



Application

BluePippinを用いた長鎖ライブラリーのサイズセレクションによるPacBioシーケンス長の改善

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、国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野 新井康仁様のご厚意により掲載させて頂きました。

方法

現在の主要な次世代シーケンサーにおいては、一般的に短いライブラリーほど優先的にデータが得られやすいため、相対的に長いライブラリーのデータは得られ難くなる。

この場合、「サイズセレクション」により、不要な短いライブラリーを除去し、目的サイズのライブラリーを分画回収することで、より効果的に目的のデータを得ることが可能となる。

今回、スミアなヒトゲノムDNAサンプルから作製したPacBio用SMRTbellライブラリーについて、自動DNA断片ゲル抽出システムBluePippinを用いて4kb以上の長鎖ライブラリーを分画回収することで、シーケンス長が改善可能か、検証した。

●ライブラリーDNA調製方法 (注:下記の通常ワークフローから一部改変)

- ①ヒトゲノムDNAを以下のWGA (全ゲノム増幅) キットで増幅
 - A) illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare)
 - B) REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen)
- ②スミアに増幅したDNA5 μ gを用いてSMRTbellライブラリーを作製
- ③0.45 \times AMPureXPで精製
- ④Qubit Fluorometer (Life Technologies) およびAgilent BioAnalyzer でDNA量とサイズの確認
- ⑤PippinPulseによるサイズ分布の確認
- ⑥BluePippinによるSMRTbellライブラリーのサイズセレクション
- ⑦1 \times AMPureXPで精製してからプライマーアニーリング&ポリメラーゼ結合
- ⑧MagBeadに結合させ、PacBio RSIIにてシーケンス解析

●シーケンサー

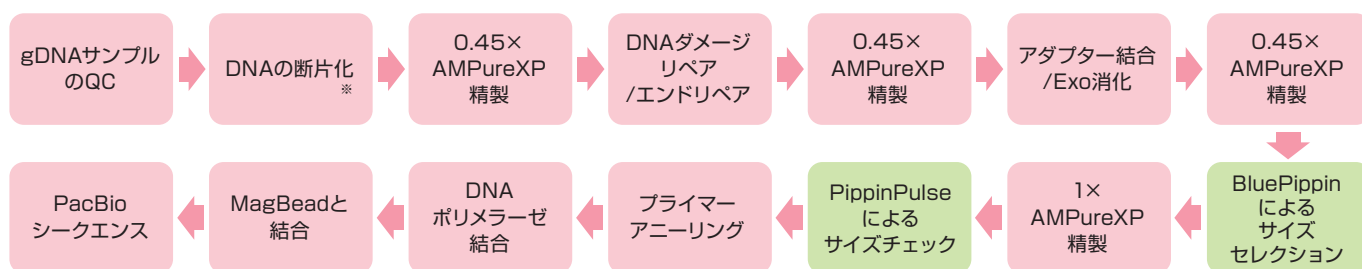
PacBio RSII
(Pacific Biosciences/トミーデジタルバイオロジー株式会社)



●BluePippinのサイズセレクション条件

ゲルカセット : 0.75%ゲルカセット Marker S1 (BLF7510)
抽出条件 : high-passモード4kb-50kbで設定 (4kb以上を分画回収)

SMRTbellライブラリー調製ワークフローへの「サイズセレクション」ステップの追加



*今回は、このステップの代わりにWGAを実施



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。



パルスフィールド電気泳動パワーサプライPippinPulse
手軽にパルスフィールド電気泳動が実施できます。長鎖DNA断片のサイズチェックに最適です。

結果

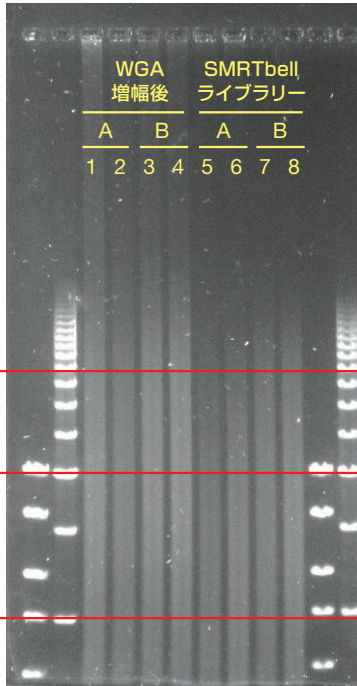


図1 PippinPulse による長鎖 DNA 断片のサイズ分布確認結果 (BluePippin 抽出前)

<サンプル詳細>	<アプライ量*>	<ピークサイズ (bp) **>
レーン1: A) WGA増幅後のDNA #1	(300.0ng/3uL)	6,458
レーン2: A) WGA増幅後のDNA #2	(300.0ng/3uL)	7,458
レーン3: B) WGA増幅後のDNA #1	(300.0ng/3uL)	6,672
レーン4: B) WGA増幅後のDNA #2	(300.0ng/3uL)	8,001
レーン5: 上記1から作製したSMRTbellライブラリー	(292.8ng/6uL)	5,098
レーン6: 上記2から作製したSMRTbellライブラリー	(313.2ng/6uL)	4,700
レーン7: 上記3から作製したSMRTbellライブラリー	(285.0ng/5uL)	5,685
レーン8: 上記4から作製したSMRTbellライブラリー	(318.0ng/5uL)	6,432

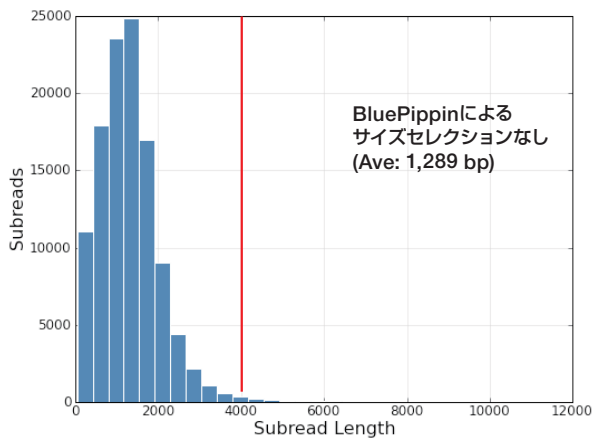
A) illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare)
 B) REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen)

* Qubit測定値による
 **BioAnalyzer測定値

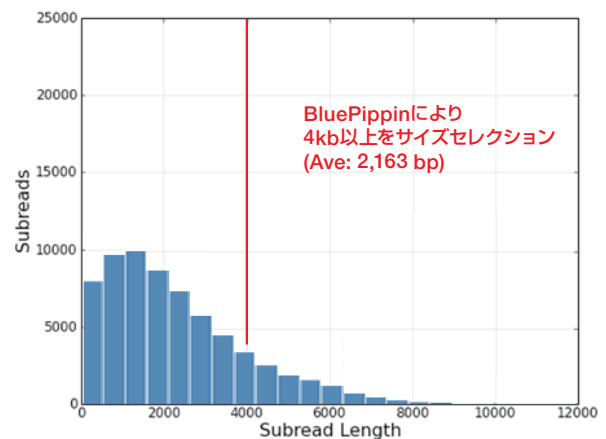
レーン5 ~ 8の4サンプルについて、BluePippinによる4kb以上の分画回収を実施した。
 (分画に供したライブラリー DNA量は1073.6ng、1200.6ng、1482.0ng、1653.6ngであった。)

* 分画回収したサンプルは、以降のステップでのロスを考慮し、全量をシーケンス解析用に用いたため、
 サイズセレクション後のサイズ確認は実施しなかった。

Mapped subread length



ゲノムDNAをg-Tubeで10kbに断片化



WGA後にg-Tubeによる断片化なし

図2 PacBio シーケンスのマッピングデータ (サブリード長分布の比較)

マップ後のサブリード長を比較したところ、BluePippin によるサイズ分画をせずにシーケンスした場合、平均サブリード長は1,289bpであったのに対し、今回 BluePippin でサイズセレクションを実施したライブラリーでは平均サブリード長 2,163bp に改善された。

また、特に 4000bp 以上のサブリードで大幅な改善が見られた。



お客様のコメント

ヒト疾患遺伝子の構造変異を詳細に調べるには、ターゲット遺伝子の全長をカバーする情報が必要である。長鎖リードが可能であるPacBioシーケンサーの特徴を生かして臨床サンプルのDNAを解析するには、高分子DNAの分画濃縮が重要なポイントになるが、BluePippinの使用によってより長鎖のDNA断片を効率的にシーケンスすることが出来た。