

お客様各位

次世代シーケンス解析 ゲノムDNA QCガイド

謹啓

時下ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。
 この度は、弊社次世代シーケンス解析サービスをご利用いただき、誠に有り難うございます。
 弊社では、貴重なサンプルをお預かりしての解析で確実にデータを出すため、またスムーズに解析を進めるため、
 解析に問題のない質・量のゲノムDNAを予めご用意くださいます様 ご協力をお願いいたしております。
 つきましては、ゲノムDNAサンプルの濃度測定には、下記推奨法もしくは同等の方法にてより確実な定量をお願い致します。
 お忙しい中大変恐縮ではございますが、何卒ご協力のほど、宜しくお願い申し上げます。

敬白

弊社推奨 ゲノムDNA品質検定法

1) 分光光度計による測定

分光光度計での測定にてサンプルの純度 (A260/A280 ratio, A260/A230 ratio) がともに ≥ 1.6 であることをご確認ください。
**※濃度については、分光光度計での測定では遊離のヌクレオチド等の夾雑物を検出し、正確な値が出ない
 可能性がありますので、下記2)3)いずれかの方法で測定してください。**

2) アガロースゲル電気泳動

濃度既知のスタンダードサンプル(分子量マーカー・ λ DNAなど)を段階希釈し、サンプルDNAと共にアガロースゲル電気泳動を行い、EtBr等で染色後のシグナルの強度を比較し、測定してください。

3) 市販の2本鎖DNA定量キットなど

Qubit fluorometer および、Quant-iT dsDNA kit (Invitrogen社)などの2本鎖DNA特異的定量キットを用いることも可能です。
 (別途、測定機器が必要な場合があります。詳細は各メーカーカタログ等をご確認ください。)

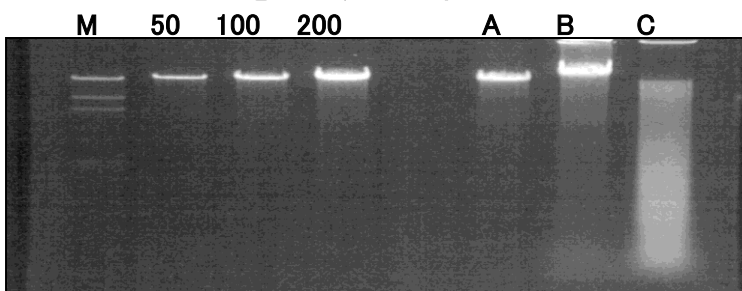
上記2) 或いは3) の濃度測定結果より、DNA総量が下記基準を満たしていることをご確認ください。

<Illumina HiSeq2500 / MiSeq>

アプリケーション	サンプル種別	必要量		必要サイズレンジ
DNA-Seq (PCR-Plus)	精製済みゲノムDNA	1 μ g	40ng/ μ l以上	-
DNA-Seq (PCR-Free)	精製済みゲノムDNA	5 μ g	40ng/ μ l以上	-
ChIP-Seq	精製済みChIP-DNA	50ng	10ng/ μ l以上	130~180bp
SureSelect	精製済みゲノムDNA	5 μ g	40ng/ μ l以上	-
メイトペア(Gel-Plus)※サイズ選択有	精製済みゲノムDNA	10 μ g	200ng/ μ l以上	-
メイトペア(Gel-Free)※サイズ選択無	精製済みゲノムDNA	3 μ g	200ng/ μ l以上	-
16S メタゲノム・Amplicon-Seq	精製済みゲノムDNA	100ng	10ng/ μ l以上	約550bp
	精製済み1st PCR産物 (アダプタ付き)	5ng	0.2ng/ μ l以上	
RUNのみ	精製済みPCR産物 (アダプタ付き)	150ng	5ng/ μ l以上	1000bp未満

電気泳動によるゲノムDNA品質検定および濃度見積りの例

1%アガロースゲル電気泳動/EtBr染色



M : マーカー (λ DNA-*Hind*III digest)
 50, 100, 200 : λ DNA (ng)
 A, B, C : サンプル (各 1 μ l)
 A: 良好
 濃度見積り: 約 150ng/ μ l
 B: 若干分解も問題なし
 濃度見積り: 約 300ng/ μ l
 C: 分解著しい
 濃度測定不可、要再調製

既知濃度のスタンダードサンプル(上記の場合、 λ DNA)の段階希釈系列を準備し、測定したいサンプル一定量と共に電気泳動・染色します。その後、蛍光強度の比較により、DNA量を見積もります。

※電気泳動時のコツ※

ゲノムDNAおよびスタンダードDNAをTEで一定量(10 μ l程度、ゲルのウェルの半分から7割くらいの量)にメスアップしてアプライすると、比較的綺麗な泳動像を得ることができます。
 また、粘性の高いゲノムDNAはTEで希釈後、緩やかにピペッティング(10回程度)、もしくは数秒程度Vortexし均一に溶解することで、ウェルへの残存をある程度防ぎほぼ全量を泳動することが出来ます。
 (過剰な混合により分解が起こりますと、正確な定量が困難になります。ご注意ください。)

※ご不明な点がございましたら、弊社担当(下記)までお問い合わせください。

北海道システム・サイエンス株式会社
 ライフサイエンス本部 解析部
 次世代シーケンス解析サービス担当
 TEL: 011-768-5903
 E-mail: hss-ngs@hssnet.co.jp