

Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローにおけるパフォーマンスの最適化

はじめに

Twist カスタムパネルには独自性があります。メチル化検出におけるパネル設計は、サイズ、GC 含量、ターゲット領域のメチル化レベルなど、お客様の研究に特有の幾つかの要因に依存します。このようなパネルに対応するには、柔軟性のあるメチル化検出システムが必要です。Twist のターゲットメチル化検出ワークフローでは、ハイブリッドキャプチャ条件を調整して、各カスタムパネルの最終的なシーケンス指標を最適化することができます。このテクニカルノートでは、マルチプレックス、ハイブリダイゼーション時間、洗浄の厳密性が最終的なシーケンス結果に及ぼす影響について説明します。

結果

Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローは、Twist Fast Hybridization Target Enrichment システムを使用して1日で実施できる end-to-end のメチル化検出ソリューションです。このワークフローは以下のように進めます。



Twist カラーの緑で示したステップは、ハイブリダイゼーションの厳密性とハンズオン時間を最適化するために調整の可能なステップです。例えば、マルチプレックスにより、サンプル調製における試薬の使用、ハンズオン時間、ピペット使用を削減できます。ハイブリダイゼーションのステップでは、所定のスケジュールに合わせてキャプチャ時間を調整できます。最後に、洗浄温度を変更することで個々のカスタムパネルに対して洗浄ステップの厳密性を調整できます。

ハイブリダイゼーション反応の最適化：マルチプレックス

研究分野に関係なく、多くの研究者にとってスループットと費用効率は極めて重要です。マルチプレックスは、サンプル調製に費やす時間や試薬を最小限に抑えることで、その双方を改善します。Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローでは、マルチプレックス（最大 8 プレックス）をサポートしており、ライブラリ調製時に組み込まれるユニークデュアルインデックス (UDI) バーコードを使用して、各サンプルへの振り分けができるようにします。

Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローにおけるマルチプレックスを実証するため、最適化されていないカスタム 1.0 Mb のカスタムメチル化パネルを用いて 8 プレックスとシングルプレックスのハイブリッドキャプチャを比較しました。シングルプレックスと比較して、8 プレックスのキャプチャでは最終キャプチャにてオフターゲットが減少し (図 1B)、ユニークな配列の数が増加しました (図 1D)。均一性 (図 1A; fold-80 ペースペナルティ) と 30X カバレッジ以上のターゲット領域の割合 (図 1C) は、どちらのプレックスでも同様でした。シングルプレックスシステムでは、添加するライブラリの総インプット量は 200 ng、マルチプレックスシステムでは 1500 ng です。そのため、オフターゲット率の低下とユニークな配列の増加は、ハイブリッドキャプチャに使用したライブラリの総量の増加に起因している可能性があります。以上のデータは、Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローにおけるマルチプレックスの性能を裏付けるものです。

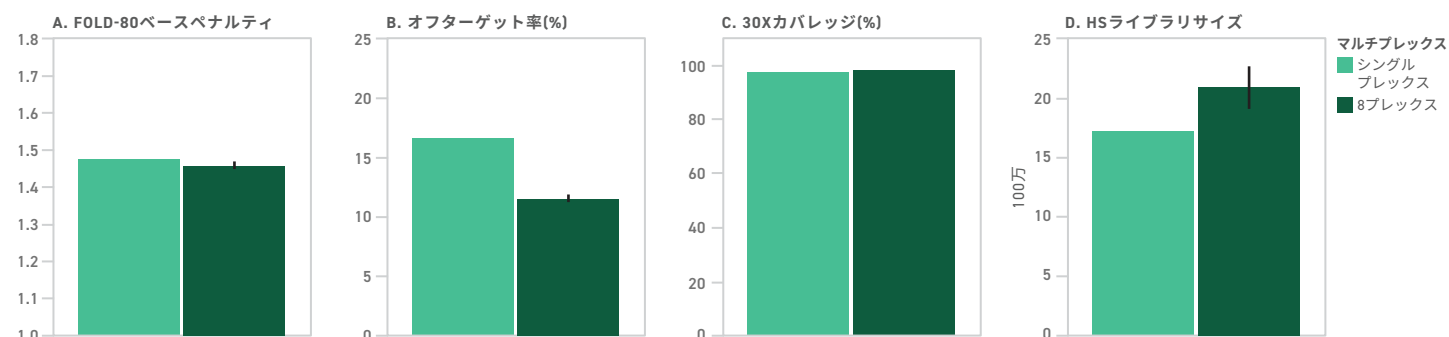


図 1: Picard 指標に対するマルチプレックスの影響。マルチプレックスのデータポイントについては、Twist Fast Hybridization Target Enrichment システムで使用する前に 8 つのライブラリを等量 (総量 1500 ng) でプールし (NA12878, Coriell)、8 プレックスのキャプチャプールを調製しました。ハイブリッドキャプチャは、最適化されていない 1.0 Mb カスタムメチル化パネルを使用して実施しました。推奨キャプチャ条件 (メチル化エンハンサー 2 μ L、Fast Wash Buffer 1 の温度 65°C、ハイブリダイゼーション時間 2 時間) をすべての反応に適用しました。このテクニカルノートでは次の方法によりデータを取得しました: 1) NextSeq[®] 500/550 高出力 v2 キットを用いたシーケンスによる 2x76 のペアエンドリードの生成、2) パネルの標的サイズに対して 200x にアライメントされたカバレッジになるようにダウンサンプリング、Bismark Aligner を用いたマッピング、Picard HS Metrics の使用。

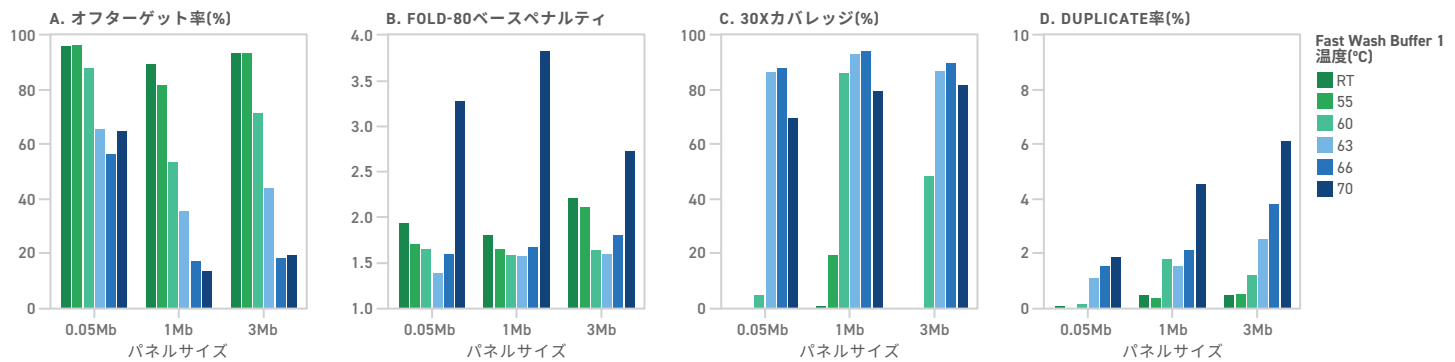


図 2: 最終の Picard 指標に対する Fast Wash Buffer 1 の温度の影響。ハイブリッドキャプチャは、異なるサイズのカスタムメチル化パネルと 200 ng のライブラリ (NA12878、Coriell) を用い、ハイブリダイゼーション 4 時間で実施しました。カスタムメチル化パネルはフィルタリングの厳密性を設定せずに設計し、オフターゲットにどのような影響が生じるかを検討しました。その他の方法については図 1 を参照。

ハイブリダイゼーション時間の最適化

特定のターゲット領域やエクソーム領域の検出を目的としたハイブリッドキャプチャを用いる様々なアプリケーションにおいて、Twist Fast Hybridization Target Enrichment プロトコルを用いる場合、ハイブリダイゼーション時間はキャプチャされるターゲット分子の数に影響します。またメチル化検出におけるライブラリ調製および変換プロセスでは、シーケンスの複雑性が大幅に低下し、結果として変換されていないライブラリで通常観察されるよりも GC 含量が大幅に減少します。

変換による GC 含量の減少とライブラリ調製による複雑性の低下のため、より短く、より効率的なハイブリダイゼーション時間を適用できます。Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローでは、最適なハイブリダイゼーション時間は 30 分～4 時間であり、ユーザーの予定や可能なハンズオン時間に応じて柔軟な対応が可能となります。Twist Bioscience では、ハイブリダイゼーションは 2 時間から開始し、その後最適化を行うことを推奨しています。カスタムメチル化パネルで 50 Mb を超す領域をターゲットとする場合、ハイブリダイゼーション時間の延長により、キャプチャの特異性とキャプチャされる固有の分子数がさらに向上し、下流の Picard 指標も改善する可能性があります。

洗浄温度の最適化

ライブラリ調製時に非メチル化シトシンがチミンに変換されることで、ライブラリの複雑性が低下し、DNA 分子の融解温度が低下します。その結果、ハイブリッドキャプチャ時にオフターゲット率が上昇し、均一性が不良となる可能性があります。

変換後のライブラリのシーケンス複雑性の低下に対応するため、Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローでは、ハイブリダイゼーション温度を 60°C に設定します。その結果、非特異的なターゲット領域を含む分子は少なくなり、シーケンス時のオフターゲット率に寄与します。このシステムでは、非特異的なキャプチャを低減するためにより厳密な洗浄（すなわち、高温での洗浄）を行うことで、このバランスを取ります。ターゲット領域、パネルサイズ、

gDNA 配列によって、最適な洗浄温度を決定します。Twist Bioscience は、Fast Wash Buffer 1 を 65°C で使用することを推奨しています。これにより、一貫して低いオフターゲット指標が得られるためです。また洗浄温度は、必要に応じて 63°C～66°C の範囲で調整することができます。一般に、Fast Wash Buffer 1 の温度が上昇すると（すなわち、洗浄が厳密になるにつれ）、非特異的なキャプチャは減少します。しかし図 2 に示すように、温度が高すぎると、均一性、カバレッジ、duplicate 率に悪影響が生じる可能性があります。

結論

ここに示したデータは、メチル化検出用の Twist ターゲットエンリッチメントパネル独自の性能を強調するものです。Twist のカスタムメチル化パネルは、非常に高度に最適化されたデザインと、ハイブリダイゼーション時間や洗浄温度など実験ニーズに応じてパネル性能を調整できる柔軟性を備えています。Twist ターゲットメチル化シーケンスワークフローは、gDNA 調製から、Illumina のプラットフォームによるメチル化検出でのシーケンス用ライブラリ調製まで対応しています。最適化されたプロトコルと非常に効率的なハイブリダイゼーション技術によって、これまでよりも少ない時間、かつ優れた性能で、gDNA からシーケンスリードのアライメントまで実施できます。