

ウイルス検出と分析

Twist Fast Hybridizationターゲットエンリッチメントプロトコルの使用

はじめに

TwistのFast Hybridizationターゲットエンリッチメントシステムは、標準的な16時間ハイブリダイゼーションワークフローの代替として時間を節約し、ターゲットシーケンス作業のパフォーマンスを向上させるための柔軟性を備えています。このシステムを使用すれば、研究者のニーズに合わせて時間とプロセスの厳密性を調整することが可能です。

当社は以前に、標準の16時間ハイブリダイゼーションワークフローを使用して、SARS-CoV-2ウイルスの検出と分析のためのターゲットエンリッチメントの適合性を示しました（[NGSを用いたターゲットキャプチャによる新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検出と分析](#)）。ウイルスの検出と分析用のTwist Fast Hybridizationシステムの柔軟性を示すため、Twist SARS-CoV-2 Research Panel（PN 102016、102017、102018）を使用してSARS-CoV-2ウイルスのゲノムをキャプチャするため、複数の変数を評価しました。

ここでは、Twist Fast Hybridizationシステムの最適なFast Wash Buffer 1の温度、ハイブリダイゼーション時間の柔軟性、Twist SARS-CoV-2 Research Panelを使用してウイルスゲノムの検出と分析を行うための8-plexハイブリダイゼーションの互換性を示します。

結果

洗浄バッファー温度の最適化

[Twist Fast Hybridizationターゲットエンリッチメントプロトコルの付録A](#)では、Fast Wash Buffer 1の温度を、パネルの厳密性と性能を調整するための微調整可能なレバーとして説明しています。（Twist SARS-CoV-2 Research Panelを使用して）SARS-CoV-2をキャプチャする最適なFast Wash Buffer 1温度を決定するため、温度範囲を57°C~70°Cに設定し、ウイルスゲノムのカバー率を評価しました（図1）。Twist SARS-CoV-2 Synthetic RNA Control 1（PN 102019）の1,000コピーおよび10,000コピーを使用してライブラリを調製し、キャプチャはFast Wash Buffer 1（57°C~70°C）を用いた2時間ハイブリダイゼーションで実施しました。

Fast Wash Buffer 1温度を高めることで、非特異的バックグラウンドキャプチャが減少し、すべての力価ポイントでウイルスリードの割合が上昇しました。Fast Wash Buffer 1を68°Cの推奨温度で使ったところ、SARS-CoV-2 Research Panelは力価1000のサンプルではSARS-CoV-2ゲノムを約920,000倍、力価10,000のサンプルでは165,000倍に濃縮しました（表1）。サンプルあたり100万リードにダウンサンプリングすると、約1,000倍のカバレッジ中央値が達成され、塩基の約99.9%が100x以上でカバーされました。

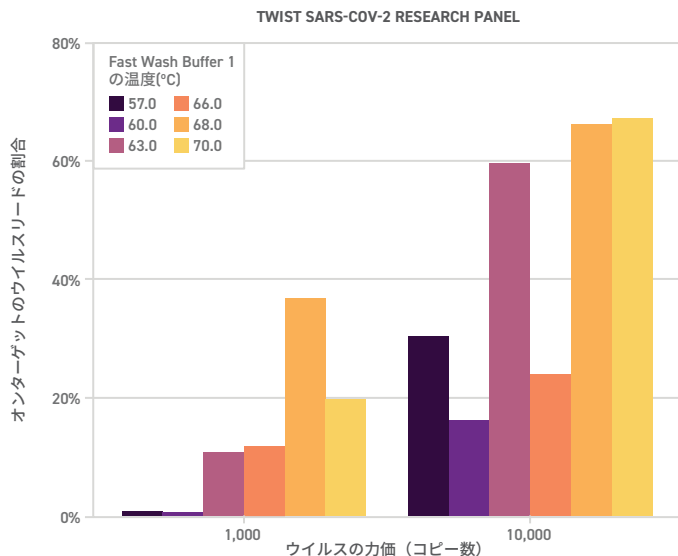


図1：2時間でハイブリダイゼーションを実施した際の、異なる洗浄温度でのウイルスゲノムのカバー率。Twist SARS-CoV-2 Research Panelを使用して、ヒトRNAバックグラウンドにスパイクイン（添加）された1000コピーおよび10,000コピーのSARS-CoV-2を濃縮しました。この図では、異なる洗浄バッファー温度で得られたウイルスリードの割合が示されています。

ウイルスの力価 (コピー数)	キャプチャ前(%)	キャプチャ後のウイルスリード割合(%)	濃縮倍率	カバレッジ中央値	100Xカバレッジ以上の塩基の割合(%)
1,000	0.00004%	36.8%	920662	956x	99.85%
10,000	0.0004%	66.0%	164991	1582x	99.91%

表1：ウイルス力価1,000および10,000でのSARS-CoV-2の濃縮倍率および100xでカバーされる割合。Twist SARS-CoV-2 Research Panelで濃縮後、100万リードにダウンサンプリングした。洗浄温度は68°C。



ハイブリダイゼーション時間の柔軟性

次に、ウイルスキャプチャにおけるTwist Fast Hybridizationシステムのハイブリダイゼーション時間の柔軟性を明らかにしました。Twist SARS-CoV-2 Synthetic RNA Control 1の1,000コピーおよび10,000コピーを使用してライブラリを作成し、Twist SARS-CoV-2 Research Panelを使用してターゲット濃縮を実施しました。68°CのFast Wash Buffer 1、30分～2時間のハイブリダイゼーション時間でキャプチャを行いました。

わずか30分で、高いキャプチャ効率が達成されました (図2)。ハイブリダイゼーション時間ごとに、オンターゲットのウイルスリードに若干の変動が見られましたが、全体的には、すべてのハイブリダイゼーション時間で優れたキャプチャ効率が達成されました。ワークフローに柔軟性があり、30分～2時間でのハイブリダイゼーションが可能です。

ウイルス検出におけるマルチプレックスの適用

最後に、ハイブリダイゼーション時にマルチプレックス反応を適用した、Twist Fast Hybridizationシステムの適合性を確認しました。[二本鎖ウイルス検出用のTwist Library Preparation Kitを使用したcDNAライブラリの作成](#)のプロトコルに従い、さまざまなウイルス力価のサンプルを、最初にTwist UDIバーコードを使用してインデックスが付加されました。次に、30分と2時間のハイブリダイゼーション時間を使用して、前の章で推奨した68°CのFast Wash Buffer 1で8-plexキャプチャを実行しました。

68°CのFast Wash Buffer 1でTwist Fast Hybridizationシステムを使用した場合、8-plexとsingle-plexの両方のキャプチャ反応では、キャプチャ効率は同等でした (図3)。8-plexシステムを使用した30分または2時間のハイブリダイゼーション時間では、single-plexで同条件を使用した場合と同等のオンターゲットウイルスリード結果となりました。

表2で示したように、SARS-CoV-2ゲノムの1000コピーおよび10,000コピーの両方で、マルチプレックス反応による30分または2時間のハイブリダイゼーションによって、わずか250,000リードで全ウイルスゲノムが1x以上でカバーされました。

パネル名	ハイブリダイゼーション時間	ウイルスの力価 (コピー数)	リード数				
			25K	100K	250K	500K	1M
Twist SARS-CoV-2 Research Panel	30 minutes	1,000	99.6%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%
		10,000	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%
	2時間	1,000	81.8%	98.8%	99.9%	99.9%	99.9%
		10,000	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%

表2: Twist SARS-CoV-2 Research Panel、68°Cの洗浄温度、30分または2時間のハイブリダイゼーションを使用した8-plexキャプチャ濃縮後、ウイルス力価1000および10,000で、1xでカバーされた異なるリード数ごとのゲノムの割合。

これらの結果に基づき、TwistのFast Hybridizationシステムを使用してウイルスゲノムを検出および分析する場合には、30分～2時間のハイブリダイゼーション時間を推奨します。

まとめ

TwistのFast Hybridization Target Enrichmentは、ターゲットシーケンス作業の性能を高める微調整が可能な柔軟なシステムです。このシステムは、対象となるウイルス性病原体を検出および分析するパネルに利用できます。このシステムをウイルス検出アッセイとして使用する場合、ハイブリダイゼーション時間を30分～2時間、Fast Wash Buffer 1温度を68°Cに設定するのが最適です。マルチプレックス反応によってワークフロー時間をさらに短縮してウイルスの進化を監視したり、新規ウイルスを迅速に分析することが可能です。

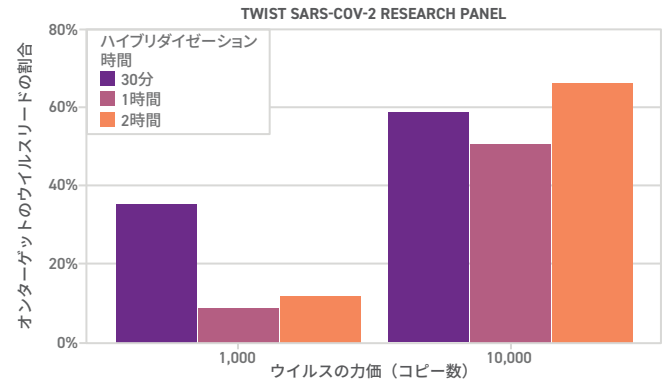


図2: SARS-CoV-2のsingle-plexキャプチャへのハイブリダイゼーション時間の影響。Twist SARS-CoV-2 Research Panelを使用して、異なるハイブリダイゼーション時間で、1,000コピーおよび10,000コピーのウイルスDNAを濃縮しました。ウイルステンプレートと一致するリードの割合が示されています。

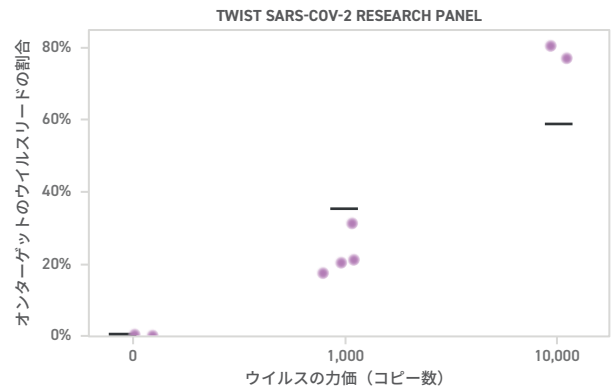


図3: SARS-CoV-2のマルチプレックスキャプチャへのハイブリダイゼーション時間の影響。Twist SARS-CoV-2 Research Panelを使用して、8-plex反応で1,000コピーおよび10,000コピーのウイルスDNAを濃縮しました。ネガティブコントロールも各8-plexに含まれています。ここで示されているデータは、68°CのFast Wash Buffer 1を使用した、30分のハイブリダイゼーション時間の結果です。この図は各条件でSARS-CoV-2ゲノムにアライメントしたリードの割合を、single-plexキャプチャのアライメント (黒線) と比較して示しています。