



高いライブラリー変換効率で より高深度なシーケンスを

Watchmaker DNA Library Prep Kitは、特にリキッドバイオプシーサンプルからの微量cfDNAの場合に、テンプレートDNAからシーケンス可能なライブラリー分子への変換を増加させ、カバレッジとシーケンスの経済性を向上させます。効率化され自動化に適したワークフローは、さまざまなシーケンスアプリケーション向けに、断片化されたDNAテンプレートからの堅牢かつ柔軟なライブラリーの調製をサポートします。

cfDNA、FFPE、ChIPなどの困難なサンプルから、バイアス、アーティファクト、ポリメラーゼエラーを最小限に抑えながら、複雑性の高いライブラリーを調製します。メチル化シーケンスアプリケーションには、Equinox ウラシル耐性ライブラリー増幅キットと組み合わせてください。

特徴と利点

- 特にリキッドバイオプシーからの臨床関連のcfDNAでより多くのDNAをシーケンス可能なライブラリー分子に変換し、感度を高めます
- 高い複雑性をもつライブラリーをわずか500 pg (最大1 μ g) から調製
- シンプルで自動化可能なワークフローにより、2時間以内にライブラリーを調製します
- Equinox ウラシル耐性増幅キットと組み合わせることでDNAメチル化解析をサポートし、優れた収量と均一性を実現します

アプリケーション

- cfDNA、ctDNAの解析
- フラグメントミクス
- DNAメチル化解析
- ChIP-Seq
- 体細胞変異コーリングおよびその他の低頻度バリエーション検出
- 遺伝性疾患のシーケンス
- ヒト全ゲノムシーケンス (PCR freeを含む)
- 全エクソームシーケンス
- 微生物およびメタゲノムシーケンス
- ウイルスゲノムシーケンス
- アンプリコンシーケンス

cfDNAから最高レベルのパフォーマンス

自然に断片化されたセフリーDNA (cfDNA) は、幅広い疾患や症状に対する新しい非侵襲性バイオマーカーであり、オンコロジーから出生前診断および移植医学に至るまで多くの研究分野に革命をもたらしています。Watchmaker DNA Library Prep Kitは、ダイレクトおよびターゲットcfDNAシーケンシングの両方に対応する効率化された高性能ワークフローを提供し、サンプルの損失、アダプターダイマーのコンタミネーション、バイアス、アーティファクトを最小限に抑えます。

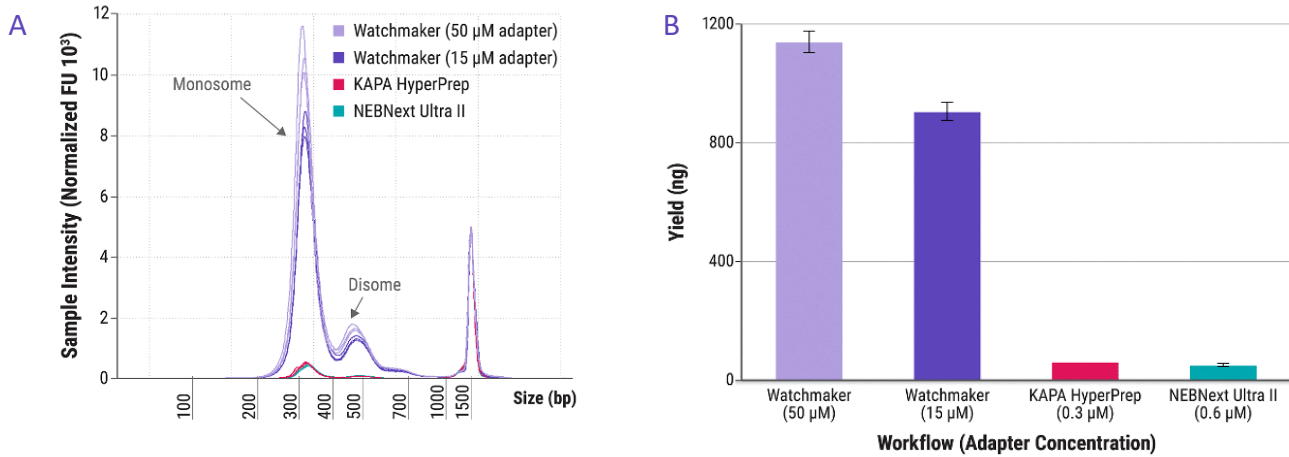


Figure 1. cfDNA のライブラリー収量の向上。 (A) 最終ライブラリーのTapeStationトレース。(B) TapeStation分析によって評価された最終ライブラリー収量。Watchmaker ライブラリーの収量は、他のキットで調製したライブラリーと比較して 9 倍高い結果になりました。アダプター濃度を増加させて更に最適化を行うと、収量がさらに20 ~ 25%向上しました。いずれのプロトコルでもアダプターダイマーは観察されませんでした。各メーカーの推奨プロトコルに従って、Watchmaker DNA Library Prep Kit、KAPA HyperPrep Kit、または NEBNext® Ultra™ II for DNA Library Prep を使用して、1 ngのIsoPure cfDNAからライブラリーを3回調製しました。

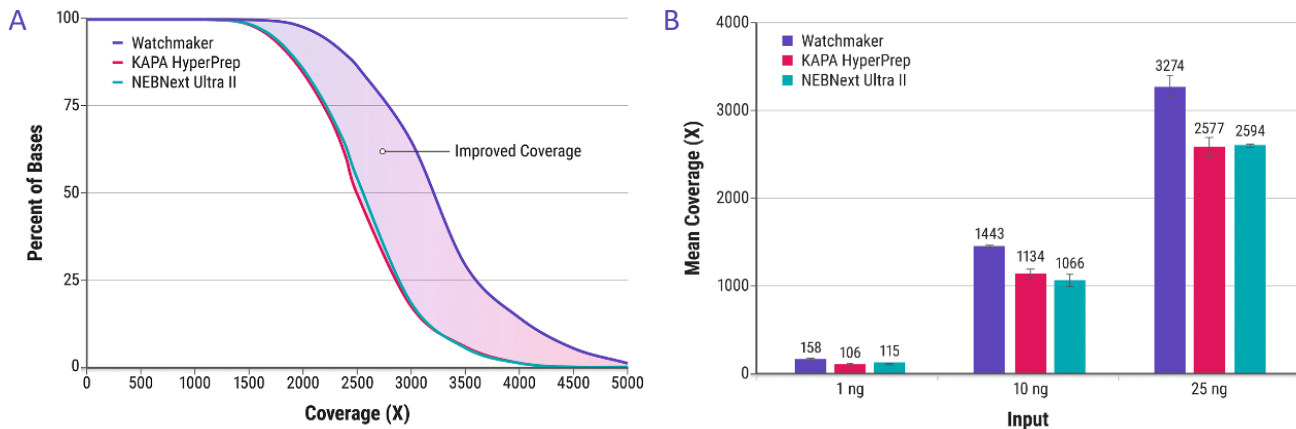


Figure 2. リキッドバイオプシーサンプルの対象範囲を拡大。 (A) 25 ng ライブラリーのターゲット領域全体にわたる累積カバレッジ。影付きの領域は、他社製品と比較してWatchmakerライブラリーのカバレッジが向上していることを示しています。(B) 飽和近くまでシーケンスされたライブラリーの重複排除UMIカバレッジ (重複率 $\geq 95\%$)。Watchmakerライブラリーの平均カバレッジは、他のキットで調製されたライブラリーと比較して20 ~ 30%高くなりました。

cfDNAライブラリーは、検証済みの0.1%のアレル頻度 (AF)で8つの変異を含む1 ng、10 ng、または25 ngのリファレンスサンプル (HD779、Horizon Discovery) から3つずつ構築されました。ライブラリーは、Watchmaker DNA Library Prep Kit、KAPA HyperPrep Kit、または NEBNext® Ultra™ II for DNA Library Prep を使用して、各メーカーの推奨プロトコルに従って調製されました。12plexのターゲット濃縮を、37 kbのカスタムオンコロジーパネルを使用して実行しました。シーケンスはNovaSeq™で実行されました。データは、ライブラリーごとに2,500万リードペアにランダムにサブサンプリングされました。

リキッドバイオプシーサンプルに対するバリエーションコールの感度を向上

リキッドバイオプシーアプリケーションでは、非常に限られたサンプル量からわずかな変異（通常は1%未満）を検出する必要があります。cfDNA テンプレートからシーケンス可能なライブラリーへの変換が増加すると、限られたインプット量からのライブラリーの複雑性が高まり、より深いカバレッジと高い感度でcfDNAサンプルからの信頼性の高いバリエーションコールが可能になります。

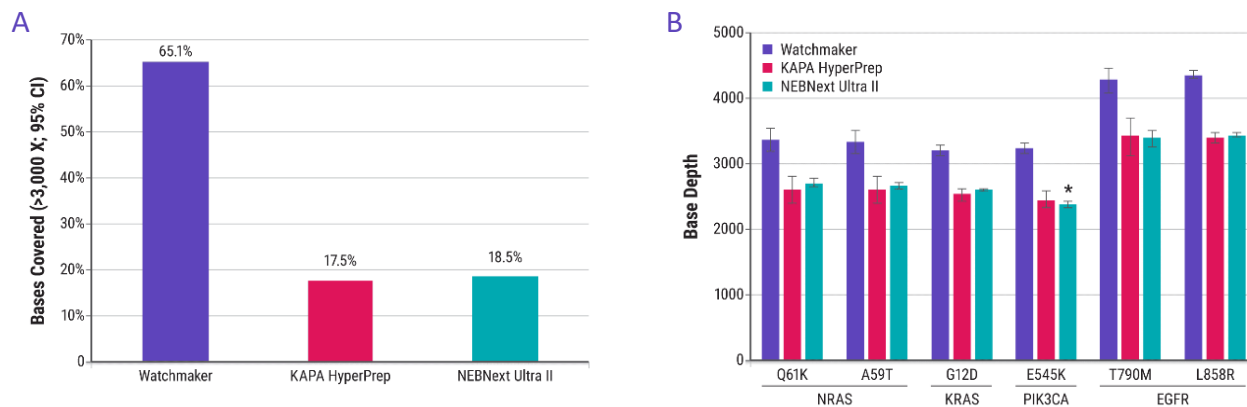


Figure 3. 低頻度バリエーションの高深度カバレッジ。 (A) $\geq 3,000X$ でカバーされた塩基の割合。Watchmakerキットは他のキットと比較して3.5 倍の改善をもたらす、これは cfDNA サンプルからのバリエーション検出感度とシーケンスの経済性に重大な影響を与えます。統計モデリングにより、変異アレル数が 1 以上で、95%の信頼区間内で非常にまれなアレル頻度(AF=0.1%) をコールするのに必要な最小カバレッジは3,000Xであると決定しました。(B) 0.1%のAFと予想される6つのSNVのベースカバレッジの深度。NEB複製ライブラリーの1つで検出されなかった1つの真陽性(*)を除き、予想されるすべての変異がすべての複製で検出されました。サンプル、ライブラリーの調製、ターゲットの濃縮、およびシーケンス情報については、Figure 2を参照ください。

FFPEサンプルにおけるカバレッジの改善

FFPE サンプルは臨床サンプルのNGS解析で広く使用されていますが、品質のばらつきが大きく、サンプル量が限られているため、課題が生じています。FFPE サンプルには、断片化酵素を備えたWatchmaker DNA Library Prep Kit with Fragmentationが推奨されますが、この標準的なWatchmaker DNA Prep Kitは、すでに断片化されているFFPEサンプルや、せん断方法に超音波処理が好ましいFFPEサンプルに対しても、同様のワークフローとパフォーマンスの利点を提供します。

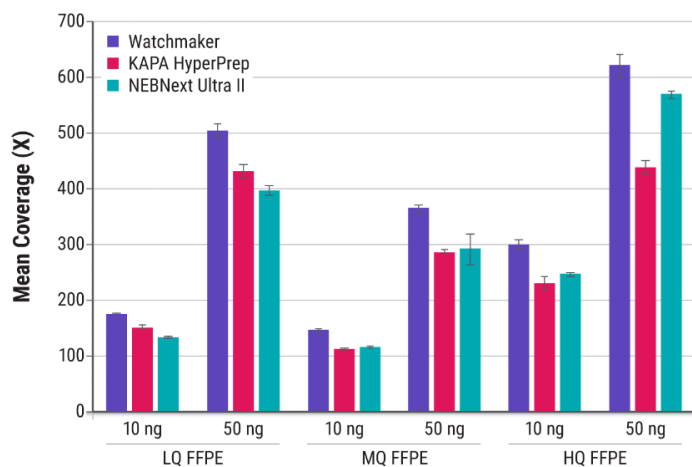


Figure 4. さまざまな品質のFFPEサンプルからのカバレッジの向上。 Watchmakerソリューションを使用して調製されたライブラリーのカバレッジは、他のキットと比較して10 ~ 50%高く、低品質および中品質のサンプルで最も大きな違いが観察されました。Watchmaker DNA Library Prep Kit、KAPA HyperPrep Kit、またはNEBNext® Ultra™ IIを使用して、10 ngまたは50 ngの低品質(LQ)、中品質(MQ)、および高品質(HQ)のFFPEサンプルからFFPEライブラリーを調製しました。各メーカーの推奨プロトコールに従ってDNAライブラリーを調製しています。12 plexのターゲット濃縮を、37 kbのカスタムオンコロジーパネルを使用して実行しました。シーケンスはNovaSeq™で実行しました。データは、ライブラリーごとに1,600万リードペアにランダムにサブサンプリングされました。

増幅困難なサンプル - ウラシル含有テンプレートを高い忠実度で増幅

DNA メチル化は、基礎となる DNA 配列を変えずに遺伝子発現を制御するのに役立つ重要なエピジェネティックなメカニズムです。DNAメチル化パターンがどのように確立、変更されるかを理解することにより、発達、分化、そして病気における遺伝子の制御についての洞察が得られます。メチル化シーケンスのワークフローでは、多くの場合、バイサルファイト変換が利用されます。非メチル化シトシンがウラシルに変換されるため、ウラシル耐性ポリメラーゼの使用が必要になります。Equinox Uracil Tolerant Library Amplification Kitは当社オリジナルのEquinoxポリメラーゼが持つ忠実度の利点を活かしながら、ウラシルとの互換性を考慮して特別に設計されています。

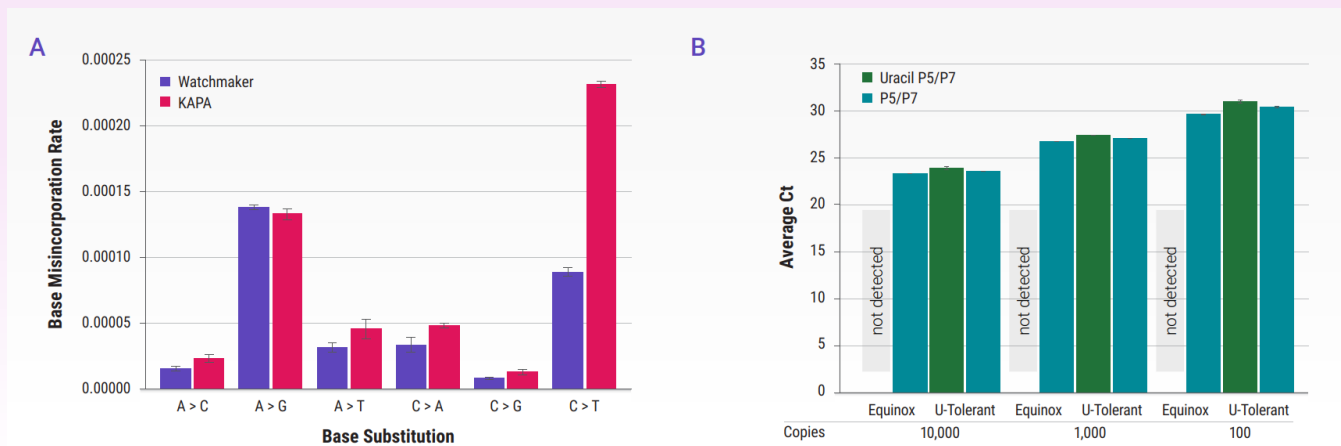


Figure 5. 困難なアプリケーション向けに設計されたライブラリー増幅。 (A) Equinox は全体的な忠実度を向上させ、オンコロジーおよびメチル化アプリケーションに関連するCからT塩基への誤取り込みイベントを減少させます。Equinox Library Amplification KitとKAPA HiFi HotStart ReadyMixのエラー率を、独自のNGSベースアッセイを使用して、900万塩基以上の組み込みイベント後に測定しました。反応は個々に3回実施しました。塩基置換プロファイルは、540万件以上のG/C取り込みイベントおよび400万件以上のA/T取り込みイベントを3回繰り返して分析されました。NEB Q5ポリメラーゼについては、塩基誤取り込みアッセイに十分な収量が得られなかったため、データは示されていません。(B) 予想通り、Equinox Library Amplification Kitはウラシル含有プライマーによって阻害されましたが、Equinox Uracil Tolerant Library Amplification Kitはインプットの範囲全体にわたって阻害を示しませんでした。

製品情報：DNA Library Prep Kit, Equinox Uracil Tolerant Library Amplification Kit

製品名	容量	型番
Watchmaker DNA Library Prep Kit	24 反応	7K0102-024
With Equinox Library Amplification Master Mix (2X), P5/P7 Primer Mix (10X)	96 反応	7K0102-096
Watchmaker DNA Library Prep Kit	24 反応	7K0101-024
PCR-free (Equinox and Primers are not included)	96 反応	7K0101-096
Watchmaker DNA Library Prep Kit	24 反応	7K0103-024
With Equinox Library Amplification Master Mix (2X), Primers are not included	96 反応	7K0103-096
Equinox Uracil Tolerant Library Amplification Kit	24 反応	7K0023-024
Includes P5/P7 Primer Mix (10X)	96 反応	7K0023-096
Equinox Uracil Tolerant Library Amplification Kit	24 反応	7K0028-024
Primers are not included	96 反応	7K0028-096

・本製品は研究用です。診断用途には使用頂けません。
 ・本カタログに記載の内容は2023年11月現在のものです。製品仕様につきましては予告なく変更する場合がございます。ご了承下さい。

(輸入販売元)

エア・ブラウン株式会社

ライフサイエンス部
 大阪:大阪市北区大深町3-1 グランフロント大阪タワーB 16階
 TEL: 06-7739-7114 FAX: 06-7739-7115

URL: <http://www.arb-ls.com>
 お問い合わせ: arb-lsdept1949@arbrown.com

(代理店)