

Pippin Prep™ DNAサイズセレクションシステム

過剰な未反応アダプターによる検出器のサチュレーション対策

サマリー

極端に高濃度なDNAバンドを持つサンプルは、検出器のサチュレーションによってPippin Prepにトラブルを引き起こす場合があります。このサチュレーションが発生するのは、大量のアダプターを含んだライゲーション反応液を分画する時や、特に目立った量のプライマーダイマー等を含んだPCR反応液を分画する時です。検出器のサチュレーションが発生すると、レファレンス・マーカをしっかりと検出できなくなり、DNA回収の失敗や誤ったDNA分画物の回収につながります。

高濃度の未反応アダプターによって失敗した例を図1に示しました。レファレンス・マーカを第5レーンにロードし、3つのアダプターライゲーション反応液を第2～4レーンにロードしました。第1レーンにはサンプルをロードしていません。ライゲーション反応液にはそれぞれ約5 μ gの未反応アダプターが含まれています。Pippin Prepのソフトウェアは、最初の2つのレファレンス・マーカ（20bpと50bp）を正確に検知しました。しかし、第2～4レーンの未反応アダプターバンド（50bpから始まるバンドの先端）はシグナルオーバーロードを引き起こしました。このオーバーロードにより、1つのアダプターバンドが複数の分裂バンドとして表示されてしまいました。さらに深刻なことに、このオーバーロードによってレファレンスレーンまで影響を受け、マーカバンドの検出が妨げられています。このような干渉が生じたのは、アダプターシグナルが、5つの光学検出器すべてが周期的に共有しているアナログ/デジタルフィルター回路をサチュレーション（飽和）状態にしたからです。

対策

この問題の対策として、Pippin Prepのソフトウェア（バージョン3.32以降）では、全てのサンプルレーンにおいて蛍光検出機能をオフにすることができます。プロトコルを設定する際、スクリーン上にある“Sig Mon” ボタンをクリックすることにより蛍光検出のオン/オフ切り替えが可能です（“Sig Mon” は“Signal Monitor”の略です。図2参照）。プロトコル画面を開いた際の初期設定では、シグナルモニタリングはすべてのレーンでオンの状態になっております（明るいカラーのボタン表示）。オフに切り替えた場合、ボタンは暗いカラーになります（このソフトウェアでは、レファレンスレーンのシグナルモニタリングをオフにすることはできませんのでご注意ください）。

シグナルモニタリングを使用するか否かに関わらず、サンプルレーンにおけるプログラミングとワークフローは同じです。唯一の違いは、モニタリングがオフになっているレーンからは光学データが記録されないことです。

この資料に関する質問は、Sage Scienceのテクニカルサポートにお問い合わせください。この問題を解消したハードウェアは2010年末にご利用可能となります。

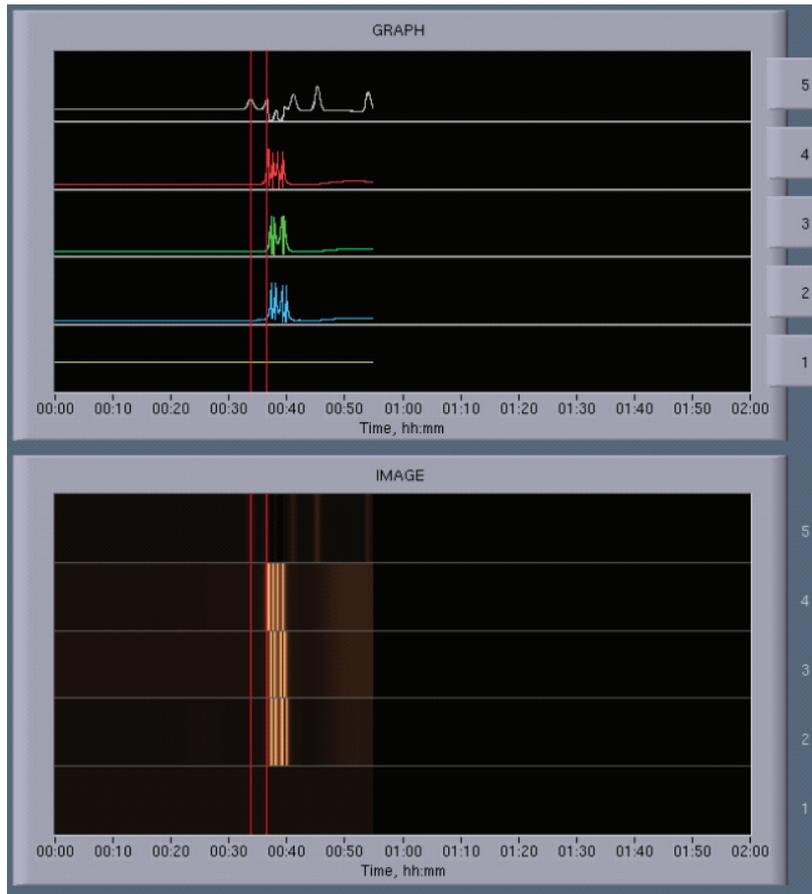


図1: 過剰な未反応アダプター (第2、第3、第4レーン) によって、ソフトウェアがDNAマーカー (第5レーン) を検出できなくなっている様子

シグナルモニターのon/offスイッチ
初期設定ではonになっている

↓

	BP Target	BP Start	BP End	BP Pause	Sample ID	Ref Lane	Sig Mon	BP Range Flag	Pause Enabled
5	0	0	0	0		5	<input checked="" type="checkbox"/>	none	<input type="checkbox"/>
4	0	0	0	0		4	<input checked="" type="checkbox"/>	none	<input type="checkbox"/>
3	0	0	0	0		3	<input checked="" type="checkbox"/>	none	<input type="checkbox"/>
2	0	0	0	0		2	<input checked="" type="checkbox"/>	none	<input type="checkbox"/>
1	0	0	0	0		1	<input checked="" type="checkbox"/>	none	<input type="checkbox"/>

図2: プロトコル画面におけるシグナルモニターのon/offスイッチ

Sage Science, Inc.
 32 Tozer Road
 Beverly, MA 01915
 support@sagescience.com
 888.744.2244 (U.S)
 978.922.1834 (outside North America)