

Technical Data

BluePippinと SageELFの回収率比較

ブロードバンドで抽出できるBluePippin
マルチフラクションで取り逃さないSageELF
それぞれの特徴が確認いただけます。



評価製品

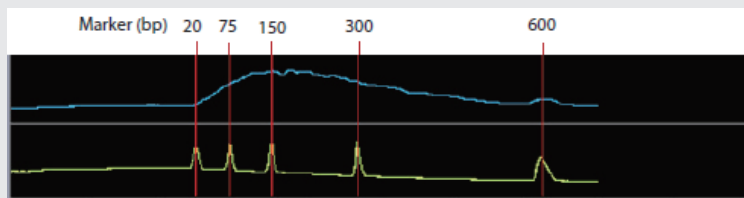
BluePippin 本体 (17インチモニター、キーボード、マウス付属) (Cat.No. BLU0001)
2% Dye Free カセット (インターナルマーカ V1) (Cat.No. BDF2010)
SageELF 本体一式 (PC、モニター、キーボード、マウス付属) (Cat.No. Sage ELF0001)
2%カセット (Cat.No. ELD2010)

目的

標準的なillumina Pair End Seq Library のサイズセレクションを想定した300bpから500bp (~ 700bp) 位の抽出効率の比較

評価方法

Sage Science社 2%コントロールDNA (スミアDNA) をそれぞれBluePippinおよびSageELFで分画し、抽出サンプルをBioanalyzer, Qubitで測定して、回収率を比較した。
input DNA : 2%コントロールDNA (スミアDNA) #CON2004 30μL/Lane (BluePippin, SageELFともに)



Bioanalyzer : Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chip #5067-4626
サイズ確認、Region Tableによる濃度測定と回収率概算

Qubit : Qubit dsDNA HS Assay Kit #Q32851
濃度測定 *SageELFのみフラクション総量での回収率概算

実験に用いた弊社機器と試薬

Size Selection



Sage Science
BluePippin 本体 (17インチモニター、キーボード、マウス付属)
(Cat.No. BLU0001)

機器の設定値

BluePippin

2% Dye Free カセット (インターナルマーカ V1)
#BDF2010
Range mode : 300-500bp,
300-600bp,
300-700bp

製品PR, 対応NGSアプリケーション

- Pair End Seq
- ChIP Seq
- RNA Seq
- Mate-Pair Seq
- micro RNA Seq
- PacBio SMRTbell
- PacBio Iso-Seq

Fractionation



Sage Science
SageELF 本体一式 (PC、モニター、キーボード、マウス付属)
(Cat.No. Sage ELF0001)

機器の設定値

SageELF

2% カセット (マーカ O2)
#ELD2010

Lane	4	5	6	7	8	9	10
設定Size (bp)	243	300	369	445	534	636	751

← 設定値

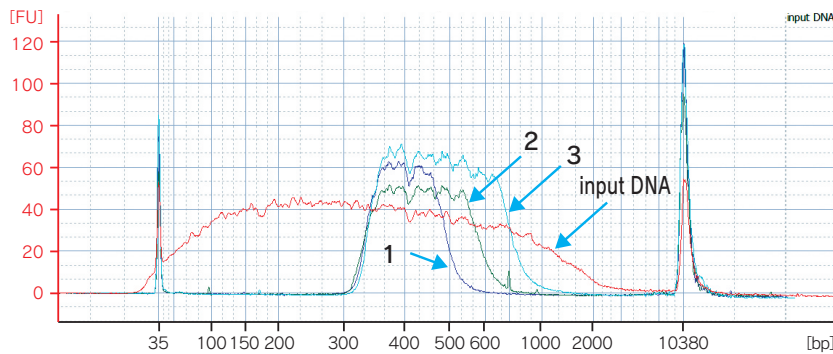
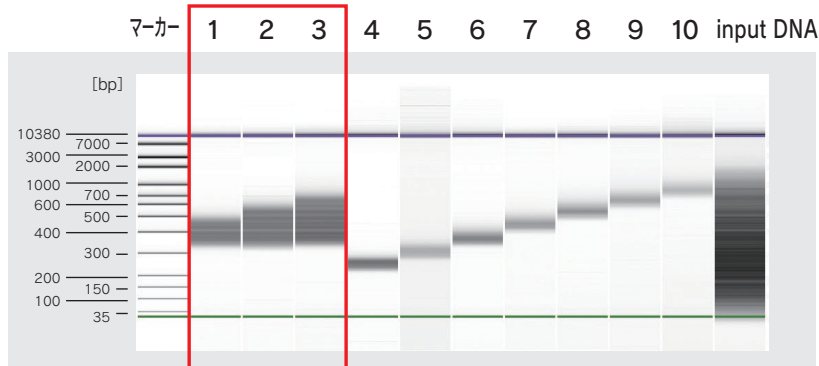
製品PR, 対応NGSアプリケーション

- Pair End Seq
- Mate Pair Seq
- PacBio Iso-Seq
- RNA-Seqでのデータ解析 (アセンブル) の複雑さを軽減
cDNAサンプルをSageELFでサイズ別にフラクション分離して、それぞれのフラクション毎に異なるbarcode index付きライブラリーを作製。このライブラリーをNGS解析する際に、barcode index毎にフラクションのサイズ情報を利用することで、解析上で発生し易いキメラ・コンティグを軽減させることが可能

結果

Size Selection

BluePippinを使用してサイズ分画した結果は下記である



ポイント

- 各抽出がそろって約300bpで始まっている
- 台形のレンジピークが抽出幅に従って広がっている

No.	Target size (bp)	Eluted sample Region							Input DNA Region			
		Elution vol (uL)	Dilution	BA Start (bp)	BA End (bp)	BA Ave (bp)	Elu conc. (pg/uL)	Elution Yield (ng)	Input region Conc (pg/uL)	Input Vol (uL)	Input amount (ng)	Region Recovery
1	300-500	43	14	301	598	411	731.2	440.2	1491.6	30	894.9	49.2%
2	300-600	40	15	305	807	449	942.0	565.2	1704.5	30	1022.7	55.3%
3	300-700	43	14	312	1269	497	1135.2	683.4	1796.7	30	1078.0	63.4%

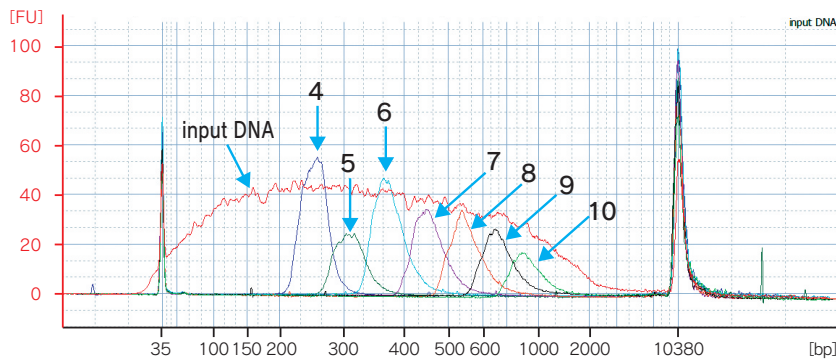
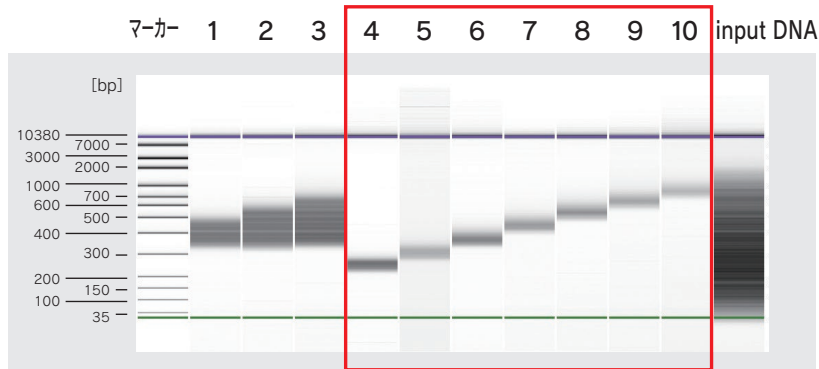
Bioanalyzer結果との比較

	Bioanalyzer		Qubit
	Target size (bp)	Elution Yield (ng)	Elution Yield (ng)
1	300-500	440.2	455.8
2	300-600	565.2	612.0
3	300-700	683.4	860.0

まとめ

設定したターゲットサイズとBioanalyzerでの測定値 (Region Table) は概ね同じ結果が得られた。BluePippinのRange抽出は、BioanalyzerのRegion Tableで換算して、約50-60%の回収率が得られた。また収量の算出でBioanalyzerとQubitはほぼ同じ値が得られた。

SageELFを使用してサイズ分画した結果は下記である



ポイント

- 各フラクションが三角形のピークになっている
- となりのピークとオーバーラップしている

No.	Target size (bp)	Eluted sample Region							Input DNA Region			
		Elution vol (uL)	Dilution	BA Start (bp)	BA End (bp)	BA Ave (bp)	Elu conc. (pg/uL)	Elution Yield (ng)	Input region Conc (pg/uL)	Input Vol (uL)	Input amount (ng)	Region Recovery
4	243	30	20	207	322	255	418.0	250.8	1218.6	30	731.1	34.3%
5	300	30	20	261	393	313	210.3	126.2	1136.4	30	681.9	18.5%
6	369	30	20	319	501	379	282.3	169.4	1063.9	30	638.3	26.5%
7	445	29	20	388	632	462	204.0	118.3	862.4	30	517.4	22.9%
8	534	29	20	464	1000	566	187.9	109.0	778.2	30	466.9	23.3%
9	636	30	20	545	1580	712	146.7	88.0	582.2	30	349.3	25.2%
10	751	28	20	656	1724	932	93.0	52.1	361.1	30	216.7	24.0%
	input DNA	30	20	207	1724	486	2984.4	1790.6				

Bioanalyzer結果との比較

	Bioanalyzer		Qubit
	Target size (bp)	Elution Yield (ng)	Elution Yield (ng)
4	243	250.8	226.2
5	300	126.2	133.2
6	369	169.4	179.4
7	445	118.3	140.4
8	534	109.0	131.7
9	636	88.0	94.2
10	751	52.1	58.8
Total Yield		913.8	963.8
Input DNA Region		1790.6	
Region Recovery		51.0%	53.8%

まとめ

設定したターゲットサイズとBioanalyzerでの測定値 (Region Table) は概ね同じ結果が得られた。また収量の算出でBioanalyzerとQubitはほぼ同じ値が得られた。SageELFは個々のフラクションはBioanalyzerのRegion Tableで換算して、約20-35%の回収率であった。また全フラクションでの回収率は約51~54%であった。

回収率の計算方法

-Bioanalyzer Region table 機能での概算

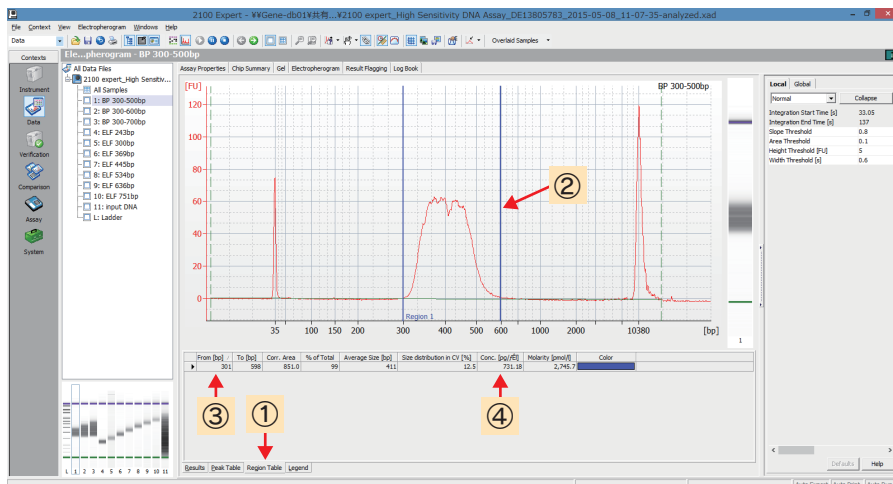
*Bioanalyzerソフトの操作方法は、機器の取扱説明書をご確認ください

*泳動ピークの面積による概算方法なので、ロード量での移動度やピーク感度の影響を受けます
参考値としてご利用ください

- ① Region table タブで抽出サンプルのデータを開く
- ② 新規領域でピークの範囲を作成する
- ③ ロードしたサンプル中での該当領域のDNA濃度を概算する
- ④ ピークの領域 (FromとTo) の数値を確認する

→この値を、同時に泳動

例：DNA7500チップ レーン1 サンプルNo.1 BluePippin回収 Sample



- ⑤ Region table タブで抽出元サンプル (input DNA) のデータを開く

⑥ 新規領域でピークの範囲を作成する。

⑦ モディファイでFromとToを前述4の値を入力する

⑧ 抽出元サンプル中での該当領域のDNA濃度を概算する

例：DNA7500チップ レーン10 精製済み抽出元サンプル



- ⑨ 前述の3と8の濃度値、およびサンプルロード時の希釈情報から回収率を算出する。

例：DNA7500チップ レーン1 サンプルNo.1 BluePippin回収 Sample

DNA7500チップ レーン11 input DNA

$$\begin{aligned}
 \text{回収率 (\%)} &= \frac{\text{算出濃度 } \textcircled{4} \times \text{Bioanalyzerロード時の希釈倍率} \times \text{BluePippinからの回収液量}}{\text{算出濃度 } \textcircled{8} \times \text{Bioanalyzerロード時の希釈倍率} \times \text{BluePippinへのロード液量}} \times 100 \\
 &= (731.18 \text{ pg}/\mu\text{L} \times 14 \times 43 \mu\text{L}) \div (1491.57 \text{ pg}/\mu\text{L} \times 20 \times 30 \mu\text{L}) \times 100 \\
 &= 49.18 \dots \\
 &\approx 49.2 \%
 \end{aligned}$$