

Twist Respiratory Virus Research Panelを用いたウイルス性病原体のNGSターゲットエンリッチメント

はじめに

2019年の新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のパンデミックにより悪化した世界の保健衛生の懸念により、ウイルス性病原体を正確に検出・同定することは非常に重要です。広範なウイルス性病原体が患者に類似する症状を引き起こし、原因の感染病原体を特定することは困難です。現在、ウイルス性病原体の検出には日常的にRT-PCR法が使用されています。これらの一般的な測定法は迅速ですが、多くの場合、一度に1つの病原体だけを検査するために使用されています。マルチプレックスRT-PCRは時間を節約し、複数のウイルスの同時検出と同定を可能にしますが、ウイルスの配列情報の欠如など、いくつかの欠点があります。次世代シーケンス(NGS)ハイブリッドキャプチャは、ハイスループットと高感度を併せ持ち、複雑なサンプルから特定の全ウイルスゲノムを迅速に同定することが可能です。

[Twist SARS-CoV-2 Research Panel](#)を用いたアプリケーションノートでは、NGSベースのターゲットエンリッチメントがどのようにSARS-CoV-2のウイルスゲノムの検出と分析に上手く適用されたかを明らかにしました。ターゲットエンリッチメントにより、ウイルス力価の低いサンプルでキャプチャ後のウイルス画分を約100万倍濃縮し、1000コピーのウイルス力価サンプルでわずか25000リードから99.9%のゲノムカバレッジが得られることを示しました。しかも、このキャプチャベースの手法は、ウイルス変異に許容性を示し、SARS-CoV-2ウイルスのさまざまなタイプの変異を同定することに成功しました。ウイルスゲノムを検出し、同時に分析できることから、ハイブリッドキャプチャはRT-PCRに代わる強力な手段として、ウイルスの進化を監視し、人口規模での調査を実施できるようになります。

感染症のターゲットキャプチャを活用するTwistの専門知識のもとに、呼吸器系疾患の一般的な症状に関連する複数のウイルス性病原体を検出できるパネルを作成しました。このパネルはTwist Respiratory Virus Research Panelと呼ばれ、29の一般的な呼吸器ウイルスを濃縮するために設計されています。このパネルを検証するため、Twist SARS-CoV-2合成RNAコントロールに加えて、一本鎖RNAおよび一本鎖DNAの両方を用いた15種類のウイルスコントロールを合成しました。これらのコントロールをヒトリファレンスRNAにスパイクイン（添加）し、ターゲットエンリッチメント用のTruSeq-compatible DNAライブラリを作成しました。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。

- 1 100万コピーで16種類の合成ウイルス株をキャプチャ。
- 2 100~100万コピーのウイルス力価範囲で、3種のウイルス株をキャプチャ。
- 3 同時感染のシミュレーションで、各1万コピーの2種類のウイルスゲノムを同時キャプチャ。
- 4 100~100万コピーのウイルス力価範囲で、さまざまなウイルスゲノムを効率的にマルチプレックスキャプチャ。

結果

Twist Respiratory Virus Research Panelは、コロナウイルス(CoV)、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ボカウイルス(hBoV)、エンテロウイルス、メタニューモウイルス、パラインフルエンザ(hPIV)、ヒトライノウイルス(HRV)、麻疹ウイルス(MeV)、おたふく風邪ウイルス(MuV)、風疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)など、29種類の一般的なヒト呼吸器ウイルスの参照配列をターゲットにしています（表4）。追加のプロープは、2000年以降の主なインフルエンザAとBの流行を表す多様なゲノムを標的とし、これに77種の追加のライノウイルス株の多様性を組み込んで設計されています。

Twist Respiratory Virus Research Panelの性能を検証するために、ネイティブのゲノム構造に応じて、さまざまな合成ウイルスを一本鎖RNAまたは一本鎖DNAとして設計および合成しました。合成ウイルスのシーケンスを確認後、以降の実験のために約100万コピー/μlに希釈してストックしました。

各ウイルス合成コントロールを50gのヒトリファレンスRNAにスパイクインし、それを使用してIllumina TruSeq-compatibleライブラリを生成しました（各サンプル100万コピー）。次に、Twist Respiratory Virus Research Panelを使用して、16時間のハイブリダイゼーション時間を用いるTwist Target Enrichment Protocolに従ってウイルス配列をキャプチャしました。ほとんどの場合、シーケンスの70%以上がライブラリのウイルスゲノム由来であり、スパイクインされたコンテンツよりも最低2500倍濃縮されていることが判明しました（図1）。

例外の1つが、ヒトボカウイルス(hBoV)でした。テストした中で最小のものが、ヒトボカウイルスのゲノムです。テンプレートが短いほど、同じ力価でもライブラリに対するコンテンツが少なくなります。実際、ウイルスリードの合計割合は、短いテンプレートでは一般的に低くなりますが、濃縮倍率（テンプレート長に正規化）は一般的に高くなっています（図1）。さらに、ボカウイルスは一本鎖DNAゲノムですが、テストしたその他のウイルスは一本鎖RNAゲノムです。同程度の長さの一本鎖RNAウイルスは、非常に高い濃縮度を示すため、ライブラリ調製時の一本鎖DNAの収量低下が、低いキャプチャ効率につながったと考えられます。

ボカウイルスとその他の一本鎖RNAウイルスのキャプチャの違いにもかかわらず、すべての合成スタンダードがFold 80ベースペナルティ1.2~1.5の、非常に均一な深いリード深度でシーケンスされました。100万のシーケンスリードで、すべてのテンプレートが中央値で1500xの深度で塩基の少なくとも99%が最低30xの深度でカバーされ（図1）、信頼性の高いバリエーションコールとde novoアセンブリが可能です。



次に、16時間のハイブリダイゼーション時間で、さまざまな力価（ライブラリあたり100、1万、100万コピー）の3種類の合成一本鎖RNAウイルスゲノム（H3N2、H1N1、HRV）をキャプチャすることで、Twist Respiratory Virus Research Panelの感度を測定しました。各ウイルスはテストしたすべての力価で最低5000倍に濃縮され、低力価のウイルステンプレートでは2万倍以上の濃縮が見られました（表1）。Twist Respiratory Virus Research Panelは数桁異なる範囲の力価で存在するウイルスシーケンスを効率的に濃縮し、100コピーまでの低い検出限界を示しました。

Twist Respiratory Virus Research Panelは1回の反応で複数のウイルスを検出または分析するために、1回のキャプチャで複数のウイルスを対象とするように設計されています。呼吸困難や不快な症状を持つ患者では、しばしばヒト呼吸器病原体の同時感染が起っています。一般的な同時感染には、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)とコロナウイルス(Martin et al 2012)やヒトボカウイルスとパラインフルエンザウイルス(Zhang et al 2012)などがあります。

ライブラリ調製時に、複数の合成ウイルスコントロールを単一のサンプルにスパイクインすることにより、同時感染をシミュレーションしました。次のコントロールを、ライブラリあたり各ウイルス1万コピーで、50ngのヒトリファレンスRNAにスパイクインしました。

- ヒトライノウイルス89（一本鎖RNA）とヒトボカウイルス1（一本鎖DNA）
- SARS-CoV-2（一本鎖RNA）とヒトコロナウイルス229E（一本鎖RNA）
- SARS-CoV-2（一本鎖RNA）とインフルエンザH3N2（一本鎖RNA）
- SARS-CoV-2（一本鎖RNA）とヒトライノウイルス89（一本鎖RNA）

次に、16時間のハイブリダイゼーション時間でTwist Respiratory Virus Research Panelを使用して、ライブラリをキャプチャしました。合計ウイルス含有量、濃縮倍率、様々なリード数でのテンプレートカバレッジを測定し、キャプチャ性能を評価しました（表2）。両方のテンプレートとも、それぞれの同時感染実験で1xでは、ほぼ完全にカバーされ、テンプレート全体で概して良好な均一性を示しました（表2と図2）。これは同じウイルス科（例えばコロナウイルス229EとSARS-CoV-2）でも、異なるウイルス科（例えばヒトライノウイルスとヒトボカウイルス）でも当てはまりました。ヒトボカウイルスを除く実験したすべてのウイルスで、30x以上で塩基の99%以上がカバーされました。ヒトボカウイルスの30xおよび100x深度が比較的低いカバレッジである理由は、一本鎖DNAからのライブラリ調製効率が低いためであると考えられます。

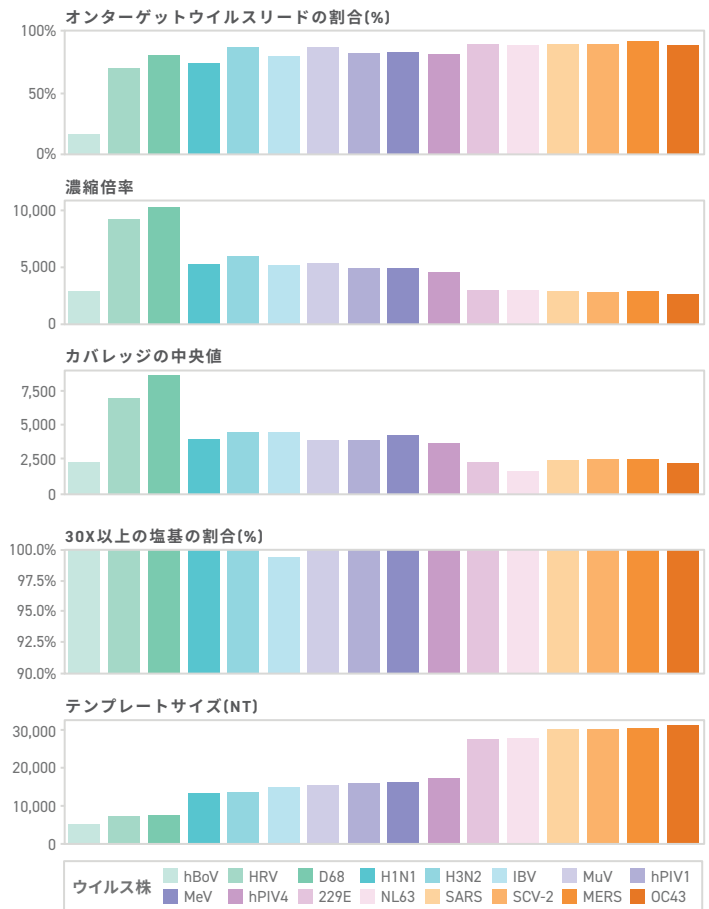


図1：異なるウイルス科からのウイルススタンダードの検出。cDNA合成前に、50ngのヒトキャリアRNAに各Twist合成ウイルスコントロール100万コピーをスパイクインしました。各スタンダードについて、オンターゲットのウイルスリード、インプットに対する濃縮倍率、ゲノム全体の中央値カバレッジ、30x以上のカバレッジ塩基の割合、テンプレート長を示しました。ウイルスゲノムはすべてのゲノムセグメントで、テンプレートの長さ順（最短から最長）に並べました。各ウイルス略語の完全名を表3に示します。

ウイルス株	ウイルス力価 (コピー)	濃縮なしで予想されるリード数 (合計100万のうち)	オンターゲットウイルスリードの数 (合計100万のうち)	濃縮倍率
H1N1	100	<1	402	28704
	10,000	1	53964	38531
	1,000,000	140	715054	5106
H3N2	100	<1	349	24025
	10,000	1	40081	27631
	1,000,000	145	818155	5640
HRV	100	<1	1453	190849
	10,000	1	26185	34393
	1,000,000	76	682086	8959

表1：Twist Respiratory Virus Research Panelを使用して、さまざまな力価でウイルスをキャプチャしました。インフルエンザH1N1、インフルエンザH3N2、またはHRVを100、1万、100万コピーのヒトRNAバックグラウンドにスパイクインしました。ウイルステンプレートから予想されるリード数、測定されたリード数、キャプチャの濃縮倍率を示しています。数字は2レプリケートの平均を表します。各ウイルス略語の完全名を表3に示します。

グループ	ウイルス株	オンターゲットウイルスリードの割合	濃縮倍率	1Xカバレッジ	30Xカバレッジ	100Xカバレッジ
1	HRV	2.1%	27263	100.0%	99.4%	91.4%
	hBoV	0.2%	4218	100.0%	63.6%	0.0%
2	SCV-2	23.4%	73403	99.9%	99.9%	99.7%
	229E	6.8%	23380	99.9%	99.7%	90.9%
3	SCV-2	21.9%	68657	99.9%	99.9%	99.7%
	H3N2	3.3%	22678	100.0%	99.3%	86.6%
4	SCV-2	30.2%	94734	99.9%	99.9%	99.8%
	HRV	2.2%	29070	100.0%	99.8%	93.6%

表2：シミュレートされた同時感染の検出。50ngのヒトRNAのバックグラウンドに、2種類の合成ウイルス標準をウイルスあたり1万コピースパイクインしました。オンターゲットのリードの割合、濃縮率、1x、30x、100x深度のカバレッジが、各実験の両方の株について示されています。数字は2レプリケートの平均を表します。各ウイルス略語の完全名を表3に示します。



図2：合成SARS-CoV-2とヒトライノウイルス(HRV)標準を使用した同時感染キャプチャ実験からの、リード密度のゲノムブラウザ表示。各ウイルス略語の完全名を表3に示します。

最後に、マルチプレックスキャプチャ系で、Twist Respiratory Virus Research Panelをテストしました。この系により、研究者はシングルプレックスキャプチャと同等のウイルスキャプチャ効率を維持しながら、測定のコストと時間を削減できます。様々なウイルスカバレッジの（ライブラリにユニークなインデックス配列を付加した）8つのサンプルを単一のハイブリダイゼーションチューブにプールして、8プレックスのキャプチャ反応を行いました。

図3の最初のグラフは、ライブラリあたり100万コピーを使用したマルチプレックスおよびシングルプレックスハイブリダイゼーション反応の比較、2番目のグラフは、ライブラリあたり100、1万、100万コピーを使用した同様の比較を示しています。各ウイルスコントロールは、Twist Standard Target EnrichmentワークフローとTwist Respiratory Virus Research Panelを使用してキャプチャされました。このデータはTwist Respiratory Virus Research Panelを使用したときに、8プレックスキャプチャが1プレックスキャプチャと同等の濃縮効率となることを示しています。

TwistのターゲットエンリッチメントプロトコルとTwist Respiratory Virus Research Panelの高いキャプチャ効率により、ネガティブコントロールのデータ結果に、極低レベルのサンプル間コンタミネーション（クロスコンタミネーション）が見つかることがあります。一般的な注意ですが、サンプル間/またはサンプルとコントロール間のクロスコンタミネーションのリスクを最小化するために、ウイルスコントロールやネガティブコントロールのライブラリは別の時間、または物理的に離れたラボワークスペース内で作成してください。物理的な分離ができない場合には、ライブラリの調製プロセス時に各サンプルの間に空のウェルを置くことで、クロスコンタミネーションの可能性を低減できます。

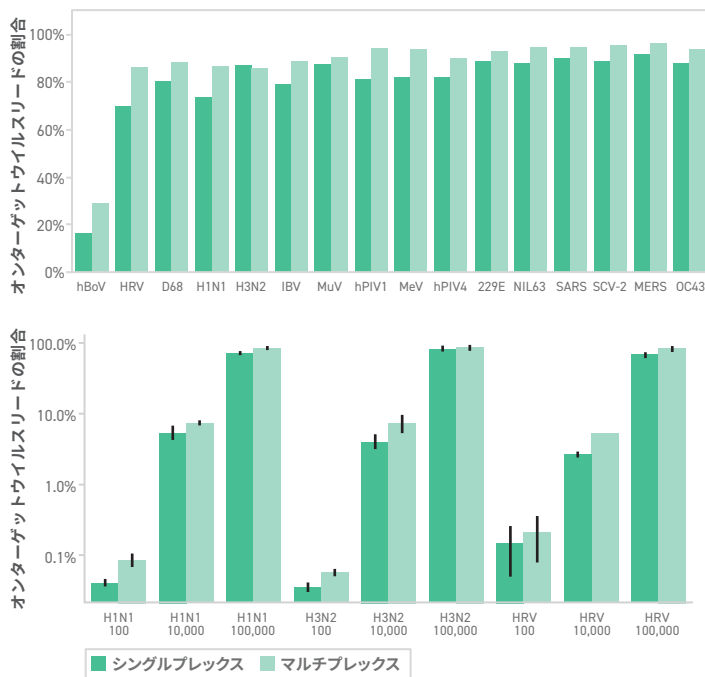


図3：マルチプレックスおよびシングルプレックスハイブリダイゼーション反応を用いて、異なるウイルスカバレッジでTwist Synthetic Viral Controlsを使用してキャプチャされたオンターゲットウイルスリードの割合の比較。各ウイルス略語の完全名を表3に示します。

要約

よくある伝播パターンのため、呼吸器病原体は極度に伝染性があり、流行を制御することは困難です。ウイルスゲノムの進化を監視し、これらの病原体の新しい株を分析する能力は、公衆衛生上の決定に影響を与える可能性のある封じ込めおよび疫学研究にとって重要です。Twist Respiratory Virus Research Panelを、Twistターゲットエンリッチメントソリューションおよび次世代シーケンスと組み合わせることで、1回のアッセイで複数の複数の呼吸器病原体に関する有意義なデータを収集する機会が研究者に提供されます。これらのワークフローは、マルチプレックス系と互換性があり、シーケンス結果の品質に影響を与えることなく、コストと時間を削減します。簡潔なターゲットエンリッチメントワークフローを使用して、Twist Respiratory Virus Research Panelによる呼吸器病原体の検出と分析を行います。

材料と方法

50 ngのヒトリファレンスRNA (Agilent)のバックグラウンドに、サンプルあたり100~100万ウイルスコピー数の範囲でTwist合成RNAおよびDNAコントロールをスパイクインしました (表3)。複数の合成ウイルスコントロールを単一のサンプルにスパイクインすることにより、同時感染をシミュレーションしました。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を並行して処理しました。次に、サンプルは、NEBのRandom Primer 6 (S1230S)のランダムプライマーとProtoScript II First Strand cDNA合成キット (E6560S)を使用して一本鎖cDNAに変換しました。次に、一本鎖cDNAをNEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Kit(E6111S)を使用して二本鎖DNAに変換しました。サンプルは、酵素による断片化を用いたTwist Library Preparation Kit (PN 101059および100401)とUnique Dual Indices(UDI) (PN 101307)を用いて、Illumina TruSeq互換ライブラリに変換しました。

濃縮はTwist Respiratory Virus Research Panel (PN 103066、103067、103068) および16時間のハイブリダイゼーションを用いる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て実施しました。マルチプレックス実験のために、8つのライブラリ (各187.5 ng) をプールし、合計を1500 ngにしました。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でシーケンスしました。パネルの各ウイルスの参照配列と連結されたヒトゲノム (ビルドhg38) から構成されるカスタムゲノムインデックスに対して、BWAを使用してアライメントを実行しました。特に断りのない限り、すべてのデータは、サンプルあたり1Mのマッピングされたリードにダウンサンプリングしました。

参考文献

Martin ET, Kuypers J, Wald A, and Englund JA. *Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children.* Influenza Other Respir Viruses. 2012; 6(1): 71–77.

Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, and Zhou X. *High Incidence of Multiple Viral Infections Identified in Upper Respiratory Tract Infected Children under Three Years of Age in Shanghai, China.* PLoS One. 2012; 7(9): e44568.

カタログ番号	名称	略称	核酸の種類	ストレージ
102024	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3)	SCV-2	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103016	Twist Synthetic Influenza H1N1 (2009) RNA control	H1N1	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103017	Twist Synthetic Influenza H3N2 RNA control	H3N2	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103018	Twist Synthetic Influenza B RNA control	IBV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103019	Twist Synthetic Human bocavirus 1 DNA control	hBoV	一本鎖DNA	-90°C~-70°C
103020	Twist Synthetic Human enterovirus 68 RNA control	D68	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103021	Twist Synthetic Human rhinovirus 89 RNA control	HRV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103022	Twist Synthetic Mumps virus RNA control	MuV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103023	Twist Synthetic Human parainfluenza virus 1 RNA control	hPIV1	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103024	Twist Synthetic Measles virus RNA control	MeV	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103025	Twist Synthetic Human parainfluenza virus 4 RNA control	hPIV4	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103026	Twist Synthetic Human coronavirus 229E RNA control	229E	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103027	Twist Synthetic Human coronavirus NL63 RNA control	NL63	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103028	Twist Synthetic Human coronavirus OC43 RNA control	OC43	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103029	Twist Synthetic SARS coronavirus Tor2 RNA control	SARS	一本鎖RNA	-90°C~-70°C
103030	Twist Synthetic MERS coronavirus 2c EMC/2012 RNA control	MERS	一本鎖RNA	-90°C~-70°C

表3：Twist Respiratory Virus Research Panelの検証に使用した合成コントロール

ウイルス名	アクセッション番号
ヒトアデノウイルス14	JN032132
ヒトアデノウイルスB1	NC_011203.1
ヒトアデノウイルスE	NC_003266
ヒトアデノウイルスタイプ7	AC_000018
ヒトボカウイルス1	MG953830.1
ヒトコロナウイルス229E	NC_002645.1
ヒトコロナウイルスHKU1	NC_006577.2
ヒトコロナウイルスNL63	NC_005831.2
ヒトコロナウイルスOC43	NC_006213.1
ヒトエンテロウイルス68	NC_038308.1
ヒトメタニューモウイルス	NC_039199.1
ヒトパラインフルエンザウイルス1	NC_003461.1
ヒトパラインフルエンザウイルス3	NC_001796.2
ヒトパラインフルエンザウイルス4	NC_021928.1
ヒトライノウイルス3	NC_038312.1
ヒトライノウイルス89	NC_001617.1
ヒトライノウイルスC	NC_009996.1
ヒトルブラウイルス2 (パラインフルエンザウイルス2)	NC_003443.1
インフルエンザB	NC_002211、NC_002204、NC_002210、NC_002209、NC_002208、NC_002207、NC_002206、NC_002205
インフルエンザH1N1 (2009)	NC_026432、NC_026431、NC_026434、NC_026436、NC_026433、NC_026437、NC_026435、NC_026438
インフルエンザH3N2	NC_007369、NC_007373、NC_007372、NC_007371、NC_007366、NC_007368、NC_007367、NC_007370
麻疹	NC_001498.1
MERS	JX869059.2
おたふく風邪	NC_002200.1
呼吸器合胞体ウイルス(A)	NC_001803.1
呼吸器合胞体ウイルス(B)	NC_001781
風疹	NC_001545.2
SARS	NC_004718.3
SARS-CoV-2	NC_045512.2

表4：Twist Respiratory Virus Research Panelの標的ウイルス

主要製品

カタログ番号	名称	説明	ストレージ
101059 : 16反応 101058 : 96反応	Twist Library Preparation EF Kit Twist Library Preparation EF Kit 1 Twist Library Preparation Kit 2	ライブラリ構築用の試薬 5x Fragmentation Enzyme 10x Fragmentation Buffer DNA Ligation Mix DNA Ligation Buffer Amplification Primers、ILMN (Universal Adaptersを使用する場合には、チューブ100220、100583は不要) s DNA Purification Beads	-25°C~-15°C 2°C~8°C
100401 : 16反応 100573 : 96反応	Twist Library Preparation Kit 2	DNA Purification Beads (単体製品として、cDNA合成の際のビーズ精製に必要です)	2°C~8°C
101307 : 16反応 101308、101309、 101310、101311: 96反応	Twist Universal Adapter System - TruSeq Compatible	Twist Universal AdaptersとTwist UDI Primersを用いて、インデックスペアごとに1反応のユニーク・デュアルインデックス付きの組み合わせを提供	-25°C~-15°C
103066 : 2反応 103067 : 12反応 103068 : 96反応	Twist Respiratory Virus Research Panel & One Codex Software	カスタムDNA呼吸器系パネルおよび各反応数相当のOne Codex解析ライセンス	-25°C~-15°C
100856 : 2反応 100578 : 12反応 100767 : 96反応	Twist Universal Blockers	非特異キャプチャの抑止用： Universal Blockers Blocker Solution	-25°C~-15°C
101262 : 2反応 100983 : 12反応 100984 : 96反応	Twist Binding and Purification Beads	ターゲットエンリッチメントと精製用： Streptavidin Binding Beads DNA Purification Beads	2°C~8°C
101279 : 2反応 101025 : 12反応 101026 : 96反応	Twist Hybridization & Wash Kit (2箱) Twist Hybridization試薬 (Box 1 of 2) Twist Wash Buffers (Box 2 of 2)	標準的なハイブリダイゼーションを用いたターゲットエンリッチメント用： Hybridization Mix Hybridization Enhancer Amplification Primers Binding Buffer Wash Buffer 1 Wash Buffer 2	-25°C~-15°C 2°C~8°C

以下の商標の表示は正確であると考えられますが、それを保証するものではありません。Agilent®、Illumina®、NEB®、NEBNext®、NextSeq®、ProtoScript®、TruSeq®。登録済みまたは登録申請中の名称、商標などは、特に商標マークが付されていない場合でも、適用される法律で保護されていないとは見なされません。

Twistの製品は研究専用であり、Twistの供給規約と条件(www.twistbioscience.com/supply-terms-and-conditions)で規定されている追加の使用制限が適用されます。