

SARS-CoV-2 NGS Assay—RUO

Using the Twist Target Enrichment Workflow and the Biotia COVID-DX (v1.0) Software

研究専用。診断手順での使用禁止。

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）NGS アッセイは、高感度の核酸ハイブリダイゼーションキャプチャに基づく研究専用のアッセイであり、SARS-CoV-2 ウイルスの検出、特性解析および環境モニタリングに使用します。Twist Bioscience 独自の DNA 合成により、迅速に開発されたウイルス固有のパネルおよび Biotia の包括的なデータ分析ソフトウェアとレポート機能（COVID-DX (v1.0)）を利用します。

このアッセイは、鼻咽頭 (NP) スwab、口腔咽頭 (OP) スwab、鼻腔前部スwab、中鼻甲介スwab、鼻咽頭洗浄 / 吸引、鼻腔吸引および気管支肺胞洗浄 (BAL) 検体（研究目的専用）から SARS-CoV-2 ウイルスを定性的に検出することを目的としています。SARS-CoV-2 NGS アッセイは、ハイブリッドキャプチャによるターゲットエンリッチメントにより、SARS-CoV-2 ウイルスから一部の領域のみ特定するのではなく、すべての核酸配列を濃縮して検出します。ハイブリダイゼーションに必要な時間は 2 時間で、想定される各検体における感度レベルは 1 mL あたりわずか 800 ウイルスコピーです。

Biotia COVID-DX (v1.0) ソフトウェアは、SARS-CoV-2 ウイルスの完全な配列を含む研究ベースのレポートを提供し、変異、遺伝的多様性、およびウイルスが感染する際の進化についての理解を深めることができます。FASTQ ファイル（シーケンスアウトプット）をラボで生成し、クラウドベースのソフトウェアである Biotia COVID-DX (v1.0) に送信して、研究専用のレポートを生成できます。SARS-CoV-2 NGS アッセイキットを購入されたお客様には、各サンプルの COVID-DX (v1.0) バイオインフォマティクス分析のクレジットが提供されます。Biotia の解析のクレジットは、Biotia User Portal から www.biotia.io に登録の上、電子メールで送付される固有のオーダー番号を入力することで使用できます。これらのクレジットによりサンプルの解析を実行するアクセス権が提供され、ソフトウェアのレポート生成コンポーネントを使用できます。



Twist NGS ワークフロー。完全な NGS ワークフローには、サンプルの調製から NGS シーケンスおよびデータ解析まで含まれます。

プロトコルの構成部品

このプロトコルには、研究被験者から採取したサンプル中の SARS-CoV-2 ウイルスを検出し、その特性の評価やモニタリングをするための SARS-CoV-2 研究用途専用アッセイの実施に関する推奨事項を記載しています。臨床診断に対する説明を与えるものではありません。

各キットの製品のパッケージと保管の注意事項を注意して読み、受領後は直ちに推奨事項に従って構成部品を保管してください。

カタログ番号	名称	説明	保管
TWIST プローブパネルおよび BIOTIA 解析ソフトウェア			
103564 : 2 反応 103566 : 12 反応 103567 : 96 反応	Twist SARS-CoV-2 Research Panel + Biotia COVID-DX (v1.0)	SARS-CoV-2 検出パネルおよび解析ソフトウェア	-25 ~ -15°C
TWIST ウイルスコントロール (別途オーダー)			
付録 B 参照	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Controls	合成 SARS-CoV-2RNA コントロール	-90 ~ -70°C
101059 : 16 反応 101058 : 96 反応	Twist Library Preparation EF Kit Twist Library Preparation EF Kit 1	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、ILLNN (ユニバーサルアダプターを使用する場合には、チューブ 100220、100583 は不要)	-25 ~ -15°C
	Twist Library Preparation Kit 2	DNA Purification Beads	2 ~ 8°C
100401 : 16 反応 100573 : 96 反応	Twist Library Preparation Kit 2	DNA Purification Beads (cDNA 合成時にはスタンドアロン製品として、ビーズの精製も必要になります)	2 ~ 8°C
TWIST FAST HYBRIDIZATION 試薬 (別途オーダー)			
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 ~ -15°C
100856 : 2 反応 100578 : 12 反応 100767 : 96 反応	Twist Universal Blockers	非特異的キャプチャの予防用 : Universal Blockers Blocking Solution	-25 ~ -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 ~ 8°C
101278 : 2 反応 101174 : 12 反応 101175 : 96 反応	Twist Fast Hybridization and Wash Kit (2 Boxes) Twist Fast Hybridization Reagents (Box 1 of 2) Twist Fast Wash Buffers (Box 2/2)	Twist Fast hybridization を用いたターゲットエンリッチメント用 Fast Hybridization Mix Hybridization Enhancer Amplification Primers Fast Binding Buffer Fast Wash Buffer 1 Wash Buffer 2	-25 ~ -15°C 2 ~ 8°C

この製品は**研究専用**です。

一般的な注意事項と安全上の注意

実施施設のガイドラインで定められた臨床検査の安全性に関する使用上の注意をすべて遵守してください。すべての検体およびサンプルは、適切な臨床検査手順を用いて、感染性を有するものとして取り扱う必要があります。キット試薬を取り扱う際やこのアッセイを実施する際は、手袋、防護メガネ、白衣などの個人用保護具を使用してください。

最高の結果を得るために、プロトコルを実施する前に本文書を読み、記載の指示に従ってください。プロトコルに変更が行われた場合、Twist は性能を保証できません。

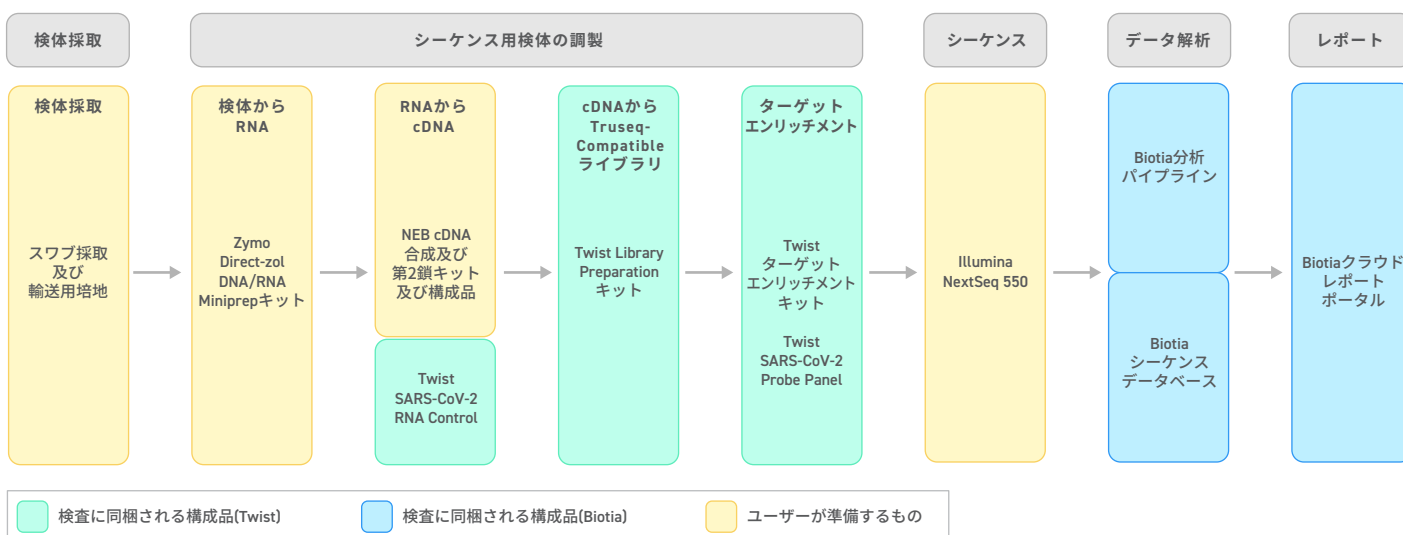


図1: ワークフロー概要 SARS-CoV-2 NGS アッセイの構成成分は、Twist (青) または Biotia (緑) によって含まれるもの、およびユーザーが準備するもの (黄色) として示されています。一般的なサンプルおよび試薬処理のステップは、上記の通りです (灰色)。

- この研究専用のアッセイを最適に実施するために、適切な検体の採取、保管、輸送を必要とします。SARS-CoV-2 ウイルスの検出は、サンプル採取方法、個々の因子（症状の有無など）、および / または感染のステージの影響を受ける可能性があります。
- 本ライブラリ調製法では、ターゲット濃縮に必要な量よりも多くの物質が得られることがあります。余った産物は、後で使用するために -20°C で保存できます。
- サーマルサイクラーと PCR チューブの適合性をテストするには、95°C で最長 5 分間インキュベートし、PCR チューブが熱と圧力で割れないことを確認します。サーマルサイクラーの蓋の締め具合を調整するか、サーマルサイクラーモデルに固有のスペーサーを使用します。
- このプロトコルでは、分量、容器、試薬に応じた試薬の混合方法（穏やかなピペティング、指ではじくまたはタッピング、ボルテックス）を詳しく説明しています。
- Fast Hybridization Mix は粘性のある試薬です。正確性のためにゆっくりピペット操作してください。また、広い口径またはボリュウムの大きいピペットチップを使用することも考慮してください。
- Twist SARS-CoV-2 Research Panel には、小さな白色の粒子が認められることがあります。これは、最終キャプチャ産物には影響しません。
- 技術サポートが必要な場合は、NGSsupport@twistbioscience.com までご連絡ください。

プロトコルの概要

このプロトコルは核酸を抽出することから始まり、RNA から cDNA を作成します。アッセイで用いる dsDNA ビオチン結合型ハイブリッドキャプチャの研究用パネルは、COVID-19 を示唆する症状を有する被験者から得た上気道検体（鼻咽頭スワブ）中の全てのウイルス配列を変異を含めて濃縮することを目的としています。このキャプチャベースの研究用アッセイでは、個々の検体におけるテンプレートウイルスおよびヒト RNA 配列からの cDNA 合成を利用し、PCR サーマルサイクラーを用いて cDNA から増幅ライブラリを生成します。その後、変異株にかかわらず、SARS-CoV-2 ウイルス配列を SARS-CoV-2 ウイルス特異的なビオチン結合プローブを用いたハイブリダイゼーション反応のターゲットとします。ターゲット領域は、ビオチン-ストレプトアビジンのケミストリおよび厳格な洗浄により非ターゲット領域から区別されて濃縮されます。残存分子を PCR のサーマルサイクラーを用いて増幅し、イルミナベースの NGS プラットフォーム（NextSeq 550 システム）で配列をシーケンスします。Biotia COVID-DX (v1.0) ソフトウェアはシーケンス結果を分析し、各サンプルに SARS-CoV-2 ウイルスが存在することを含み、研究ベースのレポートを提供します。各 SARS-CoV-2 NGS アッセイキットを購入すると、Biotia COVID-DX (v1.0) ソフトウェア、データ解析およびレポート作成にアクセスできます。購入者は、購入時に電子メールで送付される固有のリクエスト番号二応じて、Biotia のクレジットが提供されます。このプロトコルを使用すると、end to end のワークフロー（モジュール 1～5 およびパイプライン分析）が合計 50 時間以内で可能です。シーケンシングには最長 18 時間かかりますが、バイオインフォマティクスパイプライン分析の所要時間は約 2 時間です。

モジュール	ステップ	時間
ウイルス検体およびコントロール		
モジュール 1：核酸抽出	ステージ 1：核酸抽出 精製 RNA サンプル	7 時間
15 µl 段階の精製 RNA サンプル		
モジュール 2：cDNA 合成	ステージ 1：第 1 鎖合成 一本鎖 cDNA マテリアル	1.5 時間
	ステージ 2：第二鎖合成 二本鎖 cDNA マテリアル	1 時間
	ステージ 3：精製 ライブラリ調製用 cDNA マテリアル	2 時間
50 NG の cDNA マテリアルの精製		
モジュール 3：DNA ライブラリ調製	ステージ 1：酵素による断片化、末端修復、および dA 付加 dA 付加 DNA 断片	1.5 時間
	ステージ 2：Twist Universal Adapter のライゲーション Universal Adapters 付き cDNA ライブラリ	1.5 時間
	ステージ 3：ライゲーション後の精製 精製 cDNA ライブラリ	1 時間
	ステージ 4：PCR 増幅 増幅インデックス付きライブラリ	1 時間
	ステージ 5：PCR 産物の精製 精製インデックス付きライブラリ	2 時間
187.5 NG の増幅および精製インデックス付きライブラリ		
モジュール 4：SARS-CoV-2 キャプチャ	ステージ 1：プーリングの方法 インデックス付きライブラリプール	3 時間
	ステージ 2：ターゲットエンリッチメント（ハイブリダイゼーション） 溶液中でハイブリダイゼーションされたターゲット	2 時間
	ステージ 3：ターゲットのストレプトアビジン結合およびハイブリダイゼーション洗浄 ビーズでキャプチャしたターゲット	2 時間
	ステージ 4：キャプチャ後の PCR 増幅 濃縮ライブラリ	0.5 時間
	ステージ 5：キャプチャ後のライブラリの精製 精製濃縮ライブラリ	1 時間
ILLUMINA NGS プラットフォーム、シングルエンドリードラン		

コントロール：

プロトコール中、以下のコントロールを使用します。

コントロールの詳細	コントロールの種類	コントロール対サンプル比	使用量	モニターに使用	性能の説明
ウイルス検体輸送培地 (VTM)	陰性 / テンプレートコントロールなし (NTC)	96 のテストサンプルに対して 1 つのコントロール	250 μ l	NTC は、アッセイ実施時に検体がコンタミネーションする可能性を排除する目的で使用し、各抽出バッチのシーケンスで使用します。	検出されたすべてのターゲットで陰性
VERO E6 細胞 [ATCC CRL-1586] を VTM に添加	陰性抽出コントロール (NEC)	96 のテストサンプルに対して 1 つのコントロール	計 \sim 4.0 \sim 4.5 x 10 ⁶ 細胞 (20 μ l) を 230 μ l の VTM に添加	NEC は、抽出工程中に生じるクロスコンタミネーションをモニタリングするための陰性抽出コントロール、および抽出試薬と RNA 抽出成功を検証する抽出コントロールとして機能します。	検出されたすべてのターゲットで陰性
Twist RNA テンプレート陽性コントロール： Agilent Gene Expression Universal Reference RNA (ヒト) の SARS-CoV-2 合成 RNA コントロール 2 (MN908947.3)	陽性コントロール (PC)	96 のテストサンプルに対して 1 つのコントロール	50 コピー / μ l、 計 100 コピー	PC を使用して、アッセイが意図したとおりに実行されていることを確認します。陽性コントロールは 6 つの RNA 断片から成り、長さは 5,000 bp です。ポリアダニル化された領域を除き、ウイルスゲノムの全てのコード領域および非コード領域をこれらのコントロールに含めます。各 RNA 断片は、DNA テンプレートを基準として用いて、in vitro 転写により作製されています。	検出されたターゲットで陽性
Agilent Gene Expression Universal Reference RNA (ヒト)	内部コントロール (IC)	96 のテストサンプルに対して 1 つのコントロール	3.85 ng/ μ l、 計 50 ng	IC は、SARS-CoV-2 試薬を検証し、ライブラリを問題なく生成するために使用します。	SARS-CoV-2 ターゲットで陰性

前述のようにコントロールが機能しない場合、ランは無効とみなされます。これらは推奨のコントロールですが、プロセス中にその他のコントロールを使用しても構いません。**COVID-DX ソフトウェアを使用して研究データを生成するには、NTC、NEC、PC および IC を含める必要があることにご留意ください。**

Biotia COVID-DX (v1.0) ソフトウェアは SARS-CoV-2 ウイルスおよび遺伝子バリエーションの検出、カバレッジプロット、系統発生解析、HS のメトリクスを含む研究専用のレポートを提供します。

付録 A：アダプターのシーケンスおよびプーリングに関するガイドライン

UDI 配列

Twist UDI 配列の完全なガイドについては、PDF 文書 DOC-001129 または Excel ファイル DOC-001130 を参照してください。どちらのファイルも、twistbioscience.com/resources からダウンロードできます。

プーリングガイドライン

Twist UDI プライマーは次世代シーケンス用にカラムベースで塩基のバランスが保たれています。8 プレックスハイブリダイゼーション用にユニークなデュアルインデックスライブラリをプーリングする場合には、ライブラリを単一カラムから選択することを推奨します。シーケンス用に、単一シングルプレートまたは複数のプレートからのカラムを任意の組み合わせで選択できます。

表 1 Twist UDI プライマープレートのレイアウトとプーリングガイドライン。

Twist Universal Adapter System : TruSeq Compatible、16 Samples (101307)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9										
B	2	10										
C	3	11										
D	4	12										
E	5	13										
F	6	14										
G	7	15										
H	8	16										

* 注：16 サンプルのプレートのインデックスは、96 サンプル（プレート A）と同じではありません。

付録 A：アダプターのシーケンスおよびプーリングに関するガイドライン

Twist Universal Adapter System：TruSeq Compatible、96 Samples、プレート A～D（101308、101309、101310、101311）

プレート A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

プレート B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

プレート C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	193	201	209	217	225	233	241	249	257	265	273	281
B	194	202	210	218	226	234	242	250	258	266	274	282
C	195	203	211	219	227	235	243	251	259	267	275	283
D	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284
E	197	205	213	221	229	237	245	253	261	269	277	285
F	198	206	214	222	230	238	246	254	262	270	278	286
G	199	207	215	223	231	239	247	255	263	271	279	287
H	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288

プレート D

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	289	297	305	313	321	329	337	345	353	361	369	377
B	290	298	306	314	322	330	338	346	354	362	370	378
C	291	299	307	315	323	331	339	347	355	363	371	379
D	292	300	308	316	324	332	340	348	356	364	372	380
E	293	301	309	317	325	333	341	349	357	365	373	381
F	294	302	310	318	326	334	342	350	358	366	374	382
G	295	303	311	319	327	335	343	351	359	367	375	383
H	296	304	312	320	328	336	344	352	360	368	376	384

付録 A の終わり

付録 B : TWIST SYNTHETIC SARS-COV-2 コントロール

各ウイルスのコントロールは、Twist のシリコンプラットフォームおよび in vitro 転写で合成されています。各コントロールは、ウイルスゲノム全体を、6 つのユニークな 5 kb 断片で分割しています。

製品	名称	説明	核酸の種類	保管
102019	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 1 (MT007544.1)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
102024	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
102860	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 3 (LC528232.1)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
102862	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 4 (MT106054.1)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
102917	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 5 (MT188340)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
102918	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 6 (MT118835)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
103087	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 7 (EPI_ISL_418227)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
103511	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 8 (MT066176)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
103512	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 9 (MT152824)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
103513	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 10 (EPI_ISL_414648)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
1035114	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 11 (EPI_ISL_417739)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
1035115	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 12 (EPI_ISL_420244)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C
1035133	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 13 (EPI_ISL_421184)	Synthetic SARS-CoV-2 RNA controls	ssRNA	-90 ~ -70°C

付録 B の終わり

連絡先情報、オーダー、および製品サポート



本アッセイのオーダー、製品サポート、分子生物学的側面に関するまたはトラブルシューティング関連の質問については、customersupport@twistbioscience.com までお問い合わせください。



ソフトウェアに関するオーダー、製品サポート、またはトラブルシューティング関連の質問については customersupport@biotia.io にお問い合わせください。

DOC-001209 REV 4.0 | 最終更新日: 2021年3月4日

改訂	日付	詳細
2.0	2021年1月21日	「26 ゲノムの全一覧を提供」を削除
3.0	2021年2月24日	軽微な文法上の編集
4.0	2021年3月4日	11ページ 試薬: 分注量を 500 µl から 50 µl に変更