

# Ion Torrent PGMのライブラリー調製における 自動DNA断片ゲル抽出システム(Pippin Prep) の活用事例

○ 鈴木 智<sup>1</sup>、笹森 史郎<sup>1</sup>、江畑 明彦<sup>1</sup>、馬場 憲三<sup>1</sup>、角川 弘晃<sup>1</sup>、佐藤 一則<sup>1</sup>、小柳 亮<sup>2</sup>

<sup>1</sup>日本ジェネティクス株式会社、<sup>2</sup>沖縄科学技術大学院大学

このアプリケーションノートは、沖縄科学技術大学院大学 DNAシーケンシングセクション 小柳 亮様のご厚意により作成いたしました。

## 実験目的

Ion Torrent PGMのテンプレート自動調製システムOneTouchは簡便な操作でシーケンシング用ビーズの作製を可能にしているが、ライブラリーによって期待されるリード長が得られない例が散見された。この原因として、OneTouchにおいてはエマルジョンPCRの条件が固定されており、増幅効率がライブラリーのインサート長に依存することが推測されたため、ライブラリー作製の際のサイズ分画法を検討した。

## 実験条件および検証方法

- 次世代シーケンサー : Life Technologies社 Ion Torrent PGM
- ライブラリー作成キット : Ion Plus Fragment Library Kit (ゲノムDNAの断片化にはCovaris S2を使用)
- 検証方法  
ライブラリーのサイズセレクションについて、下記の方法で抽出を行った後、それぞれ得られたRead Length Histogramとスコアデータにより検証しました。

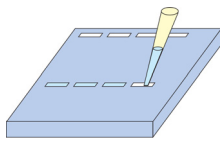


自動DNA断片ゲル抽出システムPippinPrep

### <sample 1>

L社電気泳動システム  
330bp抽出

ライブラリー作成キット 取扱説明書の推奨方法のとおりを実施しました。



### <sample 2>

L社電気泳動システム  
330bp抽出

小サイズDNA断片の混入の可能性を減らすため、330bpを抽出する直前に泳動をストップして、ピベッティングにより溶出ウェルを洗浄し、低分子除去を試みました。その後泳動を再開し、目的サイズを抽出しました。

### <sample 3>

PippinPrep  
315bp抽出

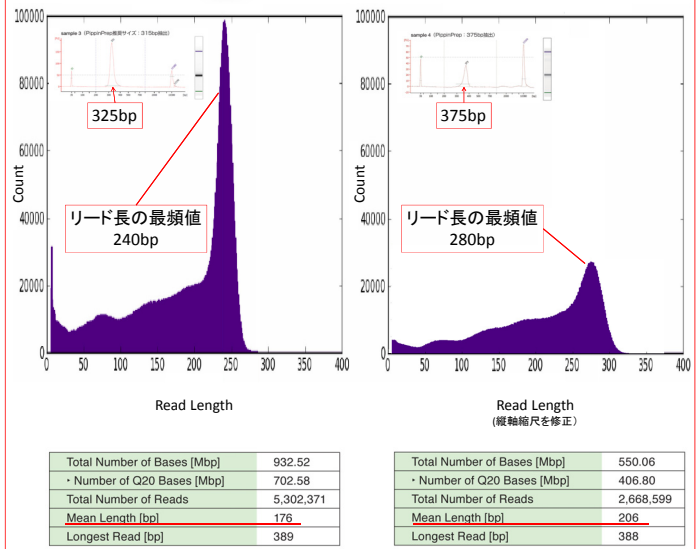
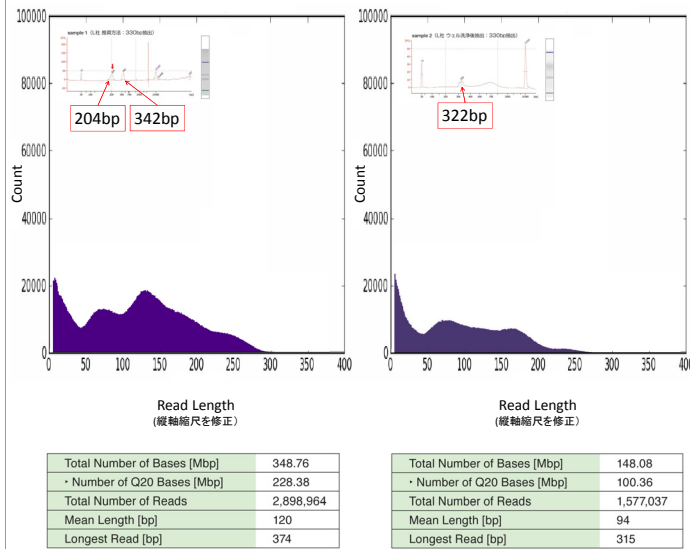
ライブラリー作成キット 取扱説明書のPippinPrepでの推奨サイズで抽出しました。



### <sample 4>

PippinPrep  
375bp抽出

PippinPrepでは、正確なサイズ設定ができるため、Sample3より大きなサイズに設定して抽出を試みました。



## まとめ

Life Technologies 社 Ion Torrent PGM は、適切なRead Lengthを得るためにライブラリー作製におけるサイズセレクションが重要で、特に低分子除去が必須であることが確認されました。

しかし推奨の電気泳動システムでは、低分子の混入が発生してしまいスコアデータの改善が困難でした。

そのためIon Torrent PGMに適した精度の高いサイズセレクションを行うためPippin Prepを検討したところ、非常に効果的な結果改善ができました。

さらにRead Lengthを伸ばすため、プロトコルよりも約50bp長いライブラリーをPippin Prepを用いて作製したところ、期待通りの結果を得ることができました。

## <お客様のコメント>

Ion Torrent PGMのシーケンステンプレート調製におけるエマルジョンPCRはライブラリーのインサート長に非常に敏感で、短い断片が混入したり、インサート長が指定より長い場合に目的のライブラリー分子が正しく増幅されず、期待通りのシーケンス結果が得られないことがあります。PippinPrepによる正確なサイズ分画はPGMの能力を十分活用するためには必須だと思います。最新の400bpシーケンスでもよい結果ができています。