



ハイスループットゲノム DNAの切断

研究目的のみ

コンテンツ

導入

材料

方法

結果

- 1. 概要
- 2. 集中力
- 3. ボリューム
- 4. スピード
- 5. 時間
- 6. フラグメント長の最適化
- 7. 弓の種類
- 8. 空間的傾向
- 9. 交差汚染
- 10. 精度
- 11. 寛容

議論

変更ログ

導入

このプロトコルでは、2010 Geno/Grinder® 自動組織ホモジナイザーおよびセルライザー (GenoGrinder) と FastPrep-96™ ハイスルーブット ビーズビーティンググラインダーおよび溶解システム (FastPrep) を使用して、ライブラリの準備のために最大 192 個の DNA サンプルをせん断する方法を説明します。DNA の断片化を最適化するために、両方のデバイスを使用しました。この方法で、10、12.5、15、および 20 kb のシーケンス読み取り長 N50 分布が生成されました。これらの機器では、サンプルの処理にビーズを使用することはありません。

gDNA を 15 kb に切断するには、120 µl 中 30 ng/µl の gDNA サンプルで 1600 SPM で 5 分間という設定を推奨します。DNA サンプルと必要な断片サイズに応じて、さらに最適化が必要になる場合があります。切断される gDNA の品質も結果に影響します。

結果の詳細については、以下のセクションを参照してください。

材料

2010 Geno/Grinder® 自動組織ホモジナイザーおよびセルライザーの場合: _____

- [粘着性PCRプレートシール](#)(サーモフィッシャー、AB0558)
- [Hard-Shell® 96 ウェル PCR プレート、薄型、薄壁、スカート付き、白/透明](#) _____
(バイオラッド、HSP9601)
- [ネスティングトレイセット](#)(SPEXサンプル準備、2189T)
- [2010 Geno/Grinder® - 自動組織ホモジナイザーおよび細胞ライザー](#) (スベックス _____
サンプル準備)
- DNA QC機器、例 :Agilent Bioanalyzer 2100、Agilent Femto Pulse

FastPrep-96™ ハイスルーブットビーズビーティンググラインダーおよび溶解システムの場合: _____

- [粘着性PCRプレートシール](#)(サーモフィッシャー、AB0558)
- [ハードシェル® 96ウェルPCRプレート、低プロファイル、薄壁、スカート付き、白/透明](#) _____
(バイオラッド、HSP9601)
- [FastPrep-96™ ハイスルーブットビーズビーティンググラインダーおよび溶解システム](#) (MP _____
バイオメディカル、116010500)
- DNA QC機器、例 :Agilent Bioanalyzer 2100、Agilent Femto Pulse

方法

注: FastPrep の速度単位は 1 分あたりの回転数 (RPM) で、GenoGrinder の速度単位は 1 分あたりのストローク数 (SPM) です。ここでは、これらは同じ意味で使用されます。このプロトコルは、96 ウェル プレートの gDNA に対して検証されています。サンプルを 15 kb に切断するには、サンプルあたり 3.6 µg を使用して、ここで概説されている方法に従ってください。

1. ゲノムDNAサンプルの量をヌクレアーゼフリー水で120µlに調整し、
96 ウェルプレートに移します。
注: 推奨される 96 ウェル プレートを使用しない場合、せん断性能は最適ではないことがわかりました。
2. 96ウェルプレートを粘着PCRプレートシールで完全に密封します。シールアプリーケーターを実行します。
効果的な密閉のために各列と各行を貫通します。
注意: AriaMx 接着プレートシール (Agilent、401492) では効果的なシールができないことが判明したため、このせん断方法では推奨されません。
3. 選択したデバイスにプレートをロードします。
ジェノ/グラインダー: ネスティング トレイをデバイスに配置し、最大 2 つの 96 ウェル プレートのサンプルを並べてロードします。
サンプルのプレートが 1 つしかない場合は、空のプレートを使用してバランスを取ります。
サンプルプレートを反映するウェル内の空のプレートに水を追加することをお勧めします。
FastPrep-96: このシステムには、プレート ホルダーの両側に均等に分散して、合計 6 枚の 96 ウェル プレートをロードして、しっかりと固定する必要があります。4 枚の空のプレートと、その上に最大 2 枚の密封サンプル プレートをロードすることをお勧めします。サンプル プレートが 1 枚しかない場合は、バランスを取るために別の空のプレートを使用してください。サンプル プレートを反映したウェルの空のプレートに水を追加することをお勧めします。
4. ラチェットナット/回転ノブを回して、プレートをしっかりと締め付けます。
取得しました。
5. 選択したシステムを 1600 SPM で 5 分間実行し、gDNA を 15 kb の N50 に断片化します。
注: 結果のセクションでさらに説明されているように、機器の設定はユーザーのニーズに合わせて変更できます。
6. 断片化された DNA 1 µl を Agilent Femto Pulse で分析し、断片のサイズを評価します。
この gDNA は、その後、ライゲーション シーケンス キットを使用してシーケンス用に準備できます。

結果

概要

せん断結果に影響を与える 4 つの変数が見つかりました。せん断時間と速度、サンプルの濃度と量です (図 1 にまとめられています)。選択した機器でこれらを最適化することで、目的の断片長を得ることができます。これらを変更した場合に断片長がどのように影響を受けるかは、結果セクション 1 ~ 5 に示されています。これらのセクションの断片化は FastPrep を使用して実行され、結果は次のとおりです。

- サンプルの濃度または体積を増やすと、断片のサイズと分布が増加します。
- せん断時間または速度を増やすと、断片のサイズと分布が減少します。

シーケンス断片長の最適化、サンプルバッファーの種類、プレートの空間的傾向、相互汚染、せん断精度と許容度に関する結果を含む、さらなる結果がセクション 6 ~ 11 に示されています。これらのセクションの断片化は、GenoGrinder を使用して実行されました。

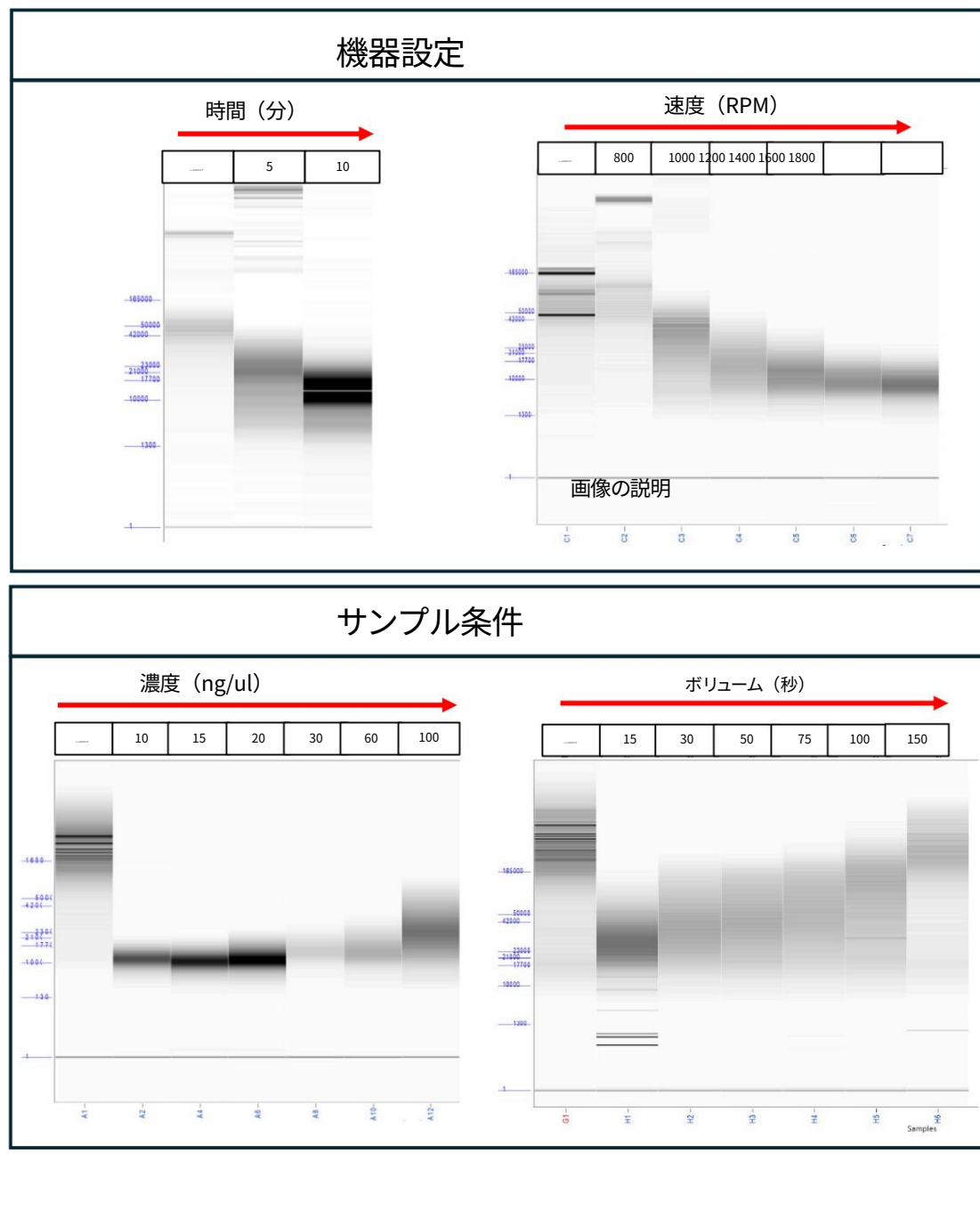


図1. 機器とサンプル条件がせん断結果に与える影響。ヒトgDNA
1回に1つの変数を変えて2回剪断し、フェムトパルスで分析した。
代表的な反復実験の結果がデジタルゲル画像上に表示されます。赤い矢印は
それぞれのパラメータの値が増加します。

集中

DNAのサイズと分布は濃度が増すにつれて増加する。ヒトgDNAは
25μlのヌクレアーゼフリー水で1800 RPMで5分間攪拌し、濃度を変えて分析した。

フェムトパルス（図2参照）より希釈されたサンプルでは、目立った変化は見られなかった。
サイズまたは分布（図3を参照）。

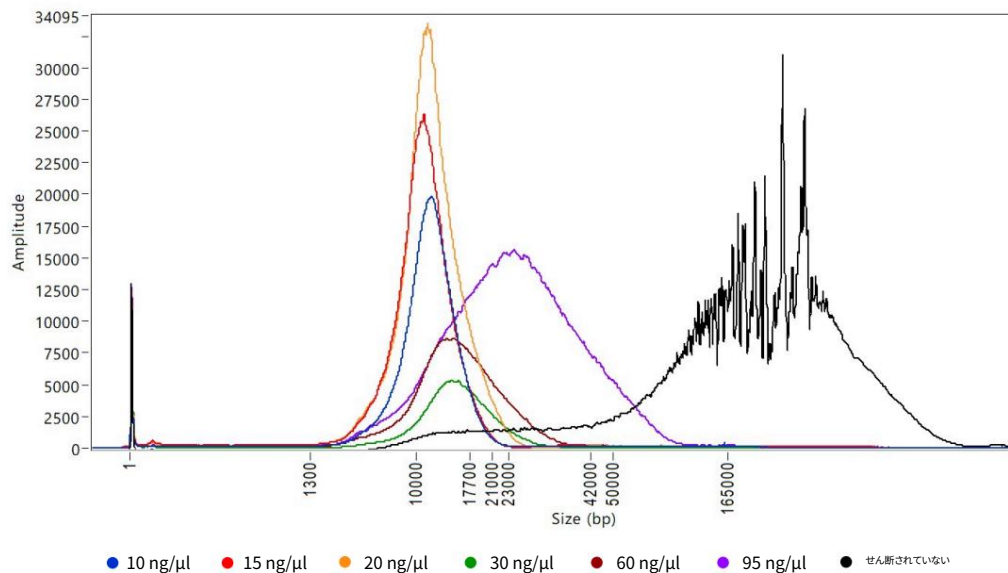


図2. サンプル濃度の変化がDNAの長さに与える影響。ヒトgDNAは切断された。
濃度を変えて、サンプルを2回剪断した。1回の剪断の結果は
代表的な複製が表示されます。

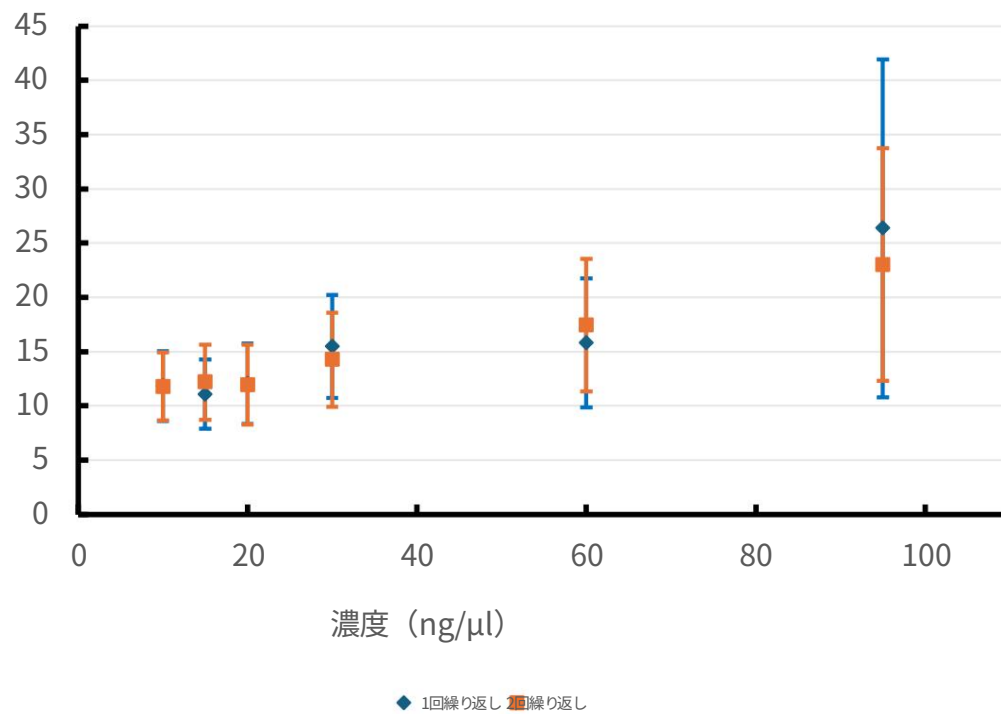


図 3. 異なる濃度でせん断されたサンプルのピークサイズと分布を示します。

平均ピーク サイズは、ProSize のスミア分析を使用して標準偏差エラー バーでマークされます。両方の複製のデータが表示されます。

音量

サンプル量を増やすと DNA のサイズは大きくなりますが、分布形状への影響は少なくなります (表 1 および図 4 を参照)。ヒト gDNA は、ヌクレアーゼフリー水の量を変えながら 55 ng/μl で 1400 RPM で 5 分間せん断され、Femto Pulse で分析されました。150 μl の量では効果的にせん断されませんでした。

表 1. 異なる容量のサンプルをせん断した後の平均ピークサイズ。サンプルは 2 回せん断されました。代表的な 1 回の反復の結果を示します。サイズは ProSize のスミア分析を使用して決定されました。

速度 (μl)	平均ピークサイズ (kb)
800	73.90
1000	26.60
1200	16.40
1400	12.80
1600	10.40
1800	9.40

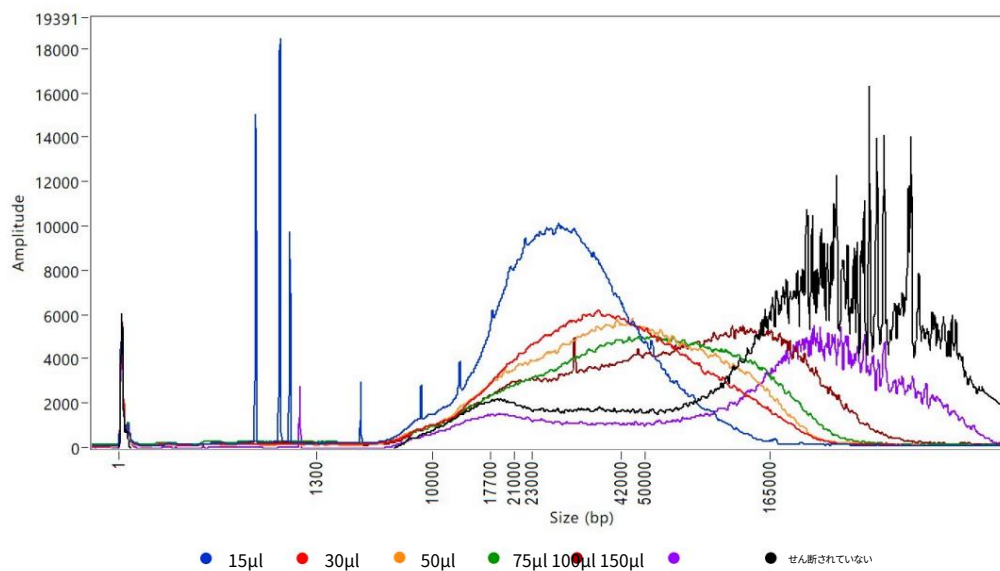


図4. サンプル量の変化がDNAの長さに与える影響。ヒトgDNAは体積を変えてサンプルを2回剪断した。代表的な1回の繰り返しの結果が表示されます。

スピード

せん断速度が増加すると、DNAのサイズと分布が減少する（表2および図5を参照）。ヒトgDNAは、25μlのヌクレアーゼフリー水中で55ng/μlで5分間、速度を変えながらせん断され、Femto Pulse で分析しました。800 RPM ではサンプルは効果的にせん断されませんでした。

表2. 異なる速度でせん断した後の平均ピークサイズ。サンプルは重複。代表的な1つの反復の結果を示します。サイズは、ProSize でのスミア分析。

容量 (μl)	平均ピークサイズ (kb)
15	34.26
30	52.46
50	58.56
75	69.20
100	89.18
150	158.61

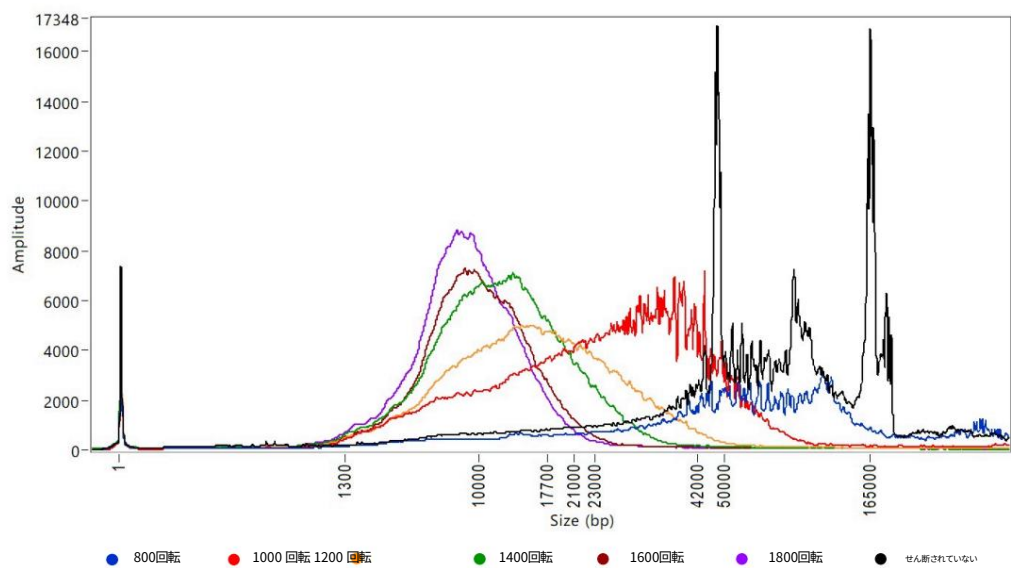


図5. 切断速度の変化がDNAの長さに与える影響。ヒトgDNAは、速度を変えて切断した。サンプルは2回切断した。代表的な1回の繰り返しの結果が表示されます。

時間

せん断時間が長くなると、DNAのサイズと分布が減少します（表3と図6を参照）。ヒトgDNAは、25μlのヌクレアーゼフリー水中で120ng/μlで1800RPMで5または10分間せん断された。分単位で計測し、Femto Pulseで分析しました。

表3. 5分および10分後のせん断後の平均ピークサイズ。サンプルは3回繰り返した。代表的な1回の繰り返しの結果が示されている。サイズは、ProSize でのスミア分析。

時間 (μl)	平均ピークサイズ (kb)
5	18.20
10	13.28

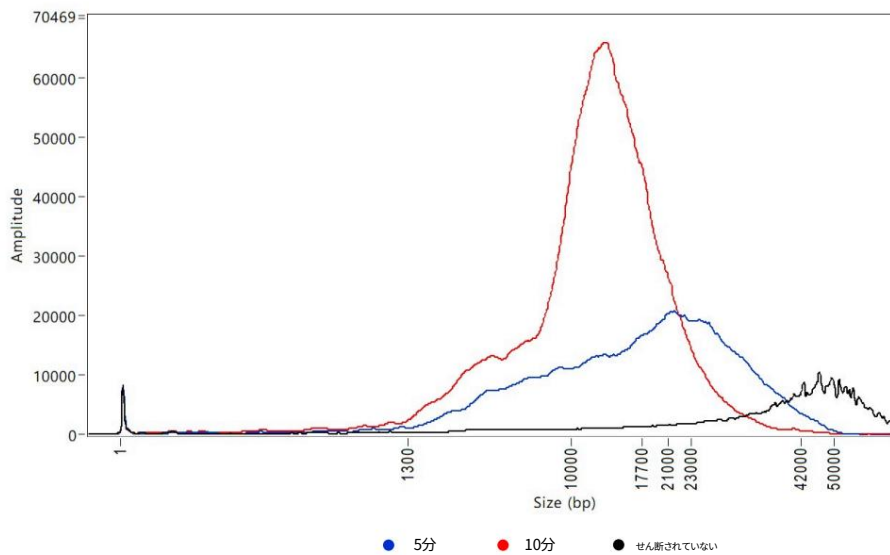


図6. 剪断時間の変化がDNAの長さに与える影響。ヒトgDNAは、5分または10分。サンプルは3回剪断された。1つの代表的な結果複製が表示されます。

フラグメント長の最適化

ヒトgDNAはN50分布の範囲に剪断された（図7参照）。サンプル濃度容量はそれぞれ30 ng/μlと120 μlであった。以下の機器条件で達成された。おおよその長さは次のとおりです。

• 10 kb (1750 RPM, 10分) • 12.5 kb (1750 RPM, 5分) • 15 kb (1600 RPM, 5分) • 20 kb (1400 RPM, 5分)

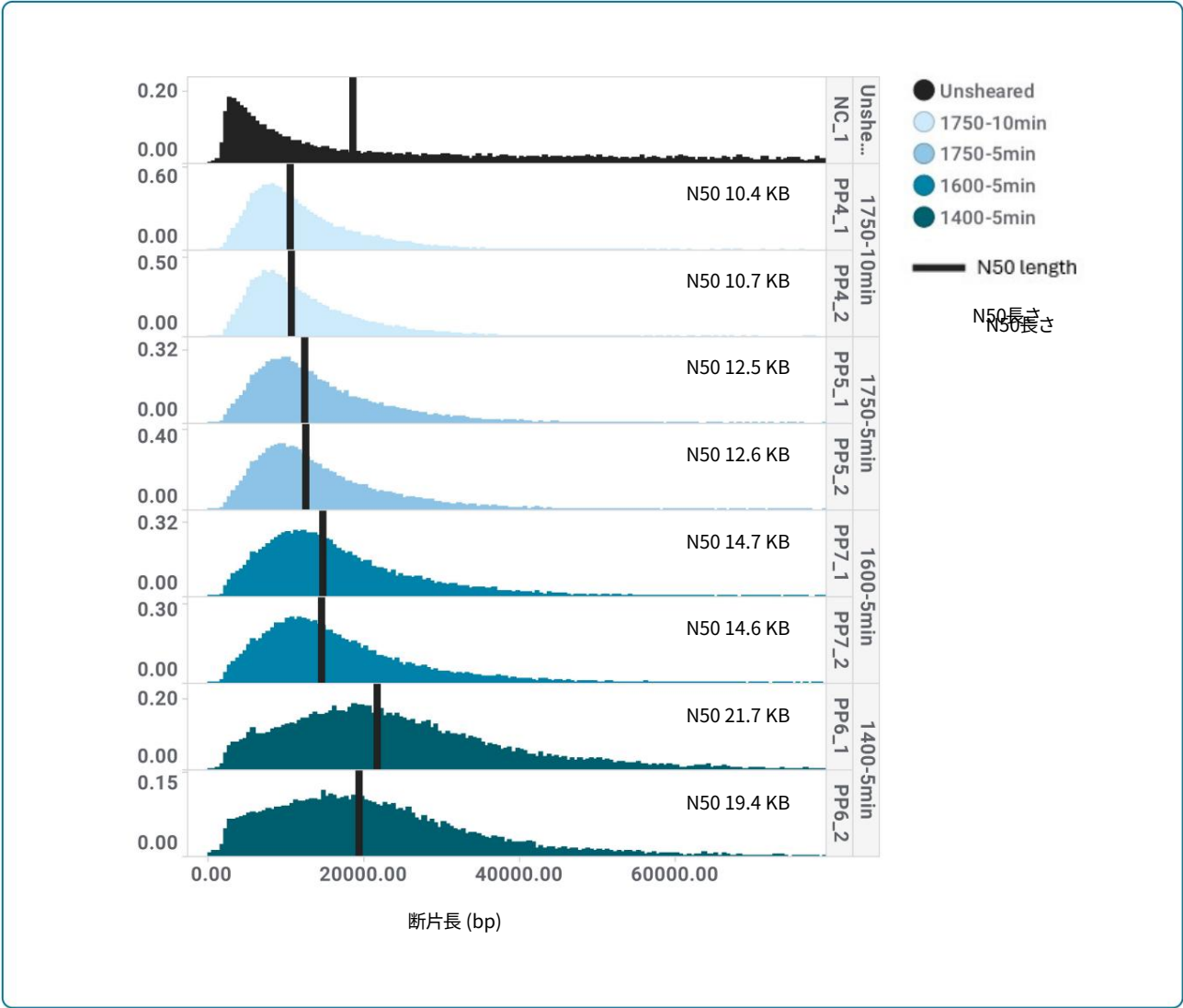


図 7. gDNA を N50 の長さの範囲に切断します。断片は、時間と速度の機器設定を変更することで、約 10 ～ 20 kb のサイズに 2 回切断されました。サンプルは、GridION 上の MinION/GridION フロー セルを使用して 24 時間シーケンスされました。

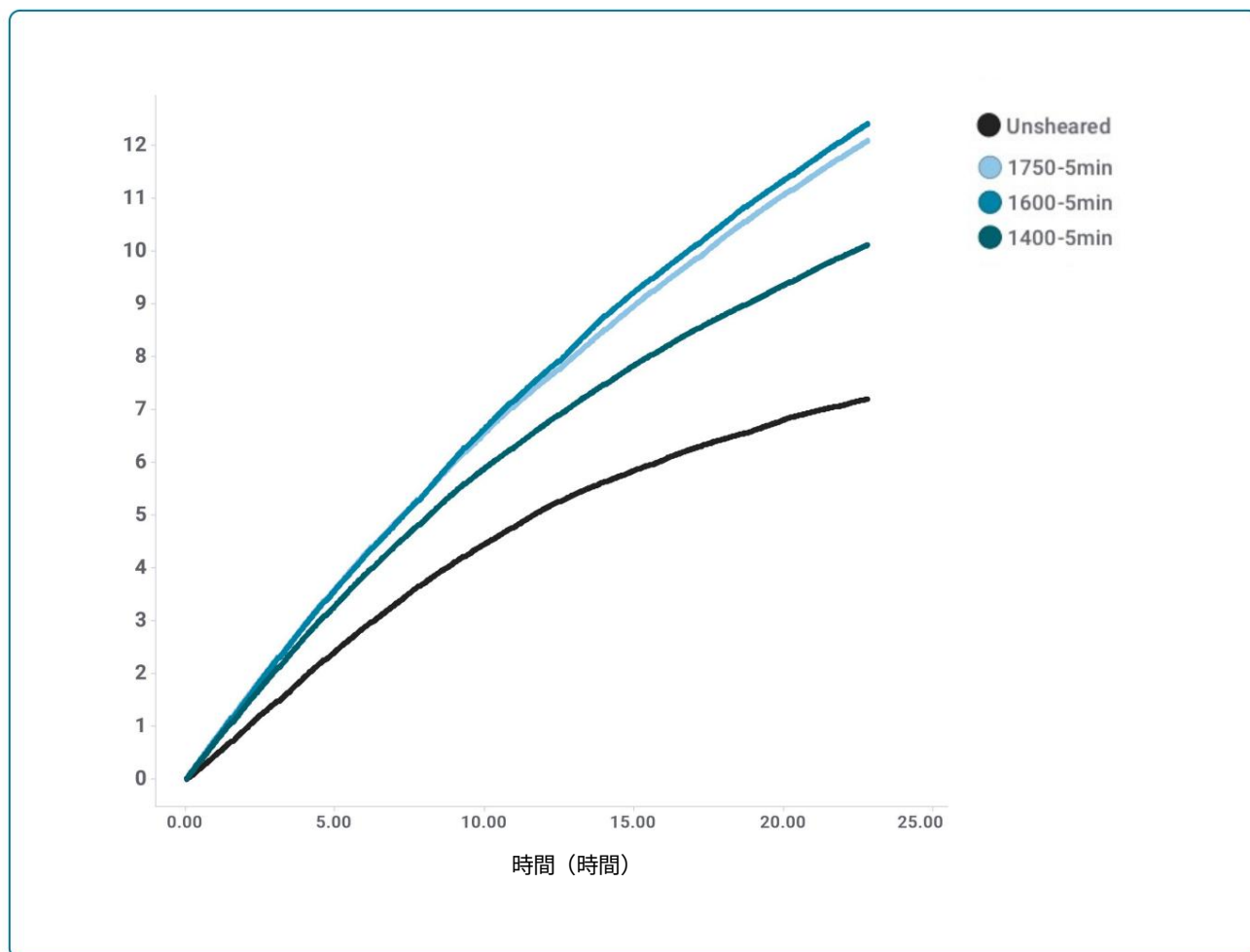


図 8. せん断された gDNA のシーケンス データ出力。せん断されたサンプルの出力は、2 つのサンプルの平均累積合計線として表示されます。サンプルは、GridION 上の MinION/GridION フロー セルを使用して 24 時間シーケンスされました。

弓の種類

gDNA をヌクレアーゼフリー水、トリス、または低 TE バッファーでせん断した場合、断片の長さに影響は見られませんでした (図 9 を参照)。サンプルの濃度と容量はそれぞれ 60 ng/μl と 50 μl で、1800 RPM で 5 分間せん断しました。すべてのサンプルは N50 が 17 kb にせん断されました。

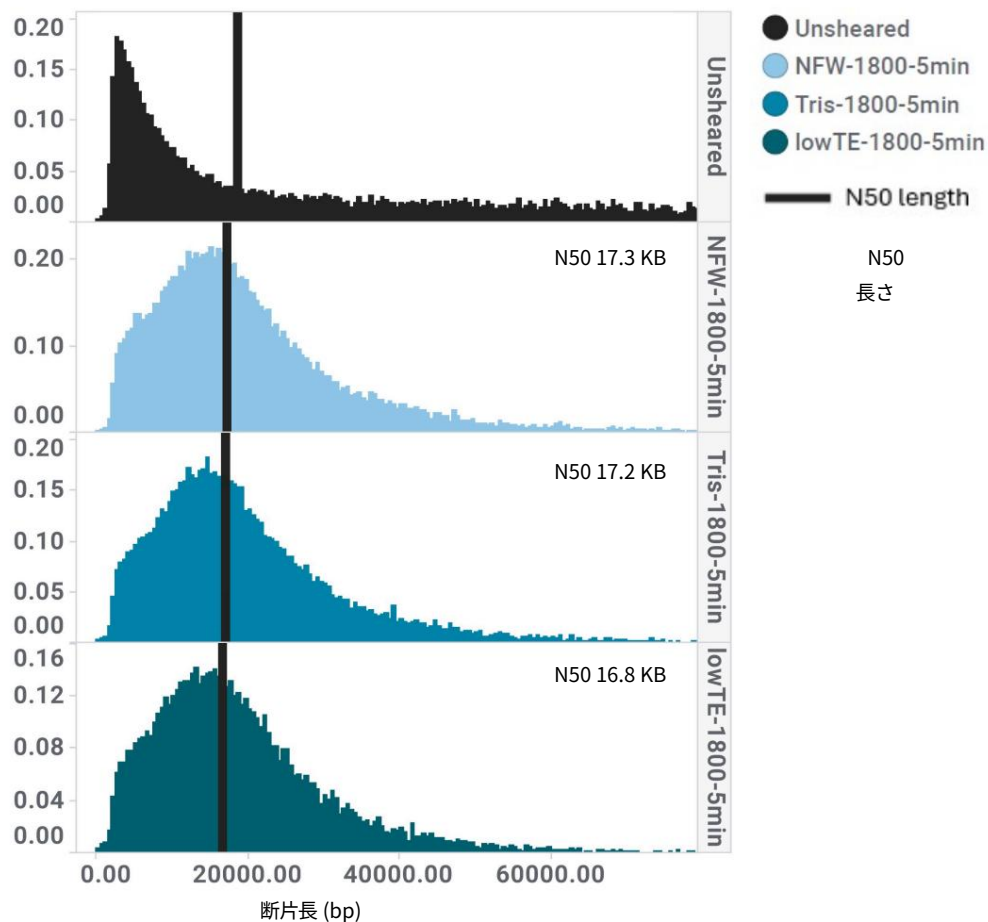


図 9. 異なるサンプル バッファーで gDNA をせん断しても、サイズ分布には影響がありませんでした。サンプルは、ヌクレアーゼフリー水、Tris、または低 TE バッファーでせん断され、GridION 上の MinION /GridION フロー セルで 24 時間シーケンスされました。

空間トレンド

96 ウェル プレート上のサンプルのせん断は、プレート上の位置とは無関係です。NEB 48 kb Lambda DNA は、プレートの端を並べ、中央をチェッカーボード状に横切るために使用されました。サンプルは、濃度と容量がそれぞれ 50 μ l で 60 ng/ μ l であり、1800 RPM で 5 分間せん断されました。プレート全体から 8 つのサンプルを 24 時間かけてシーケンスしました。N50 は 12.43~13.58 kb の範囲で、プレートの位置とフラグメントの長さの間には相関関係は見られませんでした (図 10 を参照)。

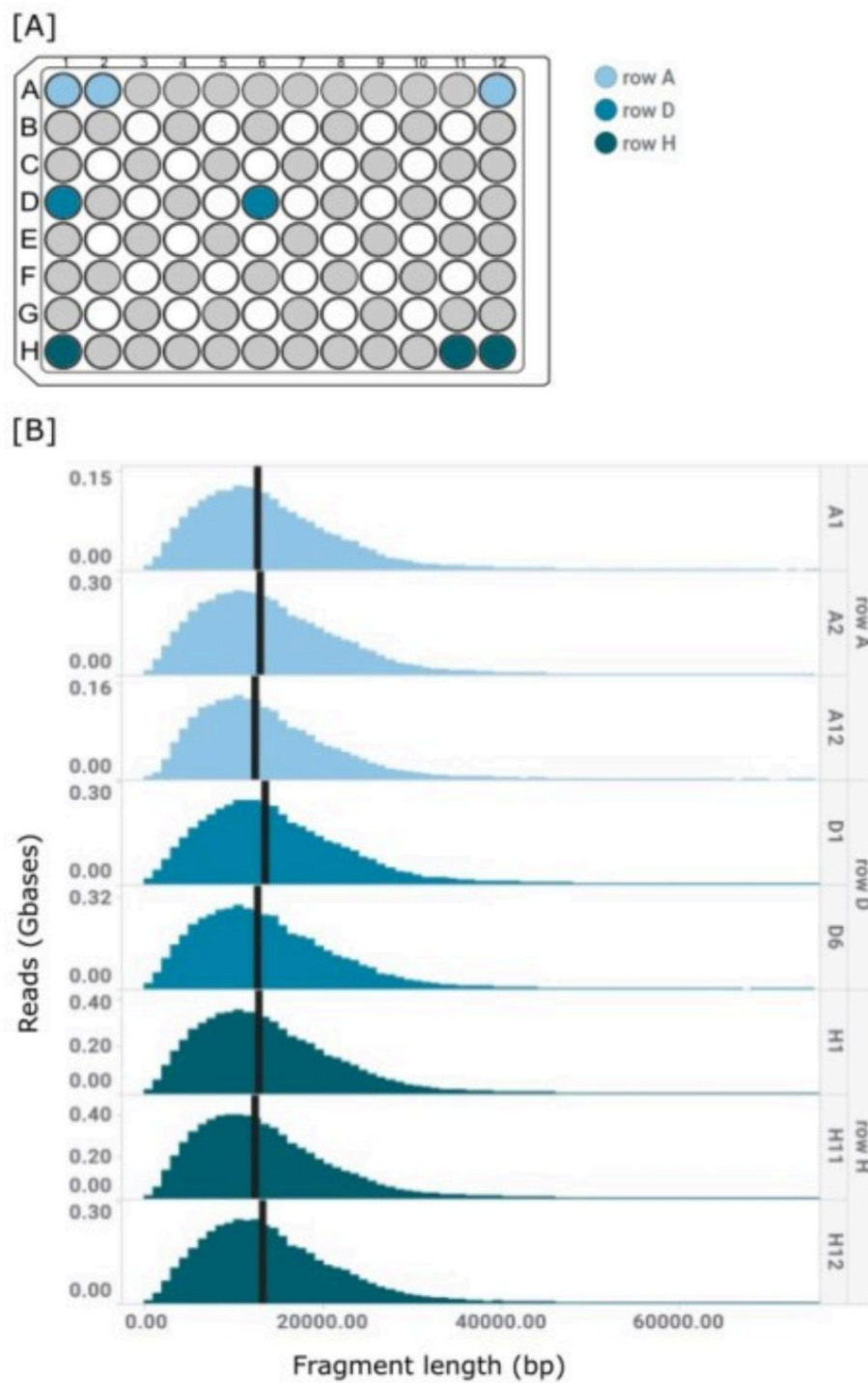


図 10. せん断されたサンプル配列の分布は、96 ウェル プレート の空間的な配置とは無関係です。[A] ここに示されているのは、せん断中のプレート上のサンプルの配置です。解析された各サンプルが取得された行は、凡例とプレートに示されています。[B] ここに示されているのは、解析されたフラグメントのライブラリ フラグメント分布です。黒い線は N50 を示しています。

交差汚染

粘着シール付きの 96 ウェル プレート进行处理しても、ウェル間の相互汚染は発生しませんでした。NEB ラムダとブランクのヌクレアーゼフリー水をプレートにロードし、せん断してシーケンスしました。ブランク ウェルのすべてのシーケンス データは整列されておらず、相互汚染が発生していないことが示されました (図 11 を参照)。

追加のテストは、食品着色料とヌクレアーゼフリーの水のブランクのチェッカーボード プレートを使用して行われました。テストされた 67 枚のプレートのうち、65 枚のプレートではウェル間の漏れは発生していませんでした。漏れが発生した 2 枚のプレートは、せん断前に加熱した蓋で培養されていました。

この加熱によりシール接着剤が損なわれるため、この方法では推奨されません (データは示されていません)。

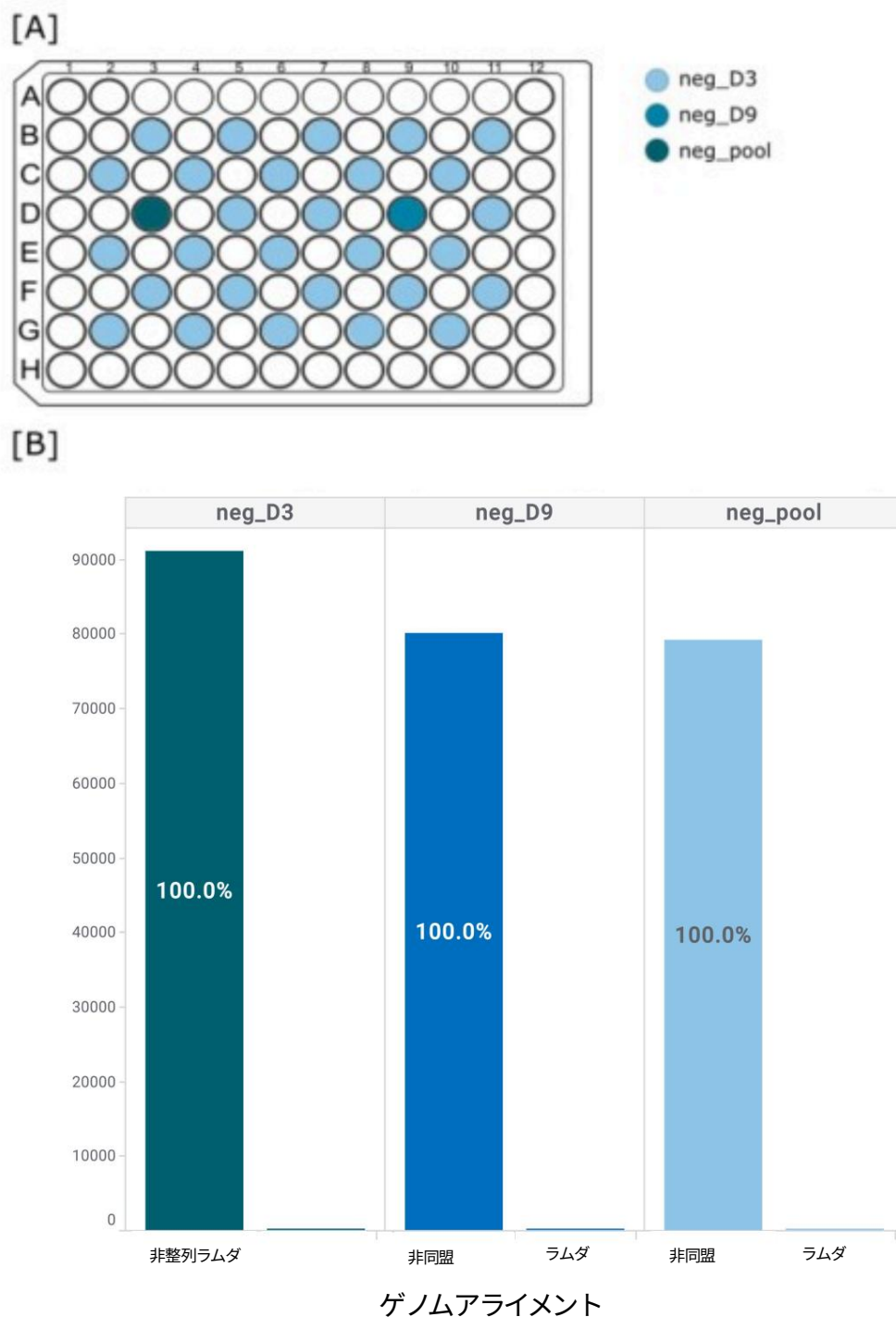


図 11. シーケンシング中にウェル間のクロスコンタミネーションは検出されません。[A] 処理されたプレートのレイアウトを示します。凡例は、分析用に収集された 3 つのサンプルグループ、ブランクウェル D3 (青緑) と D9 (濃い青)、およびすべてのブランクウェルのプール (薄い青) を示しています。

白いウェルにはラムダ DNA が含まれていました。[B] 各サンプルについて、アラインされていない読み取りとアラインされた読み取りが表示されます。サンプルは、GridION 上の MinION/GridION フローセルで 24 時間シーケンスされました。

精度

せん断精度は、3つのプレートに均等に分散された9つのサンプルを処理することによって決定されました。最も遅い速度、最も速い速度、および2つの中間の速度を表す4つの速度がテストされました。MinION/GridION フローセルで24時間シーケンスした後、N50の変動性を比較しました。

各速度のサンプルで1 kb未満の四分位範囲が観察されました (図12を参照)。すべての速度のプレート間でサンプルのプレート間CVは10%未満でした (図13を参照)。同じプレート上のサンプルでは、プレート内CVも10%未満でした (図示せず)。

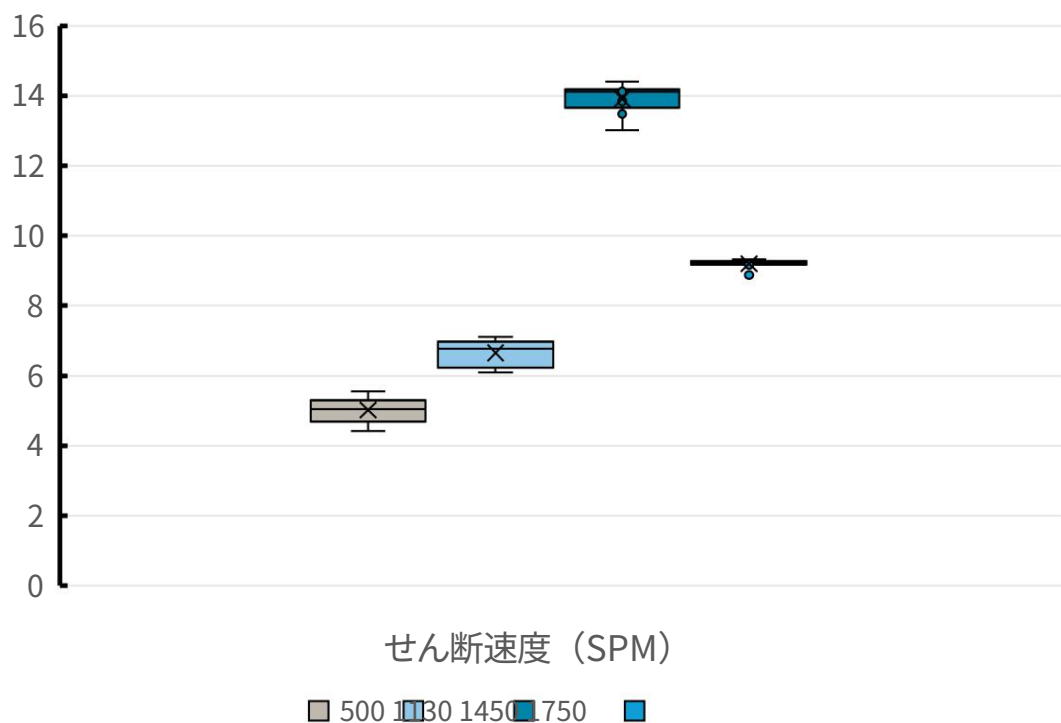


図12. 3つのプレートに均等に広がった9つの剪断されたヒトgDNAサンプルの分散。各プレートは別々に処理され、4つの速度がテストされました。

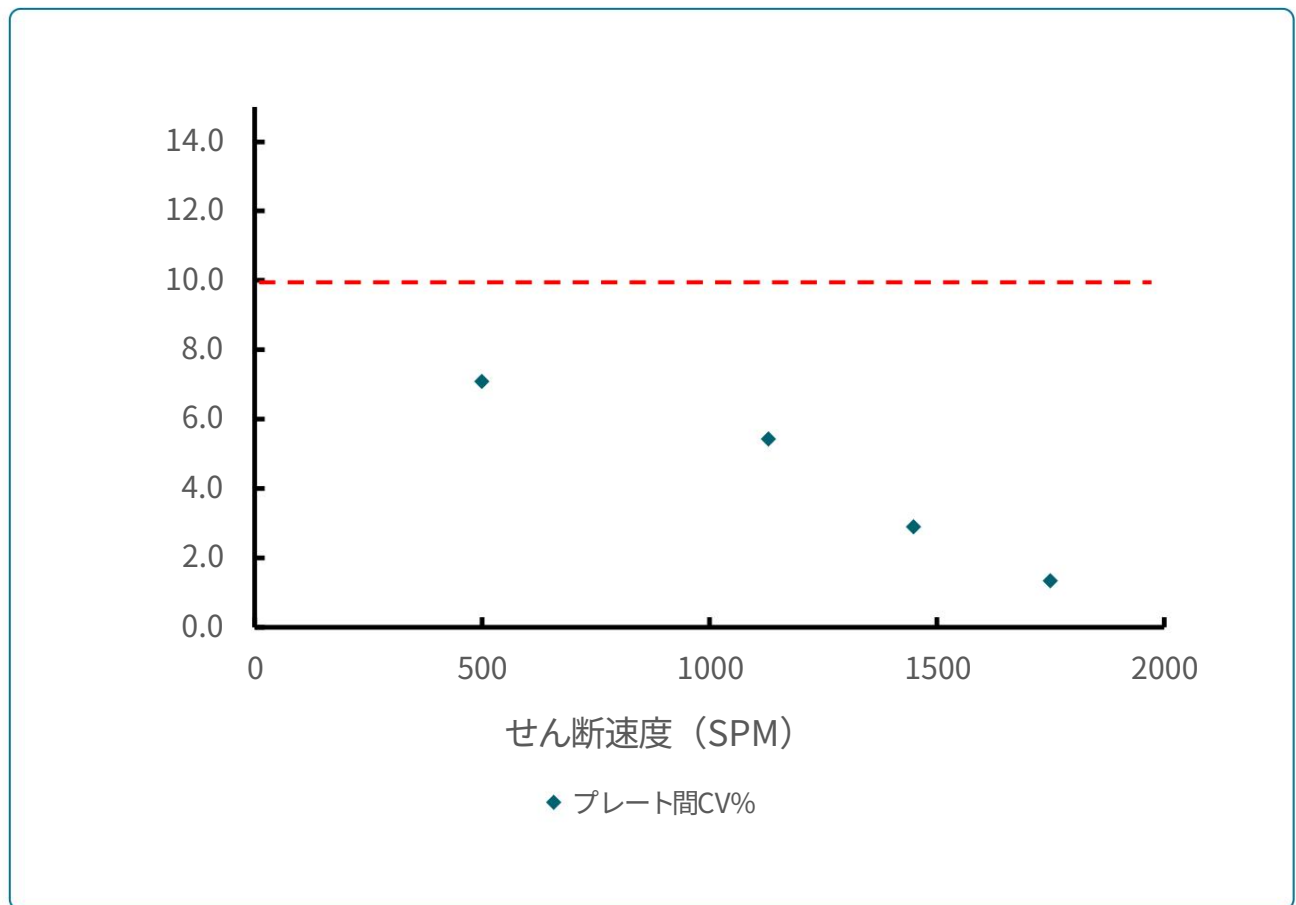


図 13.異なる速度でせん断されたサンプルのプレート間の変動。3つのプレートに均等に広げられた9つのせん断されたヒト gDNA サンプルの観測された CV が表示されます。4つの速度がテストされました。赤い線は CV % が 10%であることを示します。

許容範囲

110 μ l のヌクレアーゼフリー水中で 30 ng/ μ l を 5 分間 1450 SPM で処理するというせん断条件を前提として、規格外サンプルの結果を近似するために、この範囲から逸脱する濃度と容量の範囲をテストしました。30 ng/ μ l の 80、90、110、120% の濃度をテストし、110 μ l の 95、105、110% の容量をテストしました。濃度偏差が N50 と N10/N90 に与える影響を図 13 に示します。N10/N90 が 1 の場合は、単一のフラグメント長を表します。N50 は変化していませんが、N10/N90 は、濃度が 80% から 120% に移行すると分布の広さが増大します (図 13 を参照)。せん断結果は、テストした容量範囲では変化しませんでした。

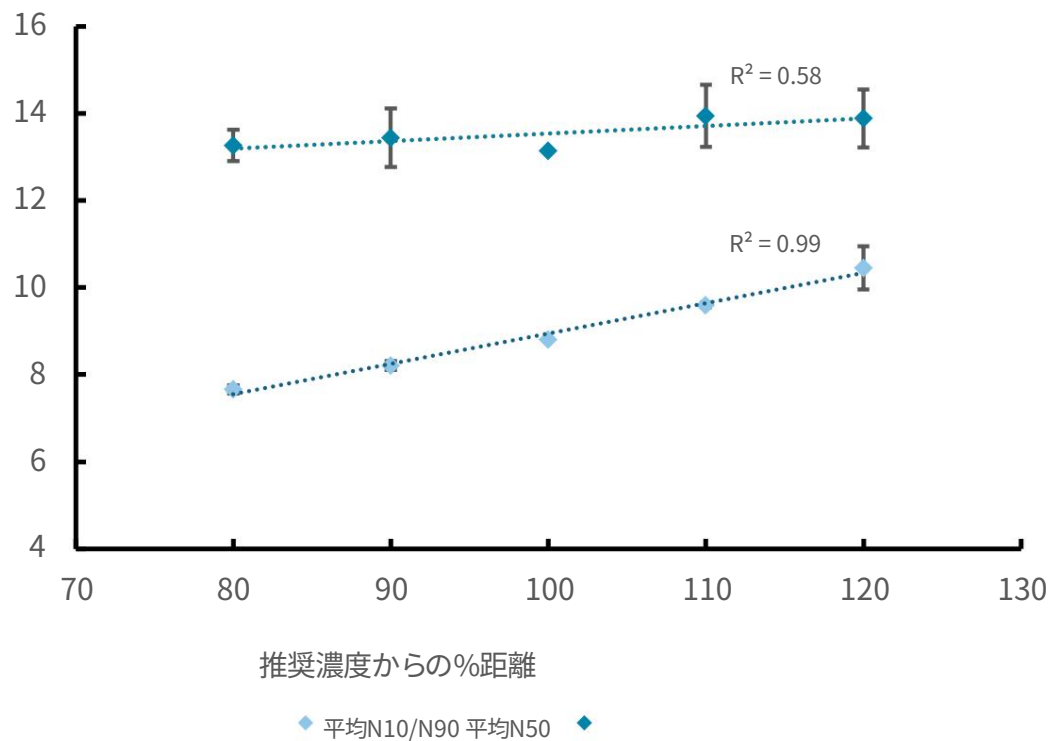


図 14. ここに示されているのは、指定された条件 (ここでは 30 ng/μl で、100% として表される) から濃度を段階的に変化させてせん断されたサンプルのフラグメント分布です。

議論

この文書では、DNA 切断アプリケーションにおける GenoGrinder と FastPrep の適合性を証明する包括的なテストを紹介します。GenoGrinder は Fastprep よりも優れた点があり、推奨される切断装置です。たとえば、GenoGrinder の速度増分は 10 SPM ですが、FastPrep では 100 RPM であるため、フラグメント サイズの調整をより正確に行うことができます。

変更ログ

バージョンの変更	
v5、2025年3月	はじめにが更新されました。 新しい推奨手順とヒントで方法が更新されました: 96 ウェル プレートで 1 ウェルあたり 120 µl の容量で 3.6 µg を使用して 15 kb に剪断するための推奨事項。 結果セクションの全面的な見直し : 情報とデータのための新しいセクションを追加しました。これで 結果の概要、濃度の考慮、ボリューム、速度、時間、フラグメントの長さの最適化、バッファーの種類、空間的傾向、相互汚染、精度、および許容範囲に関する情報が含まれます。 要約/結論としてディスカッションセクションを追加しました。 変更ログを別のセクションに移動しました。
v4、2023年8月	文法上の誤りを修正し、図 5 と 6 を更新しました。表 5 は g-TUBE ユニットを含めるように更新されました。
v3、6月 2023	表と図の凡例を含む結果セクションのフォーマットを変更し、再現可能な N50 読み取り長さを修正しました。プレートのシーリング推奨事項とプレートのバランスを更新しました。ビーズなしで使用するせん断パラメータを明確にしました。
v2、5月 2023	推奨パラメータを更新し、ジェノグラインダーの推奨事項を追加しました
v1、8月 2020	最初のプロトコルの公開