



Application

MinIONライブラリ調製におけるBluePippinを用いたサイズセレクション

製品名

自動DNA断片ゲル抽出システム BluePippin (Cat.No. BLU0001)

メーカー名

Sage Science社

以下のデータにつきましては、慶應義塾大学 先端生命科学研究所 荒川 和晴 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

一般的に、次世代シーケンスにおいては、現在のところ、短いライブラリのデータが優先的に得られやすい傾向がある。この場合、「サイズセレクション」により目的サイズを分離回収したサンプルを使用してライブラリを作製することが、より効果的に目的のデータを得るための解決策となる。本アプリケーションノートでは、BluePippinを用いてサイズセレクションを行ったサンプルを用いて作製したライブラリを、MinION (Oxford Nanopore Technologies) でシーケンスを行った結果の一例を紹介する。

実験条件と実験手順

● 生物種

アメリカジョロウグモ (*Nephila clavipes*) の成体の脚一本

① サンプルDNA抽出

Qiagen Genomic-tip 20/Gを用いてDNAを抽出
(インプロパノール沈殿後、最終ElutionはBuffer EB (Qiagen) で100 μ L)

② Agilent TapeStation Genomic ScreenTapeでサイズ確認

Invitrogen™ Qubit™ システムでDNA量の確認

③ BluePippinで10kb以上のDNAサンプルをサイズセレクション

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 0.75% DF Marker S1 High-Pass 6-10kb vs3
Input DNA量：10 μ g/well (30 μ L)

④ Agilent TapeStation Genomic ScreenTapeでサイズ確認

Invitrogen™ Qubit™ システムでDNA量の確認

⑤ ライブラリ作製

ライブラリ作製キット：ONT Ligation Sequencing Kit 1D (SQK-LSK108)
Input DNA量：1 μ g (45 μ L)

*ライブラリ作製時のポイント (プロトコル変更点) *

- fragmentation / repairはスキップして、End prepから
- EndPrepのインキュベート、プロトコルの20 $^{\circ}$ C 5分、65 $^{\circ}$ C 5分から、 \rightarrow 20 $^{\circ}$ C 15分、65 $^{\circ}$ C 5分に変更
- Adapter Ligationの、室温10分のインキュベートを、室温30分に変更
- Adapter LigationのAMPure XP (Beckman-Coulter) の量を、40 μ Lから45 μ Lに変更

⑥ Agilent TapeStation Genomic ScreenTapeでサイズ確認

⑦ MinION (Oxford Nanopore Technologies) によるシーケンス解析

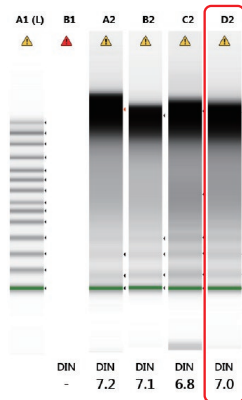


Cat.No. BLU0001



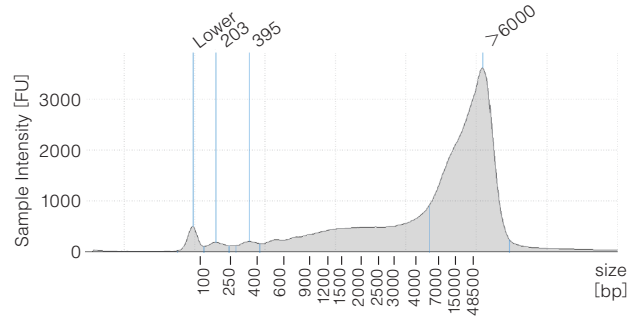
結果

② Agilent TapeStation Genomic ScreenTapeによるサイズ確認 (BluePippin前)

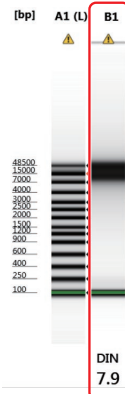


←BluePippin前

Well	DIN	Conc. [ng/μl]
D2	7	349

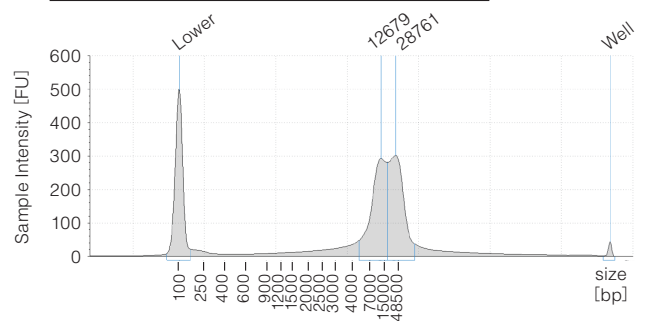


② Agilent TapeStation Genomic ScreenTapeによるサイズ確認 (BluePippin後)

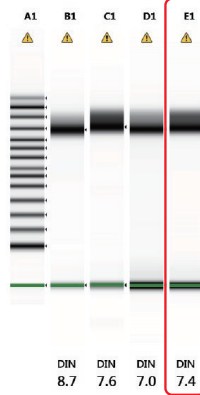


←BluePippin後

Well	DIN	Conc. [ng/μl]
B1	7.9	26.9

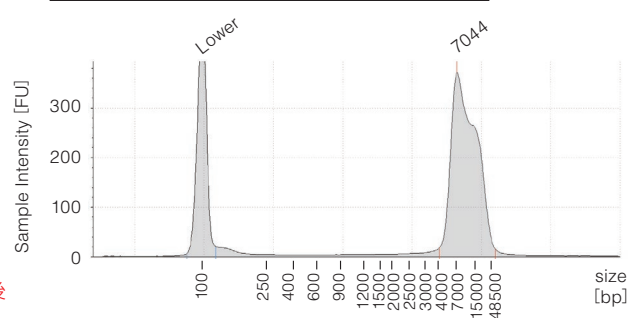


⑥ Agilent TapeStation Genomic ScreenTapeによるサイズ確認 (ライブラリ作製後)

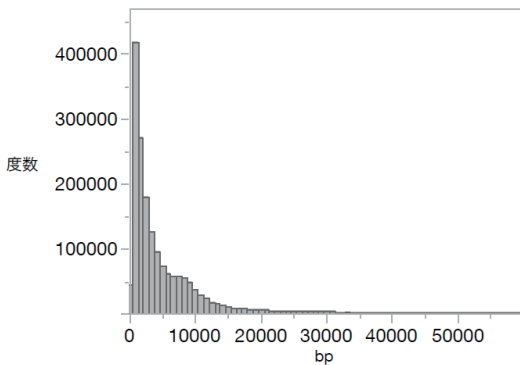


←ライブラリ作製後

Well	DIN	Conc. [ng/μl]
E1	7.4	19.4



⑥ シーケンスの結果



Read number	1,670,827
Total read length	7,655,872,327
Average read length	4,582
Longest read	566,198
Shortest read length	5
N50	8,489 (#268112)
N90	2,034 (#956151)

MinION用ライブラリにはDNA末端のポアへの運搬を補助するtetherがついた状態で作成されるため、ライブラリ作成後のサイズセレクションが叶わない(電気泳動でtetherが外れてしまう)。そのためサイズセレクションはライブラリ作成前に行う必要がある。一方、ライブラリ作成時のピペティングや、複数回行うAMPure XP精製の乾燥ステップでDNAは多少断片化されてしまうため、サイズセレクションを行なったとしてもシーケンスデータでは短いDNAも読まれてしまうが、サイズセレクションを行わないとこれよりも短いリードの割合が増える。



お客様のコメント

BluePippinを用いたサイズセレクションにより、短いリードを取り除くことができ、サイズセレクションしていないサンプル (no data) と比較して、長鎖DNA断片を効率的にシーケンスすることができた。