

新型コロナウイルス論文紹介

L452R、E484K、N501Y を検出するためのマルチプレックスアッセイ

SARS-CoV-2

One-step multiplex allele-specific RT-qPCR

to detect three non-synonymous spike protein mutations; L452R, E484K, N501Y

今回も、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。

前回ご紹介したアッセイは、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で検出するというものでした。ここで用いられるダブルラベルプローブは MGB 挿入を持つものもあり、MGB 持たないプローブと比較すると、どうしてもコストがかかってしまいます。また、別々の反応系であることから、時間と手間もかかってしまいます。

今回ご紹介するアッセイは、3 つのスパイクタンパク質変異 L452R、E484K、N501Y を、対立遺伝子に特異的なワンステップマルチプレックス RT-qPCR で検出するというものです。このアッセイ結果は、次世代シーケンシング結果とほぼ完全に一致しており、一般的なラボにおいて懸念されている変異株を検出することが可能となっております。

しかしながら、制限事項もいくつか挙げられています。必ずしも VOC / VOI を示すものではなく、稀なバリエーションは検出されない懸念があること、効率を優先したために L452 および E484 用の野生型プローブがないため、E484Q などの存在が誤った結果につながる可能性があること、プライマーやプローブ部位に新しい変異が発生した場合、偽陰性を引き起こす可能性があることも示されています。このような制限事項をきちんと理解した上で実施することが重要です。このアプローチは、新たな突然変異に適応できる可能性があり、SARS-CoV-2 バリエーションスクリーニングとして、極めて有用であるとしています。

Wang, Hannah, et al. "Multiplex SARS-CoV-2 Genotyping PCR for Population-Level Variant Screening and Epidemiologic Surveillance." medRxiv (2021).

(ここでご紹介した論文は、21.05.13 現在、まだ査読が完了していないものです。)

論文より、プライマー・プローブ配列と位置

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.04.20.21255480v2>

ご使用の PCR 機器で検出できる蛍光色素に変更して合成を承ります。

L452R_FWD CTCTCTCAAAGGTTTGAGATTAGACT
相補配列 : AGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAG
L452R_REV CTTGATTCTAAGTTGGTGGTAA
L452R_MT_HEX CCTAAACAATCTATACCGGTAATT
相補配列 : AATTACCGGTATAGATTGTTTAGG

>wuhCor1_dna range=NC_045512v2:22853-22991
GGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTAT AATTACCG
TGTATAGATTGTTTAGGAGAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTA
TCAGGCCGGTA

E484K_FWD CTGAAATCTATCAGGCCGGTA
E484K_REV GAAAGTACTACTACTCTGTATGG
相補配列 : CCATACAGAGTAGTAGTACTTTC
E484K_MT_CY5 CTTGTAATGGTGTAAAGGTTT
N501Y_MT_FAMb TTTCCAACCCACTTATGGT
N501_WT_CY3.5b TTTCCAACCCACTAATGGT

>wuhCor1_dna range=NC_045512v2:22921-23153
TAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAG
GCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGAAGGTTTAAATTGTTACTTTCCTTTACAATCATATG
GTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTCTTTTGAAC
TTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTA

Supplementary Table 3. Multiplex RT-PCR Reagents and Concentrations

Reagent	Stock Concentration	Volume (μ L)	PCR Reaction Concentration
L452R_FWD	9000 nM	1.0 ^a	360 nM
L452R_REV	9000 nM	-	360 nM
E484K_FWD	9000 nM	-	360 nM
E484K_REV	9000 nM	-	360 nM
L452R_MT_HEX	2000 nM	-	80 nM
E484K_MT_CY5	2000 nM	-	80 nM
N501Y_MT_FAM	2000 nM	-	80 nM
N501_WT_CY3.5	2000 nM	-	80 nM
SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit 2X Mix ^b	2X	12.5	1X
SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit Taq Mix ^b	-	0.5	-
Nuclease-free Water	-	6.0	-
Template ^c	-	5.0	-
Total	-	25.0	-

MT, mutant; WT, wild-type; nM, nanomolar.

^a 1.0 μ L primer/probe mix at stock concentrations listed above.

^b Catalog Numbers 11732-020 and 11732-088

^c Wild-type TWIST whole-genome synthetic RNA control, pooled mutant amplicon control (Supplementary Table 2), or extracted nucleic acids from clinical upper respiratory swabs.