

NGS 解析にあたっての DNA サンプルの準備について

目次

<参考>DNA の抽出・精製方法.....	2
DNA の必要量及びクオリティチェックについて.....	3
お問い合わせ先.....	5

<参考>DNA の抽出・精製方法

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用

※スタートサンプル量に関する詳細は、DNeasy Blood & Tissue Kit 英語版 Handbook 17 ページの”Quantification of starting material”を参照。

1. ペレットに 180 μ L の Buffer ATL を加え、Vortex で懸濁する。
2. 20 μ L の Proteinase K を加え、55°C で 1 晩インキュベートする。
3. 4 μ L の RNase A (100 mg/mL) を加えて、室温で 2 時間インキュベートする。
4. 10 秒間 Vortex にかき、15,000 rpm、5 分遠心し、上清を回収する。
5. 180 μ L の Buffer AL を加えて Vortex にかける。
6. 200 μ L のエタノールを加え、Vortex で十分に混和する。
7. サンプル溶解液を DNeasy Mini Spin Column に移す。エタノールの添加により白色の沈殿物が生じることがあるが、沈殿物もすべてカラムに移す。
8. 10,000 rpm、2 分遠心し、チューブと溶液を捨てる。
9. 新しいチューブにセットし、500 μ L の Buffer AW1 を加える。
10. 10,000 rpm、2 分遠心し、溶液を捨てる。9-10 をもう 1 度繰り返す。
11. 新しいチューブにセットし、500 μ L の Buffer AW2 を加える。
12. 15,000 rpm、2 分遠心し、溶液を捨てる。11-12 をもう 1 度繰り返す。
13. 溶液のみ捨てた後、再度 15,000 rpm、2 分遠心する。
14. カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、50 μ L の Buffer AE をメンブレンに添加し、室温で 2 分インキュベートする。
15. 15,000 rpm、2 分遠心し、さらに 50 μ L の Buffer AE を加える。
16. 15,000 rpm、2 分遠心し、チューブに回収した溶液を DNA 溶液とする。

※下線部は、より純度を上げるためにマニュアルから変更した部分。

※細胞数が多い場合には、液量を 2 倍にする。

ただし、カラムは 1 本にまとめた方が収率が良い。

DNA の必要量及びクオリティチェックについて

必要量 使用キットによって異なります。

<TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit の場合>

必要量は **2,200 ng**、液量は最大 **55 μ l** です。

<TruSeq Nano DNA Library Prep Kit の場合 (PCR によるバイアスがかかります) >

必要量は **200 ng**、液量は最大 **52.5 μ l** です。

どちらのキットを使用するかは、サンプル濃度等によって変更します。

詳しくは遺伝子実験棟までお問い合わせ下さい。

TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit について↓

<http://jp.illumina.com/products/truseq-dna-pcr-free-library-prep-kits.html>

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit について↓

<http://jp.illumina.com/products/truseq-nano-dna-library-prep-kit.html>

クオリティチェック

遺伝子実験棟でのクオリティチェック (3点) に用いるため、必要量とは別に、以下に示す量をあらかじめ分注してお持ちください。

1) 電気泳動 : 2 μ l …1本

電気泳動 (0.7~1%Gel) にて、10 Kb 以上に明瞭なバンドが検出されるか、分解および低分子の混入がみられないかを確認します。

(通常の電気泳動での確認が難しい場合、バイオアナライザによる確認を行いますので、追加料金が発生します。)

2) OD 測定 : 3 μ l …1本

純度 (OD260/OD280、OD260/OD230) が 1.8 以上となるようにサンプル調製して頂きます。また、吸収スペクトルに異常 (ピークが確認されない、ピークが高波長側にシフトなど) が認められないことを確認します。

3) 蛍光定量 : 1.5 μ l …1本

Invitrogen 社の Qubit または Promega 社の Quantus を用いて dsDNA の蛍光定量を行います。これらの定量値と OD 測定値に乖離がある場合は、ゲノム DNA の再精製をお勧めしております。

以上3点でDNAのクオリティチェックを行います。

クオリティチェック済みのサンプルをお持ちいただくことも可能ですが、その際はデータをご提出頂きますよう、お願い致します。

注：泳動図は、分解及び低分子の混入を確認するため、
100 bp 付近が確認できる泳動図をご提出ください(切り取ったりしないで下さい)。
分解及び混入サイズ確認のため、マーカーの種類及び分子量もお知らせ下さい。

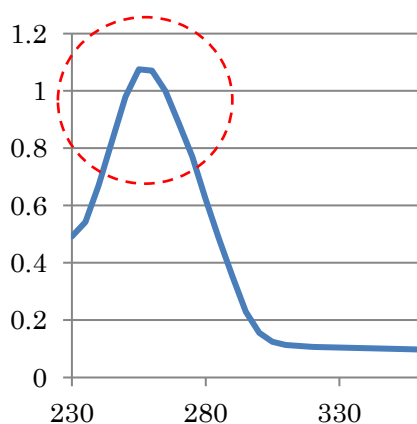
DNA クオリティチェックのデータ (参考)

1) 電気泳動



- ・バンドが認められるか。
- ・分解及び低分子は混入していないか。

2) OD 測定



- ・OD 確認
- ・吸収スペクトルに異常
(ピークがない、ピークの位置がシフトしている等)はないか。

お問い合わせ先

ご不明な点がございましたら、下記お問い合わせ先にご連絡ください。

- ・ 次世代シーケンス解析担当者共通アドレス
kyoudou@suml.cii.ac.jp
- ・ 准教授 道羅英夫 (TEL : 054-238-6354)
dora.hideo@shizuoka.ac.jp
- ・ 特任助教 兼崎友 (TEL : 054-238-4385)
kanesaki.yuh@shizuoka.ac.jp
- ・ 技術職員 森内良太 (TEL : 054-238-5061)
moriuchi.ryota@shizuoka.ac.jp

2018.10.1