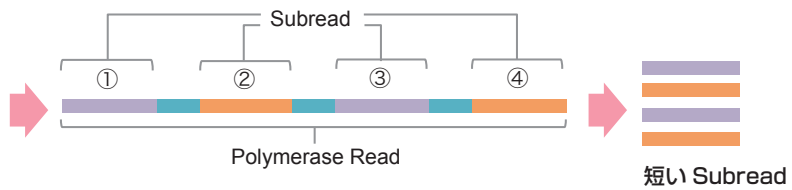
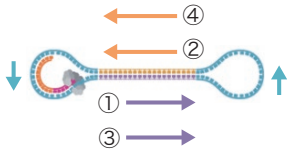
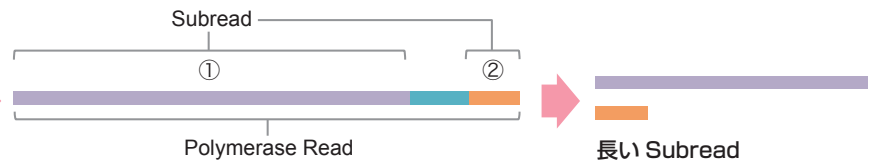
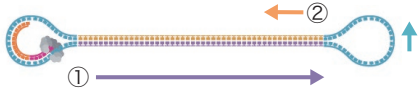


結果
BluePippin によるサイズセレクションについて
短いライブラリ

長いライブラリ


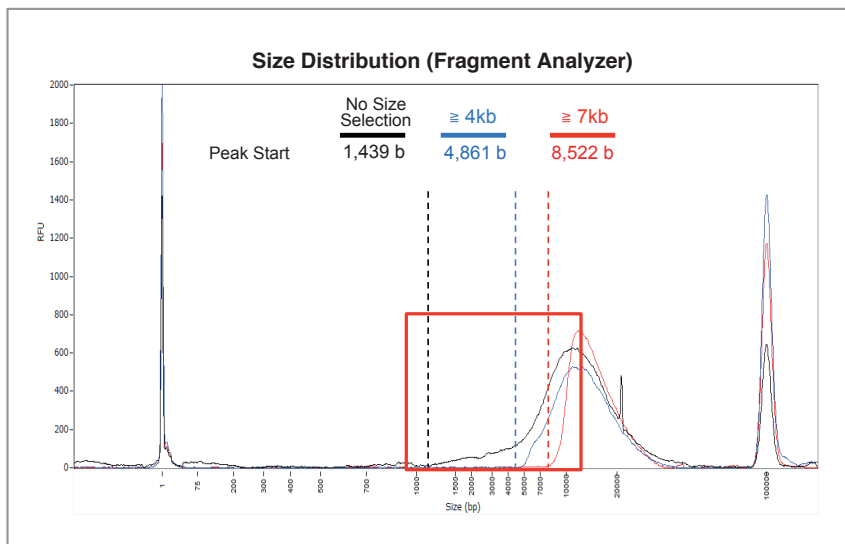
- 短いライブラリ：折り返し読まれることになり、ポリマーゼリード自体は長いリードが得られるが、サブリードとしては短くなる。
- 長いライブラリ：折り返し読まれるものの割合は減少し、ポリマーゼリード自体のトータル長さは短いライブラリと変わらないが、サブリードとしては長くなる。

※Circular Consensus Sequencing (CCS) リードを得るために、敢えて 2kb 程度の短いライブラリを調製する場合もある。

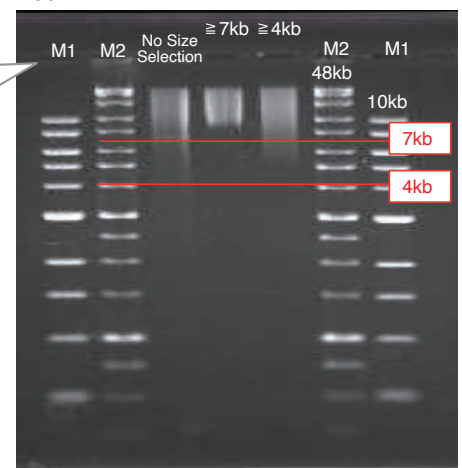
短いライブラリを除き、長いライブラリの割合を増やすことが重要



BluePippin
(自動 DNA 断片ゲル抽出装置)

<サイズセレクション結果>

フラグメントアナライザーによるサイズ比較

「No Size Selection」では短いライブラリのサイズ分布が見られる。
 「 ≥ 4 kb」では短いライブラリを除去できていることが確認できる。
 「 ≥ 7 kb」ではさらに短いライブラリを除去できている。

PippinPulse


Condition : 0.5 x TBE Buffer、0.75% Agarose S、15hr
 M1 : Quick load 1 kb ladder
 M2 : M29 ladder

電気泳動結果

「No Size Selection」および「 ≥ 4 kb」では、「 ≥ 7 kb」と比較して短いライブラリのサイズ分布が見られる。
 「 ≥ 7 kb」では短いライブラリが除去できている。

●まとめ

BluePippin によるサイズセレクションにより短いライブラリが除去できる

結果

BluePippin によるサイズセレクションの効果

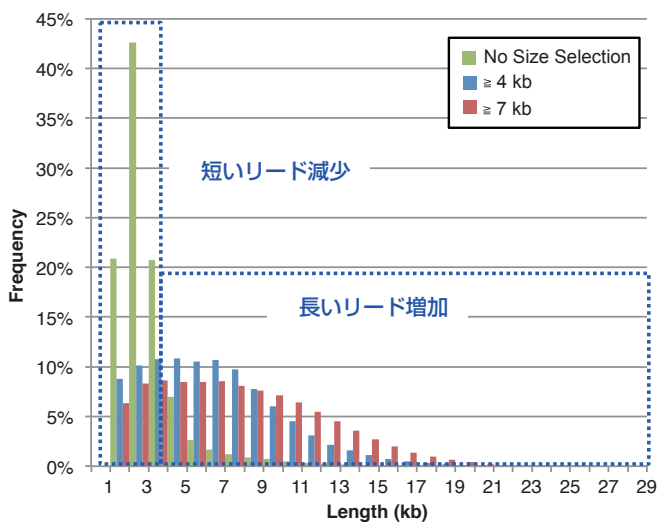
バクテリアA ゲノムDNA

- ゲノムサイズ : 2Mb (GC70%)
- 20kb Library / 180min / 4 cell / P5-C3

●P5-C3によるシーケンスのSubreads

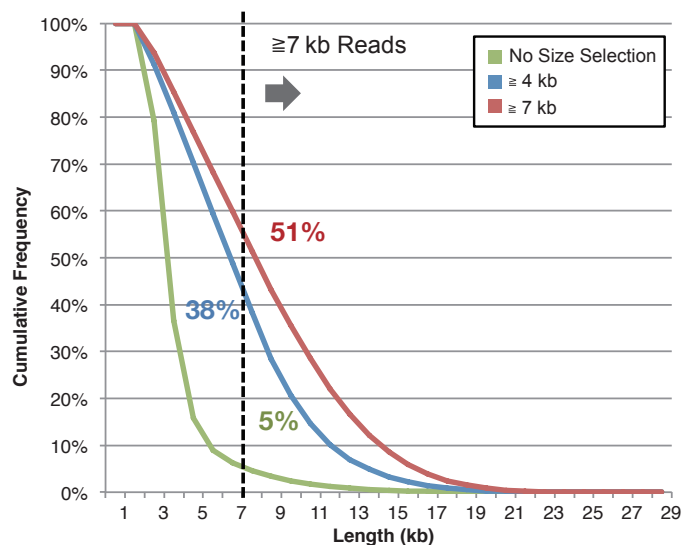
平均長が「No Size Selection」と比べて、「 $\geq 4\text{kb}$ 」では2.6倍、「 $\geq 7\text{kb}$ 」では3.3倍に伸長した。

Subreads	No Size Selection	$\geq 4\text{kb}$	$\geq 7\text{kb}$
# cells	4	4	4
# Reads	283,133	72,605	60,510
Total Bases (b)	988,682,713	386,942,346	403,633,307
Max Length (b)	25,888	28,574	27,851
Mean Length (b)	2,060	5,329 (2.6倍)	6,671 (3.3倍)
All Bases (b) / 10,000reads	34,919,374	53,294,173 (1.5倍)	66,705,223 (1.9倍)
Coverage / 10,000reads	17	25	32



●リードの割合

「No Size Selection」(緑)の短いリードに対し、サイズセレクションすることで減少した。これに伴い、サイズセレクションした「 $\geq 4\text{kb}$ 」「 $\geq 7\text{kb}$ 」(赤、青)では、長いリードが増加した。



●リードの割合の積み上げ式グラフ

$\geq 7\text{kb}$ のリードの割合は、「No Size Selection」では5%、「 $\geq 4\text{kb}$ 」では38%、「 $\geq 7\text{kb}$ 」では51%であった。

●まとめ

- サイズセレクションによって長いリードの割合が増加し、平均リード長が伸長した。
- サイズセレクションしたことで、セルあたりのデータ量が1.5倍以上増加した。

BluePippinによるサイズセレクションによって短いライブラリが除去でき、平均リード長 (Subread) がサイズセレクションなしと比べて、 $\geq 4\text{kb}$ では2.6倍、 $\geq 7\text{kb}$ では3.3倍に伸長した。

また、 $\geq 7\text{kb}$ のリードの割合は、サイズセレクションなしでは5%、 $\geq 4\text{kb}$ では38%、 $\geq 7\text{kb}$ では51%となり、長いリードの割合が増加した。

さらにセルあたりのデータ量は、サイズセレクションなしと比べて、 $\geq 4\text{kb}$ では1.5倍、 $\geq 7\text{kb}$ では1.9倍に増加した。これらの結果から、PacBio RS IIの最新標準プロトコールとなっているBluePippinによるサイズセレクションは長いリードを得るために必須であり、実際に非常に効果的であった。



お客様のコメント