

図 4: 信頼性の高い品質予測には RNA 断片のサイズ分布を参照

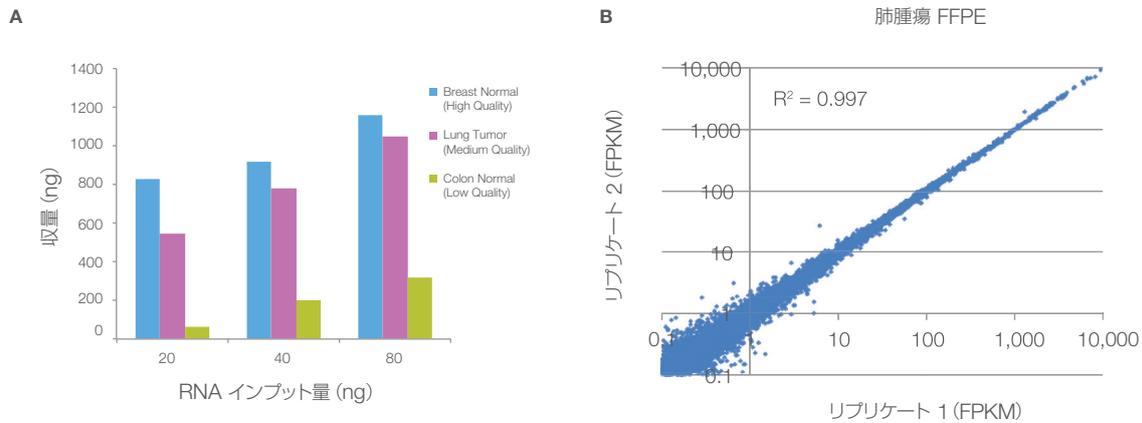


図 4a: FFPE サンプルから Total RNA を分離して、TruSeq RNA Access ライブラリー調製キットにより調製しました。ターゲットキャプチャー前のライブラリー収量を Fragment analyzer により測定しました。

図 4b: 正規化された遺伝子発現量は、BaseSpace TopHat アライメントアプリ⁴で算出しました。

表 2: DV₂₀₀ に基づいた RNA の推奨インプット量

品質 ^{*†‡}	DV ₂₀₀	推奨インプット量
高	> 70%	20 ng
中	50~70%	20~40 ng
低	30~50%	40~100 ng
過度の分解	< 30%	推奨されない

* ライブラリー調製を確実に完了させるために、逆クロスリンクステップや DNase1 処理などの RNA 分離法が推奨されます (弊社では Qiagen 社製 RNeasy FFPE Kit または AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を使用)。

† FFPE 由来 RNA 濃度を Nanodrop で測定しました。

‡ 品質分類の上限/下限に近いサンプルでベストパフォーマンスを得るには、推奨インプット量の上限付近を採用します。

これらの結果から、Fragment Analyzer または Bioanalyzer トレースで測定した RNA 断片の DV₂₀₀ が示す安定した予測値に基づいて、TruSeq RNA Access ライブラリー調製キットを用いた RNA シーケンスを行うことにより、良好なシーケンス結果が得られます。

詳細情報

TruSeq RNA Access キットの詳細については、<http://www.illumina.com/products/truseq-rna-access-kit> をご覧ください。

FFPE 由来の RNA に関するソリューションについては、<http://www.illumina.com/applications/sequencing/rna/low-quality-ffpe-rna-seq> をご覧ください。

図 5: Fragment Analyzer で DV₂₀₀ を算出

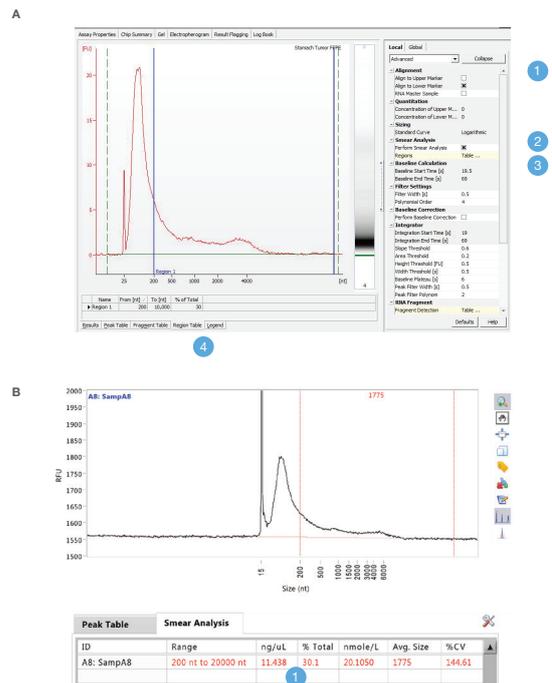


図 5a: 200nt 以上の RNA 断片の割合 (DV₂₀₀) は、以下に従い Smear Analysis を実行して Bioanalyzer トレースから算出が可能です:

- 1) 'Local' タブから、'Normal' を 'Advanced' に変更する。
- 2) 'Smear Analysis' のチェックボックスにチェックを入れる。
- 3) 'Table' をクリックして領域を追加し、ポップアップウィンドウに 200~10,000bp を入力する。
- 4) トレースウィンドウで 'Region Table' タブを選び、結果を表示する。

図 5b: Fragment Analyzer システムは DV₂₀₀ 解析のために効率化されたソリューションです。Prosize™ ソフトウェアが 200nt 以上のスメア解析パラメーターを自動的に構成し、DV₂₀₀ 値を Total% としてデータ表内に表示します。

