



Application

ナノポアシーケンスライブラリ調製 (GridION/MinION) における Short Read Eliminator Kit による サイズセレクション

製品名

Short Read Eliminator Kit (Cat.No. SS-100-101-01)
(低分子DNA除去キット)

メーカー名

Circulomics

下記のデータは、慶應義塾大学先端生命科学研究所 荒川 和晴様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

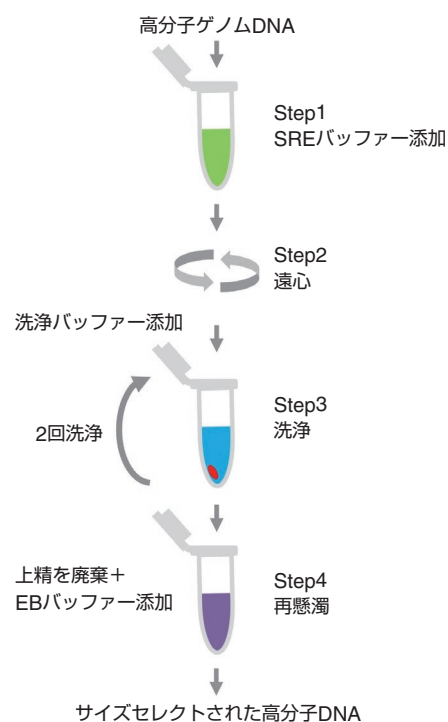
次世代シーケンスにおいては、一般的に、短いライブラリのデータが優先的に得られやすい傾向がある。このため、ライブラリ作成前に「サイズセレクション」により短いライブラリを除去し、目的サイズを分離回収することで、目的のデータをより効果的に得ることができる。Short Read Eliminator Kitは、事前の設備導入の必要なく簡便な操作で高分子DNAのみを得ることができるキットである。本アプリケーションノートでは、Short Read Eliminator Kitを用いてサイズセレクションしたサンプルでライブラリを作製し、GridION X5 (Oxford Nanopore Technologies) でシーケンスを行った結果の一例を紹介する。

実験条件と実験手順

● 生物種 カイク

- ① サンプル抽出
QIAGEN Genomic-tip 20/G (Cat.No.10223) を用いてDNAを抽出
- ② Agilent Genomic DNA ScreenTape Systemでサイズ確認
- ③ Short Read Eliminator Kitで15 kb以上のDNAサンプルをサイズセレクション
- ④ Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTapeでサイズ確認
- ⑤ PippinPulseとQubit® dsDNA BR アッセイキットによるRecovery Rateの確認
- ⑥ ライブラリ作製
1D Ligation Sequencing Kit CatNo : SQK-LSK108
* LSK108は2018年末に製品提供終了、現在はLSK109でのサポートに変更となっている。
断片化とRepairはスキップ
Library Kit Name Nanopore Kit ID
1D Ligation Sequencing Kit LSK109
1D Ligation Sequencing Kit LSK108
- ⑦ Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTapeでサイズ確認
- ⑧ GridION X5 (Oxford Nanopore Technologies) によるシーケンス解析
同一フローセルでサイズセレクション後のものを4時間ランした後にwashし、サイズセレクションしていないDNAを最後までランした

Short Read Eliminator Kitの反応ステップ

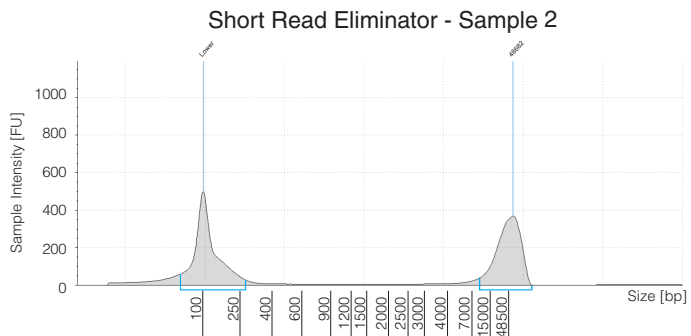
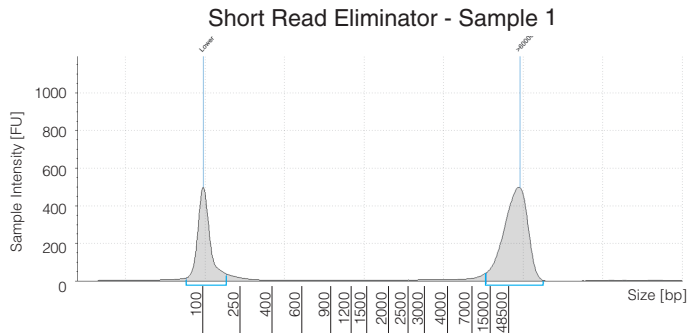
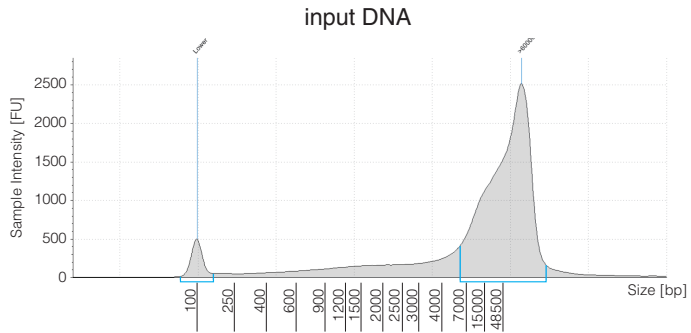
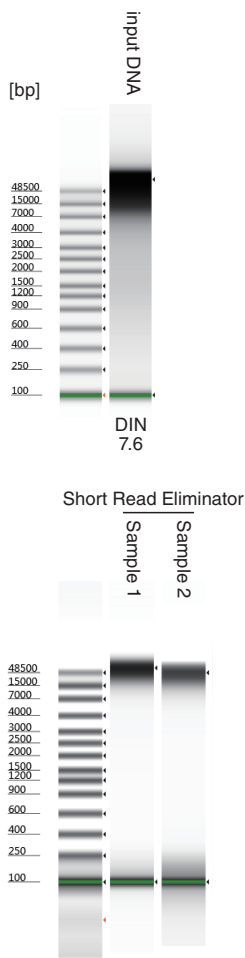


circulomics

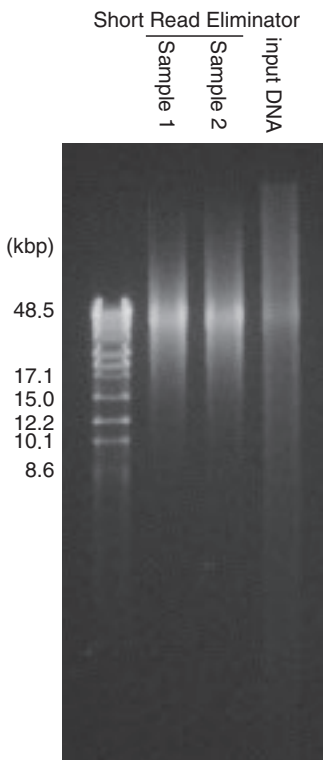


結果

● Agilent TapeStationによるサイズ確認の結果



● Pippin Pulse™によるパルスフィールド電気泳動の結果



Recovery Rate (Qubit® dsDNA BRアッセイキット)

Short Read Eliminator (5 µg start)

Sample 1: 1.05 µg (Recovery rate 21.0%)

Sample 2: 1.09 µg (Recovery rate 21.8%)

Pippin Pulse™の結果から、サイズ分布としては 15 kbp以下が Short Read Eliminator Kitによりほとんど除去できたと判断できる

Qubit® dsDNA BRアッセイキットの結果から、Recovery Rateは20%程度 (サンプルによって回収率は異なります)

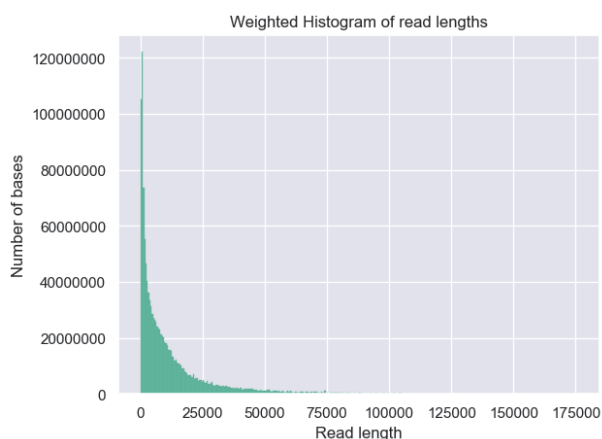


Pippin Pulse™
Electrophoresis Power Supply

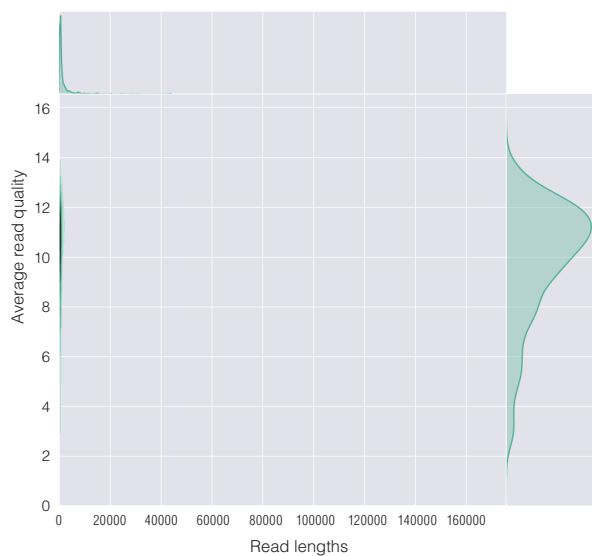
● シーケンスの結果

サイズセレクションをしていないDNAを使用

N50*	6 kbp
N90**	592 bp
Longest	175 kbp

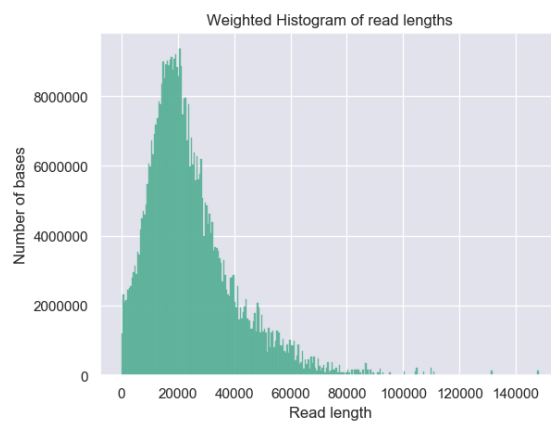


Read lengths vs Average read quality plot

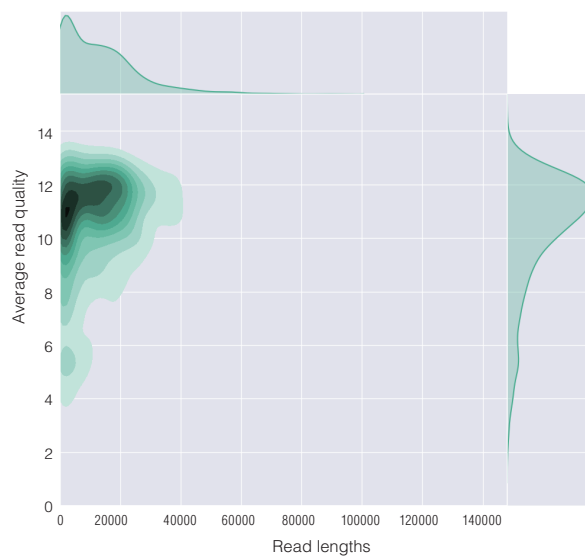


Short Read Eliminator Kitを使用

N50*	21 kbp
N90**	8 kbp
Longest	148 kbp



Read lengths vs Average read quality plot



リード長を比較したところ、サイズセレクションせずにシーケンスした場合、N50は6 kbpであったのに対し、Short Read Eliminator Kitでサイズセレクションを実施したライブラリーではN50は21 kbpに改善された。

*N50とは：配列長の加重平均。シーケンスで読めた配列を長い順から足していったときに、読めた配列の50%に達したリード長。

**N90とは：シーケンスで読めた配列を長い順から足していったときに、読めた配列の90%に達したリード長。



お客様のコメント

- Short Read Eliminatorはほぼエタノール沈殿と同等の手順で、事前の設備導入の必要なく簡便かつ効率よく高分子DNAのみを得ることができる。
- サイズ分布としては15 kbp以下をほとんど落としているように見える。
- カタログにあるように、25 kbp以下は減少が見られる（input DNAでのサイズセレクション結果で見られるなで肩部分が失われている）
- 25 kbp以上の高分子に関してはほぼ失うことなく回収できてる印象。ただし、200 kbp以上の超高分子はピペッティングや遠心のステップの関係でロスしている。（>15 kbpのセレクションをちゃんとできるためには相応にかなり長いDNAが抽出できている必要がある。）
- リードの分布を見ると多少短い断片も残ってしまっているが、簡便かつ機器などの初期投資が不要なため非常に優秀な印象。

本アプリケーションノートに使用した弊社取り扱い製品

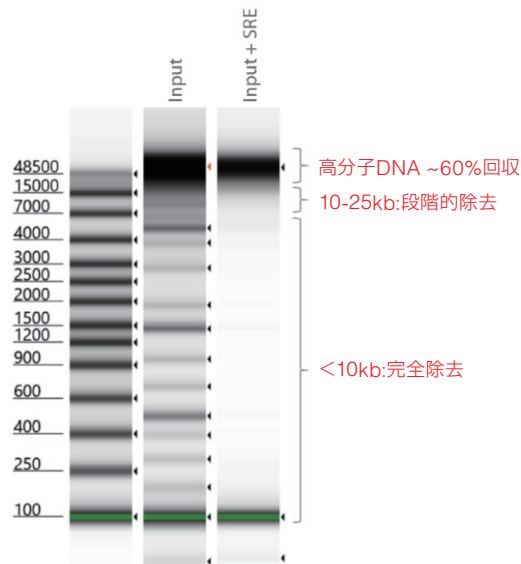
① 低分子DNA除去キット

製品名：Short Read Eliminator Kit (Cat.No. SS-100-101-01)

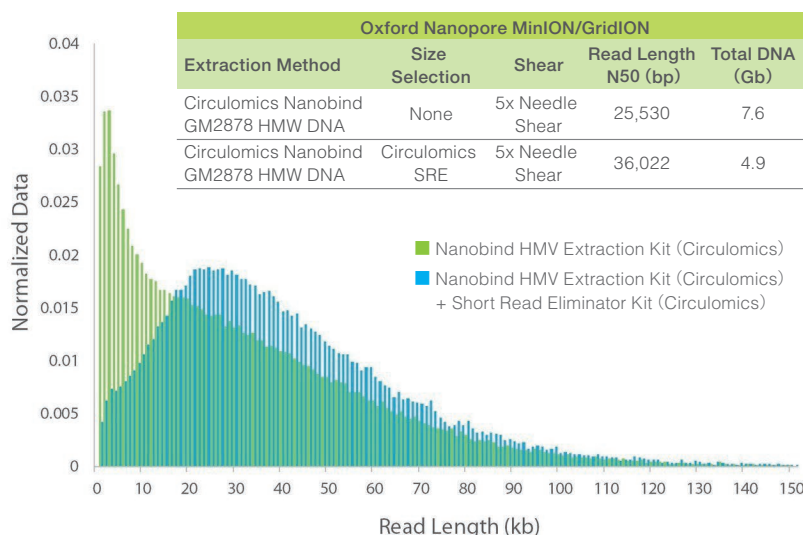
メーカー名：Circulomics

【特徴】※詳しくはWEBをご確認ください。

本製品は、サイズ選択的な沈殿法により25 kb未満のショートリードを除去することが可能なキットです。



Agilent TapeStation4200により分析した結果。Short Read Eliminator Kitを用いることで短いDNAバンドがすべて除去されました。



Oxford Nanopore MinION/GridIONで分析した結果。Short Read Eliminator Kitを用いることで25 kbp以下の短いDNAバンドが除去され、N50が25 kbpから36 kbpになりました。

② パルスフィールド電気泳動パワーサプライ

製品名：Pippin Pulse™ (Cat.No. PPI0200)

メーカー名：SageScience

【特徴】

- 準備が簡単、お手軽なパルスフィールド電気泳動が可能になりました！
- 通常の電気泳動では困難な、長いDNA断片の分離およびサイズチェックに最適です。
- 準備が簡単な通常の12×14 cmのアガロースゲルを使用し、簡便なパルスフィールド電気泳動を行えるように設計されています。
- 専用ソフトウェアには5つのプリセット・プロトコルが設定されていて、簡単な操作で泳動を行えます。
- 条件検討のために自由なプロトコル作成も可能です。
- ゲルタンクおよび接続ケーブルは別売りとなります。



Qubit®はThermo Fisher Scientific社の登録商標です。
Pippin Pulse™はSageScience社の商標です。

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved. 2019.MAY