

# Twist cfDNA Library Preparation Kit

## 主な利点

### ワークフローの最適化による頑健なパフォーマンス

- 高いライブラリ変換率により低頻度のバリエーションを確実に検出 (VAF0.1% 以下)
- 高いライブラリ収量を duplex-UMI で実現
- 1~20 ng のサンプル量に対応
- 2 時間以内にライブラリを調製可能

Twist cfDNA Library Preparation Kit は、循環セルフリー DNA (cfDNA) からライブラリを調製する際の課題に対応します。リキッドバイオプシーは、腫瘍学研究、特に末梢血に存在する腫瘍由来の遺伝子による潜在的バイオマーカーの研究において注目されています。このキットでは、Illumina システムによる次世代シーケンシング (NGS) 用の cfDNA ライブラリを高い変換率で調製することができ、少量のインプット、cfDNA の劣化、採取が困難のため DNA 量が限られる尿や脳髄液 (CSF) など、その他のサンプルに伴う技術的な課題を克服します。

Twist cfDNA ライブラリ調製キットは当社の最高品質のライブラリ調製ソリューションであり、少量のサンプルインプットでも頑健なパフォーマンスと非常に高い変換率を提供します。



図 1: Twist cfDNA Library Preparation Kit、Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit では、全ゲノムシーケンシング (WGS) およびターゲットエンリッチメントワークフローが可能です

## 最適化された効率

合理化された高パフォーマンスの Twist cfDNA Library Preparation プロトコルは 2 時間で高効率の結果が得られるようデザインされており、お客様のリキッドバイオプシー研究に変革をもたらします。このプロトコルではサンプルの取扱いが最小限に抑えられており、本分野のワークフローを簡素化することが可能です。実験工程は 3 ステップからなります。

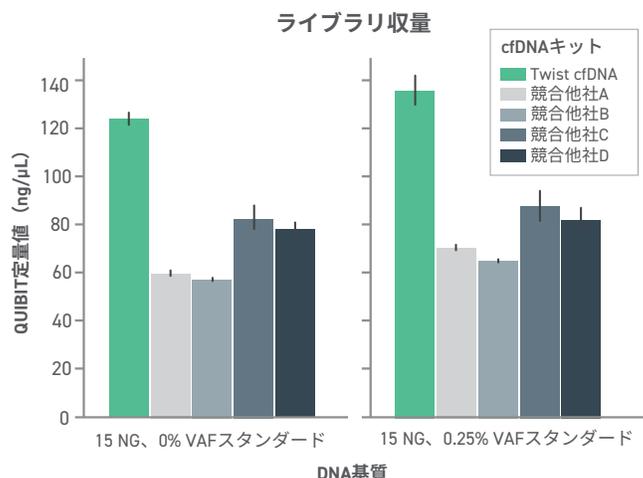
- 1. 末端修復と dA-付加:** 精製を行わずに末端修復と dA-付加をワンステップで実施
- 2. ライゲーション:** 15 分間で UMI アダプターを結合、短いインキュベーション時間で高いコンバージョン率と低アーチファクトを実現
- 3. PCR 増幅:** サンプルのマルチプレクシングのための増幅およびインデックス付加

効率、精度、および使いやすさを重視した Twist cfDNA Library Preparation プロトコルは、リキッドバイオプシー研究方法の進歩に対する当社の取り組みの成果であり、研究者の皆様に cfDNA 解析が持つ可能性を最大限に引き出す強力なツールを提供します。

## cfDNA サンプルのコンバージョン率を増強

Twist cfDNA Library Preparation Kit は、最新のターゲットエンリッチメントワークフローと組み合わせることで、インプットした DNA 分子をシーケンシングライブラリに高効率に変換します。リキッドバイオプシー研究では高感度検出のためにはライブラリ複雑性が重要であるため、このような変換率の向上はきわめて重要です。cfDNA に推奨される他の NGS ライブラリ調製キットと比較して (図 2)、当社のアプローチではライブラリ収量が増加し、さらに複雑性が向上します。

図 2: Twist cfDNA Library Preparation Kit は高収量の cfDNA ライブラリを実現。ライブラリ調製後、サンプルを 20  $\mu$ L の水に溶出し、1  $\mu$ L を Qubit™ dsDNA Broad Range Kit で定量。



このように Qubit で測定した変換率は向上しており、高値の平均ターゲットカバレッジが得られます。分子バーコード (UMI) を duplication 除去とエラー補正のために組み合わせても、一貫して高いカバレッジが認められます (図 3)。ユニークカバレッジを増やすことで、低頻度変異を信頼性高く検出する可能性を高めます。

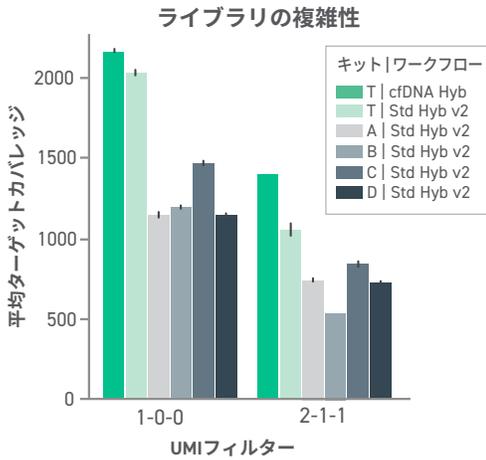


図 3: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit は、UMI duplication 除去の有無にかかわらず高い複雑性を示します。ライブラリは、現行または最新の推奨ターゲットエンリッチメントを用いて、cfDNA 標準サンプルのバリエーション部位を標的とするカスタム 50 kb オンコロジーパネルでシングルプレックスでキャプチャを行いました。

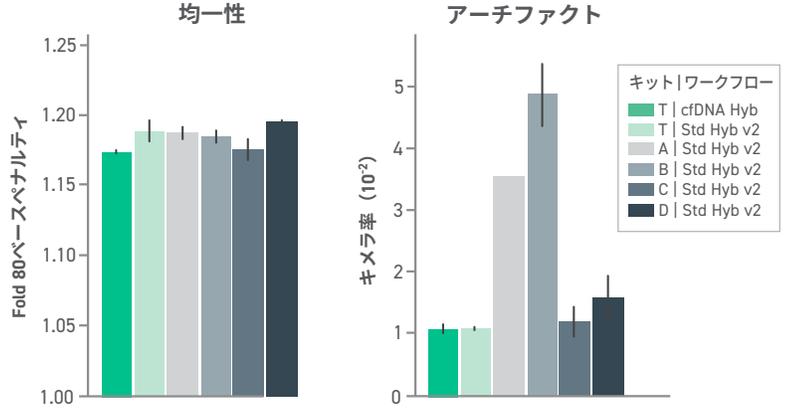


図 4: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit は、アーチファクトを最小限に抑えながら高い均一性が得られます。1-0-0 fgbio UMI フィルタリングパラメータによる UMI 補正後、Picard hybrid-selection メトリクスおよびアライメントメトリクスを算出しました。Fold 80 ベースペナルティは低いほど標的領域全体の均一性が良好であることを示すため低値が望ましく、アーチファクトが最小限に抑えられていることを確認するために低キメラ率が推奨されます。

## 高カバレッジと UMI により低 VAF の検出を実現

Twist cfDNA Library Preparation Kit は、インプットした cDNA をより多くシーケンス可能なライブラリに変換することで、他の製品と比較してより低いバリエーションアレル頻度 (VAF) の検出を可能にします。

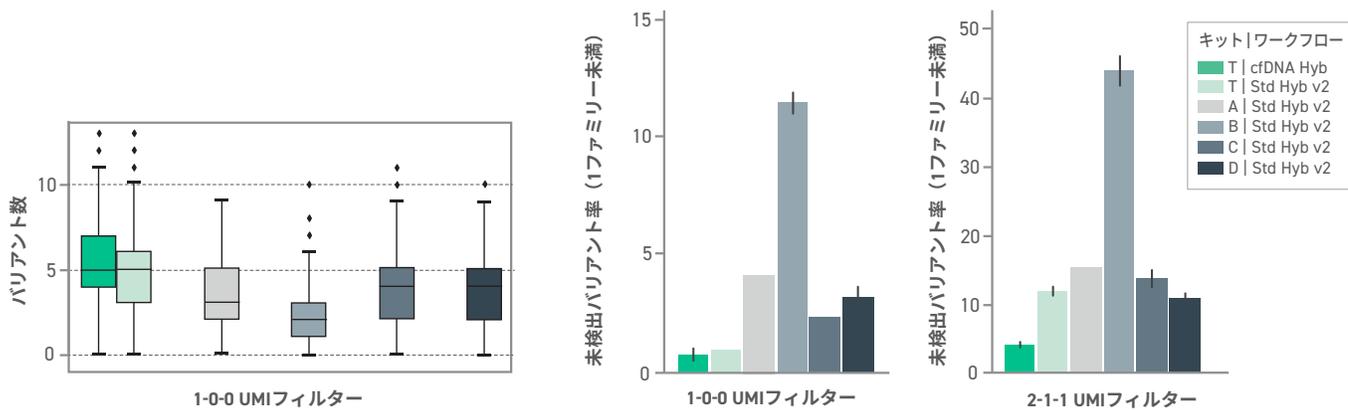
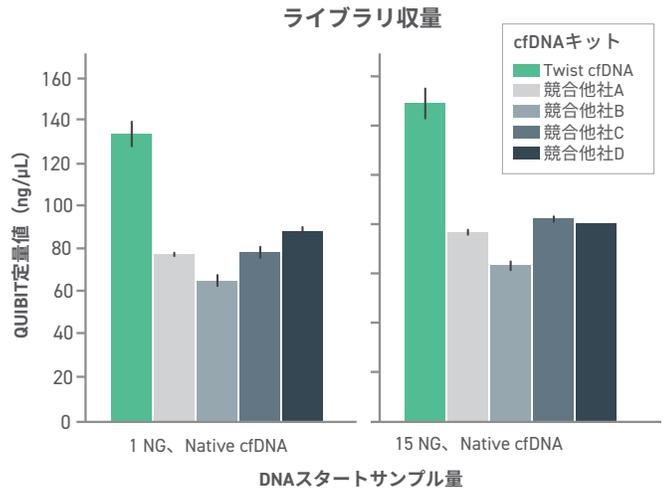


図 5: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit では、VAF0.25% で高感度かつ正確なバリエーションの検出が可能です。ライブラリは、Pan-Cancer Standard サンプルの 217SNP バリエーション部位を標的とするカスタム 50 kb オンコロジーカスタムパネルを用いてシングルプレックスでキャプチャされました。未検出バリエーション率は、1 バリエーションファミリー未満のサイトの合計を検出可能なバリエーションサイトの合計で除して算出しました。

## ネイティブ cfDNA サンプルへの適合性

コントロールサンプルで観察された高いライブラリ変換率は、ネイティブな cfDNA ライブラリでも再現されました。さらに、インプットのきわめて低い 1 ng でも、低量範囲のインプットにおける変換の質が実証されました。これらの結果は、Twist cfDNA Library Preparation ワークフローによって、上記のコントロール実験と同様に実際のサンプルでも優れた変換率およびバリエーション検出が得られることを強く示しています。

図 6: Twist cfDNA Library Preparation Kit はネイティブな cfDNA サンプルで高収量の cfDNA ライブラリを実現します。ライブラリ調製後、サンプルを 20  $\mu$ L の水に溶出し、1  $\mu$ L を Qubit™ dsDNA Broad Range Kit で定量しました。



## cfDNA サンプルに最適化されたデータ忠実性

Twist cfDNA Library Preparation Kit は、サンプルの質と完全性を損なうことなく cfDNA をシーケンス可能な分子に高確率で変換します。高確率での分子変換により、シーケンシングカバレッジが均一になりキメラアーチファクトが低減します (図 9)。

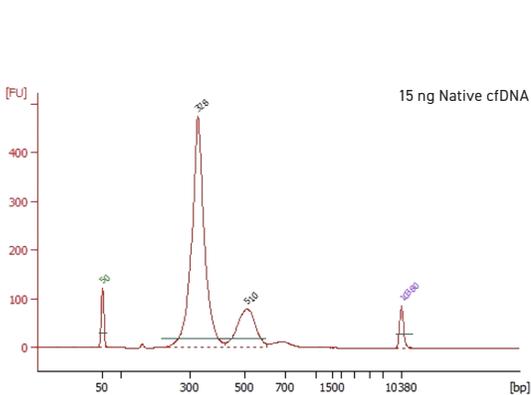


図 7: Twist cfDNA Library Preparation Kit は検体由来の cfDNA サンプルと互換性があります。ライブラリは 15 ng の Native cfDNA、PCR8 サイクルで調製。最終ライブラリ 1  $\mu$ L を、Agilent Bioanalyzer 7500 チップにて解析。

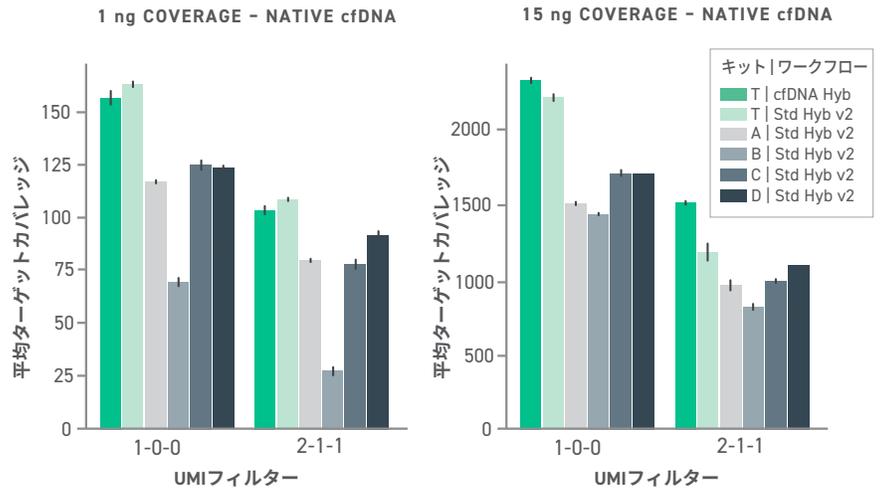


図 8: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit は、検体由来の cfDNA サンプルと互換性があります。ライブラリは標準サンプルのバリエーション部位を標的とする 50 Kb カスタムオンコロジープネルを用いてシングルブレックスでキャプチャを実施しました。

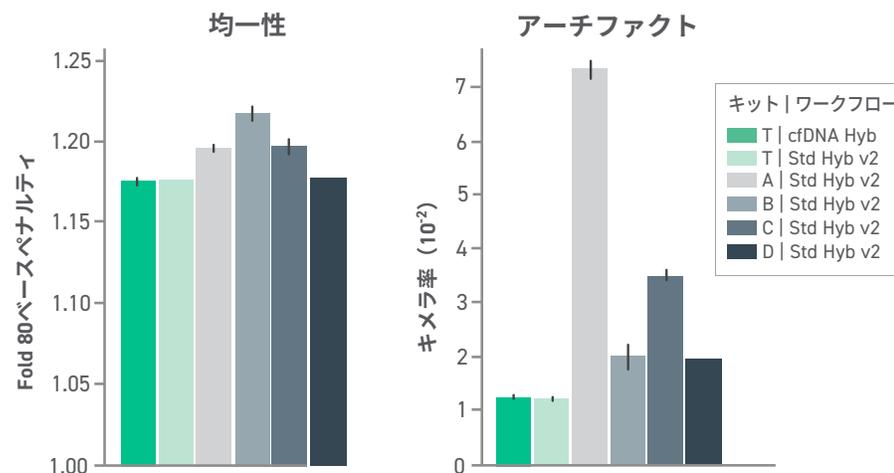


図 9: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit は、native cfDNA のアーチファクトを 15 ng と最小限に抑えながら高い均一性が得られます。1-0-0 fgbio UMI フィルタリングパラメータによる UMI 補正後、Picard hybrid-selection メトリクスおよびアライメントメトリクスを算出しました。Fold 80 ベーススペースは低いほど標的領域のカバレッジ均一性が良好であることを示すため低値が望ましく、アーチファクトが最小限であることを見るためにはキメラ率がより低い値であることが理想です。

## 方法

ここに示すデータは、Twist cfDNA Library Preparation Kit および競合他社キット A、B、C、D で作成されたライブラリから生成されました。各キットごとに4つの異なるサンプルを実施しました：15 ng of Twist cfDNA Pan-Cancer Reference Standards v2 0.25% VAF, 15 ng of Twist cfDNA Pan-Cancer Reference Standards v2 0% VAF, 1 ng of native cfDNA (Plasmalab), and 15 ng of native cfDNA (Plasmalab)。ライゲーション後、すべてのキットでインデックス PCR サイクルを統一しました。1 ng のインプットサンプルは PCR で 12 サイクル増幅し、15 ng のインプットサンプルは PCR で 8 サイクル増幅しました。最終溶出は 20 µL の水で行いました。

ライブラリ調製後、すべてのライブラリを Twist Target Enrichment Standard Hybridization v2 プロトコルに従ってハイブリダイゼーションし、500 ng をキャプチャ工程に使用しました。このハイブリダイゼーションのワークフローは、データでは「Std Hyb v2」と記載しています。さらに、このキットとともにリリースされた最新の cfDNA Target Enrichment Standard Hybridization プロトコルに従って Twist ライブラリもハイブリダイゼーションし、1 ng サンプルは 80 ng、15 ng サンプルは 1200 ng がキャプチャされました。このハイブリダイゼーションのワークフローは、データでは「cfDNA Hyb」と記載しています。競合製品に対して、Twist cfDNA Library Preparation Kit と最新のハイブリダイゼーションワークフローによる複合的な改善を示すために、この区分を行なっております。キャプチャされたライブラリをプールし、Nextseq550 150-cycle kit (Illumina) を使用して 80,000x カバレッジでシークエンスしました。UMI duplication 除去は fgbio を使用し、100 または 211 UMI フラグフィルターにて実施し、メトリクスは Picard から算出しました。

詳しくは、  
[twistbioscience.com/ngs](https://twistbioscience.com/ngs)  
[sales@twistbioscience.com](mailto:sales@twistbioscience.com)  
をご覧ください。

### 注文情報

#### cfDNA Library Prep

107603: Twist cfDNA Library Preparation Kit-16 Samples  
107604: Twist cfDNA Library Preparation Kit- 96 Samples

#### cfDNA Library Prep and Hybridization

107609: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit-16 Samples and 2 Reactions  
107610: Twist cfDNA Library Preparation and Hyb Mix Kit-96 Samples and 12 Reactions