

NGSをはじめよう！RNA-Seq入門 (キットの選び方、実験デザイン)

April 18, 2014



米田 瑞穂

イルミナ株式会社

テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2012 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, Sentrix, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, VeraCode, the pumpkin orange color, and the Genetic Energy streaming bases design are trademarks or registered trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.

illumina®

本日のOutline

▶ イルミナRNAキットのラインナップ

- 各キットの特長と原理
- 可能な同時解析のサンプル数

▶ 推奨のシーケンス条件

- インプットRNAのクオリティ
- RNAキットで調製したライブラリーのクオリティ



RNAシーケンス (RNA-Seq) で何ができるか

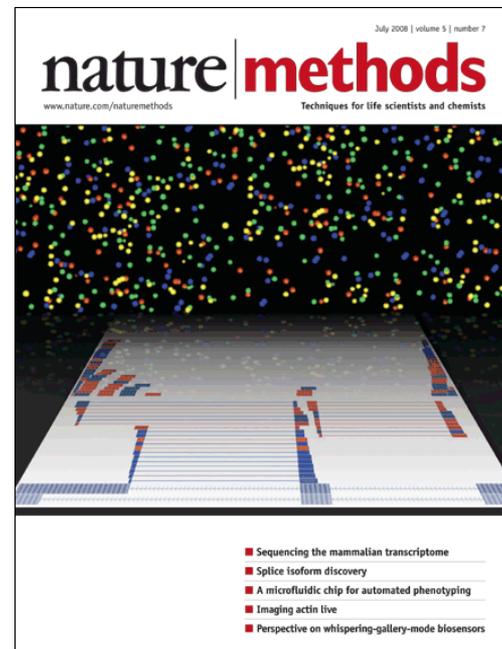
▶ 発現プロファイリング解析

- 遺伝子の発現比較
- エクソンの発現比較
- **スプライスバリエーションの発現比較**
- **アレルごとの発現比較**
- **幅広いダイナミックレンジでの発現比較**
- **アノテーションが充分で無い生物で発現比較**
- 超微量からの発現解析
- **ncRNAの発現プロファイリング解析**

▶ トランスクリプトーム解析

- **mRNA領域の網羅的推定**
- **新規スプライスバリエーションの発見**
- **融合遺伝子の発見**
- **ゲノム未知な生物において de novo アセンブルを用いて、mRNA配列の網羅的取得**
- **新規 ncRNAの発見**

赤字 — マイクロアレイでは難しいこと



July 2008 - Vol 5 No 7

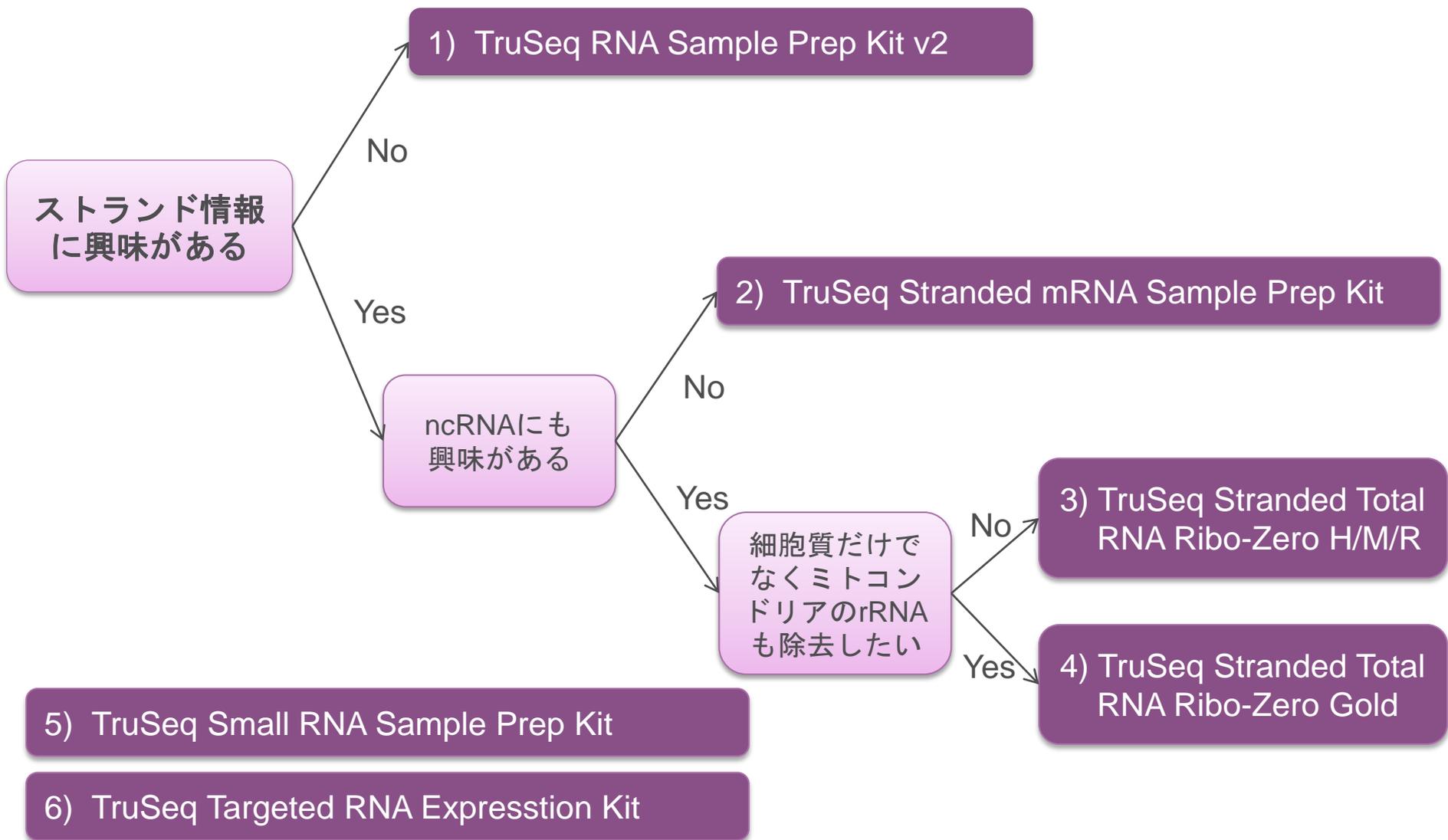
Nature Methods 5 (2008)

The beginning of the end for microarrays?

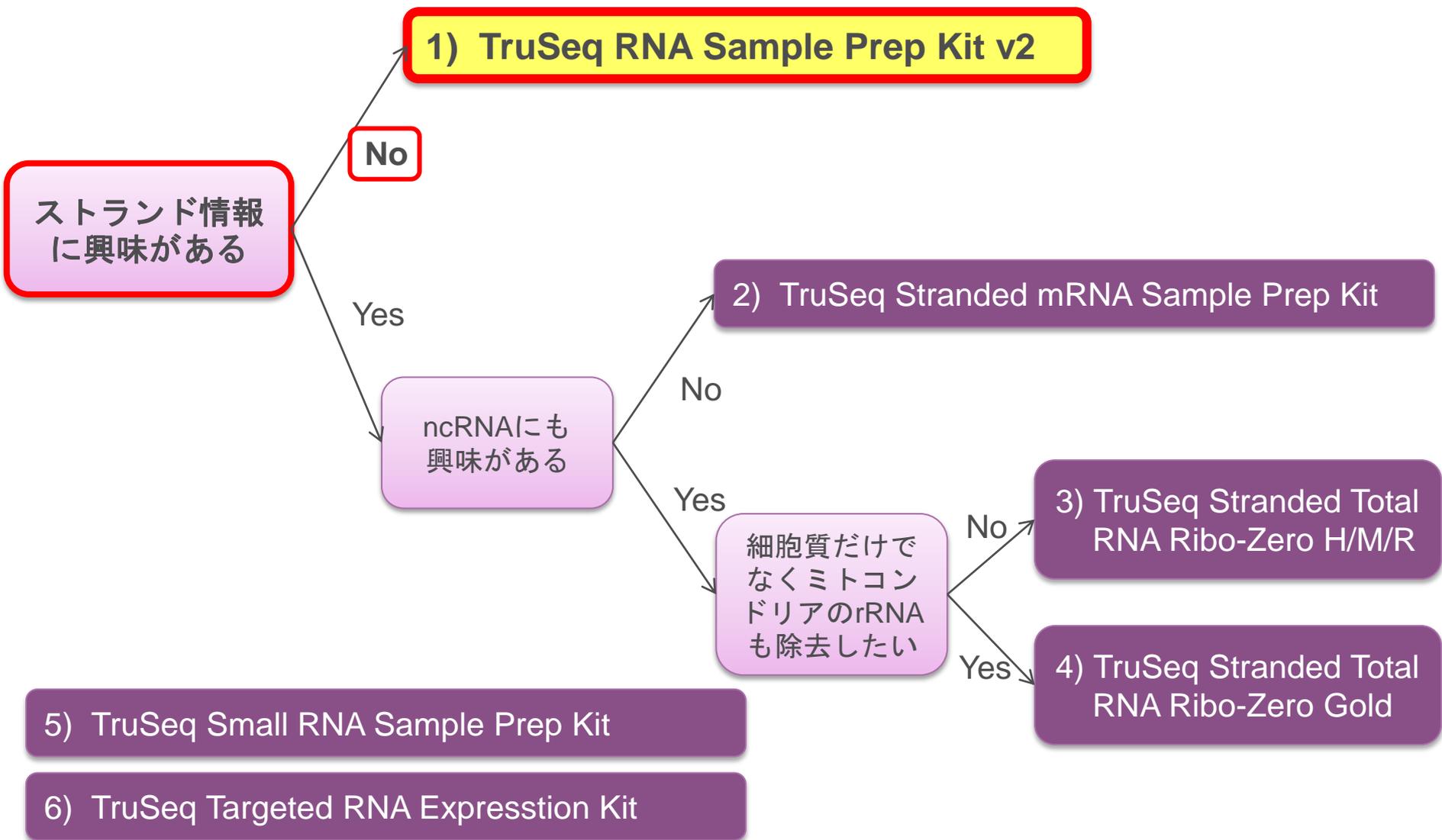
RNA-Seqのワークフロー



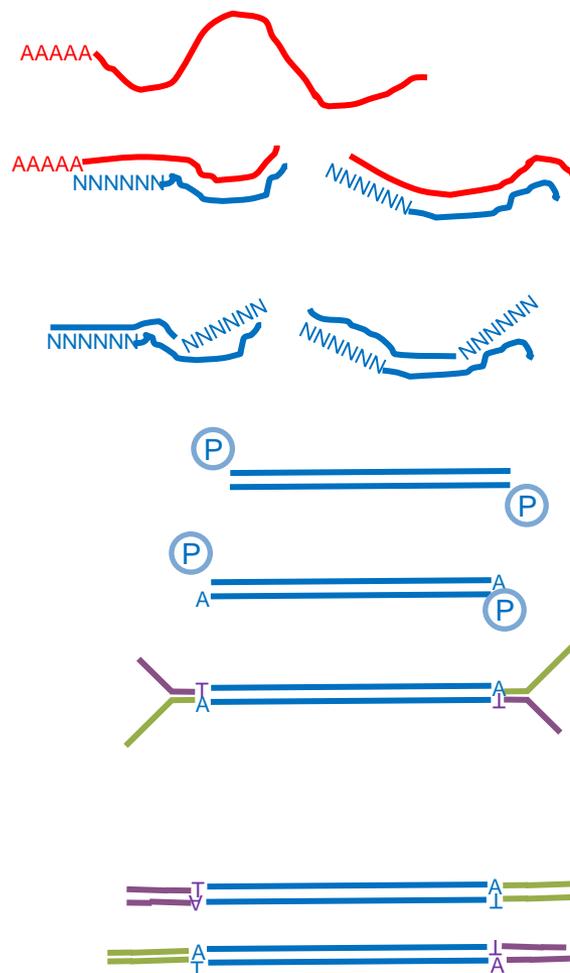
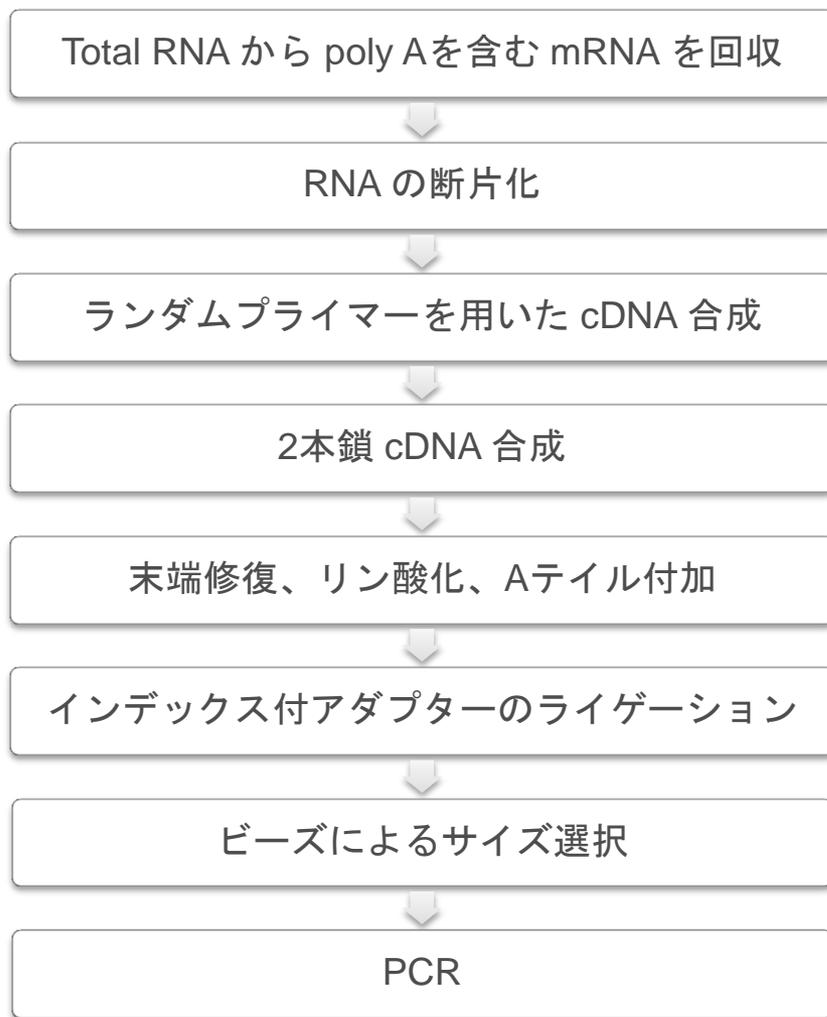
RNA-Seq : イルミナ RNAキットの選択



RNA-Seq : イルミナ RNAキットの選択

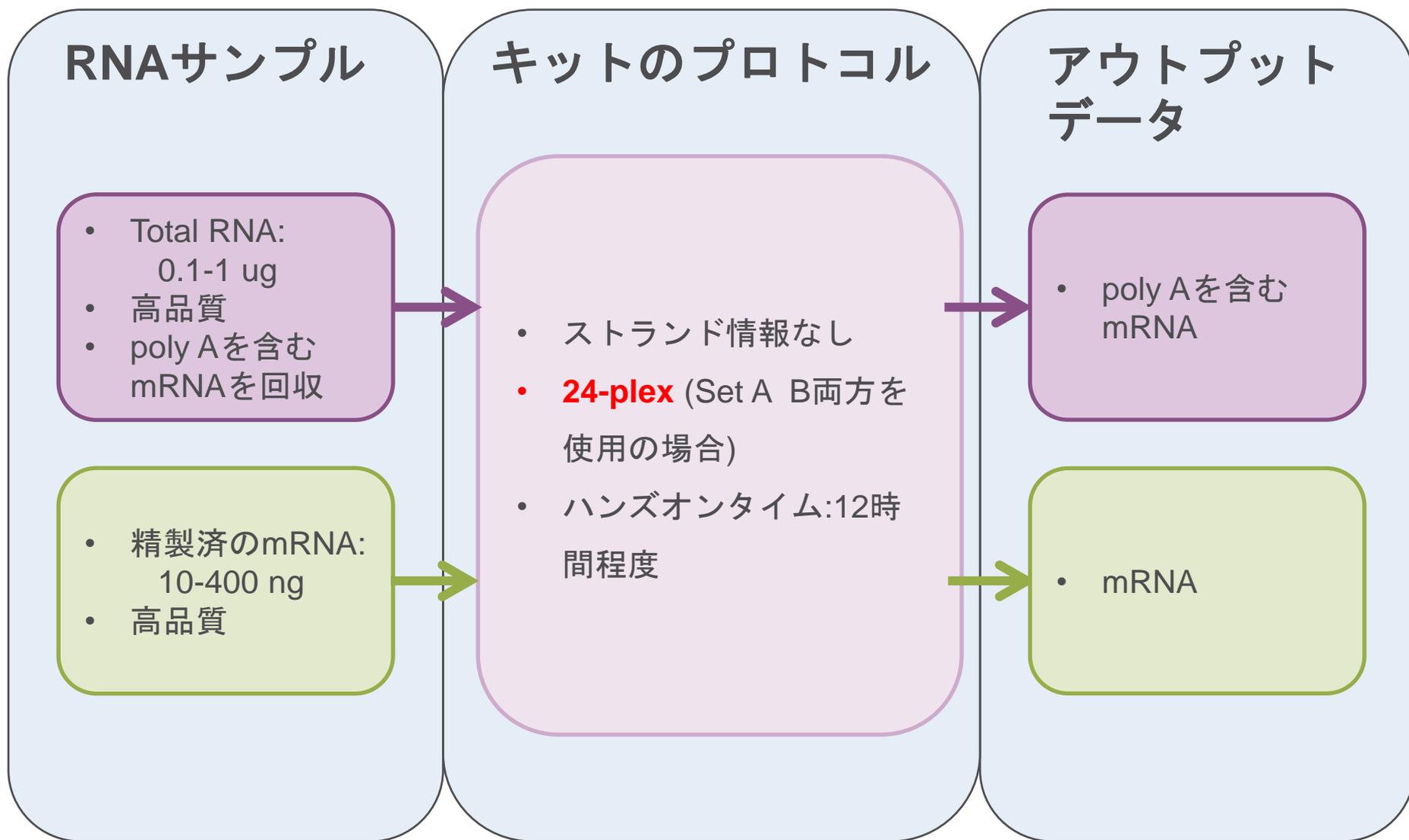


1) TruSeq RNA Sample Prep Kit v2のワークフロー

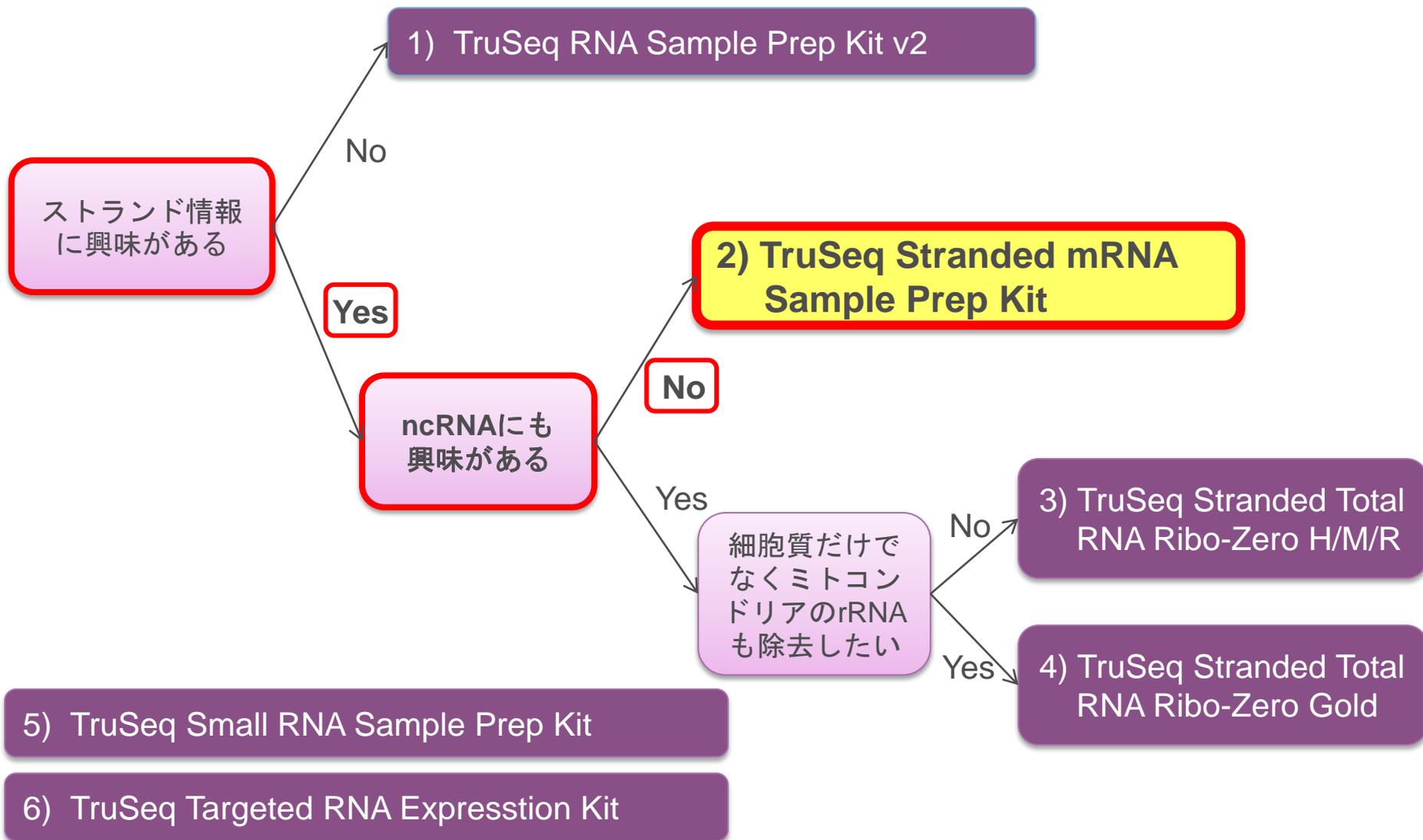


1) TruSeq RNA Sample Prep kit v2

最もスタンダードなプロトコル、ストランド情報なし

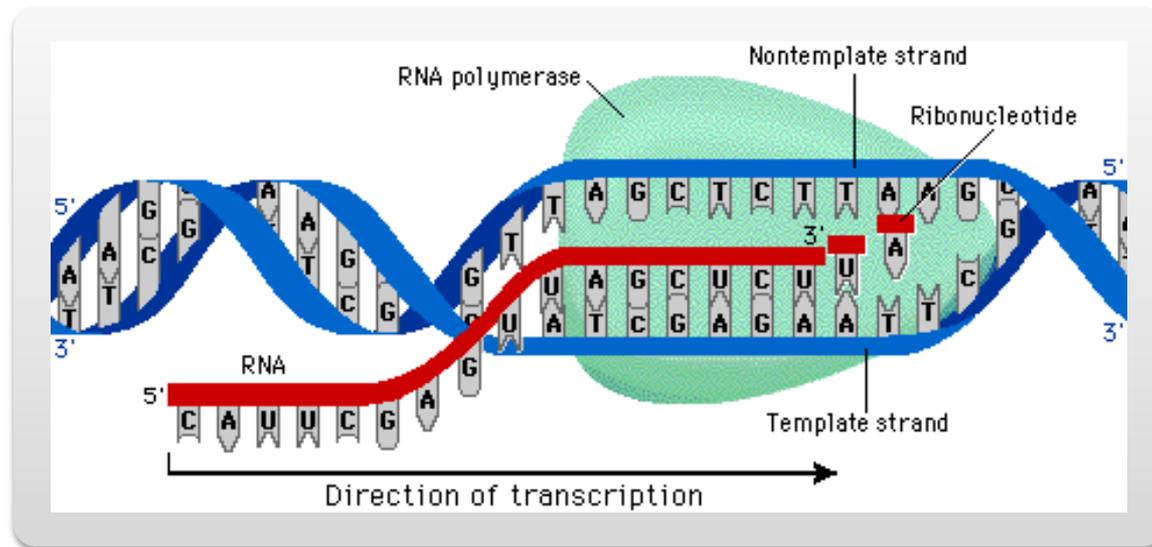


RNA-Seq : イルミナ RNAキットの選択



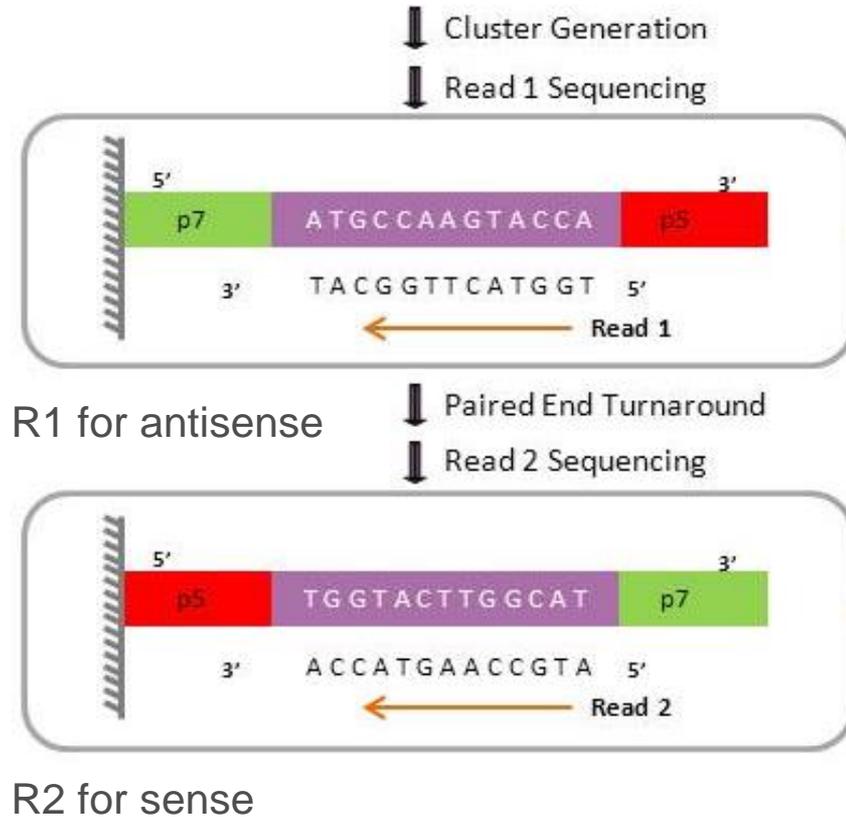
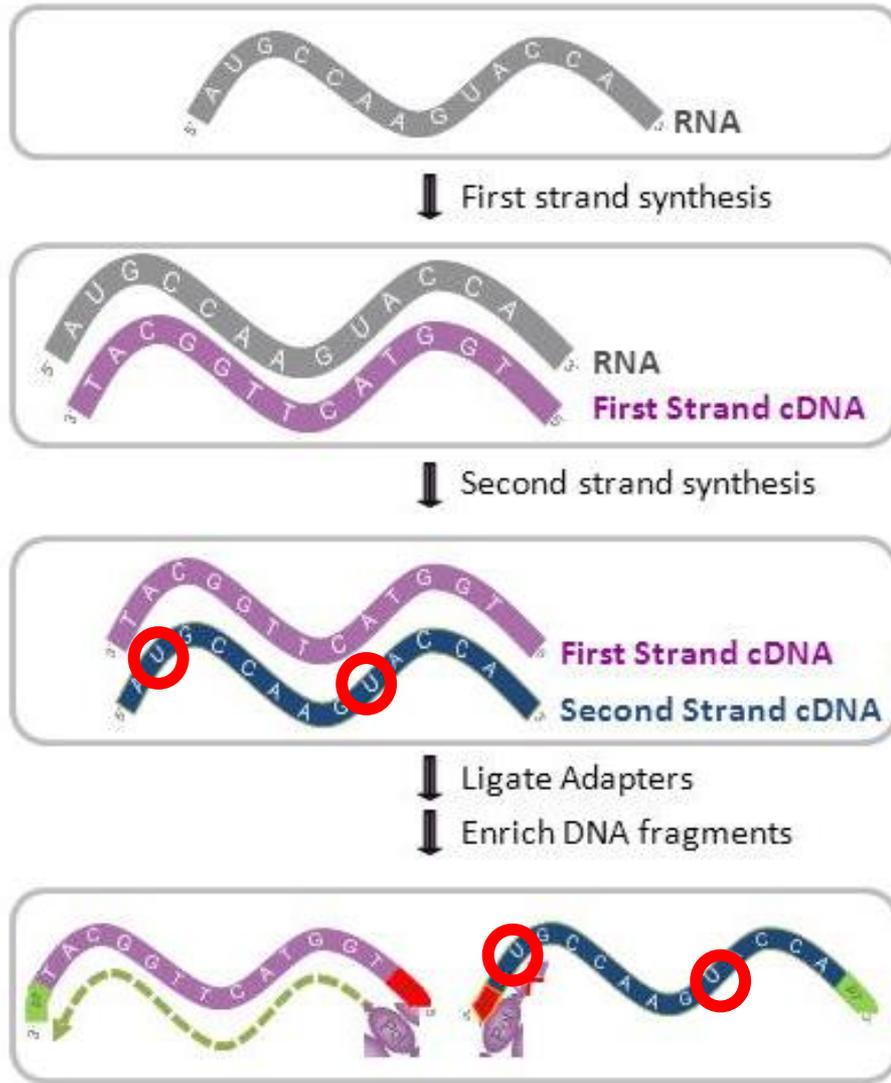
ストランド情報とは？

- ▶ ストランド情報：2つのDNA鎖のどちらの鎖からRNAが生成されたのかを示す



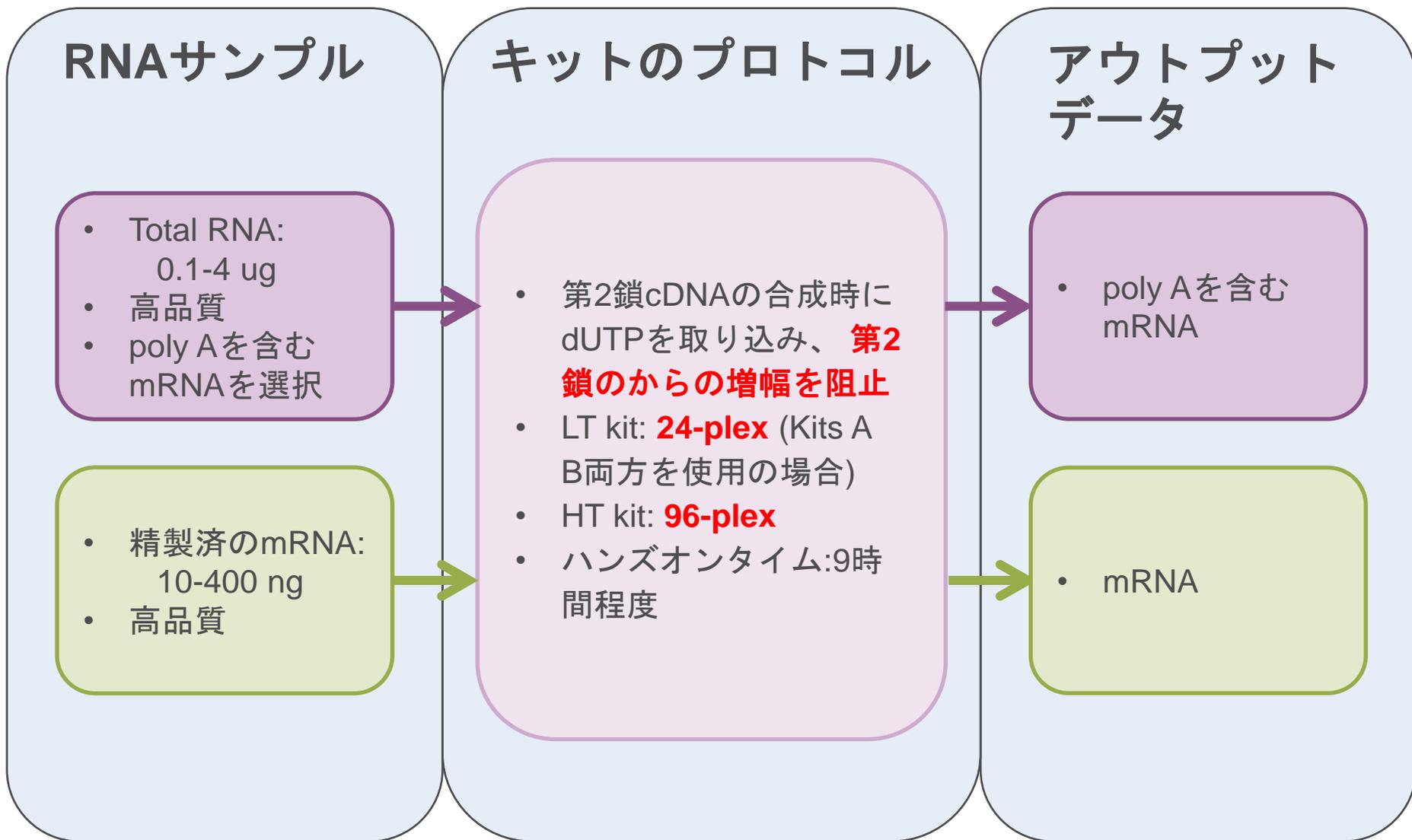
- ▶ なぜストランド情報が重要なのか？
 - 鋳型となる鎖がわかれば、ゲノムに特異的にマッピングすることができるため、結果として効率よく配列を読むことができ、サンプルとコストを抑えることができる。
 - 遺伝子調節の重要な役割を示すアンチセンスRNAの発現を検出することが可能。

2) TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kitは、 どのようにしてストランド情報が保持されるのか？

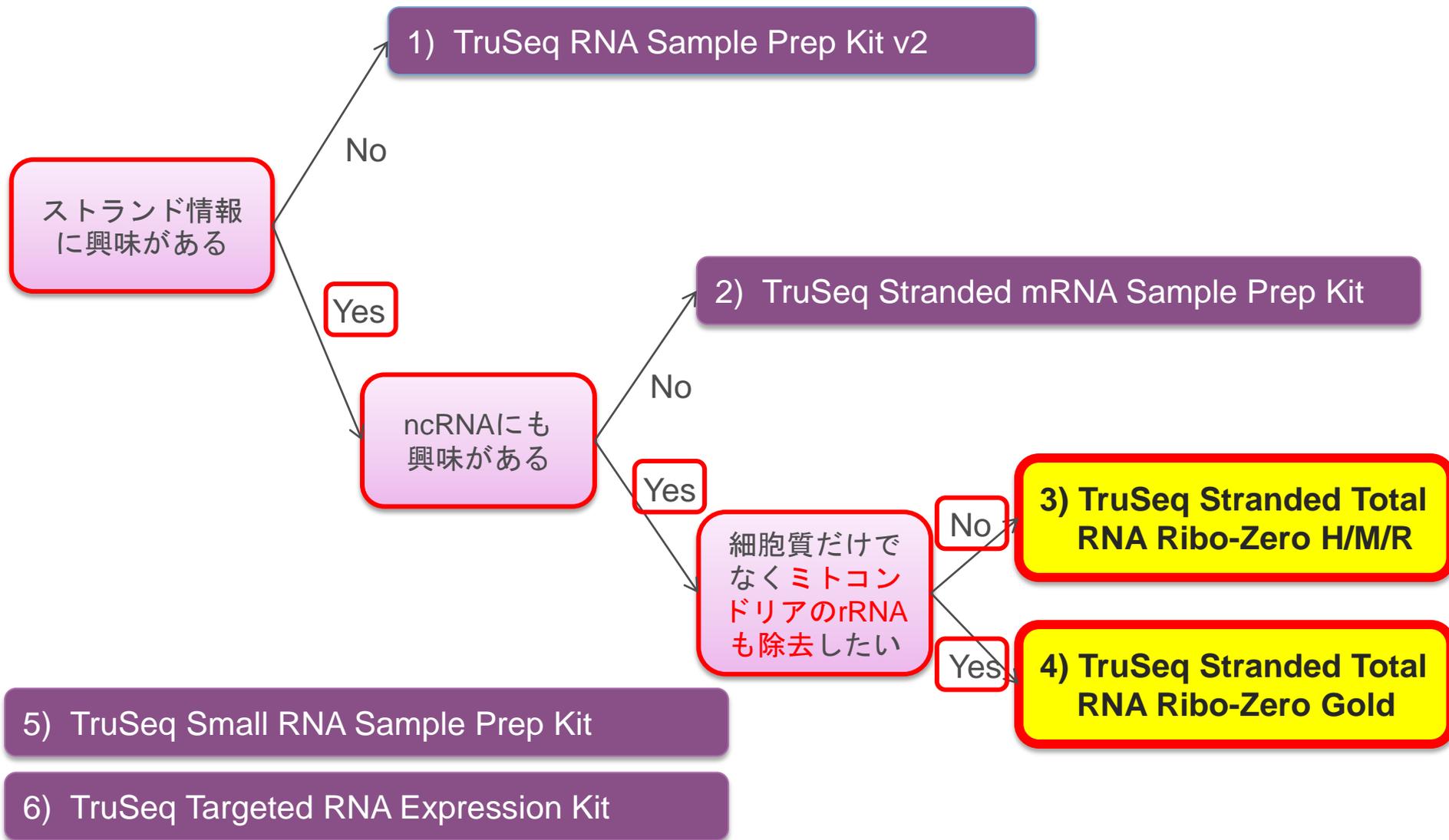


2) TruSeq Stranded mRNA Sample Prep kit

ストランド情報あり



RNA-Seq : イルミナ RNAキットの選択



3) TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero H/M/R

ストランド情報あり, Ribo-zero + 2) TruSeq Stranded mRNA

RNAサンプル

- **Total RNA:**
0.1-1 ug
- **FFPEサンプル**
に使用可能
- 対応生物種:
 1. ヒト/マウス/ラット
 2. **細胞質 rRNA除去**

キットのプロトコル

- 第2鎖cDNAの合成時にdUTPを取り込み、**第2鎖のからの増幅を阻止**
- LT kit: **24-plex** (Kits A B両方を使用の場合)
- HT kit: **96-plex**
- ハンズオンタイム:8時間程度

アウトプットデータ

- mRNA
- **ncRNA**

4) TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Gold

ストランド情報あり, Ribo-zero + 2) TruSeq Stranded mRNA

RNAサンプル

- **Total RNA:**
0.1-1 ug
- **FFPEサンプル**
に使用可能
- 対応生物種:
 1. ヒト/マウス/ラット
 2. Gold (ヒト/マウス/ラット):
ミトコンドリア
+ 細胞質 rRNA除去

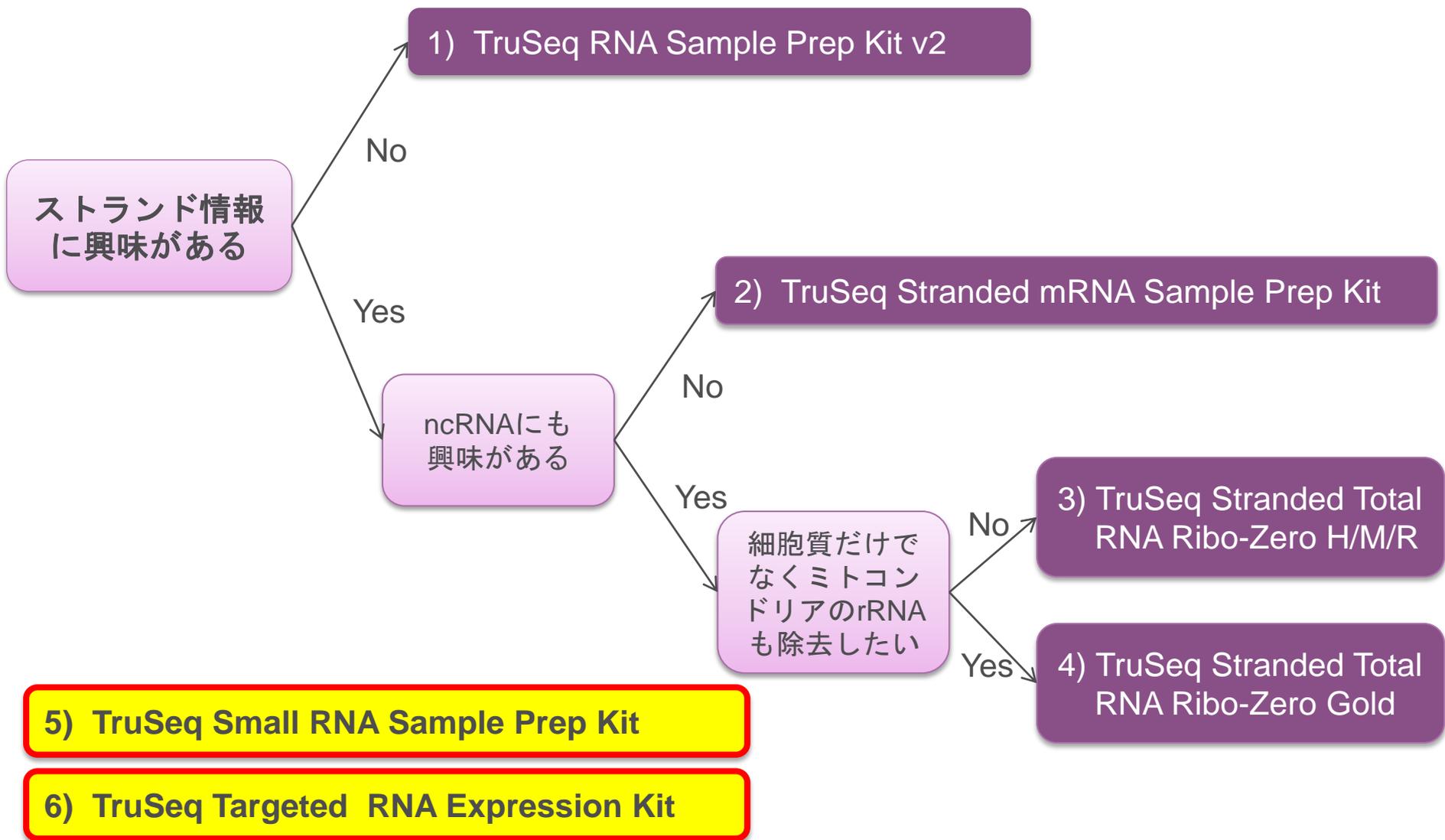
キットのプロトコル

- 第2鎖cDNAの合成時にdUTPを取り込み、**第2鎖のからの増幅を阻止**
- LT kit: **24-plex** (Kits A B両方を使用の場合)
- HT kit: **96-plex**
- ハンズオンタイム:8時間程度

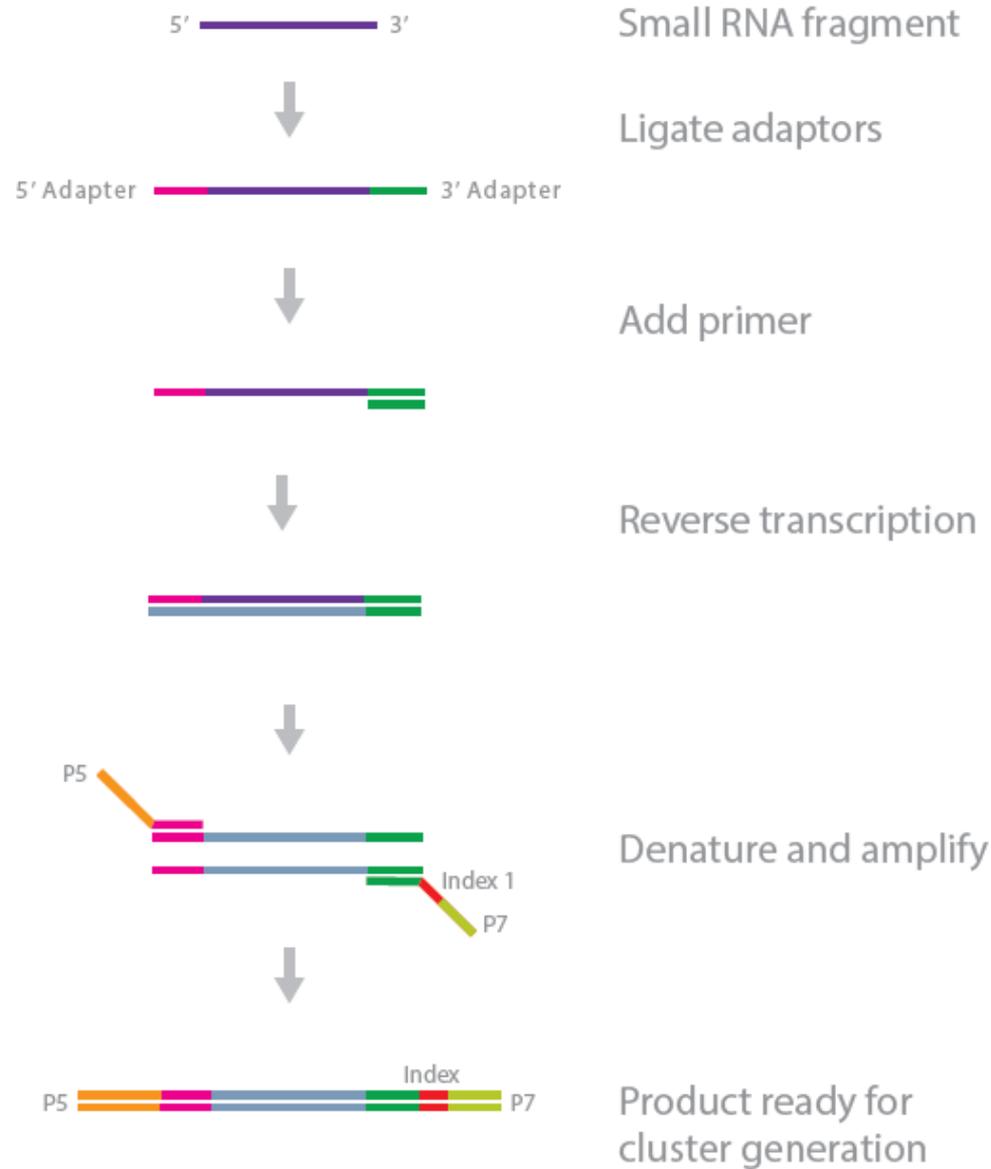
アウトプットデータ

- mRNA
- **ncRNA**

RNA-Seq : イルミナ RNAキットの選択



5) TruSeq Small RNA Kitのワークフロー



5) TruSeq Small RNA Sample Prep Kit

ストランド情報あり

RNAサンプル

- Total RNA: 1 ug
- 予め1-10 ugの total RNAから精製した small RNA
- 高品質
- Dicer-Drosha 経路を経ていること

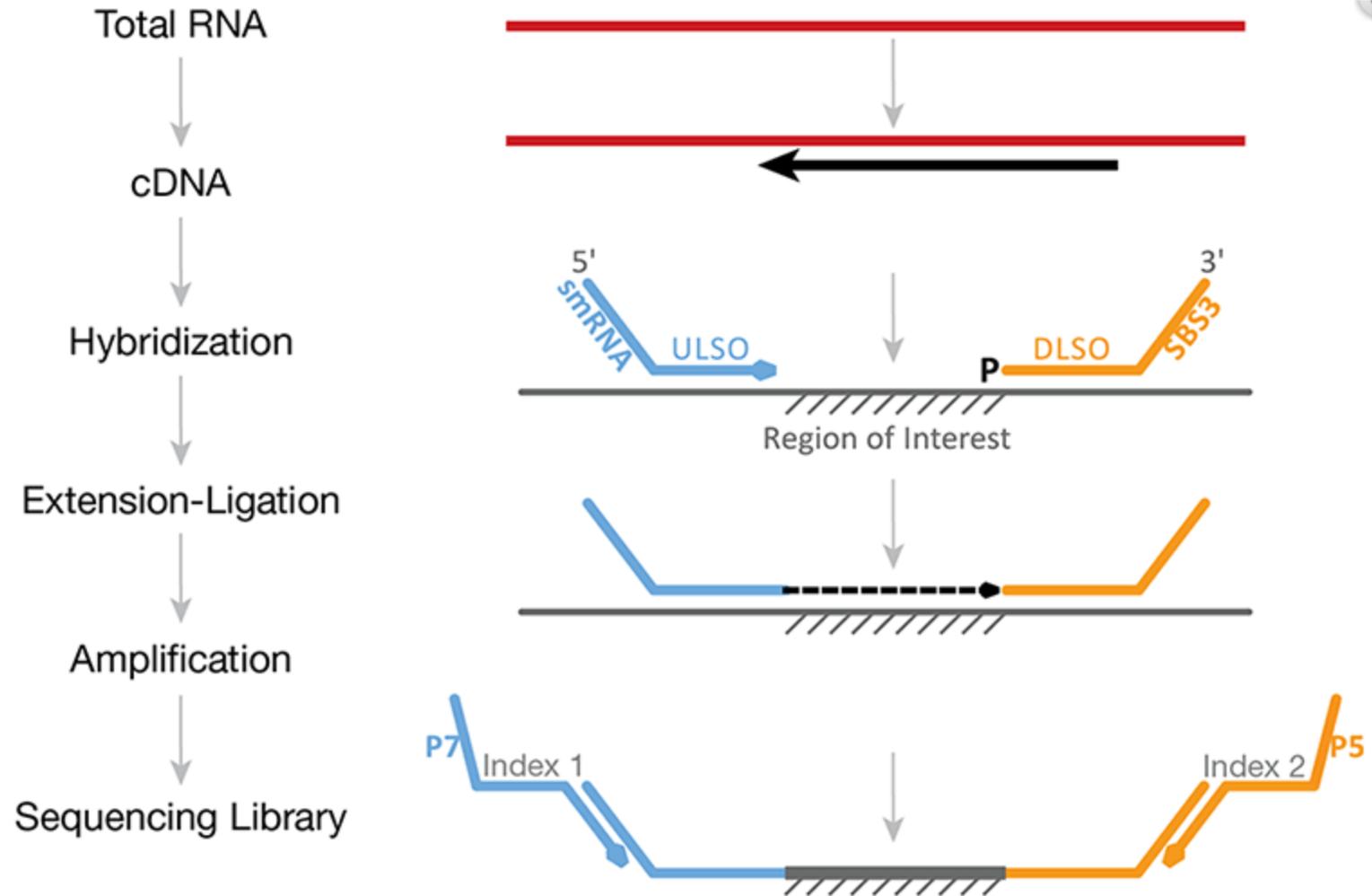
キットのプロトコル

- 3' / 5' アダプターを独立して結合させるため **ストランド情報の保持**が可能
- **48-plex** (Set A-Dを使用した場合)
- ハンズオンタイム: 24 時間程度

アウトプットデータ

- Dicer-Drosha 経路を経た **microRNA**

6) TruSeq Targeted RNA Expression Kit のワークフロー



6) TruSeq Targeted RNA Expression Kit

ストランド情報あり

RNAサンプル

- Total RNA:
50 ng
- 100 ng, 200 bp
以上のFFPEサ
ンプル

キットのプロトコル

- ULSO、DLSO がそれ
ぞれ結合するので**スト
ランド情報が保持**され
る
- パネルにカスタム領域
を加えることが可能
- サンプルは**384-plex**ま
で設定可能
- ハンズオンタイム: 4時
間程度

アウトプット データ

- 各遺伝子の発現
レベル
- 1ランにつき384
サンプルまで測
定可能

RNAキット 一覧表

	Input			Protocol			Output情報			
	Input Total RNA量	FFPE	対応している生物種	ストランド情報	ハンズオン	Plex数	mRNA	ncRNA	Small RNA	
mRNA	TruSeq RNA v2	0.1-1 ug		真核生物		12時間	24	●		
	TruSeq Stranded mRNA	0.1-4 ug		真核生物	●	9時間	96	●		
Total RNA	TruSeq Stranded Total RNA	0.1-1 ug	●	ヒト/マウス/ラット	●	8時間	96	●	●	
Small RNA	TruSeq Small RNA	1 ug		指定なし	●	24時間	48			●
Targeted RNA	TruSeq Targeted RNA Expression	50 ng	●*	ヒト/マウス/ラット	●	4時間	384	●	●	

*FFPEサンプルまたは分解が進んだサンプルの場合は100ng

シーケンスサンプル調製キット “Kit Selector”

「あなたのアプリケーションに適したサンプル調製キットを探す」 2014/03/31

illumina®

お問い合わせ MyIllumina Tools ▾

アプリケーション システム 臨床研究 受託サービス サイエンス サポート カンパニー

Search 🔍

サポート » シーケンスサンプル調製キットセレクター

📧 📱 | Follow us: 📺

サンプルの種類	シーケンスプロジェクトタイプ	サンプル調製群	サンプル調製オプション
DNA	全ゲノム	TruSeq	TruSeq DNA PCR-Free
RNA	ターゲット濃縮	Nextera	TruSeq NANO DNA
ChIP-Seq	小さいゲノム/プラスミド	上記オプションを 比較	上記オプションを 比較
	アンプリコン	上記オプションを 比較	

クリックして
選りながら
進みます

サンプル調製キット詳細

全ゲノムシーケンスに最適な、必要な試薬をすべて含んだシンプルなキットです。広く使われているサンプル調製ケミストリーをさらに改良したこの新しいワークフローは、PCRを必要とせず、ゲノムカバーレッジを向上し、解析が難しい領域もシーケンスが可能です。キットは、ロースループットとハイスループットの2種類をご用意しています。

-カタログ番号:ロースループット

-FC-121-3001(12種類のインデックスセットA、24サンプル分)

-FC-121-3002(12種類のインデックスセットB、24サンプル分)

-カタログ番号:ハイスループット

-FC-121-3003(96種類のインデックスセット、96サンプル分。インデックスはプレート形式です。4回以上の凍結融解を繰り返さないようにご注意ください。このキットは24サンプル単位以上で処理ください。)

-その他の情報は、イルミナの [製品](#) ウェブページをご覧ください。

-プロトコールやキット内容、ベストプラクティスなどの技術的詳細は、下記のサポートページをご覧ください。

-[ロースループット](#)

-[ハイスループット](#)

イルミナサポートウェビナー(http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss)

インプットRNAのクオリティ

▶ 必要なクオリティ条件:

- 1) TruSeq RNA v2、2) TruSeq Stranded mRNA、5) TruSeq Small RNA
: **RIN>8***、FFPEサンプルは使用不可
*哺乳類に対してのみ。他の生物種については、各文献を参照。
: 単離したmRNA・small RNAサンプルも使用可能 (ユーザーガイド参照)
- 3), 4) TruSeq Stranded Total RNA各種、6) TruSeq Targeted Expression RNA
: **FFPEサンプルの使用可能**

▶ クオリティチェックの測定方法は?

- Bioanalyzer でRNA chip を用いてRIN値を測定
- ホルムアルデヒドを含む1% アガロースゲルを用いた電気泳動後、EtBrで染色してバンドを確認

インプットRNAのクオリティは、RNA-Seq では重要なファクターとなる

インプットRNAのクオリティに基づいたキットの選択

- ▶ インプットRNAのクオリティの違いによるキットの選択:
 - 良いクオリティ: いずれのキットも使用可能
 - 悪いクオリティ: TruSeq Stranded Total RNA Kit 各種を推奨
 - 分解が進んだサンプル
 - FFPE サンプル

どのキットを選択する場合にでも、インプットRNAのクオリティが基準となる

- ▶ インプットRNAのクオリティによって変わるtotal RNAの必要量:
 - 良いクオリティ: 100 ng
 - 悪いクオリティ: 100 ng以上

調製したライブラリーのクオリティチェックのポイント

▶ 調製したライブラリーのBioanalyzerを用いたクオリティチェック:

- 断片長の大きさ
- 想定外のピークはないか?
 - Primer dimer
 - Adapter dimer
 - Bubble product: 問題はない
 - AMPure beads のキャリーオーバー
 - コンタミ: ライブラリーの調製、Bioanalyzer

参照: イルミナサポートウェビナーシリーズ2013 2013/10/18
「**Bioanalyzerを使用したLibrary QCとトラブルシューティング**」

▶ qPCRを用いたライブラリーの定量:

- Qubit & Nanodrop: 正確ではない
- qPCR: **推奨**

参照: イルミナサポートウェビナーシリーズ2012 2012/09/28
「**BioanalyzerとqPCRを使用したライブラリーの定性・定量評価**」

Summary

- ▶ 研究の目的、インプットRNAのクオリティによってRNA-Seqのライブラリー調製に用いるイルミナRNAキットを選択することが可能。
 - Kit Selector の利用
- ▶ ランの成功には、インプットRNAのクオリティが重要
 - Bioanalyzerを用いたインプットRNAのRIN値の測定
 - ホルムアルデヒドを含む1% アガロースゲルを用いた電気泳動
- ▶ RNAキットで調製したライブラリーのサイズ確認と定量が重要
 - Bioanalyzerを用いた断片長の確認
 - qPCRを用いた定量

サポートウェビナーにご参加いただき
ありがとうございました。

本日のセッション終了後のご質問は、
techsupport@illumina.com
で承ります。