

--- 優れたエクソームシーケンスを
IDT 社 Exome Panel と
イルミナ社 Library Prep kit で実現 ---

Integrated DNA technologies 株式会社 統括本部長 矢野 実

Integrated DNA Technologies (IDT)

- 1987年に、現CEOのDr. Joseph Walder (M.D. PhD)により設立
- 現在、世界最大級の研究用カスタム核酸合成品のサプライヤー
 - 世界の4ヶ所(米国2、欧州1、アジア1)に製造拠点
 - 500台以上の合成機器が稼動、従業員はグローバルで1,000人以上
- 2016年より、Integrated DNA Technologies株式会社(IDT KK)が日本の輸入販売元に



Integrated DNA Technologies (IDT)

- List of Products : 研究用の核酸合成品ほぼ全て
 - カスタムDNA合成: カスタムプライマー、修飾オリゴ合成、Ultramers[®]
 - カスタムRNA合成: 1本鎖合成、Ultramers[®]、DsiRNA
 - 人工遺伝子合成: gBlocks[®]、Genes
 - 定量PCRプローブ: PrimeTime[®]
 - ゲノム編集: Alt-R[®] CRISPR-Cas9 System
 - 次世代シーケンス: xGen[®]

優れたエクソームシーケンスを IDT 社 Exome Panel とイルミナ社 Library Prep kit で実現

詳細

特定の領域を対象とするターゲットリシーケンス、全エクソームを対象とするエクソームシーケンスは、遺伝性疾患研究やがん研究に至るまで、幅広い研究領域で関連遺伝子を網羅的に探索するための手法として採用されています。

IDT社とイルミナ社とは、優れたエクソームシーケンスのワークフローをご用意しました。高品質のオリゴ核酸合成で定評のあるIDT社のxGen製品(エクソームパネル、ブロッキングオリゴ、ハイブリダイゼーション試薬)と、実績あるイルミナ社のTruSeq、Nextera DNAライブラリー調製キットを用います。このワークフローにより、高いオンターゲット率とカバレッジ均一性、GC rich領域での十分なカバレッジ、を実現しました。

本セミナーでは、本ワークフローにより得られる解析データや解析結果、xGen製品の性能やその性能の基礎となっているIDT社のオリゴ核酸合成技術、についてご説明します。また、IDT社が推奨するマルチプレックス解析の設定と、それによって実現されるターゲットリシーケンスのコスト低減についてもご紹介します。

03/01/18 15:00 ~ 16:00

Integrated DNA Technologies 株式会社 (ID...

統括本部長

矢野実 様

Topic: Sequencing

登録



1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution

2. xGen[®] プローブの特徴

3. xGen[®] Exome Research Panel

3. xGen[®] Blocking Oligos

4. xGen[®] Lockdown[®] Reagents (Hybridization and wash kit)

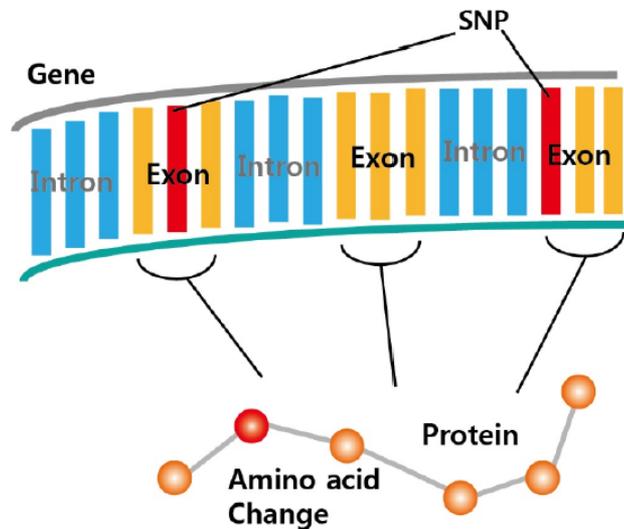
5. マルチプレックス化・コスト低減

6. IDT社のオリゴ合成技術

7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

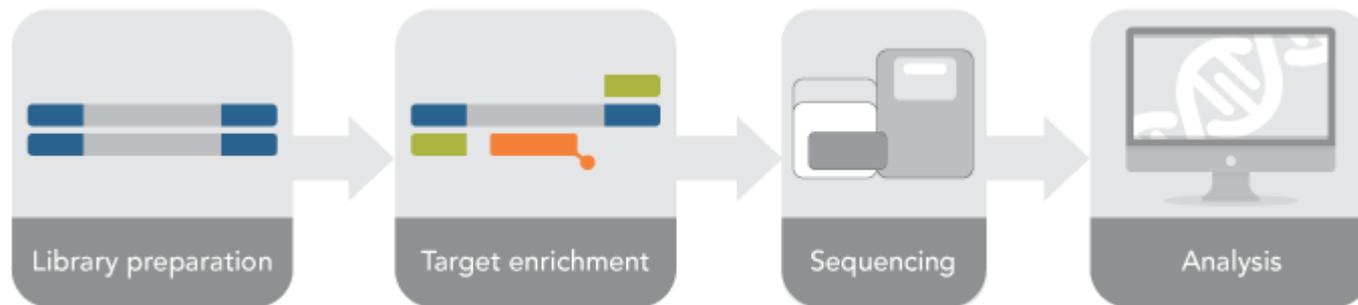
Exome Sequencing

- 全エクソン、もしくはタンパク質をコードする領域のみ、をシーケンスする
- 遺伝性疾患研究やがん研究に至るまで、幅広い研究領域で関連遺伝子を網羅的に探索するための方法



[http://www.dnalinkus.com/us/service/exome_sequencing.html]

IDT-illumina Exome Sequencing Solution



illumina

IDT

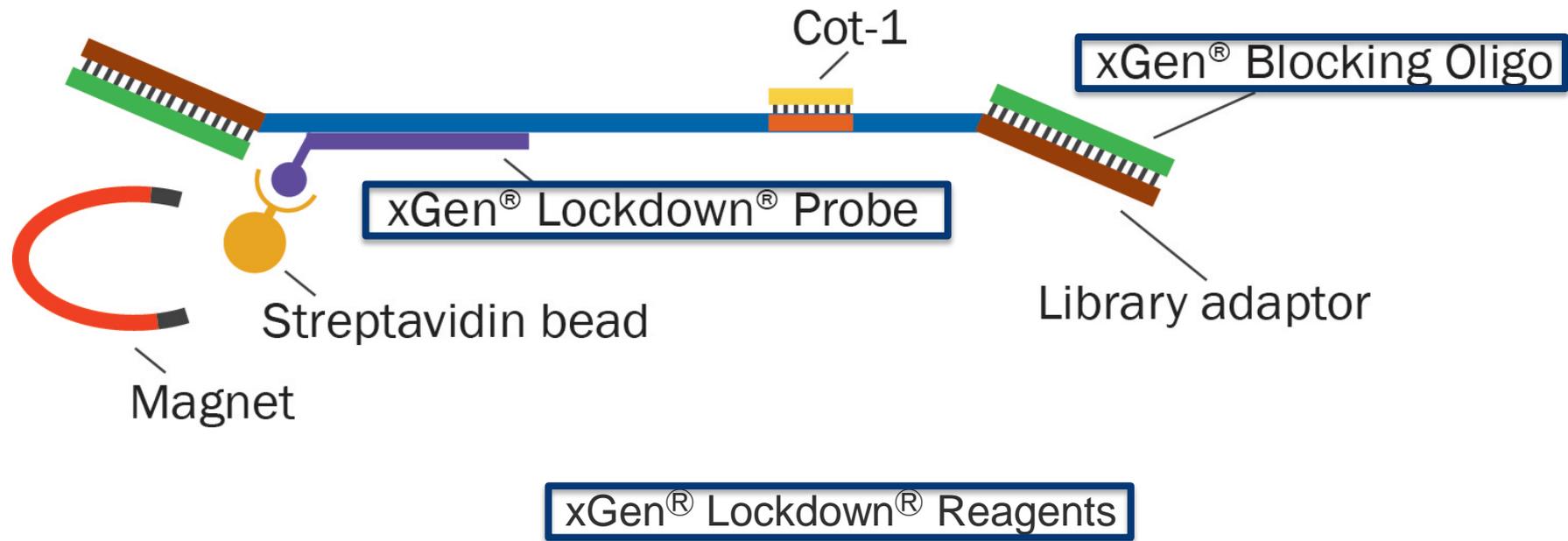
illumina

illumina



xGen® products を用いる

xGen[®] Products for NGS target capture enrichment



- 
1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution
 2. **xGen® プローブの特徴**
 3. xGen® Exome Research Panel
 3. xGen® Blocking Oligos
 4. xGen® Lockdown® Reagents (Hybridization and wash kit)
 5. マルチプレックス化・コスト低減
 6. IDT社のオリゴ合成技術
 7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

xGen[®] プローブの特徴

- 120basesの5'末端ビオチン修飾DNAオリゴ
- 各プローブは1本ずつ合成され、1本ずつ品質管理チェック
 - 質量分析による分子量測定で配列確認する
 - OD値測定により収量(モル数)を同定する

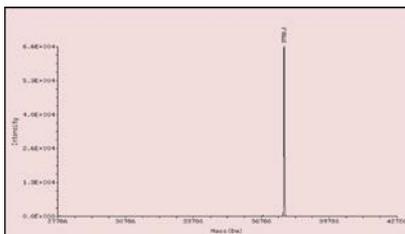


図. GC含量78%プローブの質量分析結果

合成した配列

```
/5Biosg/GCGGCGAGCGGAGATCCGGGGCCTGCGCTGCGCACTCGAGCCTGGC  
GGGCCGGCACGGTGCGGGCCATGAGCGGGGCGGTGCCCCAGGACCTAGCG  
GTGAGTGGCGGCCGAGTCGGGCAC
```

xGen® プローブを用いるパネルの特徴

- 各プローブは1本ずつ合成され、1本ずつ品質管理チェック
 - ⇒ パネルに「正しい配列、互いに等量、必要量」のプローブがプールできる。
 - ⇒ ライブラリーから、キャプチャーしたい断片を、正しくキャプチャーできる。
 - ⇒ より良い品質の配列解析データを得ることができる。
 - 高いon-target率
 - 高いカバレッジと均一性
 - GC rich領域でもキャプチャー可能(例: 第一エクソン)



1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution
2. xGen[®] プローブの特徴
- 3. xGen[®] Exome Research Panel**
3. xGen[®] Blocking Oligos
4. xGen[®] Lockdown[®] Reagents (Hybridization and wash kit)
5. マルチプレックス化・コスト低減
6. IDT社のオリゴ合成技術
7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

xGen[®] Exome Research Panel とは

スペック

- ・ ヒトの19,396遺伝子のエクソンのコーディング領域がターゲット
- ・ 39 Mbのターゲット領域、51Mbのカバー領域
- ・ 429,826本のプローブをプール
- ・ hg19データベースを基にプローブ配列デザイン

特徴

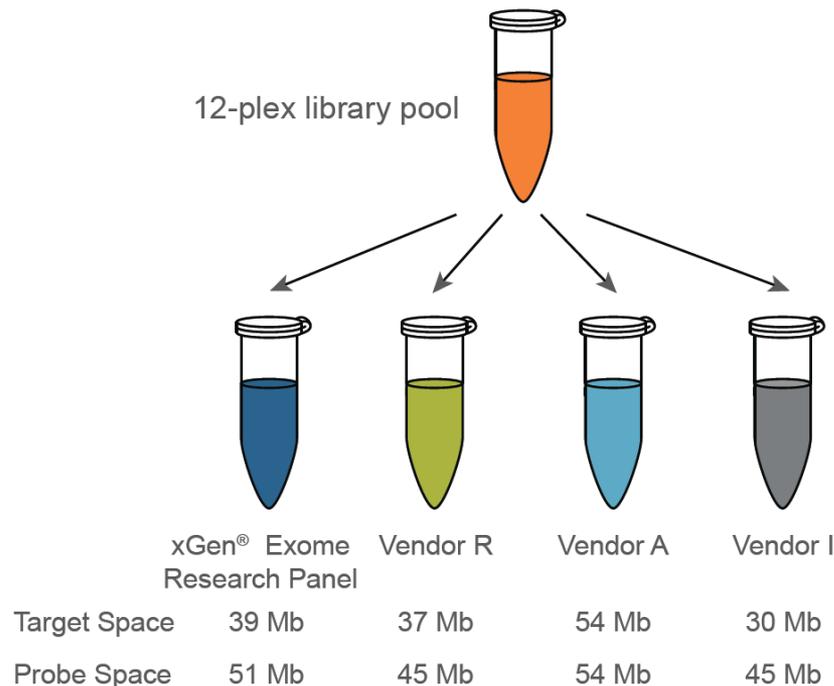
1. 高いon-target率
2. 高いカバレッジと均一性
3. GC rich領域でもキャプチャー可能
(例: 第一エクソン)

パネル名	反応数	価格
xGen [®] Exome Research Panel v1.0	16 rxn	¥480,000
	96 rxn	¥2,400,000

2018年3月1日現在の価格です

各社Exome Panelの比較検討実験： スキーム

1. KAPA Hyper Prep kitを使用して12種のライブラリを用意し、プレプール
2. 各社キャプチャー用に分配
3. 各社推奨のプロトコールに従ってキャプチャー(12-plex)
4. HiSeq® 2500のhigh outputで150bpペアエンドシーケンスを行い、34Mリード(17Mペアエンド)を取得

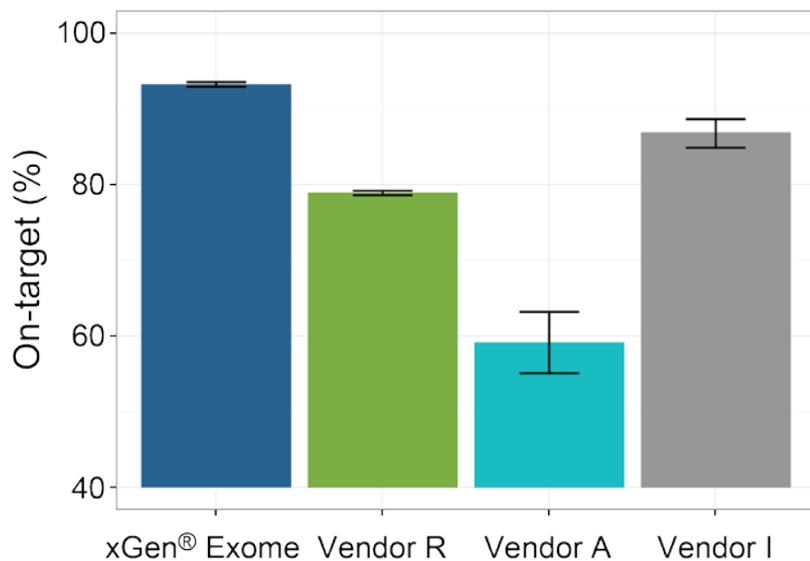


2016年に米国の大規模シーケンスセンターで得られたデータです。

各社Exome Panelの比較検討実験：各パネルの概要

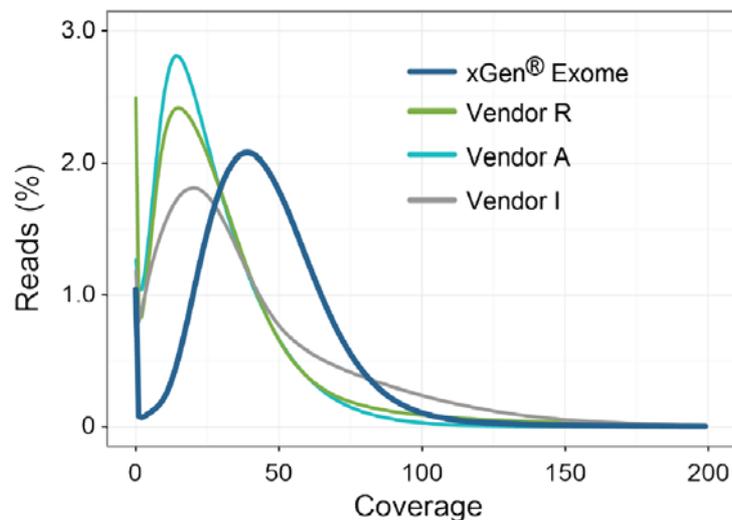
	% Database covered			
Database / Probe space	xGen [®] panel	Vendor R	Vendor A	Vendor I
(Size bp)	(51 Mb)	(45 Mb)	(54 Mb)	(45 Mb)
RefSeq (34 Mb)	98%	97%	97%	100%
CCDS (32 Mb)	99%	98%	98%	100%
Ensembl (35 Mb)	93%	92%	96%	99%
GENCODE (35 Mb)	96%	95%	97%	99%
Vega (26 Mb)	95%	96%	97%	100%

xGen[®] Exome Research Panel: 高いon-target率

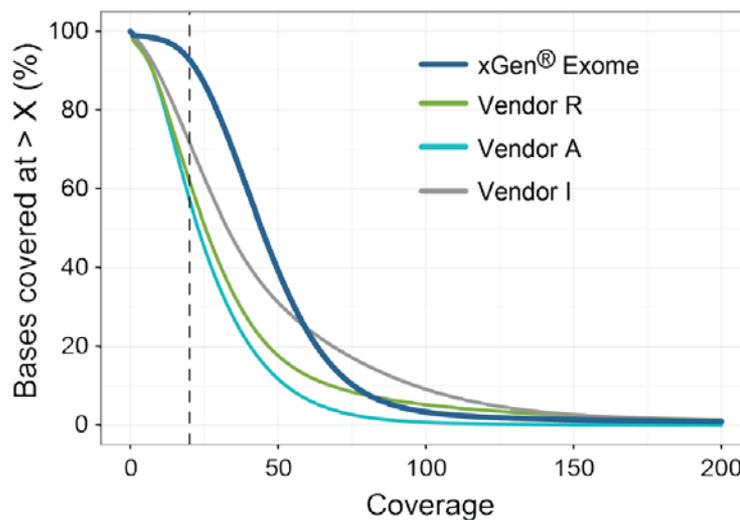


On-target (%) = (on bait bases + near bait bases) / aligned bases

xGen® Exome Research Panel: 高いカバレッジと均一性



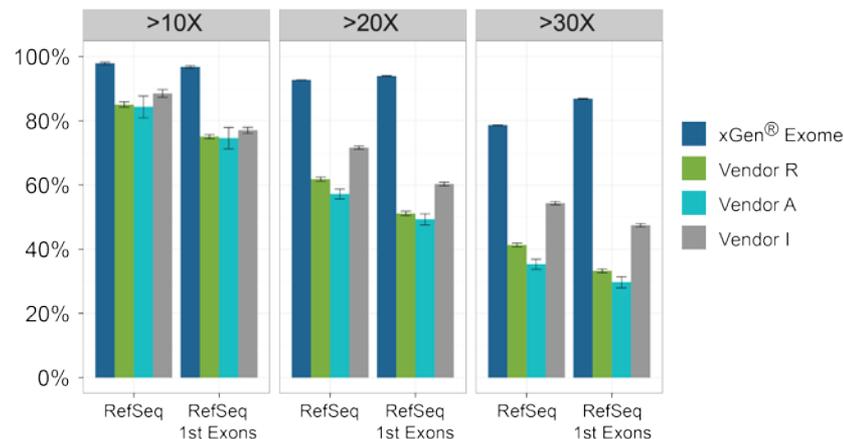
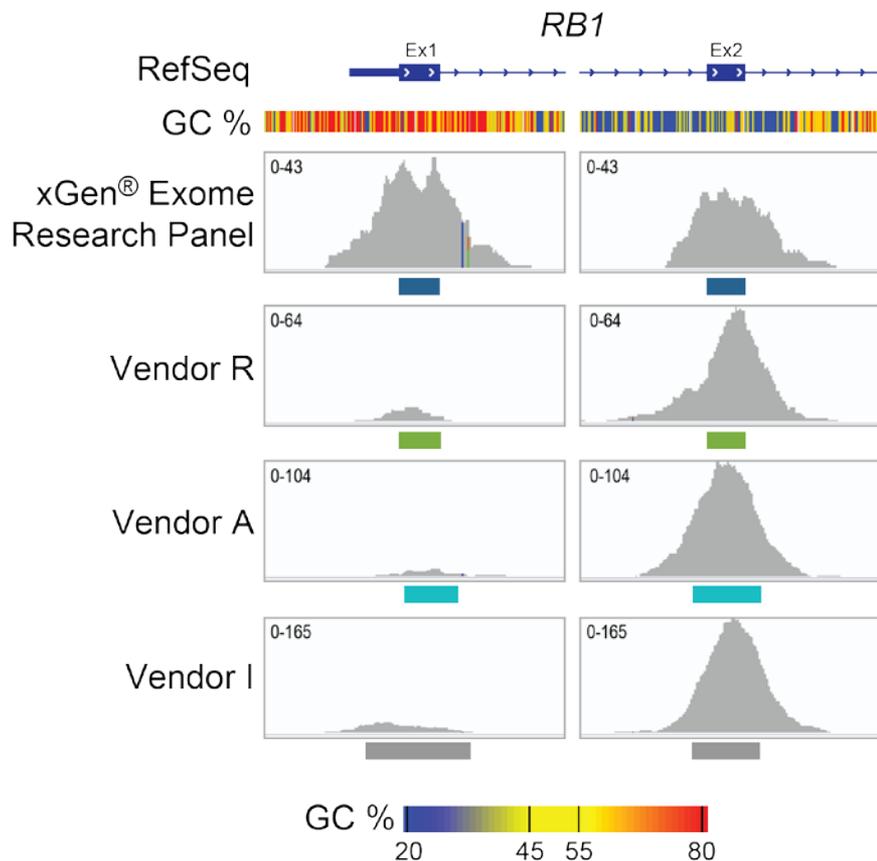
xGen®はカバレッジが低い領域が少なく、
頻度ピーク時のカバレッジ数が高い



xGen®は20xカバレッジのカバー率が93%に対して、
他のパネルは71%以下

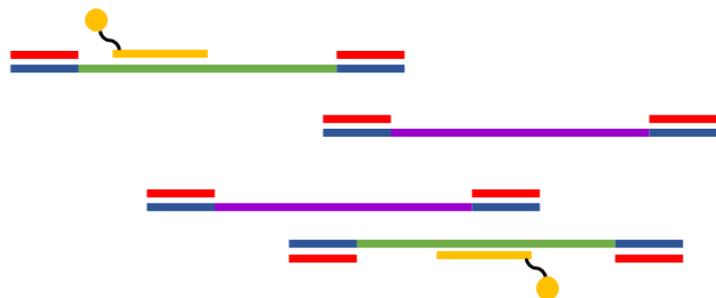
xGen[®] Exome Research Panel: GC rich領域でもキャプチャー可能

(例: 第一エクソン)

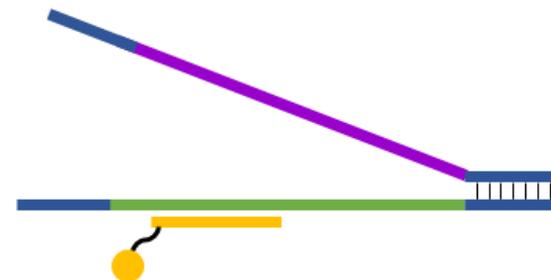


- 
1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution
 2. xGen® プローブの特徴
 3. xGen® Exome Research Panel
 - 3. xGen® Blocking Oligos**
 4. xGen® Lockdown® Reagents (Hybridization and wash kit)
 5. マルチプレックス化・コスト低減
 6. IDT社のオリゴ合成技術
 7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

xGen® Blocking Oligos: 高いオンターゲット率に必須



- ブロッキングオリゴ
- アダプター配列
- ターゲット配列
- オフターゲット配列



Blocking Oligosを使用する

- ⇒ アダプター配列がBlocking Oligosでマスクされる
- ⇒ オフターゲット配列の回収率が下がる

Blocking Oligosを使用しない

- ⇒ アダプター配列介し非特異断片が結合
- ⇒ オフターゲット配列の回収率が上がる

xGen® Blocking Oligos

製品名	反応回数	価格	納期
xGen® Universal Blocker's-TS Mix	16	¥92,500	約 1 週間
	96	¥450,000	
	384	¥1,650,000	

2018年3月1日現在の価格です

xGen® Blocking Oligos: イノシン塩基を用いマルチプレックスに対応



- インデックス配列部分には、イノシン塩基が結合するよう設計されており、マルチプレックス実験に対応可能
- 3'末端のC3スペーサー付加など非特異な配列の増幅・結合を防ぐ修飾
- HPLC精製を行った高品質オリゴ

- 
1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution
 2. xGen® プローブの特徴
 3. xGen® Exome Research Panel
 3. xGen® Blocking Oligos
 4. **xGen® Lockdown® Reagents (Hybridization and wash kit)**
 5. マルチプレックス可・コスト低減
 6. IDT社のオリゴ合成技術
 7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

xGen® Lockdown® Reagents: キャプチャー効率を最大化、時間を短縮化

- ハイブリダイゼーションバッファーと洗浄バッファーのセット
- xGen®製品を使用した際にキャプチャー効率が最大化するよう調製
- ハイブリダイゼーション時間は、4時間～16時間の範囲で。



製品名	反応数	価格	納期
xGen®Lockdown® Reagents	16 rxn	¥8,000	約1週間
	96 rxn	¥28,800	

2018年3月1日現在の価格です

- 
1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution
 2. xGen® プローブの特徴
 3. xGen® Exome Research Panel
 3. xGen® Blocking Oligos
 4. xGen® Lockdown® Reagents (Hybridization and wash kit)
 5. マルチプレックス化・コスト低減
 6. IDT社のオリゴ合成技術
 7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

マルチプレックス化・コスト低減

- プレプールしたライブラリで、キャプチャー可能
 - キャプチャにおける、推奨マルチプレックス数
 - 最大8-plexを推奨
 - より多くのマルチプレックスを実行したいユーザーへは、最初に8-plexで想定通りの十分なデータが得られること確認の上で、12-plexへ拡張することを、勧める。
- より少ないリード数で、十分なシーケンス解析可能
 - シーケンス解析にて、フローセルあたり、より多くの検体の解析が可能

コスト: Target Enrichmentのコスト低減可能

- 24 sampleの解析、キャプチャーを12-plex、で行う場合
 - Library Prepは 24 sample 分必要
 - Target Enrichmentは 2 rxn 分必要 (1 sampleあたりの費用は“1/12 rxn” 分)

⇒ 1検体あたり11,034円※

Description	List Price	1-plex Price/Sample	8-plex Price/Sample	12-plex Price/Sample
TruSeq® DNA Library Prep for Enrichment (24 Samples)	¥162,000	¥6,750	¥6,750	¥6,750
IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes (24 Indexes, 96 Samples)	¥121,000	¥1,260	¥1,260	¥1,260
IDT Lockdown Reagents (16 rxn)	¥8,000	¥500	¥63	¥42
IDT Exome Panel (16 rxn)	¥480,000	¥30,000	¥3,750	¥2,500
IDT Universal Blockers (16 rxn)	¥92,500	¥5,781	¥723	¥482
Total	¥863,500	¥44,292	¥12,546	¥11,034

2018年3月1日現在の価格です

※ Library Prepに用いるillumina社のPrep kitとIndex adapter、Target Enrichmentに用いるReagentとExome PanelとBlocking Oligosとのみで計算した金額である。

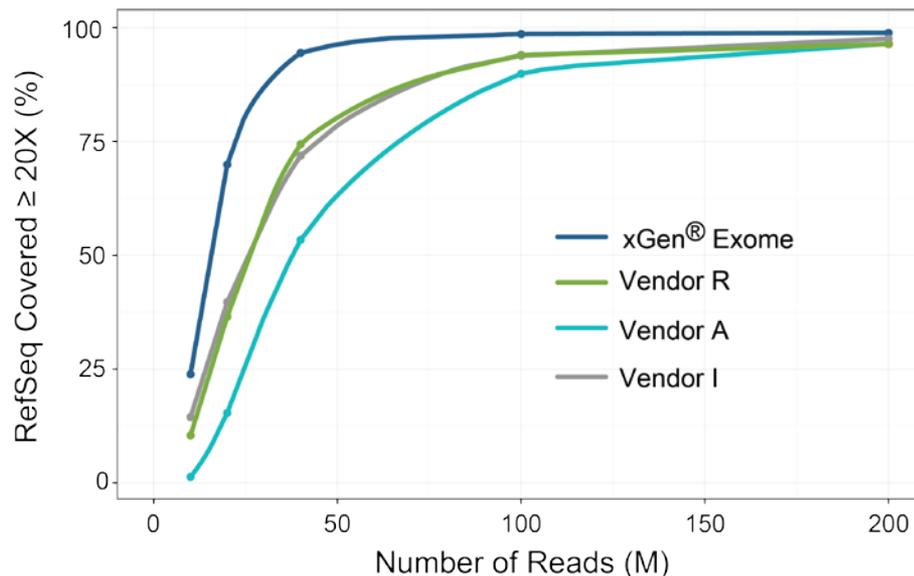
コスト： シーケンス解析でのコスト低減も可能

- xGen Exome Research Panelの12-plexのデータ

- 34Mリード、5.1 Gbのデータ量で、93.6%以上の領域で20X カバレッジ。
- 他のパネルでは、同様のカバレッジを得るために、2倍以上のリード必要。

⇒ 他のパネルと比べて、少ないリード数で十分な解析が可能。

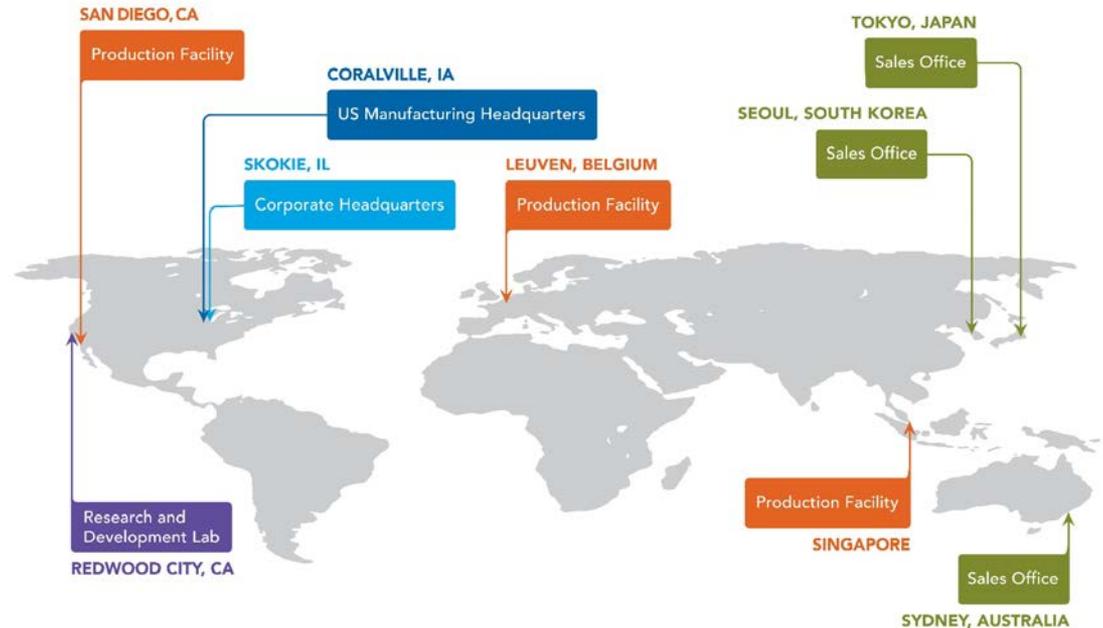
⇒ 1フローセルあたり、倍以上のマルチプレックスでシーケンス解析を行うことができ、コスト低減が可能。



- 
1. IDT-illumina Exome Sequencing Solution
 2. xGen[®] プローブの特徴
 3. xGen[®] Exome Research Panel
 3. xGen[®] Blocking Oligos
 4. xGen[®] Lockdown[®] Reagents (Hybridization and wash kit)
 5. マルチプレックス化・コスト低減
 - 6. IDT社のオリゴ合成技術**
 7. IDT-illumina Exome Sequencing 性能検証データ

Today, IDT is the leading brand in DNA and RNA synthesis

- 9 locations and >1,000 employees
- >100,000 active customers
- >50,000 oligonucleotides & >650 gBlocks® Fragments and Genes synthesized per day (over 55 million bases per month)
- >3,800 orders per day
- >400,000 website visits per month
- >94% of orders from website



IDT strategic advantages

Vertical integration



Custom synthesis platform
(hardware and software)

Synthesis inputs are
produced and controlled
internally

Quality



The molecular weight of
every oligo is verified by
mass spectrometry

Process traceability based
on custom lab information
management system (LIMS)

Flexibility and scalability



Transition from R&D to
commercialization with GMP
and B2B support

World-class custom
formulation and mixing

Support



Regionalized customer and
technical support



Raw materials



Creation of synthesis inputs



Production



QC



Kitting, packaging,
and formulation



Distribution

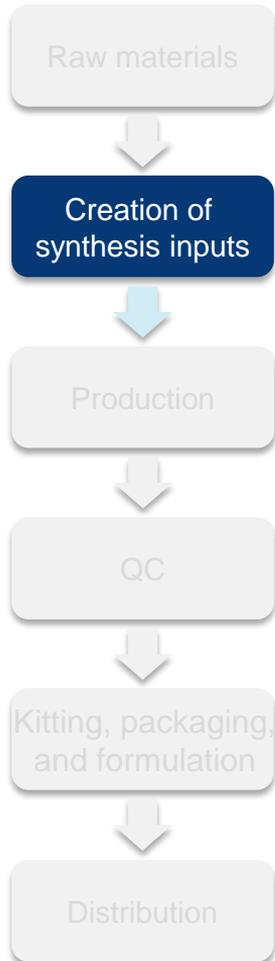
Superior oligos are made from high quality raw materials



Most reagents are acquired in bulk to reduce lot-to-lot variability

All raw materials undergo QC analysis for impurities known to negatively impact oligo synthesis

All synthesis inputs used at IDT are created or formulated in-house



Every synthesis material is QCed before use in production

IDT manufactures DNA and RNA phosphoramidites, as well as chemical modifications for oligo synthesis

IDT produces Nucleoside Controlled Pore Glass (CPG) that is used as a solid support for synthesis

Raw materials



Creation of synthesis inputs



Production



QC



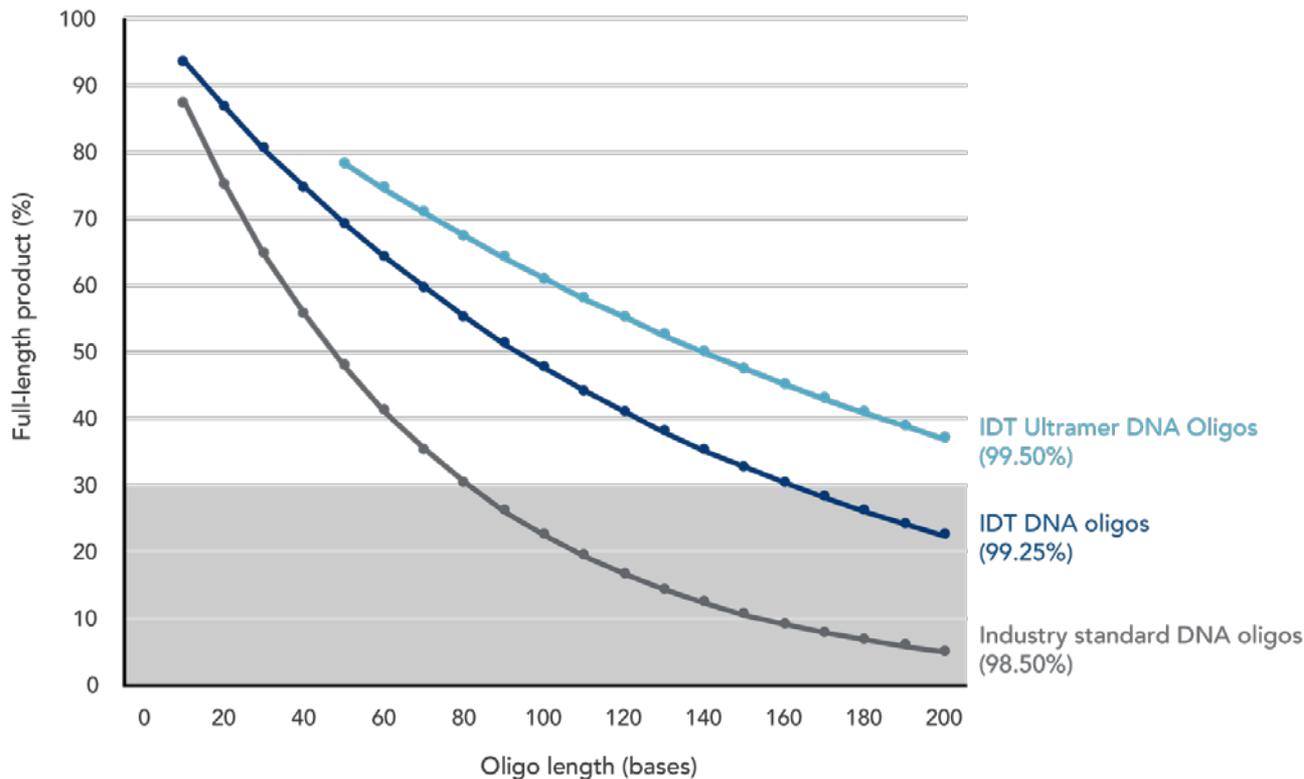
Kitting, packaging,
and formulation



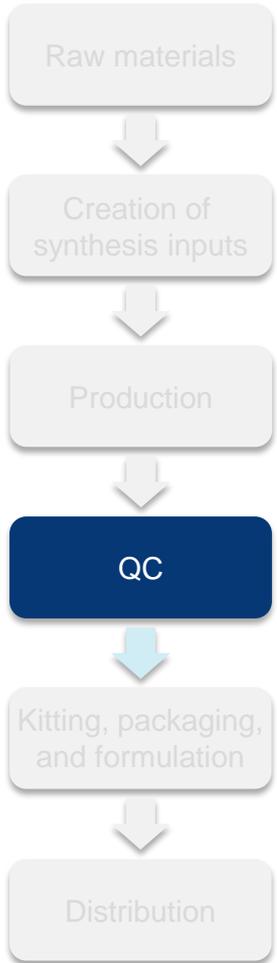
Distribution



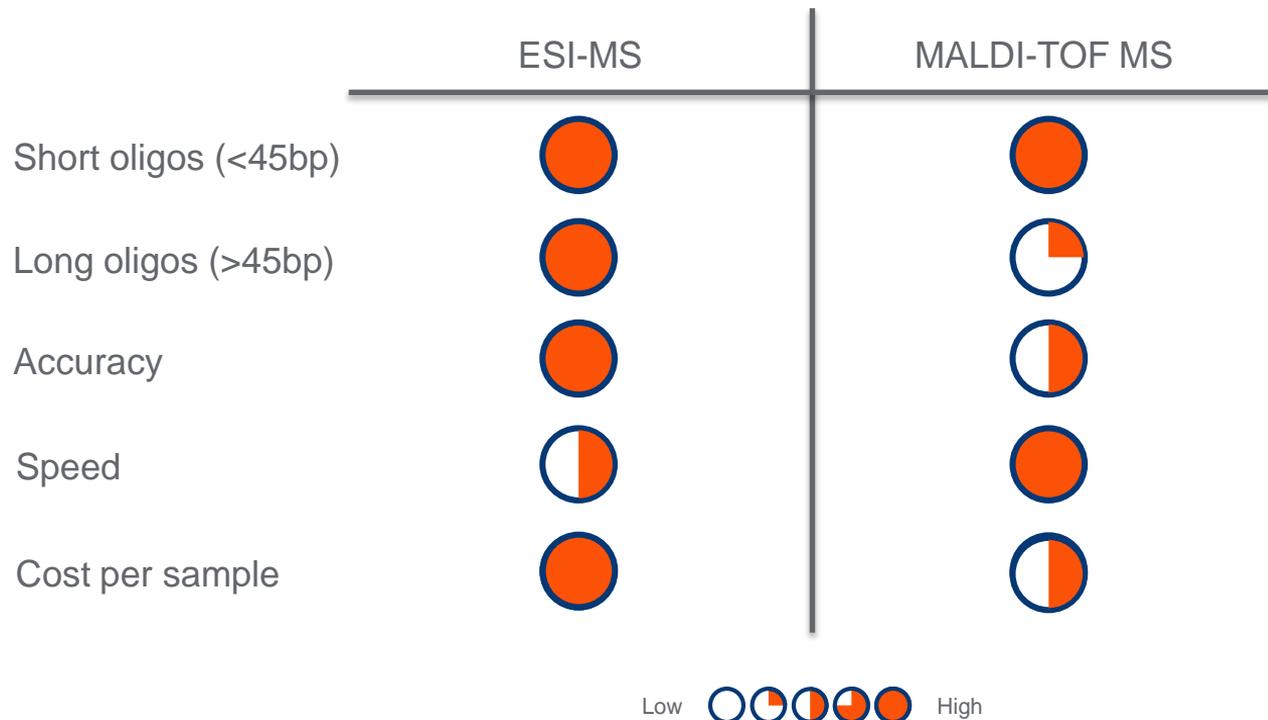
IDT oligos have the highest coupling efficiency in the industry



$$\text{Percent full-length product} = (\text{Coupling efficiency})^{(\text{Total bases}-1)}$$



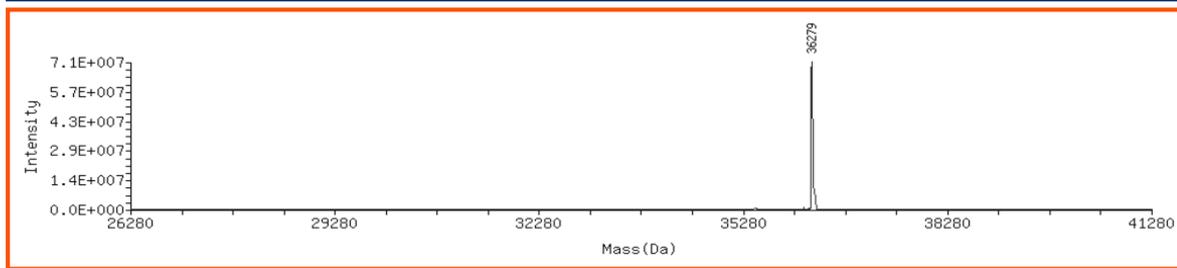
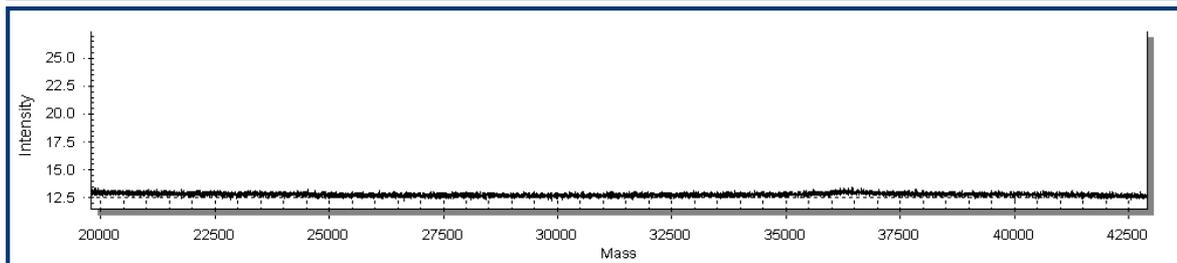
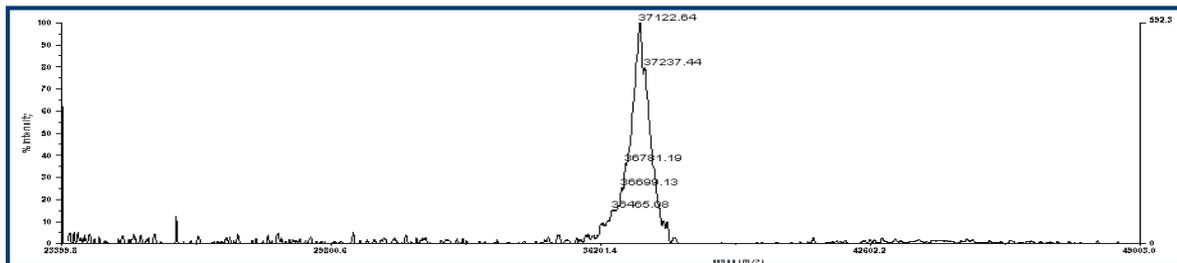
Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is the superior method for confirming the identity of oligonucleotides



IDT last used MALDI-TOF Mass Spec in 2012

MALDI-TOF cannot identify a 120 nt oligo

MW = 36,279.3 Da



Voyager MALDI-TOF

Allowed error: 72.6 Da

Measured error: 843.1 Da

Error: 2.324 %

Bruker MALDI-TOF

Allowed error: 72.6 Da

Measured error: N/A

Error: N/A

Substitution	MW Difference
dA<-->dC	24
dA<-->dG	16
dA<-->dT	9
dC<-->dG	40
dC<-->dT	15
dG<-->dT	25

ESI

Allowed error: 7.3 Da

Measured error: 0.5 Da

Error: 0.0014 %

Raw materials



Creation of synthesis inputs



Production



QC



Kitting, packaging,
and formulation



Distribution



xGen® Exome Research Panelのプロトコール、参考情報

“IDT Exome”で検索



- プロトコール
- ターゲット領域のBEDファイル
- 各プローブのBEDファイル

その他、参考情報は、IDT社のホームページからダウンロード可能です。

“Resources”をクリック

The screenshot shows the product page for the xGen Exome Research Panel. The page title is "xGen® Exome Research Panel" with the tagline "Deep, uniform coverage of the human exome with best-in-class capture panel". Below this, there is a detailed description of the panel and a list of key features:

- Obtain consistent results with individually synthesized target capture probes manufactured to GMP standards
- Achieve deep and uniform coverage even across difficult GC-rich regions
- Integrate with common sequencing platforms

The "Resources" dropdown menu is highlighted with a mouse cursor. The page also includes an "Ordering" section with a table of products and prices, and an "ORDER NOW" button.

Product	Pricing
16 rxn xGen® Exome Research Panel v1.0	¥480,000 JPY
96 rxn xGen® Exome Research Panel v1.0	¥2,400,000 JPY

The screenshot shows the "Resources" section of the product page. It lists various downloadable files and guides:

- Panel information**
 - xGen Exome Research Panel probes (bed) - Download (2,396.4 KB)
 - xGen Exome Research Panel targets (bed) - Download (1,095.4 KB)
 - xGen Exome Research Panel gene list (txt) - Download (1.44 KB)
- Files for BaseSpace analysis**
 - xGen Exome Research Panel probe manifest (txt) - Download (3,488.5 KB)
 - xGen Exome Research Panel targeted regions manifest (txt) - Download (6,900 KB)
- User guides and protocols**
 - Hybridization capture of Nextera DNA libraries using xGen Lockdown Probes and Panels (490 KB)
 - Hybridization capture with xGen Lockdown Probes and SeqCap reagents (96.2 KB)
 - Hybridization capture with xGen Lockdown Probes and Reagents (950 KB)
 - Hybridization capture of TruSeq libraries using xGen Lockdown Probes and Reagents (530 KB)
- Supplementing xGen Lockdown Panels**
- Application notes and case studies**
 - xGen Exome Research Panel—exceptional uniformity and complete coverage (755 KB)
- Posters**
 - Targeted vs. whole genomes—high quality oligonucleotide capture baits shift the target enrichment landscape (2,134 KB)
 - Development of a novel exome capture kit—ACMG 2015—Iowa Institute of Human Genetics (1,166 KB)
- Certificates of analysis (COAs)**
 - Find COAs by batch or lot number

