

A set of four multiplex mutation-specific PCR-based assays

Developed reverse-transcriptase real time PCR based assays to screen for spike protein deletions (69-70, 242-244 and mutations N501Y, E484K and L452R in clinical samples known to be positive for SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 の変異株検出アッセイを示した論文をご紹介します。

▶変異に特異的な SARS-CoV-2 PCR：懸念される変異株の迅速かつ正確な検出とスパイク L452R 変異を伴う新たに出現した変異体の同定

この論文では、VOI（注目すべき変異株）、VOC（懸念される変異株）を特異的に検出できる PCR ベースのアッセイを報告しています。ここでは、S Δ 69-70 と S Δ 242-244 をマルチプレックスで検出し、さらにスパイク変異 501Y、484K、452R と野生型 501N、484E、452L を検出する 3 つの別々のアッセイも提示しています。そして、本方法によるスクリーニング結果は、全ゲノムシーケンス（WGS）結果と 100%の一致を示したことも報告しています。

治療方法の決定や公衆衛生対策を必要とする現状においては、広く臨床検査室で使用できる迅速なアプローチが不可欠です。このような点で本アッセイは、次世代シーケンシングよりも適している側面を持つと主張しています。

Assays	Oligo name	Sequences
S gene Δ 69-70/ Δ 242-244 multiplex assay	S Δ 69-70 F	5'-TCAACTCAGGACTTGTCTTAC-3'
	S Δ 69-70 R	5'-TGGTAGGACAGGGTTATCAAAC-3'
	S Δ 69-70 P	5'- FAM-TGGTCCCAGAGACATGTATAGCAT-BHQ1-3'
	S Δ 242-244 F	5'- TGGTAGATTTGCCAATAGGTATTAACA -3'
	S Δ 242-244 R	5'- CTGAAGAAGAATCACCAGGAGTCA -3'
	S Δ 242-244 P	5' - VIC-ACTTTACTTGCTTTACATAGAAG-MGB -3'
S gene N501Y assay	S N501Y F	5'- TGTTACTTTCCTTTACAATCATATGGTTTC -3'
	S N501Y R	5'-GAAAGTACTACTACTCTGTATGGTTGGTAACC -3'
	S 501N P1	5'-VIC-CAACCCACTaATGGTGTT-MGB-3'
	S 501Y P2	5'-FAM-CAACCCACTaTGGTGTT-MGB--3'
S gene E484K assay	S E484K F	5'-CAGGCCGGTAGCACACCTT-3'
	S E484K R	5'-GTTGGAACCATATGATTGTAAAGGA-3'
	S 484E P1	5'-FAM-TAATGGTGTTgAAGGTTT -3'
	S 484K P2	5'-VIC-TGTAATGGTGTTaAAGGT -3'
S gene L452R assay	S L452R F	5'-TGATAGATTTTCAGTTGAAATATCTCTCTCA-3'
	S L452R R	5'-AATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTAT-3'
	S 452L P1	5' FAM-CCTAAACAATCTATACaGGTAA-MGB-3'
	S 452R P2	5'-VIC-CTAAACAATCTATACcGGTAAT-MGB-3'

Huanyu Wang, et al. "Mutation-specific SARS-CoV-2 PCR Screen: Rapid and Accurate Detection of Variants of Concern and the Identification of a Newly Emerging Variant with Spike L452R Mutation" medRxiv (2021).

(ここでご紹介した論文は、21.04.28 現在、まだ査読が完了していないものです。)

<論文からの RT-PCR 条件と検出位置の情報>

N501Y、E484K、および L452R Assay については以下です。

核酸溶出液 : 5μL、PCR 反応溶液 : 20μL、ThermoFisher : 1X TaqPath 1step RT-qPCR MasterMix
各プライマー : 0.9μM、各プローブ : 0.2μM、RT-PCR 機器 : ABI 7500 thermocycler
25°C, 2min→50°C, 15min→95°C, 10min→45 cycles [95°C, 15sec→65°C, 1min]

S gene L452R assay (Amplicon Size: 104bp)

S L452R F 5'-TGATAGATTTTCAGTTGAAATATCTCTCTCA-3'

(相補配列→ 5'-TGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCA-3')

S L452R R 5'-AATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTAT-3'

S 452L P1 5'-FAM-CCTAAACAATCTATAC a GGTAAT-MGB-3' (WT)

(相補配列→ 5'-TTACC t GTATAGATTGTTTAGG-3')

S 452R P2 5'-VIC-CTAAACAATCTATAC c GGTAAT-MGB-3' (MT)

wuhCor1/SARS-CoV-2 (range=NC_045512v2:22830-23033)

ATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGAATTCTAACAAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAAT
TATAATTACC(T)GTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATC
AGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGAAGGTTTAATTGTTACTTTC

S gene E484K assay (Amplicon Size: 76bp)

S E484K F 5'-CAGGCCGGTAGCACACCTT-3'

S E484K R 5'-GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA-3'

(相補配列→5'-TCCTTTACAATCATATGGTTTCCAAC-3')

S 484E P1 5'-FAM-TAATGGTGT g AAGGTTT -3' (WT)

S 484K P2 5'-VIC-TGTAATGGTGT a AAGGT -3' (MT)

wuhCor1/SARS-CoV-2 (range=NC_045512v2:22932-23107)

GGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGG
TGTT(G)AAGGTTT TAATTGTTACTTTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCA
TACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTT

S gene N501Y assay (Amplicon Size: 80bp)

S N501Y F 5'-TGTTACTTTCTTTACAATCATATGGTTTC-3'

S N501Y R 5'-GAAAGTACTACTCTGTATGGTTGGTAACC-3'

(相補配列→ 5'-GGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTC-3')

S 501N P1 5'-VIC-CAACCCACT a ATGGTGT-MGB-3' (WT)

S 501Y P2 5'-FAM-CAACCCACT t ATGGTGT-MGB-3' (MT)

wuhCor1/SARS-CoV-2 (range=NC_045512v2:22974-23153)

AAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGAAGGTTTAAATGTTACTTTCTTTACAATCATATGGT
TTC CAACCCACT(A)ATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTC TTTTGAACCTTCTACATGCACCA
GCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTA