



Application

# Ion Torrent PGM用ライブラリー調製における 正確なサイズセレクションの有用性

製品名

自動DNA断片ゲル抽出システム Pippin Prep (PIP0001)

メーカー名

Sage Science 社

このアプリケーションノートは、沖縄科学技術大学院大学 DNAシーケンシングセクション 小柳 亮様のご厚意により作成いたしました。

## 実験目的

Ion Torrent PGMのテンプレート自動調製システムOneTouchは簡便な操作でシーケンシング用ビーズの作製を可能にしているが、ライブラリーによって期待されるリード長が得られない例が散見された。この原因として、OneTouchにおいてはエマルジョンPCRの条件が固定されており、増幅効率がライブラリーのインサート長に依存することが推測されたため、ライブラリー作製の際のサイズ分画法を検討した。

## 実験条件および検証方法

- 次世代シーケンサー : Life Technologies社 Ion Torrent PGM
- ライブラリー作成キット : Ion Plus Fragment Library Kit (ゲノムDNAの断片化にはCovaris S2を使用)
- 検証方法  
ライブラリーのサイズセレクションについて、下記の方法で抽出を行った後、それぞれ得られたRead Length Histogramとスコアデータにより検証しました。



自動DNA断片ゲル抽出システムPippinPrep

### <sample 1>

L社電気泳動システム  
330bp抽出

ライブラリー作成キット 取扱説明書の推奨方法のとおり実施しました。

### <sample 2>

L社電気泳動システム  
330bp抽出

小サイズDNA断片の混入の可能性を減らすため、330bpを抽出する直前に泳動をストップして、ピペッティングにより溶出ウェルを洗浄し、低分子除去を試みまし。その後泳動を再開し、目的サイズを抽出しました。

### <sample 3>

PippinPrep  
315bp抽出

ライブラリー作成キット 取扱説明書のPippinPrepでの推奨サイズで抽出しました。

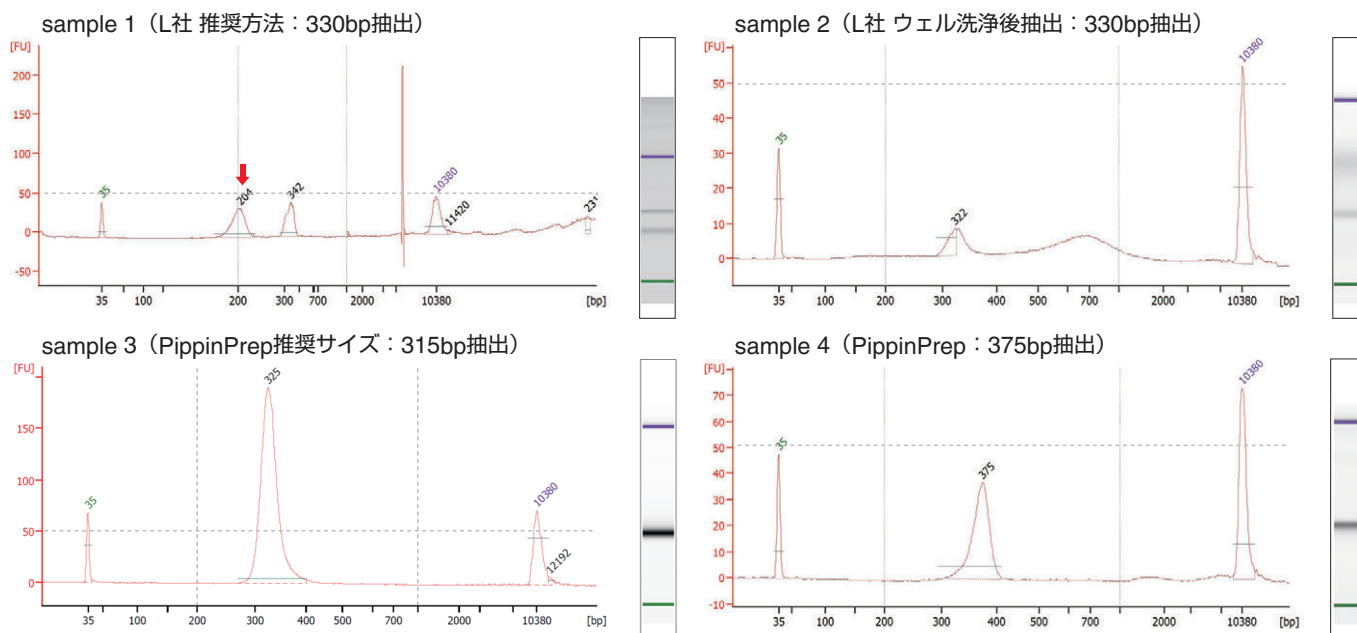
### <sample 4>

PippinPrep  
375bp抽出

PippinPrepでは、正確なサイズ設定ができるため、Sample3より大きなサイズに設定して抽出を試みました。

## 結果

### 1. 抽出後の各サンプルのサイズ分布 (Agilent Technologies社 Bioanalyzerの結果)

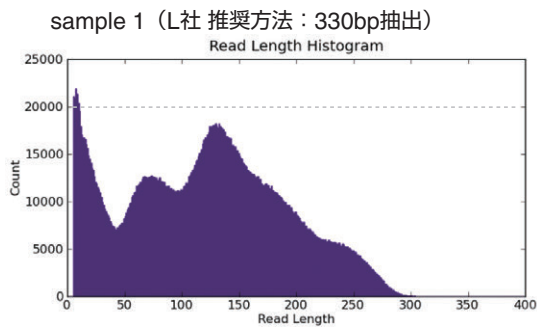


sample1では、目的サイズ以外のピーク (赤の矢印) が見られました。

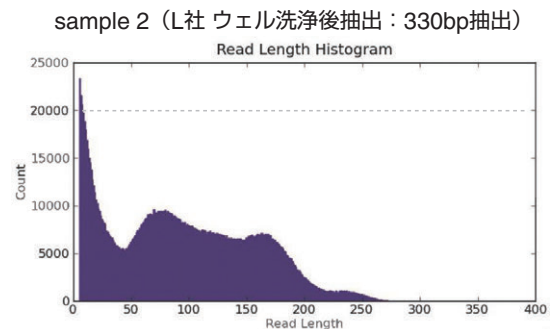
PippinPrepでサイズ分画した場合(sample3, sample4)、目的サイズのDNA断片がsample1, sample2よりも高収量で得られました。

## 結果

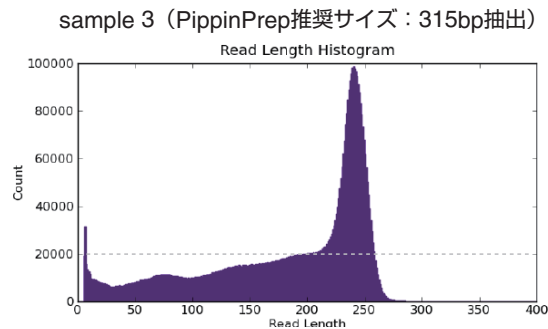
## 2. Read Length Histogramおよびスコアデータ



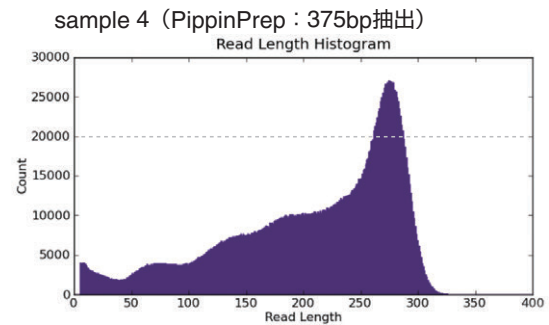
Total Number of Bases [Mbp]	348.76
・ Number of Q20 Bases [Mbp]	228.38
Total Number of Reads	2,898,964
Mean Length [bp]	120
Longest Read [bp]	374



Total Number of Bases [Mbp]	148.08
・ Number of Q20 Bases [Mbp]	100.36
Total Number of Reads	1,577,037
Mean Length [bp]	94
Longest Read [bp]	315



Total Number of Bases [Mbp]	932.52
・ Number of Q20 Bases [Mbp]	702.58
Total Number of Reads	5,302,371
Mean Length [bp]	176
Longest Read [bp]	389



Total Number of Bases [Mbp]	550.06
・ Number of Q20 Bases [Mbp]	406.80
Total Number of Reads	2,668,599
Mean Length [bp]	206
Longest Read [bp]	388

## まとめ

Life Technologies 社 Ion Torrent PGM は、適切なRead Lengthを得るためにライブラリー作製におけるサイズセレクションが重要で、特に低分子除去が必須であることが確認されました。

しかし推奨の電気泳動システムでは、低分子の混入が発生してしまいスコアデータの改善が困難でした。

そのためIon Torrent PGMに適した精度の高いサイズセレクションを行うためPippin Prepを検討したところ、非常に効果的な結果改善ができました。

さらにRead Lengthを伸ばすため、プロトコルよりも約50bp長いライブラリーをPippin Prepを用いて作製したところ、期待通りの結果を得ることができました。



## お客様のコメント

Ion Torrent PGMのシークエンステンプレート調製におけるエマルジョンPCRはライブラリーのインサート長に非常に敏感で、短い断片が混入したり、インサート長が指定より長い場合に目的のライブラリー分子が正しく増幅されず、期待通りのシークエンス結果が得られないことがあります。PippinPrepによる正確なサイズ分画はPGMの能力を十分活用するためには必須だと思います。最新の400bpシークエンスでもよい結果がでています。