APPLICATION NOTE

SPRIselectでの、ゲルフリーDNAサイズセレクション条件の最適化

Jun Onodera; Koki Fujimura | Beckman Coulter KK.

Summary

DNAサイズセレクションは、従来アガロースゲル電気泳動バンドの切り出しによって行われてきたが、現在では当社の磁性ビーズ精製キットSPRIselectを用いた電気泳動を必要としないゲルフリー法が普及しつつあり、ハイスループットでの処理が容易になっている。ここでは、SPRIselectのダブルサイズセレクションの至適条件について、DNAラダーマーカーをモデルとして検討を行った。レフトサイズセレクションおよびライトサイズセレクションのDNA回収率測定にて得られたデータから、ダブルサイズセレクションで得られるDNA断片分布のシミュレーションを行った。このシミュレーション結果と実際の実験データの比較を行い、ダブルサイズセレクションに適した実験条件例を示した。

Materials and Methods

SPRIselectによるDNAサイズセレクション

サンプルとなるモデルDNAは、100 bp DNA Ladder (Takara Bio) を用い、SPRIselect (Beckman Coulter) のマニュアルに従ってレフトサイズセレクション (0.5 x, 0.55 x, 0.6 x, 0.65 x, 0.7 x, 0.8 x, 0.95 x, 1.2 x)、ライトサイズセレクション (0.5 x, 0.55 x, 0.6 x, 0.65 x, 0.7 x, 0.8 x, 0.95 x, 1.2 x) を行った。サンプル50 μLをサイズセレクションに使用し、TE 50 μLで溶出を行った。ダブルサイズセレクションは、0.8 – 0.6で行う場合には、0.8 xのレフトサイズセレクションを行った後に、続けて0.6 xのライトサイズセレクションを行う方法とした。

各ピークのDNA定量

SPRIselectによりサイズセレクションを行ったDNAは、Agilent 2200 TapeStationおよびD1000キット (Agilent Technologies) に1 μLロードし、DNAの分離を行った。各ピークの定量は、TapeStation Analysis Version A.02.01 (Agilent Technologies) を用いた。

Results

レフトサイズおよびライトサイズセレクションで得られるDNAサイズ分布

レフトサイズおよびライトサイズセレクションについて、サンプルである100 bp DNA Ladderの各ピークの回収率をそれぞれ算出した (Figure 1)。

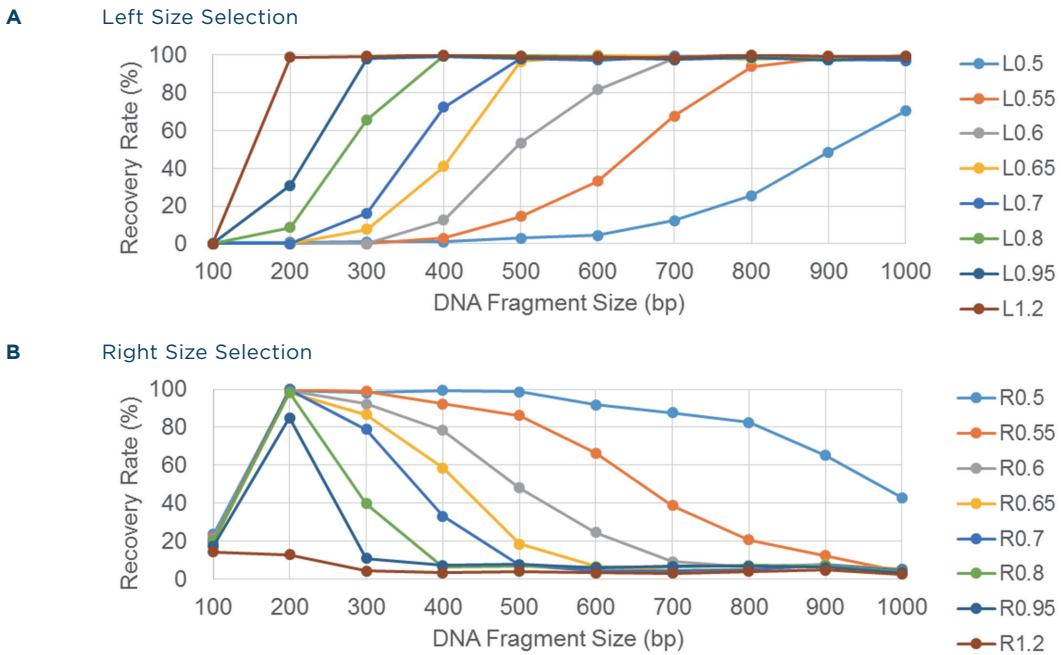

Figure 1. レフトサイズセレクションとライトサイズセレクションによる、各DNAサイズの回収率

ダブルサイズセレクションで得られるDNAサイズ分布のシミュレーション

Figure 1で得られたレフトサイズセレクションの各条件でのDNA回収率を、ライトサイズセレクションの各条件のDNA回収率で乗じることにより、ダブルサイズセレクションで得られるDNAサイズ分布のシミュレーションを行った。ダブルサイズセレクション0.8 – 0.6, 0.7 – 0.6, 0.65 – 0.55, 0.6 – 0.55の各条件について実験を行い、サンプルである100 bp DNA Ladderの各ピークの回収率をそれぞれ算出し、上述のシミュレーションの結果との比較を行った (Figure 2)。

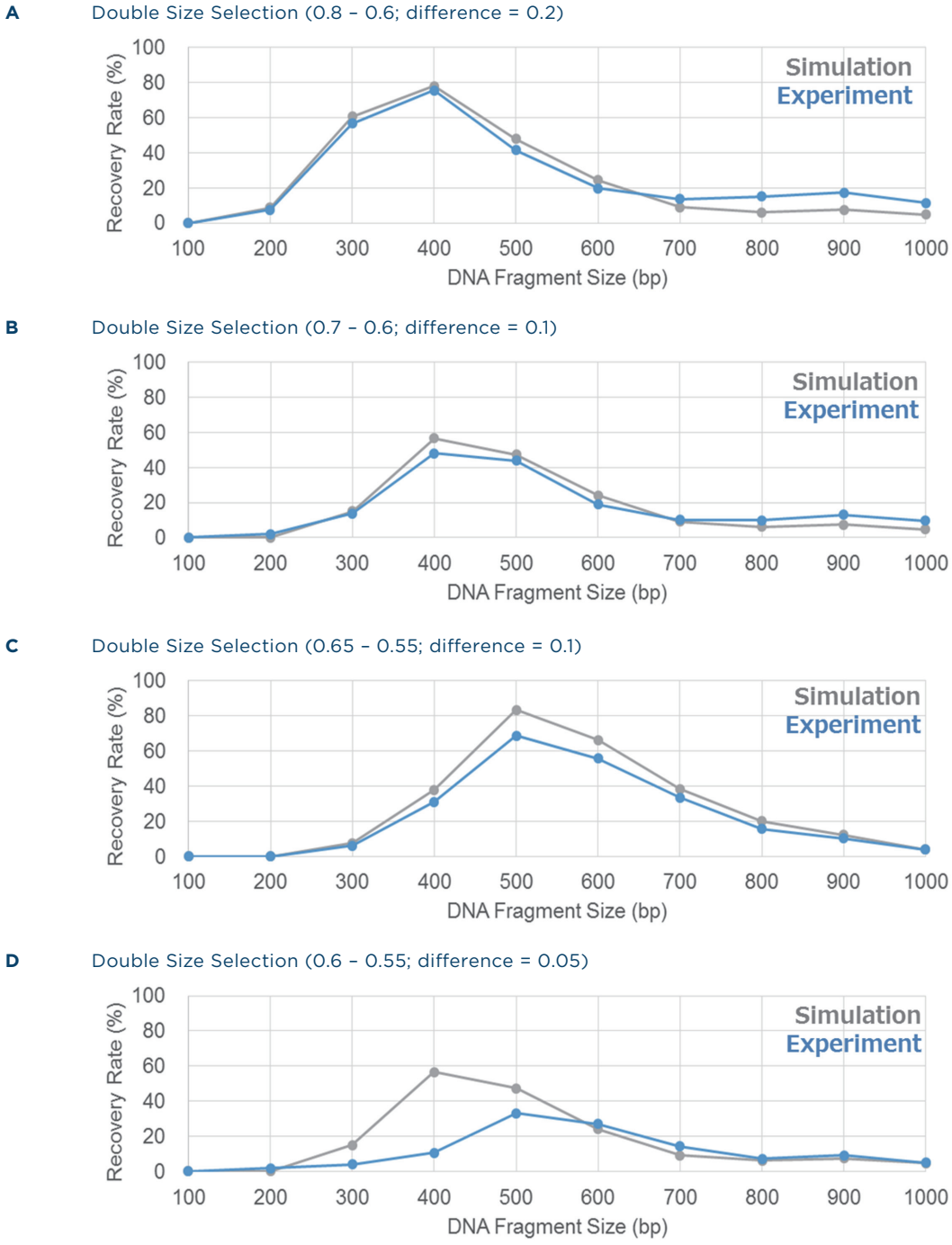

Figure 2. ダブルサイズセレクションによる、各DNAサイズ回収率のシミュレーション結果 (Simulation) と、ダブルサイズセレクション実験を行ったときのDNAサイズ回収率 (Experiment) の比較

レフトサイドとライトサイドの数値差が0.2である0.8 – 0.6のダブルサイズセレクションでは、シミュレーション結果と実験結果の間で回収率に著しい差異は見られなかった (Figure 2A)。数値差がそれぞれ0.1である0.7 – 0.6および0.65 – 0.55の場合には、実験結果がシミュレーション結果と比べて僅かに回収率が低下する傾向が見られた (Figure 2B and 2C)。さらに、数値差が0.05である0.6 – 0.55の場合には、シミュレーションで予想される回収率と大きな乖離みられた (Figure 2D)。レフトサイドとライトサイドの数値差が0.05のダブルサイズセレクション実験ではシミュレーション通りの結果が得られないことが、今回のデータから示された。

利用可能なダブルサイズセレクションの条件例

ダブルサイズセレクションで得られるDNAサイズ分布のシミュレーション結果について、レフトサイドとライトサイドの数値差が0.1以上あり、かつ最も回収率の高い断片長（極大）の回収率が40%以上である24条件をFigure 3に示した。

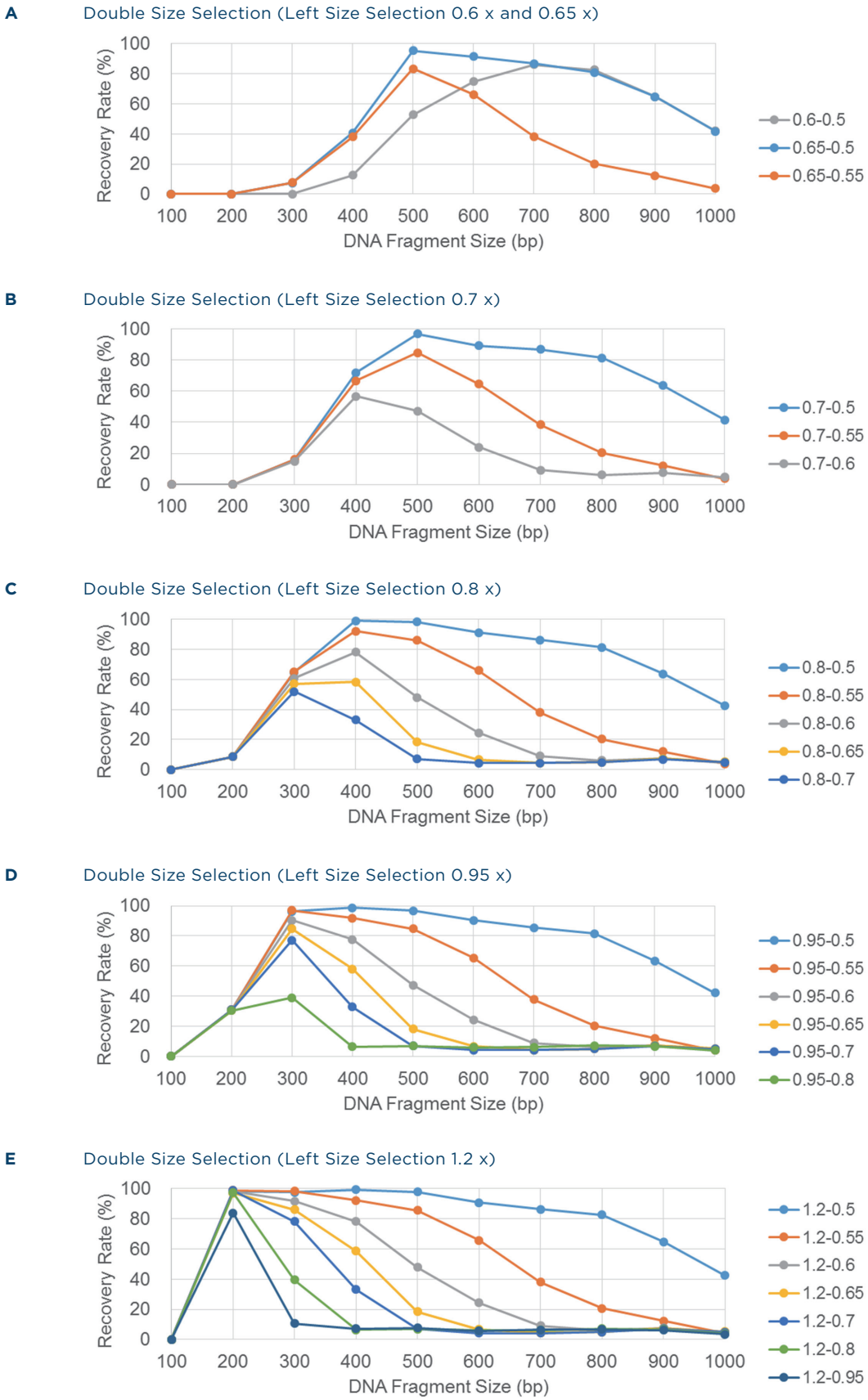

Figure 3. ダブルサイズセレクションによる、各DNAサイズ回収率のシミュレーション。サイズセレクションに適する条件のみを図示した

次世代シーケンシング用のライブラリサイズに頻用される300 bp, 500 bp, 700 bpなどにピークを持つ、DNAサイズセレクションに適した条件が得られた。Figure 3Eに示したレフトサイズセレクション1.2 xのダブルサイズセレクションの条件は、Figure 1Bで示したライトサイズセレクションの結果と類似しているが、前者は100 bp DNA断片が除去されることが相違点である。これは、プライマーやアダプターといった100 bp以下のDNAを除去可能な、ダブルサイズセレクションのメリットを示す一例である。

Conclusion

ダブルサイズセレクション条件の最適化についての検討を行い、次世代シーケンシング用のライブラリ作製に適した24の条件を示した。レフトサイドとライトサイドの数値差が0.05の条件は予測されるサイズセレクションの回収率との乖離が見られ、数値差0.1以上に設定することが推奨される。高分子量のゲノムDNAや100 bp以下のプライマーやアダプターを同時に除去し、さらに特定のサイズレンジのDNAを取得するダブルサイズセレクションは、次世代シーケンシングの前処理であるライブラリ調製過程のハイスループット化に大きな貢献を果たす。さらに、電気泳動ゲルからの切り出し、ゲルからのDNA抽出といった煩雑な作業を伴わない磁性ビーズによるDNAサイズセレクション法は、自動分注システムでの自動化にも対応しており、大量サンプルを処理する研究や遺伝子検査ラボなどでの使用にも適している。

ベックマン・コールター株式会社

本　　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp

2017.8-100(IH)