



## 使用 RNAdvance Viral 和 OT-2 平台，进行高效且高通量的 SARS-CoV-2 病毒 RNA 检测及测序研究

Jethary Rader; <sup>1</sup>Kinnari Watson, Ph.D.; <sup>1</sup>Morayo Adebisi, Ph.D.; <sup>2</sup>Han Wei, Ph.D.

版权归属: <sup>1</sup>Opentrons Labworks, New York, NY; <sup>2</sup>Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN

### 应用介绍

2020年新冠病毒肆虐全球，激化了人类对于临床研究目的的高通量 RNA 检测和基因测序的需求。传统手动操作方案难以提升RNA检测的效率。在本项研究中，我们展示了在 Opentrons OT-2 自动化移液工作站上使用 Beckman Coulter Life Sciences RNAdvance Viral 试剂盒 (C63510) 的自动化 SARS-CoV-2 RNA 提取工作流程。我们提供的分析数据显示了通过 qRT-PCR 定量的 SARS-CoV-2 检测限 (LoD) 和序列比对数据，这些数据为自动测序样品和文库制备提供了依据，以便对突变株进行遗传鉴定。

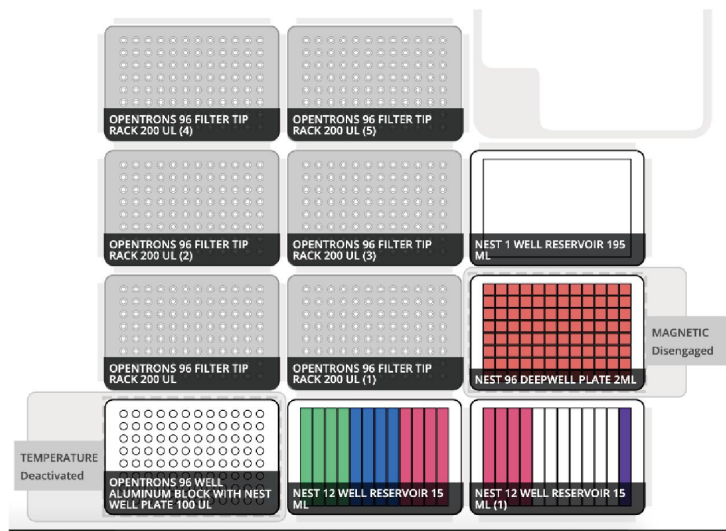
### RNAdvance 病毒试剂盒和 OT-2 平台概述

RNAdvance Viral kit 通过利用 SPRI 顺磁珠技术，从样品中高效提取病毒RNA。我们在自动化的 Opentrons 平台上使用了这种试剂，从合成鼻基质 (110mM NaCl, 1%w/v的猪胃II型粘液 (Sigma M2378-100G) 和10µg/mL w/v人类基因组 DNA (Coriell NA12878)，以90%v/v的TE/SNM) 样品中提取了不同浓度的热灭活的 SARS-CoV-2 (ATCC® VR-1986HK™)。每个浓度包括 20 个测试样品、2 个阳性对照和 2 个阴性对照。

### 工作流程吞吐量

图 1 显示了自动化 RNAdvance 病毒提取工作流程的 OT-2 甲板布局。该工作流程从向样品裂解液中添加 Bind (BBB) 开始，每个样品仅需要消耗10 个吸头，可灵活运行 8 个批次大小的最多 96 个样本。报告中描述的工作流程持续时间包括实际操作时间、样品裂解时间和优化后样品的运行时间 (图 2)。

使用 RNAdvance Viral 试剂盒和 OT-2 平台，处理 96 个样本的工作流程总共需要 3.5 小时，您可以复制链接到浏览器，查看具体协议流程：<https://protocols.opentrons.com/protocol/bc-rnadvance-viral>。您可以根据您的需求灵活地改变方法变量，以获得您所需要的批次大小、样品输入和洗脱体积的所需结果。



**图1：配备模块、实验耗材和 RNAdvance Viral 试剂的 Opentrons OT-2 实验甲板布局。**该工作流程在 OT-2 上是可以全自动运行的，每个样品使用 10 个吸头，并从加入 Bind (BBB) 开始。实验甲板上耗材内容有：最多 10 个吸头架、1 个 NEST 单孔储液槽、2 个 NEST 12 孔储液槽、1 个 NEST 0.1mL PCR 板和 1 个 NEST 2mL 深孔板，模块包括一个磁珠纯化模块和一个温控模块，配备一个 P300 多通道移液器。所有的 NEST 耗材和模块都由 Opentrons 提供。

A

批次大小	运行时间	裂解时间	手动操作时间	全工作流程耗时
8 个样品	45 分钟	20 分钟	10 分钟	1 小时, 15 分钟
24 个样品	1 小时, 2 分钟	20 分钟	20 分钟	1 小时, 40 分钟
48 个样品	1 小时, 20 分钟	20 分钟	30 分钟	2 小时, 10 分钟
96 个样品	2 小时, 38 分钟	20 分钟	40 分钟	3 小时, 38 分钟

B

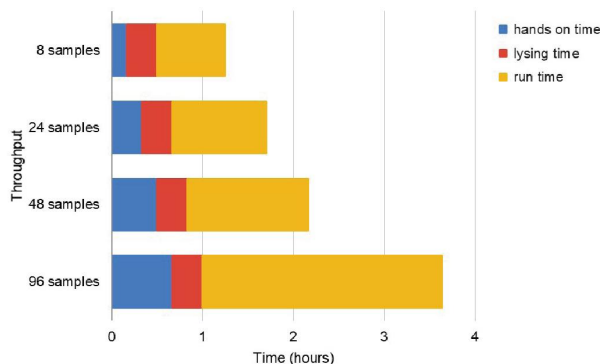


图2: 在 OT-2 平台上使用 RNAdvance Viral 试剂盒的吞吐量情况

整个工作流程运行所需的时间包括 3 个部分：操作时间、裂解时间和运行时间。操作时间包括样品和 OT-2 的准备工作。运行时间指的是 OT-2 从开始到完成整个协议所需的时间。

A) 处理 8 个样品需要 45 分钟，处理 96 个样品需要 2 小时 38 分。

B) 图形化展示了不同样品数量下的运行处理时间。

## RNAAdvance 病毒试剂盒检测限制

检测限制 (LoD) 是用于确定 OT-2 平台上自动化 RNAAdvance Viral 提取效率的指标，它表示能够在 ≥95% 的重复测量中检测到的病毒拷贝数的最低浓度。我们使用 2019-nCoV CDC N1 和 RP 引物和探针 (2019-nCoV CDC EUA kit, Integrated DNA Technologies (IDT)) 进行检测，PCR 混合液和酶使用 Luna® 通用探针一步 RT-qPCR 试剂盒 (New England BioLabs)，PCR 反应在 PCRmax ECO48 实时 PCR 系统上进行。在 SARS-CoV-2 样本 (n=20) 和阳性对照样本 (n=2) 中检测到病毒 RNA (拷贝数/μL)，但在阴性对照样本 (n=2) 中未检测到。根据表 1 的总结，分析范围内的所有对比阳性样本均被确定为阳性，其中最低浓度的病毒 RNA 拷贝数为 1 拷贝/μL。PCR 参数如下。

目标水平 (copies/uL)	阳性数 / 重复总数	平均 CT 值
50	20/20	32
10	20/20	34
5	20/20	35
1	20/20	37

**表 1: 使用 OT-2 平台和 RNAAdvance Viral 试剂盒检测 SARS-CoV-2 目标 N1 的病毒灵敏度。** 1 copy/μL 是能够检测到 ≥ 95% 样本的最低浓度，被定义为检测限制 (Limit of Detection, LoD)

为了研究 RNAAdvance Viral 在 OT-2 上的自动化性能，我们将 850 copy/μL 浓度的热灭活 SARS-CoV-2 病毒加入合成鼻腔基质中，并提取 RNA。针对 N1 和 RP，确定了均值 Ct 值、标准差、变异系数 (CV %) 和检测率等规格参数 (图 3A)。

在实验样本 (n=20)、阳性对照样本 (n=2) 和阴性对照样本 (n=2) 中，对 N1 的扩增曲线进行定量分析 (图 3B)，同时对包括对照样本在内的样品中的 RP 进行定量分析 (图 3C)。

	N1	RP
Mean (Ct)	26	33
Standard deviation	1	1
CV (%)	4	3
Detection Rate	100%	100%

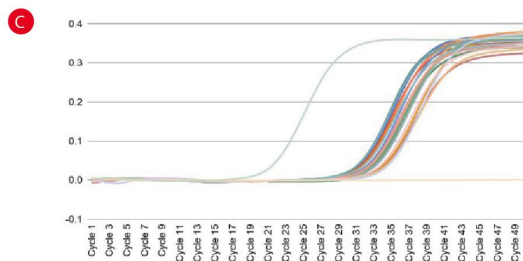
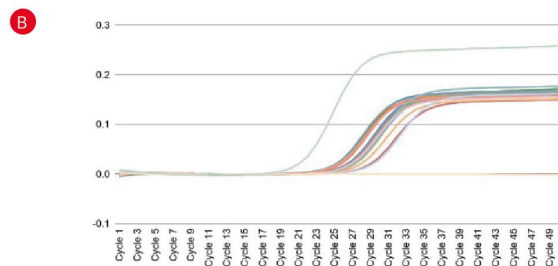
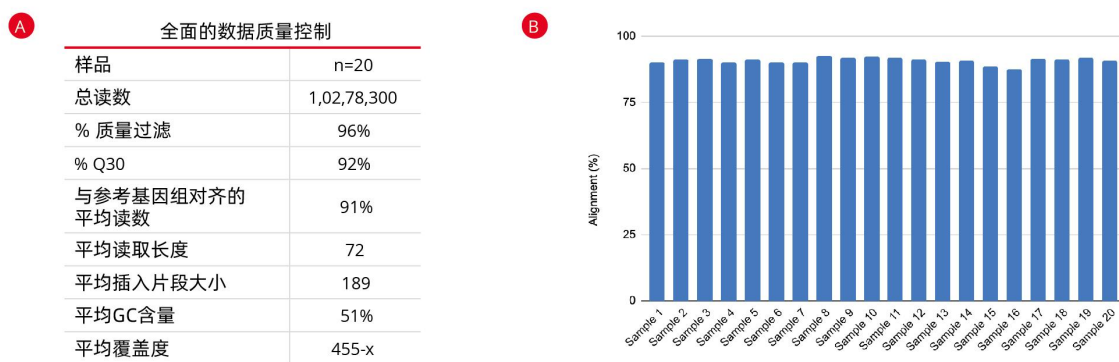


图 3. 通过各种规格的对比和扩增曲线描绘了在 OT-2 上使用 RNAAdvance 病毒试剂的可靠性能。

- A) N1 和内部对照 RP 的平均 Ct、标准差、CV (%) 和总体检出率。两个目标均检测到 100% 的样本。
- B) N1 靶标扩增的所有样品的扩增曲线，包括阳性和阴性对照。
- C) RP 靶标扩增的所有样品的扩增曲线，包括阳性和阴性对照。

## DNA 测序和数据分析

为了进一步了解测序性能，我们使用 Swift 2S Turbo DNA 文库制备试剂盒和 Swift Unique Dual Indexing 引物板进行 N1 扩增。关于 850 copy/ $\mu$ L 样本的详细数据和序列比对结果可以在图 4 中找到。我们观察到平均覆盖率为 455x，并且平均读数有 91% 与参考基因组 SARS-CoV-2 分离自 Wuhan-Hu-1 (NC\_045512.2) 对齐。读取长度与 N1 扩增区域相匹配，大约为 72 个碱基。根据 Swift 2s Turbo DNA 文库制备试剂盒制造商的说明，预期插入片段大小约为 200bp。测序是使用 Illumina MiSeq 进行的，并将筛选数据上传至 Illumina BaseSpace。在 Galaxy 中使用 Bowtie2 确定了覆盖度，并使用 Integrative Genome Viewer (IGV) 进行可视化。NC\_045512.2, SAR2-COV-2, 分离源自 Wuhan-Hu-1 的基因组是用于测序的 NCBI 参考基因组。通过在 Galaxy 中使用 QualiMap-BAMQC 工具，分析了调准、读长、片段大小和 CG 含量等信息。



**图 4：对 OT-2 上提取的样本进行全面测序数据和覆盖可视化。**

A) 综合数据 QC 表描述了多个数据点，包括 455-x 的平均覆盖率和与参考基因组对齐的平均读数，SARS-CoV-2 分离株 Wuhan-Hu-1 (NC\_045512.2) 为 91%。根据 Swift 2s Turbo DNA Library Prep 制造商的预期插入片段大小约为 200bp。

B) 每个样本与参考基因组对齐的对比。

## 总结

本研究通过 Beckman Coulter Life Sciences RNAdvance Viral 试剂盒和 Opentrons OT-2 提供了一个稳定、高性价比的自动化提取方案。该工作流程经过优化，用于 SARS-CoV-2 病毒 RNA PCR 检测，在 LoD (检测限制) 为每微升 1 个拷贝时进行了测量。我们使用了高通量测序 (NGS) 进行测试，在平均样本覆盖度达到 455 X 和平均读数对齐到 SARS-CoV-2 参考基因组的 91%。该研究表明，利用 RNAdvance Viral 试剂和 Opentrons OT-2 进行样本提取可以实现高效且经济的 SARS-CoV-2 病毒 RNA 提取。同时，在测序分析方面，该方案具有高平均覆盖度和较高的对齐率，能够为研究人员提供具有重要意义的遗传信息。这对于致力于研究 SARS-CoV-2 病毒的临床研究人员来说，为他们的工作提供了一种高效、可行的样本准备方案。

RNAdvance Viral is for molecular biology research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Beckman Coulter makes no warranties of any kind whatsoever express or implied, with respect to these protocols, including but not limited to warranties of fitness for a particular purpose or merchantability or that the protocol is non-infringing.

All warranties are expressly disclaimed. Your use of the method is solely at your own risk, without recourse to Beckman Coulter. Not intended or validated for use in the diagnosis of disease or other conditions. These protocols are for demonstration only and are not validated by Beckman Coulter.

© 2021 Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

For Beckman Coulter's worldwide office locations and phone numbers, please visit Contact Us at [beckman.com](https://beckman.com)

21.04.1466.GEN