



# 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 のカタログ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。

## プロトコルの構成

各構成の製品パッケージと保管の推奨事項を注意して読み、受領後は直ちに推奨事項に従って構成成品を保管してください。

カタログ番号	名称	説明	保管
<b>AMP MIX 付き TWIST FAST HYBRIDIZATION AND WASH KIT</b> (Twist Fast hybridization を用いたターゲットエンリッチメント用)			
101278 : 2 反応* 104180 : 12 反応 104181 : 96 反応	Twist Fast Hybridization Reagents (Box 1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hybridization Mix</li> <li>Hybridization Enhancer</li> <li>Amplification Primers</li> </ul>	-20°C
	Twist Fast Wash Buffers (Box 2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fast Binding Buffer</li> <li>Fast Wash Buffer 1</li> <li>Wash Buffer 2</li> </ul>	2 ~ 8°C
	Equinox Library Amp Mix (Box 3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Equinox Library Amp Mix (2x)</li> </ul>	-20°C
<b>TWIST プローブパネル</b> (別途注文)			
パネルの種類と 反応サイズの 選択	Twist Fixed Panel	ハイブリダイゼーション反応用のカタログコンテンツの濃縮パネル (例えば Twist Human Core Exome パネル)	-20°C
	Twist Custom Panel	ハイブリダイゼーション反応用のカスタム濃縮パネル	-20°C
	(Optional) Secondary panel	カタログまたはカスタムパネルにコンテンツを追加するためのセカンダリ濃縮パネル	-20°C
<b>ターゲットエンリッチメント用の TWIST ブロッカー &amp; ビーズ</b>			
100856 : 2 反応 100578 : 12 反応 100767 : 96 反応	Twist Universal Blockers	非特異キャプチャの抑止用 : <ul style="list-style-type: none"> <li>Universal Blockers</li> <li>Blocking Solution</li> </ul>	-20°C
101262 : 2 反応 100983 : 12 反応 100984 : 96 反応	Twist Binding and Purification Beads	ターゲットエンリッチメントと精製用 : <ul style="list-style-type: none"> <li>Streptavidin Binding Beads</li> <li>DNA Purification Beads</li> </ul>	2 ~ 8°C

\* カタログ番号 101278 には、Equinox Library Amp Mix (Box 3) は含まれません。2 反応のエンリッチメントワークフローに必要な Amp Mix は、16 検体用の Twist Library Prep Kits に同梱されています。

## 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。

- 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。
- ハイブリダイゼーション時間がワークフローに及ぼす影響に関する詳細は付録 A を参照ください。

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	<b>ハイブリダイゼーション用ライブラリの調製</b> インデックス付きライブラリプール 停止ポイント	1 時間
ステップ 2	<b>キャプチャプローブとプールのハイブリダイズ</b> 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	<b>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</b> 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	<b>キャプチャ後の PCR 増幅、生成、QC の実施</b> 濃縮したライブラリ 停止ポイント	1 時間
ステップ 5	<b>Illumina プラットフォームでのシーケンス</b> 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

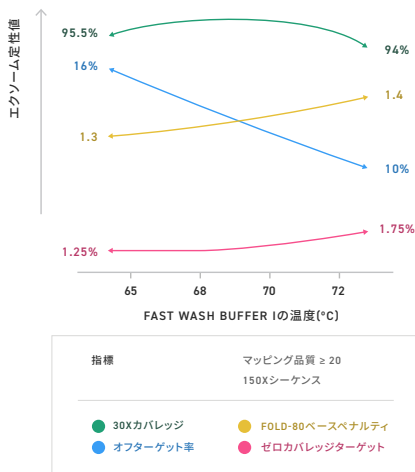
プロセスの厳密性は、Fast Wash Buffer 1 のステップで制御されます。Fast Wash Buffer 1 の温度を調整することで、基礎をなす Picard 指標が予測可能な形で変わります。重要な Picard 指標の代表値を図 A1 に示します。これらの指標に対してパネルの性能を最適化する際には、この図と x 軸の Fast Wash Buffer 1 の温度を参照してください。Twist Human Core Exome を用いた 4 時間ハイブリダイゼーションの結果を示しています。

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。

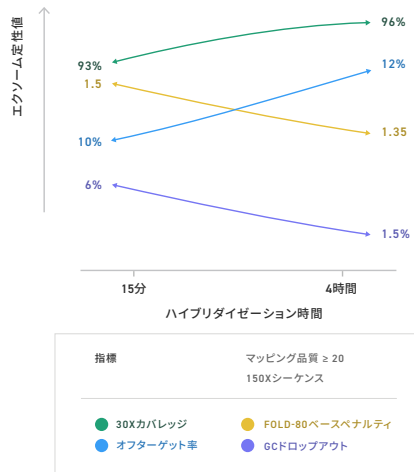
小さなパネル (0.1 Mb 以下) は、大きなパネルよりもオフターゲットが大きくなります。サイズの異なるパネルで予想されるオフターゲット率の範囲を図 A3 に示します。70°C の Fast Wash Buffer 1 を用いた指標がプロットされています。

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。

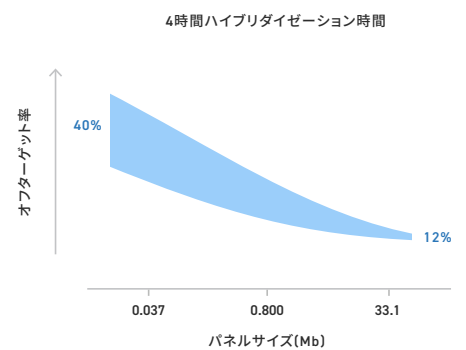
**図 A1**  
4 時間ハイブリダイゼーション時間での、代表的なターゲットエンリッチメント性能と Fast Wash Buffer 1 温度の関係



**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

DOC-001066 REV 2.0 | 最終改定日: 2021年5月14日

改訂	日付	説明
2.0	2021年5月14日	<ul style="list-style-type: none"> <li>Library Amplification Mixを12反応および96反応のエンリッチメントキットに含めるよう改訂。</li> <li>Library Amplification Mixを含めるよう、キットのカタログ番号、キットの構成品一覧、ワークフローのステップを更新。</li> <li>より明確にするためワークフローの細かいステップを更新。</li> </ul>