

Avida ターゲットエンリッチメント テクノロジー：DNA およびメチル化 シーケンシングのための協調的ハイブリッド キャプチャによるターゲットシーケンシング

著者

Michael Ruvolo, Ph.D., Director, R&D
Agilent Technologies, Inc.

概要

ターゲット次世代シーケンシングは、全ゲノムシーケンシングのわずかのコストで特定領域の深いカバレッジを実現することができます。しかし、従来のターゲットエンリッチメントでは追加のワークフローステップが必要で、ターゲット分子のキャプチャメソッドは効率的ではありませんでした。本アプリケーションノートでは、効率的で特異的なワークフローと、独自のライブラリ調製およびキャプチャにより、これまでの課題に取り組んだ新しいハイブリッドキャプチャによるターゲットエンリッチメントテクノロジーをご紹介します。Agilent Avida テクノロジーでは、長鎖オリゴヌクレオチドプローブを使用する従来の方法とは異なり、ターゲット領域に協調して結合する複数のプローブを使用します。この協調的結合によりキャプチャ効率が2～4倍に向上し、高い特異性を確保できます。ここでは、DNA、メチル化、およびDNAとメチル化を組み合わせた「Duo」の各ターゲットシーケンシングアプリケーションにおけるAvida テクノロジーの性能について紹介します。Avida テクノロジーは、1～100 ng のゲノム DNA ないし cell-free DNA (cell-free) から、一貫したキャプチャ性能でサンプル中に存在する分子の最大 80 % をキャプチャできるため、分子の全体像を非常に明確に把握できます。

はじめに

血漿から抽出される DNA や cell-free DNA (cfDNA) などの微量サンプルでは、腫瘍固有のバリエーションやメチル化の状態を検出することが困難です。その理由として、血漿から抽出される DNA や cfDNA などの検体では、サンプル量が限られている上、含まれる腫瘍 DNA 量はわずかであり、腫瘍固有のバリエーションやメチル化の状態を検出することが困難であることが挙げられます。Agilent Avida のライブラリ調製およびターゲットエンリッチメントシステムは、これらの課題に対応できるようにデザインされています。このシステムは、1 ~ 100 ng の cfDNA または 10 ~ 100 ng の断片化ゲノム DNA (gDNA) から、体細胞バリエーションとメチル化 DNA を高感度で検出することが可能です。

Avida のターゲットエンリッチメントテクノロジーは、3 次元のインターロックブローブ構造により目的の DNA ターゲットを相乗的かつ間接的にキャプチャできます。キャプチャ中に、複数のブローブが同じターゲットにハイブリタイズする場合にのみ、目的のターゲット分子で DNA スキャフォールドが形成され、ビオチンラベル化アンカーブローブによって安定化されます。長鎖ビオチン化ブローブを使用する従来のハイブリダイゼーションとは異なり、高速かつ効率的な Avida のハイブリダイゼーションは、ブリッジブローブに使用されるターゲット特異的な短い配列に基づいて行われます。このインターロック構造の形成とストレプトアビジンビーズと結合の相乗的ハイブリダイゼーションにより、特異性の高いキャプチャを達成できます (図 1)。

さらには、Avida テクノロジーではエンリッチメント前の プレキャプチャ PCR が不要です。そのためワークフローを短縮でき、PCR で発生するバイアスがなくなります。

Avida ポートフォリオは、DNA 解析、メチル化解析、ひとつのサンプルから DNA 解析とメチル化解析を組み合わせる Duo Methyl の 3 種類のライブラリ調製キットオプションで構成されます。ライブラリ調製キットと合わせて、3 種類の DNA および 1 種類のメチル化解析用のカタログパネルが利用できます。DNA パネルは Avida DNA および Avida Duo Methyl 試薬に対応しており、さまざまなアプリケーション向けに設計されています。Agilent Avida DNA Focused Cancer パネル (26 kb) では、14 種類のがん遺伝子およびがん抑制遺伝子のホットスポット領域が

カバーされ、コストをかけずに低アレル頻度を検出することができます。より大きい Agilent Avida DNA Expanded Cancer パネル (345 kb) には 100 種類以上の遺伝子が含まれています。そのうちの 80 種類は完全なエクソン領域をカバーしているため、変異数とコピー数の両方を検出できます。また Expanded パネルには、転座検出用の主要イントロン領域も含まれています。Agilent Avida DNA Discovery Cancer パネル (2.7 Mb) には、ゲノムプロファイリングおよびバイオマーカー評価のアプリケーション用として、682 種類の遺伝子および転座ホットスポットイントロンの完全なエクソン領域がカバーされています。メチル化検出には Agilent Avida Methyl 3400 DMR (Differentially Methylated Region : メチル化可変領域) Cancer パネル (870 kb) を使用できます。DMR は公共データベースや社内検討によって選択されており、がん/非がんによって異なるメチル化状態を示すことが考慮されています。

以降に示す Avida 試薬キットの性能については、cfDNA と gDNA をサンプルとし、特にテクノロジーの効率性、特異性、均一性に重点を置いています。

試薬と実験方法

サンプルとライブラリ調製

cfDNA は通常のドナーのプールされた血漿から抽出し (Biochain p/n Z2121001)、HapMap ゲノム DNA (NA24385) は Coriell から入手しました。cfDNA は断片化を実施せずそのままライブラリ調製に用いました。また gDNA は Covaris E220 ソニケーターを用いて約 200 bp の平均サイズに断片化しました。ライブラリ調製は、表 1 の Avida キットを使用し、推奨プロトコル : [Avida DNA](#), [Avida Methyl](#), [Avida Duo Methyl](#) に従って実行しました。

サンプル DNA は末端修復および dA 付加の後、3 塩基の UMI (unique molecular identifier : 分子バーコード) を含むメチル化アダプタを用いてライゲーションしました。ライゲーションした DNA をビーズ精製し、プレキャプチャ PCR を行わず直接ハイブリダイゼーションに使用しました。続いてハイブリダイゼーションを 1 時間実行し、ターゲット分子をストレプトアビジンでキャプチャしました。Duo Methyl 試薬キットでは、メチル化パネルを用いて、ハイブリダイゼーションの上清から、2 回目のキャプチャ

Avida キャプチャ

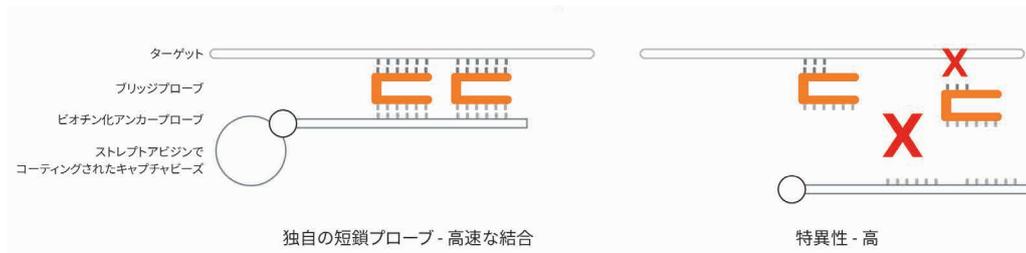


図 1. Agilent Avida キャプチャの概略図

左側の図は、ターゲット分子とビオチン化アンカーブローブに相乗的に結合しているブローブを、右側の図は、固有の特異性には複数ブローブの結合が必要であることを示しています。

を実行しました。キャプチャしたターゲットを洗浄した後、増幅してサンプルインデックスを付加しました。得られたライブラリはプール後、Illumina NovaSeq6000 で 2x150 条件でシーケンシングしました。サンプルあたりのシーケンシング量をインプット量とパネルサイズに基づいて調整し、サンプル中のユニークな分子をシーケンシングしました。サンプルあたりのシーケンスリード数の詳細は、以降の図中の凡例をご覧ください。

解析

BWA (Burrows-Wheeler Aligner) を用いて FASTQ ファイルを調整してから、UMI を用いて重複除去を行いました。続いて Single/Duplex コンセンサスリードを用いてシーケンスマトリクスを計算しました。解析パイプラインの詳細については、[Avida DNA ターゲットシーケンス解析ガイド](#) と [Avida ターゲットメチル化シーケンス解析ガイド](#) をご覧ください。分子回収率は Single コンセンサス重複除去に従い、ターゲット領域全体のユニークリードの中央値として計算しました。オンターゲットはターゲット領域とオーバーラップするリード割合として示されています。均一性は、平均カバレッジの 0.5 倍以上のカバレッジを持つターゲット塩基の割合で示されています。

表 1. Agilent Avida 試薬キット/パネル例

Agilent Avida 96 反応試薬キットおよびパネルその他の Avida 16 反応 および自動化対応試薬キットの型番については、アジレントのウェブサイトをご覧ください。

型番	試薬名	ライブラリ調製キット/パネル	適用ワークフロー
G9418A	Avida DNA Reagent kit, イルミナ index primer pairs 1 ~ 96, 96 反応	ライブラリ調製キット	DNA
G9418B	Avida DNA Reagent kit, イルミナ index primer pairs 97 ~ 192, 96 反応	ライブラリ調製キット	DNA
G9429A	Avida Methyl Reagent kit, イルミナ index primer pairs 1 ~ 96, 96 反応	ライブラリ調製キット	Methyl
G9429B	Avida Methyl Reagent kit, イルミナ index primer pairs 97 ~ 192, 96 反応	ライブラリ調製キット	Methyl
G9440A	Avida Duo DNA and Methyl Reagent Kit, イルミナ index primer pairs 1 ~ 192, 96 反応	ライブラリ調製キット	Duo Methyl
5280-0044	Avida DNA Discovery Cancer パネル、96 反応	キャプチャ用パネル	DNA / Duo Methyl
5280-0047	Avida DNA Expanded Cancer パネル、96 反応	キャプチャ用パネル	DNA / Duo Methyl
5280-0050	Avida DNA Focused Cancer パネル、96 反応	キャプチャ用パネル	DNA / Duo Methyl
5280-0059	Avida Methyl 3400 DMR Cancer パネル、96 反応	キャプチャ用パネル	Methyl / Duo Methyl

結果

cfDNAをサンプルとした場合の正確なバリエーションコールは、微量で十分なバリエーションを含む分子をキャプチャできるかに依存します。Avida テクノロジーは、最少限のインプット量からほとんどの情報を取得できるように最適化されています。DNA のサンプル量によって、測定に使用できる総分子数が決まります。一倍体ゲノムが約 3.4 pg とした場合、インプット量 1.4 ng では約 400 ゲノムに相当します。Avida ケミストリは両方のストランドを測定するため、インプット量 1.4 ng 中のユニークな分子は 800 個になります。データでは、うち約 585 個 (73 %) が回収されました。この 70 ~ 75 % の回収率は、テスト内のインプット量の範囲で一貫しています (図 2、表 2)。

また重要な点の一つとして挙げられることは、さまざまなアレル頻度でのバリエーション検出能力は、インプット量と直接的に関連していることです。インプット cfDNA 量が数 ng の場合は、アレル頻度 1 % で存在するバリエーションしか確実に検出できない可能性があります。アレル頻度 0.5 % 未満を検出したい場合は、5 ~ 40 ng のインプット量を用いる必要があります。

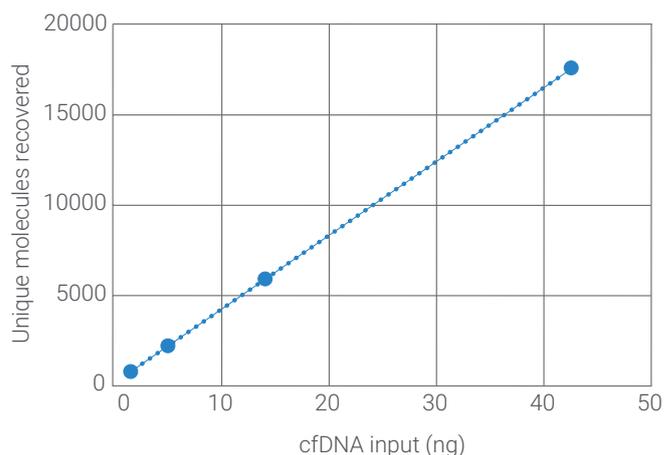


図 2. Agilent Avida ケミストリでは、幅広いインプット量 (1.4 ~ 42 ng) でユニークな分子の一貫した回収率が見られます。DNA アッセイではインプットとして cfDNA を、また 26 kb Agilent Avida DNA Focused Cancer パネルを用いてキャプチャしました。シーケンシングは以下の条件で行いました。1.4 ng および 4.2 ng : 5 M ペアエンド (PE) リード、14 ng : 10 M PE リード、42 ng : 30 M PE リード

表 2. サンプル中のユニークな分子の理論回収率 (Agilent Avida DNA Focused Cancer パネル使用時)

インプット量 (ng)	ターゲット領域あたりのユニーク分子の平均数	理論上の分子数	回収率 (%)
1.4	586	800	73 %
4.2	1806	2400	75 %
14	5774	8000	72 %
42	17396	24000	72 %

Avida テクノロジーは、高い分子回収率に加えて、ターゲット領域全体のカバレッジの高い特異性と均一性を実現します。オンターゲット率はパネルによっても異なりますが、70～88%です。オンターゲット率は、Expanded パネルのほうが少し低くなります。これは転座検出用のイントロン領域が含まれるためです。イントロン配列はそれほど複雑でないため、これらの領域をターゲットにするプローブは、クロスハイブリダイゼーションが生じやすくなります。均一性は、平均カバレッジの 0.5 倍以上のカバレッジを持つターゲット塩基の割合で示されています。均一性は 85～98% であり、ターゲット塩基全体でシーケンシングカバレッジが一貫していることを示しています。Expanded パネルに含まれる各種ターゲットタイプで見られる類似のカバレッジからも高い均一性が示されています (図 3)。

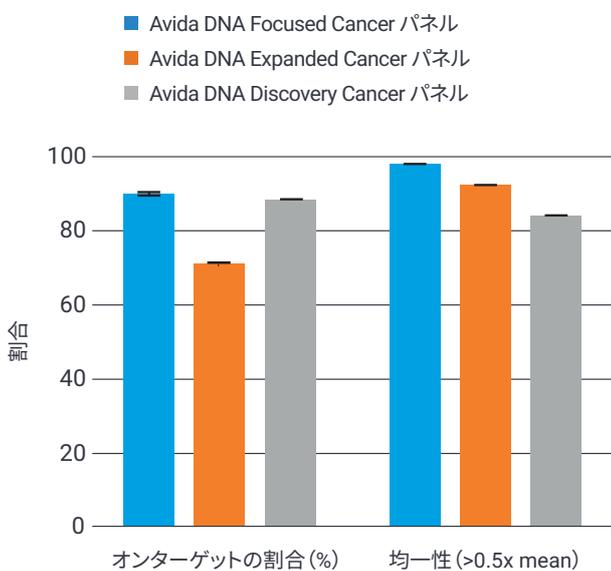


図 3. Focused パネルおよび Expanded パネルの場合、オンターゲット率は 75%、均一性は 95% を超えています。Discovery パネルの場合、均一性は 85% を超えます。データは cfDNA 10 ng をインプットとして使用し、3.5 M (Agilent Avida DNA Focused Cancer パネル)、25 M (Agilent Avida DNA Expanded Cancer パネル)、または 40 M (Avida DNA Discovery Cancer パネル) のペアエンドリードで取得しました。

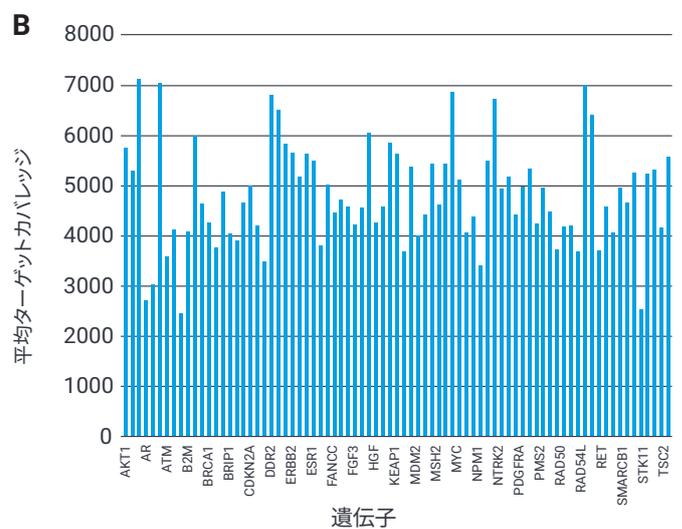
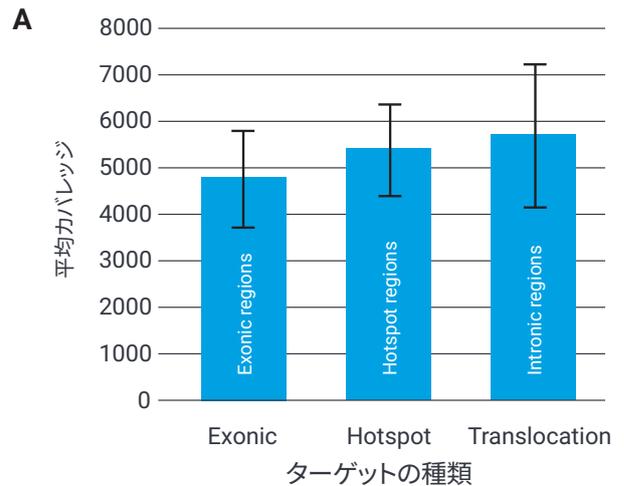


図 4. カバレッジはパネル全体で一貫しています。A) 平均重複除去カバレッジは、3 つのターゲットタイプ (エクソンコンテンツ (full exon / full genes)、ホットスポット領域 (subexonic もしくは small intronic regions)、転座領域 (longer intronic targets)) で類似しています。B) すべての遺伝子は平均 2000× リード以上でカバーされており、114 種類の遺伝子のうち 113 種類で平均ターゲットカバレッジの少なくとも 50% 以上を有していました。データは cfDNA 10 ng と Agilent Avida DNA Expanded Cancer パネル (340 kb) および 30 M ペアエンドリードの組み合わせで取得しました。

Avida テクノロジーはバリエーション検出だけでなく、新しい手法であるソフトコンバージョンによってメチル化の評価に適したものになっています。この次世代のバイサルファイト変換は、従来のメソッドとは異なり、DNA 損傷の影響を軽減して、変換後の分子の回収率を上げるよう考慮されています。図 4 に示す通り、メチル化ワークフローと Duo Methyl ワークフローは同等の性能を示します。いずれのワークフローでも、オンターゲット率は 90% 近くであり、CpG コンテキスト外のシトシン (C) の 99% 以上が変換されています。さらには、ユニークな分子の回収率が比較することができます。cfDNA インプット量が 3 ng の場合は約 200 個が、10 ng の場合は約 1,000 個がキャプチャされています。一般的なガイドラインとして、低濃度のメチル化を検出するには、約 100 個のユニークな分子が必要です。このため、このしきい値はインプットとワークフローの両方によって満たされます。

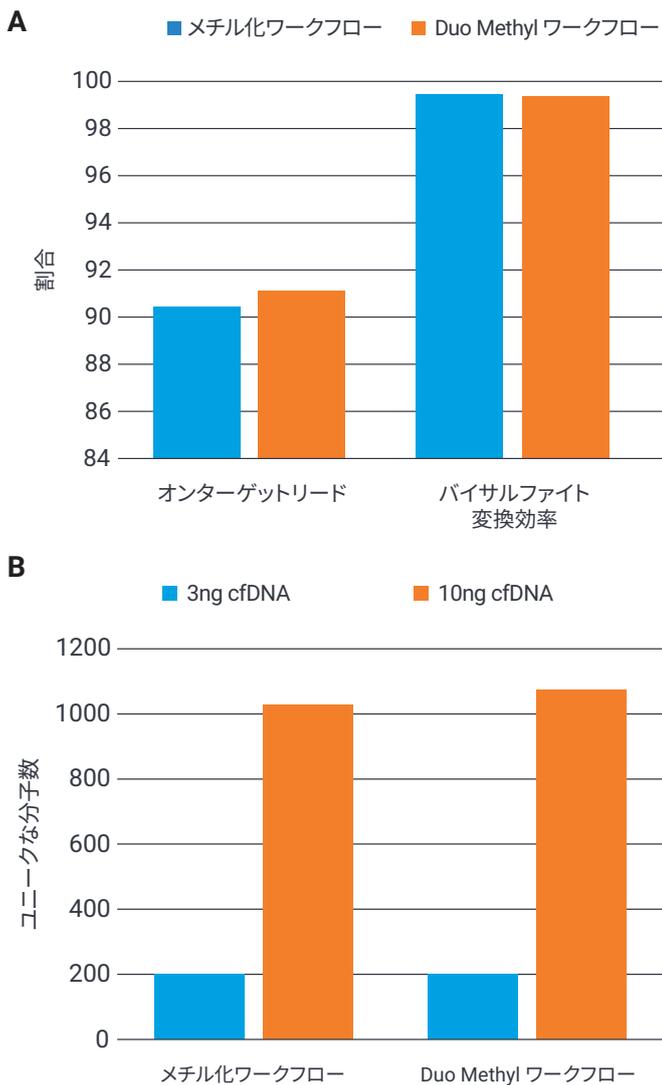


図 5. 単独 (Agilent Avida メチル化ワークフロー) または DNA 分析との組み合わせ (Agilent Avida Duo Methyl ワークフロー) で実施した場合のメチル化分析の性能

A) オンターゲット率と、変換後の非 CpG サイトシンの割合は、両ワークフローで類似しています。データは 3 ng のインプットと 10 M のペアエンド (PE) リードで取得しました。B) キャプチャしたユニークな分子の数を、3 ng と 10 ng のインプット量で比較できます。いずれのインプット量でも、10 M の PE リードを使用して解析しました。

結論

Agilent Avida の 3 つのワークフロー (DNA、メチル、Duo Methyl) は、限られたサンプル量からできる限り多くの情報を得られるように最適化されています。サンプル量の確保が困難とされる状況は cell-free DNA を用いるアプリケーションでは頻繁に発生します。この効率の高さを可能にしているのは新しい相乗的プローブ結合システムであり、インプット量範囲全体で、一貫性のある均一な分子回収率を実現しています。

また、ワークフローは、がん研究用にデザインされた 3 種類の DNA パネルと 1 種類のメチル化パネルにより、柔軟なワークフローをとれるものとなっています。パネルはさまざまな用途に対応できるように設計されています。例えばバリエーションの検出 (Focused パネル)、低インプットサンプルからのバイオマーカー探索 (Discovery パネル) などです。

Avida メチル化解析は、非メチル化シトシンの 99 % 超の変換を達成するソフトコンバージョンを利用し、変換済み分子の回収率を最大化しています。この方法はメチル化分析と、サンプルを分割せずに変異とメチル化状態を分析できる唯一の方法である独自の Duo ワークフローの両方で採用されています。

このように Avida ソリューションは、マルチオミクスアプリケーションにおける感度の課題に応えられるものとなっています。

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

G240697

www.agilent.com/genomics/genomics-jp

© Agilent Technologies, Inc. 2024

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, September 19, 2024

5994-7815JAJP