

飞机废水监测实现流行病调查

华大智造ATOPlex技术和MGISEQ-2000测序平台助力破解Omicron毒株基因组

澳大利亚生态科学分局联合华大智造等单位基于华大智造ATOPlex平台多重PCR技术和DNBSEQ测序平台，首次成功对飞机废水中的SARS-CoV-2变异毒株Omicron进行检测和溯源。

相关研究成果已于2022年发表于*Science of the Total Environment*杂志，题为“Detection of the Omicron (B.1.1.529) variant of SARS-CoV-2 in aircraft wastewater”¹。

• 靶向测序专家

华大智造SARS-CoV-2扩增子建库技术、DNBSEQ测序平台以及配套分析软件，为新冠病毒的识别、型别鉴定与溯源提供强力保障。

• 适配自动化设备

华大智造的新冠靶向测序方案可适配自研的自动化设备，从而实现样本的高效提取及建库。



背景介绍

2021年11月25日，南非国家传染病研究所（NCID）基于豪登省内22例COVID-19病例基因组测序结果发现了一种新的SARS-CoV-2病毒亚型——B.1.1.52²。该亚型内的新突变使其具有更强的传染性，毒性更强，更强的人体内免疫逃逸能力并使得之前防范COVID-19的手段有效性下降。据此，世界卫生组织SARS-CoV-2病毒演变技术咨询小组（TAG-VE）于次日将其归入值得关切的变异株（VOC）并命名为Omicron。Omicron亚型基因组内有超过50个突变位点，其中有超过30个突变位点位于与宿主细胞受体相结合的刺突蛋白上³。更严重的是，南非SARS-CoV-2重复感染的初步分析结果表明Omicron相较于其他VOC变异株有着更高的重复感染概率。

Omicron命名当日，比利时，香港和以色列等地即发现了旅游相关的Omicron病例。而到11月27日，世界范围内已报道了115列确诊病例⁴。为了避免病毒传播，包括澳大利亚在内的50多国采取了旅游限制和强化边境管理等措施。然而在2021年11月29日，澳大利亚报告了第一例Omicron阳性病例，是在南非遣返的飞机上发现的。

对客机废水的监测，尤其当旅游成为突发VOCs传播路径时，或许是一种监测VOCs的有效手段。早在COVID-19疫情暴发初期，就有从国际航班的飞机废水中成功检测到SARS-CoV-2病毒的案例⁵。近期科学研究认为，客机废水监控对于全员COVID-19核酸阴性的国际航班的监测准确性高达83.7%⁶。

研究描述

本研究在一架抵达澳大利亚的国际航班飞机废水中，基于华大智造的ATOPlex平台和DNBSEQ测序技术首次在飞机废水中成功检测出Omicron病毒毒株。这一发现进一步提供了飞机废水作为传染媒介的证据，也证实了飞机废水作为冠状病毒的独立和非侵入性监测点的重要作用。

实验方法

样本收集及RT-qPCR分析

本次实验共收集飞往澳大利亚的国际航班的飞机废水样本12例（A1-A12）。随后每个样本取50ml离心，将上层清液进行浓缩，洗涤，进行RNA提取，最后再用缓冲液洗涤提取的RNA。

先前的研究试验表明，SARS-CoV-2 N基因的RT-qPCR检测可用于SARS-CoV-2 RNA的检测和定量⁷。而对目标S基因del（69-70）突变的检测可以初步判定Omicron毒株是否存在。故据此先验证废水样本中是否存在Omicron亚型。

文库制备及测序

本研究采用了华大智造的ATOPlex技术和某友商的ARTIC V3技术对样本进行测序文库构建。对于ATOPlex技术平台而言，实验使用ATOPlex SARS-CoV-2全基因组扩增panel构建短扩增子（240-333 bp）文库从而实现靶向建库。建库过程中，首先将RNA逆转录为cDNA；随后将Lambda噬菌体

DNA (200 GC) 作为掺入对照添加到每个样品中，以确保每个样品产生足够的扩增产物用于测序；DNA/cDNA样品经过两轮PCR反应扩增后纯化定量（浓度 ≥ 4 ng/ μ L）。

上述所得文库等摩尔混合后用MGIEasy双Barcode环化试剂盒进行单链环状DNA文库制备，随后进行消化和环化形成环状单链DNA (ssCirDNA)，然后进行滚环扩增以生成DNA纳米球 (DNB)文库，使用华大智造DNBSEQ-2000测序仪进行双端100个碱基的读长（PE100）测序。

生信流程分析

ATOPlex测序数据在DNBSEQ-2000测序仪下机后，使用SARS-CoV-2_MultiPCR_v1.0工作流程 (https://github.com/MGItech-bioinformatics/SARS-CoV-2_Multi-PCR_v1.0)对数据进行处理。数据处理大致如下：测序数据过滤掉引物序列后，比对到SARS-CoV-2基因组、Lambda噬菌体DNA或GAPDH上。每个样本中的SARS-CoV-2的数据量通过噬菌体数据量进行标准化。变异株情况则由Freebayes平台根据BWA mem version 0.7.13-r1126比对结果计算得出。此外，每个样本根据变异信息和SARS-CoV-2毒株的基因组生成基因组的一致序列。

最后，将飞机废水中检测出的病毒基因组序列与最新的SARS-CoV-2基因组进行比对以进行进化枝分配、突变鉴定、基因组质量检查以及系统发育树构建和可视化的比较等。本研究的整体流程思路可参照图1。

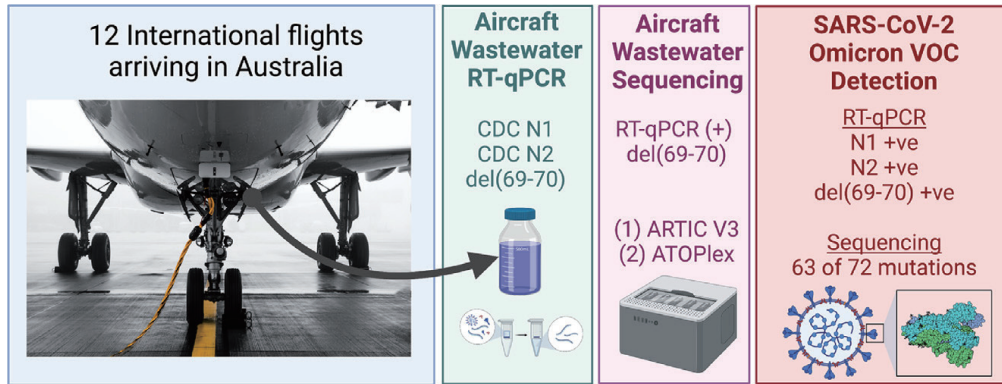


图1. 本研究的整体研究流程

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
共收集飞往澳大利亚的国际航班的飞机废水样本12例 (A1-A12)。	 ATOPlex RNA多重 PCR建库试剂盒套装  MGISEQ-2000 基因测序仪	SARS-CoV-2_ MultiPCR_v1.0 Freebayes平台 BWA	进化枝分配、 突变鉴定、 基因组质量检查、 系统发育树构建

结果

RT-qPCR检验样本是否含有新冠病毒

RT-qPCR分析结果显示，对于SARS-CoV-2 US CDC N1和N2试验，A3和A12号样本中存在SARS-CoV-2病毒。而除了A12号样本外，其它飞机废水样品通过del(69-70)分析均未产生扩增。

对于样本A12,del(69-70)试验的平均Cq值为 35.5 ± 0.17 ，表明该样本中检测到了Omicron变异亚系BA.1 (Omicron病毒分为BA.1和BA.2，其中BA.1可以通过SGTF确认) (表1)。

Flight No.	Departure port– sampling port	Flight duration	Sampling date	Number of passengers	Mean \pm SD log ₁₀ GC/50 mL of wastewater		Mean Cq \pm SD
					US CDC N1	US CDC N2	del(69–70)
A1	JNB-DRW	~ 14 h	11/04/2021	193	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A2	JNB-DRW	~ 14 h	19/08/2021	166	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A3	IST-DRW	~ 14 h 25 min	2/10/2021	142	2.98 \pm 0.13	3.01 \pm 0.27	<ALOD
A4	LAX-SYD	~ 15 h	03/11/2021	108	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A5	LAX-SYD	~ 15 h	04/11/2021	Freighter service (no passengers)	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A6	DEL-DRW	~ 11 h 40 min	07/11/2021	37	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A7	LAX-SYD	~ 15 h	08/11/2021	109	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A8	LAX-SYD	~ 15 h	09/11/2021	147	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A9	DEL-DRW	~ 11 h 40 min	10/11/2021	77	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A10	LAX-SYD	~ 15 h	14/11/2021	Freighter service (no passengers)	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A11	LAX-SYD	~ 15 h	15/11/2021	191	<ALOD	<ALOD	<ALOD
A12	JNB-DRW	~ 14 h	25/11/2021	20	4.30 \pm 0.02	4.19 \pm 0.03	35.5 \pm 0.17

JNB: O.R. Tambo International airport.
 DRW: Darwin International Airport.
 LAX: Los Angeles International Airport.
 SYD: Sydney International Airport.
 DEL: Indira Gandhi International Airport.
 IST: Istanbul Airport.
 ALOD: Assay limit of detection.

表1. 收集的废水样品利用RT-qPCR分析是否存在SARS-CoV-2或者Omicron亚型RNA

基于ATOPlex的测序具有更广的覆盖度和灵敏度

利用ATOPlex和ATRIC V3两种技术平台对A12样本进行高通量测序。通过两种不同检测方案对比结果发现，ATOPlex比ATRIC V3拥有更高的基因组覆盖率：ATRIC V3覆盖率仅为61%，而ATOPlex可以覆盖99%的基因组，且ATOPlex检测出了所有的Omicron突变，而ARTIC V3检测出20个突变（图2）。如此巨大差异的主要原因为ATOPlex平台在建库时加入的259对引物，并且多重引物方式不会受到Omicron突变干扰，并避免引物丢失的影响，这也表明了ATOPlex对低深度的突变有更高的敏感度和准确度（图2）。

而最终的结果表示，由于ARTIC V3低基因组覆盖率和碎片化的测序质量，造成后续更深入的确认毒株系有一定的限制。而使用ATOPlex的测序生成的系统发育进化树是非常接近参照对比，这也证明ATOPlex能够尽可能的恢复病毒的基因组信息，从而准确、快速的对病毒变种进行溯源。

ATOPlex技术测序结果有更好的数据表现

另外，使用ATOPlex平台的读长和读数都比ATRIC V3有更好的表现，ATOPlex平台从A12废水样本中共得到4.8Gb的测序数据、24M PE100测序reads，Q30大于88.3%。在结果分析中，根据reads质量、adapter和未知碱基（N）率对reads进行过滤后，其中96.1%的reads用于下游分析，表明了数据的高质量。

聚类分析溯源

系统发育进化树显示，相较于野生型毒株，A12废水样本与澳大利亚Omicron的临床分离株聚集良好，而聚类结果表明A12飞机废水样本中的病毒基因组与Omicron变种(21K)关系最为密切（图3）。

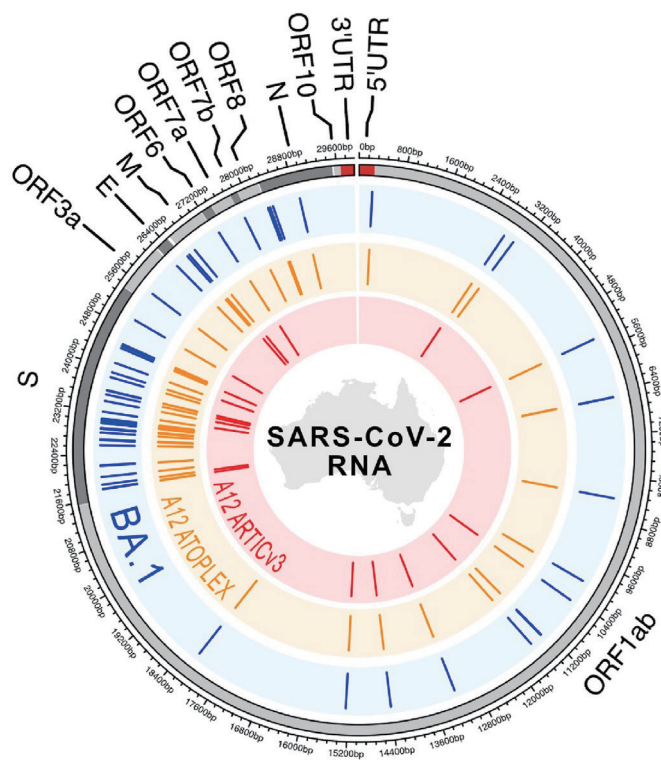


图2. Omicron BA.1的参考基因组以及ATOPlex和ARTIC V3检测同一样本A12的基因组突变结果。蓝色圈为Omicron BA.1基因组上的突变位置，黄色圈表示用ATOPlex平台检测的突变位置，红色圈表示用ARTIC V3检测的突变结果。

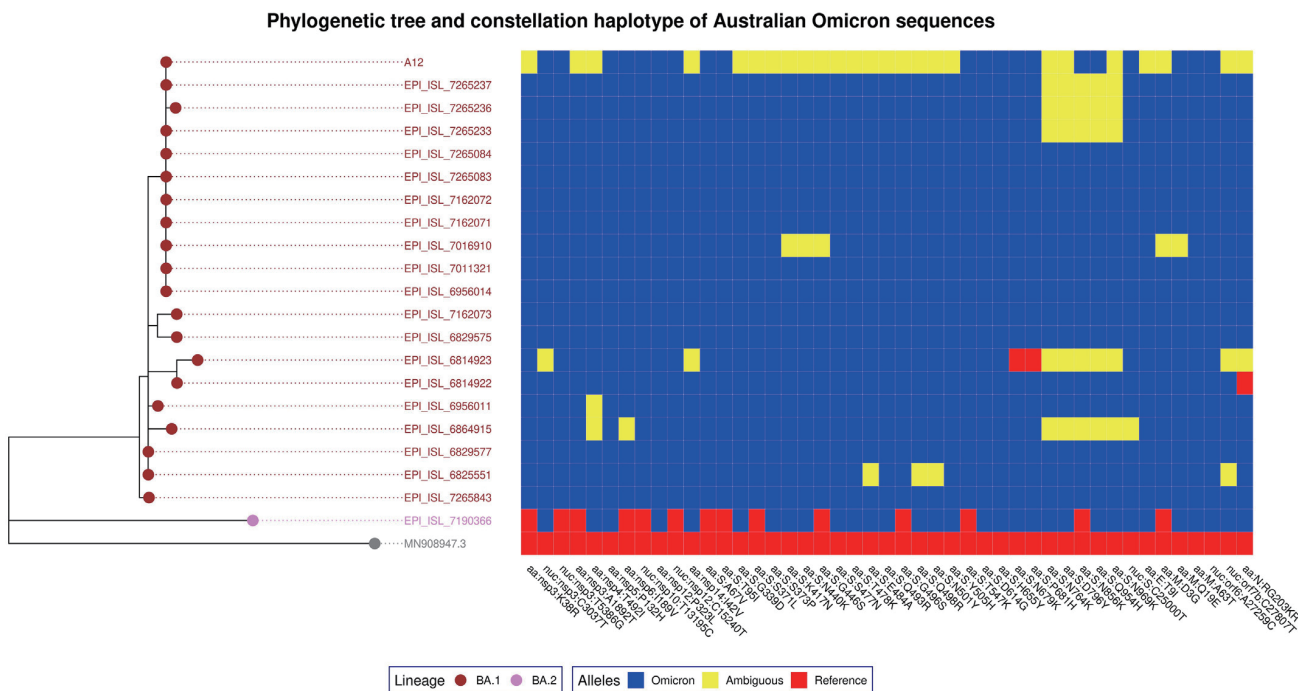


图3. 澳大利亚本土Omicron序列与飞机废水Omicron序列(A12)聚类的系统发育树和星座单倍体。蓝色标记为Omicron突变，黄色标记为不明确突变，红色标记为参考株系。

结论

本次研究证明了飞机废水是监控Omicron在全球传播的重要途径之一。本次研究使用了华大智造ATOplex技术平台以及MGISEQ-2000测序仪成功在飞机废水中检测到Omicron变异毒株并对其溯源。

在该研究中，首先基于ATOplex技术对病毒全基因组进行靶向文库构建，后在MGISEQ-2000测序仪上进行PE100测序。相对于另一种方案ARTIC V3而言，ATOplex平台表现出更高敏感度，覆盖度和准确度，因此更适合废水或环境中的新冠病毒检测和溯源。



基因测序仪MGISEQ-2000

参考文献

1. Ahmed, W. et al. Detection of the Omicron (B.1.1.529) variant of SARS-CoV-2 in aircraft wastewater. *Sci Total Environ* 820, 153171, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153171 (2022).
2. National Institute for Communicable Diseases (NICD), 2021. New COVID-19 Variant Detected in South Africa. 25 November 2021. Accessed on 5 December 2021.
3. UK Health Security Agency, 2021. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England: Variant of Concern: Omicron, VOC-21 Nov-01 (B.1.1.529). 3 December 2021. Accessed on 5 December 2021.
4. California Department of Public Health (CA DPH), 2021. Fact Sheet: Omicron Variant. 1 December 2021. Accessed on 5 December 2021
5. Ahmed, W. et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers. *J Travel Med* 27, doi:10.1093/jtm/taaa116 (2020).
6. Ahmed, W. et al. Wastewater surveillance demonstrates high predictive value for COVID-19 infection on board repatriation flights to Australia. *Environ Int* 158, 106938, doi:10.1016/j.envint.2021.106938 (2022).
7. CDC, 2019. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time rRT-PCR Panel Primers and Probes.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT生信分析加速器（工作站式服务器）	970-000085-00
	metargetCOVID	970-000228-00
建库试剂	ATOPlex RNA多重PCR建库试剂盒套装V3.1（16 RXN）	940-000132-00
	MGIEasy 双barcode环化试剂盒（16 RXN）	1000020570
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）	1000012554
	CPAS条形码引物3试剂盒V2.0	1000020834

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

撰稿：张婉灵 李奕钦

责任编辑：王其伟

审稿：江遥