



Application

# Nextera Mate Pair ライブラリー調製における長鎖 (8kb) サイズセレクション

製品名 自動DNA断片ゲル抽出システム BluePippin (BLU0001)

メーカー名 セージ サイエンス  
Sage Science 社

下記のデータは、宮崎大学 医学部医学科 感染症学講座微生物学分野 小椋義俊様、後藤恭宏様のご厚意により掲載させて頂きました。

## 要約

Mate Pair シーケンス解析用のライブラリー調製で、正確なDNAサイズセレクションを行うことがデータ解析のために重要な要素となる。今回、バクテリア6株のMate Pair ライブラリー調製において、自動DNA断片ゲル抽出システムBluePippinで8kb 断片抽出を行い、シーケンスまで実施した。

データ解析において「Paired-end リードのみのアセンブル」と「8kb Mate Pair シーケンスを加えたときのアセンブル」のstats を比較したところ、scaffold( ≥ 5 kb) 数が1~9となり、大幅なアセンブル改善の効果が見られた。

## 実験方法

### ● サンプルDNA

生物種 : バクテリア A~Fの6株  
精製方法 : QIAGEN Genomic DNA Buffer Set & Genomic-Tip 100

### ● ライブラリー作成キット

Nextera Mate Pair Sample Prep kit (イルミナ株式会社)

### ● アセンブラ

Platanus version 1.1.4

### ● BluePippinサイズセレクション条件

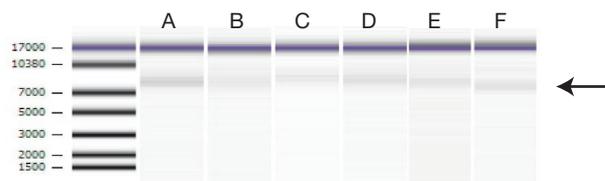
サンプル泳動量 : 30uL/lane (=3μg/lane)  
抽出条件 : Tight 8kb 抽出 (溶出回収後、40μL Tween bufferで追加洗浄回収)



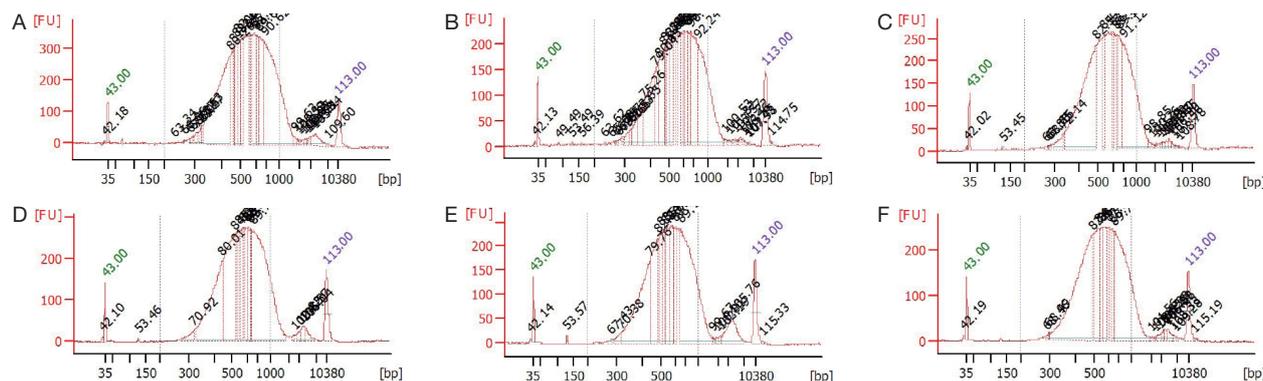
自動DNA断片ゲル抽出システムBluePippin  
長鎖DNA断片のサイズセレクションに最適なパルスフィールド電気泳動が可能です。

## 結果

Nextera Mate Pair Sample Prep Kit (イルミナ株式会社) を用いてタグメンテーションを行い、BluePippinにより8kb DNA断片を切り出し後、バイオアナライザによりサイズ確認



引き続きNextera Mate Pair Sample Prep Kitにより、環状化、断片化、ジャンクション部分の回収、TruSeqアダプター付加などを行い、ライブラリー最終産物をバイオアナライザにより確認



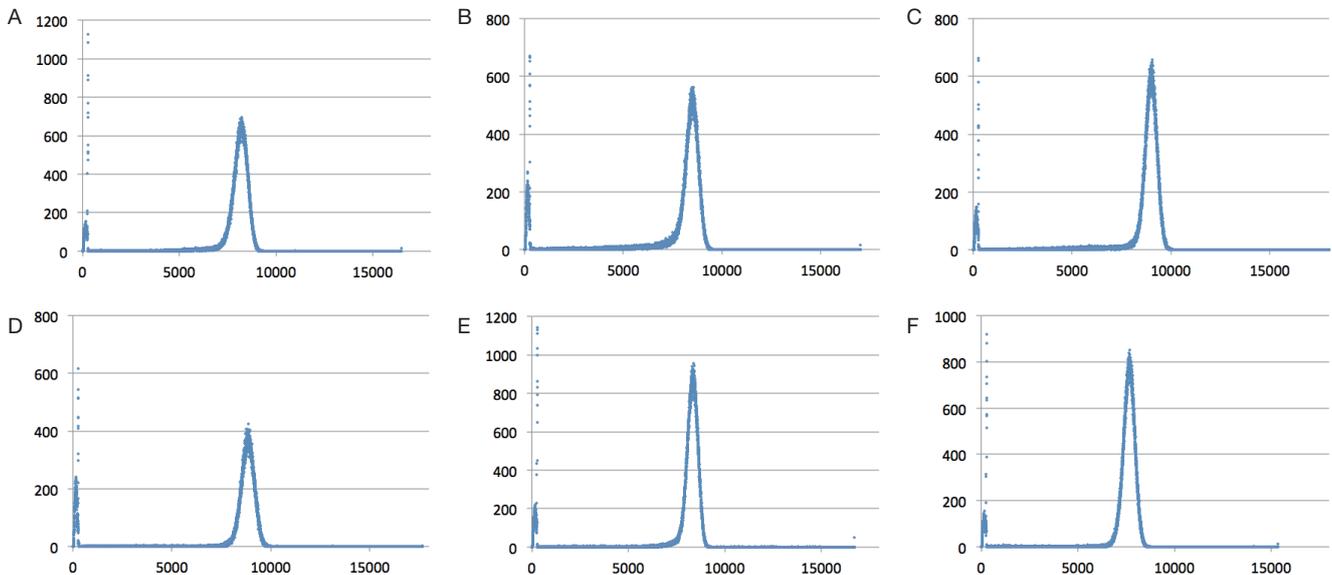
\* サンプルA~F全てで、最終的に期待どおりのサイズ分布 (300~1500bp) のライブラリーが得られた。

## 結果

## Paired-endリードのみのアセンブルと8kb Mate Pair シーケンスを加えたときのstatsの比較

Sample	Paired-end only				Paired-end + 8kb Mate Pair			
	No. of scaffolds (≥ 500 bp)	N50 (bp)	Longest (bp)	Total length (bp)	No. of scaffolds (≥ 5 kb)	N50 (bp)	Longest (bp)	Total length (bp)
A	45	120,239	310,639	2,142,184	2	1,425,894	1,425,894	2,179,544
B	86	97,027	281,891	2,152,036	5	666,271	992,168	2,208,732
C	47	125,904	339,807	2,125,667	1	2,093,081	2,093,081	2,155,836
D	73	91,994	202,911	2,202,235	9	621,239	884,953	2,231,603
E	92	116,808	340,240	2,222,598	8	575,797	1,085,503	2,278,986
F	65	151,930	231,228	2,102,029	3	1,989,566	1,989,566	2,176,244

## アセンブル後のMate Pairリードのリード間距離の分布



## お客様のコメント

Nextera Mate Pair Library のサイズセレクションでBluePippinを使用しました。  
 今まではマニュアル操作でゲル抽出を行っていましたが、作業が煩雑で手間と時間がかかり困っていました。  
 BluePippinを用いることで、実作業時間が大幅に短縮できました。  
 抽出できたDNA量は少なめでしたが、問題無く使用でき、解析でMate Pairの効果も得られ、scaffold数を大幅に減らしました。  
 今回マニュアル抽出との同時比較はしていませんが、データ解析の結果も十分なものが得られ、遜色無いと判断できました。  
 作業効率と精度を考えると、BluePippinでの自動化は効果的だと思いました。