

MGISEQ-2000适配ATOplex多重PCR技术在新冠研究方面的应用

华大智造MGISEQ-2000应用案例

亮点

ATOplex 多重 PCR 技术利用锁定引物实现在一管中完成病毒全部基因片段的扩增，该技术结合了双唯一标签技术和外参相对定量技术，不仅能够获得病毒的全基因组，还能通过掺入的已知外参准确定量样本的病毒浓度，测序灵敏度更高，适用范围广，对不同起始量的多种类型样本均适用。双唯一标签技术结合DNBSEQ测序，能够最大程度降低样本之间的污染，快速、准确地获取病毒的全基因组序列。



基于多重PCR的MPS

利用多重PCR技术靶向测序进行病毒检测，获取病毒全长基因组，适用于病毒检测、变异监测和病毒进化研究。具有高灵敏度、病毒浓度定量准确、变异检出率高和方便经济的优势



测序数据质量高

ATOplex 多重 PCR 技术搭配MGISEQ-2000测序平台，结合DNBSEQ测序技术可进行新型冠状病毒的基因分型



测序方法选择灵活

MGISEQ-2000测序仪采用双载片平台，在双载片独立运行的基础上，支持不同通量规格的载片，提供更全面更灵活的测序体验

例：如需要构建病毒的全长基因组，在MGISEQ-2000平台测序，假设 FCL中1条 lane 产出 400M reads，除去 100M 的平衡文库，FCL中300 M reads 可进行 16-64 个样本的组装；假设FCS中1条lane产出270M reads，除去70M的平衡文库，FCS中200M reads可进行8-40个样本的组装。

Ct值	单个样本推荐数据量	FCL推荐上机样本数*	FCS推荐上机样本数*
< 30	5 M reads	64/lane	40/lane
31~32	10 M reads	32/lane	16/lane
32~35	20 M reads	16/lane	8/lane
> 35	> 20 M reads	/	/

* 上机样本数考虑样本pooling时需要barcode碱基平衡

应用案例 ATOplex多重PCR测序揭示新冠病毒复阳与中和抗体水平相关¹

背景

SARS-CoV-2病毒感染导致的新肺炎的特殊临床症状之一，是部分新冠感染患者在出院后出现复阳的现象。导致病毒复阳的因素，以及复阳病毒的来源和传染性等一系列问题引发了社会的广泛关注，也成为了新冠防治科研工作的重点。2020年10月9日，Cellular & Molecular Immunology在线发表了题为“A compromised specific humoral immune response against the SARS-CoV-2 receptor-binding domain is related to viral persistence and periodic shedding in the gastrointestinal tract”的论文，该研究成果由广州市第八人民医院、深圳华大基因和广东省CDC课题组共同完成。研究通过临床样本的病毒全基因组测序，揭示了病毒复阳与患者的中和抗体水平低下相关，进一步研究了导致体液免疫应答受损的基本机制，对探索SARS-CoV-2在人群中的反弹机制及防止病毒传播和开发适用于全人群的高效保护疫苗至关重要。

实验方法

样本来源

广州第八人民医院收治的中国COVID-19患者。根据中国国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》，对所有患者进行临床表现诊断。

病毒RNA的RT-PCR检测

使用核酸分离试剂盒(达安基因,货号:DA0630)在Smart 32核酸提取仪(达安基因)上进行病毒RNA的提取。采用实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂(达安基因,货号:DA0930)针对N和orf1ab基因进行病毒检测。Ct值<40视为阳性结果。参考病毒DNA标准计算病毒RNA浓度。

病毒RNA测序与分析

基于多重PCR的富集和测序 (amplicon-based)²:

使用随机六聚体引物和Superscript II reverse transcriptase 试剂盒(Invitrogen)逆转录RNA得到cDNA的一链。使用华大智造ATOPlex新冠RNA多重PCR建库套装进行HCoV-19基因组的两步扩增,生成137X~400bp扩增子或299X~200bp扩增子。样本经过两轮PCR扩增,每轮PCR产物均使用华大智造MGIEasy DNA Clean beads进行纯化。将最终得到的纯化产物转换为单连文库并进行滚环扩增制备DNB,在MGISEQ-2000平台上进行测序。

基于杂交捕获的富集和测序 (hybrid capture-based)²:

使用2019-nCoVirus DNA/RNA捕获Panel(BOKE)从双链DNA文库中富集HCoV-19特异性内容。为适配MGISEQ-2000平台,使用华大智造MGIEasy外显子组捕获辅助试剂盒替代原试剂盒中的封闭试剂序列和PCR引物。文库构建完成后制备DNB并在MGISEQ-2000平台完成测序。

数据分析

对测序数据进行分析,使用nCoV Finder pipeline进行基因组组装;杂交捕获测序数据和多重PCR测序数据分别使用nCoV Variant detection pipeline和SARS-CoV-2 Multi-PCR v1.0进行变异检测分析。

结果

复阳阶段病毒复制可能在胃肠道进行

首先实验证实病毒参与了初始感染,而不是继发感染。在阳性复检患者中,病毒通常在肛拭子中被发现(21例中有15例,占71.4%)。对细胞内病毒亚基因组使RNA(sgmRNA)的分析证实,复检阳性患者在胃肠道(16例中有3例,占18.7%)有活跃的病毒增殖,但在呼吸道没有发现。研究人员推测,在复检阳性阶段胃肠道可能是病毒复制的主要部位之一。

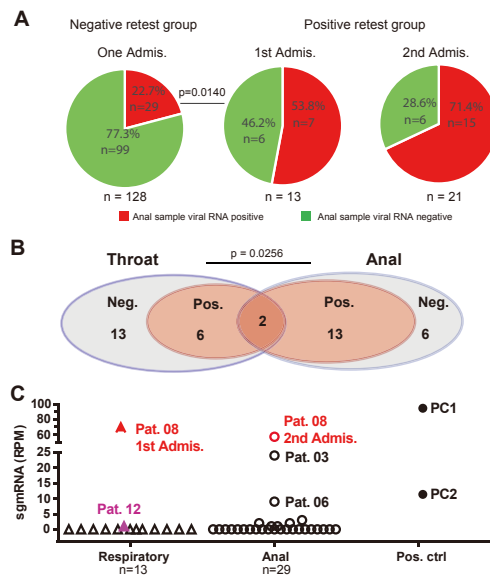


图1 在复检阳性患者的肛拭子中检出活跃增殖的SARS-CoV-2

病毒复阳与中和抗体水平低下相关

接着，该研究进一步分析了可能导致病毒复阳的因素。研究发现病毒持久性与高病毒滴度、延迟的病毒清除、患者年龄或在第一次住院期间更严重的临床症状无关。相反，病毒反弹与病毒受体结合域（RBD）特异性IgA和IgG抗体水平显著降低和抗体生成速度减慢有关。研究表明，复检呈阳性的患者未能产生强大的保护性体液免疫反应，无法及时产生保护性抗体，这可能导致迟发性病毒清除，SARS-CoV-2在胃肠道持续存在，并可能引发活跃的病毒脱落。

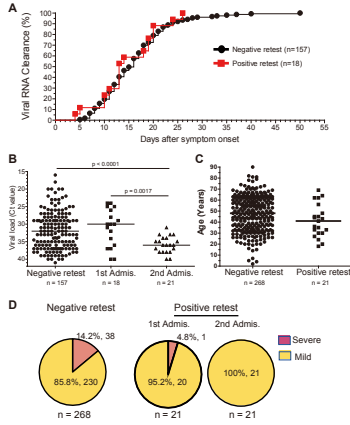


图2 SARS-CoV-2 rna阳性患者的临床特征

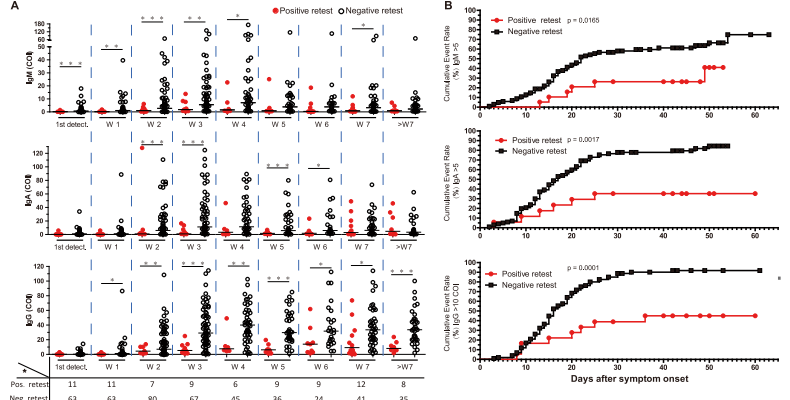


图3 抗RBD特异性IgM、IgA和IgG的特征

多数复阳病毒为片段且浓度很低

研究对16例患者咽拭子和肛拭子中提取的病毒基因组进行了测序。由于病毒浓度极低，采用基于多重聚合酶链反应扩增（PCR）的测序方法来提高检测灵敏度。最终成功获得了3例（16例中占18.8%）患者的全长SARS-CoV-2基因组（>99%基因组覆盖率，深度≥100倍）。结果表明，大多数的复阳性病毒是片段性的，且浓度很低（低Ct value），因此研究人员推测大多数的复阳性患者样本感染性是较低的。

表1 部分复检阳性患者样本SARS-CoV-2 测序结果

Sample representative	Patient	Sample type	Ct value (N)	Ct value (orf1ab)	Clean reads	SARS-CoV-2 reads	SARS-CoV-2 reads (RPM)	sgmRNA reads	sgmRNA reads / clean reads (RPM)	Coverage (>=100x)	Assembly length (bp)
yes	Patient 01	Throat swab	35	38	32,510,228	217,194	6,681	8	0	39.33%	11,762
yes	Patient 02	Anal swab	35	37	26,340,150	555,489	21,089	75	3	91.51%	27,363
yes	Patient 03	Anal swab	31	33	20,391,376	6,812,954	334,110	496	24	99.11%	29,638
yes	Patient 04	Anal swab	38	40	27,205,700	8,422	310	0	0	2.31%	692
yes	Patient 05	Anal swab	36	38	60,091,632	51,188	852	0	0	21.66%	6,478
yes	Patient 06	Anal swab	34	37	86,500,624	10,674,143	123,400	802	9	99.44%	29,737
yes	Patient 07	Throat swab	40	negative	40,103,674	125,579	3,131	5	0	48.54%	14,514
yes	Patient 08	Anal swab	33	34	21,685,592	15,425,408	711,321	1,238	57	99.15%	29,649
yes	Patient 10	Throat swab	36	negative	27,268,380	2,426	89	0	0	1.42%	424
yes	Patient 11	Anal swab	35	41	58,483,382	484,586	8,286	18	0	77.91%	23,297
yes	Patient 12	Throat swab	37	40	25,781,818	817,946	31,726	31	1	95.66%	28,606
yes	Patient 13	Anal swab	38	40	22,708,342	22,542	993	0	0	10.20%	3,049
yes	Patient 14	Anal swab	33	36	12,136,122	579,353	47,738	21	2	91.23%	27,280
yes	Patient 15	Throat swab	35	37	21,996,818	127,984	5,818	2	0	37.83%	11,313
yes	Patient 16	Anal swab	37	40	27,757,050	474,841	17,107	7	0	83.48%	24,964
yes	Patient 18	Anal swab	36	38	23,167,418	239,350	10,331	27	1	41.72%	12,476
	PC1&	NA	32	NA	28,343,628	9,216,440	325,168	340	12	99.12%	29,640
	PC2&	NA	29	NA	23,862,664	22,548,264	944,918	2,301	96	99.16%	29,651
1st admission	Patient 03 §	Throat swab	40	negative	33,419,450	4,560	136	2	0	2.18%	652
1st admission	Patient 08 §	Throat swab	24	25	37,759,960	34,009,562	900,678	2,652	70	99.68%	29,796

&: PC1 and PC2. positive control, SARS-CoV-2 viral RNA extracted from cell culture.

§: samples from the first admission.

结论

华大智造ATOPIex多重PCR技术在MGISEQ-2000平台可以产出高质量的新冠病毒序列数据，能够完成病毒基因组的准确组装和变异检测，揭示SARS-CoV-2病毒复阳与患者的中和抗体产生水平低下相关，协助SARS-CoV-2病毒在人群中反弹机制的进一步探索，助力病毒预防和有效疫苗的研发。

订购信息

测序仪

产品	规格	货号
基因测序仪MGISEQ-2000RS	台	900-000035-00

建库试剂盒

产品	规格	货号
ATOPIex 新冠RNA多重PCR建库套装*	96 RXN	1000023555

* 该建库套装即文章中提到的“ATOPIex SARS-CoV-2 full length genome panel”试剂盒

测序试剂

产品	最大支持循环数	货号
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE100)	220 Cycles	1000012554
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150)	320 Cycles	1000012555
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100)	220 Cycles	1000013155
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE150)	320 Cycles	1000011718

参考文献

- Hu, Fengyu, et al. "A compromised specific humoral immune response against the SARS-CoV-2 receptor-binding domain is related to viral persistence and periodic shedding in the gastrointestinal tract." *Cellular & Molecular Immunology* (2020): 1-7.
- Xiao, Minfeng, et al. "Multiple approaches for massively parallel sequencing of HCoV-19 genomes directly from clinical samples." *bioRxiv* (2020).

深圳华大智造科技股份有限公司

MGI-service@mgi-tech.com | www.mgi-tech.com | 4000-688-114 | 深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼

仅供研究使用

版权声明: 本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司。未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制, 拷贝, 编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。