

# Illumina Microbial Amplicon Prep— Influenza A/B

インフルエンザウイルス研究および  
公衆衛生サーベイランスのための  
合理化されたライブラリー調製  
ソリューション

- A型およびB型インフルエンザウイルス株の迅速かつバイアスのない全ゲノムカバレッジを実現
- さまざまなサンプル種やウイルスからのRNAインプット量に対応
- 全ゲノム解析とバリエーション解析を簡略化

illumina®

## はじめに

A型およびB型インフルエンザウイルス株は、季節性、パンデミック、および人獣共通の呼吸器疾患の感染拡大を引き起こす可能性があります。人間と動物の健康に世界的な脅威をもたらします。新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックにより、次世代シーケンサー (NGS) ベースの病原体ゲノムサーベイランスの有用性が実証されたことで、研究者は新たな変異株を追跡し、公衆衛生上の対応を導くことが可能になりました。同様のアンプリコンベースのアプローチが、インフルエンザウイルスのシーケンスと特性評価に利用されています。<sup>1,2</sup> しかし、インフルエンザウイルスはゲノムの多様性が高いため、正確にシーケンスを行うことは困難です。さらに、利用可能なシーケンスプロトコールの多くは効率化されておらず、ばらつきのあるシーケンス結果を生成する可能性があります。

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットは、実証済みのIllumina COVIDSeq™ Assayを基盤としており、インフルエンザウイルスに対する正確かつバイアスのないシーケンスと特性評価を実現します。使いやすいDRAGEN™ Targeted Microbial Appとの統合により、データ解析が簡略化されるため、バイオインフォマティクスの専門知識を持たないラボでも変異株の同定やウイルスのサブタイピングにアクセスできるようになります。統合型のスケーラブルなワークフロー (図1) の一部としてIllumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットを使用することで、研究者はゲノムサーベイランスの取り組みを拡大して地域社会の健康を守ることができます。

## 効率化されたワークフロー

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bは、迅速かつバイアスなくインフルエンザウイルスをシーケンスし、特性評価するための他検体のマルチプレックスが可能なRT-PCRベースのライブラリー調製ソリューションです (表1)。このキットは、ロバストなIllumina COVIDSeq Assayワークフローを基盤としており、インフルエンザウイルス株の検出と特性評価のためのシーケンスおよびデータ解析を介した遺伝物質の分離のための手順が含まれます (図1)。

### ライブラリー調製

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットには、RNAの逆転写、PCR増幅、アンプリコンのタグメンテーション用のビーズ結合トランスポソーム、および全ゲノムアンプリコンからシーケンスライブラリーを生成するためのインデックスアダプターに必要な試薬が含まれています (図2)。本キットは市販のキットを使用して抽出されたRNAと互換性があります。

表1: 合計ターンアラウンドタイムとハンズオンタイム

サンプル数	ターンアラウンドタイム	ハンズオンタイム
8サンプル	8時間	1.9時間
48サンプル	9.3時間	3.2時間

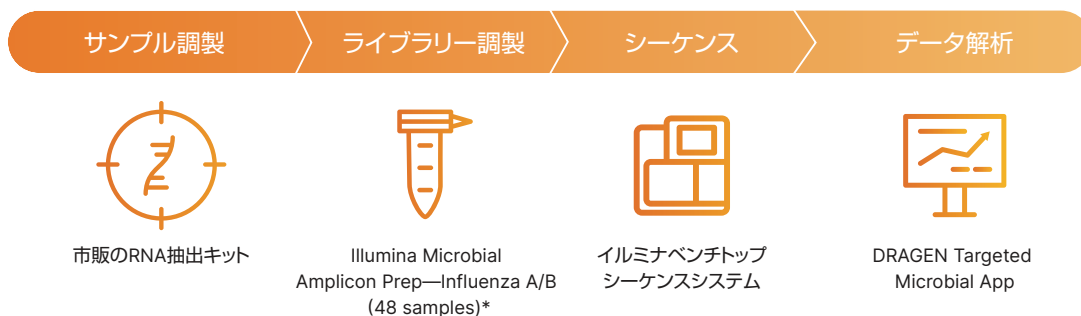


図1: Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bワークフロー: 効率化されたワークフローでは、Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットを使用してインフルエンザウイルスライブラリーを調製し、イルミナベンチトップシーケンスシステムでシーケンスし、DRAGEN Targeted Microbial Appで検出、バリエーションコールおよび系統タイピングを解析します。\*キットには、A型/B型インフルエンザウイルスユニバーサルプライマープール、RT-PCR試薬、ユニークデュアルインデックスなど、ライブラリー調製に必要なすべての試薬が含まれています。RNA抽出試薬は含まれていません。

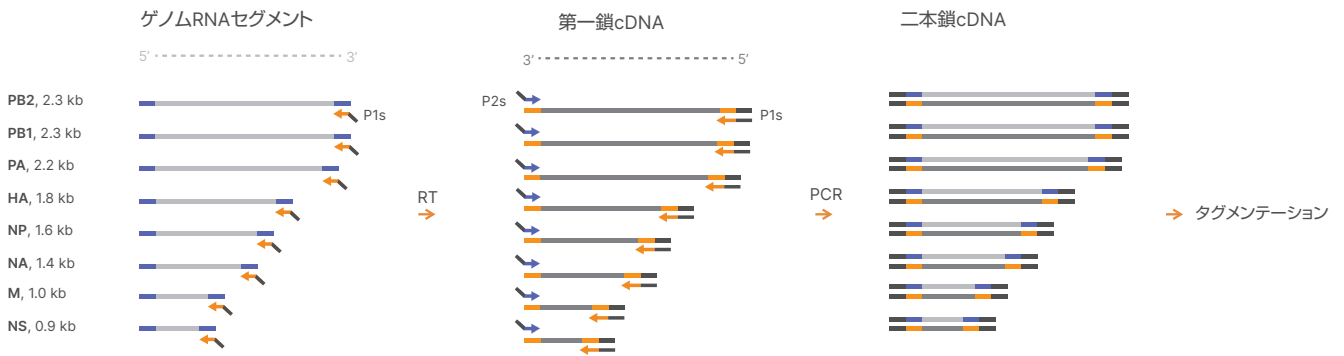


図2：タグメンテーション用のアンプリコンを生成するためのA型/B型インフルエンザウイルスのユニバーサルな全ゲノムRT-PCRアプローチ：A型/B型インフルエンザプライマープールには、第1および第2の相補的DNA（cDNA）ストランドの3'末端にハイブリダイズするように設計された16個のプライマーが含まれています。これにより、各ゲノムRNAセグメントの完全長のcDNA合成とその後のPCR増幅の両方が可能になり、タグメンテーションとライブラリー作成に使える完全なアンプリコンが生成されます。青色とオレンジ色の線は、ゲノムRNAセグメントの保存されたノンコーディング領域を表します。黒い線は、ユニバーサルプライマーによって付加された追加のDNA配列を表します。薄い灰色の線は、ゲノムRNAまたは第2のcDNAストランドに対応し、濃い灰色の線は第1のcDNAストランドに対応します。

### シーケンス

調製されたライブラリーは、イルミナのどのシーケンスシステムでもシーケンスできます。ただし、Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bの48サンプル構成は、iSeq™ 100システム、MiniSeq™ システム、MiSeq™ システム、NextSeq™ 500システム、NextSeq 550システム、NextSeq 1000システムおよびNextSeq 2000システムなどのベンチトッププラットフォームに適しています。

### データ解析

Illumina DRAGEN Targeted Microbial AppはBaseSpace™ Sequence Hubで自由に使うことができます。使いやすいアプリは、リードをリファレンスゲノムにアライメントし、バリエーションコールを行い、サンプル内の核酸種の集団を表すコンセンサスゲノム配列を生成します（図3）。利用可能な場合は、追加の系統解析のために外部のキュレーションされたデータベースにアクセスします。

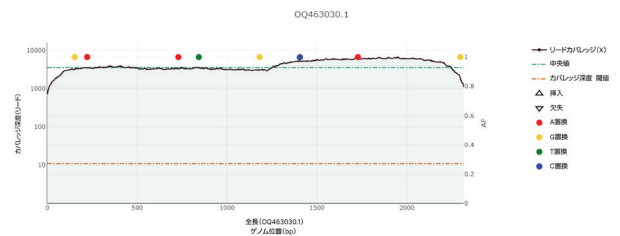


図3：DRAGEN Targeted Microbial Appを使用して生成されたA型インフルエンザウイルスのカバレッジプロット：DRAGEN Targeted Microbial Appから出力されるカバレッジプロットはインタラクティブであり、対数スケール間の切り替え、カバレッジラインの中央値、置換、欠失情報を含めるまたは除外する機能があります。A型およびB型インフルエンザウイルスなど、セグメント化されたウイルスの場合、各セグメントが個別のカバレッジプロットに表示されます。各円は、リファレンスゲノムとは異なるSNPを表します。各色は、置換された塩基（A、G、T、またはC）の情報を示しています。また、挿入と欠失は三角形で示されます。インタラクティブプロットは、ここに示すようにPNGファイルとしてダウンロードできます。

## A型/B型インフルエンザウイルスゲノム全体にわたる優れたカバレッジ

illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bは、A型インフルエンザウイルスとB型インフルエンザウイルス両方のゲノムに対する広範なシーケンスカバレッジを提供するように設計されています。このキットには、十分にテストされ確立された16種類のユニバーサルプライマープールが含まれており<sup>3,4</sup>、非常に多様なノイラミニダーゼ (NA) およびヘマグルチニン (HA) 遺伝子を含む、A型およびB型インフルエンザウイルス株を98%以上カバーします (図4、図5)。<sup>5</sup>

柔軟なillumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットは、標準的な抽出プロトコールを使用して分離されたRNAサンプルと互換性があり、変更を加える必要はありません。鼻腔スワブを含む臨床研究サンプルは、品質やウイルス量が異なる場合があります。illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットは、Ct値が21.2~31.1 (つまり、高ウイルスカバレッジから低ウイルスカバレッジ) の範囲のウイルス分離株について優れた性能を維持します。最適な結果を得るには、30未満のCt値のサンプルが推奨されます。

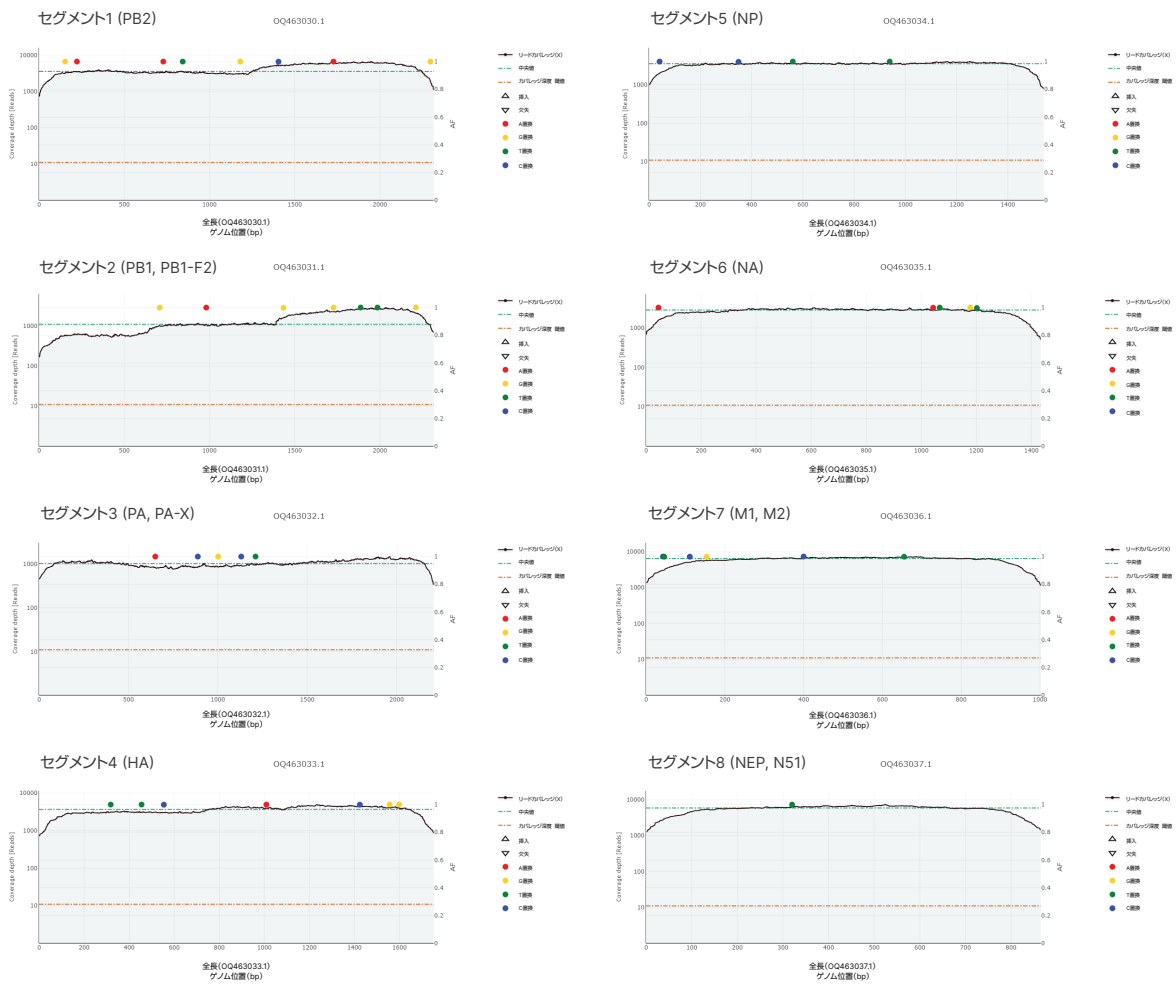


図4: A型インフルエンザウイルスサンプルに対するゲノムカバレッジプロット; 鼻咽頭スワブからのH1N1ウイルスサンプル (Ct 値 = 21.2、ウイルスRNA約482コピー) の代表的なカバレッジプロット。A型インフルエンザウイルスの8セグメントすべてにわたるゲノムワイドなカバレッジを示しています。各グラフは、A型インフルエンザウイルスゲノムの各セグメントのカバレッジを表します。リファレンスゲノムのアクセッションIDが各グラフに示されています。点線はカバレッジ深度の中央値を表します。100万ペアエンドリード (149 bp × 2) をデータ解析に使用しました。データはDRAGEN Targeted Microbial Appを使って解析しました。

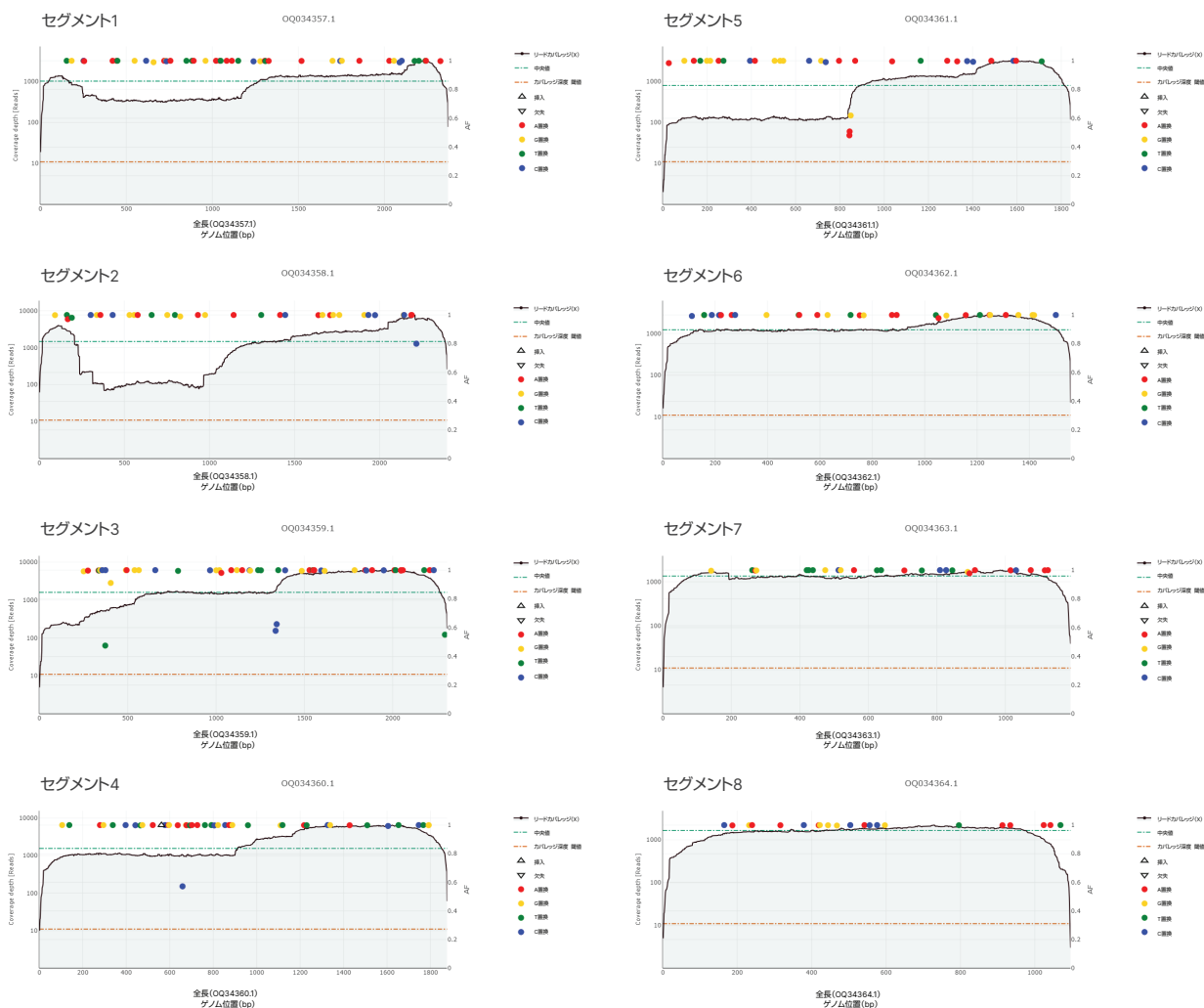


図5：B型インフルエンザウイルスサンプルに対するゲノムカバレッジプロット：B型インフルエンザウイルスサンプル（ATCC VR-1735、Ct 値 = 22.1、ウイルスRNA約85,000コピー）からの代表的なカバレッジプロット。B型インフルエンザウイルスの8セグメントすべてにわたるゲノムワイドなカバレッジを示しています。各グラフは、B型インフルエンザウイルスゲノムの各セグメントのカバレッジを表します。リファレンスゲノムのアクセッションIDが各グラフに示されています。点線はカバレッジ深度の中央値を表します。100万ペアエンドリード（149 bp × 2）をデータ解析に使用しました。データはDRAGEN Targeted Microbial Appを使って解析しました。

## まとめ

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/Bキットを使用し、インフルエンザウイルスの特性評価とサーベイランスのための効率化されたソリューションを提供することで、公衆衛生研究者は地域社会の健康を守ることができます。この柔軟なアッセイでは、さまざまなウイルス量を含む培養物または鼻咽頭のスワブおよび洗浄液から抽出されたRNAインプットを使用できます。革新的なNGSプラットフォームとの統合により、非常に効果的な公衆衛生サーベイランスと影響力の大きいインフルエンザウイルス研究のための優れたデータ品質、柔軟性、スケーラビリティが実現します。

## 詳細はこちら

[Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B](#)

[微生物学ゲノミクス](#)

## 製品情報

製品	カタログ番号
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B (48 samples)	20106305

## 参考文献

1. Lee HK, Lee CK, Tang JWT, Loh TP, Koay ESC. [Contamination-controlled high-throughput whole genome sequencing for influenza A viruses using the MiSeq sequencer.](#) *Sci Rep.* 2016;6:33318. doi:10.1038/srep33318
2. Imai K, Tamura K, Tanigaki T, et al. [Whole Genome Sequencing of Influenza A and B Viruses With the MinION Sequencer in the Clinical Setting: A Pilot Study.](#) *Front Microbiol.* 2018;9:2748. doi:10.3389/fmicb.2018.02748
3. Zhou B, Wentworth DE. [Influenza A virus molecular virology techniques.](#) *Methods Mol Biol.* 2012;865:175-192. doi:10.1007/978-1-61779-621-0\_11
4. Zhou B, Lin X, Wang W, et al. [Universal influenza B virus genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics.](#) *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1330-1337. doi:10.1128/JCM.03265-13
5. Protocols. [io.A sequencing and subtyping protocol for influenza A and B viruses using Illumina COVIDSeq Assay Kit.](#) [www.protocols.io/view/a-sequencing-and-subtyping-protocol-for-influenza-n2bvj8mrxgk5](http://www.protocols.io/view/a-sequencing-and-subtyping-protocol-for-influenza-n2bvj8mrxgk5). Published March 28, 2023. Accessed June 21, 2023.

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
[jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

[www.facebook.com/illuminakk](https://www.facebook.com/illuminakk)

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件： [jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

**illumina**<sup>®</sup>