



Technical Data

# PippinPulse を用いたパルスフィールド電気泳動による 様々な長さの断片化 DNA (600bp, 350bp, 200bp, 150bp) のサイズ分布確認

評価製品

Pippin Pulse (Cat No. PPI0200)

目的

パルスフィールド電気泳動で様々な長さに断片化したDNAのサイズ分布を確認する。

## 背景

次世代シーケンスなどのいくつかのアプリケーションにおいて、目的のサンプルがどの程度のサイズに分布しているかを確認することはダウンストリームの成功率を上げる上でも、非常に重要となります。

一般的に、キャピラリー電気泳動システムは、サンプルが少なくてもサイズが確認できるため、優れた装置として知られていますが、サンプルによってはテーリングが生じ、正確なサイズ分布が得られないことがあります。

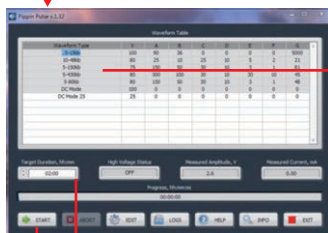
パルスフィールド電気泳動は、電気泳動中に電界の方向を切り替えることで、DNA断片をより精度よく分離し、ゲルに展開することが可能です。本技術資料では、簡便で使いやすいパルスフィールド電気泳動パワーサプライ Pippin Pulse を用いて、さまざまな長さの断片化 DNA (600bp, 350bp, 200bp, 150bp) を電気泳動し、GelPro analyzer を使用して解析することにより、目的とする長さの DNA 断片を解析した事例をご紹介します。

## 実験条件

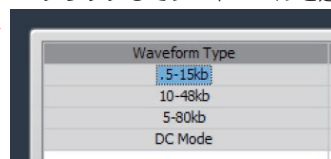
- サンプル DNA: Plant genomic DNA, Human genomic DNA
- Input DNA 量: 1000ng, 100ng, 10ng, 1ng
- Input DNA バッファー組成: TE buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
- 断片化酵素: KAPA Frag (Cat.No. KK8600)
- 断片化温度: 37°C
- 断片化時間: 5min, 10min, 20min, 30min

## 実験手順

1. ゲルシステムをセットアップ (ゲル作製、サンプルロード) する。
2. PCとPippin PulseをUSB接続し、それぞれの電源をONにする。
3. PCのデスクトップにあるPippin Pulse Iconをダブルクリックしてアプリケーションを立ち上げる。
4. クリックしてプロトコールを選択する。



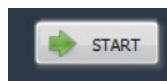
4. クリックしてプロトコールを選択する。



5. ラン時間の設定を行う。(デフォルトは2時間に設定されている)



6. スタートをクリックする。(※)

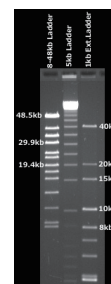
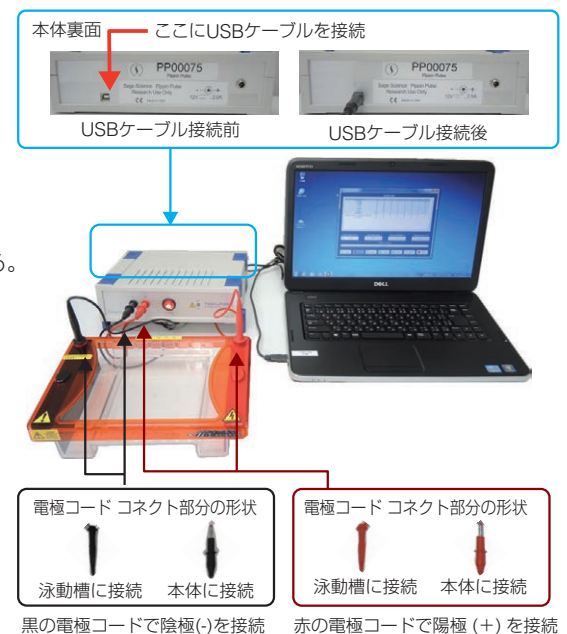


7. 泳動が完了したらゲルを解析する。

※注意: 泳動中のPCトラブルを避けるために、下記の設定に注意。

- PCの電源ケーブルの接続
- 省電力設定のスリープをOFFに設定
- Windows updateをOFFに設定

【接続図】 ※ 使用例 MidiPlus2 水平式電気泳動槽



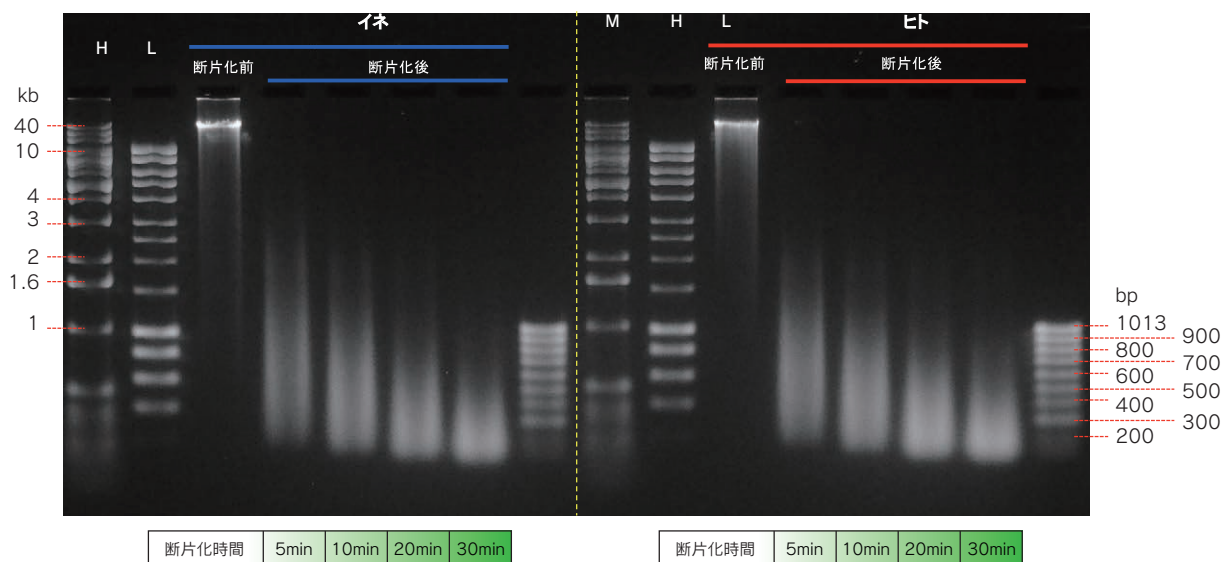
## 断片化後のサイズ分布結果 ※AdapterをLigationせずに、断片化後、熱変性により反応を中断

 ● Plant genomic DNAとHuman genomic DNAの断片化結果  
 日本ジェネティクス社 社内ラボ評価試験データ

 KAPA Frag断片化条件  
 Input DNA量 : 1ng, 10ng, 100ng, 1000ng  
 反応温度 : 37℃  
 反応時間 : 5min, 10min, 20min, 30min

Blue : Plant genomic DNA Red : Human genomic DNA

断片化時間/ Input DNA量	5min Target size 600bp	10min Target size 350bp	20min Target size 200bp	30min Target size 150bp
1000ng	 Top peak : 967bp 1147bp	 Top peak : 596bp 515bp	 Top peak : 293bp 217bp	 Top peak : 165bp 169bp
100ng	 Top peak : 808bp 920bp	 Top peak : 388bp 347bp	 Top peak : 181bp 173bp	 Top peak : 117bp 117bp
10ng	 Top peak : 870bp 639bp	 Top peak : 420bp 380bp	 Top peak : 138bp 264bp	 Top peak : 124bp 149bp
1ng	 Top peak : not detected	 Top peak : not detected	 Top peak : not detected	 Top peak : not detected

 Bioanalyzerの測定レンジでは「高分子の切れ残りが検出できない可能性」があるため  
 パルスフィールド電気泳動を用いて200bp ~ 40kbの広いレンジでサイズ確認した。


## 泳動レーン :

Lane H : High Marker, Invitrogen社 1kb DNA extension ladder (#10511-021), 2uL/lane

Lane L : Low Marker, Bioline社 HyperLadder 1kb (#BIO-33025), 5uL/lane

Lane M : Bioline社 HyperLadder 100bp (#BIO-33029), 5uL/lane

サンプルレーン : Plant genomic DNA · Human genomic DNA共に1000ng断片化サンプルを用いて200ng/Laneで泳動

## パルスフィールド泳動条件

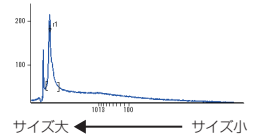
パワーサプライ : SageScience社 Pippin Pulse, 2-50kb program 16hr 泳動時間 : 6hr

泳動槽 : MajorScience社 Midi plus-2, 15x15cm ゲルトレイ アガロース : FastGene Agarose (#NE-AG02), 1.2% 120ml

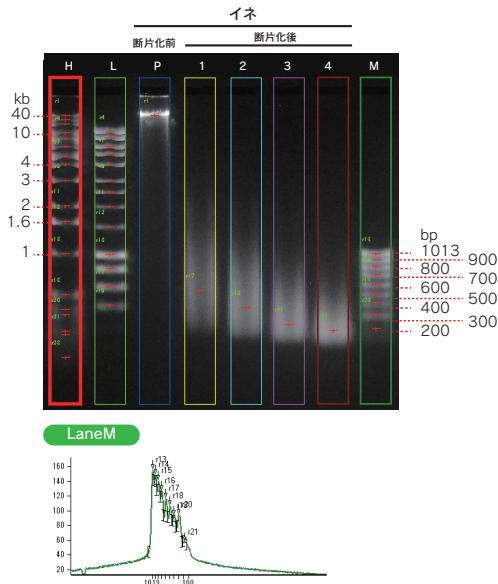
泳動バッファー : SageScience社 KBB buffer (#KBB1001), 終濃度x0.5

- Human genomic DNAとPlant genomic DNAの断片化結果  
日本ジェネティクス社 社内ラボ評価試験データ のつづき・・・  
Gel-Pro Analyzerによる解析 Input DNA量 1,000ng

\*注意\*  
X軸の値：Gel-Pro Analyzerは、  
Bioanalyzerとは逆

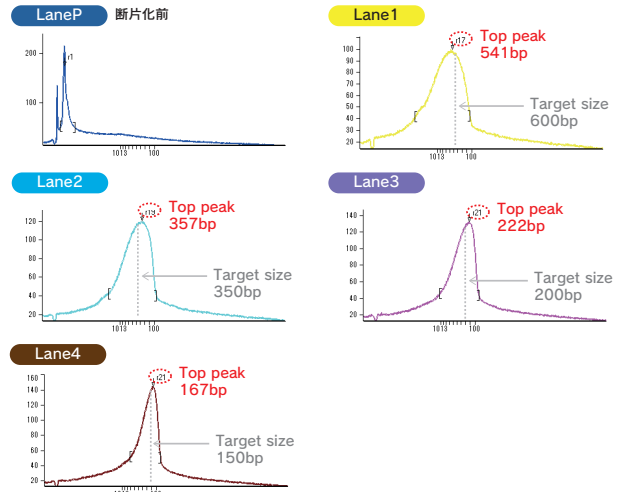


### Plant genomic DNA

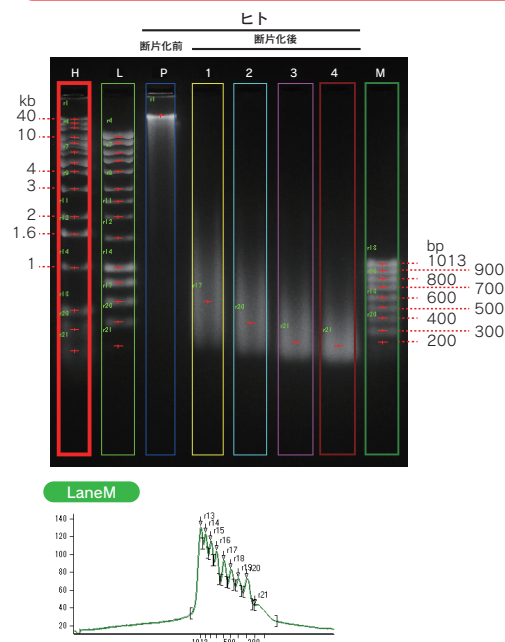


#### Gel-Pro Analyzer 解析

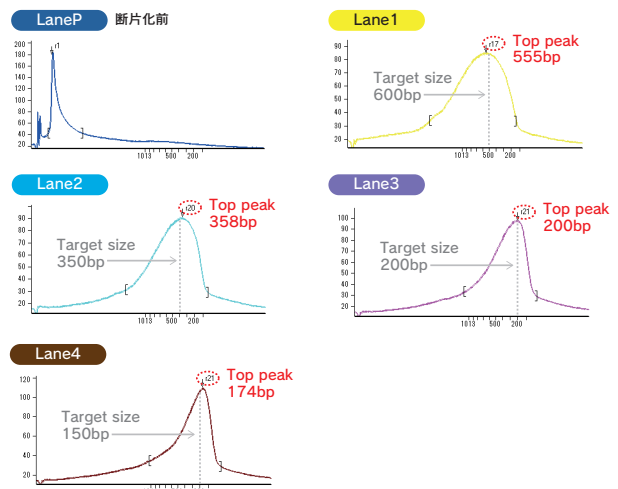
X軸の値：Gel-Pro Analyzerは、Bioanalyzerとは逆



### Human genomic DNA



#### Gel-Pro Analyzer 解析



- Top peakのsizeの比較

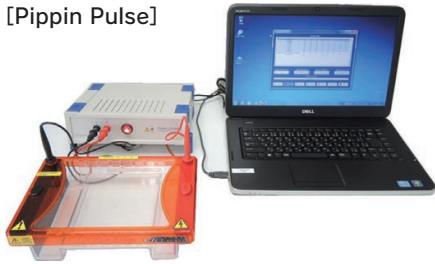
	断片化時間	5 min	10 min	20 min	30 min	解析に使用した量
	Target size	600 bp	350 bp	200 bp	150 bp	
Pippin Pulse	Plant genomic DNA	541 bp	357 bp	222 bp	167 bp	200ng
	Human genomic DNA	555 bp	358 bp	200 bp	174 bp	
Bioanalyzer	Plant genomic DNA	967 bp	596 bp	293 bp	165 bp	2ng
	Human genomic DNA	1147 bp	515 bp	217 bp	169 bp	

KAPA Fragによる断片化後のサンプルに関して、Bioanalyzerによる解析では非常に少量(2ng)で測定可能でしたが、断片化サイズが長ければ長いほど(200bp以上)テーリングが生じ、正確なサイズ分布が得られませんでした。一方で、Pippin Pulseは、解析に多くのDNA量(200ng)を必要としますが、GelPro analyzerで解析することにより、目的とする長さのDNA断片が得られていることがわかりました。

\* Plant genomic DNAは、国立研究開発法人 農業生物資源研究所 イネゲノム育種研究ユニット 主任研究員 堀 清純様のご厚意によりご提供頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

## 本技術資料で使用した当社取扱い製品

## [Pippin Pulse]



Pippin Pulse (パルスフィールド電気泳動パワーサプライ)  
PPI0200

Pippin Pulse用 10X KBB Buffer  
KBB1001

MidiPlus2 水平式電気泳動装置  
(UVトレイ3種類、1mm厚 20サンプルコーム、UVトレイダム、電極コード赤黒)  
ME1571015

1.5mm厚 16サンプルコーム MC  
ME15-16MC-1.5

## [KAPA HyperPlus Kit]



KAPA社 ライブラリー調製キット  
KAPA HyperPlus Kit  
KK8510 8回用  
KK8512 24回用  
KK8514 96回用

## キット内容

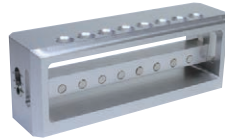
KAPA Frag Enzyme  
KAPA Frag Buffer (10X)  
KAPA Frag Conditioning Solution  
End Repair & A-Tailing Buffer  
End Repair & A-Tailing Enzyme

Ligation Buffer  
DNA Ligase  
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)  
Library Amplification Primer Mix (10X)

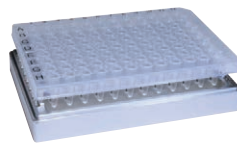
## [マグネットスタンド]



MagnaStand (YS-Model)  
8Ch x 0.2ml PCRチューブ用  
FG-SSMAG2



MagnaStand  
8Ch x 1.5mlチューブ用  
FG-SSMAG1.5



MagnaStand (YS-Model) 96wellプレート用  
FG-SSMAG96  
MagnaStand (YS-Model) V2 微量対応モデル  
(AMPure Low Volume Elution 対応マグネット)  
FG-SSMAG96SLV

お客様の声から生まれた、爆発的ヒット商品  
次世代シーケンズ (NGS) 用ライブラリー  
調製では、AMPure XPビーズを用いたサンプ  
ルクリーンアップの工程が何回かあります。  
従来のマグネットスタンドは磁力が弱いた  
め、ピベッティングでの溶液ミックスや、溶  
液回収の際のビーズキャリアオーバーが問  
題でした。このマグネットスタンドは、NGS  
ライブラリー調製に特別に開発されており、  
強力な磁力でAMPure XPのハンドリングを  
ストレスなく行うことができます。

## [磁気ビーズ]



Agencourt® AMPure® XP Kit  
A63880 5mL  
A63881 60mL  
A63882 450mL

## [試薬調整チューブラック]



アイスオン1型・2型  
SKIO-1 (169×69×47)  
SKIO-2 (177×95×47)

## [PCR装置]



LifeECO  
TC-96GHbC

Heat Lid の温度設定が  
可能です。

## [消耗品]



0.2mL 8連PCRチューブwithキャップ  
FG-088WD (ドームキャップ)  
FG-088WF (フラットキャップ)

チューブ1個単体で蓋を開閉することができ、  
コンタミネーションを予防します。



マイクロ遠心チューブ  
11150 0.65mL  
11510 1.7mL  
12000 2.0mL



10uL ワンタッチフィルター  
10320

ゴムのような柔らかいプラスチック  
によりピペットへの装置が良く  
高い分注精度が得られます。



200uL マルチガード  
14220

14220T Low Binding (低吸着)