



Application

SageELF™によるNextera Mate Pair 多様サイズライブラリーの作製

製品名

自動DNA断片ゲル抽出システムSageELF™ (ELF0001)

メーカー名

Sage Science 社

下記のデータは、自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生物機能解析センター山口 勝司様のご厚意により掲載させて頂きました。

方法

illumina社 Nextera Mate Pair Sample Prep kitにおいて、Size selectionの部分にSageELF™による分画（2ページ下段参照）を利用することで、より長く連続的でtightなサイズのmate pair libraryの調製を試みた。

目的生物種のゲノムと解析controlとしてゲノム配列既知なアラビドプシス（シロイヌナズナ）ゲノムをNextera断片化処理し、それらを9：1に混合したサンプルをSageELF™でサイズ分画した後、通常のプロトコールに従い完成Libraryとした。

Tagmentation -> Nextera断片化処理においてDNA量/Tagment Enzyme比を2段階に分け、幅広いサイズ断片に対応できるようにした。

<Sample>

目的生物のゲノムDNA

ControlとしてアラビドプシスゲノムDNA

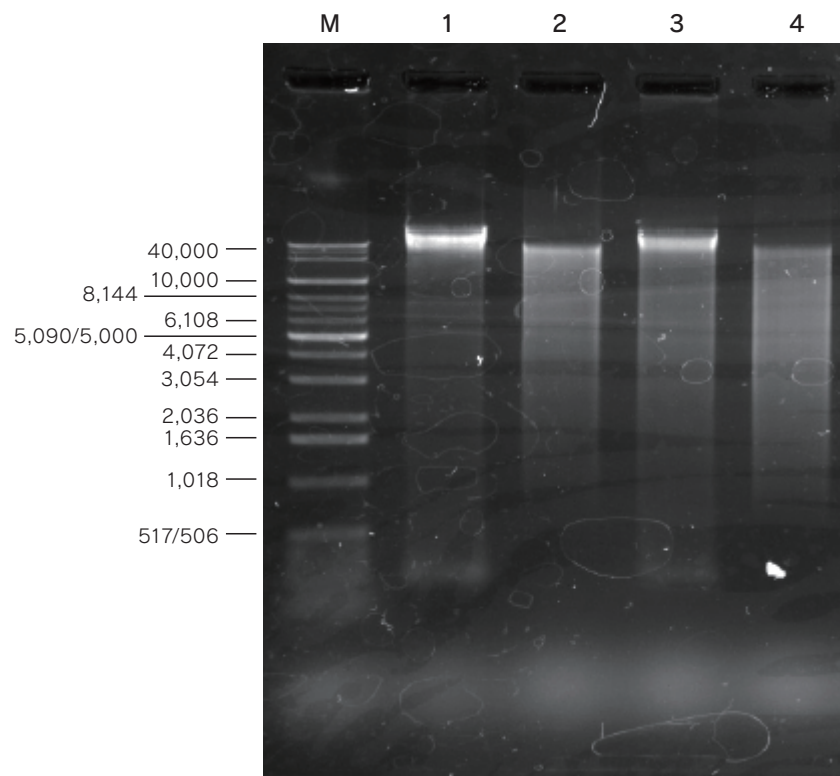
<Tagmentation>

2μg DNAを2反応分用意し、DNA量/Tagment Enzyme比を変えてtagmentし混合した。

DNA	2μg	2μg
Water	variable	variable
Tagment Buf.	40μl	40μl
Tagment Enzyme	6μl	3μl
Total	200μl	200μl

55℃ 30min. 反応後、1本にまとめた。

Zymo Genomic DNA Clean&Concentratorで精製、濃縮。溶出バッファー RSB 30μlに溶出。



M. 1kb DNA Extension ladder
(invitrogen 10511-012)

- 1. 目的生物種 単離ゲノムDNA
- 2. 目的生物種 Nextera tagmentation
- 3. アラビドプシス 単離ゲノムDNA
- 4. アラビドプシス Nextera tagmentation

各レーン100ngを泳動

<SageELF™>

使用したゲルカセット : 0.75%ゲル

分画条件 : Well No.1を18000bpで設定、他のWellは下記 "target size" のとおりプログラムが自動で割り当てた

分画したサンプル : Qubit 91.8ng/μl (2.754μg)

SageELF™ 分画結果

Well No.	target size (bp)	Elution Conc. (ng/μl)	Elution Vol. (μl)	yield (ng)
1	18000	2.06	30	61.8
2	15169	1.83	30	54.9
3	14479	3.06	30	91.8
4	12346	3.68	30	110.4
5	10348	3.4	30	102
6	8483	3.24	30	97.2
7	6878	4.64	30	139.2
8	5452	5.52	30	165.6
9	5136	6.02	30	180.6
10	4136	7.44	30	223.2
11	3247	7.86	30	235.8
12	2535	4.56	30	136.8

SageELF™ 回収率 (総回収 DNA/ 総泳動 DNA)

1.5993÷2.754=59.1%

1.5993μg

<Circularization>

1レーン毎に進めるには、DNAの量が足りない (kitは150ng-600ngを推奨) ので、

2レーンをまとめ (1+2, 3+4, 5+6, 7+8, 9+10, 11+12)、計6サンプルとして進めた。

以降の操作はNextera Mate Pair Sample Prep kitのプロトコールに従った。

SageELF™ 自動DNA断片ゲル抽出システム

DNA Fractionation for Next Gen Sequencing



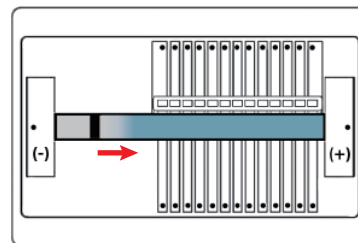
1つのサンプルから12種類の異なるサイズを分離・回収



特長

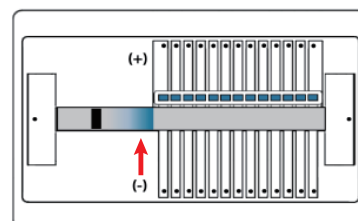
- 1サンプルから12フラクションに連続分画できます。
- 2つのゲル濃度で100bp~18kbで対応できます。
- 1回のRunで2カセット同時抽出が可能です。
- 再現性の高い自動抽出が可能です。

① DNAを分離



アガロースゲルカラム内でDNAを分離

② 目的の断片を回収

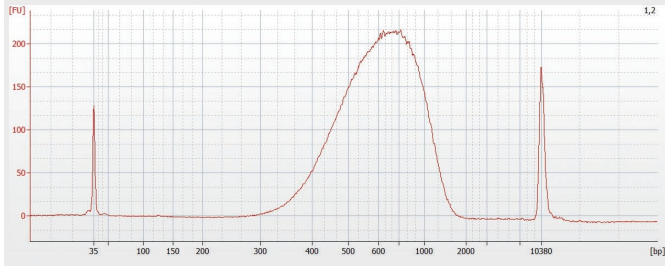


メンブレンで仕切られた12列のウェルにDNA断片を電氣的に溶出します。溶出されたDNA断片はピペティングで回収します。

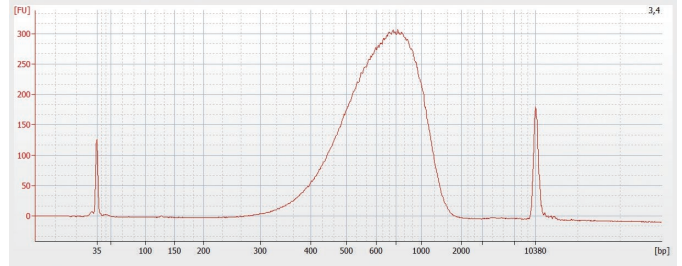
<Validate Library>

Agilent Technologies , Bioanalyzer2100 (High Sensitivity DNA kit) によるQC 結果を以下に示す。

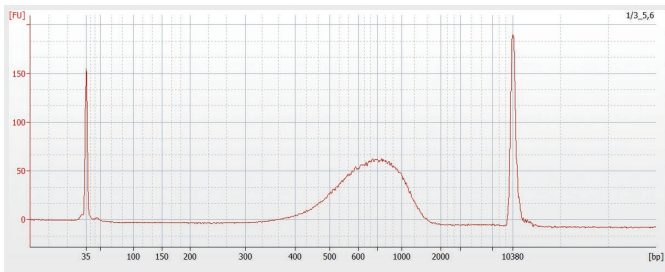
1+2 (PCR 15 cycle)



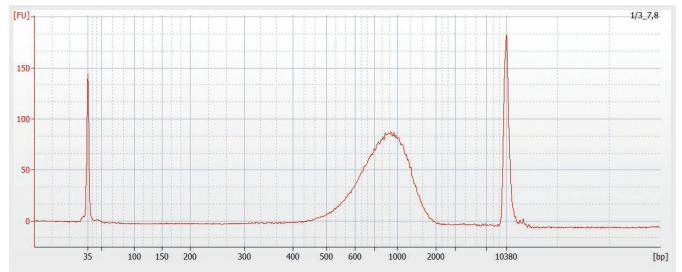
3+4 (PCR 15 cycle)



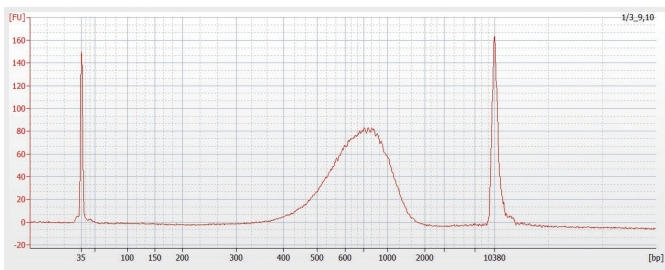
5+6 (PCR 12 cycle)



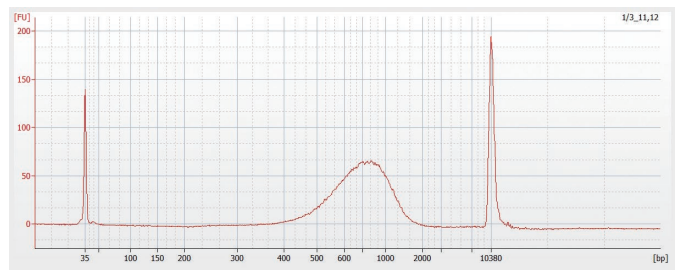
7+8 (PCR 12 cycle)



9+10 (PCR 12 cycle)



11+12 (PCR 12 cycle)



q-PCRによる定量 : Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
KAPA Library Quantification Kits

	ライブラリ濃度(nM)
1+2	8.51
3+4	11.79
5+6	3.56
7+8	2.44
9+10	4.03
11+12	3.05

12-15 cycleのPCRで十分量 (2nM以上) のシーケンスライブラリーが得られた。

結果

<Sequencing>

6ライブラリーを等量に混合し、1本鎖DNA調製した12pMのライブラリー DNAを既定量MiSeqへのシーケンスに用いた。MiSeq Reagent kit v3 (600cycle) を用い、301base 両端シーケンスした。

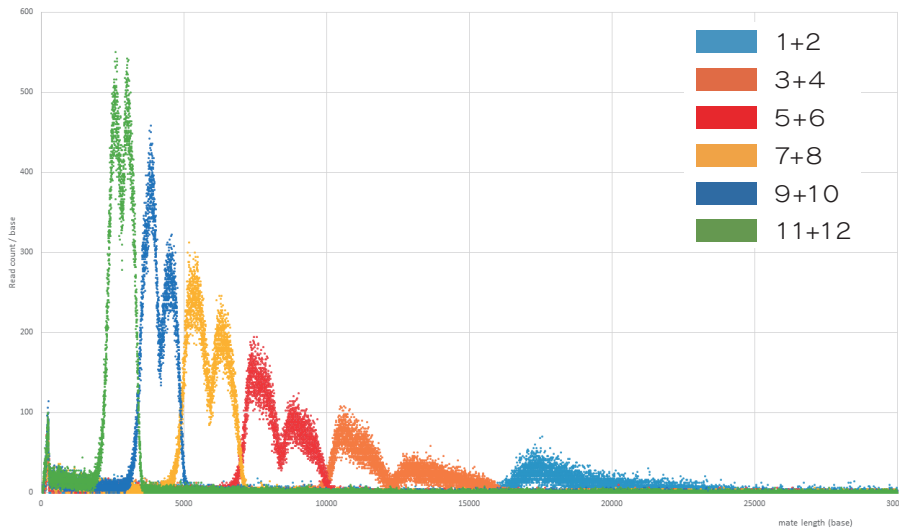
mate-pair長分布ヒストグラム

<解析の流れ 方法1>

Cutadapt によるadapter 配列の除去

Bowtie2 によるmapping

SAMToolsによるmate pair lengthの取得 (SAMファイル9列目) と、そのlength分布の集計



SageELF™ 分画条件

Well No.	target size (bp)
1	18000
2	15169
3	14479
4	12346
5	10348
6	8483
7	6878
8	5452
9	5136
10	4136
11	3247
12	2535

<解析の流れ 方法2>

NextclipによるIn mate pair orientation ratioおよびPCR duplicate ratioの解析

Nextclipはmate pair library作製の環状化時に用いたjunction adapterの有無を評価し、

正しくMate Pair orientationになっている割合をカウントするツールである。

Junction adapterがないものはmate-pairでなく、paired end方向のものが混入している場合が時折見られる。

今回のライブラリーでのjunctionアダプター配列の有無とIn Mate Pair orientation ratioは以下の通りとなった。

	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
junctionアダプター配列が確認できたread	97.4%	96.5%	96.5%	92.4%	96.1%	95.4%
うち In Mate Pair orientation ratio	97.9%	99.1%	99.4%	99.6%	99.7%	99.8%
junctionアダプター配列が確認できないread	2.6%	3.5%	3.5%	7.6%	3.9%	4.6%
うち In Mate Pair orientation ratio	91.7%	92.7%	94.3%	96.6%	95.3%	95.4%
PCR duplicate(%)	23.7%	3.8%	2.2%	1.7%	1.5%	1.3%



お客様のコメント

Short readシーケンサーのリードからゲノムアセンブルを行う場合、様々なサイズのmate-pair libraryの構築は良好なアセンブル結果を得るために非常に重要である。

SageELF™での分画を用いたmate-pair libraryは2k-20k程度の範囲で、各サイズごとシャープなサイズ分布のライブラリーを得ることができ、シーケンスの結果も極めて高い率でIn Mate Pair orientationの配列を得ることができていた。

分画の細かさによりサイズ境界の回収率が低下する点が見られたが、ライブラリー作製サイズを調整することで、より良いmate pairライブラリーが再現良く作製できることが期待できる。