

# BaseSpaceで達成するSmall RNA発現解析

March 28, 2016



寺倉 伸治  
イルミナ株式会社  
アプリケーションコンサルタント

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, 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®

# Small RNA解析のワークフロー



## ①RNAの準備

- ・ どれぐらいのRNAが必要か？
- ・ 抽出に適したキットは何か？



## ②ライブラリー調製

- ・ TruSeq Small RNA Sample Prep Kitの留意点
- ・ ライブラリーの評価方法



## ③シーケンス

- ・ シーケンス条件について (読み量とリード長)
- ・ 最適インストール濃度は？



## ④情報解析

- ・ BaseSpaceでこういった解析が可能か？
- ・ 出力結果の紹介

# Small RNA解析のワークフロー



## ①RNAの準備

- ・ どれぐらいのRNAが必要か？
- ・ 抽出に適したキットは何か？



## ②ライブラリー調製

- ・ TruSeq Small RNA Sample Prep Kitの留意点
- ・ ライブラリーの評価方法



## ③シーケンス

- ・ シーケンス条件について (読み量とリード長)
- ・ 最適インストール濃度は？



## ④情報解析

- ・ BaseSpaceでこういった解析が可能か？
- ・ 出力結果の紹介

# RNAの準備

- ✓ TruSeq Small RNA Sample Prep Kitを用いたライブラリー調製には1 µgのTotal RNA、もしくは10~ 40 ng Small RNAが必要
- ✓ RNAの抽出にはmiRNA用の製品を使用するとよい、miRVana (ライフテクノロジーズ)、miRNeasy (キアゲン)、NucleoSpin miRNA (マッハライナーゲル)など。
- ✓ RIN8以上を推奨、Agilent BioanalyzerやTape Stationなどを用いて、RNAの品質評価を行う
- ✓ miRNA濃縮画分(サイズ選別したSmall RNA、AGO1免疫沈降物、Exosomal miRNA、血漿中miRNA)を用いる場合は、Agilent 2100 Bioanalyzer Small RNAチップでmiRNAの確認するとよい。
- ✓ TruSeq Small RNA Sample Prep Kitは、5'末端がモノリン酸化、および3'末端がOH基になっているSmall RNAを対象としている。RNAの性状によっては、酵素処理などが必要かもしれない。

# TruSeq Small RNA Sample Prep Kitの紹介



- ✓ 1Kitあたり24反応
- ✓ 1 Kitあたり12種類のインデックス付き、SetA~Dを購入すると最大で48 インデックスに対応
- ✓ 1.5日間のワークフロー

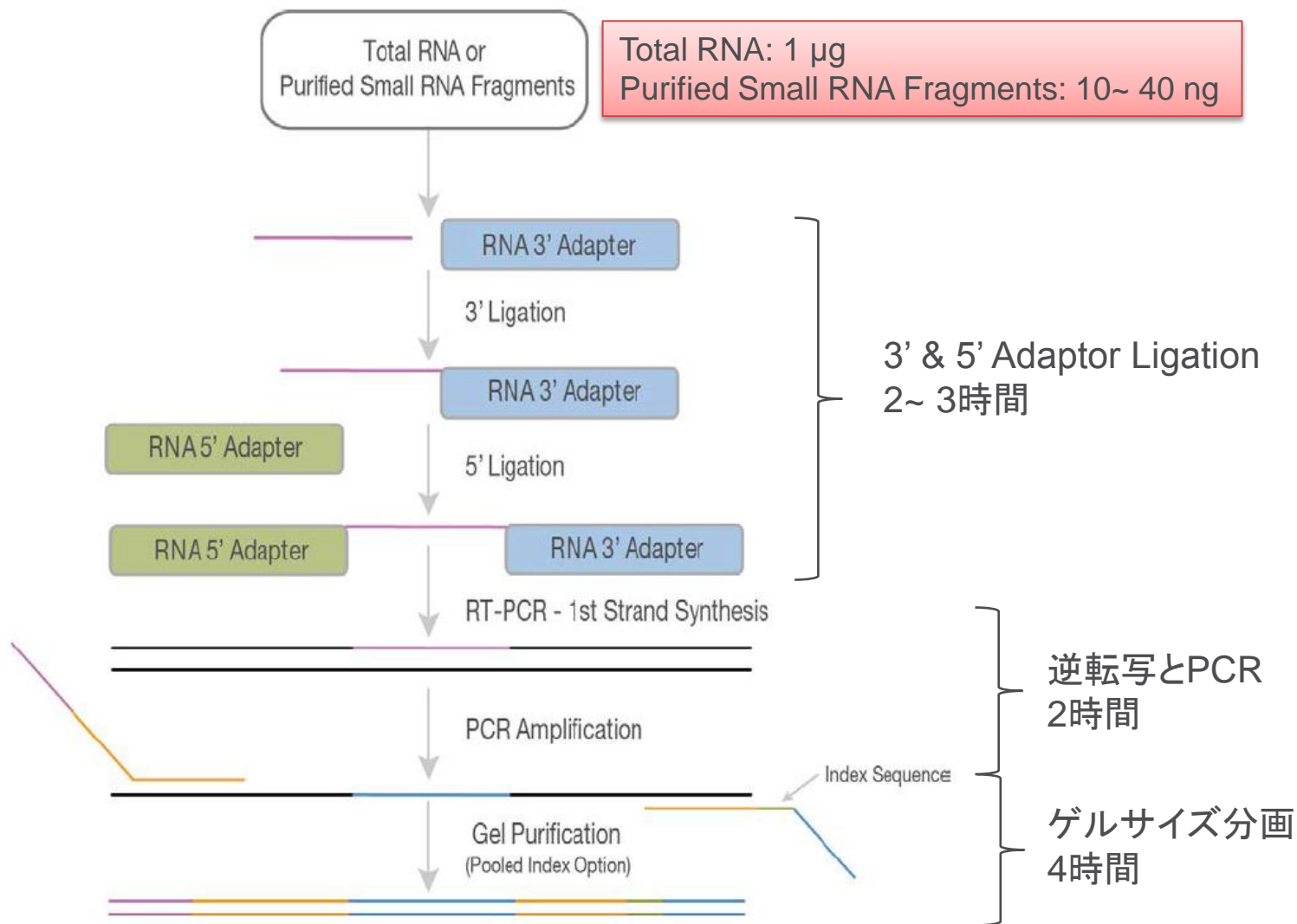
カタログ番号	キット名	1サンプルあたりのコスト	キット価格
RS-200-0012	TruSeq Small RNA Sample Prep Kit - Set A	19,125円	459,000円
RS-200-0024	TruSeq Small RNA Sample Prep Kit - Set B	19,125円	459,000円
RS-200-0036	TruSeq Small RNA Sample Prep Kit - Set C	19,125円	459,000円
RS-200-0048	TruSeq Small RNA Sample Prep Kit - Set D	19,125円	459,000円

価格は試薬消耗品価格表2016年4月改訂版による

# ライブラリー調製 必要準備品、特に注意が必要なもの

- ▶ **T4 RNA Ligase 2, Deletion Mutant** (Epicentre, Cat# LR2D1132K: 2,000 units [up to 10 libraries], Cat# LR2D11310K: 10,000 units [up to 50 libraries])
- ▶ **SuperScript II Reverse Transcriptase** (Life Technologies, Cat# 18064-014 10,000 units [up to 50 libraries])
- ▶ 電気泳動に必要なもの
  - Novex TBE gels 6%, 10 well (Life Technologies, Cat# EC6265BOX)
  - Novex TBE running buffer (5X) (Invitrogen, Cat# LC6675)
  - 上記の電気泳動が可能な電気泳動槽 (Xcell SureLock Mini-Cell Electrophoresis unitなど)
- ▶ Glycogenもしくは同等品
- ▶ Filter Tube (IST Engineering, Cat# 5388-50 や Costar, Cat#8162、もしくは同等品); ゲルからのDNA抽出の際にゲルデブリを除くのに使用

## ライブラリー調製ワークフロー



# アダプターライゲーション工程

## 3' Adaptor Ligation

Total RNA (1 µg)	5 ul
RNA 3' Adaptor (RA3)	1 ul
<hr/>	
Total Volume	6 ul

↓ 熱変性  
70°C, 2 min. → **すぐに氷上へ**

以下のPremix (4 ul)を加える(反応液の総量は10 µl)

Ligation Buffer (HML)	2 ul
RNase Inhibitor	1 ul
T4 RNA Ligase 2, Deletion Mutant	1 ul
<hr/>	
Total Volume	4 ul

↓ 28°C, 60 min.

↓ 1 ul Stop Solution (STP)を加え、ピペッティング。(反応液の総量は11 µl)

↓ 28°C, 15 min → 氷上へ.



# アダプターライゲーション工程

## 5' Adaptor Ligation

1. PCRチューブに1検体あたり1.1  $\mu$ lのRNA 5' Adaptor (RA5)を移し、70°C 2分間の処理をしたのち速やかに氷上へ移す。

\* 1検体であれば1.1  $\mu$ l、4検体であれば4.4  $\mu$ lとなる。

2. 熱変性したRA5を用いて、以下の5' adaptor ligationの反応液を調製する。

Reagent Name	1 rxn	4 rxn
熱変性したRA5	1.1 $\mu$ l	4.4 $\mu$ l
10 mM ATP	1.1 $\mu$ l	4.4 $\mu$ l
T4 RNA Ligase	1.1 $\mu$ l	4.4 $\mu$ l
Total Volume	3.3 $\mu$ l	13.2 $\mu$ l

← 必要量の1.1倍を準備

3. 準備したPremixを用いて、5' adaptor ligation反応を行う

11  $\mu$ l 3' Adapter Ligation反応物



3  $\mu$ lの調製した5' adaptor ligationの反応液を加える。(反応液の総量は14  $\mu$ l)



28°C, 60 min.



ライゲーション産物 (14  $\mu$ l)

氷上に置き、次のステップへ進む。

## 逆転写反応

## 逆転写反応

6  $\mu$ l アダプターライゲーション産物↓  
1  $\mu$ l RNA RT Primerを加える。↓  
熱変性70°C, 2 min. → すぐに氷上へ↓  
以下のPremixを5.5  $\mu$ l加えます (反応液の総量は12.5  $\mu$ l)

Reagent Name	1 rxn	4 rxn
5X First Strand Buffer*	2 $\mu$ l	8.8 $\mu$ l
12.5 mM dNTP**	0.5 $\mu$ l	2.2 $\mu$ l
100 mM DTT*	1 $\mu$ l	4.4 $\mu$ l
RNase Inhibitor	1 $\mu$ l	4.4 $\mu$ l
SuperScript II Reverse Transcriptase*	1 $\mu$ l	4.4 $\mu$ l
Total Volume	5.5 $\mu$ l	24.2 $\mu$ l

↓  
50°C 1時間反応↓  
氷上へ

14  $\mu$ lのライゲーション産物のうち、6  $\mu$ lを使って逆転写反応を実施  
余ったライゲーション産物は、-80°Cで1週間まで保存可能

複数サンプルの場合は、必要量の**1.1倍**を準備

\*5X First Strand Buffer、DTTとSuperScript II RTaseはinvitrogenのSuperScriptIIの付属品となります。

**\*\*12.5 mM dNTPの準備**

25 mM dNTP Mix	0.5 $\mu$ l
Ultra Pure Water	0.5 $\mu$ l

Total Volume	1 $\mu$ l
--------------	-----------

# PCR Amplification

以下のPremixを逆転写産物 (12.5  $\mu$ l)を加える。(反応液の総量は50  $\mu$ l)

Ultra Pure Water	8.5 $\mu$ l
PCR Mix(PML)	25 $\mu$ l
RNA PCR Primer (RP1)	2 $\mu$ l
RNA PCR Primer Index (RPIX)	2 $\mu$ l
<hr/>	
Total Volume	37.5 $\mu$ l

RNA PCR PrimerはRNAではありません、DNA Primerです。  
RNA PCR Primer Index (RPIX)でIndexが付加される。

↓  
PCR増幅反応

98°C 30秒間

98°C 10秒間

60°C 30秒間

72°C 15秒間

11サイクル\*

\*11サイクルは1  $\mu$ g Total RNAを出発材料にした場合です。サンプル量や性状に合わせて、最大で15サイクルまで増やすことが可能

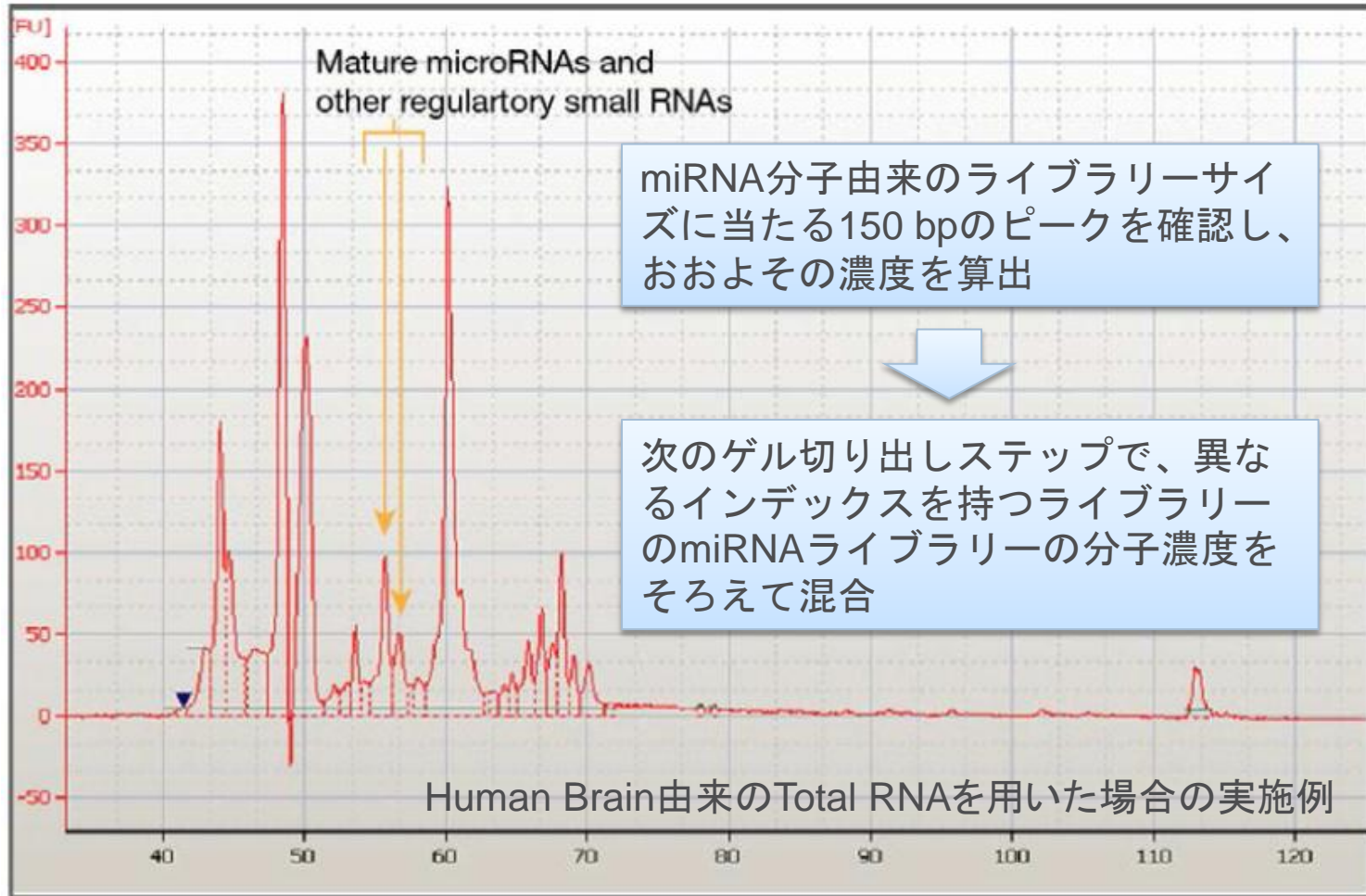
72°C 10分間

4°C Hold

↓  
PCR産物 (50  $\mu$ l)は-20°Cで1週間まで保存可能です。

# PCR Amplification

- ▶ PCR産物をAgilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity chipを用いて、評価を行います。



# Purify cDNA Construct

## 電気泳動を用いたサイズ選別

1. Agilent Bioanalyzerの評価結果を元に、異なるインデックスを持つライブラリーの、miRNA分子の濃度をそろえるように混合します。



多検体の場合はプールしたサンプルを切り出した方が手間がかかりませんが、検体数が少ない場合には、Agilent Bioanalyzerの評価をスキップして、1検体ずつゲル切り出ししてもよい。

2. 電気泳動を行うサンプルとマーカーの準備を行う

電気泳動するもの (3種類)

**#1 サイズラダー (High Resolution Ladder、キットに付属)**

1  $\mu$ l High Resolution Ladder + 1  $\mu$ l DNA Loading Dye = 2  $\mu$ l (1レーン分)

**#2 切り出し用の目安マーカー (Custom RNA Ladder、キットに付属)**

2  $\mu$ l Custom RNA Ladder + 2  $\mu$ l DNA Loading Dye = 4  $\mu$ l (2レーン分)

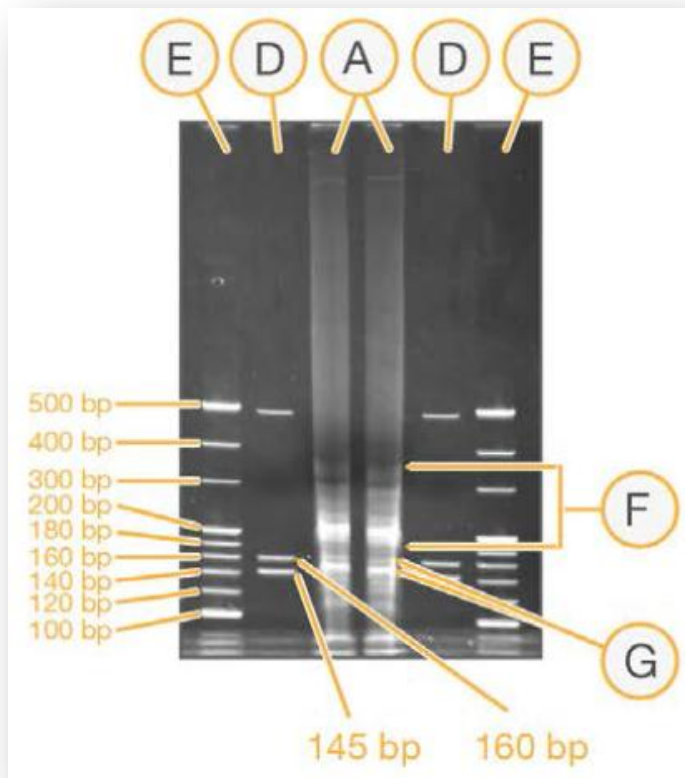
**#3 PCR産物(ライブラリー)もしくはプールしたPCR産物**

50  $\mu$ l PCR産物 + 10  $\mu$ l DNA loading dye = 60  $\mu$ l (レーンあたり25  $\mu$ lまで)

# Purify cDNA Construct

## 電気泳動を用いたサイズ選別

### 3. 電気泳動の実施



左の泳動図にあるような形で電気泳動を行います

E: **High Resolution Ladder** 2 ul/well, 1レーン分  
左の図は2レーン流していますが、1レーンでよい

D: **Custom RNA Ladder** 2 ul/well, 2レーン分  
ライブラリーを挟むように流す

A: **ライブラリー** 25 ul/ well, 2レーン分  
Wellあたり30 ulを越えないようにする



Novex TBE gels( 6%, 10 well)を用いて、140 V 60分間の電気泳動を行います



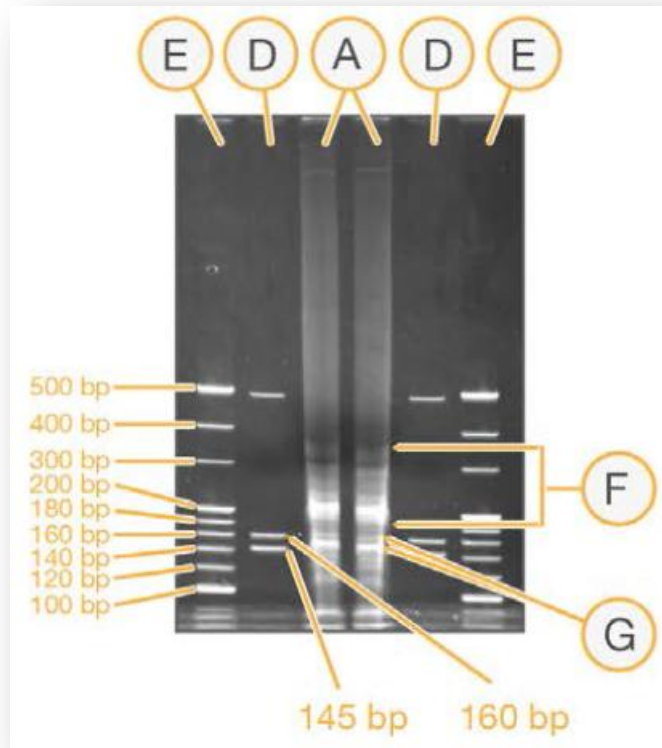
同じIndexを持つ場合には、コンタミを避けるために泳動槽を分けます。

# Purify cDNA Construct

## 電気泳動を用いたサイズ選別

4. エチジウムブロマイド水溶液 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ )で2~3分間染色を行います
5. UVトランスイルミネーターでDNAを可視化し切り出しを行います。

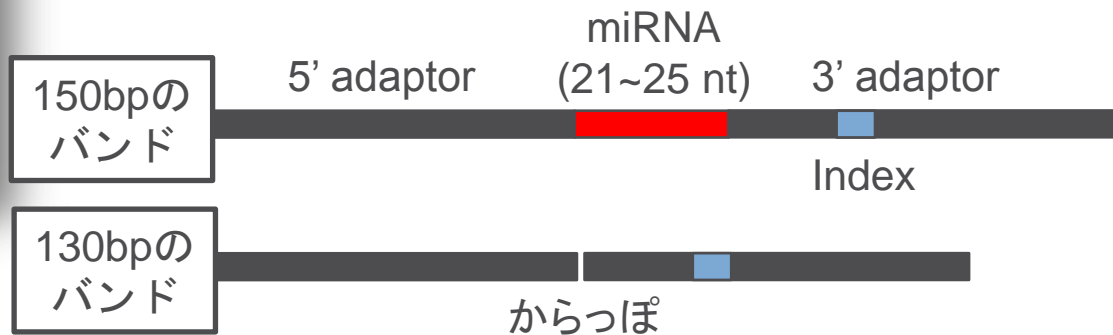
**\* SYBR Goldでの染色とDark Readerでの可視化もOK**



G: 切り出し目安マーカースが示す、**145~ 160 bp**が **miRNAに由来したライブラリー分子**となるので、ここを切り出す。

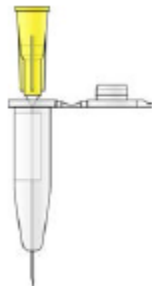
F: Small non coding RNAを対象とする場合はここも切り出す。

**\* 130 bpの分子はアダプター同士の間になるの  
で、切り出さないように注意！**



# ゲルからのDNA抽出

## ゲル破碎用チューブの準備



500 µl tubeの底に  
ニードルで穴をあける



穴をあけた500 µlチューブを、2 mlチューブにセットします

## ゲルの破碎とDNAの抽出

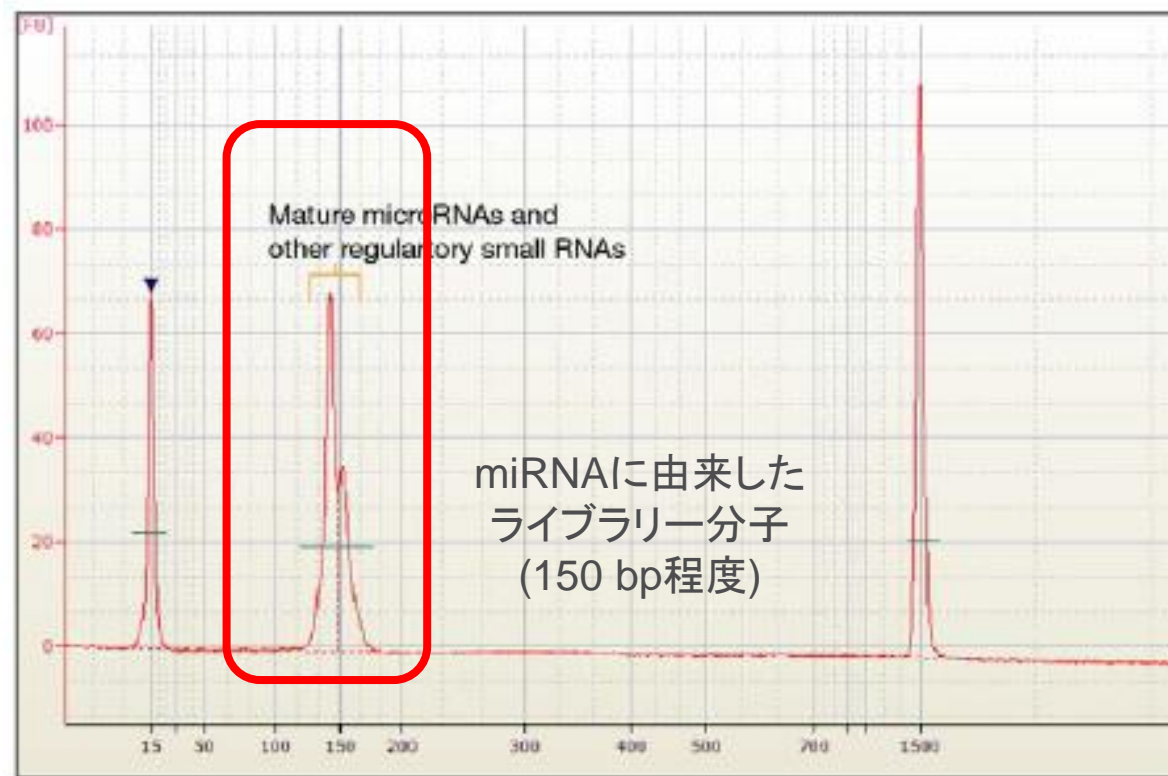
1. 準備したゲル破碎用チューブに切り出したゲルを入れ、20,000g 2分間の遠心処理でゲルを破碎します。
2. 300 µl Ultra Pure Waterを破碎したゲルに加え、室温で2時間以上、Rotatorを用いて混ぜます。(最大でオーバーナイト可)
3. フィルター (IST Engineering, part # 5388-50, ) を用いた遠心処理により、ゲルデブリを除く
4. 2 µl Glycogen、30 µl NaOAcと975 µl 冷却したEtOHを加え、20,000g 20分間の遠心処理を行います(エタノール沈殿)。
5. 500 µl 70% EtOHでリンスを行い、風乾させる。
6. 10 µl 10 mM Tris-HCl pH8.5 (EBやRSBでも可)に溶かす→ ライブラリー完成！

User Guideではエタノール沈殿はオプションの工程だが、実施した方が良い



# ライブラリーの評価

Agilent 2100 Bioanalyzer (DNA1000チップ)を用いてサイズと分子濃度の評価を行います。



\*Qubitといった二本鎖特異的定量を行い、Agilent 2100 Bioanalyzerの評価結果と矛盾しないかを確認するとよい。

# ライブラリー調製 注意点など

- ▶ RNAの熱変性 (70°C 2分間)の後は、速やかに氷上へ移す。
- ▶ ゲル切りだしにはBlue Pippin (sage science) を使うことも可能です。
- ▶ ライブラリー不良の原因は、スタートRNAに問題があることが多い。miRNA専用の抽出キットや、十分量のRNAを準備することが重要です。

# Small RNA解析のワークフロー



## ①RNAの準備

- ・どれぐらいのRNAが必要か？
- ・抽出に適したキットは何か？



## ②ライブラリー調製

- ・TruSeq Small RNA Sample Prep Kitの留意点
- ・ライブラリーの評価方法



## ③シーケンス

- ・シーケンス条件について (読み量とリード長)
- ・最適インストール濃度は？



## ④情報解析

- ・BaseSpaceでこういった解析が可能か？
- ・出力結果の紹介

# シーケンス条件

- ・検体あたり、100~ 500万リードの取得が目安
- ・リード長は50塩基でよい (miRNA解析の場合)

	MiniSeq		MiSeq		NextSeq	
1ランあたりのサンプル数 (500万リード取得)	1	~5	~3	~5	~26	~48
使用試薬	Mid Output	High Output	V2	V3	Mid Output	High Output
リード長	1x 50 bp					

\*TruSeq Small RNA Sample Prep Kitは最大で48インデックスまでの対応です

カタログ番号	製品名	取得リード数	価格
FC-420-1004	MiniSeq High Output Kit (75 Cycle)	800万リード	99,000円
FC-420-1001	MiniSeq High Output Kit (150 Cycle)	2,500万リード	144,000円
MS-102-2001	MiSeq Reagent Kit v2 (50 Cycle)	1,500万リード	144,000円
MS-102-3001	MiSeq Reagent Kit v3 (150 Cycle)	2,500万リード	158,000円
FC-404-2001	NextSeq 500 Mid Output v2 Kit (150 Cycle)	1億3,000万リード	186,000円
FC-404-2005	NextSeq 500 High Output v2 Kit (150 Cycle)	4億リード	249,000円

価格は試薬消耗品価格表2016年4月改訂版による

# シーケンス注意点

- ▶ Small RNA ライブラリーはサイズが短いため、クラスター形成効率がよい。クラスターが普段よりも多くできます。経験的な数字ではあるが、クラスター形成に用いるライブラリー濃度は通常の20~30%程度落としたほうがよい。
- ▶ アダプター部分の読み込みや検体の性状により%Baseが偏る



標準的なヒトTotal RNAからSmall RNAライブラリーを解析した場合

# Small RNA Appについて



Small RNA

illumina, Inc.

## Small RNA Appでできること

- ✓ miRNAの発現解析
- ✓ DESeqによる、二群間解析を実施し、結果をMAプロット・PCAプロット、ヒートマップ等に描画
- ✓ miRDeep\*を用いた新規miRNAの予測
- ✓ アダプタートリムはできません、事前にFASTQ Tool Kit等で実施が必要

## Limitation

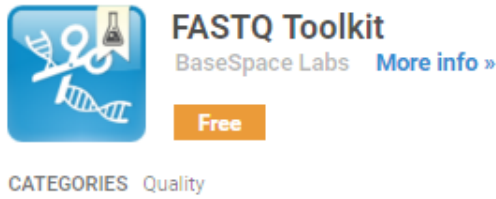
- ・ 1解析に100サンプルまで
- ・ 1解析に200 G basesまで、1サンプルあたり25 G basesまで
- ・ 参照配列は、ヒト(hg19)、マウス(mm10)、ラット(rn5)
- ・ Single ReadのFASTQであること
- ・ Read Lengthが18~51 ntであること
- ・ 二群間解析なので、Replicateでの実施が必要になります。

## Software Ver.

Isis (Analysis Software): 2.5.52.11、SAMtools: 0.1.19-isis-1.0.2、Bowtie (Aligner): 0.12.8、miRDeep\*: 3.2、DESeq2: 1.0.17

# Small RNA Appについて

## 解析の実行の前にアダプタートリムの実行



FASTQ Toolkitでアダプタートリムの実施  
リード長をそろえる、クオリティトリムなどもできます。

### Adapter Trimming

Use these parameters if you want to trim adapter sequences. The adapter sequence can be specified separately for the 5'- and 3'-end and is a required input for adapter trimming. In addition to the adapter sequence, you can specify a stringency value that determines how similar a sequence has to be in order to be identified as an adapter sequence.

▼ Click to expand/hide adapter trimming settings

Adapter trim stringency (0.01-0.99):

Select an adapter to trim or specify the adapter sequence(s) below:

TruSeq Small RNA (TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG)

Adapter sequence(s) to trim from the 5'-end:

Adapter sequence(s) to trim from the 3'-end:

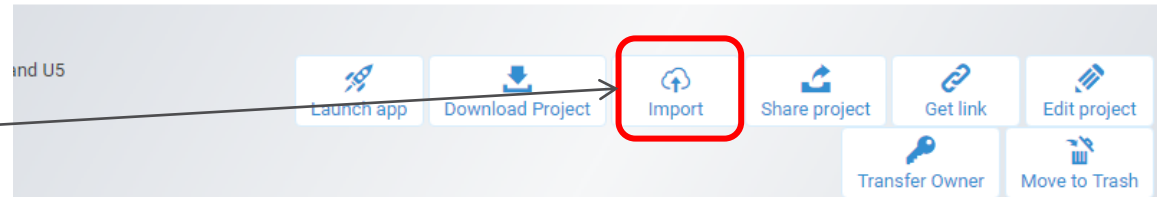
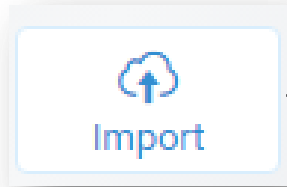
Trim Ns from the 3'-end before identifying adapters:

TruSeq Small RNA をアダプターに選択して実行

MiSeq Reporter、Bcl2fastqでもアダプタートリムの実行が可能です



# BaseSpaceにFASTQがアップロードされていない場合は、

お手持ちのFASTQをBaseSpaceにアップロードする方法



ProjectのImportアイコンを押すと、お手持ちのアップロードできます。

Analyses **5**

<input type="checkbox"/>	NAME	LAST MODIFIED ▼	STATUS	APPLICATION	SIZE
<input type="checkbox"/>	 Small RNA 03/15/2016 9:40:11	Mar 15, 2016	<b>Complete</b>	Small RNA	47 GB
<input type="checkbox"/>	 FASTQ Toolkit 03/15/2016 7:20:57	Mar 15, 2016	<b>Complete</b>	FASTQ Toolkit	12 GB

SRAのデータをアップロードする場合



SRA Import  
BaseSpace Labs

SRA Import AppでSequence Read Archiveのデータをインポートできます。Accession番号(SRR1234567など)が必要。



# BaseSpace Small RNA Appの実行



Small RNA v1.0.0

Illustrina, Inc.

Analysis Name: Small RNA 03/06/2016 7:04:36

Save Results To:

Select Project(s):

160306\_MiniSeq\_Small\_RNA

## Options

Enable Novel Precursor  
Discovery:



miRDeep\*を用いた新規miRNAの発見を行うか？

Enable Pairwise Differential  
Expression Analysis:



二群間比較を行うか？

## References

Species: Homo sapiens/hg19



MiRBase Version: miRBase 21



対象生物 (Human、  
Mouse、Rat) とデータ  
ベース\*を選択します  
\*miRBase21のみ

# BaseSpace Small RNA Appの実行

## Samples

Samples can be partitioned into multiple groups for differential expression analysis and novel precursor discovery. At least two groups are required for pairwise differential expression analysis. Novel precursor discovery is performed for each group.

GROUP	LABEL	SAMPLES
# 1	control	Select Sample(s): <input type="text"/>
# 2	control	Select Sample(s): <input type="text"/>

グループ名を手入力

サンプルを選択

# BaseSpace Small RNA Appの実行

Select Sample(s): 12

Search...

Filtersは検体を探す出するのに便利

SAMPLES

**HBRR1-trimmed-10** ⓘ  
 102.96 MB  
 1/12/16 6:03 AM  
 (Unknown genome)  
 Read length: 36  
 Reads PF: 4,952,896  
 MiniSeq: TruSeq Small RNA (MAQC HBRR and UHRR)  
 Illumina Inc

**UHRR3-trimmed-10** ⓘ  
 54.88 MB  
 1/12/16 6:02 AM  
 (Unknown genome)  
 Read length: 36  
 Reads PF: 2,909,011  
 MiniSeq: TruSeq Small RNA (MAQC HBRR and UHRR)  
 Illumina Inc

**Filters**

Project  
 MiniSeq: TruSeq Small RNA (MAQC↓)

Genome  
 -- Any Genome --

Min Read 1 length    Max Read 1 length  
   

Min Read 2 length    Max Read 2 length  
   

Min # reads    Max # reads  
   

解析を行うサンプルを選択する

Cancel    Confirm

# BaseSpace Small RNA Appの実行

## Samples

Samples can be partitioned into multiple groups for differential expression analysis and novel precursor discovery. At least two groups are required for pairwise differential expression analysis. Novel precursor discovery is performed for each group.

GROUP	LABEL	SAMPLES						
# 1	UHRR	<div style="background-color: #0070C0; color: white; padding: 2px;">Select Sample(s):</div> <table border="1"> <tr> <td>UHRR3</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>UHRR2</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>UHRR1</td> <td>×</td> </tr> </table>	UHRR3	×	UHRR2	×	UHRR1	×
UHRR3	×							
UHRR2	×							
UHRR1	×							
# 2	HBRR	<div style="background-color: #0070C0; color: white; padding: 2px;">Select Sample(s):</div> <table border="1"> <tr> <td>HBRR3</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>HBRR1</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>HBRR2</td> <td>×</td> </tr> </table>	HBRR3	×	HBRR1	×	HBRR2	×
HBRR3	×							
HBRR1	×							
HBRR2	×							

グループとそれに属するサンプルの登録が終わりました。  
\*Replicateでの登録が必要ですので、検体数は二つ以上選択



# BaseSpace Small RNA Appの実行

**Differential Expression Analysis**

Select Pairs of Groups for Differential Expression Analysis:    チェックを入れる

PAIR	CONTROL GROUP	COMPARISON GROUP
# 1	UHRR	HBRR 



二群間解析を行うグループ名を手入力

# BaseSpace

## Small RNA Appの実行



### Small RNA v1.0.0

illumina, Inc.

Analysis Name:

Small RNA 03/06/2016 7:04:36

Save Results To:

Select Project(s):

160306\_MiniSeq\_Small\_RNA

This app is free.

Continue

### Options

Enable Novel Precursor  
Discovery:



Enable Pairwise Differential  
Expression Analysis:



Continueを押して、  
解析スタート！

# BaseSpace

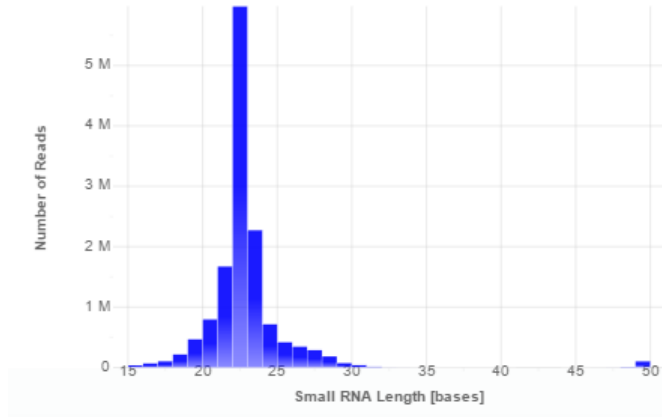
## Small RNA Appの実行

### Analysis Info

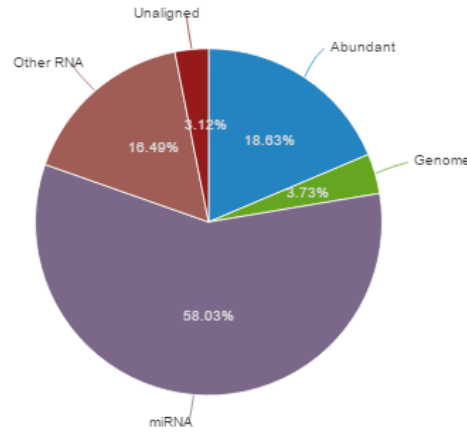
NAME	Small RNA 03/06/2016 7:04:36
APPLICATION	Small RNA   Version: 1.0.0
DATE STARTED	Sunday, March 6th 2016, 10:22:11 am
DATE COMPLETED	Sunday, March 6th 2016, 11:07:59 am
DURATION	45 minutes 48 seconds
SESSION TYPE	Single Node
SIZE	1.69 GB
STATUS	<b>Complete</b> Application completed successfully

MiniSeqで取得したデータ、検体あたり300~500万リードを、二群間解析(3検体と3検体との比較)を行った場合、45分48秒で終了

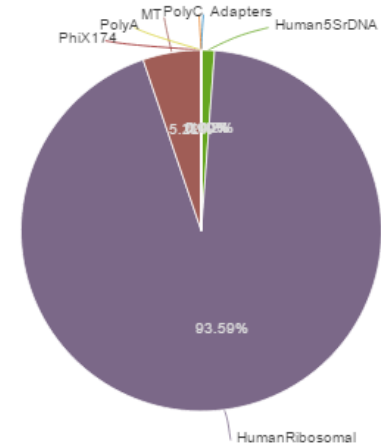
# Small RNA v.1.0 Appの実行結果 Quality Control Statistics (each Sample)



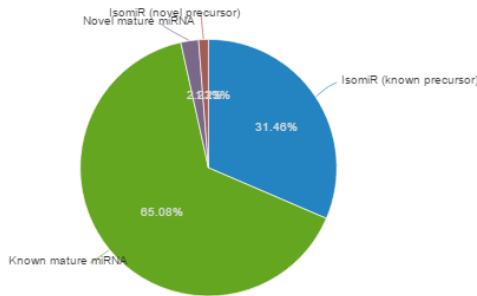
Small RNA Length Distribution



Read Distribution

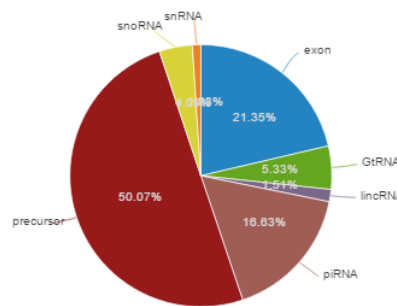


Abundant Distribution



Sub-Category	Number of Reads	Percentage
IsomiR (known precursor)	2,528,173	31.46%
IsomiR (novel precursor)	98,745	1.23%
Known mature miRNA	5,230,531	65.08%
Novel mature miRNA	179,519	2.23%
<b>Total</b>	<b>8,036,968</b>	

miRNA Distribution



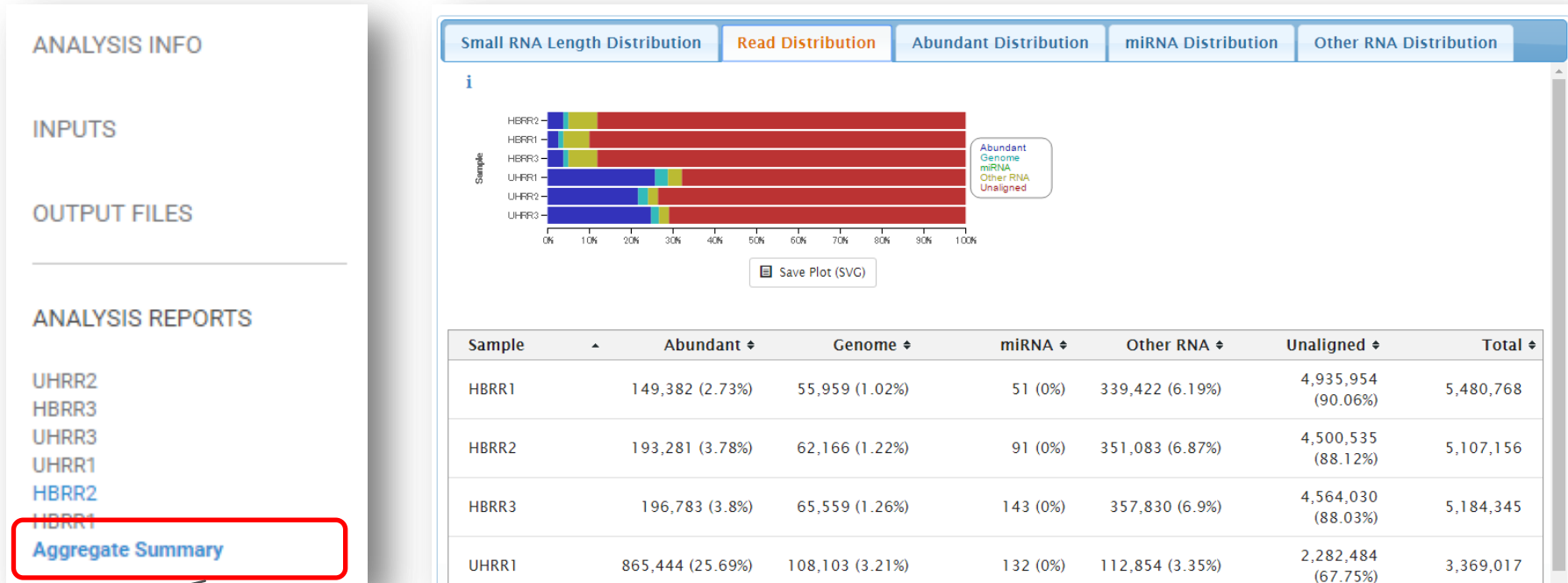
Other RNA Distribution

Sub-Category	Number of Reads	Percentage
exon	487,645	21.35%
GtRNA	121,784	5.33%
lincRNA	34,418	1.51%
piRNA	380,037	16.63%
precursor	1,143,772	50.07%
snoRNA	93,368	4.09%
snRNA	23,545	1.03%
<b>Total</b>	<b>2,284,569</b>	



# Small RNA v.1.0 Appの実行結果

## Quality Control Statistics (Aggregate Summary)



左メニューのAggregate Summaryを選ぶと全ての検体を並べた結果が表示されます

# Small RNA v.1.0 Appの実行結果 Summary and Top Sequences

Summary and Top Sequences *i*

[Mature miRNA](#)
[IsomiR \(Known Precursor\)](#)
[Novel Mature miRNA](#)
[IsomiR \(Novel Precursor\)](#)
[Precursor Group](#)
  
[Novel Precursor Group](#)
[miRNA Family](#)
[piRNA](#)

Number of Mature miRNAs With Reads	854
Total Number of Reads	5,230,531
Hits File	<a href="#">View</a> <a href="#">Download</a>

見たいサブセクションを選択します

Mature miRNAs Hits

Show 10 entries Search:

Name	Number of Reads
hsa-let-7a-5p	16004
hsa-let-7b-5p	2076
hsa-let-7c-5p	1112
hsa-let-7d-3p	165
hsa-let-7d-5p	763
hsa-let-7e-3p	2
hsa-let-7e-5p	1207
hsa-let-7f-5p	2361
hsa-let-7g-5p	2186
hsa-let-7i-3p	1

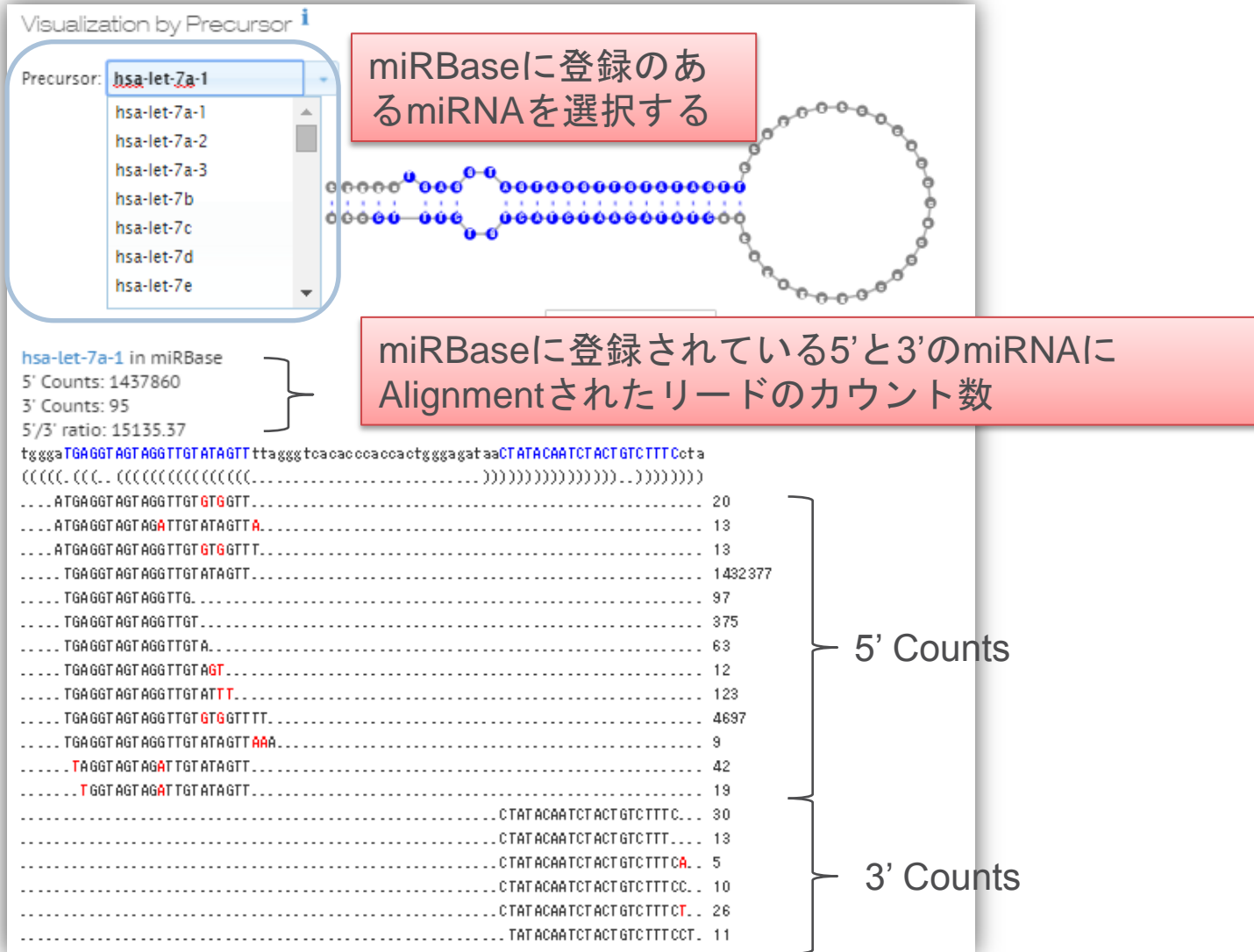
Showing 1 to 10 of 467 entries

[Previous](#)
[1](#)
[2](#)
[3](#)
[4](#)
[5](#)
[...](#)
[47](#)
[Next](#)

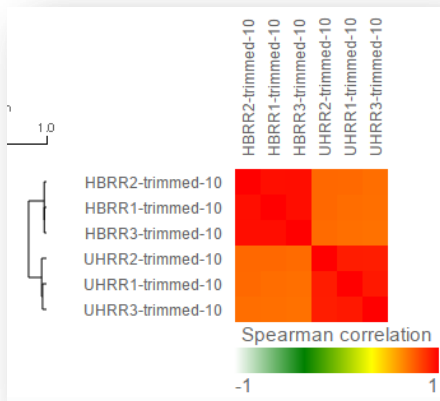
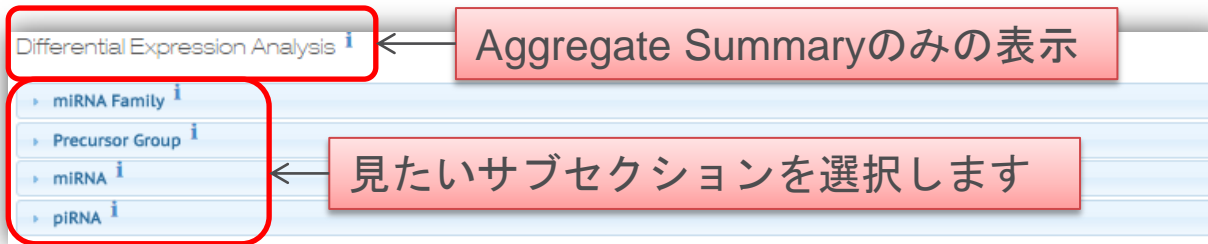
[Export Filtered Table \(CSV\)](#)

Viewを押すと、その検体での、各miRNAにアライメントされたリード数を確認することが可能です。

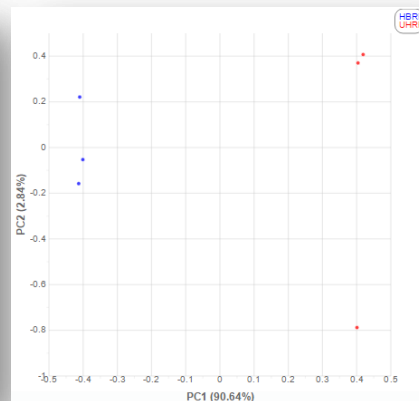
# Small RNA v.1.0 Appの実行結果 Visualization by Precursor



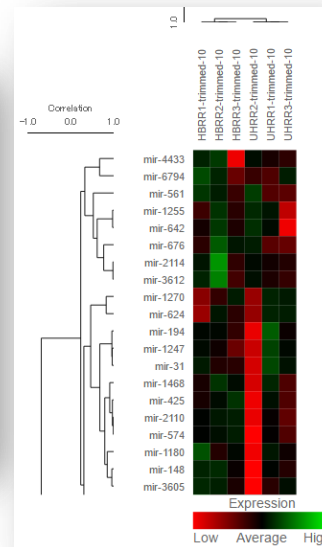
# Small RNA v.1.0 Appの実行結果 Differential Expression Analysis



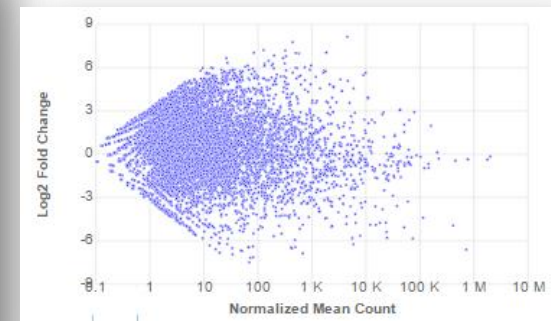
Sample Correlation



PCA Plot



Expression Heatmap



Pairwise Analysis

# 発現解析結果の詳細なファイルについて

ANALYSIS INFO

INPUTS

**OUTPUT FILES**






---

ANALYSIS REPORTS

- UHRR3-trimmed-10
- UHRR1-trimmed-10
- HBRR3-trimmed-10
- UHRR2-trimmed-10
- HBRR2-trimmed-10
- HBRR1-trimmed-10
- [Aggregate Summary](#)



左メニューのOutput Filesを選択

### Output Files

NAME	
..	
 family	
 mirna	
 pirna	
 precursor	
 UHRR_vs_HBRR.result	
 global.result	

各サブセクションでの二群間発現解析の結果がまとめられています



 UHRR_vs_HBRR	
 global	

検体ごとのデータ(global)と二群間比較のデータのそれぞれにデータが分けられています

# 発現解析結果の詳細なファイルについて

[deseq.counts.csv](#)

[deseq.disp.pdf](#)

[deseq.heatmap.pdf](#)

[deseq.ma.pdf](#)

[deseq.res.csv](#)

[deseq.scatter.pdf](#)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1		HBRR2-tri	HBRR1-tri	HBRR3-tri	UHRR1-tri	UHRR2-tri	UHRR3-trimmed-10	
2	SampleGro	HBRR	HBRR	HBRR	UHRR	UHRR	UHRR	
3	hsa-let-7a	105751	123312	107241	15877	11652	16004	
4	hsa-let-7a	26	33	33	0	0	0	
5	hsa-let-7a	2	0	2	2	1	0	
6	hsa-let-7b	12994	14846	13404	2008	1405	2076	
7	hsa-let-7b	0	0	0	0	0	0	
8	hsa-let-7c	20061	23282	20152	1108	786	1112	
9	hsa-let-7c	7	10	7	2	0	0	
10	hsa-let-7d	4971	5936	5166	712	553	763	
11	hsa-let-7d	730	806	793	203	146	165	
12	hsa-let-7e	6564	7385	6724	1173	860	1207	
13	hsa-let-7e	51	52	43	1	2	2	
14	hsa-let-7f	60897	72303	62625	2468	1815	2361	
15	hsa-let-7f	0	0	0	0	0	0	
16	hsa-let-7f	1	2	0	0	0	0	
17	hsa-miR-1	352	341	327	27	22	20	
18	hsa-miR-1	0	0	0	0	0	0	
19	hsa-miR-1	23571	23621	25482	3839	2610	3633	
20	hsa-miR-1	0	0	0	0	0	0	
21	hsa-miR-1	281	315	314	474	317	429	
22	hsa-miR-1	12	7	8	6	1	1	
23	hsa-miR-1	11	17	13	13	13	13	
24	hsa-miR-1	9	0	3	27	22	49	

deseq.counts.csv

各サンプルの遺伝子ごとのカウント数(補正計算済み)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		baseMean	log2FoldCh	lfcSE	pvalue	padj	status	control	comparison
2	hsa-let-7a-5p	41073.55	-0.64849	0.024585	2.50E-153	3.73E-152	OK	50152.4	31994.71
3	hsa-let-7a-3p	6.86918	-4.68124	1.315717	0.000374	NaN	Low	13.22297	0.51539
4	hsa-let-7a-2-3p	1.437637	1.549983	1.164755	0.183275	NaN	Low	0.731969	2.143305
5	hsa-let-7b-5p	5086.859	-0.61283	0.038699	1.76E-56	1.05E-55	OK	6151.297	4022.421
6	hsa-let-7b-3p	0	NaN	NaN	NaN	NaN	Low	NaN	NaN
7	hsa-let-7c-5p	5836.625	-2.10055	0.037792	0	0	OK	9466.05	2207.199
8	hsa-let-7c-3p	2.447118	-1.13891	0.978853	0.244621	NaN	Low	3.365812	1.528424
9	hsa-let-7d-5p	1944.683	-0.68417	0.053557	2.28E-37	9.80E-37	OK	2397.342	1492.023
10	hsa-let-7d-3p	364.0272	0.120881	0.102137	0.236604	0.25032	OK	348.7855	379.2689
11	hsa-let-7e-5p	2732.891	-0.37458	0.037719	3.06E-23	9.98E-23	OK	3085.692	2380.09
12	hsa-let-7e-3p	12.8154	-2.45159	0.627571	9.37E-05	0.000115	OK	21.66942	3.961373
13	hsa-let-7f-5p	17043.58	-2.57776	0.041215	0	0	OK	29196.71	4890.457
14	hsa-let-7f-1-3p	0	NaN	NaN	NaN	NaN	Low	NaN	NaN
15	hsa-let-7f-2-3p	0.215526	-1.24358	1.523707	0.414411	NaN	Low	0.303062	0.12799
16	hsa-miR-15a-5p	102.119	-1.57962	0.198732	1.89E-15	4.56E-15	OK	153.0366	51.20145
17	hsa-miR-15a-3p	0	NaN	NaN	NaN	NaN	Low	NaN	NaN
18	hsa-miR-16-5p	9139.279	-0.55918	0.084602	3.86E-11	7.40E-11	OK	10888.58	7389.972
19	hsa-miR-16-1-3p	0	NaN	NaN	NaN	NaN	Low	NaN	NaN
20	hsa-miR-17-5p	515.1593	2.717876	0.085073	5.87E-224	1.35E-222	OK	135.9433	894.3753
21	hsa-miR-17-3p	4.832831	0.488482	0.707573	0.489966	NaN	Low	4.022386	5.643277
22	hsa-miR-18a-5p	17.693	2.20487	0.363726	1.35E-09	2.36E-09	OK	6.307292	29.0787
23	hsa-miR-18a-3p	36.41653	5.046488	0.634423	NaN	NaN	Outlier	2.139133	70.69393
24	hsa-miR-19a-5p	0	NaN	NaN	NaN	NaN	Low	NaN	NaN
25	hsa-miR-19a-3p	23.53805	-2.55849	0.492136	2.01E-07	3.04E-07	OK	40.2445	6.831608

deseq.res.csv

二群間の比較結果 (Fold Change、補正済みP値)

\*bamファイルは出力されますが、各データベース(miRBaseなど)にAlignmentされているため(ゲノムにAlignmentされていないため)、Genomic Viewer等での確認はできません。

# Small RNA解析のワークフロー



## ①RNAの準備

- ・ 1  $\mu\text{g}$ のTotal RNAが必要
- ・ miRNA用の抽出キットを使用するとよい



## ②ライブラリー調製

- ・ 事前試薬の購入、熱変性ステップ、切り出しステップなどで注意が必要



## ③シーケンス

- ・ 1検体あたり100~500万リード、リード長は50 bases
- ・ クラスター形成に用いるDNA濃度は普段よりも下げる



## ④情報解析

- ・ BaseSpace Small Appを用いれば、発現解析と新規miRNAの発見が可能

# 参考/データベース

## ▶ イリミナホームページ

- [Sequencing](#)

## ▶ TS Webinar

- 2016/4/22  
あなたのアプリケーションに適したライブラリー調製キットを探す
  - 2016/4/26  
Nextera Mate Pair Sample Preparation KitとBaseSpaceで完結する バクテリアゲノムアセンブリー-
  - 2016/5/13  
MiSeqでランをする前に – サンプルシート作成ソフトIllumina Experiment Manager (IEM) の使い方 –
  - 2016/5/27  
TruSeq Rapid Exome & TruSeq Exome Library Prep Kitを用いた Easy Prep Exome
- ## ▶ 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