



Application

PacBio長鎖ライブラリーの(≥7kb) サイズセレクションの効果検証 (サイズ分布およびシーケンス結果の比較)

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س
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

前回、サイズ分画をせずにシーケンスした場合の平均サブリード長は1,289bpであったのに対し、BluePippinで≥4kbサイズセレクション(High-passモード4kb-50kb)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。(Application Note 2013 (21) 参照)

今回、BluePippinで更に長い≥7kbサイズセレクション(High-passモード7kb-50kb)を実施し、BluePippinサイズセレクション後の回収量を確認した。

また、サイズセレクション前後のライブラリーのサイズ分布を比較し、PacBioにおけるシーケンス長の改善効果を検証した。

● サンプルおよびライブラリー調製

ヒトゲノムDNAより20 kb SMRTbell™ライブラリー用プロトコルのとおりライブラリー調製を行い、x0.45 AMPureXPにて精製した。

● ゲノムDNA断片化

g-Tube (Covaris社) *Eppendorf-5415R遠心機を使用したため5400rpmにて実施

● BluePippinサイズセレクション条件

サンプル泳動量 : 6,210ng/30μL 1レーン
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7kb-50kbで設定 (7kb以上を分画回収)

● PippinPulse パルスフィールド電気泳動条件

パワーサプライ : SageScience社 Pippin Pulse (PPI0200) , 2-50kb 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 ×0.5 KBB buffer

● BluePippinサイズセレクション後の回収量の測定

Qubit® 2.0 Fluorometer (ライフテクノロジーズ社)

● 検証項目

- (1) BluePippinサイズセレクション後の回収量の確認
- (2) BluePippinサイズセレクション前後のサイズ分布の比較 (分画精度の確認)
- (3) シーケンス長の改善効果

〈ワークフロー〉

ゲノムDNA抽出



g-Tubeによる断片化



20 kb SMRTbell™ライブラリー調製



BluePippinを使って分画、≥7 kb を回収



精製後、シーケンス



● 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)



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

BluePippinによる $\geq 7\text{kb}$ サイズセレクション結果

検証1: BluePippinサイズセレクション後の回収量

BluePippinサンプル泳動量	: 6,210ng/30 μL	分画前
回収溶液量	: 61 μL (うち1 μL をQubit測定に使用)	
Qubit測定濃度	: 44ng/ μL	
トータル回収量	: 2,684ng/61 μL	分画後

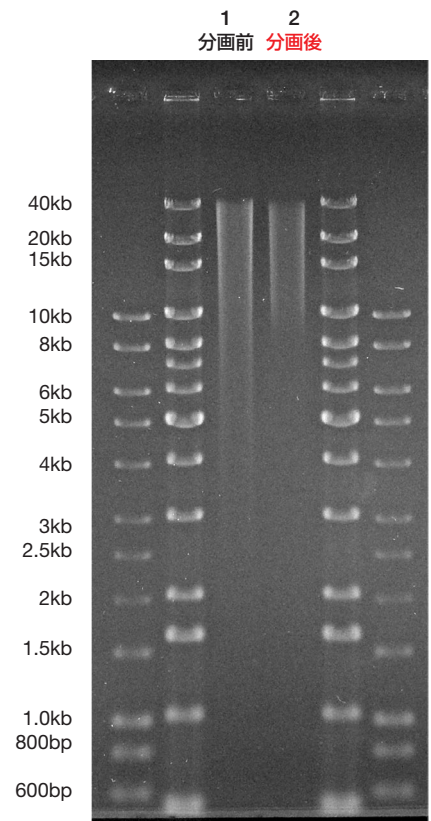
BluePippinの1レーンあたり6,210ngをアプライし、HighPassモード7kb以上で分画した長鎖ライブラリーとして2,684ngの回収量を得ることが出来た。

検証2: BluePippinサイズセレクション前後のサイズ分布の比較 (分画精度の確認)

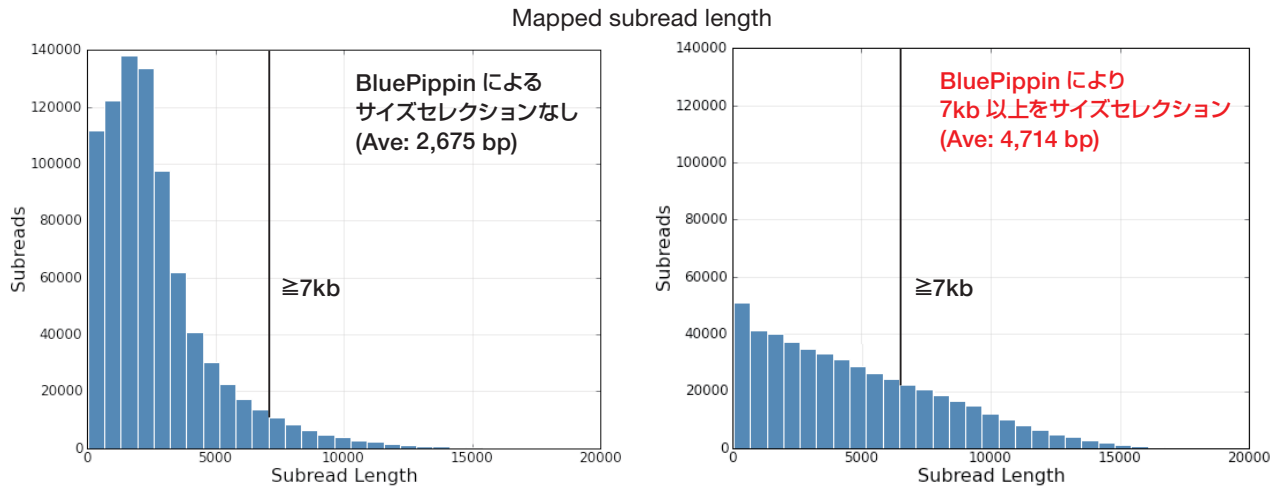
〈PippinPulse パルスフィールド電気泳動 (右図)〉

レーン1	BluePippin分画前	: 約300ng / 5 μL
レーン2	BluePippin分画後	: 220.0ng / 5 μL

PippinPulse パルスフィールド電気泳動結果 (右図) のとおり、BluePippinでのサイズセレクションにより、長いライブラリーが回収され、短いライブラリーが効果的に除去できていることが確認された。



PacBio シークエンスのマッピングデータ (サブリード長分布の比較)



(解析: 国立がん研究センター 濱様)

検証3: シークエンス長の改善効果

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クエンスした場合、平均サブリード長は2,675 bpであったのに対し、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4,714 bp に改善された。



お客様のコメント

PacBioによるlong read性能を活かしてゲノムシークエンスを行うには、長鎖DNAを濃縮したライブラリーを作製することがキーとなる。
BluePippinでの正確な分画により、ヒト組織でのシークエンス長を大きく改善することが出来た。