

# NGSを用いたターゲットキャプチャによる新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検出と分析

## はじめに

一本鎖RNAウイルスであるSARS-CoV-2は、世界的流行中の新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の原因です。プライマーを用いてSARS-CoV-2ウイルスの対象領域を増幅するRT-PCR（逆転写PCR）は、COVID-19感染症を検出するための迅速な検査法です。しかし、迅速検査に留まらず、ウイルスの経時的な広がりや進化を監視するために、変異を含むウイルスゲノム全体を解析できる高感度検査も必要です。

Twistの核酸ハイブリダイゼーションキャプチャベースのアッセイは、新興ウイルス病原体を検出および追跡する手法として研究者に用いられています。以前に、Twistは米国陸軍感染症研究所（USAMRIID）およびイルミナ社と共同でNGS用に、すべてのヒトウイルスのターゲットエンリッチメントのためのキャプチャプローブからなる大規模パネルPan Viral 1.0を開発しました。これには、1000種以上のヒトウイルスのターゲットエンリッチメント用の60万を超えるプローブが含まれています。Pan Viral 1.0 NGSアッセイパネルは、2015年に西アフリカで大流行したエボラウイルスをキャプチャするためにUSAMRIIDが使用しました。また、2017年にナイジェリアで大流行したサル痘ウイルスを分析するために、セネガルのダカール・パスツール研究所が使用しました。

現在進行中のCOVID-19パンデミックの間、当社はSARS-CoV-2の検出と分析のために、同様でより特異的な手法を用いることにしました。SARS-CoV-2 (MN908947.3)参照ゲノム配列全体をターゲットとするプローブを含む、キャプチャパネルを設計しました。また、SARS-CoV-2 (MT007544.1)の全長を、重複しない6つの断片で合成し、その後RNAに転写しました。SARS-CoV-2 (MT007544.1)ゲノムにはパネルのゲノムと比較して、3か所のSNPと1か所のインデル領域が含まれます。合成したウイルス一本鎖RNAを、キャプチャアッセイの陽性コントロールとして、ヒトリファレンスRNAにスパイクイン（添加）しました。このアプリケーションノートには、以下のことが示されています。

1. わずか10コピーのウイルス性物質を10万倍を超える濃縮効率で検出。
2. 濃縮により、1X以上でゲノムの99.9%超をカバー。
3. SARS-CoV-2コントロールMN908947.3中の変異を同定。

## 材料と方法

合成RNA SARS-CoV-2コントロールを作成するため、参照ゲノム配列MT007544.1 ([ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT007544](https://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT007544))およびMN908947.3 ([ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947](https://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947))を6つの非重複断片に分割しました。断片は二本鎖DNAとして合成し、その後RNAに転写されました。次に、SARS-CoV-2 (MT007544.1) RNAコントロールをキャプチャに用いました。

50 ngのヒトリファレンスRNA (Agilent Technologies (740000-41))のバックグラウンドにサンプルあたり10~100万ウイルスコピー数の範囲で合成SARS-CoV-2 RNAをスパイクイン（添加）しました（表1）。ヒトリファレンスRNAのみから構成されたネガティブコントロールも並行して処理しました。次に、RNAサンプルは、NEBのRandom Primer 6 (S1230S)、ProtoScript II First Strand cDNA合成キット(E6560S)、NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand合成キット(E6111S)のランダムプライマーを使用して、cDNAに変換しました。cDNAサンプルは、酵素による断片化を用いたTwist Library Preparation Kit (PN 101059 and 100401)と、Unique Dual Indices(UDI) (PN 101307)を用いて、Illumina TruSeq-Compatibleライブラリに変換しました。

濃縮はTwist SARS-CoV-2 Research Panel (PN 102016、PN 102017、またはPN 102018)を用いて、シングルプレックスキャプチャ反応に500 ngのライブラリを使用し、16時間のハイブリダイゼーションで実施しました。濃縮したライブラリは、NextSeq500/550 High Outputキットを使用し、Illumina NextSeqプラットフォームで2x75bpのペアエンドリード法でシーケンスしました。BWAを用いて、SARS-CoV-2ゲノム配列およびヒトリファレンスゲノム(hg38)に対してアライメントを実行しました。特に記載のない限り、アライメントされたリードは100万リードにダウンサンプリングされています。

最新の情報をご案内させていただきます。  
 下記までお問い合わせください。  
 TEL: 045-345-5840（平日9-17時）  
[jsalescustomer@twistbioscience.com](mailto:jsalescustomer@twistbioscience.com)