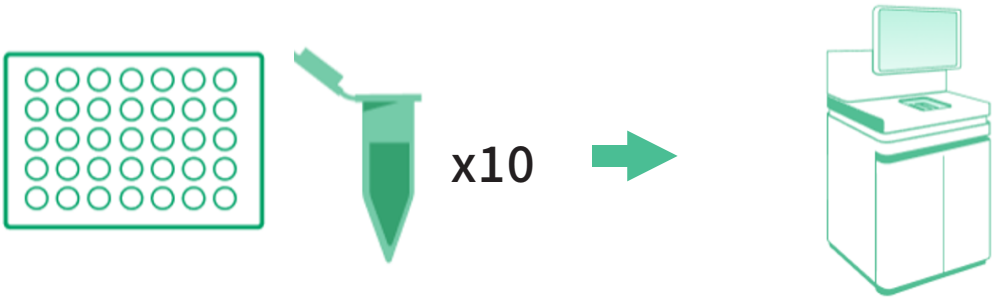
TWIST BIOSCIENCE

Writing the Future of Plant and Animal Genomics

High Throughput and Cost-Efficient Library Prep

Twist 96-Plex Library Preparation Kitは、集団遺伝学、疾病遺伝学、農業、食品安全、マイクロバイオーム、合成生物学アプリケーションのためのハイスループット・シーケンス・パイプラインを最適化します。少ないシーケンス量でローパスのカバレッジでゲノム全体にわたる高品質のジェノタイピング用途に特化し、一度に最大960サンプルまでの強固なライブラリー構築を可能にします。



96検体を1チューブで調製可能　　960検体までプール可能

主な利点

効率的

- 1サンプルあたりわずか15ドル未満
- 自動化装置不要
- 断片化、修復、ライゲーションの工程は不要

適応性

- 高 GC 含量や低 GC 含量のサンプルに最適化可能
- 同一キットで複数のタイプのサンプルに使用可能

ハイスループット

- 1キットあたり最大 960 サンプルまで個別にバーコード化可能
- 一度に最大 96 サンプルを処理できる高度なマルチプレックス反応

製品SKU

106541 Twist 96-Plex Library Preparation Kit, 5x96 samples, Set A
106542 Twist 96-Plex Library Preparation Kit, 5x96 samples, Set B
106543 Twist 96-Plex Library Preparation, 10x96 samples

問い合わせ先
twistbioscience.com
jsalescustomer@twistbioscience.com

©2023. All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.

大阪大学
微生物病研究所・附属遺伝情報実験センター
元岡 大祐 先生

元岡先生から一言

ゲノム解析室（お問い合わせ E-mail : service[a]ngs.gen-info.osaka-u.ac.jp*）では、本キットの受託分析を受付中です。96検体に満たない場合でも、プライマーのGC含有量の組み合わせを変えるなど柔軟に対応できます。お気軽にご相談ください。*[a]を@に変えてご連絡ください。

ご利用の感想

Twistの新しい全ゲノム用ライブラリ調製キットは、ゲノム分析を多検体で低コストで行うことを売りにしており、NGS受託解析サービスに加えることにしました。良い点としては、**多検体を初めのステップ（ランダムPrimerによる伸長反応）以降、1チューブで操作できるので手間を省くことができます。**導入時の評価において、最初の濃度を合わせておくことで、**ほぼ均一に目的の細菌ゲノム配列データが取れました。**

ライブラリ調製方法は経験者であれば比較的簡単に行うことができますが、異なるPrimerを組合せた伸長反応の条件や、ビーズによるCaptureステップは初心者には難しいため、もう少し詳しいプロトコルまたは操作説明が必要かもしれません。また、最初のDNA量や濃度が低い場合が想定されるため、その対応策＊があればさらに良いと思います（＊Twistより：別途、low input用のプロトコルの評価が進められています）。様々な生物種での論文報告が出てきており、費用対効果の高いハイスループットキットだと感じています。

ご利用のきっかけとなった課題は何でしたか？

大阪大学・微生物病研究所・ゲノム解析室では、遺伝情報解析技術と大型計算機システムを融合させ、次世代シークエンサーを用いて得られたデータの包括的・網羅的な解析を中心に研究支援を行っています。また、イルミナ株式会社のPropel認証、Twist Bioscience社のProLab認証を取得し、均質なデータを提供できるサービスプロバイダーとして、全世界の研究者を対象としたNGS受託解析を行っています。近年はシーケンスコストが飛躍的に低下し、より安価に多くのゲノム解析ができるようになりましたが、ライブラリ調製のコストが課題でした。

(図) プールした24検体のシークエンスデータ量

Library_name	total_number_of_bases	q30_bases	frac_q30_bases	primer_plate_well
1	40,265,826	37,009,181	0.919	A01
2	43,362,468	39,944,185	0.921	B01
3	46,688,052	42,841,754	0.918	C01
4	36,544,452	33,411,266	0.914	D01
5	43,413,660	39,898,359	0.919	E01
6	35,119,134	32,227,936	0.918	F01
7	36,914,172	33,897,033	0.918	G01
8	39,720,252	36,462,597	0.918	H01
9	41,056,932	37,700,970	0.918	A02
10	38,984,130	36,015,317	0.924	B02
11	39,792,300	36,548,598	0.918	C02
12	50,527,452	46,479,500	0.920	D02
13	41,118,552	37,787,459	0.919	E02
14	40,827,990	37,498,991	0.918	F02
15	39,749,640	36,358,064	0.915	G02
16	33,516,540	30,823,932	0.920	H02
17	34,295,322	31,473,530	0.918	A03
18	33,586,218	30,822,047	0.918	B03
19	34,238,442	31,612,755	0.923	C03
20	42,966,204	39,416,376	0.917	D03
21	37,415,664	34,377,298	0.919	E03
22	34,079,652	31,390,780	0.921	F03
23	35,989,398	32,884,735	0.914	G03
24	33,994,332	31,188,206	0.917	H03

Results are specific to the institution where they were obtained and may not reflect the results achievable at other institutions

TWIST BIOSCIENCE

©2023. All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.

東京大学大学院農学生命科学研究科
附属水産実験所
細谷 将 先生

ご利用のきっかけ

私の研究対象である水生生物でもローカバレッジリシーケンスの利用が増えてきています。特に集団ゲノミクス分野では適応遺伝子座の探索などで注目されています。このような解析において、大規模の検体からゲノムワイドにシーケンスデータを取る手法は開発途上にありますが、そんな中でも本キットは作業工程の簡便さや価格で特に優れている印象があり、試してみることとしました。

細谷先生のご利用方法

DNBSEQ上で2回のシーケンスを行いました。1回目はライブラリー調整の際に濃度測定を分光光度計で行いました。リード数のばらつきが大きくなり、横着してはいけないと改めて実感しました。2回目はUV 測定を行いました。リード数のばらつきは低減しましたが、依然、ばらつきは発生しました。測定サンプルとライブラリー調整に用いたサンプルが異なる希釈系列であったことも理由として考えられますが、DNA質に起因する増幅効率の差や、プール後のビーズ精製、サイズセレクションなどのステップなど、いくつかの複合要因があったとも考えられます。サンプル毎にライブラリー濃度を測ってからプールするわけではないので、ある程度のばらつきが発生するのは致し方ないかなという印象です。作業工程については、ライブラリー調整の上流でプールできるので、**96サンプルでもほとんどの工程を1チューブで行えるので、ハンドリングが非常に楽でした。**

ご利用の感想

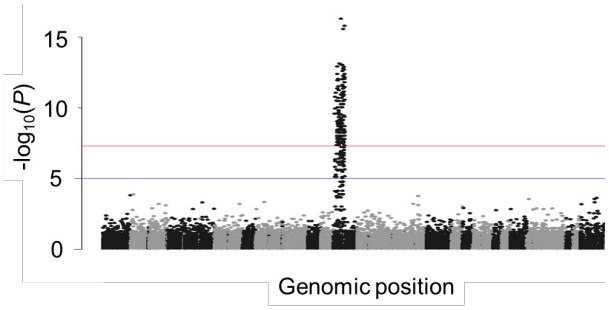
2回のシーケンスで得られたデータ量が異なっていたので、直接的な比較は難しい面もありましたが、データ間で問題視されるような齟齬は無いように感じました。8bpのindexで特定できなかったリードは全体の3%程度でシーケンスのqualityに依存しているようでした。データがそれなりに取れた個体に関しては、**ライブラリー間で同一個体の特定が上手くいきました。**すなわち、同一個体の2回のデータを別個体とみなし、全個体間で血縁度を算出したところ、全個体において2回のデータが一卵性双生児あるいは同一個体程度とされた一方で、異なる個体ペアが同様の高い血縁度を示すことはありませんでした。ゲノムのカバー率は均一ではなく、リードが得られなかった領域も少なくありませんでした。これはマッピングの際に複数個所にマップされるようなリードを除外したことが一因と考えられます。一方で、リピート以外でも coverage が高い領域が散見され、特定の配列から増幅が開始されやすい傾向があるような印象もありました。下流の解析については、得られたBAMファイルを使って ANGSDで性に関するGWASを行ったところ既知の性決定遺伝子座が同定されることが確認できました。また、特定の配列から増幅が開始されやすいというのを逆利用して、GBSとして使えるか試してみました。**6~8x depth 以上のサイトを集めると3万座程度のSNPが得られ、PLINKで行った GWASの結果がANGSDと（ほぼ）同じということを確認しました。**

以上の結果から、本キットは、作業工程の簡便さに優れ、ローカバレッジリシーケンスとGBSの両方のアプリケーションに利用できる汎用性に優れたキットと言えるかと思います。

今後のご利用計画

今後は、サバ・マサバの集団解析に利用する予定です。また、GBSとして利用できることも活かしてゲノミックセレクション法（ゲノムワイドSNPを利用した選抜育種法）にも使えるようにしていく予定です。

（図）GWASによるマサバ性決定遺伝子座の同定



本稿の内容は生研支援センター・イノベーション創出強化研究推進事業ならびにJST未来社会創造事業の成果の一部です。

©2023. All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.

名古屋大学大学院生命農学研究科
土井 一行 先生

ご利用のきっかけとなった課題は何でしたか？

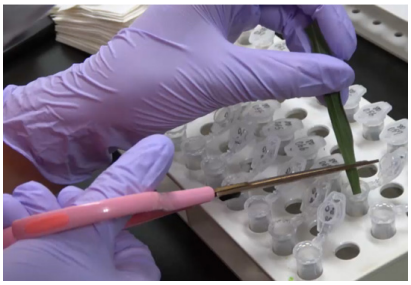
私たちは、イネの大規模分離集団を用いた研究を行っています。これまでに、いわゆるRAD-seqにより数千個体をジェノタイピングしてきました。RAD-seqの原理上、ことなる解析集団でも同じサイトにマーカーが得られる可能性が高く、私たちの用途にはアドバンテージがあります。一方、遺伝子単離のための変異サイト探索の用途には、両親の配列を別途解析する必要がありました。**NGSの高性能化を考えると、skim-seq的な手法の導入により、分離集団のジェノタイピングと両親のリシーケンスを同時に行ったほうが良いと考えていました。**このような状況でTwistさんの96-Plex Library Prep Kitを試用する機会をご提案いただき、代表となるイネ品種をシーケンスしていただきました。

ご利用の感想

今回、ライブラリ作製は私たち自身で行っていないのでライブラリ作製の手間は評価できませんでした。ランダムプライマーを使う方法であるため、読まれるサイトがどの程度限定されるか分からない状態でしたが、思ったよりもショットガンライブラリに近いカバレッジのパターンが得られ、代表品種のリシーケンス情報が得られました。ランダムプライマーは選ぶ余地があると伺っていますので、期待される結果のシミュレートを事前にできると有用と思います。また、**植物でありがちな、分子量が小さくなってしまったDNAからでも十分なデータが得られるのはありがたいです（図）。**Skim-seqを仮想し、リード数を減らしてアライメントしてみたところ、今回の条件ではリードの重なりはほとんどなく、RAD-seqではなくショットガンライブラリに近い印象です。交配組合せにもよりますが、イネ1個体あたり20万-50万リードのショートリードで私たちには十分なジェノタイプ情報が得られると見込まれました。**植物のジェノタイピングでは、遺伝解析・品種改良のどちらの用途でもほとんどの材料は一回きりの解析後に捨てられてしまうため価格が問題になりますが、システム自体は信頼できると感じました。**

Barcode_name	Library_name	Sample_Name	barcode	#reads
1	GA44534	1	ATCCGGTA	19,346,787
2	GA44535	2	GACATCAC	12,755,658
3	GA44536	3	TCGATGGT	30,548,992
4	GA44537	4	CTGTCAGA	22,303,474
5	GA44538	5	TGGTACGT	15,364,289
6	GA44539	6	GATGCATC	11,606,851
7	GA44540	7	CTTCCAAC	26,316,717
8	GA44541	8	ACACGTGT	33,907,945
9	GA44542	9	TAGGCCAT	32,607,781
10	GA44543	10	CTGTACAG	29,957,079
11	GA44544	11	TCGAGTTG	18,684,267
12	GA44545	12	AAGGTTCC	26,504,934
13	GA44546	13	GCCGTATA	16,450,719
14	GA44547	14	ACCTGTTC	19,032,288
15	GA44548	15	ACAGTCAC	17,828,957
16	GA44549	16	GAGTTCTG	19,181,774
17	GA44550	17	GCTACGAT	23,200,836
18	GA44551	18	CTAGAGCT	27,043,592
19	GA44552	19	ACTGACTG	23,427,638
20	GA44553	20	GGAAGCAT	19,953,800
21	GA44554	21	CCATATGG	14,828,841
22	GA44555	22	CAGTTGAC	12,536,624
23	GA44556	23	ACACGTCA	15,115,028
24	GA44557	24	ACCAACGT	20,929,787
25	GA44558	25	GATCAGCT	16,529,384
26	GA44559	26	CGTAGCAT	28,985,810
27	GA44560	27	GTGTTGAC	19,541,018
28	GA44561	28	AGTGTCTG	11,691,404
29	GA44562	29	TGGTCATG	18,738,660
30	GA44563	30	ACTGTGAC	17,565,096
31	GA44564	31	CTTGTCCA	11,127,317
32	GA44565	32	CGATCGAT	18,586,005

（図）サンプルごとのリード数：
分子量が低め（オレンジで囲んだサンプル）でも問題なく十分なデータが得られた。



Results are specific to the institution where they were obtained and may not reflect the results achievable at other institutions

TWIST BIOSCIENCE

©2023. All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.

東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻
木口 悠也 先生

ご利用のきっかけ

我々はメタゲノム解析によってヒトとマイクロバイオームの関係性を紐解く研究を行っています。我々は研究テーマの一つである腫瘍内マイクロバイオーム解析においてゲノムのGC含量が低いとされる細菌が肺がん組織内に存在する可能性を掴んでいました。しかし、腫瘍内のメタゲノム解析では>99%がヒトゲノムかつGC含量が偏った配列は一般的なシークエンスプロトコルでは著しくシークエンス深度が浅くなってしまうという技術的制約によって詳細な解析に十分なデータ量を取得できないという課題がありました。そこで、GC含量が低い配列を選択的にシークエンス可能なTwist Bioscience社の96-Plex Library Prep Kitを適用することで標的としている細菌ゲノムのシークエンス深度を高めることができないか？と考えたのが利用のきっかけです。

木口先生のご利用方法

我々はまずヒトゲノムが大量に混在している状況で96-Plex Library Prep Kitが本当にGC含量に偏りのある細菌ゲノム配列をシークエンスできるのか確かめることとしました。サンプルとしてヒトゲノムの混入率が70～90%である唾液サンプルを用いてLow GC, Mix GC, High GCの3パターンのプロトコルでショットガンメタゲノムシークエンスを行い、得られたデータの特性を評価しました。

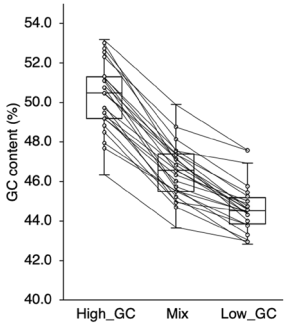


図1. ContigのGC含量分布

その結果、アセンブル解析によって得られるcontigのGC含量はプロトコル依存的に変動し(図1)、Low GC Kitで構築可能である細菌ゲノムにはGC含量が非常に低い系統が含まれることがわかりました(図2)。この結果を元に我々は肺がん腫瘍内メタゲノム解析に当キットを適用し、目的細菌のシークエンス深度を増幅させることができました(図3)。この結果は、GC含量に偏りのある細菌を選択的にシークエンスする目的において96-Plex Library Prep KitのHigh GCおよびLow GCプロトコルが有用であることを示唆しています。当手法がメタゲノム解析に広く用いられることによって未知の細菌ゲノムや遺伝性因子が発見できることを期待させる結果となりました。

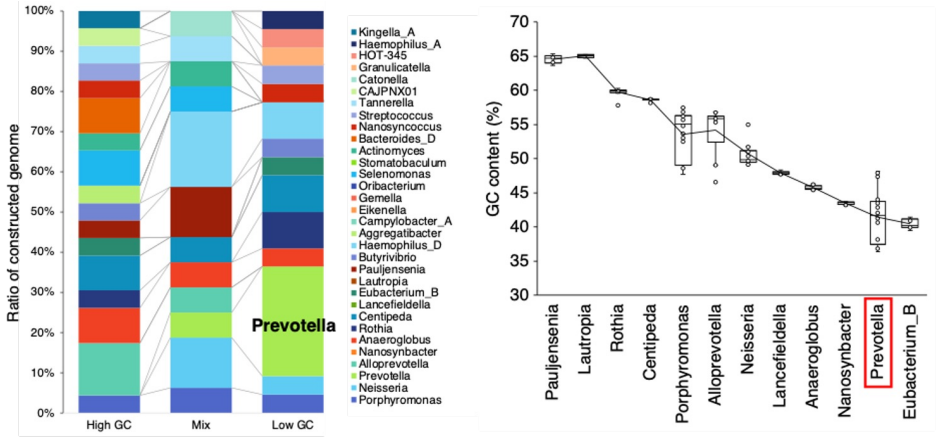


図2. GC Kitの違いによって構築されるゲノムの違い

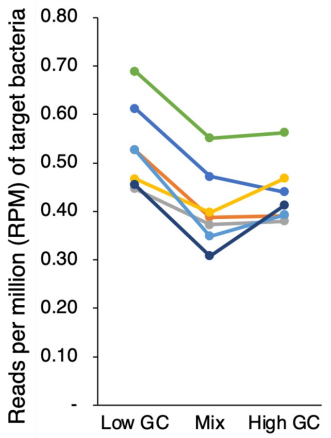


図3. 腫瘍メタゲノムにおけるGC含量の低い目的細菌のシークエンス量

Results are specific to the institution where they were obtained and may not reflect the results achievable at other institutions

©2023. All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.

Twist 96-Plex Library Preparation Kit

Low-pass シーケンシングやプラスミド QC 用のハイスループットライブラリの調製

主な利点

ハイスループット
- 1 キットあたり最大 960 サンプル
- チューブ 1 本で最大 96 サンプル

効率の最大化
- 高い費用対効果（1 サンプルあたりわずか 10 ドル程度）
- 断片化、修復、A-tailing ステップが不要

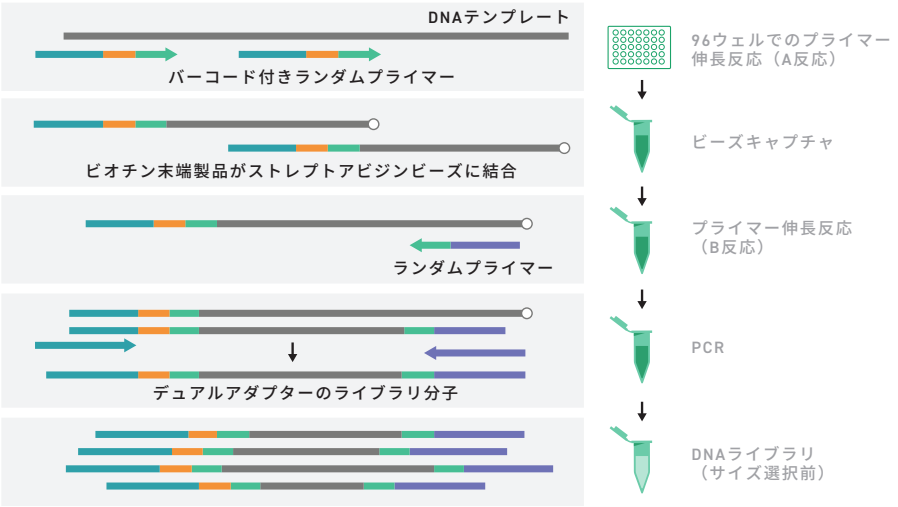
様々な生物に対応可能
- 高／低 GC 含量サンプルの最適化が可能

ライブラリ調製は、多くのラボの NGS ワークフローにおいて、運用および費用の面で最も大きな課題となっています。規模の大きな NGS 検査を実施する場合、または広範なゲノムマッピングを実施する場合、効率的なシーケンシングツールが極めて重要となります。現在使用されているシーケンシングライブラリ調製法の多くは、ハイスループット環境に最適化されておらず、分析サンプルの処理におけるボトルネックになっています。

Twist 96-Plex Library Preparation kit は、一度に 96 サンプルを処理することができるハイスループット型の調整キットとして設計されています。ワークフローのほとんどのステップを 1 本のチューブで実施するため、効率的な試薬の使用と無駄のない処理が実現できます。各ランは、インプットするサンプルの GC プロファイルに合わせて調整でき、作物の low-pass シークエンシングや薬剤デザイン研究のプラスミド QC のどちらにも適したツールとなっています。最終ライブラリは、Illumina シーケンサーに適合し、デマルチプレックス用にバーコードが付いています。

ケミストリー

1. 96 ウェルプレートの変性 DNA テンプレートに、5’ バーコードアダプターがランダムにプライミングします。ポリメラーゼによりプライマーが伸長して DNA テンプレートのコピーを作成します。ビオチン標識 ddNTP で反応が停止します。
2. すべてのサンプルを 1 本のチューブにプールし、ストレプトアビジン磁気ビーズでキャプチャします。また、洗浄して過剰な反応物質を除去します。
3. 2 つ目の 5’ アダプターテールプライマーと鎖置換ポリメラーゼにより、キャプチャしたテンプレートをデュアルアダプターのライブラリに変換します。磁気ビーズの最も近くに結合したプライマーは伸長し、ビーズ下流のプライマー配列まで合成されます。
4. ビーズを洗浄して過剰な反応物質を除去し、デュアルアダプターのライブラリを保持します。少ない PCR サイクル数で同時にライブラリを増幅し、インデックスリードポジションに任意のプレートバーコードを組み込みます。

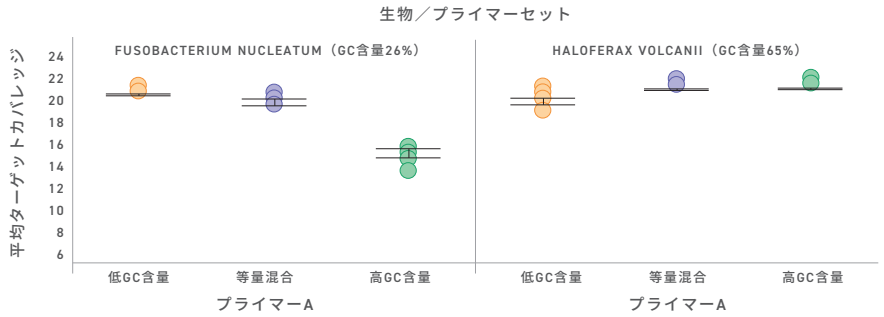


FOR RESEARCH-USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

対象生物のプロファイルに合わせてカスタマイズ

各Twist 96-Plex Library Preparation Kitには、高 GC 含量用 1 枚、低 GC 含量用 1 枚の計 2 枚のプライマープレートが入っています。インプットするサンプルのプロファイルに応じて、使用するプレートを選択し、カバレッジが最も均一となる最適なライブラリを生成することができます。

TWIST 96-PLEX LIBRARY PREP による GC 含量が異なる生物の比較

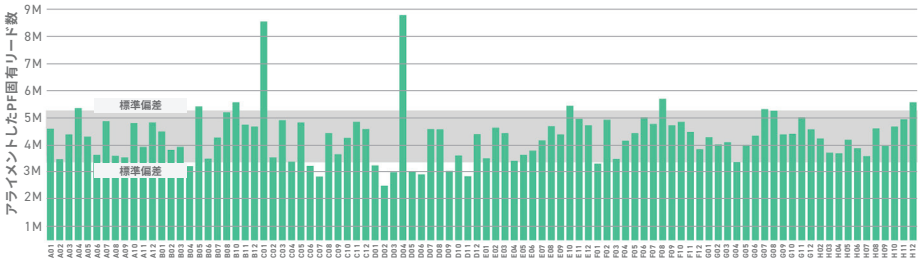


高 GC 含量または低 GC 含量の 2 種類の生物で、Twist 96-Plex Library Preparation Kit を用いて調製しました。いずれの生物でも、高 GC プライマー、低 GC プライマー、および両方のプライマーを 1:1 で混合したプライマーで調製しました。表示したデータセットは、30X のカバレッジで解析するためダウンサンプリングしています。いずれの場合も、最適なプライマーセットを用いることによりターゲットカバレッジが向上しました。

スケールが均一のライブラリ

Twist 96-Plex Library Preparation Kit で調製したシーケンシング用ライブラリでは、各プレートのリード数が均一になります。磁気ビーズベースのサイズ選択で、特定の範囲内の断片をむらなくキャプチャします。

TWIST 96-PLEX のアライメントされたユニークリード数

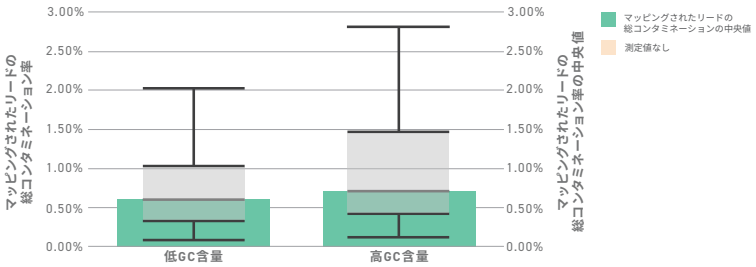


Twist 96-Plex Library Preparation Kit を用いて、*E.coli* から 96 の NGS ライブラリを作成しました。レプリケートサンプル各 50 ng を同じワークフローで調製し、その後、NextSeq 550 シーケンサーで配列を決定しました。データをプレートレベルのバーコード、次にサンプルのバーコードでデマルチプレックスし、リファレンスゲノムとのアラメントによりサンプルあたりのリード数を得ました。ドロップアウトを除外したこの結果からは、ほとんどのサンプルがアライメントされたリード数の平均値の 20% 以内に収まることが示されました。

コンタミネーションの最小化

Twist 96-Plex Library Preparation kit では、クロスコンタミネーションを起こすことなく、一度に多くのサンプルをプールすることができます。各ウェルのサンプルは固有のバーコードが付加され、シークエンス時にはウェルからウェルへのコンタミネーションを最小に抑えられます。

TWIST 96 PLEX LIBRARY PREP の総コンタミネーション率



Twist 96-Plex Library Preparation Kit を使用して 384 の NGS ライブラリを作成しました。これらのライブラリでインプットした DNA は、2 名のオペレーターが高 GC 含量および低 GC 含量プライマープレートで調製した 96 種類のプラスミドのセットです。ライブラリを 1 つにプールし、NextSeq 550 シーケンサーで配列を決定しました。コンタミネーションは、プラスミドあたりのコンタミネーションリードとコンタミネーションではないリードとの比率で評価されました。すべてのプラスミドについて、両オペレーターのコンタミネーション率の中央値は、各 GC プライマープレートで 1% 未満でした。

Twist 96-Plex Library Preparation Kit は、NGS ライブラリ調製の Twist Bioscience ポートフォリオ製品の一部です。

詳しくは、
twistbioscience.com/ngs
sales@twistbioscience.com をご覧ください。

注文情報

106541: Twist 96-plex Library prep Kit, Set A, 5 x 96 samples
106542: Twist 96-plex Library prep Kit, Set B, 5 x 96 samples
106543: Twist 96-plex Library prep Kit, 10 x 96 samples

Twist Bioscience、Twist の各種ロゴおよび本書で使用する Twist NGS ロゴは、Twist Bioscience Corporation の商標です。他の商標はすべて、その各所有者が所有権を有します。
© 2022 Twist Bioscience Corporation. All rights reserved.

NGS PROLAB
TWIST BIOSCIENCE

受託解析サービスのご案内

大阪大学 微生物病研究所 ゲノム解析室

06-6879-8323

service@ngs.gen-info.osaka-u.ac.jp

最短10営業日納品
とにかく“早い”

ライセンス契約
“不要”

豊富なオプション
ゲノム抽出/データ解析

サンプル数	1Gb/sample		0.5Gb/sample(100PE)	
	納期2週間*	納期4週間	納期2週間*	納期4週間
48	¥336,000- (¥7,000-)	¥264,000- (¥5,500-)	¥336,000- (¥7,000-)	¥264,000- (¥5,500-)
96	¥384,000- (¥4,000-)	¥336,000- (¥3,500-)	¥364,800- (¥3,800-)	¥316,800- (¥3,300-)
192	¥691,000- (¥3,600-)	¥614,400- (¥3,200-)	¥672,000- (¥3,500-)	¥576,000- (¥3,000-)

- お急ぎの場合には、検体送付前に、事前にスケジュールをご確認ください。
- FASTQファイルの納品になります。
- (　)の価格は１サンプルあたりのコストとなります。

【お問合せ】

〒220-0012 横浜市西区みなとみらい３-6-1
みなとみらいセンタービル19階TEC
TEL: 045-345-5840
Mail: jsalescustomer@twistbioscience.com

TWIST BIOSCIENCE

©2023. All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.