



Technical Data

# 長鎖DNA抽出専用ゲルカセット「High Pass Plus<sup>\*</sup>」の製品評価試験

※自動DNA断片ゲル抽出装置BluePippin専用です。


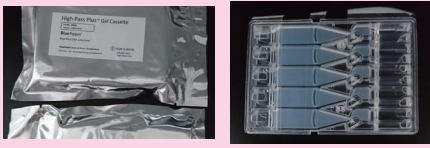
背景

ロングリードの次世代シーケンサでは、短鎖DNA断片を排除し、長鎖DNA断片を効率良く回収することが、シーケンスの成否に大きな影響を与えます。BluePippinの“High-Pass” DNAサイズセレクションは、数kbp~数十kbp以上の長鎖DNA断片分離、回収に有効な手段として用いられてきました。「High Pass Plus」は、High Pass DNAサイズセレクションで、より短時間かつ高収量を実現するために開発されたHigh Pass DNAサイズセレクション用ゲルカセットです。本テクニカルノートでは、High Pass Plusカセットを用いたHigh Pass DNAサイズセレクションが従来法 (High-Pass) とどのように異なるのか評価しました。

評価項目

- ① BluePippinでのラン時間
- ② 異なるサンプル、異なるインプットDNA量での回収量・回収率

製品仕様

	ゲルカセット	今回の評価で用いたBluePippin設定 (Cassette Definition)	製品の特徴と違い
従来法 (High-Pass)	Pippin Gel Cassete 0.75% (Sage Science, BUF7510) 	0.75% DF Marker S1 high-pass 15-20 kb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ゲルが細く、長い</li> <li>• 泳動距離が長く、分離能が良い。特定サイズをピンポイントで取りたい時に有用</li> <li>• 溶出ウェルの容量が40 μL</li> <li>• 15 kbp以上の分離・回収におよそ4~5 h</li> </ul>
High Pass Plus	High Pass Plus Gel Cassete (Sage Science, BPLUS10) 	15 kb High Pass Plus Marker U1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ゲルが太く、泳動距離が短い構造</li> <li>• High Pass Plus専用のCassette Definition (プログラム) によるサイズセレクションにより、長鎖DNAを高収量で回収</li> <li>• 溶出ウェルの容量が80 μL</li> <li>• 15 kbp以上の分離・回収におよそ2 h 30 ~ 3 h</li> </ul>

使用機器と使用試薬

- DNAサイズセレクション： BluePippin (BLU0001) ※ソフトウェアバージョン：v6.31-CD30
- Pippin Pulseゲル電気泳動： 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)  
DNA染色：Midori Green Direct (NE-MG06)
- 使用したサンプル： 細胞由来精製ゲノムDNA (細胞gDNA)  
組織由来精製ゲノムDNA (組織gDNA)



BluePippin



Pippin Pulse

## 評価方法

細胞gDNAと組織gDNAを使用して15 kbp以上のサンプルを取得するため、BluePippinを用いてサイズセレクションを行った後に、Pippin Pulseを用いたパルスフィールド電気泳動にてバンドを確認した。

I インプットDNAの分布を確認するため、各サンプルをPippin Pulseを用いてパルスフィールド電気泳動を行った。

Pippin Pulse設定 (Pre-set protocols) : 5-430 kb

泳動時間 : 15時間

泳動バッファー : 0.5×KBB buffer (Pippin Pulse泳動用バッファー)

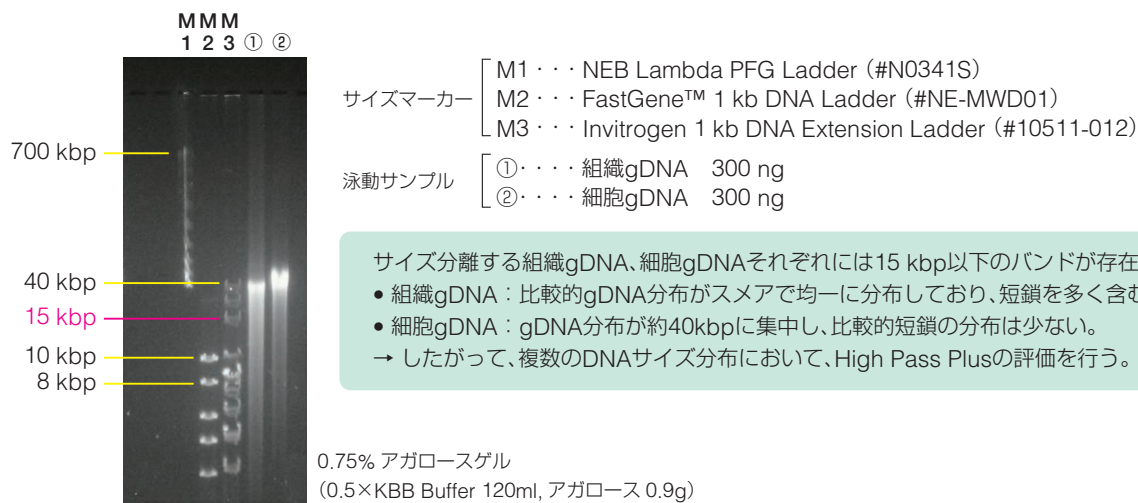
II 15 kbp以下の短鎖DNAを取り除くため、BluePippinを使用してサイズセレクションを行った。

III 回収したサンプルが目的の長鎖DNAであることを確認するため、Pippin Pulseを用いてパルスフィールド電気泳動で確認した。(条件①と同じ)

IV 回収したサンプル1 μLをQubit 2.0フルオロメーター (Invitrogen : Q32866) で測定し、DNA濃度を求め、長鎖DNA回収量を計算した。

## 結果

### I. Pippin Pulseゲル電気泳動によるインプットDNAの状態確認



サイズ分離する組織gDNA、細胞gDNAそれぞれには15 kbp以下のバンドが存在する。

● 組織gDNA : 比較的gDNA分布がスミアで均一に分布しており、短鎖を多く含む。

● 細胞gDNA : gDNA分布が約40kbpに集中し、比較的短鎖の分布は少ない。

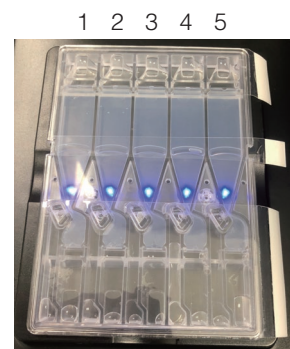
→ したがって、複数のDNAサイズ分布において、High Pass Plusの評価を行う。

### II. BluePippinにおけるラン時間の比較

	ラン時間
従来法	4 h 45 m 00 s
High Pass Plus	2 h 31 m 40 s

約2時間差

High Pass Plusの方がラン時間が短く、迅速に分離、回収できた。



レーン1 : マーカー  
 レーン2 : 2 μg\_Cell  
 レーン3 : 5 μg\_Cell  
 レーン4 : 2 μg\_Tissue  
 レーン5 : 5 μg\_Tissue

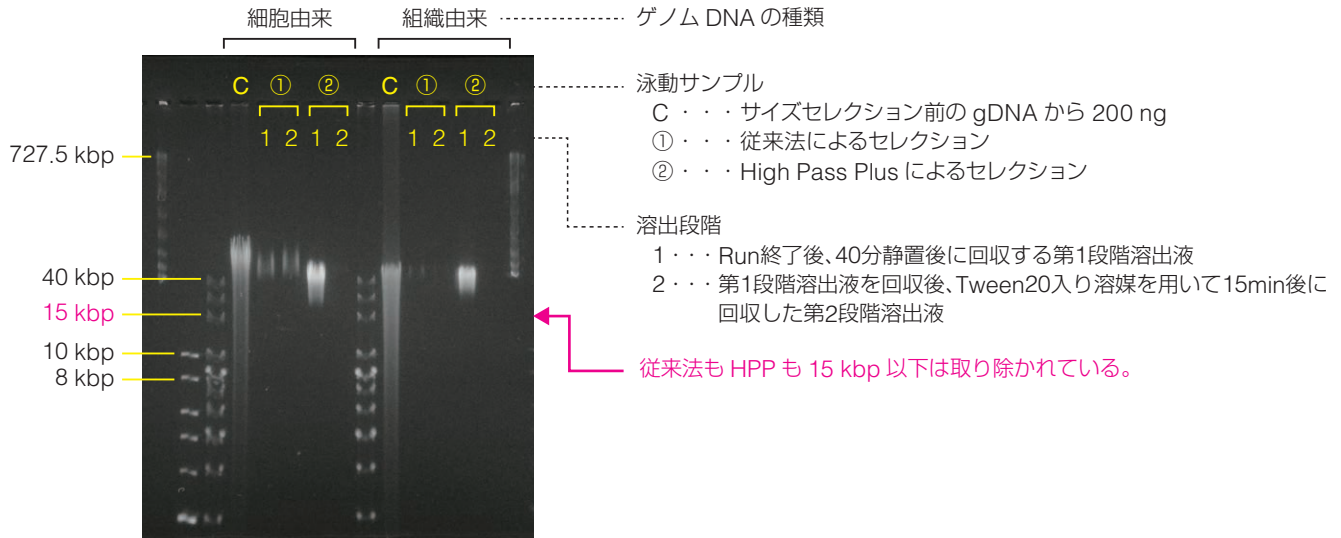
High Pass Plus Gel Cassette  
 ※BluePippin にセットした状態

### Ⅲ. 異なるサンプル、異なるインプットDNA量での回収量・回収率

#### i) インプット量 2 μg でのサイズセレクション

従来法と High Pass Plus (HPP) それぞれでインプット量 2 μg で確認を行った

#### ● Pippin Pulse ゲル泳動結果

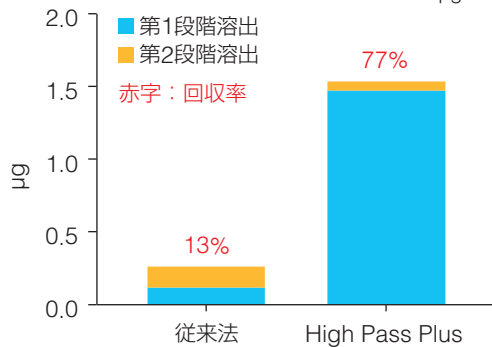


#### ● ゲノム DNA インプット量 2 μg のときの回収量の比較

細胞gDNA回収量

	第1段階溶出	第2段階溶出	Total	回収率
従来法	0.118	0.146	0.264	13%
High Pass Plus	1.474	0.059	1.533	77%

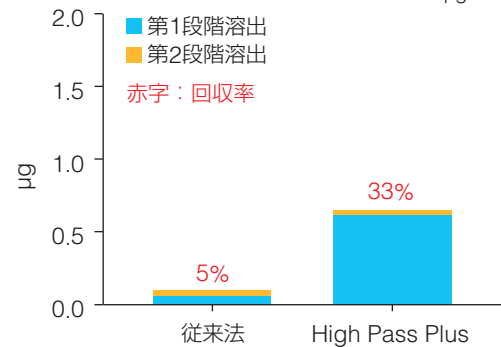
(Unit : μg)



組織gDNA回収量

	第1段階溶出	第2段階溶出	Total	回収率
従来法	0.058	0.040	0.099	5%
High Pass Plus	0.624	0.027	0.651	33%

(Unit : μg)

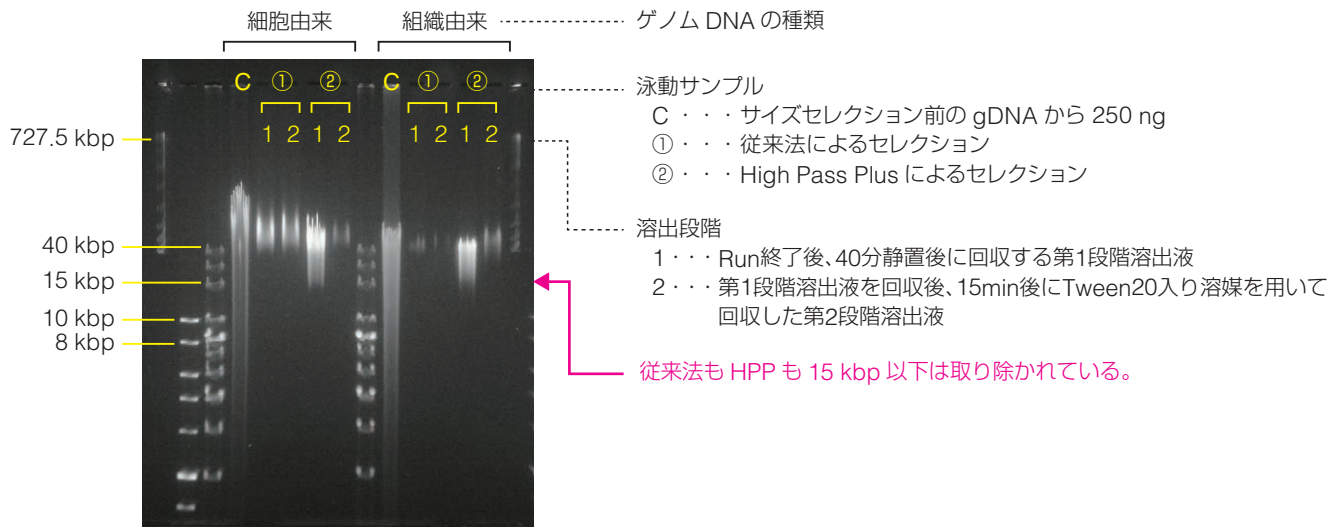


- 従来法と比較して総収量が6~7倍増加した。
- 細胞gDNA回収率 (77%) は組織gDNA回収率 (33%) よりも高い回収率を示した。  
 → この結果は、組織gDNAが短鎖DNAを多く含むこと (結果 I) に合致し、本実験におけるサイズセレクションが異なるDNAサイズ分布においても機能していることを意味している。
- High Pass Plusは、第1段階溶出液で抽出DNAのほとんどが回収できた。

## ii) インプット量 5 $\mu\text{g}$ でのサイズセレクション

従来法と High Pass Plus (HPP) それぞれでインプット量 5  $\mu\text{g}$  で確認を行った

### ● Pippin Pulse ゲル泳動結果

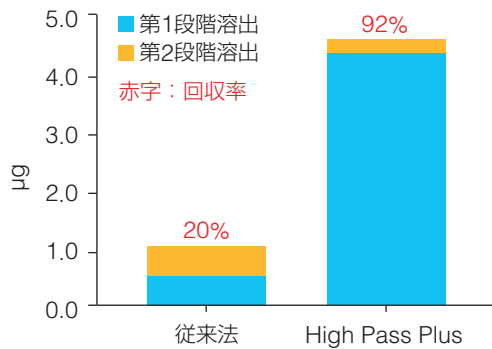


### ● ゲノム DNA インプット量 5 $\mu\text{g}$ のときの回収量の比較

細胞gDNA回収量

	第1段階溶出	第2段階溶出	Total	回収率
従来法	0.506	0.508	1.013	20%
High Pass Plus	4.368	0.225	4.593	92%

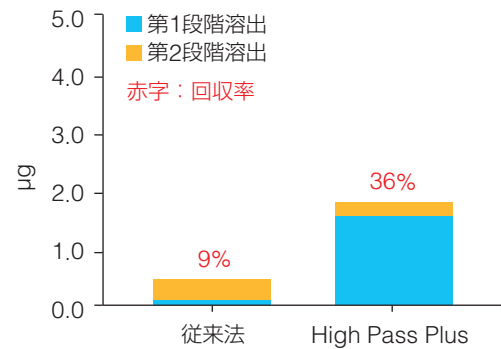
(Unit:  $\mu\text{g}$ )



組織gDNA回収量

	第1段階溶出	第2段階溶出	Total	回収率
従来法	0.090	0.353	0.443	9%
High Pass Plus	1.540	0.251	1.791	36%

(Unit:  $\mu\text{g}$ )



サイズセレクションするゲノムDNAインプット量を5  $\mu\text{g}$  に増やしても高収量で15 kbp以上のDNAを回収できた。  
また、High Pass Plusは、インプット量2  $\mu\text{g}$  の条件と同様に、第1段階溶出液で抽出DNAのほとんどが回収できた。

### まとめ

- ① 従来法 (High-Pass) と比較して、High Pass PlusではBluePippinでのラン時間が2時間以上短縮できた。
- ② 異なるサンプル (細胞由来と組織由来)、異なるインプットDNA量 (2  $\mu\text{g}$  と 5  $\mu\text{g}$ ) いずれの条件でも、従来法 (High-Pass) と比較して High Pass PlusのほうがDNAの回収量が顕著に増加した。

## 補足情報

### 第1段階溶出時点のDNA回収率の比較

今回得られた回収量・回収率の結果において、第1段階溶出時点での回収率を比較した。

※第1段階溶出時点のDNA回収率% = (1st 回収量/全体回収量) × 100

ゲノムDNAインプット量	ゲルカセット	細胞gDNA	組織gDNA
2 µg	従来法	45%	59%
	High Pass Plus	96%	96%
5 µg	従来法	50%	20%
	High Pass Plus	95%	86%

### 補足情報まとめ

いずれの条件でも、従来法と比較して、High Pass Plusは第1段階溶出時点で高い回収率が得られた。