

# ケーススタディー： Femto Pulse System による 超微量サンプルの QC とその有用性

## はじめに

今回は、沖縄科学技術大学院大学（OIST）シーケンシングセクションの藤江学先生にお時間をいただき、アジレントの全自動パルスフィールドキャピラリ電気泳動システムである Femto Pulse を用いたサンプルの品質管理（QC）についてお伺いしました。

藤江 学 先生

沖縄科学技術大学院大学（OIST）  
シーケンシングセクション



## Q. OIST シーケンシングセクションについて教えてください。

OIST にはコアファシリティというものがあまして、これは最先端の装置を購入し、それに専任技術職員をつけ、ノウハウ・知識を一か所に蓄積していくための施設です。そうすることで、同じ機関内で装置を分散して所有することによるパフォーマンスの低下が起こらないようにしています。シーケンシングセクション (SQC) は OIST に複数あるリサーチサポートディビジョンの一つで、次世代シーケンサを用いたアプリケーションに関して、様々なメーカーのシーケンサを用いて、依頼を受けたサンプルのシーケンスを行う研究支援を行っています。

## Q. 使用しているシーケンサおよびアプリケーションについて教えてください。

SQC では 3 社のシーケンサを使用し、サービスを提供しています。イルミナ社のシーケンサは歴史も古く、さまざまなアプリケーションで使用しています。MiSeq は気軽に使えるため、共通機器室にも設置されており、ユーザー自身で解析が行えるようになっています。また、現時点で最大のスループットを持つ NovaSeq 6000 も使用しています。ロングリードシーケンサは Pacific Biosciences 社の Sequel II と Oxford Nanopore Technologies 社の MinION、PromethION を使用しています。

アプリケーションとしては、イルミナ社のシーケンサは RNA 発現解析やリシーケンスによるマーカー探索が多く、Pacific Biosciences 社や Oxford Nanopore Technologies 社のシーケンサは *De novo* のゲノム解析などに使用しています。

## Q. Femto Pulse を導入したきっかけについて教えてください。

一言でいうと検出感度が良く、分析が少ないサンプル量で済む、という点です。

SQC では、外部の受託企業よりも少ないサンプル量を提出してもらって解析ができるようにサービスを提供していますが、どうしても求めるサンプル量よりも提供されるサンプル量が少ないことが多くあります。自分たちで抽出したサンプルであればある程度は感覚的にどういったものかわかることもあります。提出されたサンプルの場合はどういったことが起こっているかわかりませんし、再提出をお願いした場合でも二度と手に入らない貴重なサンプルであることが多く、できる限り一つ一つの工程で使用する DNA 量を少なく抑える必要があります。

例えばゲノム DNA のサイズ測定をする場合、パルスフィールドゲル電気泳動ですと、どうしても多量の DNA を QC に使ってしまうことになります。

そこで微量のサンプル量でゲノム DNA の解析ができる装置となると、現在市場にある装置では Femto Pulse 一択となるため、導入しました。

希少なサンプルの QC に関して Femto Pulse が導入される以前は、吸光度測定、蛍光測定、電気泳動の 3 つの QC を行いたいところを、サンプル量の制限があるために生物種・組織・抽出方法などからどの QC を行うか選択していましたが、Femto Pulse を導入することによって、複数の QC を行うことができるようになりました。その結果得られる情報が増えるため、下流のライブラリ調製の実験で失敗する確率を抑えられるようになりました。



OIST メインキャンパス

提供：沖縄科学技術大学院大学

## Q. 具体的なアプリケーションに関して教えてください。

微量 total RNA の分解度の確認と、シーケンスライブラリの確認、およびゲノム DNA の分解度の確認に使用しています。微量 total RNA の分解度の確認に関しては、SQC へ提供されるサンプルは二度と手に入らない貴重なものであり、かつ、昆虫・植物・海の生物などの total RNA は、典型的な total RNA の泳動波形と異なることが多くあります。そのため、微量で分析できる点と、分離能が高いので、rRNA 間の分解産物の確認をしやすいという点で Femto Pulse を使用しています。

シーケンスライブラリの確認については、微量のライブラリのサイズ確認とアダプターダイマーの検出で活用しています。PCR バイアスを少なくするためにライブラリ調製過程の PCR サイクル数を抑えると、どうしてもライブラリ収量が少なくなり、通常の電気泳動ですとシグナルが検出できません。そういったライブラリでも Femto Pulse を用いることで検出ができます。ライブラリのサイズ確認は特に、イルミナの整列化フローセルを用いるシーケンサの場合に重要になってきます。整列化フローセルは、長すぎるライブラリが取り込まれにくくなるため、もしサイズセレクションが間違っていた場合、デジタル PCR による定量でライブラリがあることを確認したとしてもシーケンスが読めないということがあります。デジタル PCR での定量にはライブラリのサイズ情報が入ってきませんので、Femto Pulse でシーケンスされる長さのライブラリであることを確認することで、シーケンスデータが取得できることを担保できます。

また、整列化フローセルの場合、短いライブラリが優先的にフローセルに取り込まれます。そのため、アダプターダイマーが存在すると、それが優先的にシーケンスされてしまい、データの多くを失ってしまうことになります。ですので、アダプターダイマーは徹底的に取り除く必要があります。Femto Pulse ではアダプターダイマーを高感度で、また正確なサイズで検出できるため、アダプターダイマーが取り除かれていることの確認に使用しています (図)。

ゲノム DNA の分解度の確認については、ロングリードシーケンサで 100 kb、200 kb のリードを取りたいときに 100 kb 以上のゲノムがあるかを確認するなど、簡単に微量で DNA の QC をするために Femto Pulse を使用しています。

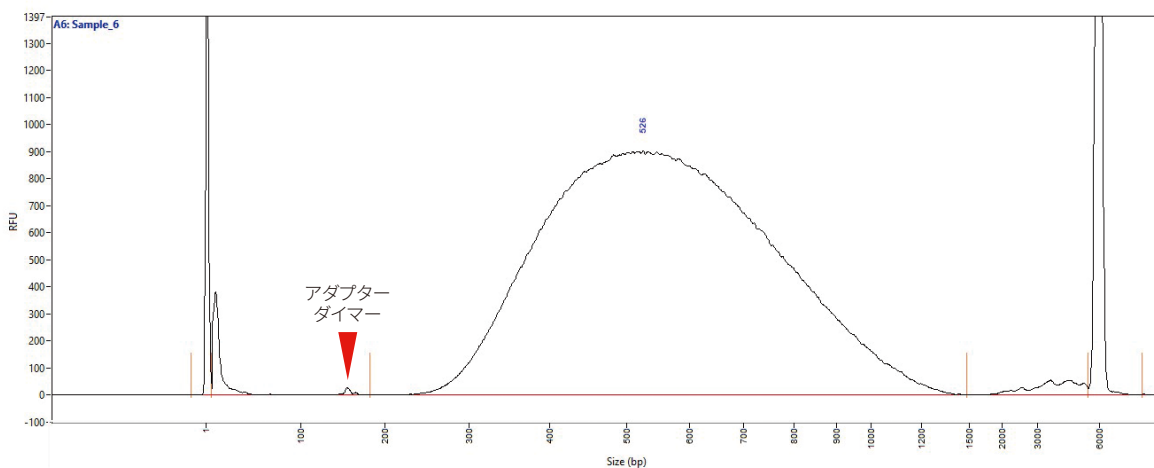


図 . Femto Pulse Ultra Sensitivity NGS Kit を用いて取得した DNA Shotgun sequence (PCR free) ライブラリのエレクトロフェログラム

## Q. Femto Pulse と TapeStation の使い分けについて教えてください。

サンプル量が少なかったり、初めてのサンプル、特殊なサンプルに関しては解像度が高い Femto Pulse で分析することが多いです。それ以外のサンプルは簡単に分析が行える TapeStation で、というように使い分けています。

## Q. Femto Pulse をご使用されて操作性やコストといた点でどのように感じてますでしょうか。

操作性に関しては TapeStation と比べると煩雑な部分がありますが、夕方に分析を開始し、そのままオーバーナイトで放置できる点は便利だと感じています。二度と手に入らなかったり、量が少なかったりといったサンプルの希少性ですとか、アダプターダイマーが多い場合にシーケンス試薬をより消費してしまう点を考えると、QC のコストに関してはそこまで気になるものではなく、Femto Pulse で QC を行うほうがよいと感じています。

## Q. Femto Pulse に関してご要望があれば教えてください。

Genomic DNA 165 kb Kit に関して、50 ~ 165 kb のサイジング精度が上がれば、より良いです。また、より高分子側の DNA、最低でも 500 kb のゲノム DNA が分析できるようになればより広いアプリケーションでの QC に使用できると思います。

また TapeStation の非常に簡単な操作性で Femto Pulse が利用できる点で更に利便性が向上します。

### [ お問い合わせ窓口 ]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

G220452

© Agilent Technologies, Inc. 2022

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、  
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、  
法律で禁止されています。

Printed in Japan, April, 2022

5994-4791JAJP