評価では、非N塩基の割合（捕捉したゲノムの割合の定量的測定値）とカバレッジ中央値で測定した場合、人工サンプル中のARTIC v4プライマーによるパフォーマンスの向上が示されました（図1）。重要なこととして、ARTIC v4プライマーはSARS-CoV-2ゲノムの重要な領域であるスパイクタンパク質座内で、より均一なカバレッジを示しました<sup>3-5</sup>（図2）。

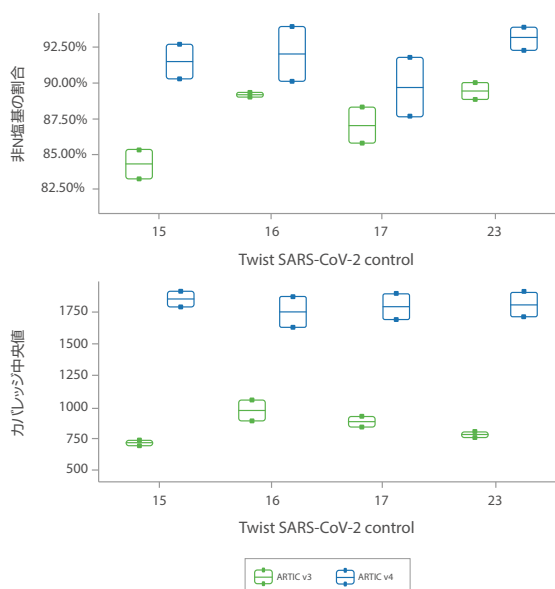


図1：SARS-CoV-2ゲノムカバレッジの向上：ARTIC v4プライマーは、非N塩基の割合およびカバレッジ中央値で測定した場合、Twist Synthetic RNA Control中のウイルスゲノムカバレッジの向上を示しました。人工コントロールは、実際のウイルスサンプルよりも低いゲノムカバレッジとなることが予測されています。

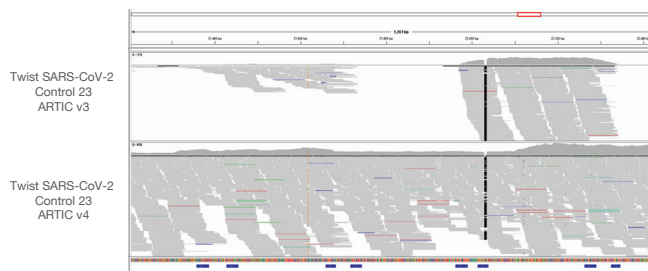


図2：スパイクタンパク質座位におけるカバレッジの向上：ARTIC v4プライマーは、Twist SARS-CoV-2 Control 23のスパイクタンパク質座位でより均一なカバレッジを示しました。

### COVID陽性NPスワブサンプルにおけるパフォーマンスの向上

ARTIC v4プライマープールのパフォーマンスは、COVID陽性NPスワブサンプルを用いて評価しました。SARS-CoV-2ウイルスターゲットは、NPサンプルから同様のレベルで検出されました（データ省略）。NPサンプル中のウイルスゲノムカバレッジは、ARTIC v4プライマーによって向上しました（図3）。

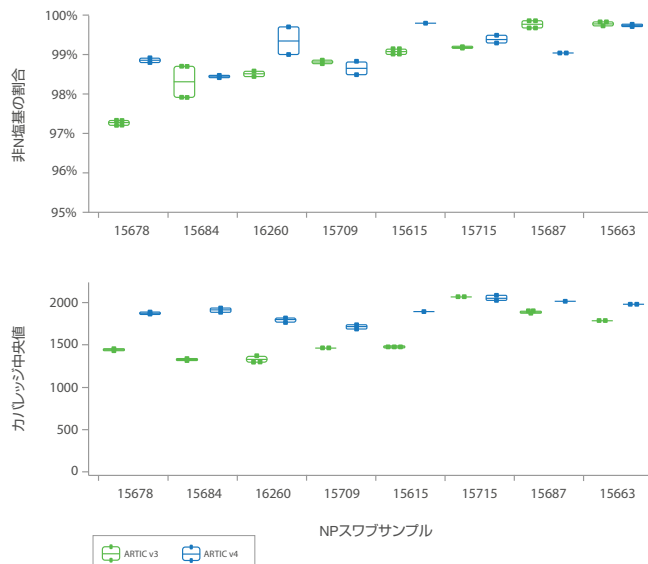


図3：NPスワブサンプルにおけるSARS-CoV-2ゲノムカバレッジの向上：ARTIC v4プライマーは、未決定塩基割合およびカバレッジ中央値で測定した場合、NPサンプル中のウイルスゲノムカバレッジの向上を示しました。

ウイルスゲノムカバレッジは、B.1.617.2 (Δ) 変異株COVID陽性NPスワブサンプルで評価しました。特にスパイクタンパク質座位でARTIC v3と比較した場合、ARTIC v4プライマーはより均一なカバレッジを示しました (図4)。

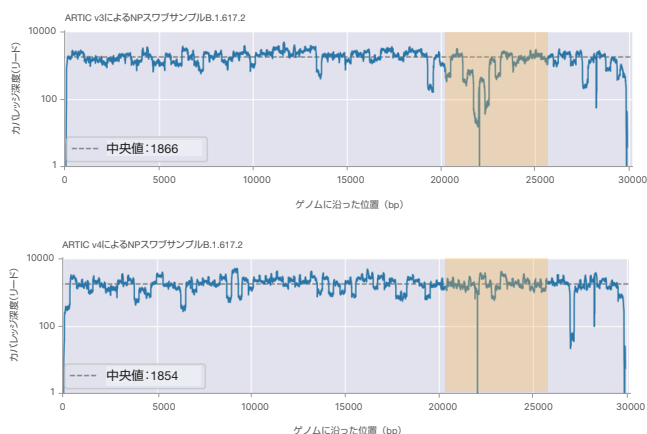


図4: B.1.617.2 (Δ) 変異株SARS-CoV-2におけるゲノムカバレッジの向上: ARTIC v4プライマー (下) は、スパイクタンパク質座位中のより均一なウイルスゲノムカバレッジを示しました (ハイライト領域)。どちらのプライマープールにも認められる鋭いカバレッジの降下は、ドロップアウトではなく、実際の6塩基欠失です。

## 高力価および低力価のNPスワブサンプルにおけるパフォーマンスの向上

高いウイルス力価 (qPCR Ct値27以下) のあるB.1.617.2 (Δ) 変異株COVID陽性NPスワブサンプルのウイルスゲノムカバレッジに対してARTIC v4プライマープールを評価しました。ARTIC v4プライマーは、さまざまなリード深度にわたり75 bp×2および150 bp×2のリード長でパフォーマンスの向上を示しました (図5Aおよび図5B)。低いウイルス力価 (qPCR Ct値30以上) のB.1.617.2 (Δ) 変異株COVID陽性NPスワブサンプルにARTIC v4プライマーを用いた場合でもパフォーマンスの向上が認められました (図5C)。

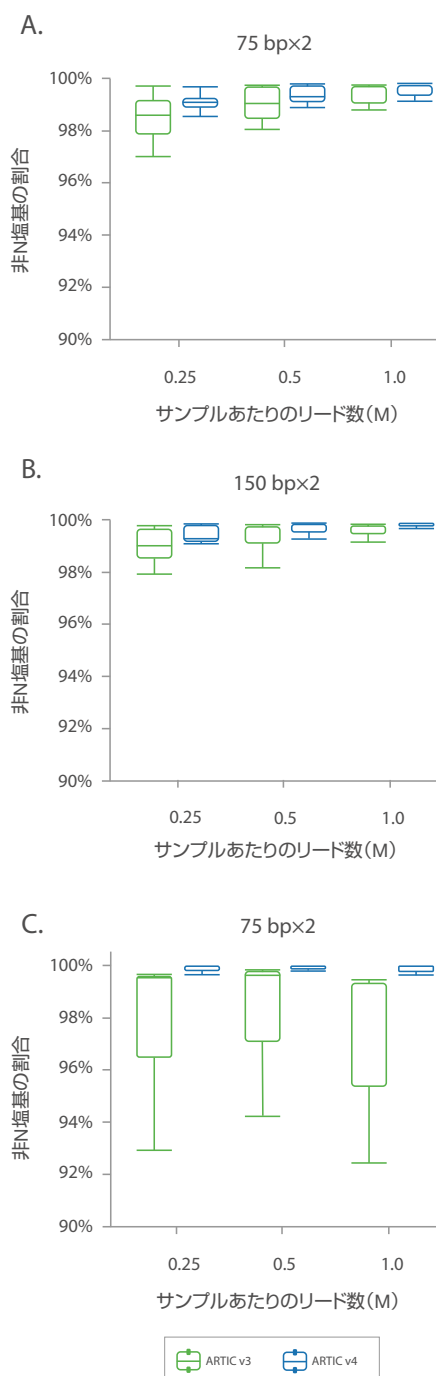


図5: 高力価および低力価のCOVID陽性NPスワブサンプルにおけるSARS-CoV-2ゲノムカバレッジ: ARTIC v4プライマーは、(A) 75 bp×2および (B) 150 bp×2のリード長での高力価COVID陽性NPスワブサンプル、および (C) 低力価COVID陽性サンプルにおいてウイルスゲノムカバレッジの向上を示しました。

## まとめ

COVID-19パンデミック中の新規SARS-CoV-2変異株の発生と蔓延から、シーケンスに基づくウイルスサーベイランスの必要性は明らかです。Illumina COVIDSeq Assay (96 samples)は、少数サンプルに対応し、小規模な臨床研究ラボが新規SARS-CoV-2変異株と系統の発生と蔓延率を同定、追跡することができます。本キットに含まれるARTIC v3プライマープールは、SARS-CoV-2検出とジェノタイプングに高い機能がありますが、ARTIC v4プライマープール（付属品として購入可能）は、特にスパイクタンパク質座位のウイルスゲノムカバレッジを増加することから、ARTIC v4プライマープールは詳細なSARS-CoV-2シーケンスのために完全なゲノムカバレッジを必要とするラボに最適であることが示されています。

## 詳細はこちら

Illumina COVIDSeq Assay (96 samples) : [jp.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/covidseq-assay.html](http://jp.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/covidseq-assay.html)

## 参考文献

1. World Health Organization. WHO Director-General's statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus (2019-nCoV). 30 January 2020.
2. Baric, RS. Emergence of a highly fit SARS-CoV-2 variant. *N Engl J Med*. 2020;383:2684-2686.
3. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, et al. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science*. 2021; doi:10.1126/science.abf6950.
4. Addetia A, Xie H, Roychoudhury P, et al. Identification of multiple large deletions in ORF7a resulting in in-frame gene fusions in clinical SARS-CoV-2 isolates. *J Clin Virol*. 2020; 129:104523.
5. Rosenthal SH, Kagan RM, Gerasimova A, et al. Identification of eight SARS-CoV-2 ORF7a deletion variants in 2,726 clinical specimens. *bioRxiv*. 2020; doi.org/10.1101/2020.12.10.418855.

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
[jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illuminakk](https://www.facebook.com/illuminakk)

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : [jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc.または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. M-GL-00408 v1.0-JPN 07JAN2022

**illumina**<sup>®</sup>