

# Bioanalyzerを使用したライブラリーQCと トラブルシューティング

October 16, 2015



米田 瑞穂  
イllumina株式会社  
テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDX, MiSeq FGx, NeoPrep, NextBio, Nextera, NextSeq, Powered by Illumina, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the US and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

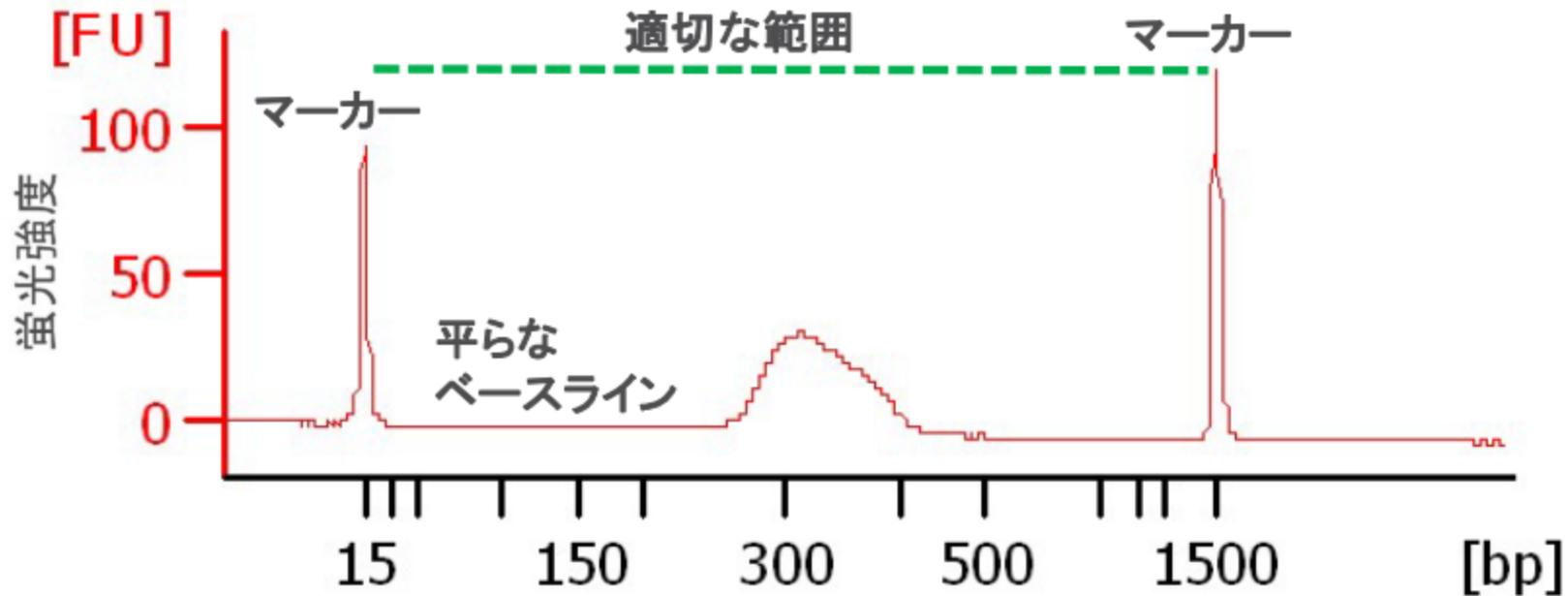
illumina®





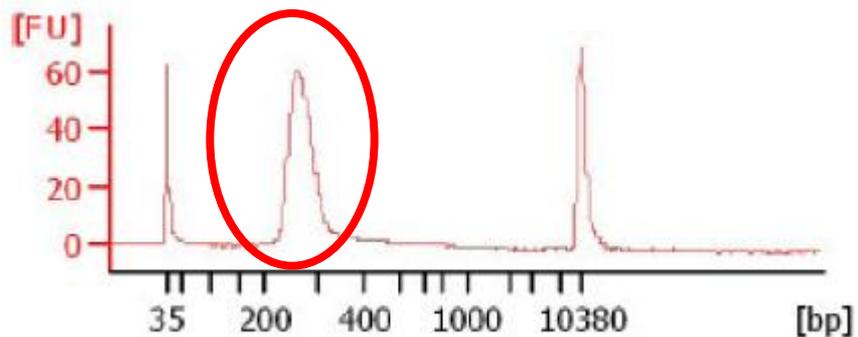
- 1) TruSeq RNA
- 2) TruSeq ChIP
- 3) TruSeq DNA Nano
- 4) TruSeq DNA PCR-Free
- 5) Nextera

# Bioanalyzerでの解析に適したライブラリー

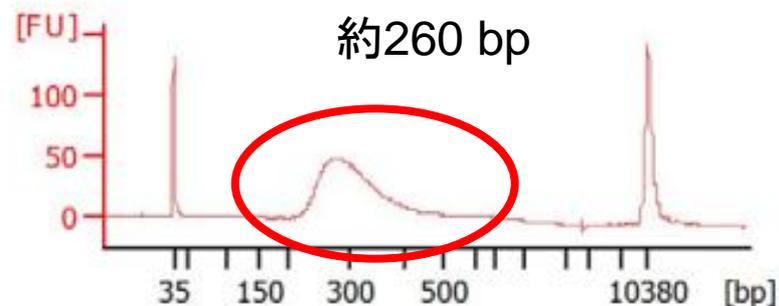


# 理想的なトレース: TruSeq ChIP, TruSeq RNA

## TruSeq ChIP



## TruSeq RNA



理想的  
な結果

異常な  
サイズ

ピーク  
の消失

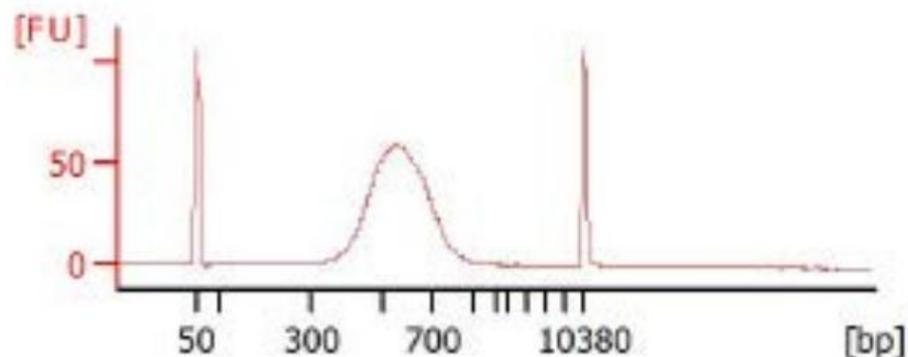
大きな  
ピーク

小さな  
ピーク

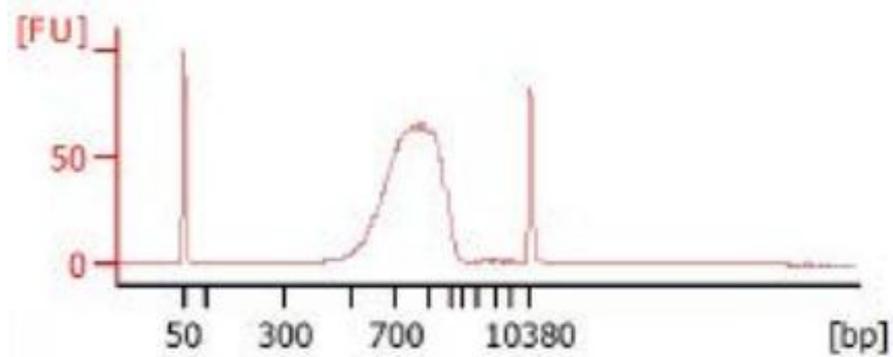
# 理想的なトレース: TruSeq Nano

TruSeq Nano Kitは、SPBビーズによるサイズセレクションがある。  
最終ライブラリーには、インサートと~120 bp (LT)もしくは~135 bp (HT)のアダプターが含まれる。

350 bp インサート  
+  
~130 bp アダプター



550 bp インサート  
+  
~130 bp アダプター



理想的な結果

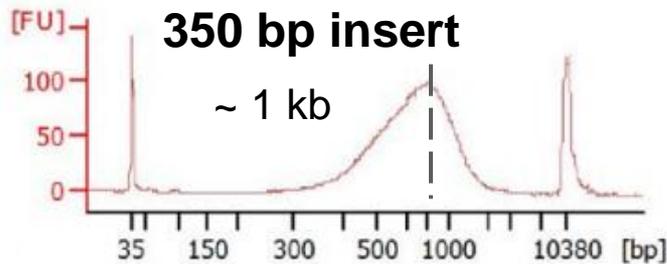
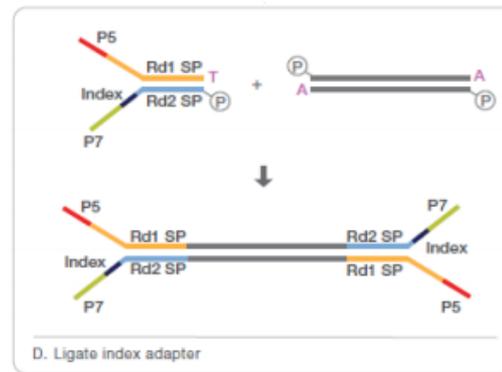
異常なサイズ

ピークの消失

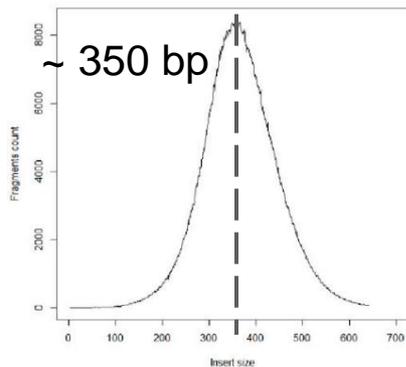
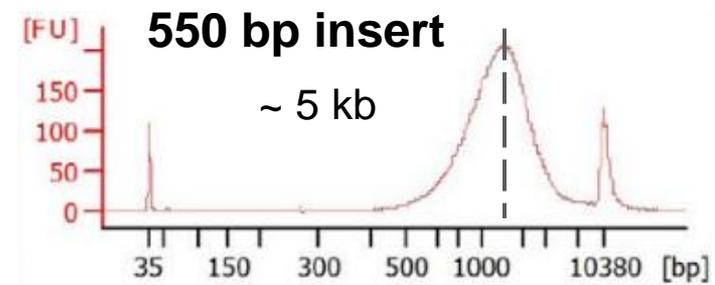
大きなピーク

小さなピーク

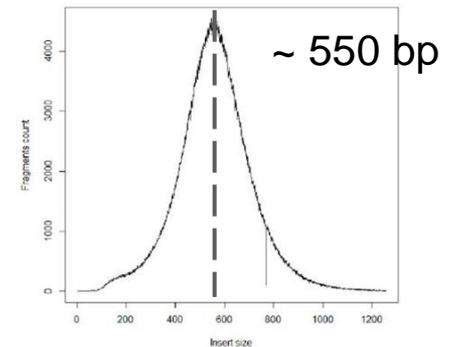
# 理想的なトレース: TruSeq PCR-free



最終ライブラリーの  
トレース



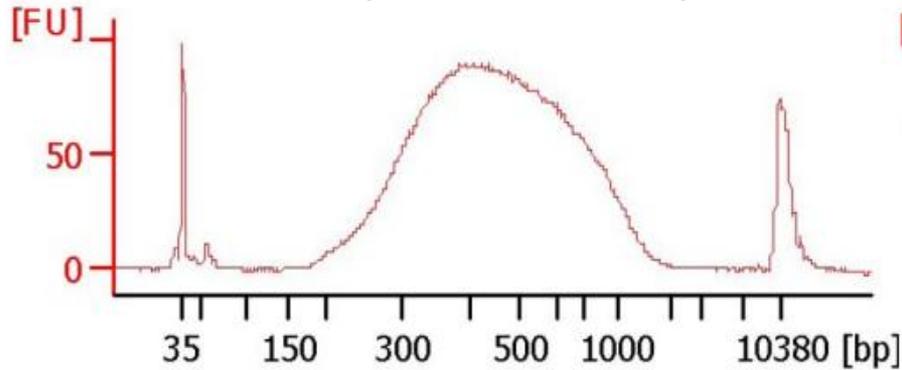
シーケンス結果から得られた  
平均インサートサイズ



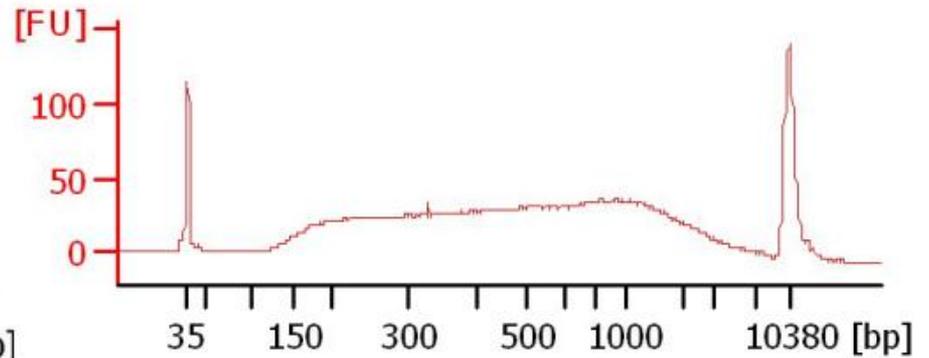


# 理想的なトレース: Nextera

250 bp ~ 1000-1500 bp



丸いピーク



なだらかなピーク

理想的な結果

異常なサイズ

ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

# Bioanalyzerを用いたトラブルシューティング

- ▶ ライブラリーのピークがある。  
多くのケースではシーケンスは可能
  
- ▶ ライブラリーのピークがない  
再調製が必要

理想的な結果

異常なサイズ

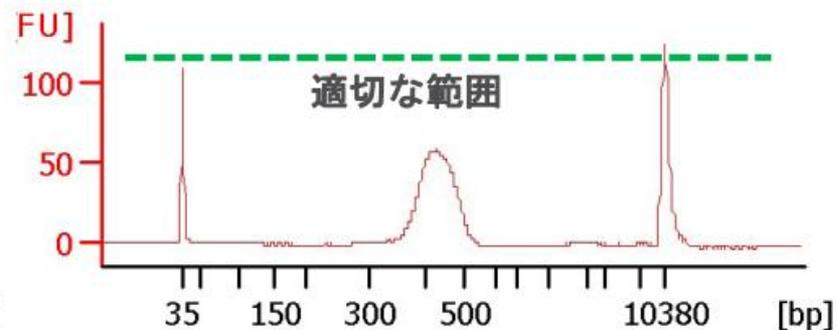
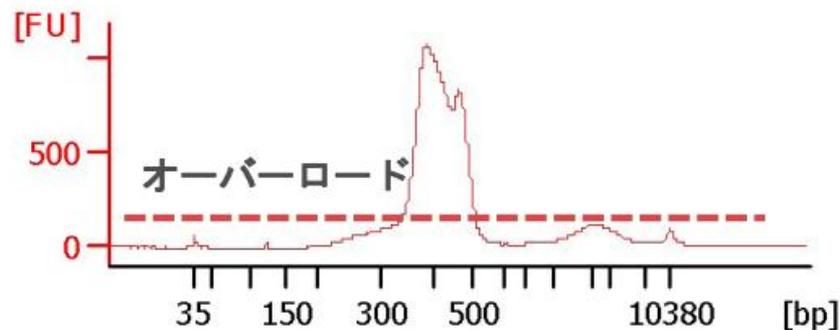
ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

- 1) 共通: ピークが高すぎる場合
- 2) Nextera: サイズが小さすぎる場合 (1例)
- 3) Nextera: サイズが大きすぎる場合 (3例)
- 4) TruSeq: サイズが小さすぎる場合 (1例)

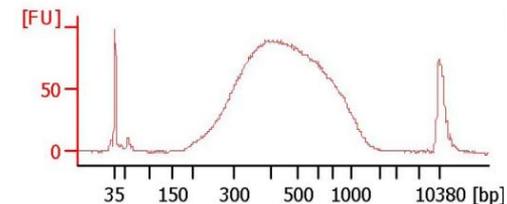
# 異常なピーク :ライブラリーのオーバーロード



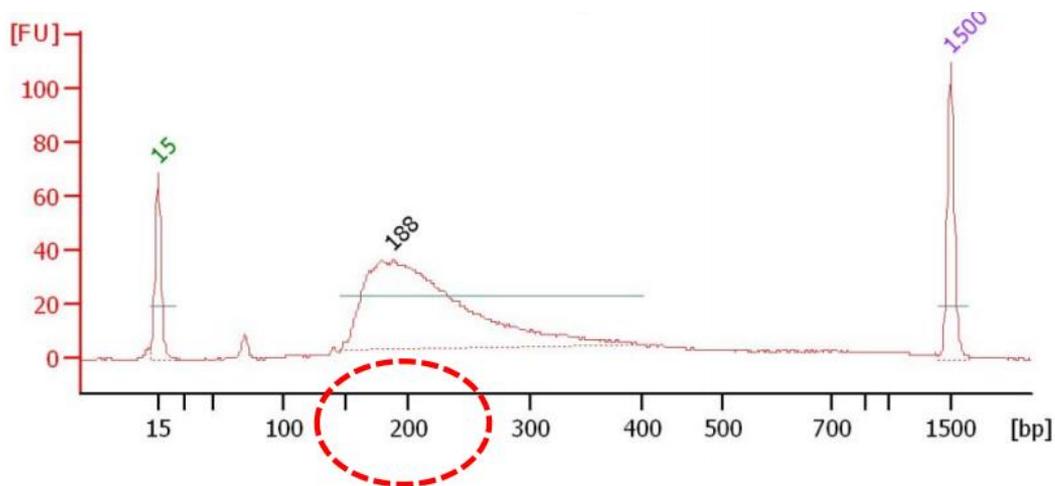
解決法: ライブラリーを希釈したのち、再解析を行う



# 異常なサイズ： Nextera 小さすぎるライブラリー



Tagmentation過多  
原因：インプットDNA量が少なすぎる  
回避方法：DNA量を正確に定量する



理想的な結果

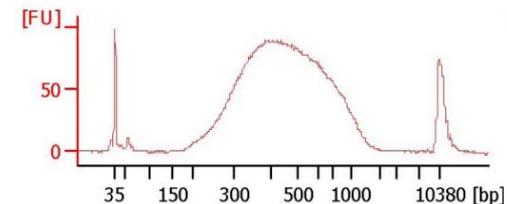
異常なサイズ

ピークの消失

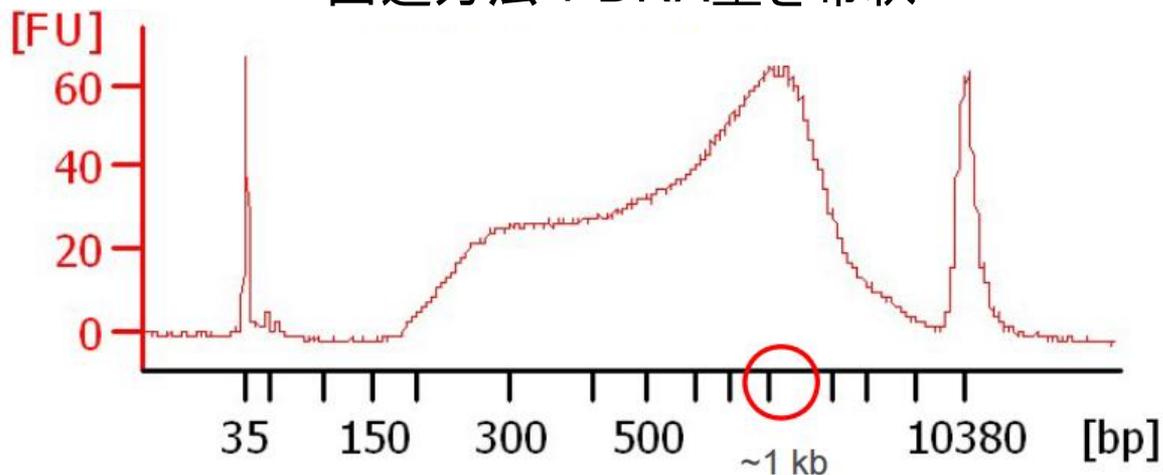
大きなピーク

小さなピーク

# 異常なサイズ: Nextera 大きすぎるライブラリー



Tagmentation不足  
原因: インプットDNA量が多すぎる  
回避方法: DNA量を希釈



理想的な結果

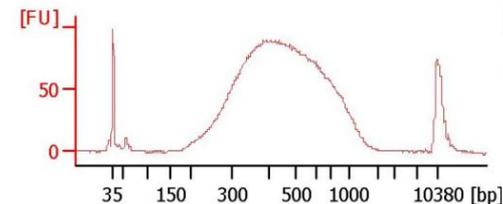
異常なサイズ

ピークの消失

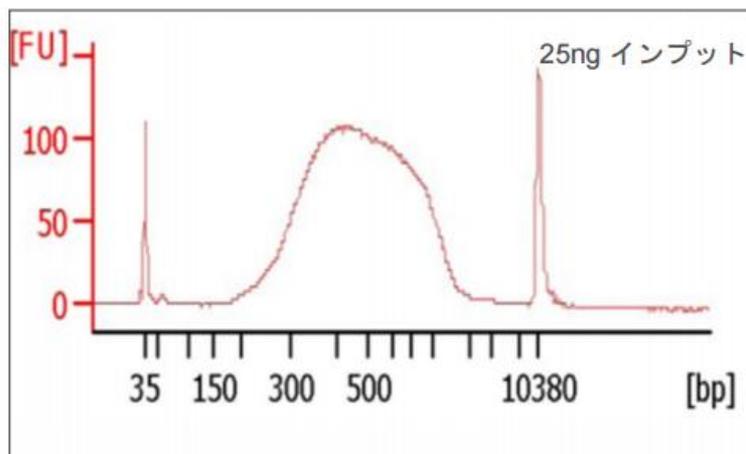
大きなピーク

小さなピーク

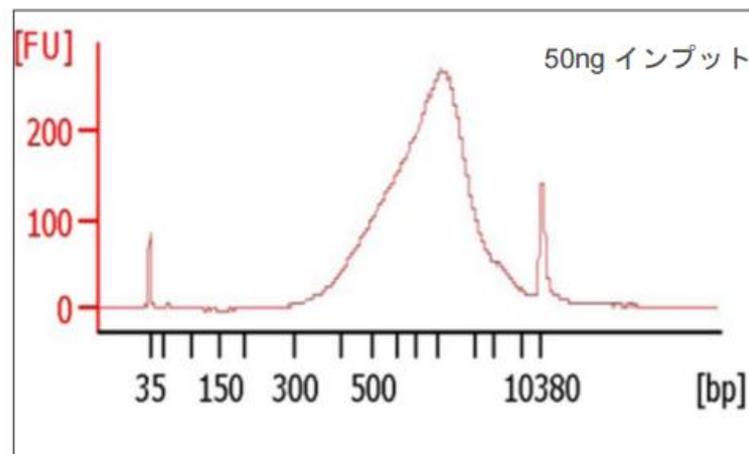
# 異常なサイズ: Nextera 大きすぎるライブラリー



最終ライブラリーのBioanalyzerのトレースは違うが、シーケンスの解析結果には大きな影響を与えない。



平均ライブラリーサイズ: 500 bp



平均ライブラリーサイズ: 1 kb



# 異常なサイズ: Nextera 大きすぎるライブラリー

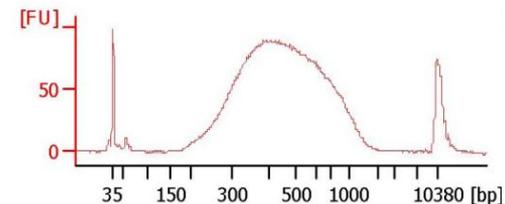
インプット DNA	ライブラリーサイズの中央値 Bioanalyzer (bp)	インサートサイズの中央値 Bioanalyzer (bp)	Density (# of Unique Bases)
25 ng	500	230	$2.53 \times 10^9$
50 ng	1000	346	$2.65 \times 10^9$

\* Sequence data performed in duplicate (50 ng) and Triplicate (25 ng)

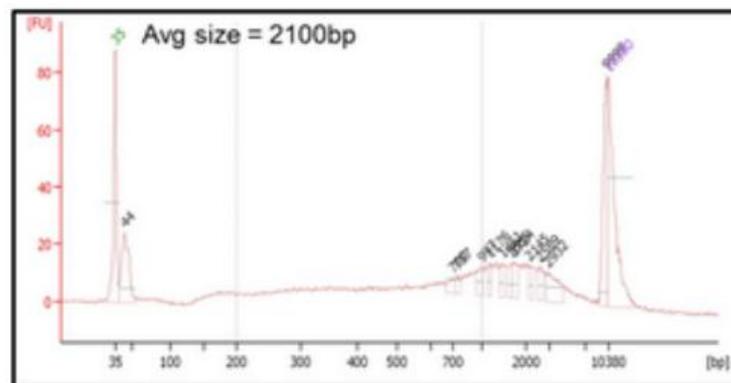
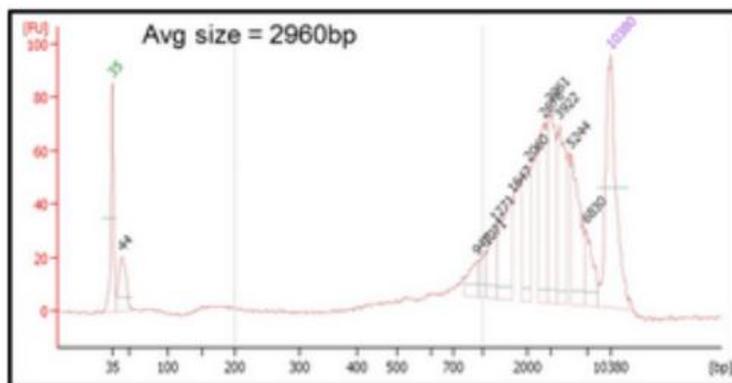
- 最終ライブラリーのトレースは異なるが、シーケンスの解析結果に大きな影響を与えない。
- Bioanalyzerはtagmentationが行われたことの検証用に使う。多少異なるDNAサイズでもシーケンスデータに大きな影響を与えない。



# 異常なピーク: Nextera 大きすぎるライブラリー



Tagmentation不足  
原因: Tagmentation酵素が阻害されている



理想的な結果

異常なサイズ

ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

# 異常なサイズ: Nextera 大きすぎるライブラリー

## DNA精製キットから混入しうるTagmentation酵素の阻害物質

<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/pr9ujrEx7USo794O2k6G4Q/dnarna-isolation-considerations-when-using-truseq>

Extraction Inhibitors	Inhibitory Effect	Likely Source	Methods to Minimize Inhibition
EDTA	Chelation of metal ions	TE buffer	Reduce EDTA concentration in TE buffer or simply use Tris-HCl (10 mM) or water as elution buffer
Alcohols	Enzyme denaturation	Ethanol, isopropanol, isoamyl alcohol	Dry pellet and resuspend or use silica-based purification
Excess Salts	Template blocking	KC <sub>l</sub> , NaCl, CsCl, NaAc	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Chaotropic Salts	Enzyme denaturation	Guanidinium chloride; magnesium chloride, urea	Wash with 70% ethanol or use silica-based purification
Phenol:Chloroform	Enzyme denaturation	Organic carryover	Use PVP, PVP/ammonium acetate, incorporation of 1.2% citric acid at the DNA extraction step
Detergents/DDT	Enzyme denaturation	Sodium deoxycholate, SDS, Tween 20	Wash with 70% ethanol
Exogenous DNA/RNA	Template competition	Carryover	DNase I for DNA removal; RNase A for RNA, RNA:DNA hybrid removal
Carriers	Template competition/blocking	RNA, heparin, glycogen	Only use carriers that do not serve as template or block the template such as linear acrylamide, N- or P-carriers
Agarose	Template blocking	Gel extractions	Use a spin column with chaotropic salt buffer; dialysis
Excess Metal Ions	Reduce oligo specificity	Mg <sup>++</sup> from PCR buffer	Dialysis against PBS (pH 7.4), phenol: chloroform extraction followed by EtOH precipitation





理想的な結果

異常なサイズ

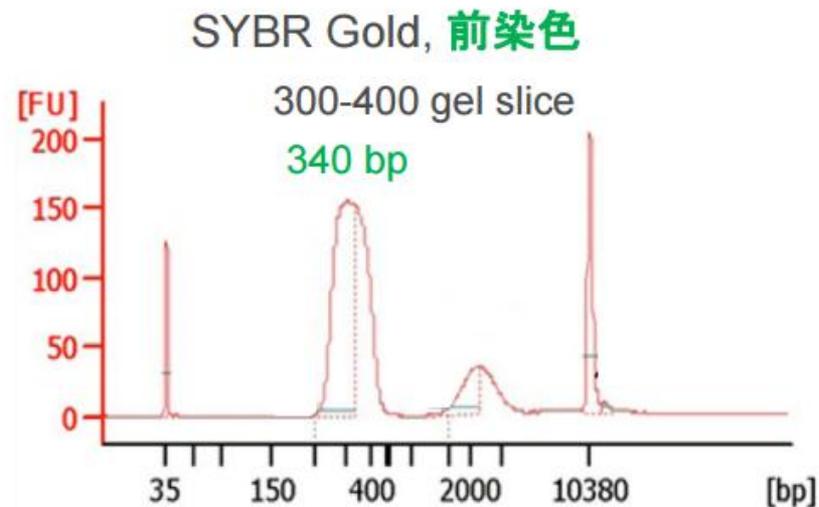
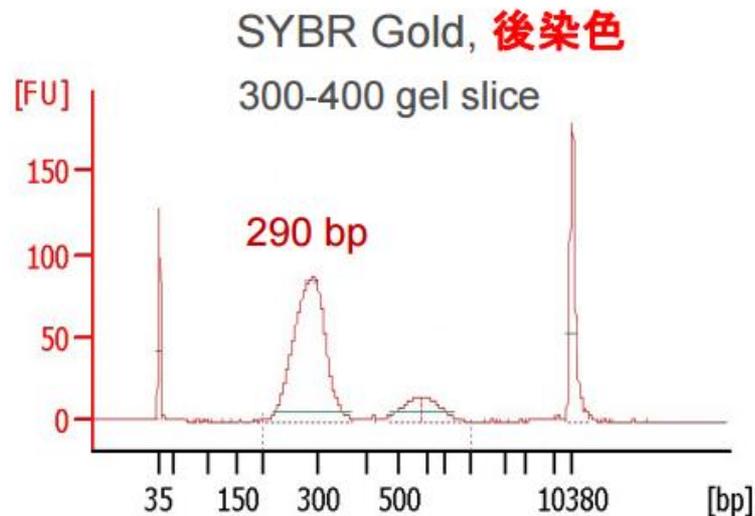
ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

- 1) 共通: ピークが高すぎる場合
- 2) Nextera: サイズが小さすぎる場合 (1例)
- 3) Nextera: サイズが大きすぎる場合 (3例)
- 4) TruSeq: サイズが小さすぎる場合 (1例)

# 異常なサイズ: TruSeq 小さすぎるライブラリー



正確なサイズセレクションのためには、SYBR Goldで前染色したゲルが必要

理想的な結果

異常なサイズ

ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

# 異常なサイズ: TruSeq DNA 小さすぎるライブラリー

ゲルの条件が異なると、ライブラリーラダーマーカークの泳動度に影響が出る。

後染め (SYBR Gold)  
SYBR Green  
Ethidium Bromide  
E-gels  
Pippin Prep

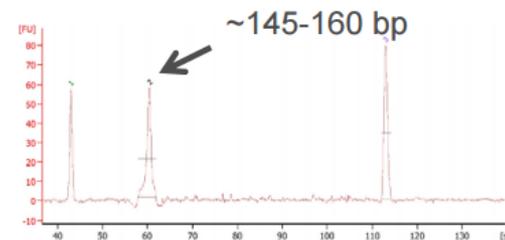
ゲルの条件は、プロトコルに沿って選ぶ



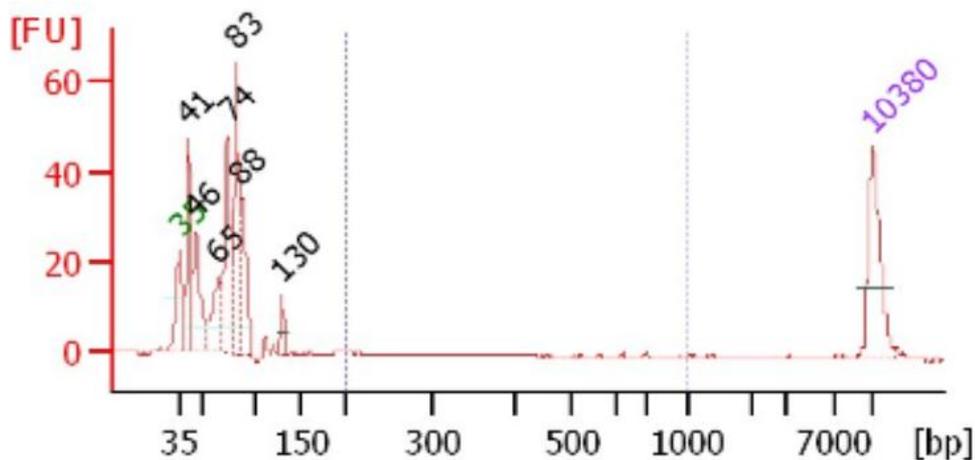


- 1) TruSeq Small RNA
- 2) 共通

# ピークの消失: TruSeq Small RNA



Small RNA由来の145-160 bp付近のピークが見られない。  
本キットによりSmall RNAが回収されなかった。



理想的な結果

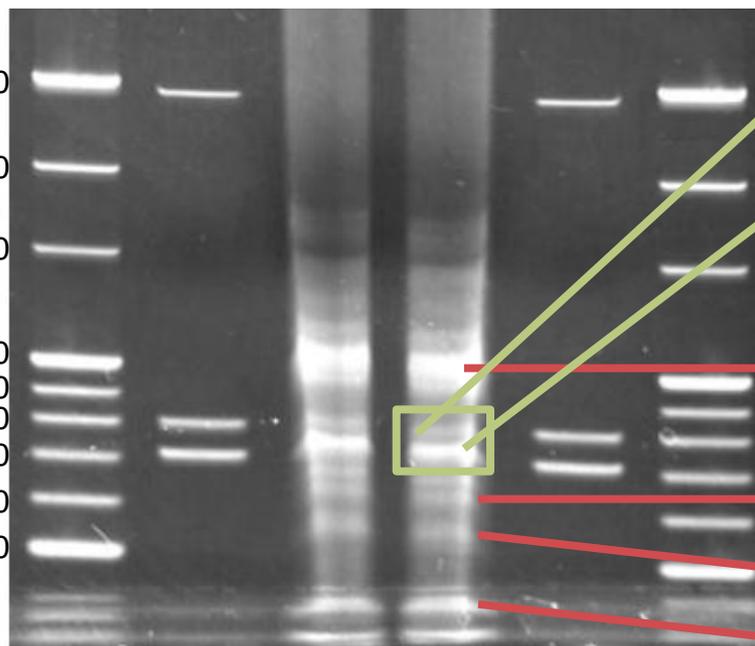
異常なサイズ

ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

# 参考: Small RNA Library Best Practice

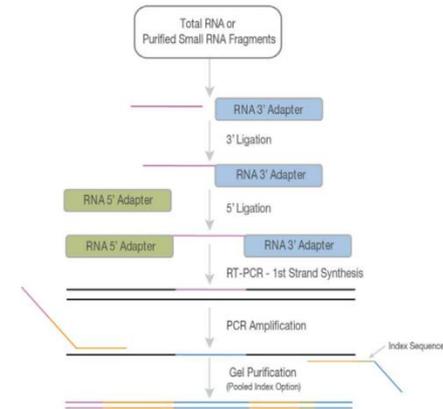


サイズ	予想産物
150 bp – 155 bp	Pre-miRNA, piRNA など (抽出サンプルに依存します)
144 bp – 150 bp	18-25 bp microRNA

サイズ	予想産物
≥ 200 bp	tRNA or rRNA with ligated adapters
130 bp – 138 bp	Amplified adapter concatamer
120 bp – 125 bp	Amplified adapter dimer
≤ 100bp	Primer or primer dimer

# ピークの消失: TruSeq Small RNA

Small RNA由来の145-160 bpのピークが見られない。  
本キットによりSmall RNAが回収されなかった。



起こりえる原因	解説策
質の低いインプットRNA	高品質なRNAを確保するために、インプットQCを行う。
アダプターオリゴの二次構造の形成	70°Cで温めた直後に氷上に移す
Small RNAが精製したRNA中に存在しない	Small RNAの精製に対応したキットを使用する

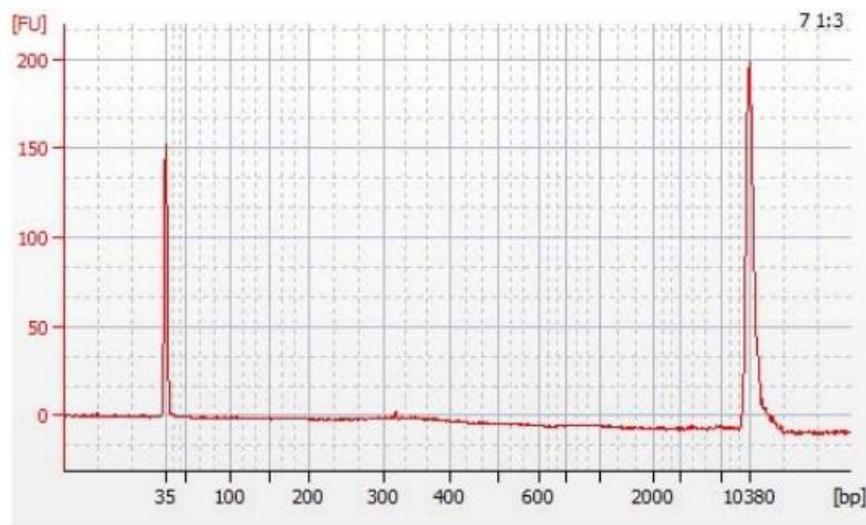




- 1) TruSeq Small RNA
- 2) 共通

# ピークの消失: TruSeq and Nextera

ライブラリーのピークが見られない、もしくはダイマーのピークしか見えない。  
シーケンスすべきではない。



理想的  
な結果

異常な  
サイズ

ピーク  
の消失

大きな  
ピーク

小さな  
ピーク

# ピークの消失: TruSeq and Nextera

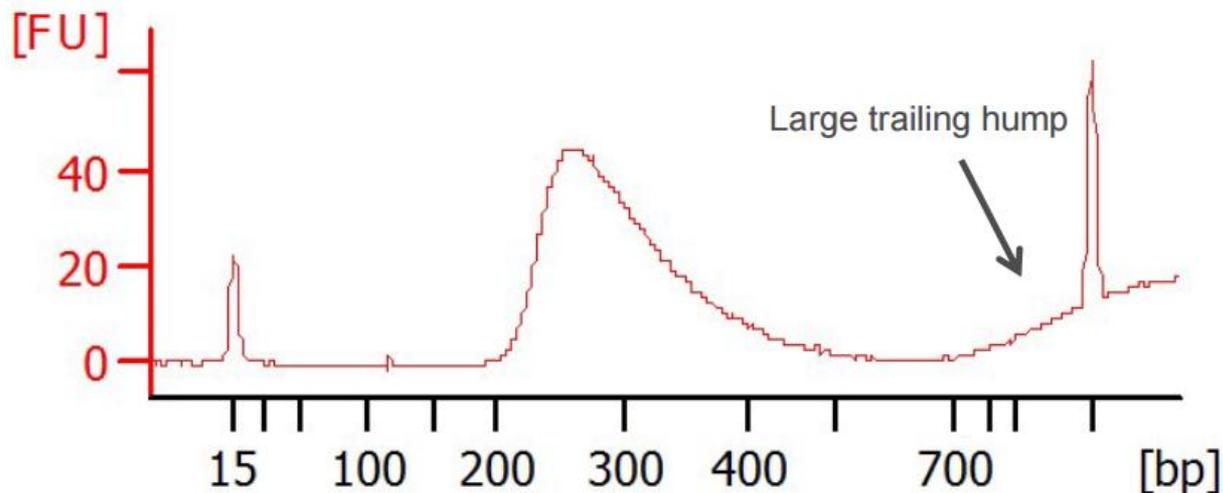
起こりえる原因	解説策
質の低いインプットもしくは量が不十分	QubitやPicoGreenを用いてインプットのQCを行う
ビーズ精製時のサンプルの消失	Best Practicesの手法にしたがう
Thermal cyclerの蓋が加熱されていない	Thermal cyclerが室温以上に加熱される時は、蓋の温度を100°Cにする。
不完全なfragmentatoin	Fragmentatoin後のサイズ分布をチェックする
酵素の劣化	酵素を消費期限内に使用する。 凍結融解を行わない。





1) 共通

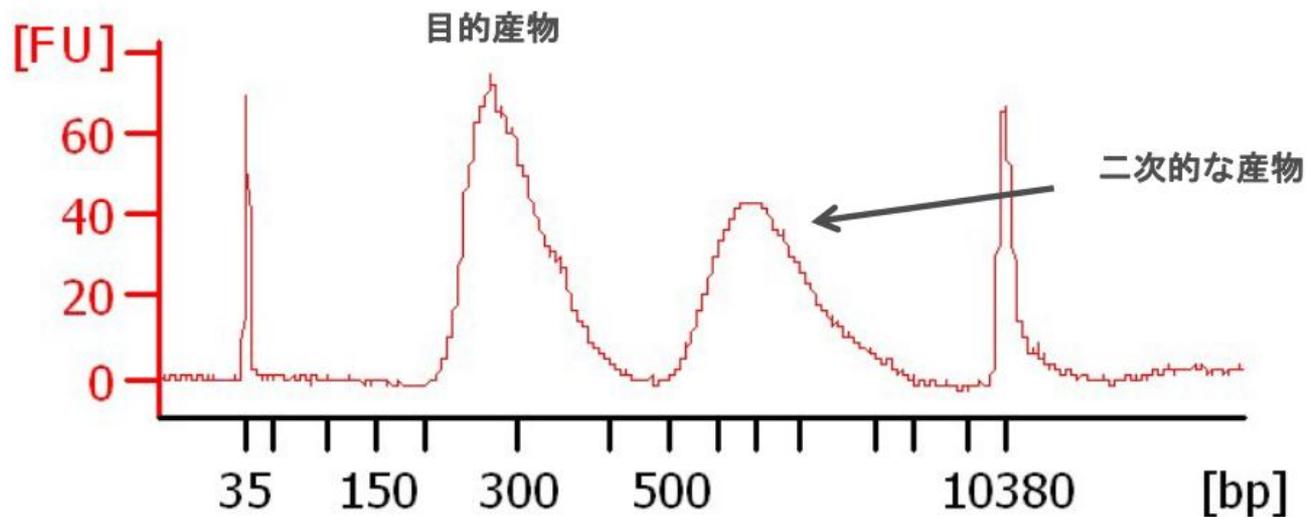
# 大きなピーク AMPure beadsの持ち込み



解決法: サンプルが透明になるまで磁石の上に静置したのち、ライブラリーを回収する。  
回避方法: AMPure beads使用時にbest practices にしたがう



# 大きなピーク PCR bubble product



理想的な結果

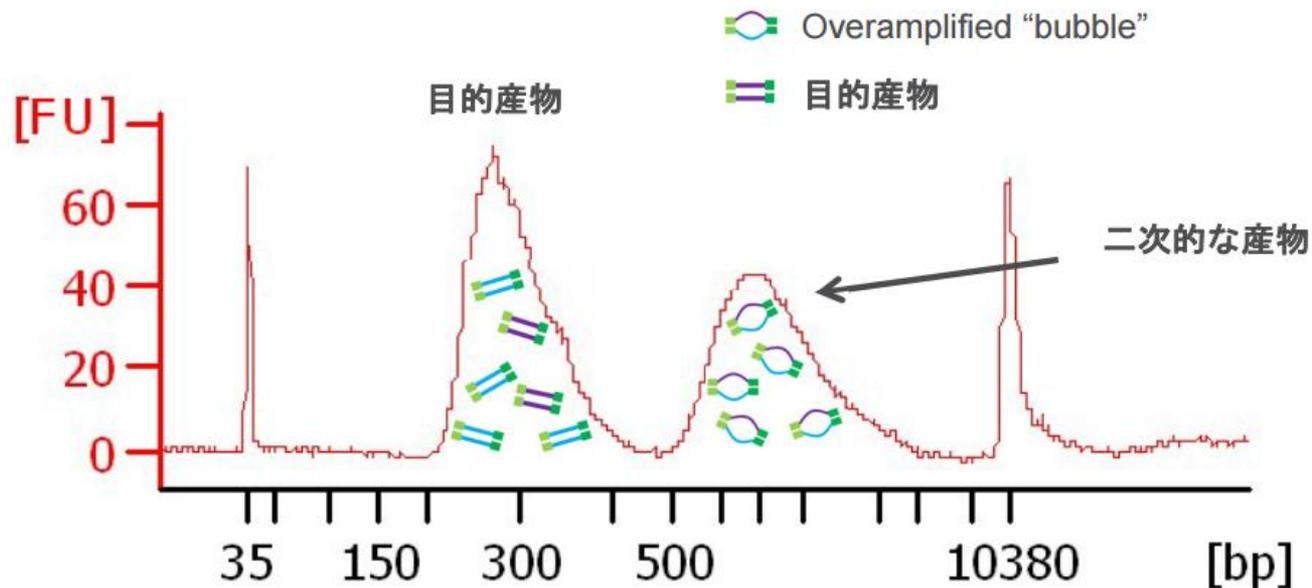
異常なサイズ

ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

# 大きなピーク PCR bubble product



- OveramplificationによるArtifactピーク
- PCR反応に必要な試薬が枯渇すると、相補的ではないライブラリー鎖が末端にある相補的なアダプターでアニールする
- Semi-single stranded productができる

理想的な結果

異常なサイズ

ピークの消失

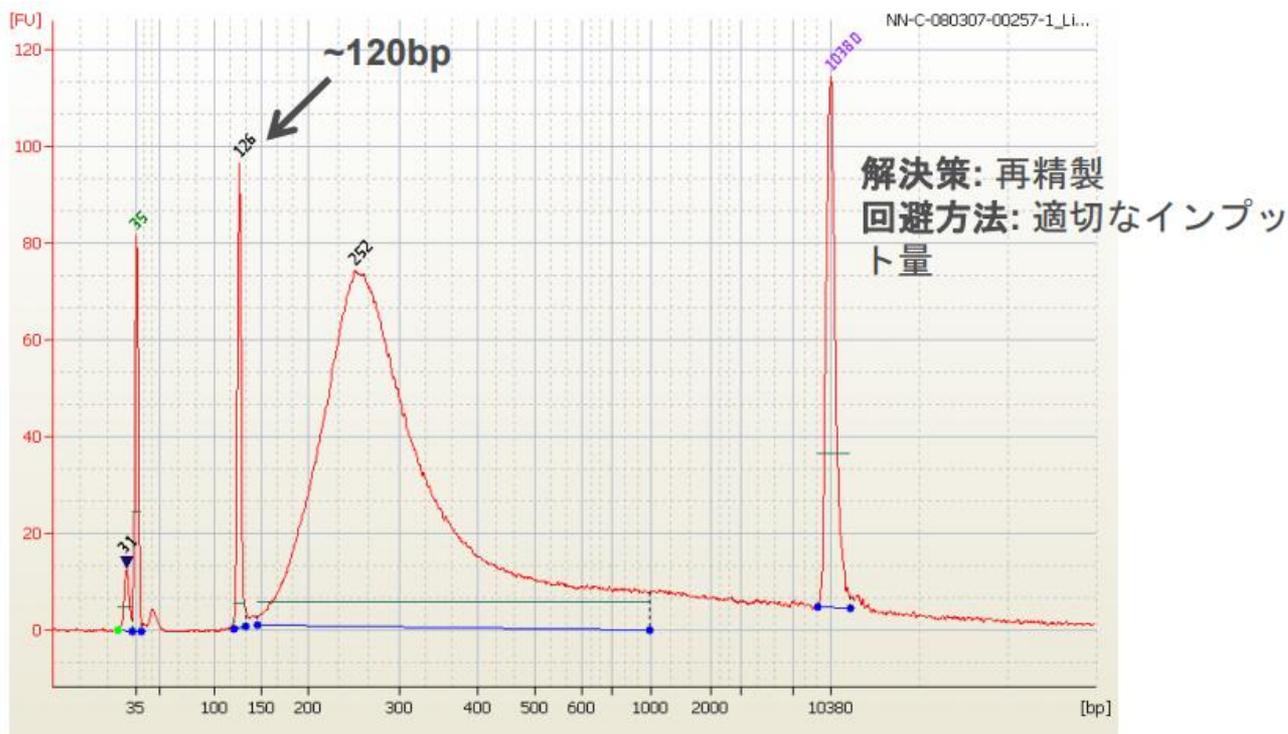
大きなピーク

小さなピーク



- 1) TruSeq
- 2) Nextera

# 小さなピーク: TruSeq アダプターダイマー



理想的な結果

異常なサイズ

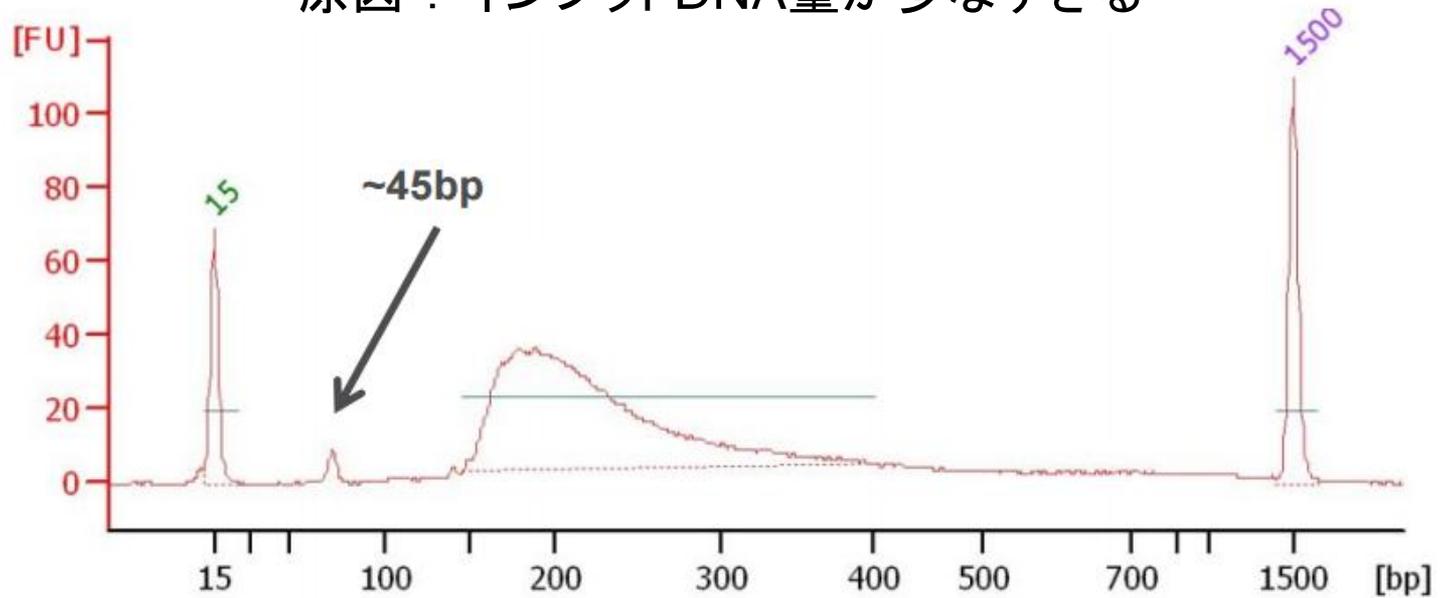
ピークの消失

大きなピーク

小さなピーク

# 小さなピーク: Nextera プライマーダイマー

原因：インプットDNA量が少なすぎる



回避方法：適切な量のインプットDNAを使用する





# 参考/データベース

- ▶ イリミナホームページ

- [Sequencing](#)

- ▶ TS Webinar

- 2015/03/06

- Nexteraライブラリー調製キットシリーズで期待通りのライブラリーを得るためのヒント

- 2015/04/10

- TruSeq DNA & RNAキットを用いたライブラリー作製におけるトラブルシューティング

- ▶ User Guide, Q&A, Best Practices

- MyIlluminaより各種キットサポートページの情報をご確認ください

ご清聴ありがとうございました

本日セッション終了後のご質問は、  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)にお問い合わせください