

# illumina COVIDSeq™ Assay (96 samples)로 향상되는 성능

ARTIC v4 primer pool은  
SARS-CoV-2 변이에 대해 높은  
유전체 커버리지를 제공합니다

illumina®

## 용이해진 COVID-19 감시

전 세계에서 COVID-19 팬데믹이 1년이 넘도록 맹위를 떨치고 있습니다.<sup>1</sup> 델타 변이의 등장과 전염력과 치사율이 더 높을 수 있는 새로운 SARS-CoV-2 변이는 공중 보건 노력, 일부 진단 검사, 팬데믹 대응을 위해 개발된 백신에 대한 우려를 불러일으켰습니다.<sup>2</sup> 이러한 우려를 해소하기 위해서는 새로운 SARS-CoV-2 변이를 확인하고 모니터링하는 유전체 감시(genomic surveillance)가 필요합니다. Illumina는 유전체 감시를 원하지만 대용량 시퀀싱 시스템과 대형 Library Prep Kit에 대한 자본적 지출 부담이 커 실행을 망설이는 랩을 위해 Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)를 제공하고 있습니다. Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)는 비교적 작은 규모의 랩에서 적은 수의 샘플로 새로운 SARS-CoV-2 변이 및 계통(lineage)의 등장과 확산을 파악하고 추적할 수 있도록 낮은 수준 내지 중간 수준의 처리량을 제공하는 앰플리콘(amplicon) 기반의 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) assay입니다.

Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)에는 공개적으로 사용 가능한 검증된 ARTIC multiplex PCR protocol을 기반으로 SARS-CoV-2 RNA의 검출과 특성 규명을 위해 개발된 ARTIC v3 primer pool이 포함되어 있습니다. 한편 ARTIC v3 primer pool을 변경하고 최적화된 ARTIC v4 primer pool은 Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)의 SARS-CoV-2 검출 및 변이 검출 성능을 향상하도록 설계된 제품입니다. 본 Technical Note를 통해 COVID-19 감시를 목적으로 Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)와 ARTIC v4 primer pool을 함께 사용했을 때 바이러스 검출 분석 민감도가 향상되고 바이러스 유전체 커버리지(viral genome coverage)가 높아진다는 사실을 확인할 수 있습니다.

## 실험 디자인

### 샘플 준비

다양한 COVID 변이의 대표로 Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control(표 1)의 바이러스 카피(copy) 200개를 Universal Human Reference(UHR) RNA(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호: QS0639)의 백그라운드에 spike-in하여 네 개의 인위적(contrived) 샘플을 준비했습니다. qPCR을 통해 COVID 양성으로 판정된 비인두(nasopharyngeal, NP) 스왑 샘플에서 추출한 RNA(Ct 값 ≤ 30)도 실험에 포함했습니다.

표 1: 인위적 SARS-CoV-2 샘플

Twist Synthetic RNA Control	Pangolin 명명법 <sup>a</sup>	WHO 라벨 <sup>b</sup>	Twist 카탈로그 번호
15	B.1.1.7	알파	103909
16	B.1.351	베타	104043
17	P.1	감마	104044
23	B.1.617.2	델타	104533

a. Pangolin(Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages)은 SARS-CoV-2 계통의 동적 명명법을 구현하기 위해 개발됨.

b. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 과학적인 배경이 없는 청중이 SARS-CoV-2 변이를 논의할 때 그리스 알파벳을 순서대로 붙인 명칭을 사용할 것을 제한함.

### 라이브러리 준비

모든 샘플의 라이브러리는 Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)와 해당 키트에 포함된 ARTIC v3 primer pool 그리고 액세서리 제품인 ARTIC v4 primer pool을 함께 사용하여 동시에 준비했습니다.

### 시퀀싱

이렇게 준비한 라이브러리는 2 x 74 bp 및 2 x 150 bp의 리드 길이(read length)에서 NextSeq 500/550 Mid-Output v2.5 Kit(150 cycles 또는 300 cycles)를 사용하여 NextSeq™ 550Dx 기기로 시퀀싱했습니다. ARTIC v4 primer pool은 COVIDSeq Test(RUO)와 COVIDSeq Assay(96 samples)를 사용하여 iSeq 100부터 NovaSeq 6000 시스템까지 모든 Illumina 시퀀싱 시스템으로 검증을 하였는데, 플랫폼 간에 유의한 성능 차이는 관찰되지 않았습니다(데이터 미포함).

### DRAGEN™ COVID Lineage App을 이용한 분석

NextSeq 550Dx 기기로 생성한 FASTQ 시퀀싱 파일을 SARS-CoV-2 참조 유전체(reference genome)에 정렬(alignment)하기 위해 BaseSpace™ Sequence Hub의 Illumina DRAGEN COVID Lineage App v3.5.4에 업로드했습니다. Illumina DRAGEN COVID Lineage App은 업로드된 FASTQ 파일을 사용하여 매핑/정렬, 변이 검출, 공동 시퀀스(consensus sequence) 생성을 수행합니다. 계통 및 분기군(clade) 검출(즉, 계통학적(phylogenetic) 검출)은 FASTA 공동 시퀀스에 접근한 후 이를 최신 버전의 Pangolin에 비교함으로써 진행됩니다.

## 결과

### 인위적 샘플에서 확인된 성능 향상

Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control로 준비한 인위적 샘플을 이용해 ARTIC v4 primer pool의 성능을 평가했습니다. 바이러스 유전체 커버리지를 % non-N bases(캡처된 유전체(genome captured)의 백분율을 정량적으로 측정할 수치)와 커버리지 중앙값(median coverage)으로 측정하여 평가한 결과, 모든 인위적 샘플에서 ARTIC v4 primer의 성능이 향상된 것을 확인할 수 있었습니다(그림 1). 특히 주목할 만한 점은 ARTIC v4 primer가 SARS-CoV-2 유전체의 핵심 영역인 스파이크 단백질 유전자좌(spike protein locus)<sup>3-5</sup> 내에서 더 균일한 커버리지를 보였다는 것입니다(그림 2).

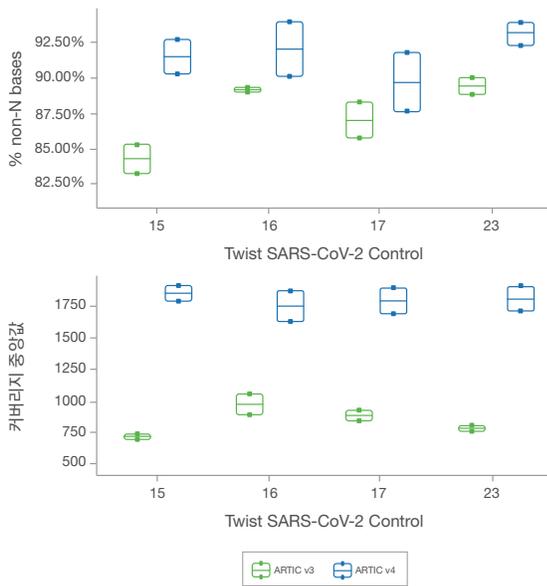


그림 1: 높아진 SARS-CoV-2 유전체 커버리지 — % non-N bases 및 커버리지 중앙값으로 측정된 결과, 모든 Twist Synthetic RNA Control에서 ARTIC v4 primer의 높아진 바이러스 유전체 커버리지가 관찰됨. 참고로 인위적 Control은 실제 바이러스 샘플보다 유전체 커버리지가 낮을 것으로 예상됨.

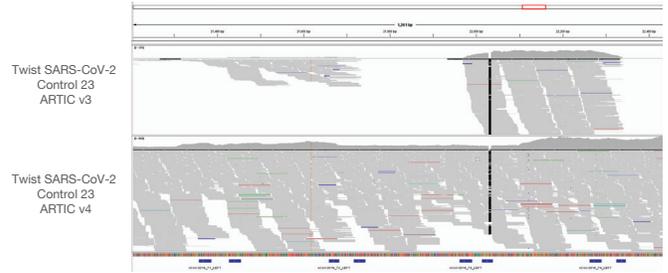


그림 2: 스파이크 단백질 유전자좌에서 확인된 높아진 커버리지 — ARTIC v4 primer는 Twist SARS-CoV-2 Control 23의 스파이크 단백질 유전자좌에서 더 균일한 커버리지를 보임.

### COVID 양성 NP 스왑 샘플에서 확인된 성능 향상

COVID 양성 NP 스왑 샘플을 사용하여 ARTIC v4 primer pool의 성능을 평가했습니다. 모든 NP 샘플에 걸쳐 유사한 수준의 SARS-CoV-2 바이러스 표적(target)이 검출되었습니다(데이터 미포함). 또한 모든 NP 샘플에서 ARTIC v4 primer의 바이러스 유전체 커버리지가 높아진 것으로 나타났습니다(그림 3).

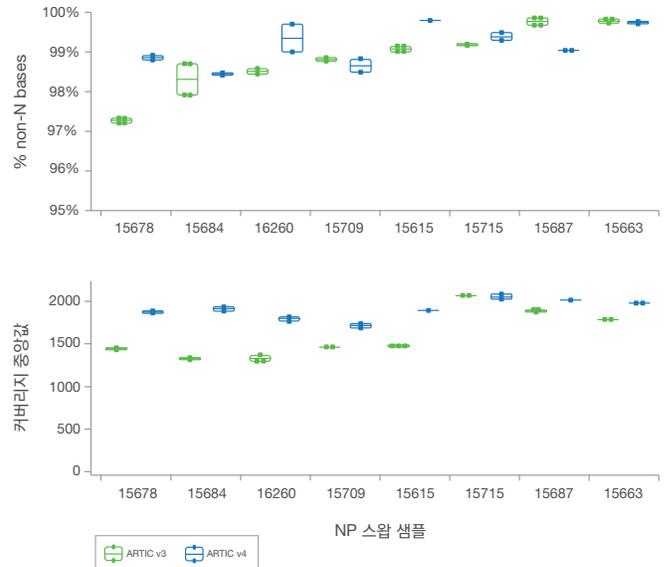


그림 3: NP 스왑 샘플에서 확인된 높아진 SARS-CoV-2 유전체 커버리지 — % non-N bases 및 커버리지 중앙값으로 측정된 결과, 모든 NP 샘플에서 ARTIC v4 primer의 높아진 바이러스 유전체 커버리지가 관찰됨.

바이러스 유전체 커버리지는 델타(B.1.617.2) 변이 COVID 양성 NP 스왑 샘플을 사용해 평가했습니다. ARTIC v3 primer와 비교했을 때 ARTIC v4 primer는 스파이크 단백질 유전자좌에서 특히 더 균일한 커버리지를 보였습니다(그림 4).

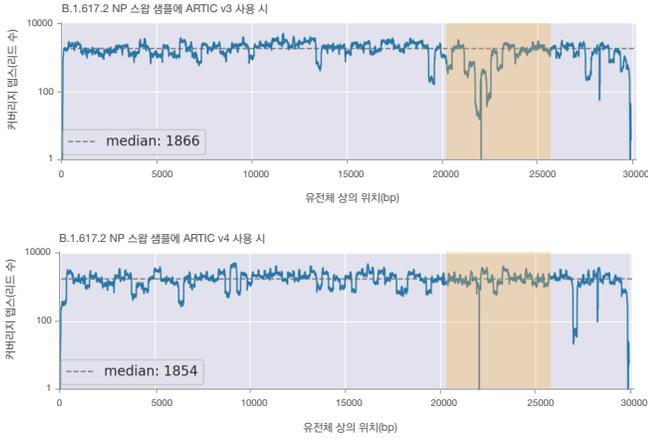


그림 4: 델타(B.1.617.2) 변이 SARS-CoV-2에서 확인된 높아진 유전체 커버리지 — ARTIC v4 primer(하)는 스파이크 단백질 유전자좌(주황색 영역) 전체에 걸쳐 더 균일한 바이러스 유전체 커버리지를 보임. 참고로 ARTIC v3와 ARTIC v4 사용 시 공통적으로 관찰된 급격한 커버리지 감소는 드롭아웃(drop-out)이 아닌 실제 여섯 개의 염기 결실(six-base deletion)을 나타냄.

### 고역가 및 저역가 NP 스왑 샘플에서 확인된 성능 향상

바이러스 역가(viral titer)가 높은 델타(B.1.617.2) 변이 COVID 양성 NP 스왑 샘플(qPCR Ct 값 ≤ 27)을 사용해 ARTIC v4 primer pool의 바이러스 유전체 커버리지를 평가했습니다. ARTIC v4 primer는 2 x 75 bp 및 2 x 150 bp의 리드 길이에서 폭넓은 리드 뎀스(read depth)에 걸쳐 향상된 성능을 보였습니다(그림 5A 및 그림 5B). 또한 ARTIC v4 primer는 바이러스 역가가 낮은 델타(B.1.617.2) 변이 COVID 양성 NP 스왑 샘플(qPCR Ct 값 ≥ 30)을 사용했을 때도 향상된 성능을 보였습니다(그림 5C).

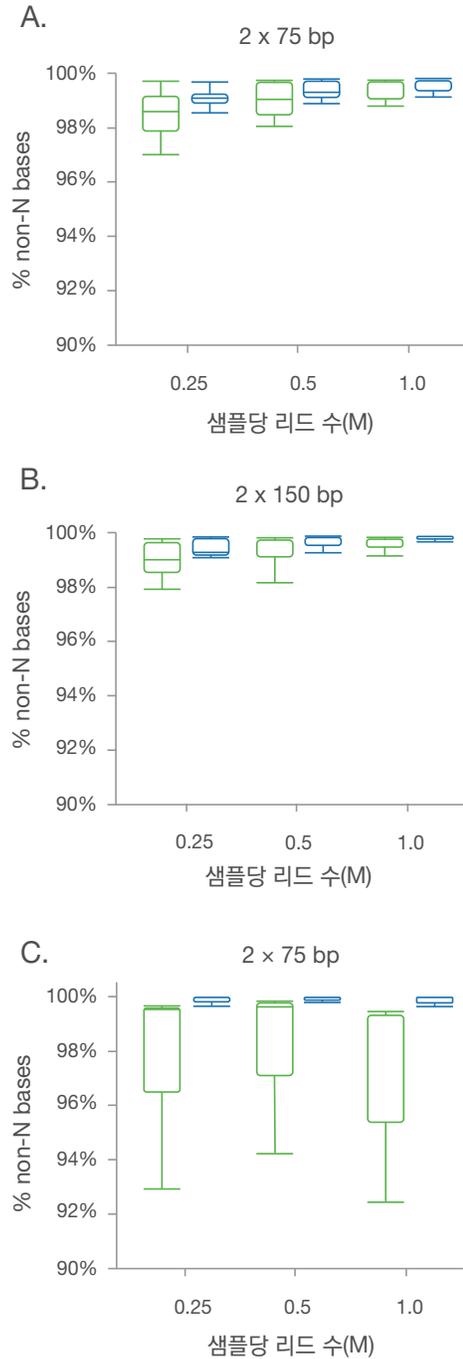


그림 5: 고역가 및 저역가 COVID 양성 NP 스왑 샘플에 대한 SARS-CoV-2 유전체 커버리지 — 고역가 COVID 양성 NP 샘플에서 리드 길이가 2 x 75 bp(A)일 때와 2 x 150 bp(B)일 때 그리고 저역가 COVID 양성 샘플(C)에서 ARTIC v4 primer의 높아진 바이러스 유전체 커버리지가 관찰됨.

## 요약

COVID-19 팬데믹 상황에 새로운 SARS-CoV-2 변이가 등장하고 전파됨에 따라 시퀀싱 기반의 바이러스 감시의 필요성이 대두되고 있습니다. Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)는 비교적 작은 규모의 임상 연구실에서도 새로운 SARS-CoV-2 변이 및 계통의 등장과 확산을 파악하고 추적할 수 있도록 적은 샘플의 사용을 지원합니다. 물론 키트에 포함되어 있는 ARTIC v3 primer pool도 SARS-CoV-2 검출 및 지노타이핑(genotyping, 유전형 분석)에 우수한 성능을 보이지만, 앞서 살펴보았듯이 액세서리 제품인 ARTIC v4 primer pool이 스파이크 단백질 유전자좌에 대해 특히 높은 바이러스 유전체 커버리지를 제공한다는 사실을 고려했을 때, 심층적인 SARS-CoV-2 시퀀싱을 위해 완전한 유전체 커버리지를 원하는 랩에는 ARTIC v4 primer pool이 더 적합할 수도 있습니다.

## 상세 정보

Illumina COVIDSeq Assay(96 samples)에 대한 자세한 내용은 [www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/covidseq-assay.html](http://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/covidseq-assay.html)을 참조하시기 바랍니다.

## 참고 문헌

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.

# illumina®

무료 전화(한국) | 080-234-5300

techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.

특정 상표 정보는 [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html)을 참조하십시오.

M-GL-00408 v1.0 KOR