

# illumina COVIDSeq™ Test (RUO版) を 用いたSARS-CoV-2 オミクロン変異株検出 のためのガイドライン

ARTIC v4プライマープールに11の追加オリゴを添加し、オミクロン変異株に対するほぼ完全なゲノムカバレッジを取得

illumina®

## はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) はCOVID-19パンデミックの原因であり、このパンデミックは、過去1世紀における最大の公衆衛生上の緊急事態の1つとして世界中の数十億もの人々に影響を及ぼしています。<sup>1</sup> この感染力の高いウイルスは変異を獲得し、さまざまな株に進化し、これらのうちのいくつかは、懸念される変異株として公衆衛生コミュニティによって同定されていることから、迅速かつ正確なウイルス検出と特性評価が必要であることは明らかです。<sup>2-5</sup> これらの変異株における変異は、プライマー結合に悪影響を及ぼす可能性があるため、アンプリコンシーケンスメソッドでは問題になることがあります。それに対し、進化するウイルスゲノムを正確にシーケンスし続けるには、プライマープールのアップデートが必要です。

ARTIC Networkは、2020年後半にSARS-CoV-2ゲノムを効率的にシーケンスできるプライマー配列を開発し、発表しました (ARTIC v3)。デルタ変異株 (B.1.617.2) の出現では、この株の多くの変異により、ARTIC v3プライマーを用いたウイルスゲノムに増幅の問題が生じました。<sup>6,7</sup> それに対し、ARTIC Networkは低カバレッジのアンプリコンに対するプライマー配列を設計し直すことで、ARTIC v4プライマープールの構築につながりました。2021年11月初旬に南アフリカでオミクロン変異株 (B.1.1.529) が初めて同定され、その感染速度の速さによって、複数の地域で急速に優勢な変異株となりました。<sup>8,9</sup> プライマー結合部位のオミクロン変異株の新たな変異は、ARTIC v4プライマープールを用いた増幅に悪影響を及ぼすことが考えられました。この問題を解消するために11のプライマーを用いてARTIC v4プライマープールを更新したことで、ARTIC v4.1プールが得られました。

また、ハイブリッドキャプチャーを用いた濃縮によるシーケンスアプローチは変異が多くみられる領域内であっても有効性が持続します。Illumina RNA Prep with Enrichmentを用いたRespiratory Virus Oligo Panel v2は、SARS-CoV-2変異株などの一般的な呼吸器系ウイルスの検出と特性評価が可能です。この濃縮方法を用いたパネルは、新たなSARS-CoV-2変異株のサーベイランスを目的とした「フューチャーブルー (将来を見据えた)」メソッドとして使用できる可能性があります。

本テクニカルノートでは、ARTIC v4.1プールを調製するために11の追加オリゴを添加するプーリングスキームをお示しします。既知のオミクロン系統の鼻咽頭 (NP) スwabサンプルを用いて、ARTIC v4プールとv4.1プールの機能試験の結果を明らかにします。最後に、Illumina RNA Prep with Enrichmentを用いたRespiratory Virus Oligo Panel v2について、オミクロン陽性サンプルを用いて評価し、SARS-CoV-2変異株ゲノムの変異を克服するための性能を判定します。

## 実験方法

### サンプル調製

30の上気道検体は、COVID-19関連症状を発現した人からフロック鼻咽頭スワブとPrimeStore Molecular Transport Media (MTM) (Longhorn Vaccines & Diagnostics, LLC) を用いて収集しました。KingFisher Flex Magnetic Particle Processor with 96 Deep Well head (Thermo Fisher Scientific) とMagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号: A48383) をハイスルーブットの核酸抽出に使用しました。Synthetic RNA Control 48 (B.1.1.529/BA.1) (Twist Bioscience、カタログ番号: 105204) は、オミクロン変異株検出の陽性コントロールとして200コピーの合成ウイルスを用いてアッセイしました。TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号: A47814) を使用して、Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号: 4485701) およびCOVID-19 Interpretive Software (Thermo Fisher Scientific) を用いたリアルタイムqPCRからSARS-CoV-2のORF1abおよびNタンパク質遺伝子を検出しました。

Respiratory Virus Oligo Panelでは、NPスワブで採取した1サンプルを収集し、上記と同様の方法に従ってRNAの抽出、増幅を実施しました。このサンプルは、N遺伝子についてはqPCR Ct値が14.4、Orf\_1abについては13.2となりました。Synthetic RNA Control 48 (B.1.1.529/BA.1) は、オミクロン変異株検出の陽性コントロールとして1,700コピーの合成ウイルスを用いてアッセイしました。

### ライブラリー調製

サンプルは、Illumina COVIDSeq Test (RUO版)<sup>†</sup> (イルミナ、カタログ番号: 20043675) にARTIC v4またはv4.1プールのいずれかを使用し、デュプリケートで処理しました。v4.1プールを調製するためのプライマーは、25 nmoleのカスタムDNAオリゴとしてIntegrated DNA Technologies (IDT) から注文し、100 μMのIDTEバッファー<sup>†</sup>に懸濁しました (表1)。プライマーは100 μMの各チューブから等量ずつプールしてから10 μMに希釈し、2種類の添加プールを作製し、それぞれC4P1およびC4P2プライマープールのチューブに添加しました。

\* この試験の一環として評価していませんが、Illumina COVIDSeq Assay (96 samples)を用いた場合でも同様の結果が予想されると考えられます。

† IDTE (10 mM Tris, 0.2 mM EDTA) は、オリゴの懸濁および保存に使用することがIDTから推奨されています。

表1: 添加プールプライマー

C4P1.1添加プールプライマー	
プライマー名	プライマー配列
SARS-CoV-2_23_RIGHT_alt1	AGAATCTAAACCACTAAGACAAACACTAC
SARS-CoV-2_27_RIGHT_alt1	AATGTTGTGACTTTTTGCTACCTGC
SARS-CoV-2_79_RIGHT_alt1	AATTGGTGGTGTTTTGTAATTTGTTTGAC
SARS-CoV-2_89_LEFT_alt1	TAGGTTTCCTATTCCCTTACATGGATTTGT
SARS-CoV-2_89_RIGHT_alt1	CTAGATGGTGTCCAGCAATACGAAG
C4P2.1添加プールプライマー	
プライマー名	プライマー配列
SARS-CoV-2_10_LEFT_alt1	TGAATATCACTTTTGAACCTTGATGAAAGGATTG
SARS-CoV-2_10_RIGHT_alt1	GGTTGAAGAGCAGCAGAAGTG
SARS-CoV-2_76_LEFT_alt1	ATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGT
SARS-CoV-2_76_RIGHT_alt1	GTCCACAAACAGTTGCTGGTG
SARS-CoV-2_88_LEFT_alt1	TTATGTACTCATTGTTTCGGAAGAG
SARS-CoV-2_90_RIGHT_alt1	ATTAGTAATATCTCTGCTATAGTAACCTGAAAG

表2: プライマープールの調製

C4P1.1の調製			
サンプル数	C4P1.1プールの合計量	C4P1の量	C4P1.1添加プールの量
1	4.30 µL	4.10 µL	0.20 µL
96	412.80 µL	393.14 µL	19.66 µL
384	1,651.20 µL	1,572.57 µL	78.63 µL
C4P2.1の調製			
サンプル数	C4P2.1プールの合計量	C4P2の量	C4P2.1添加プールの量
1	4.30 µL	4.06 µL	0.24 µL
96	412.80 µL	389.43 µL	23.37 µL
384	1,651.20 µL	1,557.74 µL	93.46 µL

添加したプールの量は各プライマーの等モル量のインプットとなるように計算しました(表2)。

COVIDSeq v4およびv4.1ライブラリーは、Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent, カタログ番号: 5067-4626) を用いてアッセイし、予測したライブラリー収量とサイズを確認しました。v4およびv4.1ライブラリープールのいずれもシーケンス用に十分な収量があり(それぞれ、60.12 nMおよび76.96 nM)、ライブラリーサイズは予測した中央値でした(それぞれ、310 bpおよび315 bp)。

### Respiratory Virus Oligo Panel

ライブラリーは、Illumina RNA Prep with Enrichment (イルミナ, カタログ番号: 20040536) およびIDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes (イルミナ, カタログ番号: 20027213) を使用して、NPスワブサンプルのRNAを用いて調製しました。また、Synthetic RNA Control 48は、陽性コントロールとして、プロトコルの「変性RNA」ステップで1,700コピーの合成ウイルスのインプットを用いてアッセイしました。増幅後、サンプルをRespiratory Virus Oligos Panel v2 (イルミナ, カタログ番号: 20044311) を用いてシングルプレックス反応として濃縮しました。NPスワブサンプルおよびControl 48のいずれもデュプリケートでアッセイしました。濃縮したライブラリーは、上記と同様にアッセイし、予測したライブラリー収量(11.65 nM)とサイズ(421 bp)を確認しました。

### シーケンス

調製したライブラリーを、『NextSeq™ 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Denature and Dilute Libraries Guide』に従って変性、希釈し、74 bp × 2のペアエンドリード構成のNextSeq High Output Kit v2.5 (150 cycles) (イルミナ, カタログ番号: 20024907) を用いて、NextSeq 550システムでシーケンスしました。

### データ解析

FASTQファイルは、BaseSpace™ FASTQ Generationアプリv1.0.0を用いてランデータから生成し、200万ペアエンドリード当たり100万クラスターの同一の深度にダウンサンプリングしました。詳細な解析は、BaseSpace Sequence HubのDRAGEN™ COVID Lineageアプリv3.5.5で実施しました。COVIDSeqライブラリーに対して、プライマートリミングのために選択したv4またはv4.1いずれかのBrowser Extensible Data (BED) ファイルを用いたデフォルトパラメーターを使用しました。濃縮ライブラリーに対して、プライマートリミングのために選択した「None (なし)」BEDファイルを用いたデフォルトパラメーターを使用しました。アンプリコンカバレッジは、DRAGEN COVID Lineageアプリから、「カウント」として報告されました。

## 結果

### ARTIC v4およびv4.1プールの評価

全NPサンプルとコントロール中のSARS-CoV-2 RNAの存在は、qPCRによって確認しました(図1)。DRAGEN COVID Lineageアプリを用いたシーケンスデータの解析より、オミクロン変異株(BA.1)として分類されました(データ示さず)。

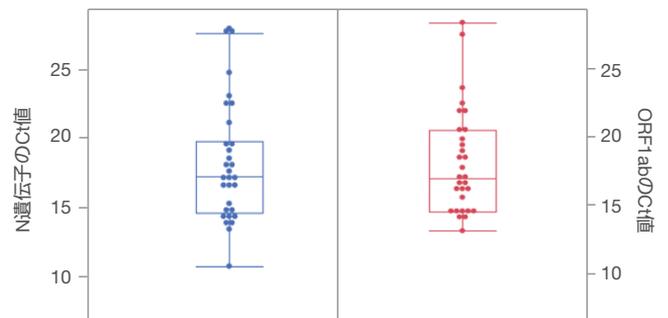


図1: qPCRによるSARS-CoV-2 RNAの検出: Nタンパク質(青色)およびORF1ab(赤色) 遺伝子領域についてプロットしたCt値。アッセイしたすべてのサンプルでSARS-CoV-2 RNAの存在が確認されました。

ARTIC v4およびv4.1プライマープールの性能は、Illumina COVIDSeq Test (RUO版) を使用して評価しました。キャプチャーしたゲノムの平均パーセントは、非N塩基(10×以上のカバレッジ)の割合として報告され、v4およびv4.1はそれぞれ98.50%および99.66%でした。カバレッジ中央値の平均は、v4およびv4.1はそれぞれ、1788および1748でした(図2)。

増幅について、ARTIC v4およびv4.1プライマープールを使用した場合の差を検証するために、各アンプリコンに対するカバレッジをプロットしました。ARTIC Networkが実施した*in silico*解析では、アンプリコン10、23、27、76、79、88、89および90はオミクロンに分類されたサンプルにおいて性能低下を示す可能性があると予測されました。Synthetic RNA Control 48はアンプリコンカバレッジに対する品質管理(QC)として使用することができます。3回のテクニカルレプリケートのシーケンスの結果より、アンプリコン10、23、27および88はどちらのプライマープールでも影響しなかったことが示されました(データ示さず)。アンプリコン76、89および90は、カバレッジ中にほぼ完全なドロップアウトがありましたが、アンプリコン79はv4プールを用いたレプリケート間のカウントに広い幅があることが示されました。アンプリコン90を除いて、すべてのアンプリコンはv4.1プールでスキューされました(表3)。

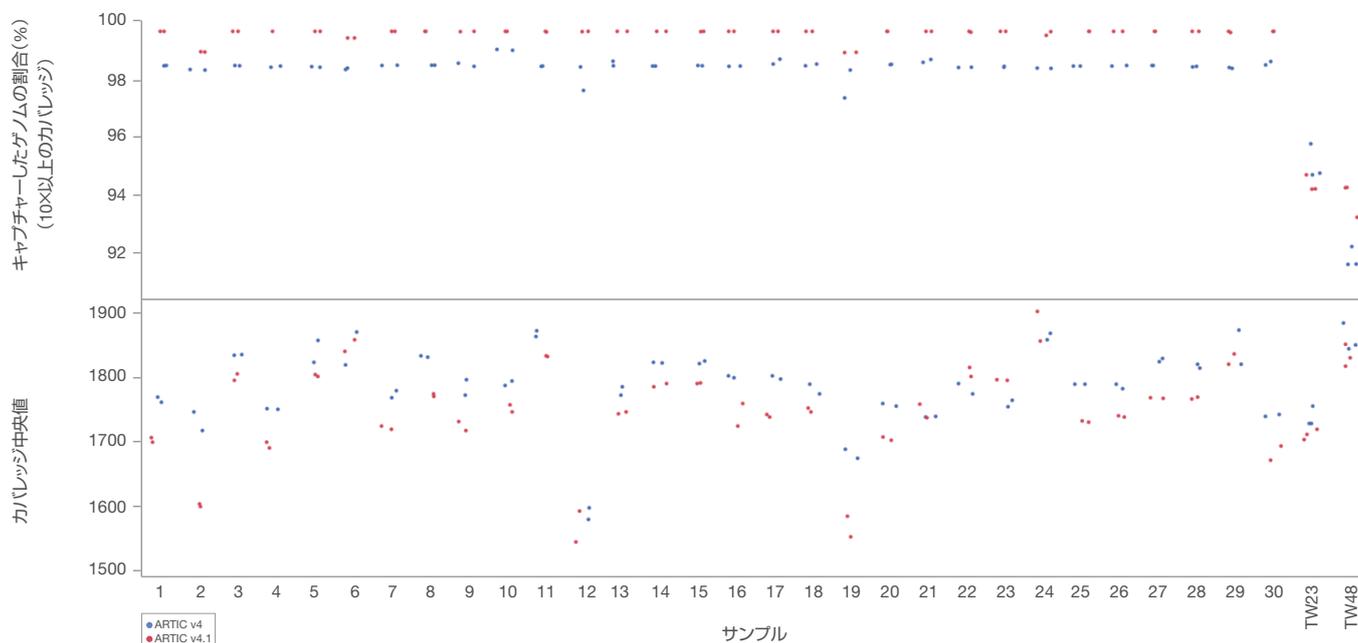


図2: ARTIC v4およびv4.1プライマープールでアッセイを行ったNPサンプルのウイルスゲノムカバレッジ: v4 (青色) およびv4.1 (赤色) プライマープールに対してウイルスゲノムカバレッジをアッセイしました。キャプチャーしたゲノムの平均パーセントは、非N塩基 (10×以上のカバレッジ) の割合として報告され、v4およびv4.1はそれぞれ98.50%および99.66%でした。カバレッジ中央値の平均は、v4およびv4.1はそれぞれ1788および1748でした。

表3: RNA Control 48を用いたアンプリコンカバレッジ

アンプリコン	ARTIC v4	ARTIC v4.1
76	ドロップアウト	レスキュー
79	広いカウント幅	レスキュー
89	ドロップアウト	レスキュー
90	ドロップアウト	ドロップアウト

v4プールで増幅したサンプルライブラリーについて、アンプリコン76と90はカバレッジがほぼ完全にドロップアウトし、アンプリコン79、88および89はサンプル間のカウントに広い幅があることが示されました (図3A、図3C)。Synthetic RNA Control 48を用いた結果と同様に、アンプリコン10、23および27のカバレッジはどのv4増幅ライブラリーでも影響しませんでした (図3A、図3C)。

これらの結果とv4.1プールで増幅した同一のサンプルライブラリーとの比較より、アンプリコン76と90のカバレッジがレスキューされ、アンプリコン79、88および89のカウントの幅が狭まったことが示されました (図3B、図3D)。これらのアンプリコンの性能向上は、v4.1プールに追加したプライマーが寄与したものと考えられます。また、これらの結果は、v4およびv4.1プライマープールを用いたアンプリコンカバレッジのQCに対して、Synthetic Control 48が使用できることも証明しています。

v4.1プールを調製する11プライマーがバリエーション検出の分析感度に影響を及ぼす、または新しいPCRアーチファクトを取り込む可能性があるかを特定するために、v4およびv4.1プールで増幅したサンプル間のバリエーションコールを比較しました。結果より、バリエーションG22813T、T22882GおよびG22898Aは、v4.1を用いて増幅した58ライブラリーのうちの55ライブラリーにおいてアンプリコン76に一貫して検出されましたが、v4では検出されませんでした。

シーケンス深度を視覚化するためにIntegrated Genomics Viewer (IGV) を用いた詳細な検証を行ったところ、v4増幅ライブラリーのG22813T、T22882GおよびG22898Aでバリエーションコールの欠損をもたらすアンプリコン76におけるカバレッジギャップが示されました (図4)。

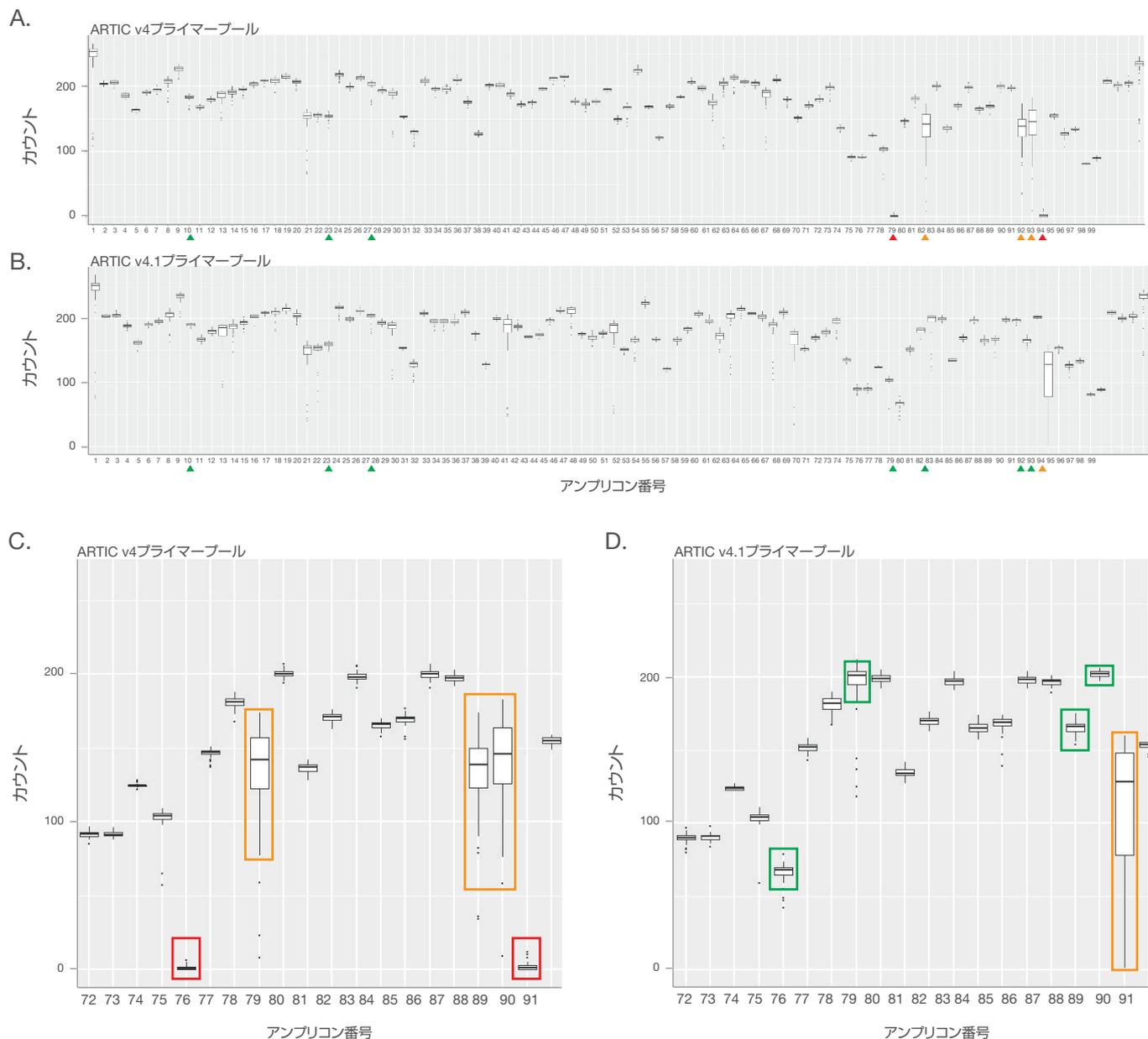


図3: ARTIC v4およびv4.1プライマープールでアッセイを行ったNPサンプルのアンプリコンカバレッジ: ARTIC v4およびARTIC v4.1プライマープールで生成された、全アンプリコン (A, B)、およびスパイクタンパク質領域のアンプリコン72~84 (C, D) のカバレッジをプロットしました。アンプリコン10、23および27は、どちらのプールでもカバレッジへの悪影響を示しませんでした (AおよびBの緑色矢じり)。v4プールの場合、アンプリコン76と90はほぼ完全なドロップアウトを示し (Aの赤色矢じり、Cの赤色囲み)、アンプリコン79、88および89は、サンプル間でカウントに広い幅が示されました (Aのオレンジ色矢じり、Cのオレンジ色の囲み)。ARTIC v4.1プールでは、アンプリコン76、79、88および89がレスキューされました (Bの緑色矢じり、Dの緑色囲み)。

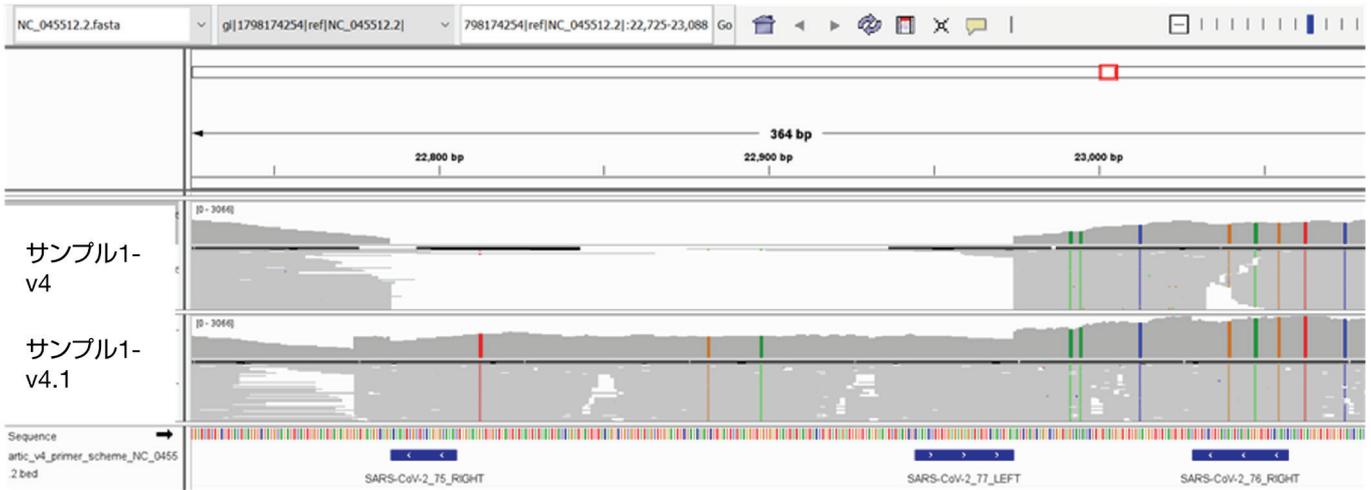


図4: ARTIC v4およびv4.1プールを用いたアンプリコン76のカバレッジ: IGVを用いたシーケンス深度の視覚化により、ARTIC v4プールを用いた場合のアンプリコン76のカバレッジギャップが示されました。これは、G22813T、T22882GおよびG22898Aでバリエーションコールがなかったことによるものであり、v4.1プールを用いた場合には問題なくコールされました。

## SARS-CoV-2変異株のカバレッジ取得のための Respiratory Virus Oligo Panelを用いた濃縮

SARS-CoV-2変異株ゲノムにおける変異を克服するために、Respiratory Virus Oligo Panel v2を用いてターゲット化した濃縮方法を評価するために、NPスワブで採取したオミクロン陽性1サンプルおよびSynthetic RNA control 48を、Illumina RNA Prep with Enrichmentワークフローで処理しました。結果より、NPスワブサンプルおよびControl 48のキャプチャーしたゲノムの割合は、それぞれ99.99%および99.53%であったことが示されました (図5)。NPスワブサンプルとControl 48のカバレッジ中央値は、それぞれ1963および82でした (図5)。

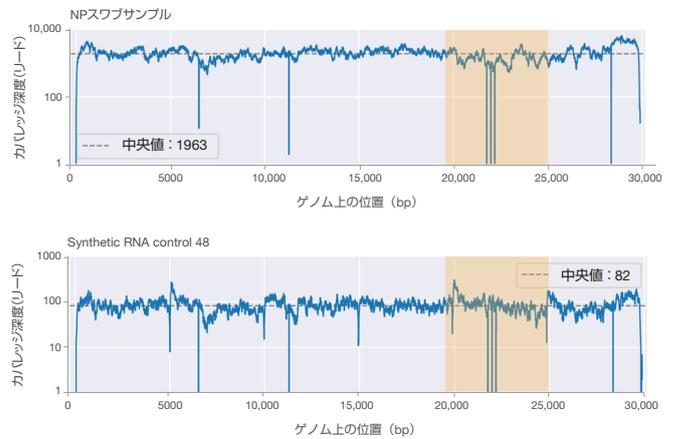


図5: Respiratory Virus Oligo Panel v2を用いたSARS-CoV-2オミクロン変異株 (BA.1) のゲノムカバレッジ: NPスワブサンプル (上) とControl 48 (下) のキャプチャーしたゲノムの割合は、それぞれ99.99%および99.53%であり、カバレッジ中央値は、それぞれ1963および82でした。注意: カバレッジに観測された低下は、濃縮またはアッセイの性能によるものではなく、ゲノム内の欠損によるものです。

## まとめ

COVID-19パンデミック下における新しいSARS-CoV-2変異株の出現とまん延から、シーケンシングを用いたウイルスサーベイランスの必要性は明らかです。本テクニカルノートでは、DRAGEN COVID Lineageアプリと共に使用したIllumina COVIDSeq Test (RUO版)によって、ARTIC v4とv4.1プライマープールのいずれを用いてもSARS-CoV-2系統が正しく分類されることを証明しました。さらに、v4プールはほぼ完全なコンセンサスゲノムをもたらす一方で、一部のアンプリコンは、オミクロン株を含むSARS-CoV-2変異株のカバレッジが低下することを示しました。ウイルスゲノムの包括的なカバレッジについて、本テクニカルノートのガイドラインでは、ARTIC v4.1プライマープールを調製、使用することでアンプリコンのドロップアウトを克服できることをお示しました。また、新しいプローブデザインとパネルのメンテナンスの負担を避けたい場合、Illumina RNA Prep with Enrichmentを用いてRespiratory Virus Oligo Panel v2を使用することで、SARS-CoV-2変異株の発生時に包括的なゲノムカバレッジが得られます。

## 詳細はこちら

Illumina COVIDSeq Test (RUO版) : [jp.illumina.com/covidseq](https://jp.illumina.com/covidseq)

## 参考文献

1. World Health Organization. [WHO Director-General's statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus \(2019-nCoV\)](#). Published January 30, 2020. Accessed January 20, 2022.
2. Baric, RS. [Emergence of a highly fit SARS-CoV-2 variant](#). *N Engl J Med*.2020;383:2684–2686. doi: 10.1056/NEJMci2032888.
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.
6. Mlcochova P, Kemp SA, Shanker Dhar M, et al. [SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion](#). *Nature*.2021;599(7883):114-119. doi: 10.1038/s41586-021-03944-y.
7. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. [Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization](#). *Nature*. 2021;596(7871):276-280. doi: 10.1038/s41586-021-03777-9.
8. Saxena SK, Kumar S, Ansari S, et al. [Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron \(B.1.1.529\) variant of concern and its global perspective](#). *J Med Virol*.2021; Dec 14. doi: 10.1002/jmv.27524.
9. Thakur V, Ratho RK. [OMICRON \(B.1.1.529\): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear](#). *J Med Virol*.2021; Dec 22. doi: 10.1002/jmv.27541.

## 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](https://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](https://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](https://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-00691 v1.0-JPN 01MAR2022

**illumina**<sup>®</sup>