

新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル

Qiagen 社 QiaSEQ FX 編

- version 1.4 (2022/01/27)-

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

糸川健太郎、関塚剛史、橋野正紀、小神野明紀菜、田中里奈、

衛藤皐、染野里紗、黒田誠

*本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではなく、使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。また本資料の内容は予告なく改定・変更される場合があります。

変更履歴

v1.1	プライマー-version N3 を追記。
v1.2 (2021/9/17)	NEB Q5 を Hot Start 品 (M0493S)に変更 (大きな違いは無い)。 Q5 Hot Start Hi-Fi 2X Master Mix を選択肢として追加。 PCR 産物精製無しのプロトコルを追加。 PCR 反応液の量を半量に変更。 Primer set N3.2 の記述を追加。
v1.3 (2021/12/03)	プライマー-version N4、ARTIC V4、NEB VarSkip Short を追記
V1.4 (2022/01/27)	動画リンクを追加 プライマー-version N5 を追記

使用する試薬・器具等

試薬等消耗品

- NEB 社 LunaScript RT SuperMix Kit (E3010S,L)
- NEB 社 Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (M0493S,L)
または Q5 Hot Start Hi-Fi 2X Master Mix (M0494S,L)
- NEB 社 dNTPs, 10 mM each (NEB) (N0447S,L)
- QIAGEN 社 QIAseq FX DNA Library Kit (180475)
- ThermoFisher 社 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Q32854)
- Beckman Coulter 社 Agencourt AMPure XP (A63881)
- Illumina 社 シーケンシングキット (300-cycle 可能なもの)

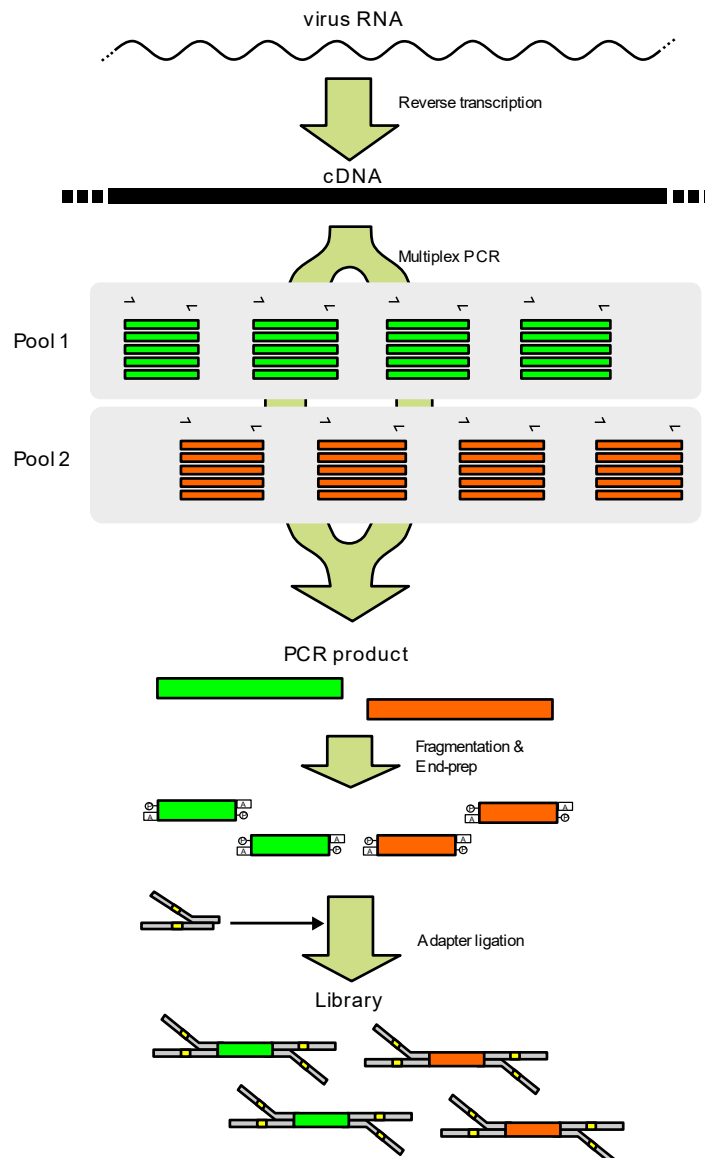
- 50 µM multiplex PCR primers, カートリッジ精製グレード
- Low-TE buffer, pH8.0 (10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA)
またはミリ Q 水で代用可
- 80% エタノール溶液 (用時調整)
- 低吸着性エッペンチューブ (1.5 ml)

器具・機器等

- ThermoFisher 社 Qubit Flex Fluorometer
- Illumina 社 シーケンサー
- PCR Thermal Cycler
- マグネットセパレーター
- 卓上ミニ遠心機・プレート遠心機 (スピンドウン用)
- その他基本的な実験器具類

本プロトコルについて

本プロトコル[1]の主要部分は英国の研究者らを中心としたグループ、ARTIC Network (<https://artic.network/ncov-2019>) によって開発された。すなわち、ナノポアシーケンサー用に開発された ARTIC Network のプロトコル [2] を基に、イルミナ社のショートリードシーケンサー (iSeq100 等)で解析できるように改変されたものである。



1. nCoV-2019 sequencing protocol for illumina V.4 <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-for-illumina-btjqnkmw>
2. nCoV-2019 sequencing protocol v3 (LoCost) V.3, <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-v3-locost-bh42j8ye>

Multiplex PCR primer について

Multiplex PCR のプライマーセットには複数のバージョンが存在する。

- ARTIC Network V1: 2020 年 1 月に発表されたオリジナルのプライマーセット。改良されて現在では使われていない。
https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/tree/master/primer_schemes/nCoV-2019/V1
- NIID ver.N1: 感染研による ARTIC Network V1 の改良版 (Itokawa et al., PLOS ONE, e0239403, 2020)。12 本のプライマーを変更している。
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N1
- NIID ver.N2: NIID ver.N1 に 72_RIGHT_C22A というプライマー一本を Pool2 追加 (2021 年 3 月)。変異株 R.1 系統のゲノムで生じるミスマッチ (G22017T) に対応した形。
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N2
- NIID ver.N3: NIID ver.N2 に 72_RIGHT_b16172a というプライマー一本を Pool2 追加 (2021 年 6 月)。変異株 B.1.617.2 系統のゲノムで生じるミスマッチ (Δ 22029-22034) に対応した形。
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N2
- NIID ver.N3.2: NIID ver.N3 の 64_LEFT & 64_RIGHT の濃度を二倍にした (2021 年 8 月)。変異株 B.1.617.2 系統のゲノムで生じるミスマッチ (C19220T) に対応した形。
- NIID ver.N4: NIID ver.N3 に 5 本のプライマーを追加し、B.1.1.529 オミクロン株に対応。国内で R.1 株が途絶えたと考えられることから 72_RIGHT_C22A を除外 (2021 年 12 月)。
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N4
- **NIID ver.N5:** NIID ver.N4 に 3 本のプライマーを追加し、BA.2 (B.1.1.529.2) オミクロン株に対応。(2022 年 1 月)。
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N5
- ARTIC Network V4: ARTIC Network によるオリジナル (V1) の改良版。
https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/tree/master/primer_schemes/nCoV-2019/V4
- 1200 bp PCR amplicons: Freed et al (2020)によるデザイン。アンプリコンが長いのでプライマーの本数が少なく済む。Ct 値の低い検体であっても、断片化の程度によっては増えにくい。
<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-rapid-barcoding-1200-bh7hj9j6>
- NEB VarSkip Short: NEB 社により変異株のゲノム解析のために、新しく開発された。NEB 社のライブラリキットに同梱される。<https://github.com/nebiolabs/VarSkip>

感染研では現在 **NIID ver.N4** プライマーセットを用いている。プライマーは Pool 1 で（奇数番号プライマー）101 本、Pool 2（偶数番号プライマー）各 101 本、合計 202 本ある。プレート合成等のプランで合成依頼すると安価である。合成したプライマーは、予め Pool 1 と Pool 2 のプライマー同士をそれぞれ以下のように混合し、全体濃度が 50 μM となるようにする。

(例 N5) 各プライマーのストック濃度が 50 μM

Pool 1 (奇数番号)		Pool 2 (偶数番号)	
Primer name	vol	Primer name	vol
nCoV-2019_1_LEFT	10 μl	nCoV-2019_2_LEFT	10 μl
nCoV-2019_1_RIGHTv2	10 μl	nCoV-2019_2_RIGHT	10 μl
nCoV-2019_3_RIGHT	10 μl	nCoV-2019_4_RIGHT	10 μl
...
nCoV-2019_97_RIGHT	10 μl	^a nCoV-2019_64_LEFT	20 μl
^d nCoV-2019_73_LEFT_b11529b	10 μl	^a nCoV-2019_64_RIGHT	20 μl
^d nCoV-2019_75_RIGHT_b11529a	10 μl
^d nCoV-2019_83_LEFT_b11529a	10 μl	^b nCoV-2019_74_LEFT	20 μl
^e nCoV-2019_9_LEFT_b16172a	10 μl	^b nCoV-2019_74_RIGHT	20 μl
^e nCoV-2019_15_LEFT_b11529a	10 μl
		nCoV-2019_98_RIGHT	10 μl
		^c nCoV-2019_72_RIGHT_b16172a	10 μl
		^d nCoV-2019_76_LEFT_b11529a	10 μl
		^d nCoV-2019_92_LEFT_b11529a	10 μl
		^e nCoV-2019_34_RIGHT_b11529a	10 μl
Total	1010 μl	Total	1050 μl

ストック濃度が 100 μM の場合、プール後に水 (or Tris-HCl pH8.0) で 2 倍に希釈する。

- デルタ株 C19220T ミスマッチに対応するためプライマー濃度を二倍に上げている。
- アンプリコン 74 は増幅が悪いためプライマー濃度を二倍に上げている。
- B.1.617.2 株の変異に対応するために N3 から追加された。
- B.1.1.529 株の変異に対応するために N4 から追加された。
- BA.2(B.1.1.529.2) 株の変異等に対応するために N5 から追加された。

プロトコル

1. 逆転写反応

[ 動画]

1-1 PCR プレート (or 8 連チューブ) 各ウェルに LunaScript RT SuperMix と検体 RNA を加え混合し、シールする。

RT 反応液

試薬	分量
LunaScript RT SuperMix	1.25 μ l
精製 RNA	5 μ l
Total	6.25 μl

1-2 サーマルサイクラーで次の反応を行なう。

25°C	2 min
55°C	20 min*
95°C	1 min
4°C	Hold

逆転写反応および multiplex PCR に関する注意点

- 鋳型 RNA、PCR 産物 DNA のコンタミネーションには十分注意すること。特に、Multiplex PCR 後のサンプルを処理する作業 (3. プーリング・精製以降) とは場所、器具類等を共有しないようにすることが重要。毎回、陰性コントロール (RNA の代わりに水) を一緒に実験を行うことを推奨する。

*) LunaScript RT SuperMix のプロトコルでは 55°C で 10 min であるが、念のために 20 min で行っている。10 min 延長することによる効用があるかどうかは未確認。

2. Multiplex PCR

[ 動画]

2-1 次の PCR のマスターミックスを調製し、PCR 用のプレート (or 8 連チューブ) の各ウェルに分注する。2X Master Mix または酵素・バッファー分離型の Q5 製品のどちらを使っても構わない。一つの検体について二つの反応 (Pool 1, Pool 2) があることに注意。

Multiplex PCR Master Mix (2X Master Mix 使用の場合 (A))

試薬	Pool1 reaction	Pool2 reaction
Milli-Q 水	3.89 μ L	3.89 μ L
Q5 HS Hi-Fi 2X Master Mix	6.25 μ L	6.25 μ L
Primer Pool 1 (50 μ M)	0.36 μ L	-
Primer Pool 2 (50 μ M)	-	0.36 μ L
Total	10.5 μL	10.5 μL

OR

Multiplex PCR Master Mix (酵素・バッファー分離型使用の場合 (B))

試薬	Pool1 reaction	Pool2 reaction
Milli-Q water	7.3 μ l	7.3 μ l
5 \times Q5 Reaction Buf	2.5 μ l	2.5 μ l
dNTP (10mM each)	0.25 μ l	0.25 μ l
Q5 HS Hi-Fi DNA Polymerase	0.125 μ l	0.125 μ l
Primer Pool 1 (50 μ M)	0.36 μ l	-
Primer Pool 2 (50 μ M)	-	0.36 μ l
Total	10.5 μl	10.5 μl

2-2 cDNA のうち、**2 μ l** を Pool 1 と pool 2 の両反応液にそれぞれ加え、シールする。

2-3 サーマルサイクラーで次の反応ステップを行なう (Total 約 3 時間)。2X Master Mix と酵素・バッファー分離型の Q5 製品で温度条件が異なるので注意。

98 $^{\circ}$ C	30 sec	30 cycles
98 $^{\circ}$ C	15 sec	
x $^{\circ}$ C*	5 min	
4 $^{\circ}$ C	Hold	

(A) 2X Master Mix 使用の場合 x=61 $^{\circ}$ C

② 酵素・バッファー分離型の場合 x=64 °C

*オリジナルのプロトコルより 1°C低い設定となっている。サーマルサイクラーの個体差によって、至適温度の設定が若干異なる場合もある。N1/2/3, ARTIC V3 プライマーセットにおいては、至適温度よりも高くなると **64 番**のアンプリコンのカバレッジが低くなる傾向があることが分かっている。もし継続的に 64 番アンプリコンの低カバレッジが観察される場合、1~2 °C温度を下げるような調整を行うと結果が向上する可能性がある。

逆転写反応および multiplex PCR に関する注意点

- 鋳型 RNA、PCR 産物 DNA のコンタミネーションには十分注意すること。特に、Multiplex PCR 後のサンプルを処理する作業（3. プーリング・精製以降）とは場所、器具類等を共有しないようにすることが重要。

3. PCR 産物混合・精製及び定量

ここでは PCR 産物の混合と精製を行うが、ある程度検体数が多ければ (>24) 混合と水による希釈だけで済ますことも可能。精製無しの場合、短い非特異的産物やプライマーダイマーが取り除かれていない分、精製した場合よりも (5 倍希積分を勘案して) DNA 量が多く検出される。例えば、精製した場合陰性コントロールは通常 <1 ng / μ L であるが、精製無しでは数 ng / μ L 程度の値になる。よって、特に増幅量が低かった検体について精緻なノーマライズはできないのでその点だけ注意されたい。

(PCR 産物精製有り)

3-1 新しいプレート (or 8 連チューブ) を用意し、Pool 1 と Pool 2 の各 PCR 反応液からそれぞれ **5 μ L** ずつ採取し混合する。残りの PCR 反応液は解析結果を確認するまで念のため 20°C で保存する。

3-2 Agencourt AMPure XP のボトルを室温に戻し、沈殿しているビーズをボルテックスでよく混ぜ拡散させる。AMPure XP 溶液を **10 μ L** を各サンプルに加え、よく混ぜる。室温で 5 分間静置する。

3-3 ビーズの洗浄と DNA の溶出を行う。

1. プレートをマグネットスタンドに置き、磁気ビーズが磁石に集まり液が透明になるまで静置する。
2. 磁気ビーズ (DNA が吸着している) を吸わないように気を付けて、上清を除去する。
3. **150 μ L** の 80% エタノール (用事調製) を加える。
4. 30 秒間静置する。
5. 80% エタノールを除去する。
6. エタノール洗浄 (3~5) をもう一度繰り返す。
7. 残存したエタノールが揮発するまでマグネットスタンド上でそのまま静置する。2 ~ 3 分程度。完全に乾燥させる必要はない。
8. マグネットスタンドからプレートを取り出し、Low TE buffer **20 μ L** を各サンプルに加え、磁気ビーズとよく混ぜる。
9. 1 分静置する。
10. マグネットスタンドで 2 分間静置する。
11. 上清を新しいプレートに移す。

3-4 Qubit dsDNA HS Assay Kit* で DNA 濃度を測定する。

(PCR 産物精製無し)

[ [動画](#)]

3'-1 PCR 産物 pool1 と pool2 の各 PCR 反応液からそれぞれ **2 μ l** ずつ採取し採取し、ミリQ水 **16 μ L** と混合し希釈する。

3'-2 Qubit dsDNA HS Assay Kit* で DNA 濃度を測定する。

*0.5 – 100 ng/ μ l の濃度範囲がある程度正確に測定できればその他の DNA 定量法でも可。
NanoDrop (吸光度法) は精度が悪いので推奨しない。

4. NGS ライブラリ調製 (QIASeq FX)

4-1 あらかじめサーマルサイクラーのプログラムを設定し、直ぐに開始できる状態にしておく。

4 °C	1 min
32 °C	6 min
65 °C	30 min
4 °C	Hold

(Head-lid = 80 °C)

[ 動画]

4-2 下記の Fragmentation & End-prep 反応のマスターミックスをサンプル数分調製する。新しい PCR プレート (or 8 連チューブ) を用意し、各ウェルにマスターミックス **10.5 µl** を分注する。

Fragmentation & End-prep Master Mix	
試薬	容量
Milli-Q water	6.75 µl
FX Buffer, 10x	1.25 µl
FX Enzyme Mix	2.5 µl
Total	10.5 µl

4-3 アルミブロックを氷上に置き、Fragmentation & End-prep Master Mix を分注したプレート載せる。

4-4 『3. PCR 産物混合・精製及び定量』で混合され精製 (あるいは希釈) した PCR 産物 **2 µl** を各反応液に加えピペティングでよく混ぜる。DNA の断片化反応は室温でも進行するので、必ず氷上で行うこと。全てのサンプルを入れ終わったらプレートをシールする。

4-5 4-1 で設定したサーマルサイクラーのプログラムを開始し、4 °C に達した時点でプレートを入れる。

4-6 Fragmentation & End-prep 反応が終了したのち、氷上に置く。**1 µl** のインデックス付きアダプター (キット付属) を各サンプルに加える。インデックス<=>サンプル間の対応を、忘れないように必ず記録しておく。使用したアダプタープレートはシールし、保存・再利用する (注意点参照)。

[動画]

4-7 Ligation Master Mix を次のように作成する。

Ligation Master Mix	
試薬	容量
Milli-Q water	4 μ l
Ligation Buffer, 5x	5 μ l
DNA ligase	2.5 μ l
Total	11.5 μl

4-8 氷上に置いたプレート各ウェルに Ligation Master Mix **11.5 μ l** を加え、ピペッティングあるいは軽くボルテックスし良く混ぜる。シールする。

4-8 サーマルサイクラーで次の反応を行なう。

20 °C	15 min
65 °C	20 min
4 °C	Hold
(Head-lid = 80 °C)	

アダプターに関する注意点

- 本プロトコルでは 1/4 にスケールダウンしている都合上、QiaSeqFX キット (96) を使いきるには同じインデックスをそれぞれ 4 回ずつ使用しなければならない。しかし、本来のキットプロトコルでは各インデックスアダプターは使いきりで、アルミシールを開けたウェルのアダプターは再使用しないこととなっている。したがって、使用済みアダプターウェルを保存・再利用したことに起因するトラブルは、自己責任で、メーカー側に帰せられない部分があることを留意されたい。インデックス間のクロスコンタミネーション等には十分注意すること。
- 少数検体で解析を行う際にはカラーバランスに注意してインデックスを選択すること。詳しくは illumina 社資料「Library Pool の際の Index の選び方」 (https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2013_illumina_techsupport_session13.pdf) 等参照。

5. Pooling & 精製

[ 動画]

5-1 ライゲーション反応後のライブラリ溶液を一本のチューブ(1.5 ml or 2 ml, low-binding) にプールする。反応液を全量プールしても構わないが、検体数に応じてプール後の体積が 500 μ l を超えない範囲で採取する (例 5 μ l)。

このプーリングの際に、各ライブラリ溶液から等量の体積を採取すれば、『3. PCR 産物混合・精製及び定量』で定量した PCR 産物の濃度とほぼ比例したリード数が後の NGS 解析で得られるはずである。逆に PCR 産物濃度を基に、ここでの採取量をライブラリ溶液ごとに調整すると各検体のリード数をある程度均等にすることができる。検体数が多く、リード数をなるべく均等に割り当てたい場合有効だが、あまりにも濃度が低いサンプル (< 5 ng / μ l)は、経験上シーケンスが得られてもほとんど全長解析はできないので、採取量の調製は上から下までせいぜい約 5、6 倍までにしておくとよい。

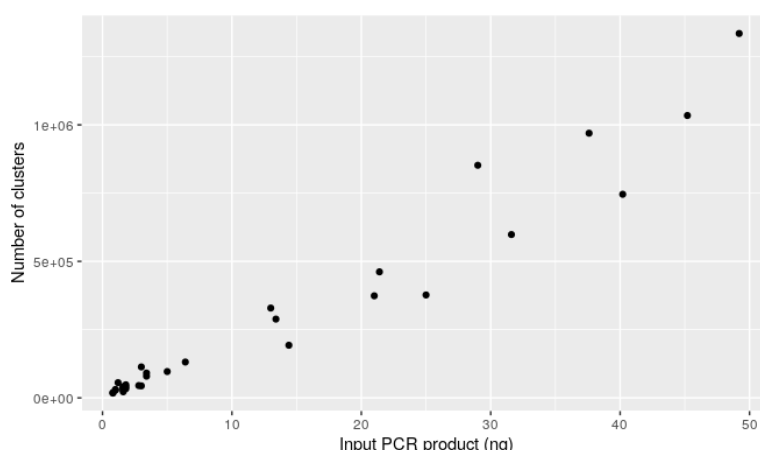


図 ライブラリ調製にインプットした DNA 量と得られたリード数の例 (調整なし)

表 ライブラリプーリングの例

PCR 産物 精製時濃度	調製なし		調製あり		
	採取量	期待出力 (iSeq100)	採取量	期待出力 (iSeq100)	
Sample 1	10 ng/ μ l	3 μ l	88 Mb	6 μ l	293 Mb
Sample 2	40 ng/ μ l	3 μ l	353 Mb	1 μ l	195 Mb
Sample 3	50 ng/ μ l	3 μ l	441 Mb	1 μ l	244 Mb
Sample 4	5 ng/ μ l	3 μ l	44 Mb	6 μ l	146 Mb
Sample 5	1 ng/ μ l	3 μ l	9 Mb	6 μ l	29 Mb
Sample 6	30 ng/ μ l	3 μ l	265 Mb	2 μ l	293 Mb
		18 μ l	1.2 Gb	22 μ l	1.2 Gb

[ 動画]

5-2 ピペットマンのダイヤルを使ってプールされたライブラリ溶液の体積 ($v \mu\text{l}$) を簡単に測定する。

5-3 室温に戻しておいた AMPureXP 溶液をボルテックスで攪拌し $v \times 0.8 \mu\text{l}$ の AMPureXP 溶液をプールされたライブラリ溶液に加える。室温で 5 分静置する。

5-4 以下のようにビーズの洗浄と DNA の溶出を行う。

1. チューブをスピンドウンしマグネットスタンドに置く。磁気ビーズが磁石に集まり液が透明になるまで静置する。
2. ビーズ (DNA が吸着している) を吸わないように気を付けて、上清を除去する。
3. **500 μl** の 80% エタノール (用事調製) を加える。
4. ボルテックスで攪拌し、スピンドウンする。
5. マグネットスタンドに静置し磁気ビーズを集める。
6. 80% エタノールを除去する。
7. エタノール洗浄 (3~6) をもう一度繰り返す。
8. 残存したエタノールが揮発するまでマグネットスタンド上でそのまま静置する。2 ~ 3 分程度。完全に乾燥させる必要はない。
9. マグネットスタンドからチューブを取り出し、milli-Q 水 **50 μl** を加え、磁気ビーズとよく混ぜる。
10. 1 分静置する。
11. スピンドウンしマグネットスタンドで 2 分間静置する。
12. 上清を新しい 1.5 ml low-binding チューブに移す。

5-5 室温に戻しておいた AMPureXP 溶液をボルテックスで攪拌し **60 μl** (1.2x) の AMPureXP 溶液を加える。室温で 5 分静置する

5-6 磁気ビーズの洗浄と DNA の溶出を行う。

1. チューブをスピンドウンしマグネットスタンドに置く。磁気ビーズが磁石に集まり液が透明になるまで静置する。
2. 磁気ビーズ (DNA が吸着している) を吸わないように気を付けて、上清を除去する。
3. **500 μl** の 80% エタノール (用事調製) を加える。

4. ボルテックスで攪拌し、スピンドウンする。
5. マグネットスタンドに静置し磁気ビーズを集める。
6. 80% エタノールを除去する。
7. エタノール洗浄 (3~6) をもう一度繰り返す。
8. 残存したエタノールが揮発するまでマグネットスタンド上でそのまま静置する。2 ~ 3分程度。完全に乾燥させる必要はない。
9. マグネットスタンドからチューブを取り出し、Low-TE **30 μ l** を加え、磁気ビーズとよく混ぜる。
10. 1分静置する。
11. スピンドウンしマグネットスタンドで2分間静置する。
12. 上清を新しい 1.5 ml low-binding チューブに移す。

6. ライブラリ定量・シーケンシング

6-1 普段使用している NGS ライブラリの定量方法を用いて、ライブラリ濃度を測定する。感染研ゲノムセンターでは、qPCR を用いた以下の方法で定量している。

Illumina TruSeq Library quantification with qPCR probe method, <https://www.protocols.io/view/illumina-truseq-library-quantification-with-qpcr-p-bnpamdie>

これまで当センターで作成したライブラリの QuBit dsDNA HS kit による重量濃度 (ng / μ l) の測定値と qPCR によるモル濃度 (nM) の測定値の関係を下図に示す。これを利用してライブラリ濃度を簡便に推定しても良い (モル濃度 \approx (重量濃度 ng/ μ l \times 2.73) nM)。

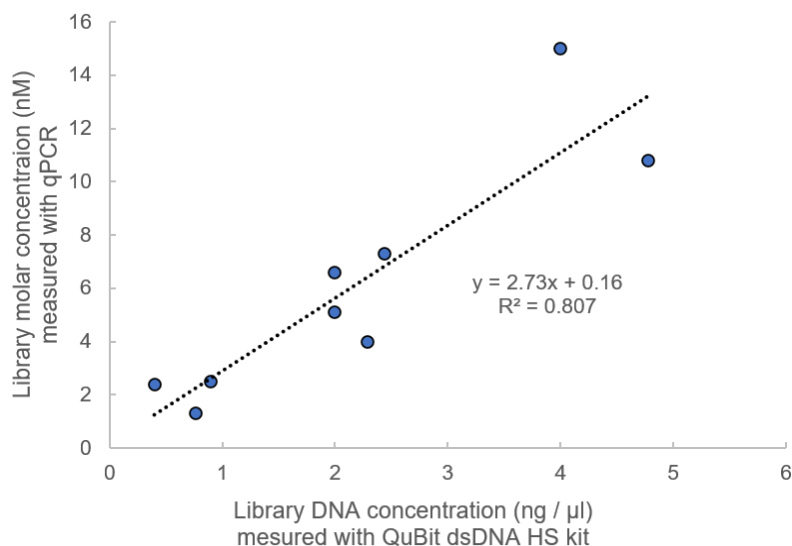


図 ライブラリの重量濃度 (Qubit) とモル濃度の関係 (qPCR)

[ 動画]

6-2 ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。iSeq100 の場合、50 pM に Resuspension Buffer で希釈し、PhiX control を 2%程度添加して **20 μ l** をカートリッジにロードする。その他の機種については illumina 社のマニュアルに従われない。

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

- 令和 3 年度 厚生労働科学研究費補助金・新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークを強化するための研究（19HA1001） 宮崎班」
- 令和 3 年度 日本医療研究開発機構 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「病原体ゲノミクスを基盤とした病原体検索システムの利活用に係る研究 黒田班」