

Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit

ライゲーションによるノーマライズで実現する超ハイスループット

シーケンシングのコストは着実に低下しているにもかかわらず、アレイベースの技術が依然として多くの大規模ゲノム研究において選択されるツールとなっています。従来、マイクロアレイは、手頃な価格、シンプルなワークフロー、ハイスループット化、信頼性の高い塩基多型 (SNP) の検出といった特徴を備えており、これらは次世代シーケンシング (NGS) では実現が難しい領域です。しかし、研究者がゲノムプロファイリングを SNP 以外にも拡大しようとする中で、ゲノムプロファイリングを SNP だけにとどまらず拡張しようとする場合、真にハイスループットで費用対効果の高い NGS ソリューションが必要とされています。

Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit は、ポピュレーション解析、アグリゲノミクス、その他の超ハイスループットアプリケーションにおいて、アレイベース技術に代わる NGS を実現します。

Twist の Normalization by Ligation (NBL) (ライゲーションによる正規化) 技術とゴールドスタンダードの酵素による断片化法を組み合わせることにより、Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit では、幅広い DNA インプットに対応する内蔵されたサンプル正規化機能を提供し、ライブラリ調製前の一般的なサンプル処理手順のコストと煩雑さを軽減します。また、早期にサンプルバーコーディングを行うことにより、下流で別々の 12 サンプルを 1 つの反応に統合することが可能となり、より合理的で効率的なワークフローが実現されます。研究目的がゲノム全体のゲノム変異の推定であれ、研究対象領域の直接的な濃縮であれ、このワークフローは NGS が直面する一般的なスループットの課題を取り除き、あらゆる規模の研究を可能にします。

主な利点

Normalization by Ligation (NBL)

- 実験前のノーマライズステップを排除
- 中間産物の定量不要
- 幅広いインプット範囲 (30 ng ~ 300 ng) のサンプルに対応

サンプルの早期プリーングによるコスト削減

- ライゲーション反応後、96 サンプルを 8 本のチューブに統合
- 上流の反応ボリュームを少量化
- 下流の消耗品を削減

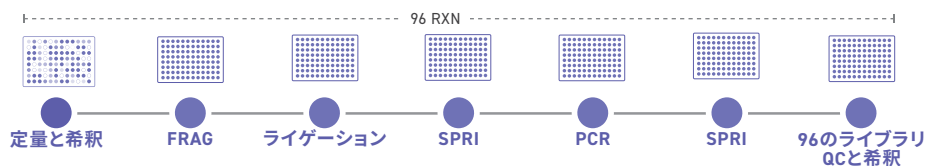
大規模マルチプレックスアッセイが可能な設計

- 1 つのキットで最大 1,152 サンプルのインデックスが作成可能な他に類を見ない性能
- 既存のラボ設備にて 12 倍の増加*
- ターゲットエンリッチメント 1 反応あたり 96 サンプルをサポート

サンプルの事前ノーマライズや中間ステップの定量が不要

Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit は、全く新しい手法であるライゲーションによるノーマライゼーションを採用しており、事前および中間のサンプル定量が不要となり、シーケンシングワークフローが合理化されます (図 1)。

一般的な酵素による断片化ライブラリ調製 (96 サンプル用)



FlexPrep UHTライブラリ調製 (96 サンプル用)

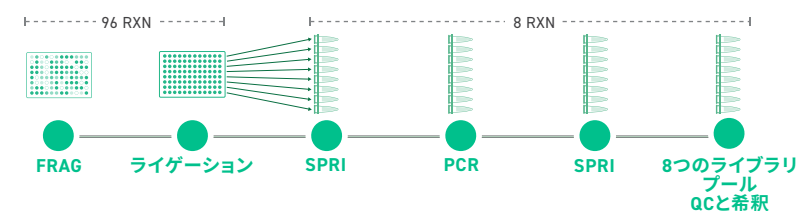


図 1. 96 サンプルを用いた一般的な酵素による断片化 (EF) と Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit の比較。一般的なライブラリ調製では、断片化の前に手間のかかる定量と希釈が必要です。反応範囲もサンプル数に応じて直線的に拡大します。Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit では、ライゲーション中に自動正規化を行い、インラインバーコードアダプターを活用して、12 反応ごとに 1 つの反応に統合されたハイスループットワークフローを可能にしています。

品質に妥協することなくリソースを節約する専用ワークフロー

FlexPrep ノーマライゼーションアダプターには 12 個のインラインバーコードが含まれ、超ハイスループットと自動化に適したマルチプレックス戦略が可能です (図 2)。

Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit を使用すると、1 キットで最大 1,152 サンプルを 1 回のシーケンシングで処理できるようになります。この効率性向上によりコストと消耗品の節約につながります。

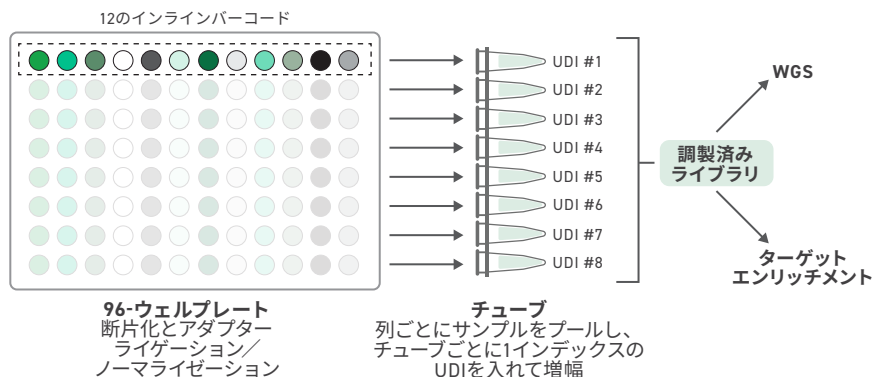
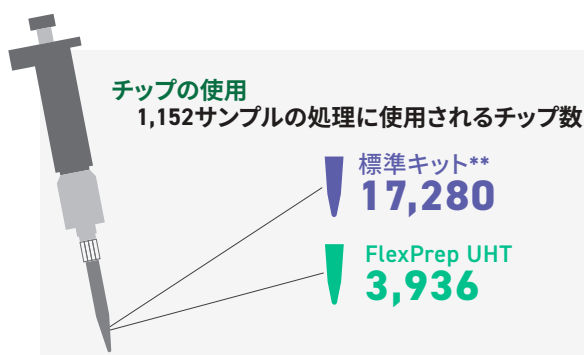


図 2. ライゲーション後の FlexPrep ワークフローを簡略化。フラグメンテーションおよびライゲーション反応は、1 サンプルにつき 1 ウェル内で調製されます。ライゲーション時に使用されるアダプターには、インラインバーコードが含まれており、96 ウェルプレートの横一列の全 12 ウェルのプールが可能で、ライゲーション後のライブラリ調製プロセスの複雑性を減らします。個々のプールは、インデックス (UDI) を PCR で付加して調製され、プール単位でのデマルチプレックスを行います。



試薬廃棄物の削減

以下の試薬が削減される設計：

- 洗浄に使用するエタノール (12 分の 1 に削減)
- ライゲーション後の AMP mix (12 分の 1 に削減)
- AMP 後の SPRI ビーズとエタノール (12 分の 1 に削減)

FlexPrep は、一定のインサートサイズを維持しながらデータをノーマライズします

Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit に含まれるセルフノーマライゼーションアダプターは、全ゲノムシーケンシング (WGS) またはターゲットエンリッチメント (TE) のワークフローにおいて、均一性やインサートサイズへの影響を最小限に抑えながら、30 ng から 300 ng のインプット量をサポートします (図 3、4)。

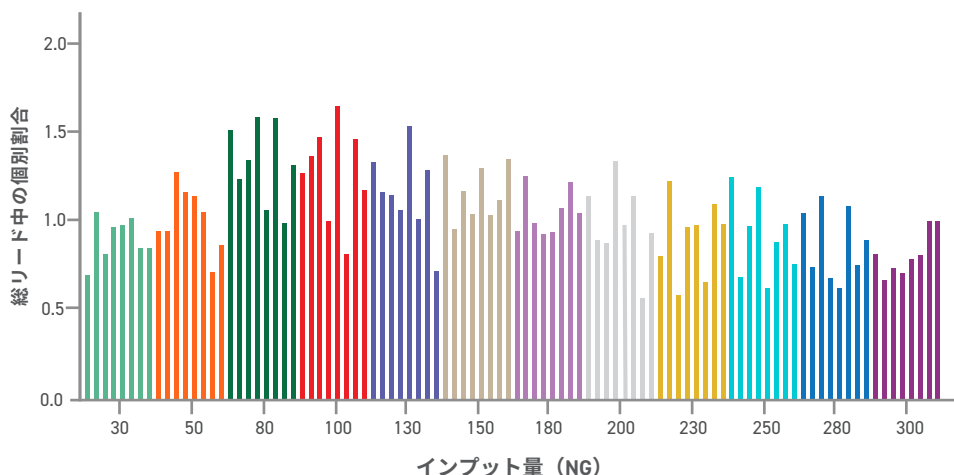


図 3. 様々な DNA インプット量から NGS リード数をノーマライズ。ヒトゲノム DNA (NA12878) からスタートし、Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit 使用後、FlexPrep Target Enrichment Protocol に従い、800 kb カスタムパネルとともに 96-plex でターゲット濃縮を行いました。作製した 96 個のライブラリをイルミナ NextSeq550 でシーケンスしました。12 サンプルからなる 8 つのライブラリプールには、それぞれ 30 ng ~ 300 ng の範囲で様々なインプット量を入れて作製しました。ユニークデュアルインデックスおよびインラインバーコードによるデマルチプレックス後に、各ライブラリに同定された総リードカウントの割合を計算しました。完全なノーマライゼーションが行われた場合の平均値は 1.04% (100/96) です。***

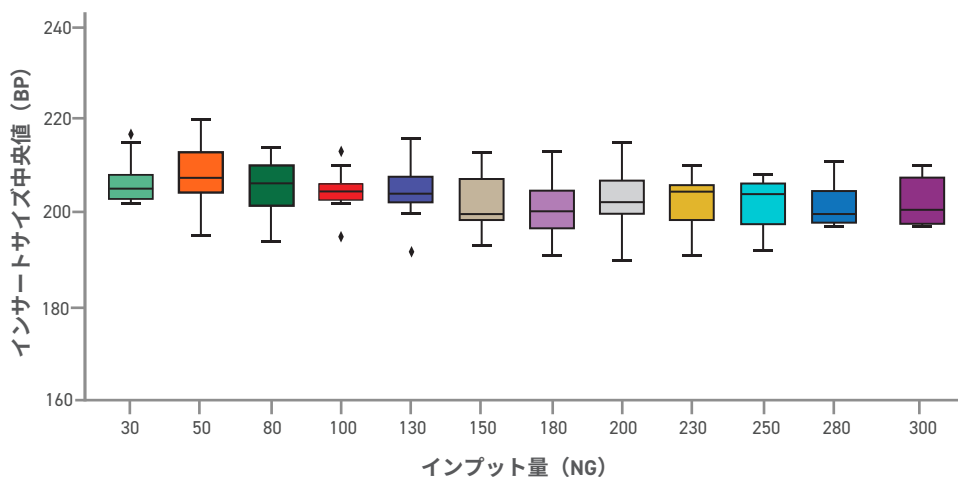


図4. 様々なインプット量からのインサートサイズ中央値。
Twist FlexPrep Target Enrichment Protocol を使用した 96-plex キャプチャーでは、10 倍の差があるインプット gDNA 量からでも一貫してインサートサイズ中央値が 210 bp から 220 bp であることが示されています。データをターゲット領域サイズの 75X でダウンサンプリングし、Picard metric の MEDIAN_INSERT_SIZE を表示しています。

より少ないオーバーシーケンスでマルチプレックス内の高い均一性

シーケンス量の多いサンプルと最も少ないサンプルの比較に基づいてノーマライズの CV 値を定義することもできますが、最もシーケンス量の少ないサンプルを単独で使用する方が、より正確なノーマライズの尺度になります。シーケンシングのカバレッジを広げること（オーバーシーケンス）で、所定のプールで望ましいカバレッジに到達するサンプルの割合が高くなります（図 5）。必要なオーバーシーケンスを最小限に抑え、目的カバレッジに到達するプール内のライブラリの割合を最大化することがノーマライゼーションプロトコルの目標です。

Twist BioScience はオーバーシーケンスを表す S metric という指標を作製しました。これは、所定プールの平均シーケンシング深度を、最も少ないシーケンシングサンプルで実現するためには、どれだけのシーケンシングが必要かを判定するものです。この S metric は、シーケンシング深度が深まるに伴い平均を上回るカバレッジのライブラリプール内のライブラリの割合を示します。値が小さいほど、個々のサンプルカバレッジ間のばらつきが小さいことを示します。完全な均一性が達成されている仮想ケースでは、S metric は 1 となります。Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit を一定または様々なインプット DNA 量のプールとともに使用する際は、一定量の場合は最小 >1.5 程度、様々なインプット量では >1.75 程度が必要です（図 6）。

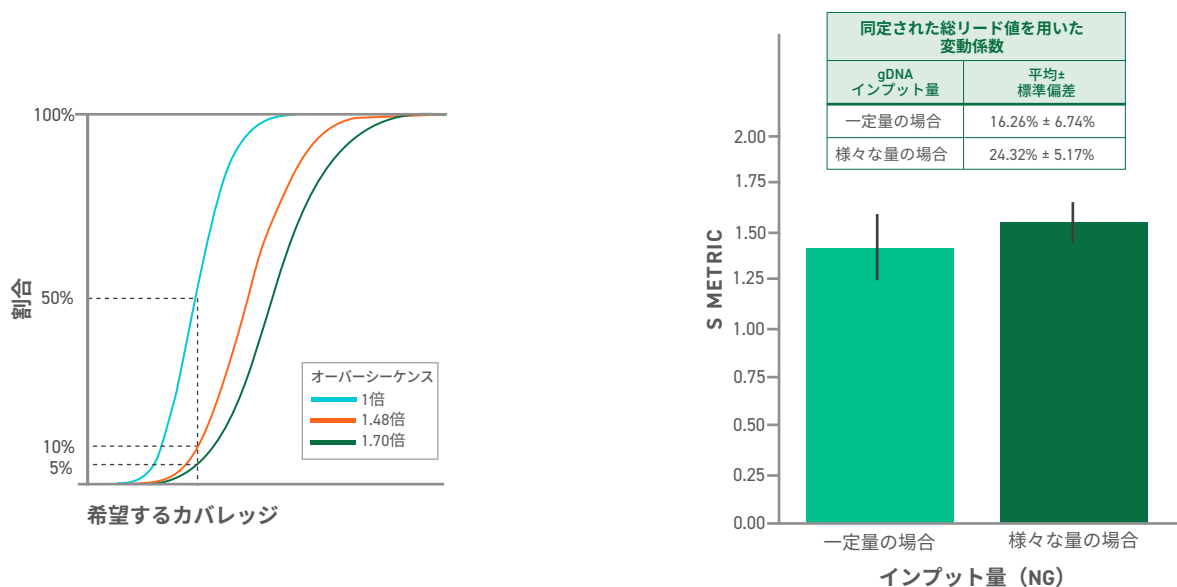


図 5. 「non-zero-samples」のサンプルの割合を希望の平均カバレッジまで上げるために必要なオーバーシーケンス倍数。希望するシーケンスカバレッジを有するライブラリがプール内でどのくらいの割合かをオーバーシーケンスの程度と表した図。96-plex FlexPrep ワークフローでは、サンプルの 90% および 95% をそれぞれ希望の平均カバレッジにするためには、48% および 70% の追加シーケンスカバレッジが必要。

図 6. 最終的な FlexPrep ライブラリプールの S metric。Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit を用いて調製したライブラリプールにて、30 ng から 300 ng の範囲で一定量用いた場合と、様々なインプット量を使用した場合の S metric 比較。比較のため、上記の各 CV の表を追加しています。

対象領域をターゲットエンリッチメントで解析

FlexPrep のワークフローの効率性は、ターゲットエンリッチメントにも及んでおり、一回のエンリッチメント反応で 1 サンプルから最大 96 サンプルまで対応可能です。

他の Twist Library Preparation Kit と同様に、FlexPrep UHT は、ターゲットエンリッチメント後に均一なカバレッジを有する複雑性の高いライブラリを作製します (表 1)。FlexPrep は、Twist カスタムパネルと組み合わせて、SNP、k-mer、構造バリエーション、およびその他のゲノム特性についてカバー領域を調整することが可能で、これにより数百万ものマーカーを調べることができます。

30 NGから300 NG GDNAをライブラリ調製へ用い、 96-PLEXでターゲットエンリッチメント	
METRICS AT 75X RAW TARGET COVERAGE	平均±標準偏差
Selected Bases	79.22% ± 0.54%
Mean Target Coverage	32.74 ± 4.78
Chimeras	1.31% ± 0.38%
Fold-80 Base Penalty	1.416 ± 0.044
Covered Bases at 10X	96.06% ± 0.94%
Covered Bases at 20X	85.41% ± 6.36%
Covered Bases at 0X	0.43% ± 0.04%

表 1. 96-plex でのターゲット濃縮を Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit と FlexPrep Target Enrichment Protocol で行った場合の指標。96-plex ターゲットエンリッチメントは 800 kb パネルを用いて実施し、gDNA インプット量 30 ng から 300 ng をライブラリ作製に用いました。エンリッチしたライブラリを Illumina NextSeq 550 でシーケンシングし、平均 75X カバレッジでダウンサンプリングしました。Picard の中の主要なメトリクスを上記に示しています。

*8 ウェル対 96 ウェルのワークフローに基づく

** 標準的なキットは、酵素による断片化とそれに続くライゲーションおよび PCR を使用するワークフローに基づいている

***2024 年 9 月の Twist 社内データに基づくすべてのチャート、図、グラフ。

さらに詳しく知る

twistbioscience.com/ngs
sales@twistbioscience.com

注文情報

192 Sample Kits

109220: Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit, 192 Samples
109223: Twist FlexPrep UHT LP and Hybridization Kit, 192 Samples

1,152 Sample Kits

109224: Twist FlexPrep UHT Library Preparation Kit, 1152 Samples
109226: Twist FlexPrep UHT LP and Hybridization Kit, 1152 Samples