NEBNext Enzymatic Methyl-seq Library Preparation Protocol

For use with the Twist NGS Methylation Detection System

アデニンやシトシンのメチル化などゲノム DNA 配列が変わらずに起こる因子が細胞の機能や健康に影響を及ぼします。これらのエピジェネティック修飾は細胞特異的に遺伝子発現を調節します。シトシンのメチル化は CpG 部位と呼ばれる共通のゲノム配列に認められ、メチル化は特定のがんや遺伝性疾患と関連しています。メチル化パターンを正確に検出することは、健康や疾患における生物学的プロセスの多くを理解するためだけでなく、がんの診断においても重要です。

Twist Bioscience と New England Biolabs（NEB）の提携によりメチローム分析に革新がもたらされます。NEB Enzymatic Methyl-seq (EM-seq) Library Preparation キットは、有害な化学変換プロセスを用いずに CpG 部位を特定するための新たなツールです。EM-seq では、代わりに 2 段階の酵素変換プロセスを用いることで DNA へのダメージを低減し、その結果、高品質のライブラリを調整し、5mC および 5hmC 部位を同定できるようになります。Twist Custom Methylation Panels and Enrichment キットと組み合わせたこの end-to-end のシステムにより、最先端の酵素学、ターゲットパネル設計のアルゴリズム、および最適化されたワークフローを駆使した想像を超えるシーケンス効率が得られます。

本プロトコルでは、ライブラリの調製について説明します。この後のハイブリッドキャプチャ手順について、Twist Bioscience はこれらのライブラリをカスタムターゲットメチル化パネルと組み合わせ、特定の領域に対するシーケンスを行うターゲットメチル化シーケンスのワークフローを提供します。そのプロトコルについては、Twist Bioscience のリソースライブラリ（twistbioscience.com）でご覧いただけます。別途日本語のプロトコルを用意しています。

*この製品は**研究専用**です。*

PUBLISHED：2021年2月

ワークフロー構成要素

各キットの製品パッケージと保管の推奨事項を注意して読み、受領後は直ちに推奨事項に従って構成品を保管してください。

製品番号	名称	説明	保管
101977：96反応	NEBNext Enzymatic Methyl-Seq	ライブラリ構築用の試薬： Control DNA CpG methylated pUC19 Control DNA Unmethylated Lambda NEBNext Ultra™ II End Prep Reaction Buffer NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix NEBNext Ultra II Ligation Master Mix NEBNext Ligation Enhancer NEBNext EM-seq™ Adaptor Elution Buffer TET2 Reaction Buffer TET2 Reaction Buffer Supplement Oxidation Supplement DDT Oxidation Enhancer TET2 Fe(II) Solution Stop Reagent APOBEC	–25～–15°C
101978：96反応	NEBNext Multiplex Oligos for Enzymatic Methyl-Seq	Twist Universal AdaptersとTwist UDI Primersを用いて、インデックスペアごとに1反応のユニーク・デュアル インデックス付きの組み合わせを提供	–25～–15°C
101979：96反応 (33.1 mL)	Twist Total Purification Beads	DNA Purification Beads	2～8°C

プロトコルの概要

このプロトコルは、メチル化したゲノム DNA（gDNA）で始まり、その後のハイブリッドキャプチャのためにアダプター付き二本鎖 DNA ライブラリに変換します。2 段階の酵素変換プロセスを用いて、非メチル化シトシンとメチル化シトシンを区別します。TET2 は、第 1 段階において 5- メチルシトシン（5mC）および 5- ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）の部位を酸化させ、第 2 段階における APOBEC による酵素の脱アミノ化から保護します。非メチル化シトシンはチミンに変換されるため、調製されたライブラリ中のシトシン配列が 5mC または 5hmC の部位に相当します。本ワークフローでは、物理的な断片化、NEBNext EM-seq アダプター、バーコード付きプライマーシステムを使用します。このプロトコルを使用すると、メチル化検出（ステップ 1 ～ 7）のためのライブラリの調製が約 10 時間で可能です。

ライブラリ調製ワークフロー	時間
ゲノム DNA サンプル	
ステップ 1 **ゲノム DNA の調製および断片化** 希釈および断片化済み実験用サンプル	**0.5 時間**
ステップ 2 **断片化済み DNA の末端処理の実施** dA 付加した DNA 断片	**1 時間**
ステップ 3 **EM-seq アダプターのライゲーション** Universal Adapters の付加した DNA ライブラリ	**1 時間**
ステップ 4 **5mC および 5hmC 部位の酸化** 5mC および 5hmC 部位が酸化された DNA ライブラリ	**2 時間**
ステップ 5 **DNA の変性** 変性 DNA ライブラリ	**0.5 時間**
ステップ 6 **シトシンの脱アミノ化** APOBEC が、酸化された 5mC および 5hmC を除くシトシンを脱アミノ化	**3.5 時間**
ステップ 7 **ライブラリの PCR 増幅** 増幅および精製された最終のライブラリ生成物	**1.5 時間**
停止ポイント	

付録 A

DNA コントロールの利用および調製

このキットには、2 種類の DNA コントロールが含まれています：CpG メチル化 pUC19 および非メチル化ラムダ DNA。これらのオプションのコントロールは既知量でメチル化されており、シーケンス後に正確な変換率を決定することができます。すべての 96 反応キットに各々のコントロールが十分にあり、別々にコントロールライブラリを 2 回、調製することができます。

ライブラリ調製キット内のこれらをポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして使用するには、それぞれを以下の分量で新しい 1.5 mL のマイクロ遠心チューブ内で混合します。

試薬	分量	量	期待されるメチル化レベル	期待される変換効率
pUC19をメチル化したCpG	48 µl	96 ng	95-98%	99.5%以上
非メチル化ラムダDNA	48 µl	4.8 ng	最大0.5%	99.5%以上
合計	96 µl	100.8 ng	—	—

SPRI ビーズ精製、カラム濃縮、または高速真空濃縮器を用いて DNA コントロールを濃縮します。DNA コントロールを 0.1X TE pH 8.0、50 µl で再懸濁し、平均インサートサイズ 200 ～ 300 bp まで物理的に断片化します（最終的な Illumina ライブラリ 350 ～ 450 bp）。Covaris などの focused-ultrasonicator platform を用いて、サンプルゲノム DNA と同様のプロセスに従い断片化します。

一旦調製したコントロールライブラリはキャプチャプロセスを実施しません。代わりに、このライブラリを最終のプーリングプロセスまで保存し、最終ターゲットライブラリと一緒に選択したシーケンスプラットフォームでシーケンスします。シーケンス後に追加の解析が必要となります。両ゲノムの BED ファイルは、Twist Resource Library（twistbioscience.com）から確認できます。

付録 A の終わり

付録 B

バーコード配列

EM-seq ライブラリ調製のための NEBNext Multiplex Oligos に関連するバーコードの詳細なガイドについては、NEB サイト上の FAQ およびトラブルシューティングのページ（www.neb.com/faqs/2018/01/31/do-you-have-sample-sheets-for-use-with-the-nebnext-multiplex-oligos-for-illumina-96-unique-dual-index-primer-pairs）を参照してください。

付録 B の終わり

付録 C

Twist Fast Hybridization Target Enrichment System を用いた Twist ターゲットメチル化シーケンスのワークフロー
Twist ターゲットメチル化シーケンスのワークフローは、本ライブラリ調製プロトコルに適合しており、メチル化配列を検出するために使用できます。このワークフローは 30 分から 4 時間の間のハイブリダイゼーション時間を適用していますが、2 時間のハイブリダイゼーション時間から開始することを推奨します。このプロトコルでは、Twist Fast Hybridization Target Enrichment プロトコルと類似の実験条件を採用していますが、メチル化検出に特化した推奨事項を記載しています。このプロトコルは、Twist Bioscience のリソースライブラリ（tnightbioscience.com）で閲覧できます。

カタログ番号	名称	説明	保管
詳細情報 tickbioscience.com/products/ngs	カスタムメチル化パネル	例：特異的CpG領域、関連遺伝子など	–25〜–15°C
100856：2反応 100578:12反応 100767：96反応	Twist Universal Blockers	非特異的キャプチャの抑止用： Universal Blockers Blocking Solution	–25〜–15°C
103556：2反応 103557：12反応 103558：96反応	Twist Methylation Enhancer	メチル化に関連した非特異的キャプチャの抑止用： Methylation Enhancer	–25〜–15°C
101262：2反応 100983：12反応 100984：96反応	Twist Binding and Purification Beads	ターゲットエンリッチメントと精製用： Streptavidin Binding Beads Twist DNA Purification Beads	2〜8°C
101278：2反応 101174：12反応 101175：96反応	Twist Fast Hybridizationand Wash Kit (2 Boxes) Twist Fast Hybridization Reagents (Box 1 of 2) Twist Fast Wash Buffers (Box 2 of 2)	Fast hybridizationを用いたターゲットエンリッチメント用： Fast Hybridization Mix Hybridization Enhancer Amplification Primers Fast Binding Buffer Fast Wash Buffer 1 Wash Buffer 2	 –25〜–15°C 2〜8°C

付録 C の終わり