



Application

## BluePippinを用いた8kb長鎖DNA断片抽出の検討

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病学分野 小椋義俊様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 実験目的

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。しかし、一般的なパルスフィールド電気泳動でのゲル切り出しは、操作が煩雑でかつ熟練の技術が要求されMate Pairシーケンス解析を成功させるためのハードルとなっている。

今回、自動DNA断片ゲル抽出システムBlue Pippinで8kb 断片抽出を行い、正確性および再現性を確認する検討を行った。抽出したDNAは、サイズ確認のためPippin Pulseを用いてアガロースゲルに展開し、ゲル解析ソフトウェアにて解析した。

### 実験方法

#### ●サンプルDNA

生物種 : 大腸菌  
精製方法 : QIAGEN Genomic DNA Buffer Set & Genomic-Tip 100

#### ●ハイドロシェア断片化条件

Large shearing assembly speed setting 8, 20 cycles  
サンプルDNA量 : 15  $\mu$ g / 150  $\mu$ l

#### ●BluePippinサイズセレクション条件

サンプル泳動量 : 30  $\mu$ l / lane (=3  $\mu$ g / lane)  
抽出条件 : Tight 8kb 抽出 (溶出回収後、40  $\mu$ l Tween bufferで追加洗浄回収)  
再現性評価 : 抽出 2 lane  $\times$  2 Run

#### ●PippinPulse パルスフィールド泳動条件

パワーサプライ : SageScience社 Pippin Pulse (PPI0200), 1-30kb program 16hr  
泳動槽 : MajorScience社 Midi plus-2 (ME1571015)  
アガロース : Lonza社 SeaKem GOLD, 0.75% 100ml  
泳動バッファー : SageScience社  $\times$ 0.5 KBB buffer

#### ●染色および撮影条件

染色色素 : Invitrogen社 SYBR Safe  
撮影 : Blue LED (470nm), Amber filter, f8 - 16sec

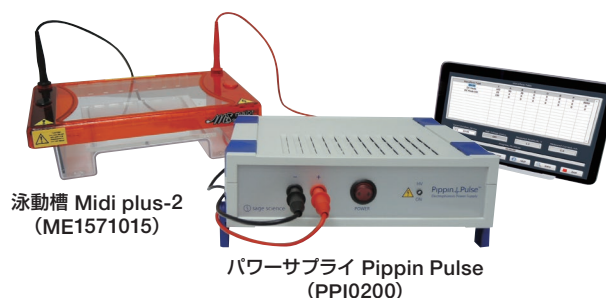
#### ●ゲル解析

ソフトウェア : Media Cybernetics社 Gel-Pro analyzer v6.3



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。



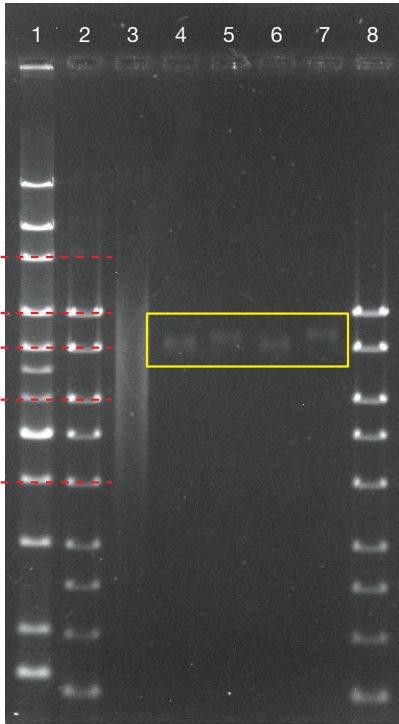
泳動槽 Midi plus-2 (ME1571015)

パワーサプライ Pippin Pulse (PPI0200)

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。

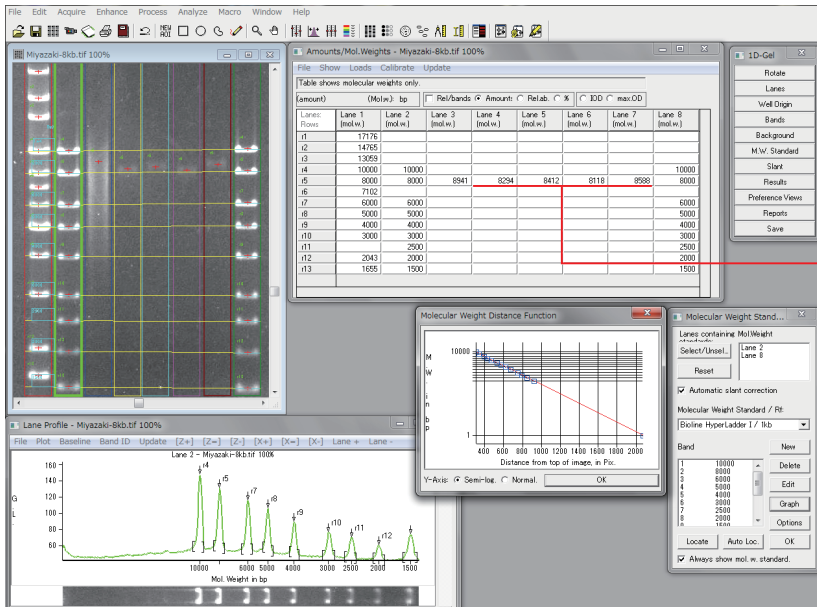
## 結果



## BluePippin 抽出後 サイズ確認

〈泳動レーン〉

- Lane 1 : High Marker (Invitrogen社 1kb DNA extension ladder, 2uL/lane)  
 Lane 2, 8 : Low Marker (Bioline社 HyperLadder 1kb, 3uL/lane)  
 Lane 3 : 抽出前 Sample (6uL/lane = BluePippin泳動1/5量)  
 Lane 4-7 : BluePippin 抽出サンプル  
 Lane 4 : Run1-1, 82uL抽出 →16.4uL泳動 (抽出1/5量/lane)  
 Lane 5 : Run1-2, 102uL抽出 →20.4uL泳動 (抽出1/5量/lane)  
 Lane 6 : Run2-1, 86uL抽出 →17.2uL泳動 (抽出1/5量/lane)  
 Lane 7 : Run2-2, 103uL抽出 →20.6uL泳動 (抽出1/5量/lane)



## ■ ゲル解析

 ソフトウェア : Media Cybernetics社  
 Gel-Pro analyzer v6.3

〈解析結果〉

- Lane 4 : 8294 bp  
 Lane 5 : 8412 bp  
 Lane 6 : 8118 bp  
 Lane 7 : 8588 bp

Lane 4-7 average : 8353bp  
 Lane 4-7 CV : 2.4%

## ■ 結果

BluePippinでの8kb Tight 抽出で、約8.3kbのバンドが回収された。(Ave.: 8353bp, CV: 2.4%) レーン間、Run バッチ間で、若干のサイズ違いが認められたが、概ね良好な結果であった。



お客様のコメント

MatePair 8kb用のDNA抽出で検討しましたが、再現性も高く良好な結果でした。  
 マニュアルでの手間を考えると、BluePippinでのゲル抽出自動化はNGSライブラリー作製でメリットがあると  
 考えます。  
 これからいろいろなサンプルで活用していきたいと思えます。