

「腫瘍パネルにおける変異頻度検出」

標準サンプルFFPE HD 200 (Horizon社) に対して、腫瘍パネル (ATOPlex) での解析を行いました。

DNBSEQ-G400RSによるPE100シーケンシングを2種類のケミストリで行い、得られた結果を比較しました。変異頻度の測定値と期待値を、図11に示しています。CoolMPSによる変異頻度検出 (図11-A) はstandard-MPS (図11-B) と同等でしたが、より変異頻度の期待値に近似していました。表1に示したその他の品質値も同等でした。

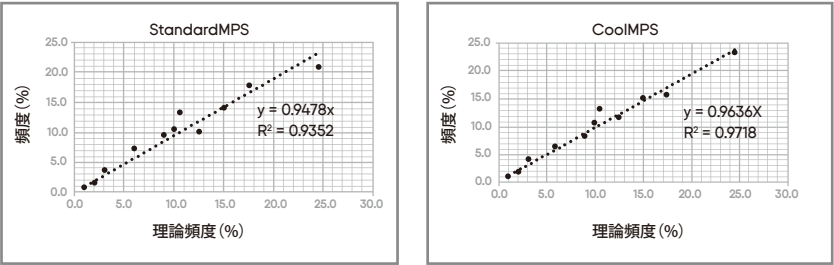


図11-A (左、StandardMPS) および11-B (右、CoolMPS)：期待される変異頻度との相関関係

近似	CoolMPS	StandardMPS
Q30	92.10%	87.20%
マッピング率	99.88%	99.95%
キャプチャ率	97.05%	97.26%
カバレッジ (≥100X)	99.36%	99.71%
Uniformity (>0.2X)	97.21%	95.43%

表1 2種類のケミストリ間での主な指標の比較

「RNASeqパフォーマンス」

CoolMPSでのRNASeqのパフォーマンスを標準サンプルUHRR由来のライブラリを用いて評価しました (図12)。StandardMPSおよびプラットフォームと比較したところ、Standard-MPSおよびCoolMPSのQ30%はいずれも90%であり、リード数はそれぞれ477Mと487Mでした。各プラットフォームとqPCR (インプット量200ng) より得られた結果をプロットしたところ高い相関関係が認められました (左)。CoolMPS自体の再現性も良好でした (右)。

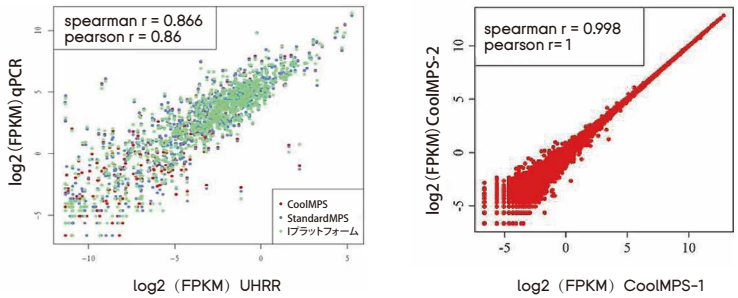


図12 左のグラフは、評価対象の全手法間における良好な相関関係を示しています。右の図は、CoolMPSの再現性を示しています。

「結論」

MGI DNBSEQプラットフォーム専用のCoolMPSシーケンシング法にはStandardMPSに対して優位性があることが示されました。従来の確立されたライブラリ調製プロトコルを変更することなく、幅広いアプリケーションに対応することが可能です。

「発注情報」

CoolMPS DNBSEQ-G400RS Sequencing Sets

パーツ番号	製品名
1000017992	CoolMPS High-throughput Sequencing Set (DNBSEQ-G400RS FCL SE50)
00016933	CoolMPS High-throughput Sequencing Set (DNBSEQ-G400RS FCL SE100)
00016935	CoolMPS High-throughput Sequencing Set (DNBSEQ-G400RS FCL PE100)

日本事務所

JAPAN MGI TECH CO., LTD. (日本華大智造科技株式会社)

アドレス：〒651-0083兵庫県神戸市中央区浜辺通5-1-14 神戸商工貿易センタービル 8F

メール：MGI_Japan@genomics.cn

ウェブサイト：en.mgitech.cn

電話：078-414-8765

FAX：078-414-8763



<https://www.linkedin.com/company/MGI-BGI>



https://twitter.com/MGI_BGI



website

CoolMPS™ Sequencing Reagent Sets

「よりクリーンで、より明るくより長いシーケンシング」

2019年10月に発表されたCoolMPSは、DNBSEQプラットフォーム向けの抗体を利用した初の超並列シーケンシングケミストリです。この革新的なケミストリは、より明確な塩基同定を可能にする非破壊塩基認識手法を使用しています。

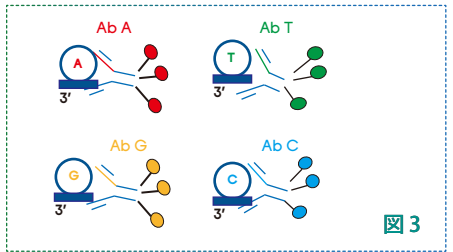
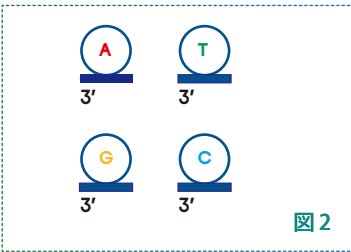
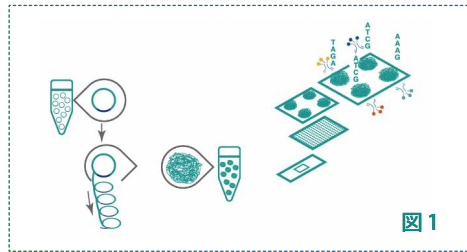


「CoolMPSケミストリの原理」

CoolMPSは、DNBSEQテクノロジーで使用されているシーケンシング手法です (図1)。使用するのとは次のとおりです。

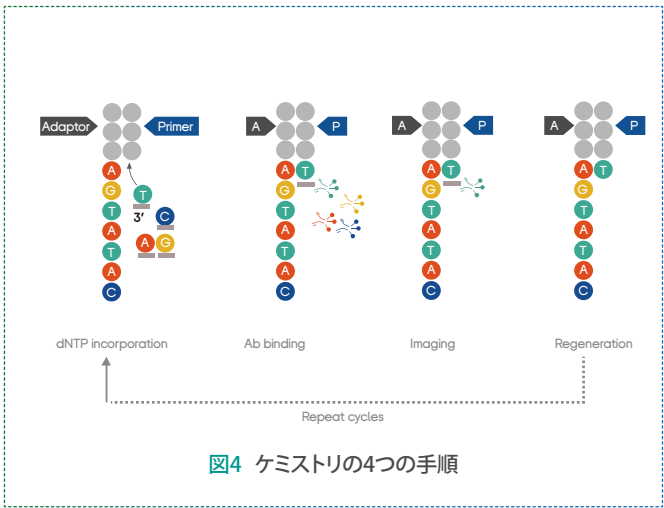
- 4つのコールドdNTP (蛍光ラベルの無いdNTP) と伸長防止ブロッカー (図2)。
 - 塩基特異的かつブロッカー特異的な4種類の抗体 (図3)。
- A、T、G、Cの特異的抗体の交差反応はほとんどありません。各抗体には、特定の色素 (標識) 分子が添加されています。

CoolMPSケミストリは、一般的に使用されている全てのライブラリ調製手法に対応しています。



「CoolMPSシーケンシング手順」

- フローセル上でDNA伸長時にコールドdNTPを取り込みます。
この塩基（コールドdNTP）は、まったくナチュラルな形状をしています。
- 取り込まれたコールドdNTPは、特異的に結合する蛍光標識抗体により認識されます。
- フローセルからイメージ取得し、塩基判定を行います。
- 次に再生試薬がブロッカーと抗体を取り除きます。
このとき塩基に損傷は発生しません。
- 必要なリード長に至るまでシーケンシングサイクルを繰り返します。



「メリットとアプリケーション」

- 強い信号強度からの高いS/N比の獲得
- クエンチングや塩基の損傷を回避
- システムティックなシーケンスエラーの回避
- Runon（塩基読み取りが遅れる反応）Lag（塩基読み取りが進みすぎる反応）の低レベルでの抑制

「高いシグナル強度」

図5 は、StandardMPS（蛍光ラベルdNTPを使用）とCoolMPS（非蛍光ラベルdNTPを使用）のシグナルを比較しています。CoolMPSのシグナルの方が高く、PE100ランの200サイクル後でも、StandardMPSの開始時のシグナル強度を上回っています。

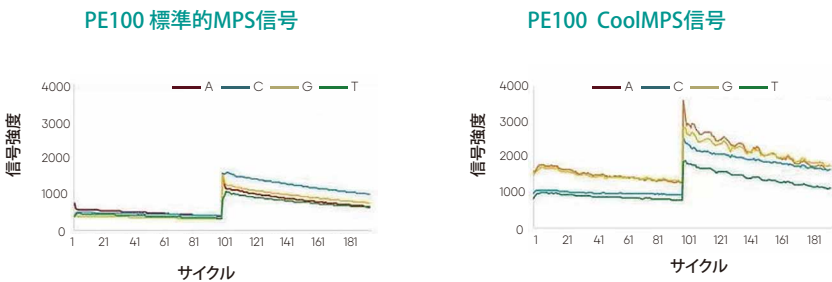


図5 PE100ランにおけるStandardMPSおよびCoolMPSの信号比較

「シグナルクエンチが起こらない」

StandardMPSでは、Gの読み取り時に信塩基の損傷依存のシグナルクエンチが発生する可能性があります（G suppression）。これは環状構造に近接した蛍光dyeが、リンカーの切り離し時に損傷を受けること原因とされています。CoolMPSでは塩基の蛍光ラベルを行っていないため、このような問題は生じません。図6 は、StandardMPSで取り込まれた塩基の損傷を示しています。

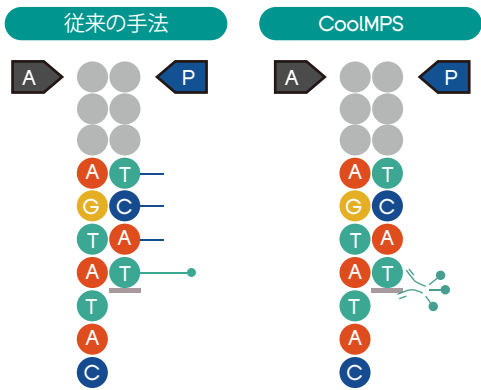


図6 従来のケミストリでは塩基損傷が起こります（左図）。しかしCoolMPSでは塩基損傷は起こりません。

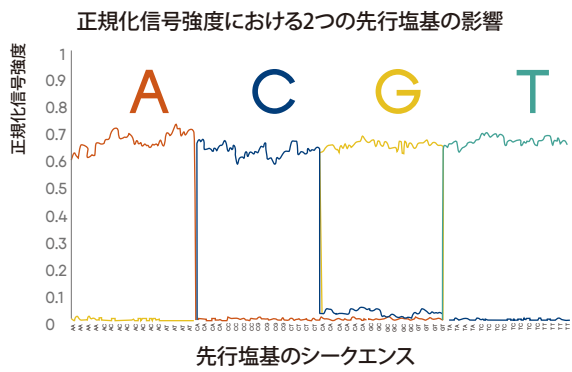


図7 シグナル強度に先行塩基の影響はほとんど認められない。

CoolMPSでは、蛍光体は抗体にラベルされており、その抗体はシグナル読み取り後に取り除かれます。即ちCoolMPSで新しく合成された鎖は天然型の塩基から成り、シグナル検出に悪影響を与えません。図7に示されたように、2つの先行塩基と比較してプロットされたたシグナル強度からも明らかです。いずれの塩基でもシグナル強度に差はなく、結果として高い精度とより長いシーケンシングリード長を実現することができます。

「低いシーケンスエラー」

ベースコール時に先行塩基が関係するエラーが生じる場合がありますが、CoolMPSでのベースコールエラーは不規則性が高いことがわかります（図8）。



図8 極めて低いエラー率とバイアス

「Lag / Runonに対する優れた特性」

Lag（塩基読み取りが進みすぎる反応）およびRunon（塩基読み取りが遅れる反応）はスムーズなシーケンス反応を評価するための一般的な指標です。DNAポリメラーゼによる蛍光ラベルdNTPの取り込みは、コールドdNTPSと比較して効率が低いことがわかります（図9）。

- Lagとは、シーケンシングがNポジションに進行する際に、一塩基遅れて（N-1）いることを表します。
- Runonは、数塩基進んだ箇所（N+）をシーケンスしていることを表します。

図9 に示されたように、CoolMPSの平均的なLagおよびRunonはそれぞれ0.2%と0.06%で、StandardMPSの0.7%と0.24%と比べて大幅に低くなっています。CoolMPSテクノロジーがもたらす低いレベルのLag / Runonは、より長いリードの取得を可能にします。

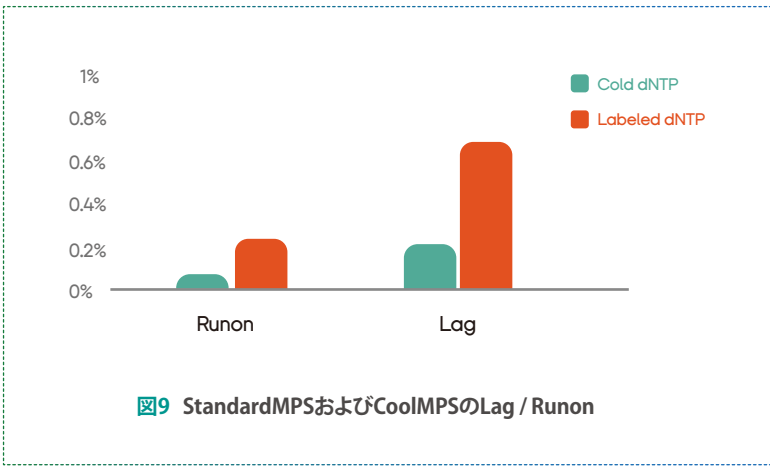


図9 StandardMPSおよびCoolMPSのLag / Runon

「アプリケーション」

CoolMPSのケミストリを使用して幅広いアプリケーションを評価し、StandardMPSと比較しました。WGS (PCR)、WGS (PCR-Free)、WES、RNA-Seq、およびターゲットパネルでのPE100シーケンシング比較（図10）では、CoolMPSのデータ出力はStandardMPSより6%高く、Q30%はStandardMPSより1〜9%高いことが示されました。

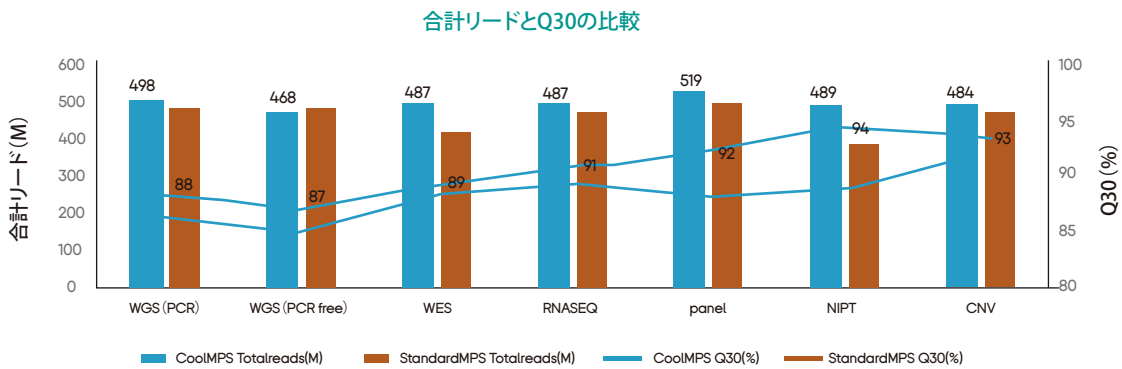


図10 異なるアプリケーションでのCoolMPS PE100データ性能