

基于多重PCR靶向测序技术对城市污水中SARS-CoV-2的识别、定量与溯源

华大智造ATOPlex靶向测序技术助力污水中新冠病毒监测

澳大利亚昆士兰大学水管理高等研究中心和合作伙伴基于华大智造ATOPlex多重PCR靶向测序技术，对城市污水中极低载量的SARS-CoV-2病毒进行了识别、定量及溯源。

相关研究结果于2021年以“Novel Multiplexed Amplicon-Based Sequencing to Quantify SARS-CoV-2 RNA from Wastewater”为题发表在*Environmental Science & Technology Letters*上¹。

推荐应用：新冠病毒动态监控

推荐机型：MGISEQ-2000，MGISEQ-200，DNBSEQ-G99，DNBSEQ-E25。

• 检测灵敏度高

基于独有的ATOPlex多重PCR技术，可对极低浓度的病毒进行检测，检测限低于10 拷贝/mL。

• 基因组覆盖度高

扩增子覆盖SARS-CoV-2全长基因组，1X覆盖率高于99%，充分满足新冠溯源需求。

• 精准定量

可对样本中的病毒载量进行相对定量或绝对定量，线性分析 R^2 大于0.99。



背景介绍

目前，由SARS-CoV-2病毒引起的全球性疫情正严重威胁着公众的健康以及经济发展，控制疫情的蔓延成为了当前最为紧要的事情，其中对病原体的早期检测则是进行防控至关重要的一环。然而，因不少的病毒携带者属于无症状患者，通过临床检测来衡量区域内病毒的流行程度有一定的局限性和滞后性²。最新的研究进展表明，基于污水的流行病学研究（WBE）可在早于医疗系统检测的时间点发现病毒的存在，然而污水中较低的病毒载量成为了WBE广泛应用的一大难点^{3,4}。

本研究应用华大智造ATOPlax平台设计优化的新冠建库试剂和DNBSEQ测序平台对城市污水中极低载量的SARS-CoV-2病毒进行检测识别、定量及溯源，为废水中新冠病毒流行病学研究提供了一套高灵敏度和高通量的方案，如图1所示。

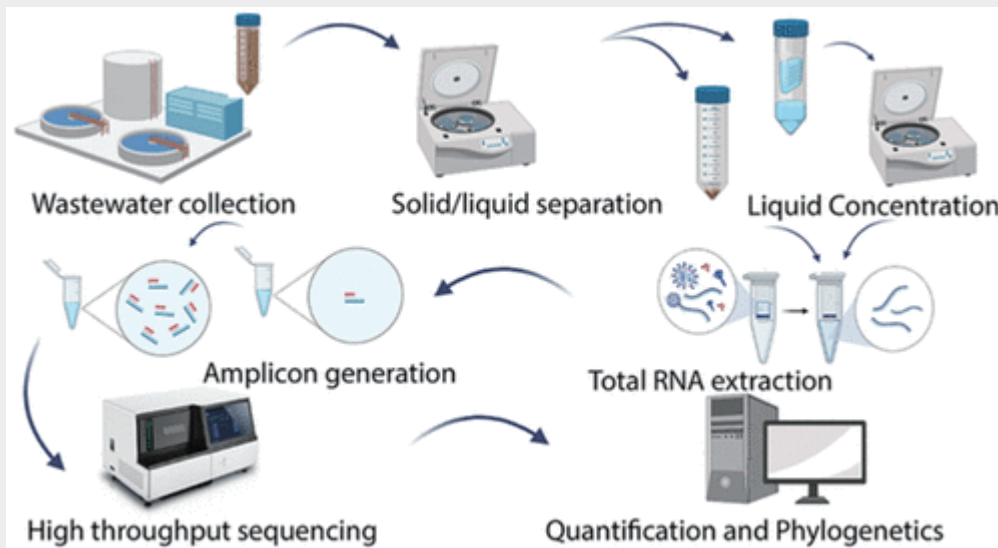


图1. 污水中SARS-CoV-2的测序流程¹

研究描述

废水流行病学 (WBE) 对于遏制新冠大流行已显示出令人鼓舞的效果。准确、灵敏和高通量地检测城市废水中的SARS-CoV-2对WBE至关重要。在此，本研究基于华大智造研发的多重扩增子测序的新方法（即ATOplex多重PCR靶向测序技术）开展SARS-CoV-2的废水监控⁵。研究发现ATOplex多重PCR靶向测序技术能够在比RT-qPCR检测限低4倍的病毒浓度下进行稳定和准确地溯源。研究还发现，废水中的固体部分含有大量的病毒RNA，这说明从废水的固体和液体部分提取病毒RNA的必要性。

实验方法

技术可行性验证

将SARS-CoV-2的阳性标准品逆转录(TWIST Biosciences, TWIST)之后超声打断获得约500 bp的cDNA片段，梯度稀释后作为标准品样本 (D1-D12)，并使用ddPCR技术进行绝对定量。应用华大智造ATOplex建库技术和DNBSEQ™测序平台对已定量的标准品样本进行测序，并进行后续的再次定量及溯源分析，以验证该技术流程在极端样本中的可行性。同时，采用RT-PCR方法针对标准品中的N1和N2基因进行检测和定量，以比较结合ATOplex技术的测序流程与常规RT-PCR技术的检测限。

真实样本制备

收集6份各50 mL来自当地的未处理污水样本，通过离心的方法将样本的固相和液相分开，随后对固、液相分别进行total RNA提取 (RNeasy PowerMicrobiome Kit, Qiagen)，得到真实污水样本 (S01-S06)。

文库制备

采用华大智造ATOplex建库试剂盒 (ATOplex 新冠RNA多重PCR建库套装) 及环化试剂盒 (环化试剂盒) 对上述真实污水样本进行文库制备，得到约200 bp的短片段扩增子，操作方法严格遵循试剂盒说明书。

其中，ATOplex多重PCR建库技术可在一管中实现逆转录及扩增，通过2轮PCR即可对目标片段进行上百万倍的富集，能够对病毒含量极低的样本进行检测。同时，扩增子覆盖SARS-CoV-2基因组全长，可获得全长序列和变异信息，为溯源分析奠定基础。

测序及生物信息分析

将上述得到的文库在华大智造MGISEQ-2000基因测序仪进行PE100测序，每个样本约10M reads，并利用华大智造提供的SARS-CoV-2超高重PCR技术数据分析流程对数据进行处理，得到SARS-CoV-2的 read数比例和对应的病毒序列信息，并组装出病毒的全长基因序列。并使用其他开源软件进行溯源分析，获得系统发育进化树。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
收集6份各50 mL 来自当地的未处 理污水样本 (S01-S06)	 <p>ATOPlex 新冠RNA 多重PCR建库套装</p> <p>MGISEQ-2000 基因测序仪</p>	metargetCOVID	可行性验证，系统发 育树构建及溯源等

结果

可行性验证发现基于ATOPlex多重PCR靶向测序技术具有超高的灵敏度及定量精确度

使用GraphPad Prism软件将ddPCR和ATOPlex多重PCR靶向测序技术对标准品（D1-D12）获得的数据进行回归分析，以检验采用ATOPlex多重PCR靶向测序技术是否能够对病毒载量进行精准定量。结果显示，通过测序方法最终获得的

SARS-Cov-2 reads数与样本中的病毒载量存在着高度正相关性（ $R^2=0.993$ ），证明了基于ATOPlex多重PCR靶向测序技术的可对样本中的病毒含量进行精准地定量，如图2所示。

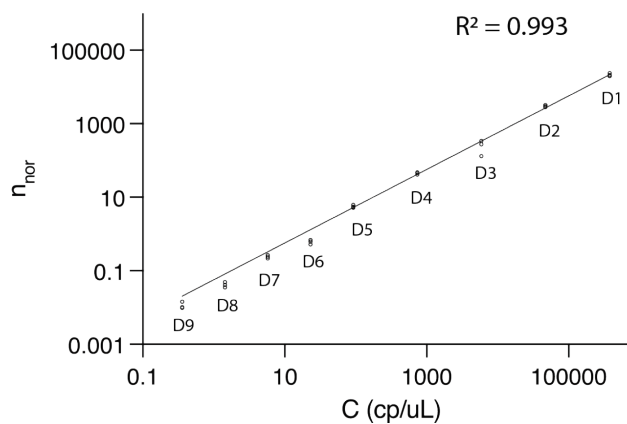


图2. 基于ATOPlex多重PCR靶向测序技术获得的SARS-CoV-2 reads数（y轴）与病毒载量（x轴）之间的线性回归分析

Dilution	Absolute viral concentration (cp/μL)	ATOPlex measurement (cp/μL)	Genomic coverage at ≥ 30 times the depth (%)	Mapping rate (%)	RT-qPCR measurement for N1 (cp/μL)	RT-qPCR measurement for N2 (cp/μL)
D1	3.8×10^5	3.8×10^5	99.8 ± 0.56	99.66	$3.4 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$	$2.8 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^4$
D2	4.7×10^4	5.3×10^4	99.9 ± 0.33	99.68	$4.8 \times 10^4 \pm 5.6 \times 10^3$	$4.4 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$
D3	5.9×10^3	4.3×10^3	99.9 ± 0.07	99.7	$(6.9 \pm 1.8) \times 10^3$	$5.6 \times 10^3 \pm 3.6 \times 10^2$
D4	7.4×10^2	7.9×10^2	100.0 ± 0.11	99.68	$8.3 \times 10^2 \pm 3.1 \times 10$	$8.0 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10$
D5	9.2×10	9.9×10	99.9 ± 0.51	99.64	$1.1 \times 10^2 \pm 1.7 \times 10$	$1.0 \times 10^2 \pm 1.1 \times 10$
D6	2.3×10	1.0×10	99.0 ± 0.57	99.4	$3.5 \times 10 \pm 1.3$	$3.2 \times 10 \pm 7.1$
D7	5.8	4.2	97.7 ± 1.00	99.42	8.7 ± 2.0	9.9 ± 3.3
D8	1.4	0.7	96.9 ± 4.50	99.37	2.0 ± 0.6	0.6
D9	0.4	0.2	68.4 ± 1.67	99.39	1.3	undetected
D10	9.0×10^{-2}	7.3×10^{-2}	31.0 ± 11.35	99.36	undetected	undetected
D11	2.2×10^{-2}	2.6×10^{-2}	8.4 ± 4.25	99.32	undetected	undetected
D12	6.0×10^{-3}	6.0×10^{-5}	0 ± 0	99.4	undetected	undetected

表1. ATOPex多重PCR靶向测序技术的性能验证

同时，通过比较ATOPex多重PCR靶向测序技术和RT-PCR的结果发现，ATOPex多重PCR靶向测序技术比常规的RT-qPCR更加灵敏：在低于RT-qPCR检测限一个数量级时（D11）仍可获得8.4%（ $>30X$ ）的基因覆盖率；在低于RT-qPCR检测限四个数量级时（D12）虽无法进行定量，但仍可鉴定出病毒的存在，检测限低于6 copies/mL。并且，在所有量级的样本中，Mapping率均 $>99\%$ ，

如表1所示，证明了Panel的高度特异性。

随后，研究人员基于测序结果绘制了D1-D12标准品的系统进化树，结果发现，虽然病毒浓度低于RT-qPCR检测极限四分之一（D10, 90 copies/mL），但ATOPex多重PCR靶向测序技术的溯源结果依然准确，表明了ATOPex多重PCR靶向测序技术能够高效地保留病毒的全基因组序列信息，从而对病毒变种进行精准溯源，如图3所示。

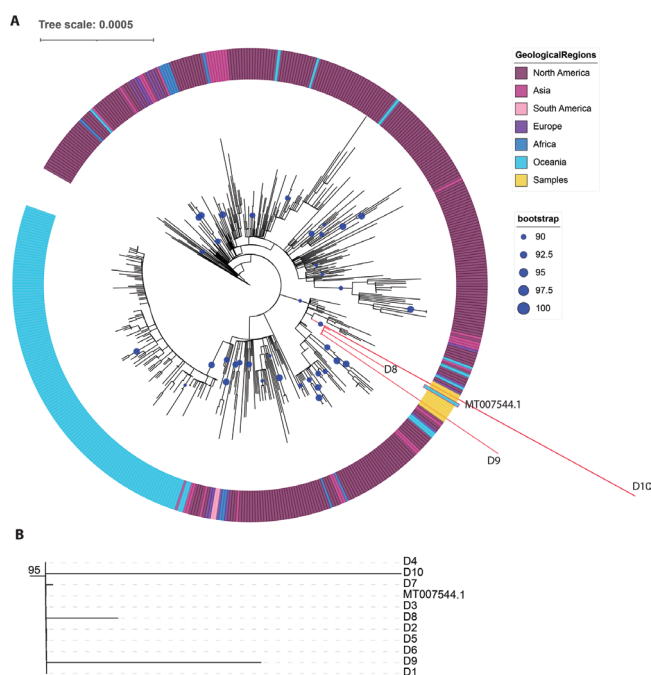


图3. 系统发育进化树分析。A图：系统发育树将稀释的标准品（红色分支）放置在参考菌株附近（在外圈突出显示）
B图：子进化树显示所有样本（D1—D10）位于参考基因组序列（MT007544.1）附近

精确的定量分析发现在污水的固相样本中 含有更多的病毒

过往对于污水的研究中，通常会将污水中固体排除，只对液体进行分析，而在本研究中，研究人员使用ATOPex多重PCR靶向测序技术分别对真实污水样本(样本S01-S06)的固相组分和液相组分进行检测，同时使用RT-qPCR技术作为辅助检测。结果表明，RT-qPCR技术未能检测出任一样本中

的SARS-CoV-2病毒，相比较之下，在每个样本约10 M reads的前提下，ATOPex多重PCR靶向测序技术不仅检测出了样本中的病毒，更通过定量技术发现在污水固相组分中的病毒含量明显高于液相，证明了城市污水颗粒物中藏有大量病毒，是重要的病毒源，如图4所示。

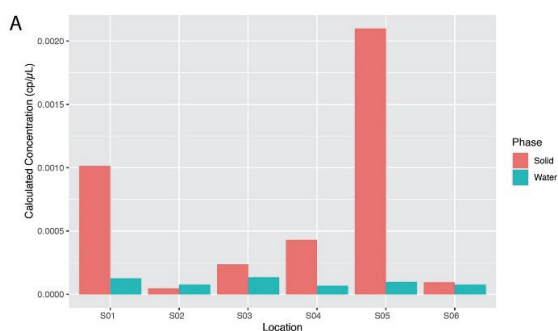


图4. 基于ATOPex多重PCR靶向测序技术和测序方法定量真实污水样本中的病毒载量橙色代表固相样本，绿色代表液相样本从图中可以看出，固相样本中的病毒载量明显高于液相

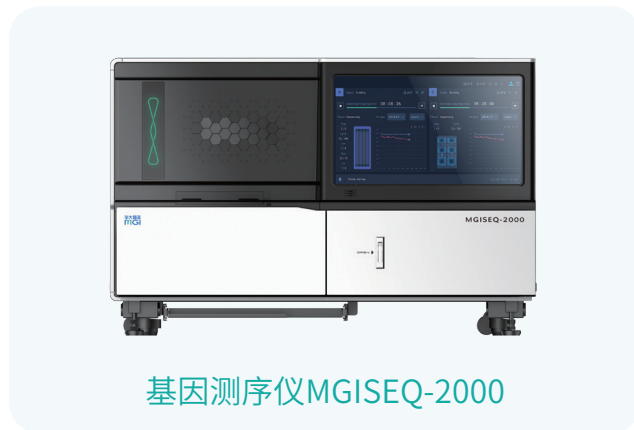
结论

多重PCR是在常规PCR基础上发展出来的一种新型PCR技术，能够同时对多个靶标进行检测以获得样本中多条目的基因的序列，不仅可节省时间和成本，更能从极端样本中提取大量的信息。基于华大智造ATOplex 技术及DNBSEQ测序平台可满足病原、肿瘤、分子育种等多个领域的广泛的应用，如图5所示。

本研究中，澳大利亚昆士兰大学水管理高等研究中心基于此平台成功检测出城市污水中极低含量的SARS-CoV-2病毒，同时证明了该方法能够对污水中病毒含量进行准确的定量分析，并可获得基因全长序列以进行后续的系统发育分析，从而有利于WBE 在公共卫生应急方面的进一步应用和发展。

华大智造自主研发的ATOplex新冠多重PCR靶向测序技术，能够同时对多个靶标进行扩增和文库

制备，还开发了与之配套的数据分析软件，以简单、快捷的流程完成病毒分型和溯源，具有高效、精准、自动化程度高的特点。同时，还可以兼容多款华大智造不同通量的基因测序仪，以满足不同场景的需求。



ATOplex platform

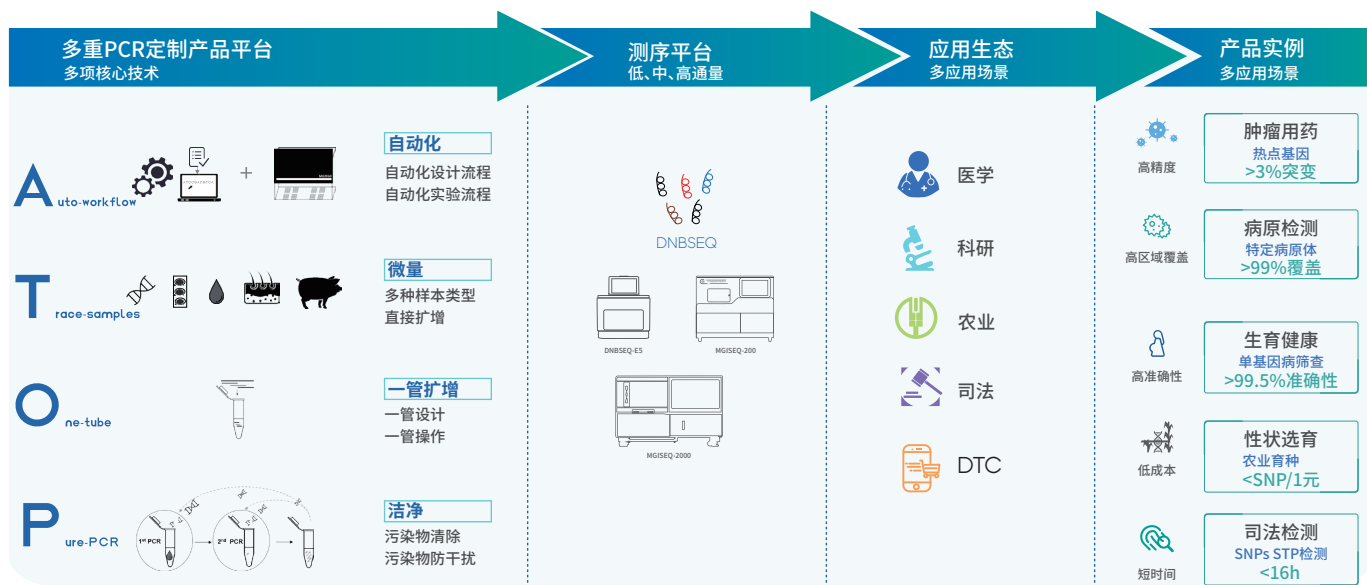


图5. ATOplex多重PCR建库试剂盒定制化平台

更多资讯

ATOplex平台详情请点击：<https://www.mgi-tech.com/products/atoplex/>

ATOplex公邮：mgi_atoplex@mgi-tech.com

仅供研究使用，不适用于临床诊断

参考文献

1. Gaofeng Ni *et al.* Novel Multiplexed Amplicon-Based Sequencing to Quantify SARS-CoV-2 RNA from Wastewater. *Environmental Science & Technology Letters* 8, 683-690, doi:10.1021/acs.estlett.1c00408 (2021).
2. Nishiura, H. *et al.* Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int J Infect Dis* 94, 154-155, doi:10.1016/j.ijid.2020.03.020 (2020).
3. Gonzalez, R. *et al.* COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Res* 186, 116296, doi:10.1016/j.watres.2020.116296 (2020).
4. Polo, D. *et al.* Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 - approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Res* 186, 116404, doi:10.1016/j.watres.2020.116404 (2020).
5. Xiao, M. *et al.* Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples. *Genome Med* 12, 57, doi:10.1186/s13073-020-00751-4 (2020).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	DNBSEQ-G99ARS 基因测序仪	900-000560-00
	DNBSEQ-E25ARS 基因测序仪	900-000473-00
	基因测序仪MGISEQ-200RS	900-000350-00
	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
软件	微生物快速识别平台PFI	900-000392-00
	metargetCOVID	970-000228-00
建库试剂	*ATOPlax RNA多重PCR建库试剂盒套装V3.1 (96 RXN)	940-000133-00
	*ATOPlax RNA多重PCR建库试剂盒套装V3.1 (16RXN)	940-000132-00
	DNBSEQ一步法DNB制备试剂盒 (OS-DB) (4RXN)	1000026466
测序试剂	DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL SE100/PE50)	940-000409-00
	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒	940-000236-00
	MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100)	1000019845
	MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100)	1000011719
	CPAS 条形码引物 4 试剂盒	1000014048

*本文中所使用的试剂为旧版试剂盒，我们推荐使用新版试剂盒

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



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所有，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。

版本：2023年1月版