



Application

自動DNA断片ゲル抽出装置SageELF™の実用例 (1) “PacBio Iso-Seq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)
エルフ

メーカー名

セージ サイエンス
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 山崎 慎一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

PacBio RS II は、他のシーケンサに比べて長いリードを得られるという特徴があり、その平均リード長は一般的な mRNA の長さを超えている。これまで mRNA の配列決定は、断片化後にシーケンスし、アセンブルにより断片化前の配列に復元を試みる手法が一般的であったが、PacBio RS II のロングリードを生かすことで、断片化していない mRNA 全長を 1 リードで読み取り、アセンブルすることなく配列を決定する Iso-Seq という手法が用いられるようになった。

しかしながら PacBio RS II は、より短いライブラリを優先的にシーケンスしてしまうという特徴も有しているために、効率良くデータを得るには事前のサイズ分画が必要となる。

今回、一度の操作で複数の異なるサイズフラクションを得ることができる SageELF™ を用いて Iso-Seq ライブラリのサイズ分画を行い、その回収率や得られるシーケンスデータの確認を行った。

PacBio Iso-Seq用ライブラリ作製

実験方法

● サンプルRNA

生物種：A

RNA精製方法：組織検体をポリトロン (KINEMATICA社製) で破碎後、Trizol (Thermo Fisher 100mL Cat.No.15596026) でRNA抽出

● ライブラリ作製キット

- ・ SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (TAKARA Clontech Cat.No.634928)
- ・ KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase (KAPA Cat.No.KK2502)
- ・ SMRTbell テンプレートプレップキット 1.0 (Pacific Biosciences Cat.No.100-259-100)

● SageELF™ サイズセレクション条件

<1回目>

Sample A, B : 40 μL/lane (Sample 30 μL + DNA marker75 10 μL = 40 μL ; 5 μg/lane)

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

<2回目>

Sample A, B : 40 μL/lane (Sample 30 μL + Loading solution* 10 μL = 40 μL ; 1.9 μg/lane)

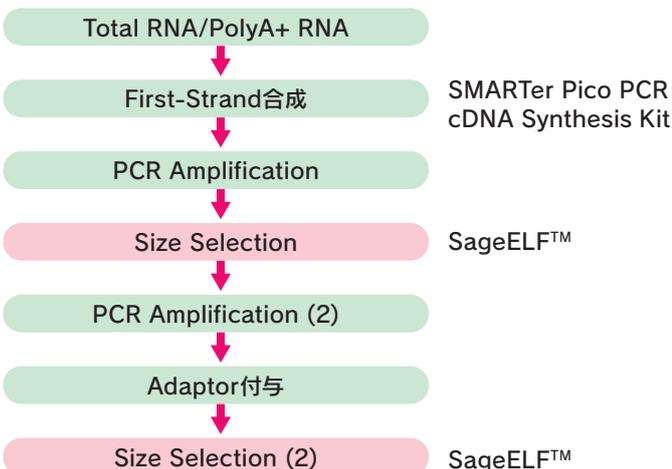
ゲルカセット : 0.75% Agarose DNA ELF cassette with marker

*日本ジェネティクス補足：2016年2月現在、Iso-Seq プロトコルが修正され、Loading solution ではなく、DNA maker75 を使用することを推奨しております。

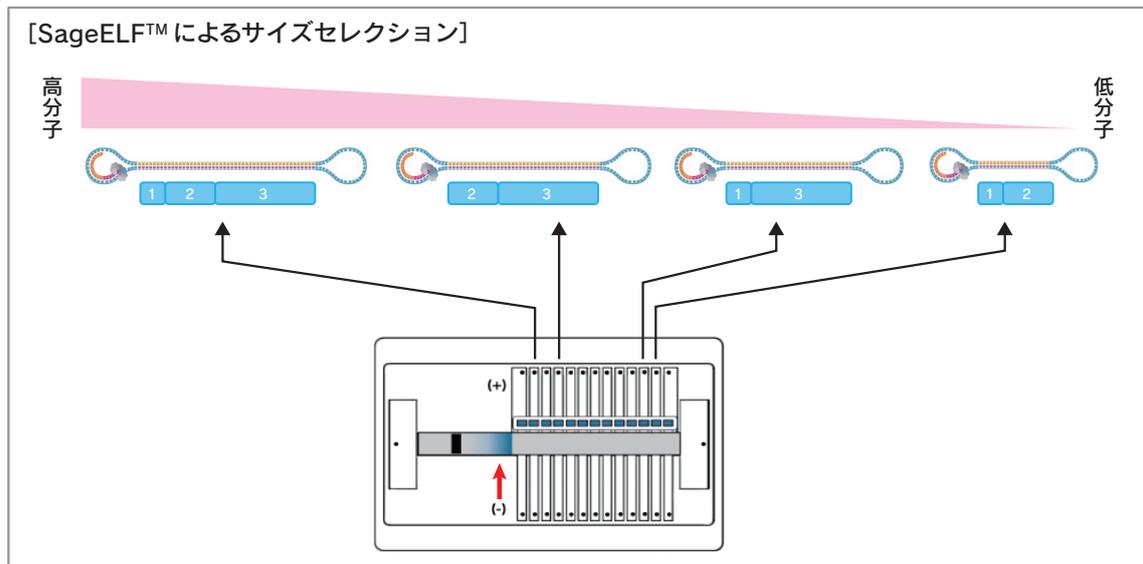
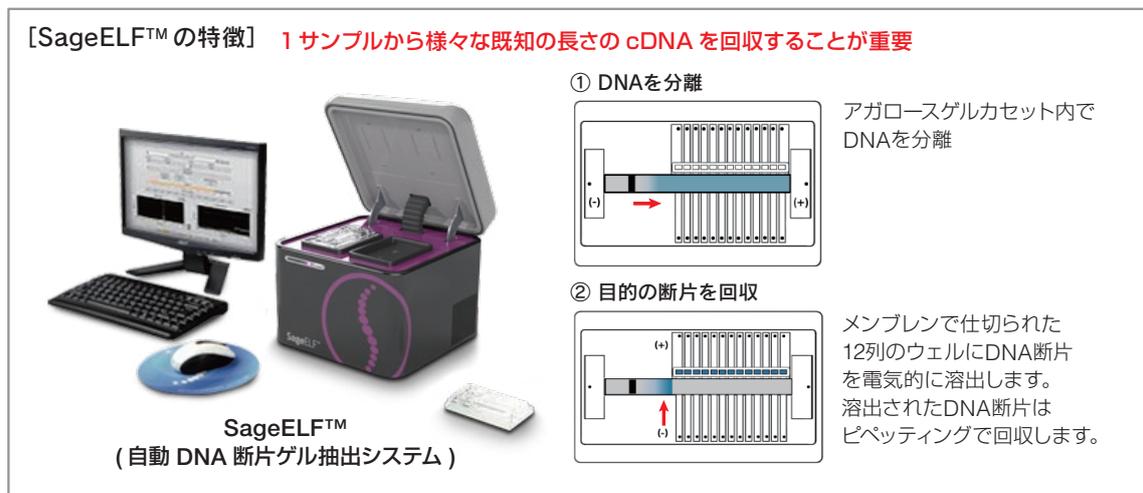
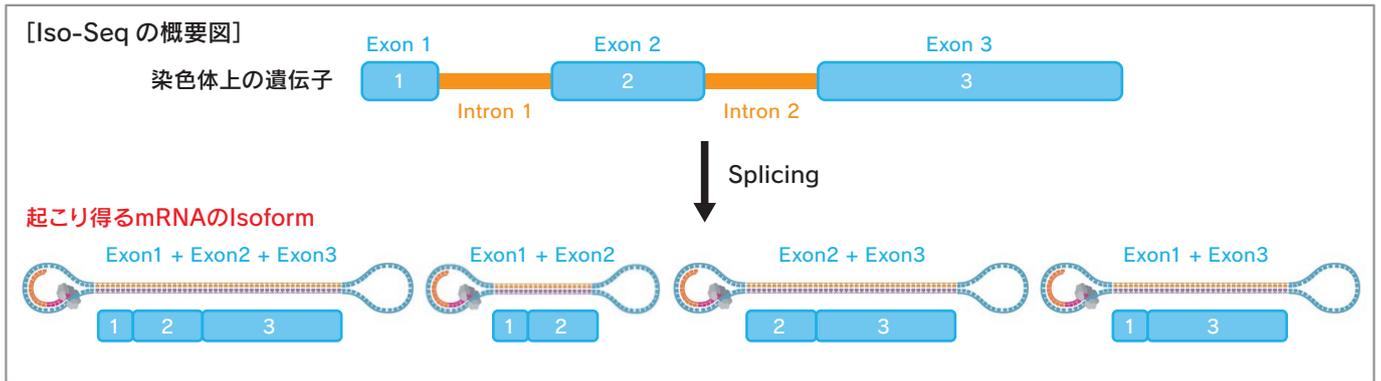


PacBio RS II
(Pacific Biosciences/
トミーデジタルバイオロジー株式会社)

<ワークフロー>



SageELF™



[PacBio RS II によるシーケンス]

- SageELF™ によるサイズセレクションにより、サイズ別にデータが得られるため、効率良くデータを得ることが可能

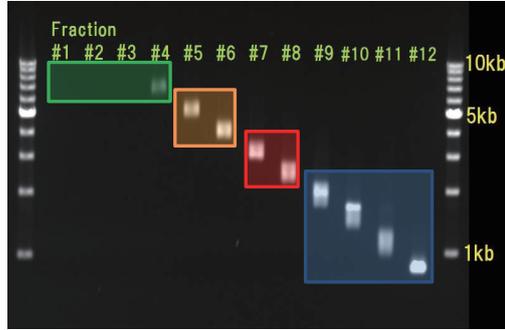
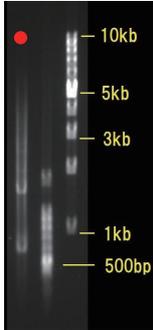
結果

SageELF™によるサイズセレクション結果 (1回目)

SageELF™の Well No.10 が 1500bp になるように設定し、サイズセレクションを実施した。

Sample Bの泳動結果

5ug/Lane



Pool ① : #9 - #12

Pool ② : #7 - #8

Pool ③ : #5 - #6

Pool ④ : #1 - #4

Sample A

Well No.	target size [bp]	yield [ng]	Recovery rate [%]
Fraction #01	13420bp	0	0.00%
Fraction #02	10485bp	0	0.00%
Fraction #03	8293bp	7	0.13%
Fraction #04	6615bp	51	1.03%
Fraction #05	5145bp	181	3.62%
Fraction #06	4021bp	331	6.62%
Fraction #07	3111bp	785	15.70%
Fraction #08	2676bp	1008	20.16%
Fraction #09	2001bp	1056	21.12%
Fraction #10	1497bp	770	15.39%
Fraction #11	1048bp	652	13.04%
Fraction #12	743bp	342	6.85%
Total		5183	103.66%

1500bp → に設定

Sample B

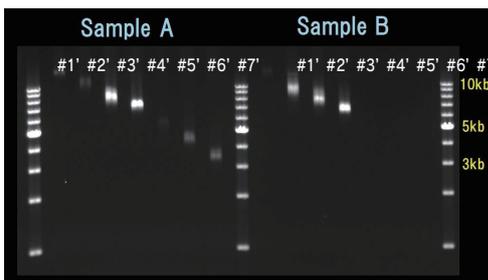
Well No.	target size [bp]	yield [ng]	Recovery rate [%]
Fraction #01	13420bp	0	0.00%
Fraction #02	10485bp	0	0.00%
Fraction #03	8293bp	27	0.54%
Fraction #04	6615bp	119	2.38%
Fraction #05	5145bp	243	4.86%
Fraction #06	4021bp	422	8.45%
Fraction #07	3111bp	530	10.61%
Fraction #08	2676bp	665	13.30%
Fraction #09	2001bp	725	14.50%
Fraction #10	1497bp	824	16.48%
Fraction #11	1048bp	495	9.90%
Fraction #12	743bp	1152	23.04%
Total		5203	104.06%

←1500bp に設定

③
②
①
Bioanalyzer
および
sequencing
に使用したサ
ンプル (詳細
は次ページ)

SageELF™によるサイズセレクション結果 (2回目)

Pool ④ (#1 - #4) を使用して SageELF™の Well No.10 が 1500bp になるように設定し、2 回目のサイズセレクションを実施した。
1.9ug/Lane



Pool ②' : #7' - #8'

Pool ③' : #5' - #6'

Pool ④' : #1' - #4'

Sample A

Well No.	target size [bp]	yield [ng]	Recovery rate [%]
Fraction #01'	13420bp	4	0.20%
Fraction #02'	10485bp	53	2.83%
Fraction #03'	8293bp	564	29.90%
Fraction #04'	6615bp	584	30.95%
Fraction #05'	5145bp	54	2.86%
Fraction #06'	4021bp	64	3.40%
Fraction #07'	3111bp	75	3.98%
Fraction #08'	2676bp	48	2.53%
Fraction #09'	2001bp	20	1.08%
Fraction #10'	1497bp	19	0.99%
Fraction #11'	1048bp	14	0.75%
Fraction #12'	743bp	10	0.51%
Total		1509	79.98%

1500bp → に設定

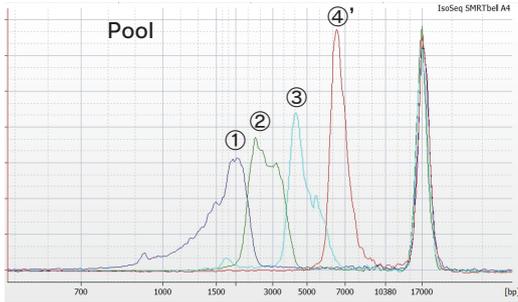
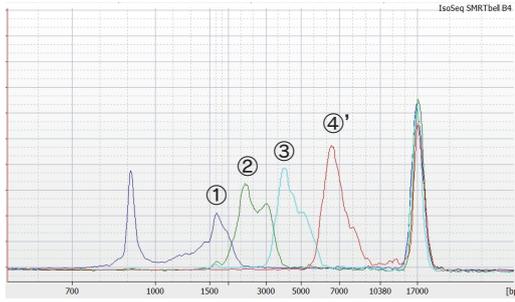
Sample B

Well No.	target size [bp]	yield [ng]	Recovery rate [%]
Fraction #01'	13420bp	38	1.96%
Fraction #02'	10485bp	147	7.62%
Fraction #03'	8293bp	268	13.91%
Fraction #04'	6615bp	154	7.97%
Fraction #05'	5145bp	11	0.59%
Fraction #06'	4021bp	3	0.17%
Fraction #07'	3111bp	0	0.00%
Fraction #08'	2676bp	0	0.00%
Fraction #09'	2001bp	0	0.00%
Fraction #10'	1497bp	0	0.00%
Fraction #11'	1048bp	0	0.00%
Fraction #12'	743bp	0	0.00%
Total		621	32.23%

←1500bp に設定

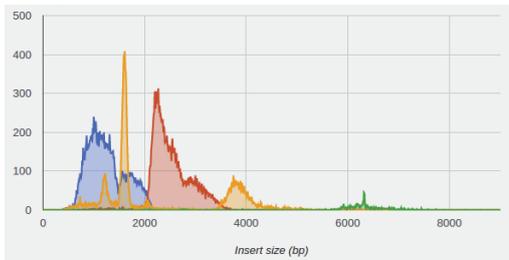
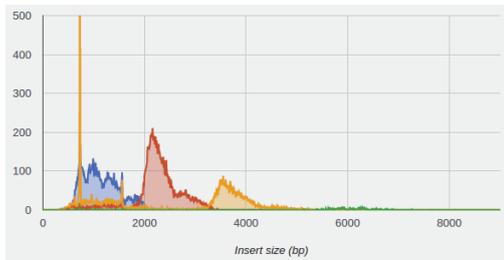
④'
Bioanalyzer
および
sequencing
に使用したサ
ンプル (詳細
は次ページ)

〈Bioanalyzerによるサイズ分布〉

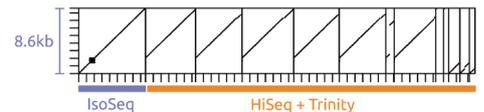
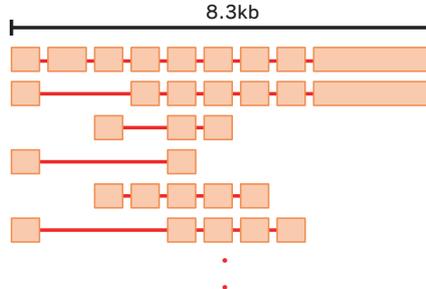
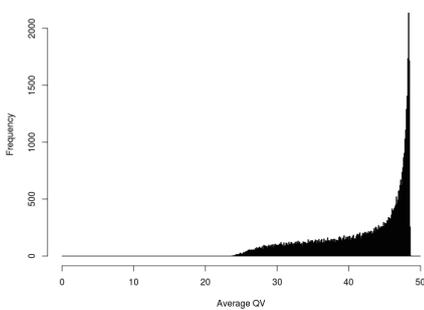
Sample A

Sample B


〈Sequencing〉

Pool	Reads of Insert		Isoforms		% full-length non-chimeric reads	
	Sample A	Sample B	Sample A	Sample B	Sample A	Sample B
①	51,943	60,450	30,961	40,035	59.61%	66.23%
②	58,689	54,456	37,338	35,539	63.62%	65.26%
③	55,521	52,336	29,236	27,273	52.66%	52.11%
④'	44,658	34,140	14,917	11,625	33.40%	34.05%

Sample A

Sample B


Sample A, Bについて Pool#1~#4 の Read of Insert 長を測定したところ、期待していた通り、分画したサイズに対応した長さになっていた。非常にシャープなピークも見られるが、これは組織特有の高発現遺伝子に由来することが分かっている。



PacBio RSIIのRaw readのQVは8-9程度であるが、Iso-Seqにより得られたアイソフォーム配列の大半は平均QVが30を超えていた。

8kb を超えるアイソフォームも得られた。アセンブルを行っていないので当然ではあるが、共通する配列を持つ異なるアイソフォームを別々の配列データとして得られていることも確認できた。

アイソフォーム中にリピート配列を含むアイソフォームも見られた。同様の配列はHiSeq + Trinityでは複数のContigに分断されていた。

以上の結果により、アセンブルの必要なく、実際に存在するIsoformを解析することができた。また、リピートを含んでいても、問題なかった。



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。また所要時間は回収したいフラクションの数に影響されないので、その数が大きくなるほど他の手法に比べて作業効率が良くなります。加えて、1つのサンプルから複数のサイズフラクションが得られるためサンプルの無駄が少なく、Iso-Seqにおいては必要なPCRサイクル数が最小限に抑えられます。