

Pippin Prep™ DNAサイズセレクションシステム

Agilent Bioanalyzer High Sensitivityチップを使用したローインプットDNAサイズセレクション

概要

NGSサンプル調製の効率が向上すればするほど、シーケンスラボにおいてライブラリー生成に使われるゲノムDNAの量は少なくなっていく。ここで2つの問題が生じます。1つ目は、断片化プロセスにおける誤差の許容範囲が狭くなるということです。もしも希望した分布が生成されなかった場合、目的のライブラリーを生成するために必要とされる量のDNAが適切なサイズレンジ内に無い可能性があります。もしライブラリーのインサートサイズのサイズ制限が厳しすぎないようであれば、この問題はサイズセレクションのプロセスを変えることによって修正でき、入力分布のより濃度の高い部分を回収することができます。このような調整をするためにもユーザーは、サイズセレクションを設定する前に、インプットサンプルのサイズ分布を知っておく必要があります。しかしこの条件が2つ目の問題を引き起こします。それは、ごく少量のインプットサンプルだけが消費されるように、プレ分画解析法は非常に感度が高くなければならないということです。

この技術資料は、Agilent Bioanalyzer High Sensitivity(HS)チップとSage Science Pippin Prepシステムを組み合わせた相乗効果について解説したものであり、その相乗効果を利用すれば上記の問題に対処できます。以下に示す通り、Bioanalyzer HSチップは、断片化されたインプットDNAのサイズ分布の解析に最適です。その理由は、必要なDNAの量がわずか数ngだからです。インプットサイズ分布を知っていることで、ユーザーはPippin Prepにおける最適なサイズセレクションレンジを選択することができ、ライブラリー生成の断片化とサイズセレクションステップをコントロールすることができます。

DNAインプットプロファイルの解析

この解析では、制限酵素で処理された大腸菌ゲノムDNAを用いることで断片化インプットサンプルをシュミレーションしました。図1はAgilent Bioanalyzer DNA1000チップでの解析結果ですが、この消化物は約20~1000bpという広いサイズレンジを持っており、図1における添加量は100ng (レッド) と50ng (ブルー) です。最も多いサイズ分画である100bp付近では、50ngにおいて約40蛍光ユニットの強度が示されています。

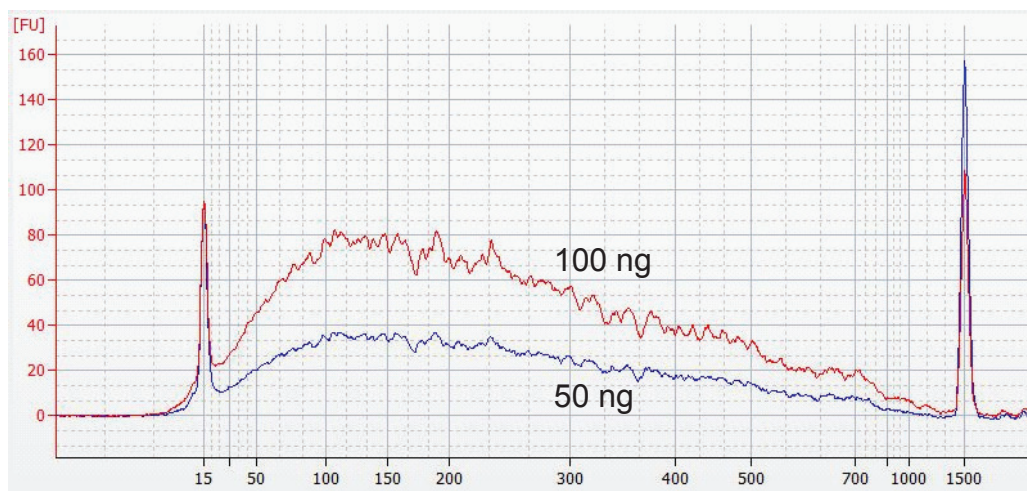


図1. Agilent Bioanalyzer DNA1000チップで解析した制限酵素処理後の大腸菌ゲノムDNA

同じサンプルをBioanalyzer HSチップで解析したところ、1/50のインプットでほぼ同等のシグナルが得られました（図1の50ngと図2の1.2ngを比較してください）。さらにHSチップでは、より少ないサンプル量（約1/3）でインプットサイズ分布の妥当な結果を得ることもできました（図2の0.375ngをご確認ください）。これらのデータにより、低濃度ゲノムサンプルの解析においてBioanalyzer HSチップが有効であることが実証されました。例えば、数10ナノグラムのサンプルにおいては、5%以下のインプットサンプルから良い解析プロファイルを得ることが可能です。インプットDNAの良いプロファイルを得ることによって、Pippin Prepシステムのための分画設定を調整することが可能となり、ライブラリー構築が成功する確率を最大化することができます。

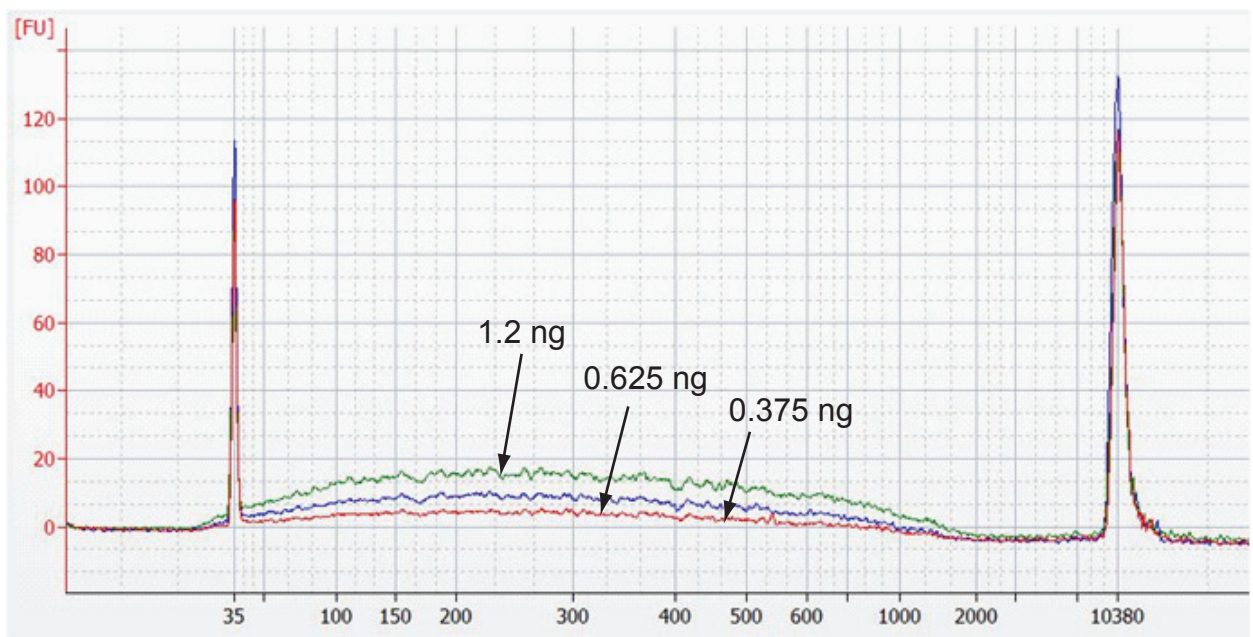


図2. Bioanalyzer HSチップを用いた低濃度ゲノムDNAサンプルの分画前解析
数字は、指定チャンネルにおけるサンプルの合計インプット量を示します。

Pippin Prep分画物の解析

Bioanalyzer HSチップは、Pippin Prepで得られた産物の分画後解析にも非常に便利です。このことを実証するため、2% Pippin Prepカセットの4つの異なるインプット量（各レーンの合計DNA添加量はそれぞれ、15ng、50ng、150ng、250ng）で制限酵素処理済みの大腸菌ゲノム消化物を流し、各レーンから150bpを中心としたタイトなサイズ分画を回収しました。図3はラン終了時のPippin Prepのスクリーン画像です。Pippin Prepの蛍光感度の限度は、シングルバンドではDNA約5ngですが、サイズ分布が広いゲノムサンプルではより少なくなります。その結果、最大インプット量である250ng（図3の最上段/レーン5）においてさえゲノムDNAは検出されません。溶出のタイミングは全てレファレンスのマーカー（図3の最下段/レーン1）に基づいているため、これはPippin Prepの機能上の問題ではありません。

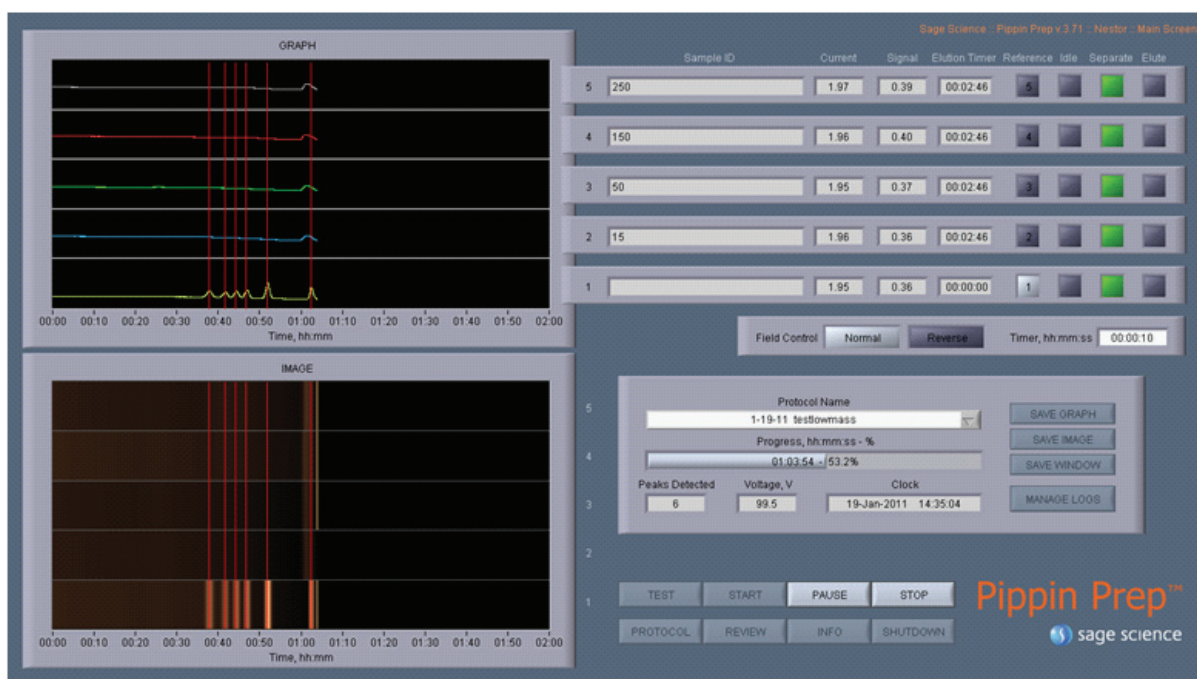


図3. 制限酵素処理済み大腸菌ゲノムDNAをインプットとして使用したPippin Prepによる分画の結果を表示したスクリーン画像

レファレンス・マーカーはレーン1です (バンドは、20、50、75、100、150、250bp)。ゲノムDNAのインプット量はレーン2～5にそれぞれ15、50、150、250ngです。ロード量が少ないため、ゲノムDNAサンプルから蛍光シグナルは確認できません。(250bpマーカーと一致するシグナルの小さな突起は、溶出チャンネルからのエチジウムが検出器を通過する際にバックグラウンドが増加することによって引き起こされるものです。)

図3で示されたPippin Prepによってサイズ分画された産物を、Bioanalyzer HSチップを用いて解析しました。すべてのケースで、1 μ lの溶出産物 (計40 μ l) を追加精製することなく直接HSチップにロードしました。このHSチップの電気泳動図が図4です。グラフの拡大図を見てみると150bp付近で突起が確認できますが、これは産物のピークを含んだものです。別表には産物のピークにおけるDNA量が示されておりますが、これらはAgilent Bioanalyzer 2100 Expertソフトウェアによって得られた数値です。

図4と別表の結果から、50、150、250ngからのサイズ分画されたDNA産物はBioanalyzer HSチップで容易に検出されるということが示されました。これらの産物バンドにおけるDNAの推定量は30～120pgのレンジです (図1)。インプット量15ngからの150bp産物は、バックグラウンドの上でろうじて検出される程度です。それは、産物の量が数pgレンジに見積もられているからです (別表)。これらのデータが示しているのは、Pippin Prepから得たDNAの解析にはHSチップが最良の選択だということです。その理由は、50ng程度のゲノムDNAインプットからのタイトカットであっても、それを解析するのに十分な感度を有しているからです。

Bioanalyzer HSチップでPippin Prep産物を解析する際の感度は、インプットと産物の分布の条件に依存するということにご注意下さい。例えば、ターゲットサイズ周辺の分布が狭いインプットサンプルに対して、Pippin Prepの”tight”モードを選んだ場合、図3や図4よりも少ないインプットDNAを使用した場合に産物の解析が可能となります。同様に、Pippin Prepで広いbpレンジが回収された場合は、より多くのインプットDNAが必要となります。

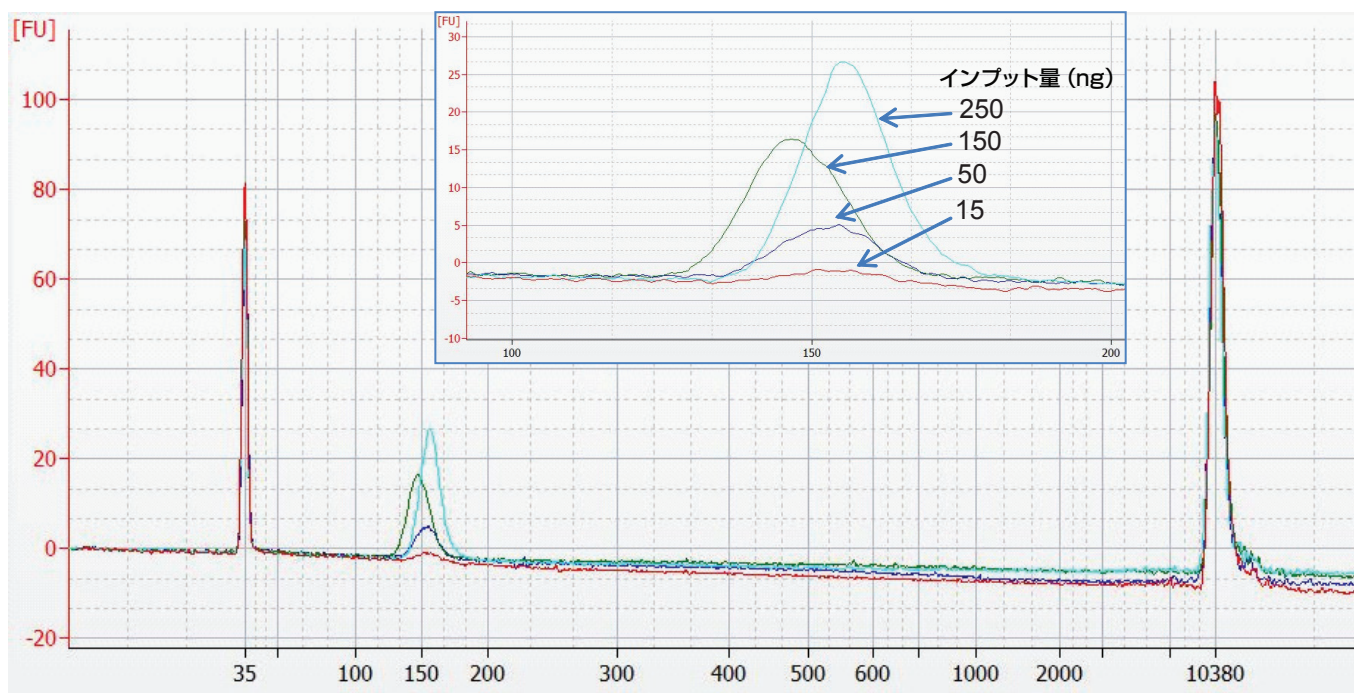


図4. 図3の実験から得たPippin Prep産物をBioanalyzer HSチップで解析したグラフ

2%カセットを使用して150bpを中心としたタイト分布を回収しました (Pippin Prepの設定: bp target=150)。グラフの拡大図は産物のピークの突出部分を示します。

| Pippin lane | Input ng | From [bp] | To [bp] | Corr. Area | % of Total | Average Size [bp] | Size distribution in CV [%] | Conc. [pg/μl] |
|-------------|----------|-----------|---------|------------|------------|-------------------|-----------------------------|---------------|
| 2 | 15 | 134 | 173 | 4.2 | 32 | 154 | 3.9 | 5.1 |
| 3 | 50 | 135 | 174 | 22.1 | 72 | 153 | 4.7 | 31.5 |
| 4 | 150 | 128 | 170 | 58.8 | 86 | 148 | 5 | 85.0 |
| 5 | 250 | 134 | 180 | 81.9 | 90 | 156 | 4.5 | 122.3 |

別表1. 図4で示されたHSチップでの結果 (Agilent Bioanalyzer Expertソフトウェア)

Sage Science, Inc.
 Suite 3150, 500 Cummings Center
 Beverly, MA 01915
support@sagescience.com
 888.744.2244 (U.S)
 978.922.1834 (outside North America)