

【文献紹介】新型コロナウイルス Spike N501Y & HV69-70del 変異の RT-qPCR スクリーニング

ここでご紹介するのは、査読前の論文ですが、研究目的として、SARS-CoV-2 陽性サンプルにおける spike N501Y および HV69-70del 変異の迅速なスクリーニングのために開発された OneStep 逆転写リアルタイム PCR (RT-qPCR) 検出手法です。

40 minutes RT-qPCR Assay for Screening Spike N501Y and HV69-70del Mutations

▶ spike N501Y および HV69-70del 変異スクリーニングのための 40 分の RT-qPCR アッセイ

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.26.428302>;

Gulay Korukluoglu(1), Mustafa Kolukirik(2)*, Fatma Bayrakdar(1), Gozde Girgin Ozgumus(2), Ayse Basak Altas(1), Yasemin Cosgun(1), Canan Zohre Ketre Kolukirik(2)

(1) WHO National Influenza Center and Virology Reference Laboratory of Ministry of Health Turkey, Ankara, Turkey

(2) Bioeksen R&D Technologies Limited, Istanbul Technical University Teknokent, Istanbul, Turkey

筆者らは、SARS-CoV-2 変異体 spike N501Y 変異の有病率増加は、より高い伝播性および中和抗体からの回避に関する懸念を高めているため、N501Y を含むすべての変異は疫学において重要とした上で、シーケンスベースの手法よりも短時間で変異体による有病率をタイムリーに推定するために本手法を開発したと述べています。

さらに、VOC-202012/01 有病率の増加傾向は、その高い伝播速度の指標で、501Y.V2 および P.1 の亜種は、より高い伝播率をもっているように見えないが、より重篤な病気を引き起こしたり、中和抗体から逃れたりする可能性があるため警戒をしているとのこと。開発された RT-qPCR アッセイにより、VOC-202012/01 と、501Y.V2 および P.1 バリエントの疑いのある症例の両方を、シーケンスベースの手法と比較して、大幅に短い時間と低コストで検出できると述べています。

Table 2. Contents of the "Bio-Speedy® SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit" (Cat No: BS-N501Y).

Kit Content	Formulation
2X Prime Script Mix	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix
	S gene, aa position 501N, sense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): CATATGGTTTCCAACCCACTA
	S gene, antisense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): GGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAAAGT
	S gene, hydrolysis probe (150 nM), Sequence (5'-3'): FAM-5'- TGGTGTGGTTACCAACCATACAGAG -3'-Q
	Orf1ab gene, sense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): TCTTCTCGTAAGAACGGTAATAAAGG
	Orf1ab gene, antisense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): GATCAGTGCCAAGCTCGTCG
N501 Oligo Mix	Orf1ab gene, hydrolysis probes (150 nM each), Sequence (5'-3'): ROX-5'- AGCTGGTGGCCATAGTTACGGCGCCG -3'-Q Sequence (5'-3'): ROX-5'- CCTAAGTCAAATGACTTTAGATCGGCGCCG-3'-Q
	S gene, HV69-70del, sense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): ACTTGGTTCCATGCTATCTCTGG
	S gene, HV69-70del, antisense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): TAAACACCATCATTAATGGTAGGACAG
	S gene, HV69-70del, hydrolysis probe (150 nM), Sequence (5'-3'): CY5-5'- CCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCC -3'-Q
	S gene, aa position 501Y, sense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): CATATGGTTTCCAACCCACTT
	S gene, antisense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): GGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAAAGT
Y501 Oligo Mix	S gene, hydrolysis probe (150 nM), Sequence (5'-3'): FAM-5'- TGGTGTGGTTACCAACCATACAGAG -3'-Q

	Orf1ab gene, sense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): TCTTCTTCGTAAGAACGGTAATAAAGG
	Orf1ab gene, antisense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): GATCAGTGCCAAGCTCGTCG
	Orf1ab gene, hydrolysis probes (150 nM each), Sequence (5'-3'): ROX-5'- AGCTGGTGGCCATAGTTACGGCGCCG -3'-Q Sequence (5'-3'): ROX-5'- CCTAAGTCAAATGACTTTAGATCGGCGCCG-3'-Q
	S gene, <i>HV69-70del</i> , sense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): ACTTGGTCCATGCTATCTCTGG
	S gene, <i>HV69-70del</i> , antisense primer (500 nM), Sequence (5'-3'): TAAACACCATCATTAAATGGTAGGACAG
	S gene, <i>HV69-70del</i> , hydrolysis probe (150 nM), Sequence (5'-3'): CY5-5'- CCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCC -3'-Q
NTC	Water, DEPC-treated, molecular biology grade, CAS: 7732-18-5
PC	10 ³ copies/mL synthetic S RNA for N501Y 10 ³ copies/mL synthetic S RNA for HV69-70del 10 ³ copies/mL synthetic Orf1ab RNA

Table 4. Instruments and their software validated with the Bio-Speedy® SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit

Manufacturer	Instrument	Instrument Catalog No	Software	Software Catalog No
Roche	LightCycler® 96	5815916001	LightCycler® 96 Application and Instrument Software	Included in 5815916001
Bio-Rad	CFX96 Touch™	1855195	CFX Maestro™ Software	12004110
Qiagen	Rotor-Gene® Q 5 Plex Platform	9001570	Q-Rex Software v1.0	Included in 9001570
Bio Molecular System	Magnetic Induction Cyclers (Mic)	MIC-4	micPCR Software Version 2.8	Included in MIC-4
HiMedia	Insta Q96® Plus	LA1073	PCR Insta Q96 v1.0	Included in LA1073

Table 5. Reaction set-up and the details of the qPCR program

Reaction Setup			qPCR Program		
Component	Reaction N501	Reaction Y501	Cycle	Temperature	Duration
2X Prime Script Mix	5 µL	5 µL	1	52 °C	5 min
N501 Oligo Mix	2.5 µL				
Y501 Oligo Mix		2.5 µL	1	95 °C	10 sec
				95 °C	1 sec
Template Nucleic Acid	2.5 µL	2.5 µL	40	60 °C	1 sec
Total reaction volume	10 µL	10 µL		FAM/ROX/CY5 Read	