

# Pippin Prep™ DNAサイズセレクションシステム

## 断片化ゲノムDNAのサイズセレクションにおける回収量について

### イントロダクション

この技術資料では、Pippin Prepによる断片化ゲノムDNAのサイズセレクションにおけるDNA回収量について解説します。回収するDNAの量は、選択したサイズレンジを広げることによって増やすことができます。

### Pippin PrepにおけるDNA回収

選択したサイズレンジにおける一般的な回収率は50～80%です。この回収率は、制限酵素で処理されたプラスミドDNAを分画し、酵素処理したDNAの一部を収集し、“選択回収したアウトプットDNA”と“適切に希釈されたインプットDNA”をAgilent Bioanalyzerで直接比較することによって算出したものです。

1. DNAフラグメントをサンプルウェルにロードします。
2. ソフトウェアを設定する際に、一つのターゲットサイズに対して少なくとも3つのパターンでレンジを変えてフラグメントを回収するようにプログラムします。
3. 回収フラグメントの量を決定します。
4. アウトプットDNAフラグメント（選択したレンジの中間付近）と、インプットDNAの同じフラグメントを比較します。

図1で、0.75%ゲルカセットにおける代表的な結果を示しました。

### 断片化ゲノムDNAからの分画物の回収

Pippin Prepを用いることで、断片化DNAから狭いサイズレンジのDNAを回収することができます。ソフトウェアの初期設定である“tight”モード（ユーザーがbpターゲット値のみを入力するモード）では、可能な限り狭いレンジが回収できるようにプログラムされています。狭いサイズレンジでは、広いレンジと比べてインプットゲノムDNAに含まれるDNAがより少なくなるため、システムが正常に稼働したとしても、初期設定の“tight”モードでは期待値よりも少ないDNAしか回収されません（選択したサイズレンジ内でインプットDNAの50～80%を回収）。

### 回収レンジを広げて収量を増加

回収レンジを広げた場合の効果を実証するため、400bpを中心としたバンドに対し、1.5%カセットを用いて初期設定の“tight”モードで回収を行いました。また、複製ゲノムサンプルから、徐々にサイズレンジを広くした回収も実施しました（中心とするbpターゲットは同じ）。最も広い回収レンジとして、マニュアルによるスラブゲルのバンドの切り出しおよび抽出で得られた標準的なレンジを選びました。その結果を図2と表1に示しました。インプットおよび回収DNAの解析は、インプットの1/40または回収アウトプットの1/40を用いてAgilent Bioanalyzer 2100で行いました。そしてインプットとアウトプットのトレースを直接比較し測定しました。

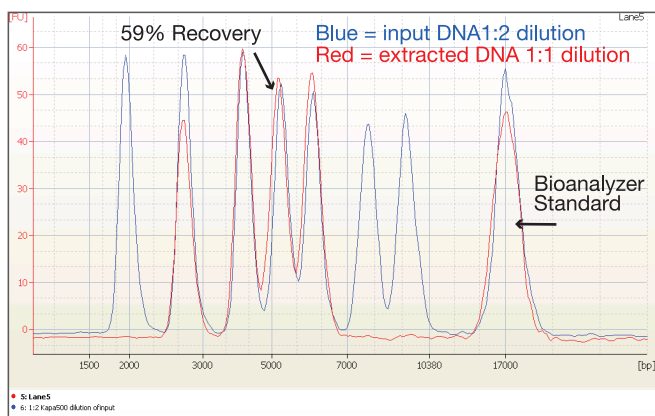


図1：5kb DNAフラグメントのサンプル回収

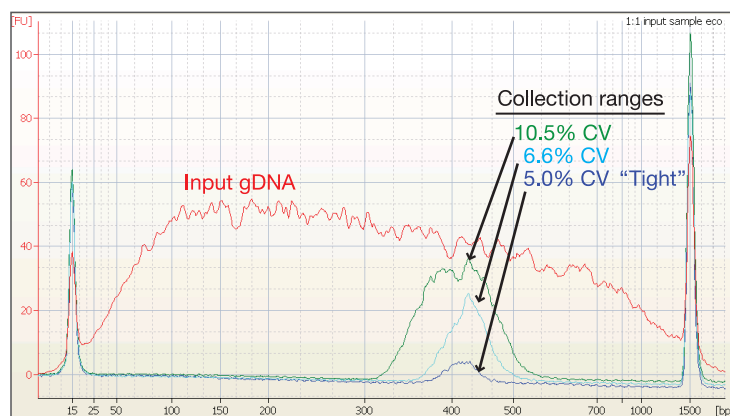


図2：サイズレンジがサンプル収量に与える影響

Programmed Values - Pippin			Bioanalyzer Result						
TargetBP	StartBP	End	BP Start	BP End	Average Size (bp)	Range (bp)	Range as %CV	Conc. (ng/ul)	Amt. (ng)
400	374	426	365	461	415	96	5	0.9	36
400	360	440	354	493	426	139	6.6	4	160
400	320	480	312	525	412	213	10.5	9.7	388

表1: 図1のデータから得たAgilent Bioanalyzerの結果  
 インプットDNAの量は5 $\mu$ g、推奨サンプル添加量の最大値は10 $\mu$ gです

## 結論および収量を増やすコツ

表に示すように、回収レンジを96bpから213bpに広げる(Bioanalyzer Result 参照)ことによってDNA収量を10倍に増やすことができました。このデータからわかることは、Pippin Prepの初期設定である“tight”モードが、ユーザーが期待する分布より狭い範囲の場合、より広い回収レンジを選択することによってDNAの収量を劇的に増やすことができるということです。

インプットDNA溶液中にタンパクによるコンタミネーションがあった場合、収量が減ることがありますので、コンタミネーションが疑われる場合はサンプルからタンパクを除去してください。ソフトウェアのバージョンが4.5以上であれば、ユーザー自身の設定により溶出の最後に5秒間の逆電流を流せる機能が備わっており、収量を最大20%アップさせることができます。

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