



Application

自動DNA断片ゲル抽出装置SageELF™の実用例 (2) “Nextera Mate Pair用ライブラリ作製への適用”

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、沖縄科学技術大学院大学 (OIST) DNAシーケンシングセクション 神田 美幸様のご厚意により掲載させて頂きました。本アプリケーションノートは、第4回NGS現場の会のスポンサーセッションの発表内容を元に編集しました。

背景

新規ゲノム配列決定に用いられる Mate pair ライブラリは、3kb・8kb・15kb などの異なるインサートサイズのライブラリを作製することが多く、サイズセレクションは必須である。

しかしながら一般的なゲル切り出し抽出は操作が煩雑であるのに加え、ゲルを切り出す工程が手作業であるため、再現性の高い実験を行うにはある程度の慣れが必要である。

一方 SageELF™は一度の操作で複数の異なるサイズフラクションを自動的に抽出することができる。

今回これを用いたサイズ分画を含むライブラリ作製・シーケンスを行い、得られたデータが新規ゲノム配列決定のアセンブルに用いることができるかどうか確認した。

Nextera Mate Pairライブラリ作製

実験方法

● サンプルDNA

生物種：造礁サンゴ4種

精製方法：細胞をゲルに包埋した後に抽出

● ライブラリ作製キット

Nextera Mate Pair Sample Prep Kit (illumina Cat.No.FC-132-1001)

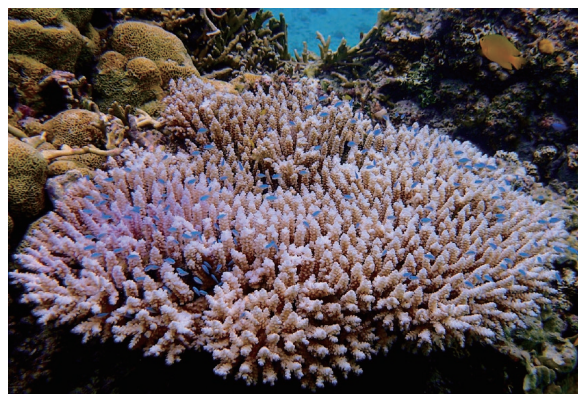
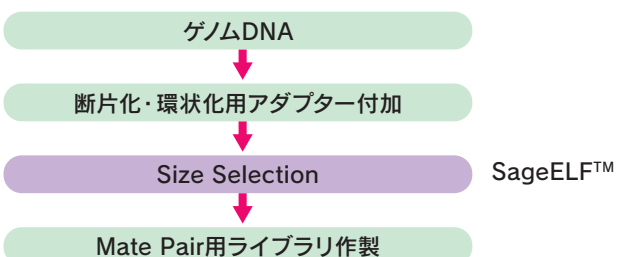
● SageELF™サイズセレクション条件

Sample C, D : 40μL/lane (Sample 30μL + Loading solution* 10μL = 40μL)

ゲルカセット : 0.75% Agarose DNA ELF cassette with marker

*日本ジェネティクス補足：サイズモードをご使用の際には、Loading solution ではなく、DNA maker75 を使用することを推奨しております。

〈ワークフロー〉



沖縄科学技術大学院大学 (OIST) DNA シーケンシングセクションでは、多種多様なサンプルを取り扱っています。上の写真は、多種多様なサンプルの中でも、海洋生物の中の1つであるサンゴの写真です。

[メイトペア概要図]

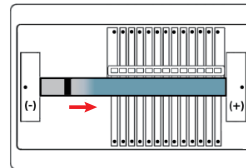
ゲノムDNA
↓
断片化 (2-10kb)
環状化用アダプター付加 (ビオチン標識)



[SageELF™ の特徴] 1 サンプルから様々な既知の長さの DNA を回収することが重要

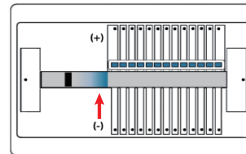


① DNAを分離



アガロースゲルカセット内で DNA を分離

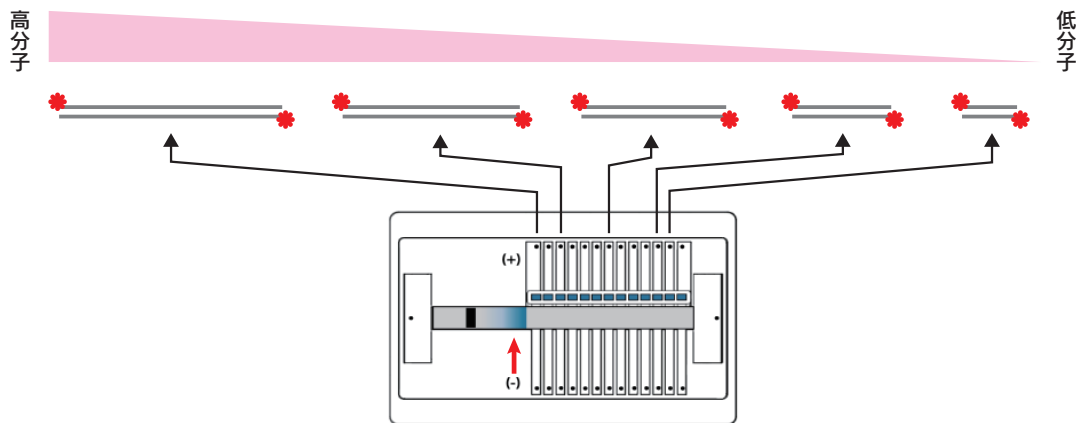
② 目的の断片を回収



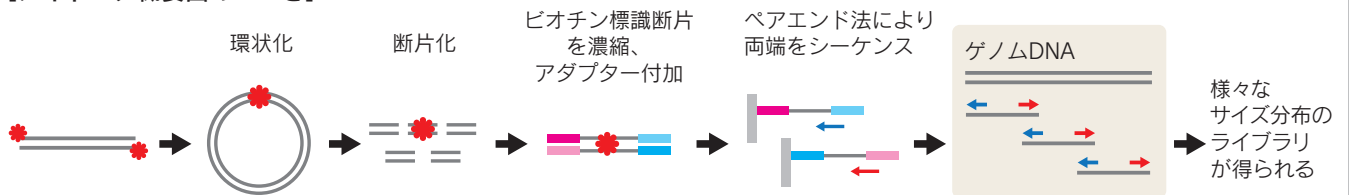
メンブレンで仕切られた 12列のウェルに DNA断片を電氣的に溶出します。溶出された DNA断片はピペティングで回収します。



[SageELF™ によるサイズセレクション]



[メイトペア概要図のつづき]



結果

SageELF™ によるサイズセレクション結果

SageELF™ のソフトウェアで Well No.1 が入力できる値で最大になるように設定*し、サイズセレクションを実施した。

*日本ジェネティクス補足：Sage Science 社公式情報では最大値は 18000bp となっているためソフトウェアバージョンにより修正変更される場合もございます。

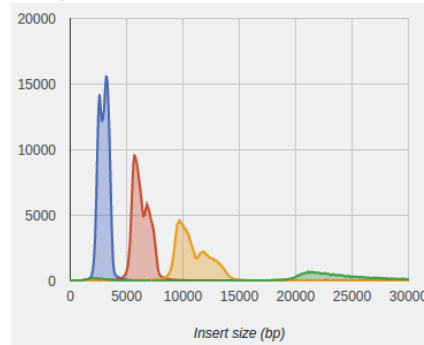
Sample C, Sample D

Well No.	target size [bp]
Fraction #01	18870
Fraction #02	16059
Fraction #03	15891
Fraction #04	13656
Fraction #05	11575
Fraction #06	9543
Fraction #07	7779
Fraction #08	6058
Fraction #09	5893
Fraction #10	4771
Fraction #11	3794
Fraction #12	2975
Total	18870

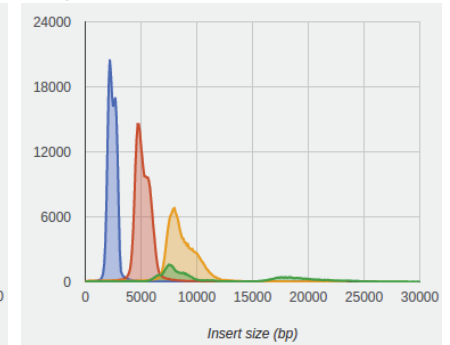
← 最大値を設定

(Sequencing)

Sample C

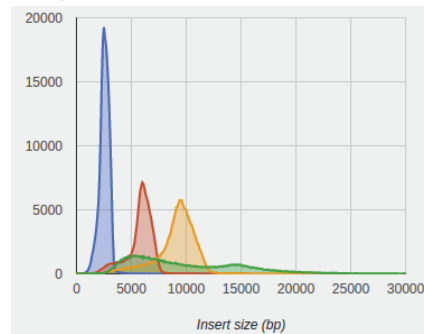


Sample D

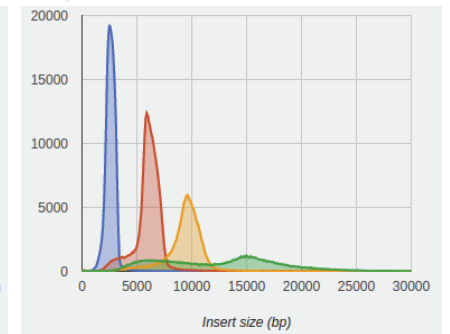


SageELF™

Sample E



Sample F



ゲル抽出
(マニュアル)

SageELF™ では大幅に作業時間を短縮できたにもかかわらず、ゲル抽出と比べても遜色ないデータが得られた。

SageELF™ の方では一度分画したフラクションをまとめたため、まとめた後のフラクションにも複数のピークが含まれるが、解析に使用する上で問題になることはなかった。

もしそれが問題になる場合であれば一度分画したフラクションをまとめなければ良いと思われる。

下流の解析に進むのに十分なアセンブル結果が得られた。



お客様のコメント

SageELF™ は通常のゲル切り出し抽出に比べ大きく手間が省けるうえ、実験者の個人差が出ない点が良いと思います。

回収できるサイズが広範囲でかつ回収率が高く、サンプルを無駄にすること無く下流の実験へ進むことができます。

Illumina社Nextera Mate Pair Library kitでのライブラリ作製においては、タグメンテーションしたサンプルから複数のサイズ抽出が可能になります。SageELF™での分画後、精製なしで次の反応に進める点(*)も時間短縮に貢献しています。

*日本ジェネティクス補足：Illumina社Nextera Mate Pair Library kitではPippin Prepが推奨されており、分画したサンプルを直接次のステップで使用しています。