



Twist Fast Hybridization Target Enrichment Protocol

For use with the Twist NGS Workflow

Twist Fast Hybridization Target Enrichment Protocolは、Illumina社の次世代シーケンス(NGS)システムでシーケンスするためのターゲットエンリッチメントDNAライブラリを作成します。このマニュアルでは、最短15分から調整できる柔軟なハイブリダイゼーションによって最適な性能が得られる手順を説明しています。

NGSワークフローのTwistターゲットエンリッチメント構成で、このプロトコルは：

- Twistのカatalogまたはカスタムパネルのいずれかを使用したシングルまたはマルチプレックスハイブリダイゼーション反応用に作成されています。オプションでセカンダリパネル（スパイクイン）も追加できます。
- Twist Library Preparation Kitを用いて最適化されています。
- 指定された試薬または同等品を使ってのみ実施してください。



Twist NGSワークフロー。完全なNGSワークフローにより、サンプル調製からNGSシーケンスおよびデータ解析まで行えます。このワークフローを構成するTwist Fast Hybridization Target Enrichment Protocolは、それ以外で構成されるプロトコルと連携して機能します。

この製品は研究専用です。

プロトコルの概要

このプロトコルは、増幅されたインデックス付きゲノムDNA (gDNA)ライブラリで始まり、Illuminaの次世代シーケンス(NGS)システムでシーケンスするためにターゲットを濃縮したDNAライブラリを作成します。15分~4時間までの柔軟なハイブリダイゼーション時間を特徴とし、ターゲットエンリッチメントワークフロー全体を1日以内に完了することができます。必要に応じてハイブリダイゼーション時間を柔軟に調整することで、ワークフローと性能ニーズのバランスを取ることができます。

- これまで一晩かかっていたハイブリダイゼーションと同様の性能（カバレッジ深度）が15分で得られます。
- Twist Fast Hybridization溶液中でより長い1~4時間のハイブリダイゼーションを行うと、性能はさらに向上します。
- 一晩のハイブリダイゼーションを必要とするワークフローにも対応できます。

| FAST HYBRIDIZATIONターゲットエンリッチメントワークフロー (増幅されたインデックス付きライブラリ) | | 時間 |
|---|---|----------------------------|
| ステップ 1 | ハイブリダイゼーション用ライブラリの調製 インデックス付きライブラリプール | 1時間 |
| ステップ 2 | キャプチャプローブとプールのハイブリダイズ 溶液中でハイブリダイズされたターゲット | 0.5時間 プラス15分~4時間 で可変 |
| ステップ 3 | ハイブリダイズしたターゲットをストレプトアビジンビーズに結合 ビーズにキャプチャされたターゲット | 1.5時間 |
| ステップ 4 | キャプチャ後のPCR増幅、生成、QCの実施 濃縮したライブラリ | 1時間 |
| 停止ポイント | | |
| ステップ 5 | Illuminaプラットフォームでのシーケンス Illuminaプラットフォームでのシーケンス用に準備したライブラリ | — |

付録A：Fast Wash Buffer 1の温度調整

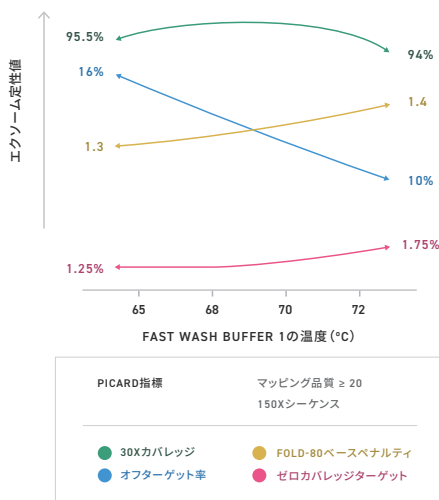
プロセスの厳密性は、Fast Wash Buffer 1のステップで制御されます。Fast Wash Buffer 1の温度を調整することで、基礎をなすPicard指標が予測可能な形で変わります。重要なPicard指標の代表値を図A1に示します。これらの指標に対してパネルの性能を最適化する際には、この図とx軸のFast Wash Buffer 1の温度を参照してください。Twist Human Core Exomeを用いた4時間ハイブリダイゼーションの結果を示しています。

ハイブリダイゼーション時間が長くなると、性能指標が向上します。予想される性能を図A2に示します。70°CのFast Wash Buffer 1を使用したTwist Human Core Exomeの結果です。

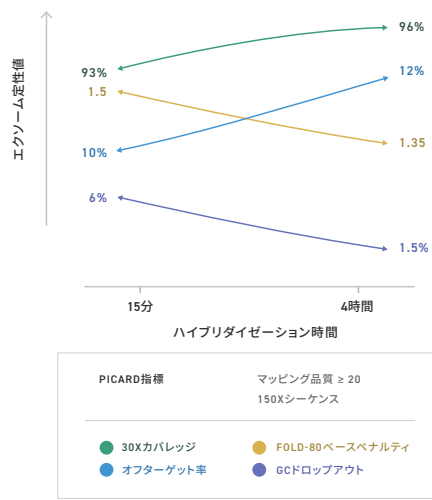
小さなパネル（0.1 Mb以下）は、大きなパネルよりもオフターゲットが大きくなります。サイズの異なるパネルで予想されるオフターゲット率の範囲を図A3に示します。70°CのFast Wash Buffer 1を用いた指標がプロットされています。

Fast Wash Buffer 1の温度を調整すると、洗浄ステップの厳密さが変わります。重要なPicard指標の相対値を以下の図に示します。これらの指標に対して問題解決をする際には、この図とx軸のFast Wash Buffer 1の温度を参照してください。以下はTwist Human Core Exomeを用いた結果です。

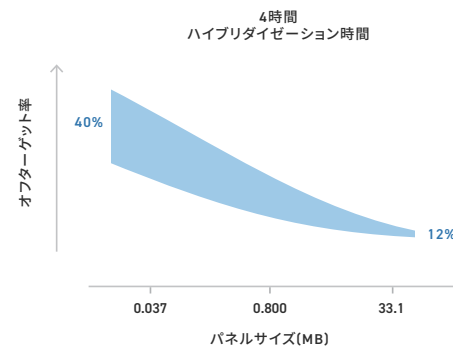
図A1
4時間ハイブリダイゼーション時間での、代表的なターゲットエンリッチメント性能とFast Wash Buffer 1温度の関係



図A2
代表的なターゲットエンリッチメント性能とハイブリダイゼーション時間との関係（70°CのFast Wash Buffer 1を使用）



図A3
パネルサイズに関して予想されるパネルのオフターゲットの増加（70°CのFast Wash Buffer 1を使用）



付録終わり