

イルミナウェビナー バクテリアRNA-Seqをはじめよう -ライブラリー調製から情報解析まで-

サービス・サポート部 | Aug/2018



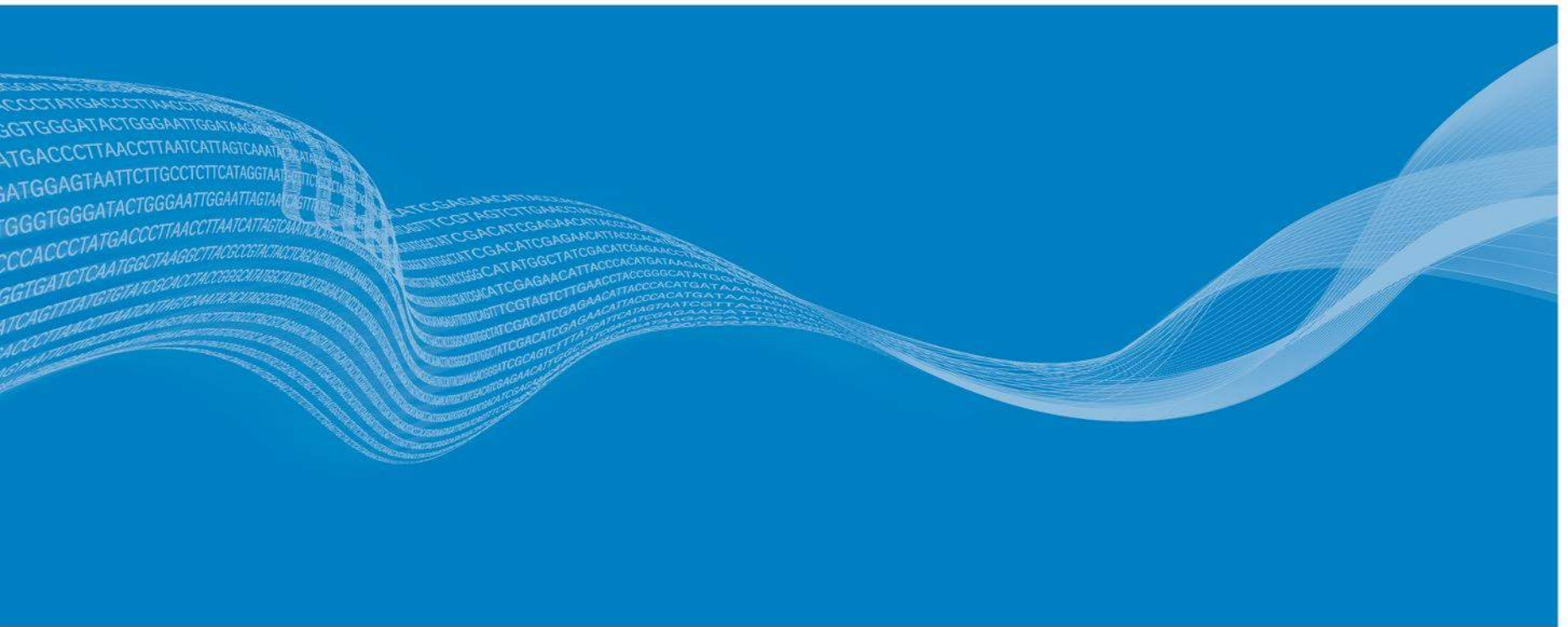
留意点

- ウェビナーの録画・スライドは一週間ほどしましたら、弊社HPにアップロードされます。
 - <https://jp.illumina.com/events/webinar.html>
- ご紹介する製品の価格は2018年4月試薬消耗品価格表を参照しています。

今回の話の流れ

1. バクテリア向けのRNA-Seqライブラリーをどのように調製するのか？
2. シーケンスはどの程度まで読めばよいのか？
3. 情報解析はどうするのか？
4. そして、コストはどの程度になるのか？

バクテリアRNA-Seqのライブラリー 調製



バクテリアRNA-Seqライブラリーの調製ワークフロー

真核生物

Oligo dT BeadsによるmRNA単離

逆転写・cDNA
合成

アダプター連
結とPCR



mRNAを濃縮する工程が異なる

バクテリア

Ribo-Zeroによる
rRNAの除去

逆転写・cDNA
合成

アダプター連
結とPCR

真核生物と異なり、バクテリアのmRNAはPoly-A Tailを持たないため、Oligo dT BeadsによるmRNAの単離ができない。そのため、バクテリアでは、Ribo-Zeroという製品でrRNAを除去した後、残ったRNAをライブラリーにする。

バクテリアRNA-Seqライブラリーの調製には 二つの実験方法がある

実験
ワークフロー

Ribo-Zeroによる
rRNAの除去

逆転写・cDNA
合成

アダプター連結
とPCR

① ScripSeq
Complete
Kit

オールインワンのキット

② TruSeq
Stranded
mRNA Library
Prep Kit*

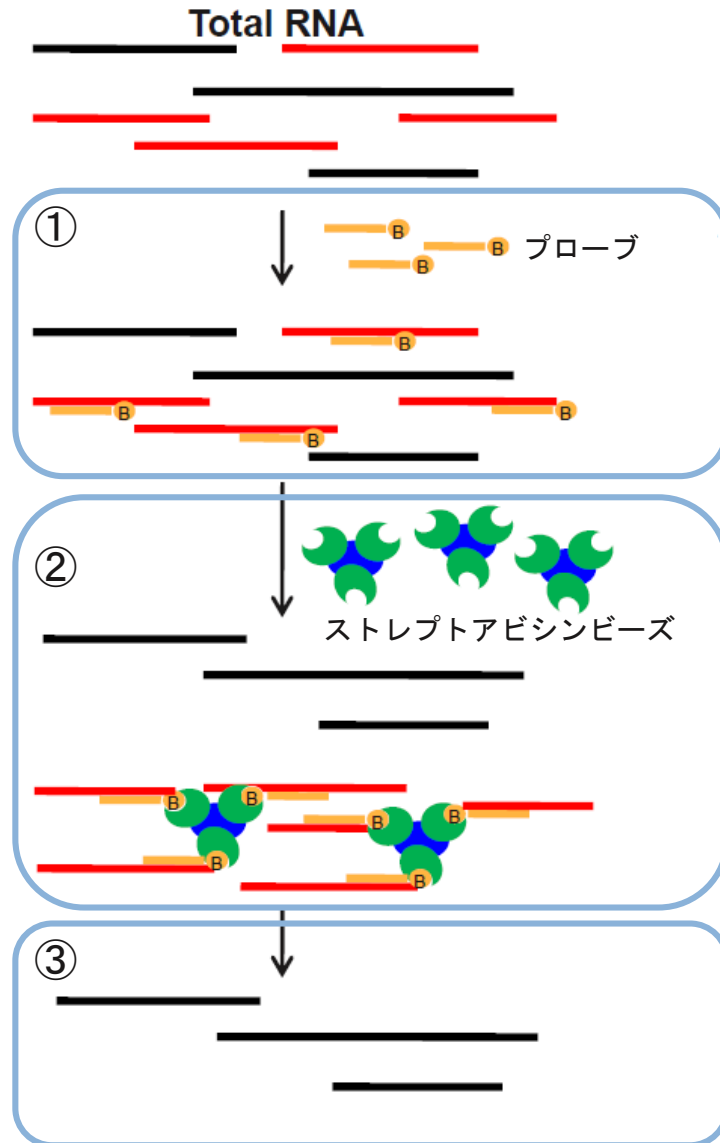
Ribo-Zero(別購入)に
よるrRNAの除去

TruSeqキットの構成成品で、逆転写か
らアダプター連結・PCRを実施



*研究室に真核生物用にTruSeq Stranded mRNA Library Prep Kitをお持ちの場合には、Ribo-Zero購入で原核生物も解析できます！

Ribo-ZeroによるrRNAの除去



① rRNAを認識するビオチンプローブを用いたハイブリダイゼーション

② ストレプトアビジンビーズを用いて、ハイブリダイゼーションしたrRNAを除去する

③ rRNAを除去したRNAの回収

バクテリア向けRibo-Zeroキット

| カタログ番号 | 製品名 | 価格 | コメント |
|-----------|---|----------|----------------------|
| MRZMB126 | Ribo-Zero Bacteria Kit (6 Reactions) | 102,000円 | グラム陰性菌および陽性菌rRNA を除去 |
| MRZB12424 | Ribo-Zero Bacteria Kit (24 Reactions) | 361,000円 | |
| MRZGN126 | Ribo-Zero GramNegative Bacteria Kit (6 Reactions) | 102,000円 | グラム陰性菌rRNA を除去 |
| MRZGP126 | Ribo-Zero GramPositive Bacteria Kit (6 Reactions) | 102,000円 | グラム陽性菌rRNA を除去 |

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)のご紹介

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)は、ライブラリー調製に必要な試薬に加えて、グラム陰性菌および陽性菌のrRNA を除去できるRibo-Zero (Bacteria)が含まれるオールインワンキットです。

| カタログ番号 | 製品名 | 価格 | コメント |
|--------|--|----------|---|
| BB1206 | ScriptSeq Complete Kit (Bacteria) (6 Reactions) | 149,000円 | グラム陰性菌および陽性菌のrRNA を除去できるRibo-Zero (Bacteria)が含まれる |
| BB1224 | ScriptSeq Complete Kit (Bacteria) (24 Reactions) | 546,000円 | |

*ライブラリー調製には、これらに加えて**FailSafe™ PCR Enzyme Mix (Epicentre)**が必要です。また、Multiplexed Sequencing（多検体シーケンス）を実施する場合**ScriptSeq Index PCR Primers**のご購入が必要になります。



製品の詳細は次スライドに

| カタログ番号 | 製品名 | 価格 | 販売元 |
|----------|---|---------|-------------------|
| FSE51100 | FailSafe™ PCR Enzyme Mix (100 Units, 80反応分) | 27,000円 | エア・ブラウン ライフサイエンス社 |

| カタログ番号 | 製品名 | 価格 | コメント |
|-----------|---|----------|---------------------|
| RSBC10948 | ScriptSeq Index PCR Primers (Set 1) (48 Reactions) | 41,500円 | 12種類のインデックスプライマーセット |
| SSIP1202 | ScriptSeq Index PCR Primers (Set 2) (48 Reactions) | 41,500円 | |
| SSIP1203 | ScriptSeq Index PCR Primers (Set 3) (48 Reactions) | 41,500円 | |
| SSIP1204 | ScriptSeq Index PCR Primers (Set 4) (48 Reactions) | 41,500円 | |
| SSIP1234 | ScriptSeq Index PCR Primers (Sets 1-4) (48 Reactions/set) | 151,000円 | 48種類のインデックスプライマーセット |

研究対象のバクテリアがRibo-Zeroに適応しているか調べたい

- **Ribo-Zero rRNA Removal Kit Species Compatibility**

- <https://www.illumina.com/products/by-type/molecular-biology-reagents/ribo-zero-rrna-removal-bacteria.html>

さまざまな生物種でのRibo-ZeroのCompatibilityについての情報を確認いただけます

Ribo-Zero (Bacteria) Kit Species Compatibility

| Species | In silico | Reported or in published literature | Comments |
|---|-----------|-------------------------------------|--|
| <i>Acanthamoeba</i> | ✓ | | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | ✓ | | |
| <i>Actinoplanes spp.</i> | | ✓ | |
| <i>Amoebophilus asiaticus</i> | | ✓ | |
| <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117 | ✓ | | Removes 16S and 23S rRNA. Will not remove 5S rRNA. Use highest quality RNA possible. |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> | ✓ | | |

研究対象のバクテリアがRibo-Zeroに適応しているか調べたい

- Find Your RNA Companion with **RNA MatchMaker**

- <http://www.illumina.com/products/selection-tools/rna-matchmaker-tool.html>

対象バクテリアのrRNA配列から、最適なRibo-Zeroのキットを配列検索から調べる。

Enter Ribosomal RNA Query Sequence

Organism Name* What is the name of your organism?

Researcher Name* What is your name?

Researcher Email What is your email?

Institute Name* Where do you work?

Select a FASTA file* ?
Please select a plain-text fasta file. Accepted formats: fasta, fa, txt.

ファイルを選択 選択されていません

Or enter FASTA sequence(s) ?

研究対象のバクテリアのrRNA配列を入力



✓ Strong Match >85%

How to interpret my results?

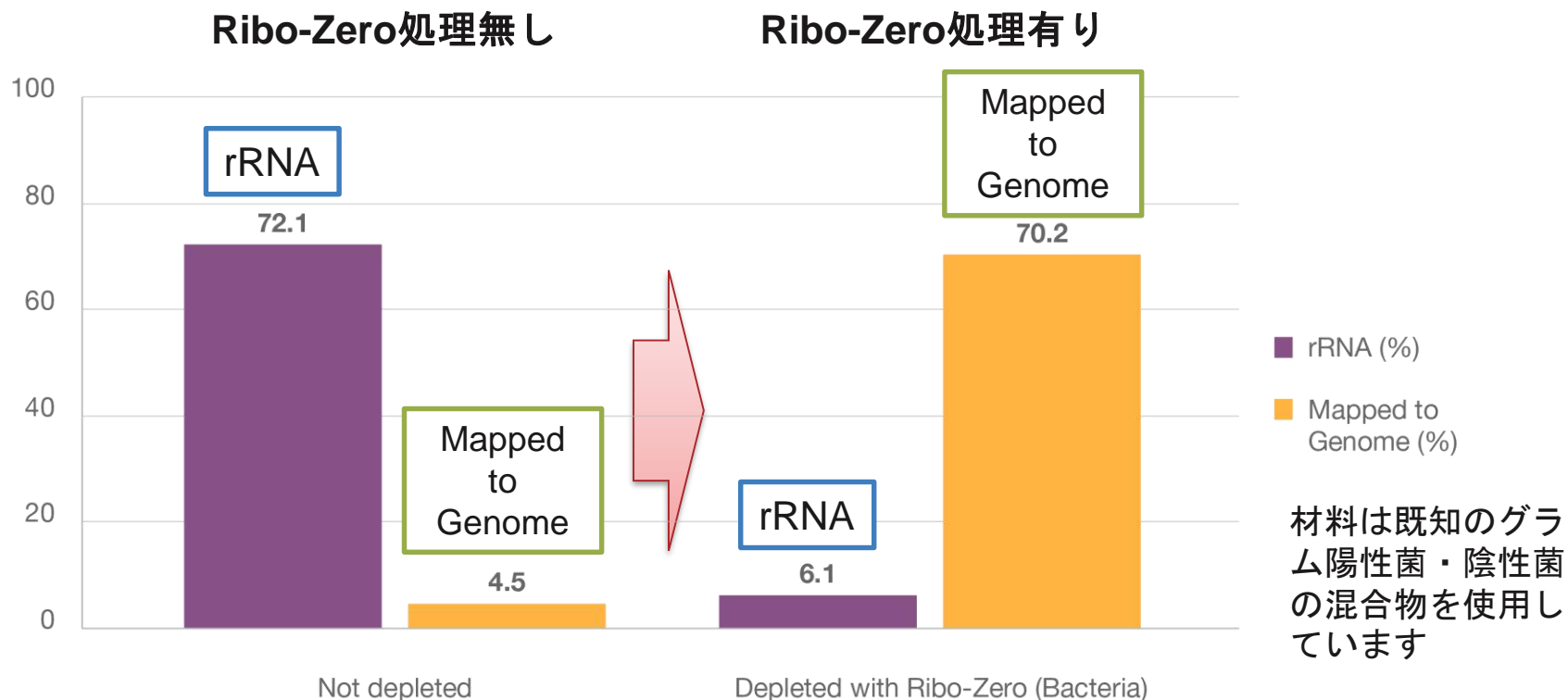
A strong match has been identified between your sequences and a current ScriptSeq Complete kit.

Please visit **ScriptSeq Complete (Bacteria)** to see your strongest match.

Match results are based on theoretical blastn

検索結果は、ScriptSeqの製品名で表示されてしまいますので、そのScriptSeq製品に含まれるRibo-Zeroを調べる。

Ribo-ZeroによるrRNA除去有り・無しにおけるリードアライメントの割合比較



Ribo-Zero処理により、rRNAにアライメントされるリードが大きく減少

Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria), Supporting Data and Figure

<https://www.illumina.com/products/by-type/molecular-biology-reagents/ribo-zero-rna-removal-bacteria.html?langsel=/us/>

まずは、ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)の実験ワークフローから話します。

実験
ワークフロー

Ribo-Zeroによる
rRNAの除去

逆転写・cDNA
合成

アダプター付
加・連結とPCR

① ScriptSeq
Complete
Kit

オールインワンのキット

② TruSeq
Stranded
mRNA Library
Prep Kit*

Ribo-Zero(別購入)に
よるrRNAの除去

TruSeqキットの構成成品で、逆転写か
らアダプター連結・PCRを実施

ライブラリー調製手順は、以下のマニュアルの手順を紹介します。
ScriptSeq™ Complete Kit (Bacteria) Lit. # 345 • 4/2013 EPILIT345 Rev. A

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)のワークフロー

① Ribo-Zeroを用いたrRNAを除去

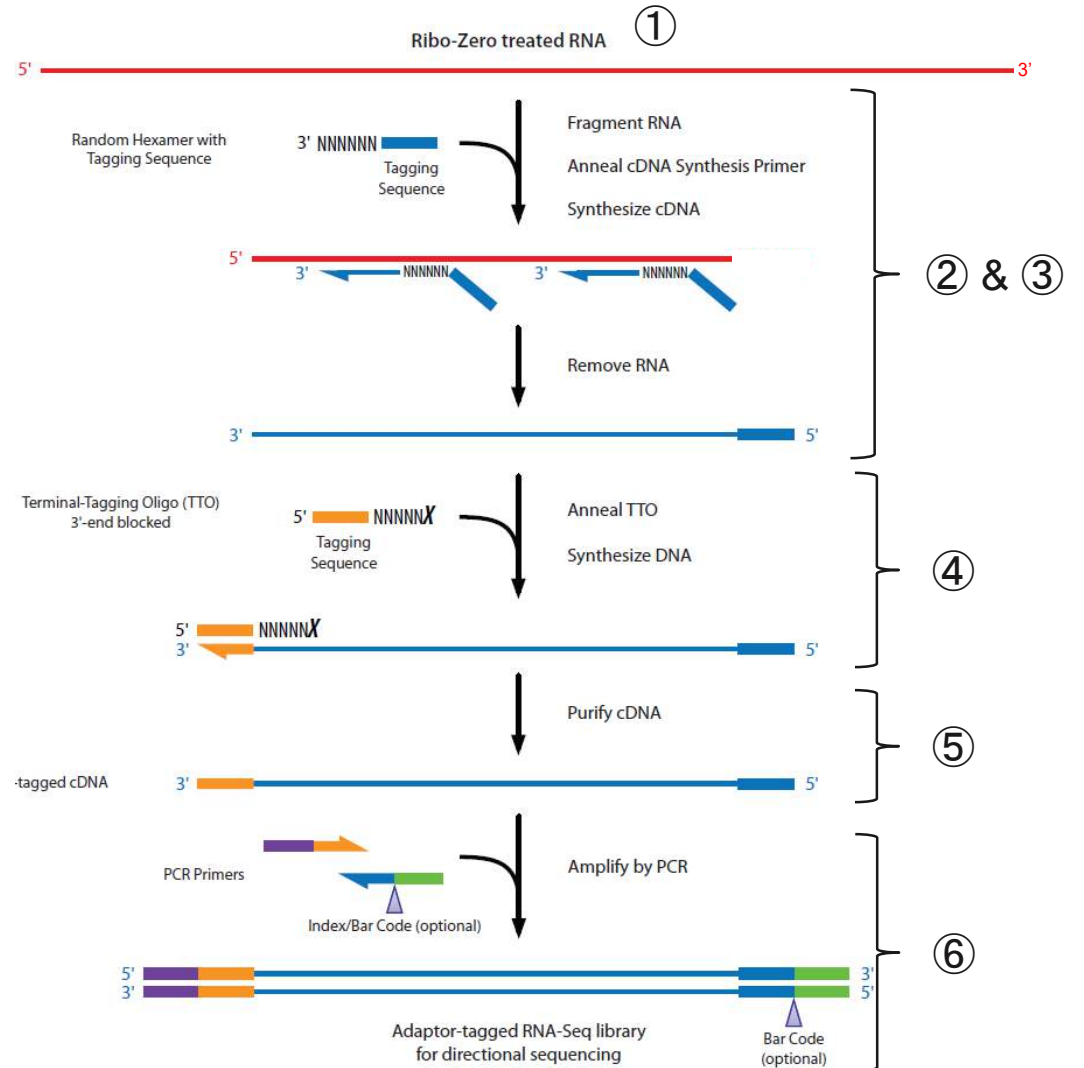
② RNAの断片化

③ 定常配列を付加したランダムプライマーを用いて逆転写反応 (1本鎖cDNA合成)

④ 追加で定常配列を付加したランダムプライマーを用いたタギング反応を行う。

⑤ 両末端にタグ配列をcDNAの合成

⑥ インデックス付きプライマーを用いたPCR増幅によりライブラリー作成



ScriptSeq Complete Kit

RNAの準備

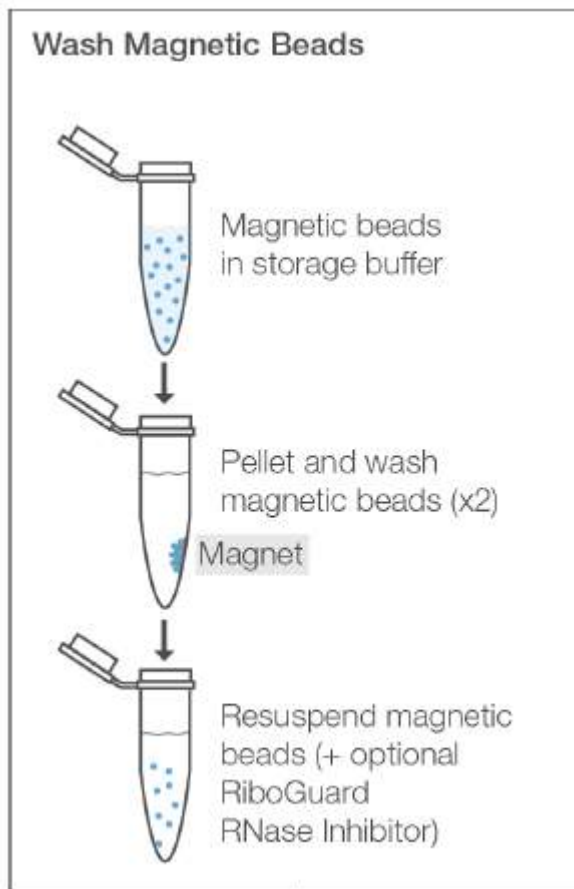
- Total RNA 1 ~ 5 μg (40 ng/ μl 以上を25 μl)がライブラリー調製には必要です。
- 市販のキットを使い抽出・精製を行うとよい。夾雑物はライブラリー調製不良の要因となります。
- ゲノムDNAは逆転写酵素の基質となり、ライブラリー化されてしまうので、DNase処理により除いたほうが良い。
- 定量手法の指定はないが、ナノドロップといった吸光定量は夾雑物の影響を受けるため、Qubitといった蛍光定量法を用いたほうが良い。
- RNAの分解が気になる場合には、Agilent 2100 BioanalyzerやTape Stationで評価を行うとよい。RIN値の推奨スコアはない。

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)の解析に必要なもの

- 別にご購入が必要な消耗品
 - FailSafe™ PCR Enzyme Mix (Epicentre)
 - Ribo-Zero・ライブラリー調製の際の核酸精製試薬
 - MinElute PCR Purification columns (Qiagen)、Agencourt AMPure XP System (Beckman Coulter)やAgencourt RNAClean XP Kit (Beckman Coulter) など
- 必要な装備品
 - ピペッター、Thermal Cyclerとマグネットスタンド

Ribo-ZeroによるrRNAの除去

①マグネットビーズの準備



1. 1検体あたり225 μ lのMagnetic Beadsを使用します。

| | 1 rxn | N rxns |
|----------------|-------------|-----------------|
| Magnetic Beads | 225 μ l | 225 X N μ l |

2. マグネットスタンドに置き、透明になった上清を取り除きます。
3. マグネットビーズを、1検体あたり225 μ lのRNase-free水 (キット付属)で2回の洗浄を行います。

| | 1 rxn | N rxns |
|------------------|-------------|-----------------|
| RNase Free Water | 225 μ l | 225 X N μ l |

4. 1検体あたり65 μ lのMagnetic Bead Resuspension Solutionで、ビーズを再懸濁します。
*オプションでRiboGuard RNase Inhibitor (キット付属) を、1 μ l加えます。

| | 1 rxn | N rxns |
|---------------------------|------------|----------------|
| RNase Free Water | 65 μ l | 65 X N μ l |
| RiboGuard RNase Inhibitor | 1 μ l | 1 X N μ l |

5. 最後に、65 μ lずつ1.5 mlチューブに小分けを行います、この小分けは重要なポイントになります。

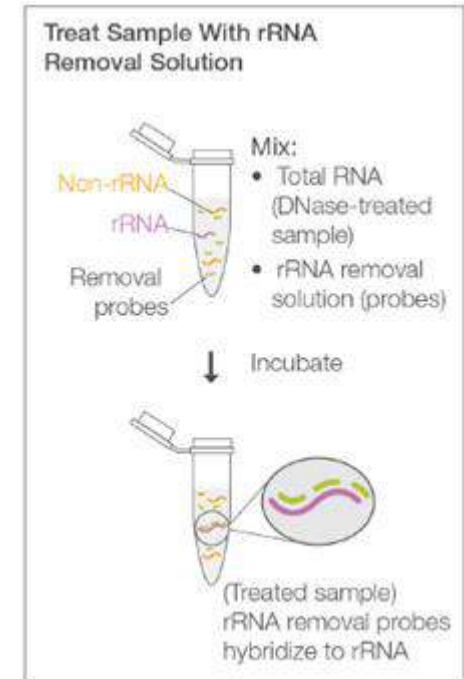
Ribo-ZeroによるrRNAの除去

② rRNAとプローブのHybridization

1. RNAとRibo-Zero rRNA Removal Solution (rRNAを認識するプローブ)を混ぜる***加えるRibo-Zero rRNA Removal Solution の量はスタート量により変わります**

| スタートRNA量 | RNA溶液量 | Ribo-Zero rRNA Removal Solution |
|-----------|------------|---------------------------------|
| 1~ 2.5 ug | 28 μ l | 8 μ l |
| 2.5~ 5 ug | 26 μ l | 10 μ l |
| | | Total 36 μ l |

2. Ribo-Zero Reaction Buffer 4 μ lを加え、ピペットでよく混ぜる(total 40 μ l)。
3. Thermal Cyclerで68°C 10分間のインキュベーションを行います。
4. その後に、室温で5分間のインキュベーションを行います。



Ribo-ZeroによるrRNAの除去

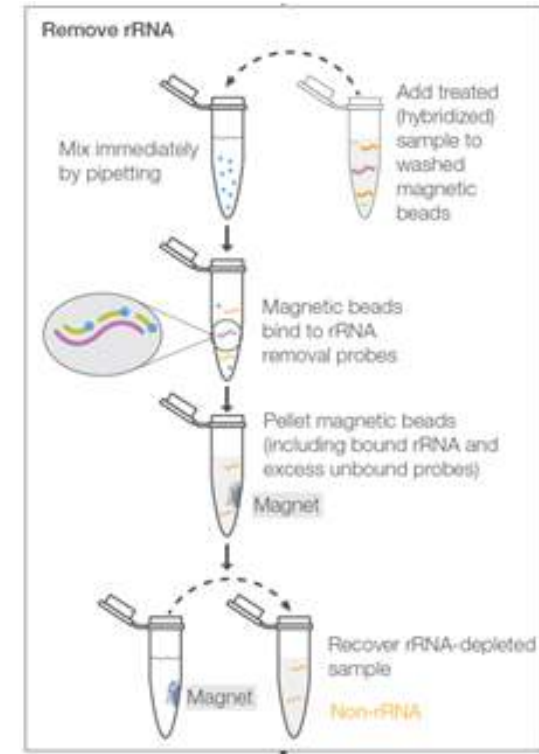
③ マグネットビーズとの反応

1. ピペットを用いて、前のスライドの反応物であるハイブリダイゼーションしたRNA（室温）を、2スライド前に準備したマグネットビーズ65 μ lのチューブに加えます。
2. そして、チップを変えず、そのまま少なくとも10回のピペッティンで混ぜた後、さらに10秒のボルテクスを実施し、1.5 mlチューブを室温に5分間置きます。

注意点、1と2の工程は非常に重要です。

- ・ 必ずマグネットビーズの入ったチューブに、ハイブリダイゼーション産物を移す、ハイブリダイゼーション産物にマグネットビーズは加えない。
- ・ ピペッティングとボルテクスの混合作業は必ず、Reference Guideに従う。

3. 室温に置いたのち、10秒間のボルテクスを実施し、Water Bathもしくはヒートブロックを用いて、50°Cで5分間のインキュベートを実施します。
4. インキュベートののち、すぐにチューブをマグネットスタンドに、上清が透明になるまで少なくとも1分間は置きます。
5. 慎重に上清（ここにrRNA-depleted RNAが含まれる）を新しい1.5 mlチューブに回収します。（すぐに次の工程に進む、もしくは-70°Cで保存可能）



Ribo-ZeroによるrRNAの除去

④ rRNA-depleted RNAの精製

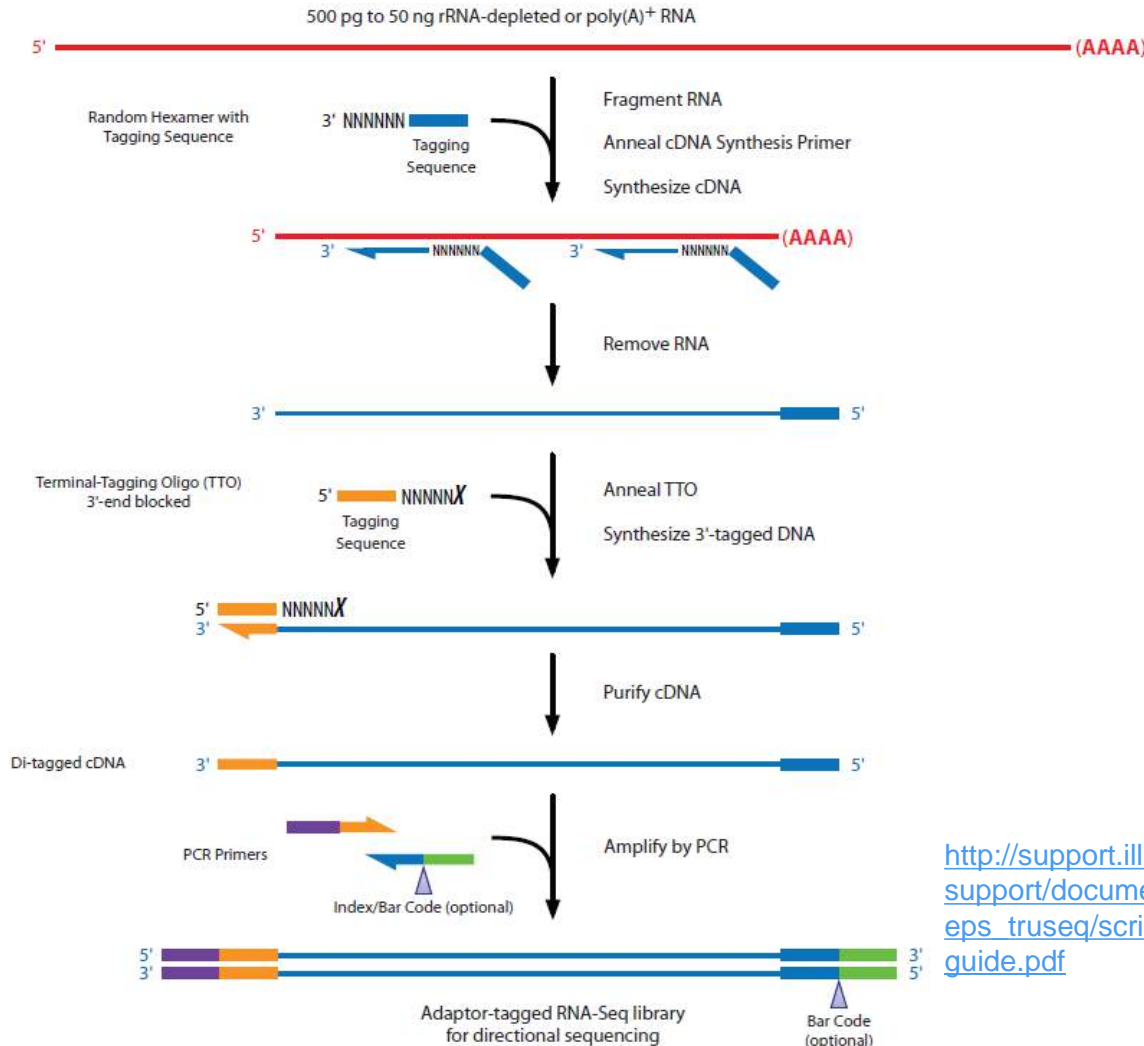
- 回収したRNAを以下の3オプションで精製を行います。
 1. Ethanol Precipitation (Glycogenと3 M Sodium Acetateはキットに付属しています)
 2. Agencourt RNAClean XP Kit (Cat# A63987, Beckman Coulter、キットに付属していません)を用いた精製
 3. RNeasy MinElute Cleanup Kit (Cat# 74204, QIAGEN、キットに付属していません)を用いた精製

精製工程の手順の紹介は、ここでは割愛します。以下のReference Guideの**3.D. Purification of the rRNA-Depleted Sample**の工程に従い実施ください。

ScriptSeq Complete (Bacteria) Library Prep Guide

http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/scriptseq-complete-bacteria/documentation.html

ScriptSeqキットのライブラリー調製ワークフロー



- 2回の連続した、ランダムプライマーを用いたタギング反応によりライブラリーを調製
- PCR増幅の際に最大48種類のインデックスアダプター使用可能（別売り）
- 簡単なピペット操作で3~4時間程度の作業

http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/scriptseq-v2-rna-seq/scriptseq-v2-rna-seq-library-prep-guide.pdf

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を用いたライブラリー調製 RNAの断片化とcDNA合成

1. 準備したrRNA-Depleted RNAを用い、以下の手順で混合物を調製します。

| | |
|---------------------------|------------|
| Nuclease-Free Water | x μ l |
| rRNA-Depleted RNA | y μ l |
| Fragment Solution | 1 μ l |
| cDNA Primer | 1 μ l |
| <hr/> | |
| Total volume per reaction | 12 μ l |

2. 85°Cで5分間インキュベートした後、氷上に移す。（この熱処理でRNAが断片化されます）
3. 以下のように調製した4 μ l cDNA Synthesis Mixを、チューブに加えます (Total 16 μ l)。

| | |
|----------------------------------|-------------|
| cDNA Synthesis Premix | 3 μ l |
| 100 mM DTT | 0.5 μ l |
| StarScript Reverse Transcriptase | 0.5 μ l |
| <hr/> | |
| cDNA Synthesis mix | 4 μ l |

4. 25°C 5分間ののち、42°Cで20分間反応で反応させ、37°CでPauseする。(逆転写反応)
5. 37°Cの状態、1 μ l Finishing Solution*を加え、さらに37°Cで10分間反応する。
* Finishing Solutionは酵素となりますので、扱いに注意してください。
6. 95°Cで3分間ののち、25°CでPauseさせる。

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を用いたライブラリー調製 3' tagged cDNAの合成

1. 25°CでPauseしている反応物に、以下の8 µl Terminal Tagging Master Mixを加える。

| | |
|-----------------------------|--------|
| Terminal Tagging Premix | 7.5 µl |
| DNA Polymerase | 0.5 µl |
| <hr/> | |
| Terminal Tagging Master Mix | 8 µl |

2. 25°Cで15分間のインキュベートを行う(タギング反応2回目)。
3. 95°Cで3分間のインキュベートののち、4°Cもしくは氷上に移す(酵素の失活)。
4. 反応物の精製を行います。反応物の精製は、(1) MinElute column purification (QIAGEN)と(2)AMPureXP (Beckman Coulter)の2オプションから選択します。経験的に低分子除去に優れたAMPureXPがお勧め。

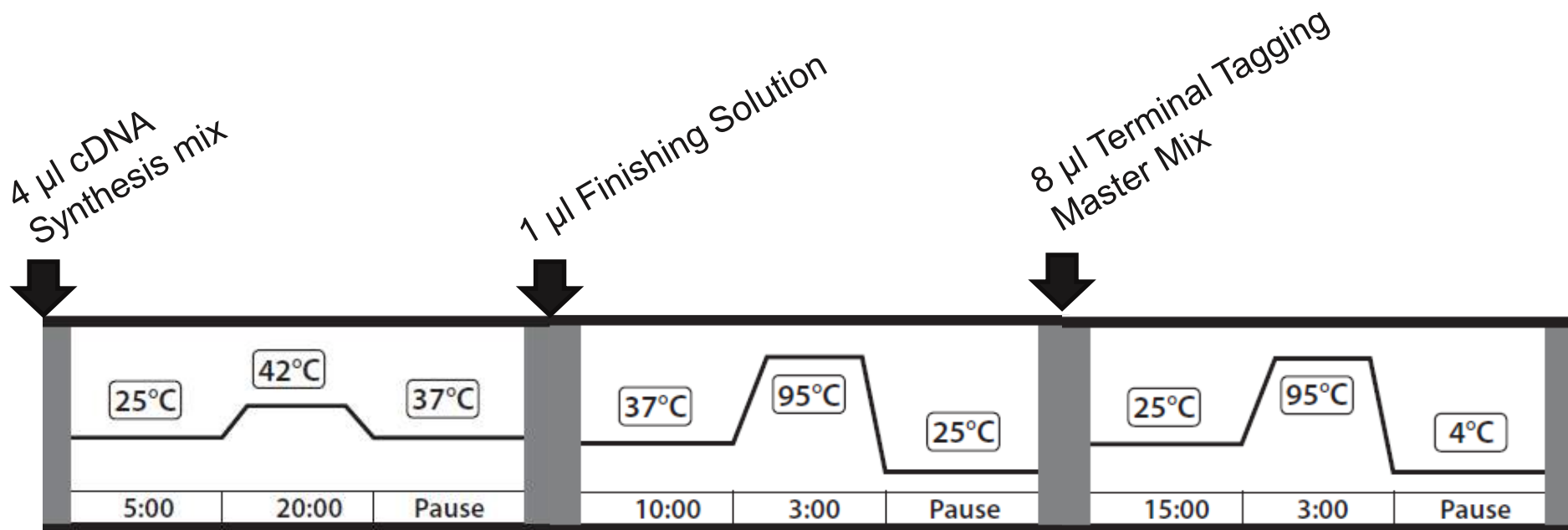
精製工程の手順の紹介は、ここでは割愛します。以下のReference Guideの” **5.D. Purify the cDNA**”の工程に従い実施ください。

ScriptSeq Complete (Bacteria) Library Prep Guide

http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/scriptseq-complete-bacteria/documentation.html

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を用いたライブラリー調製 Tips!

ここまでの逆転写反応とタギング反応は、**Thermal Cycler上で、One Tube**で行い、**順次反応試薬を加えていく**ことにより、完結します。
事前にThermal Cyclerに、以下のようにプログラムを入力しておくと、実験を楽に進めることが可能です。



すべてThermal Cycler上で、試薬を添加していく形で、反応を進めることが可能です。

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を用いたライブラリー調製 PCR Amplification

1. PCR反応液の調製

精製したタギングされたcDNA(di-tagged cDNA)を鋳型にPCRをおこなうための反応液を調製します。

多検体シーケンス
(Index有りライブラリー)

通常はこっち！

1検体のみのシーケンス
(Index無しライブラリー)

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| di-tagged cDNA | 22.5 μ l |
| 25 μ l FailSafe PCR PreMix E | 25 μ l |
| Forward PCR Primer | 1 μ l |
| ScriptSeq Index PCR Primer | 1 μ l |
| FailSafe PCR Enzyme (1.25 U) | 0.5 μ l |
| Total volume | 50 μ l |

| | |
|----------------------------------|--------------|
| di-tagged | 22.5 μ l |
| 25 μ l FailSafe PCR PreMix E | 25 μ l |
| Forward PCR Primer | 1 μ l |
| Reverse PCR Primer | 1 μ l |
| FailSafe PCR Enzyme (1.25 U) | 0.5 μ l |
| Total volume | 50 μ l |

この工程では、試薬の準備で注意点があります！

- ① PCR酵素はキットに含まれておりません。FailSafe™ PCR Enzyme Mix (Epicentre; cat. nos. FSE51100)をお求めください。FailSafe PCR PreMix Eはキット付属。
- ② Index 付ライブラリーを調製する場合には、別売のScriptSeq Index Primersが必要になります。

ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を用いたライブラリー調製 PCR Amplification

2. 以下の反応条件でPCRを実施します (Volume: 50 μ l)。

Denature the ds DNA at 95° C for 1 minute

↓

95°C 30 seconds

55°C 30 seconds

68°C 3 minutes

} 15サイクル

} これよりも少ないサイクル数でもよい

↓

68°C 7 minutes.

4°C Hold

3. PCR産物の精製を行います。反応物の精製は、(1) MinElute column purification (QIAGEN)と(2)AMPureXP (Beckman Coulter)の2オプションから選択します。経験的に低分子除去に優れたAMPureXPがお勧め。

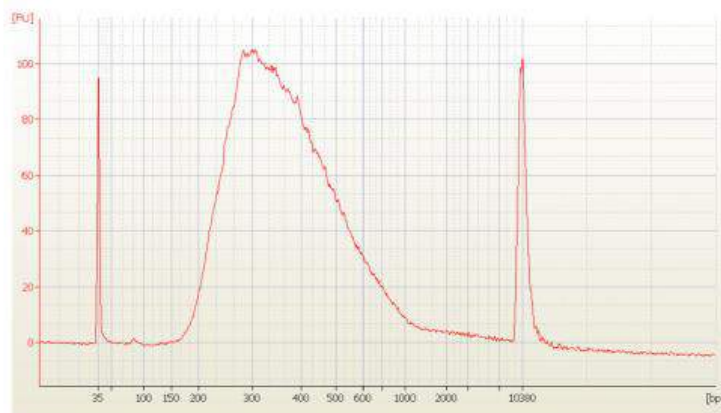
精製工程の手順の紹介は、ここでは割愛します。以下のReference Guideの” **5.F. Purify the RNA-Seq Library**”の工程に従い実施ください。

ScriptSeq Complete (Bacteria) Library Prep Guide

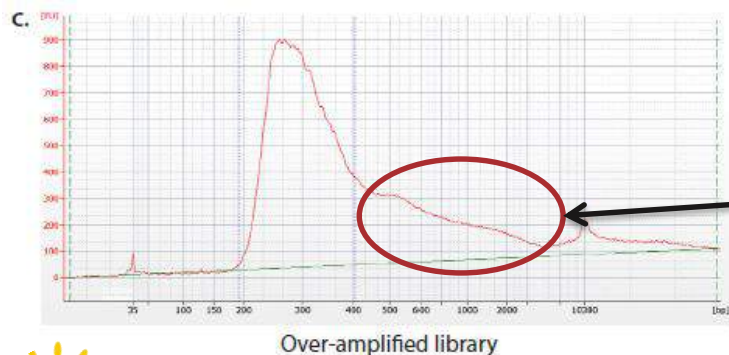
http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/scriptseq-complete-bacteria/documentation.html

ライブラリーの評価

Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity chipによる評価を行う



1 μ g Total RNAスタートの場合
の評価結果の例



過剰なPCRサイクル数により異常な高分子側のピークが観察れます。60%以上のDNA分子が200~1000 bpであればシーケンス可能です。



Reference Guideでは、Agilent 2100 Bioanalyzerを使用していますが、Tape StationやFragment Analyzerの同等品でも問題ございません。また、QubitやqPCRと言った定量を実施いただくと、正確なライブラリー濃度の評価が期待できます。

次は、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit を用いた実験ワークフローを話します。

実験
ワークフロー

Ribo-Zeroによる
rRNAの除去

逆転写・cDNA
合成

アダプター付
加・連結とPCR

① ScripSeq
Complete
Kit

オールインワンのキット (必要な試薬が含まれる)

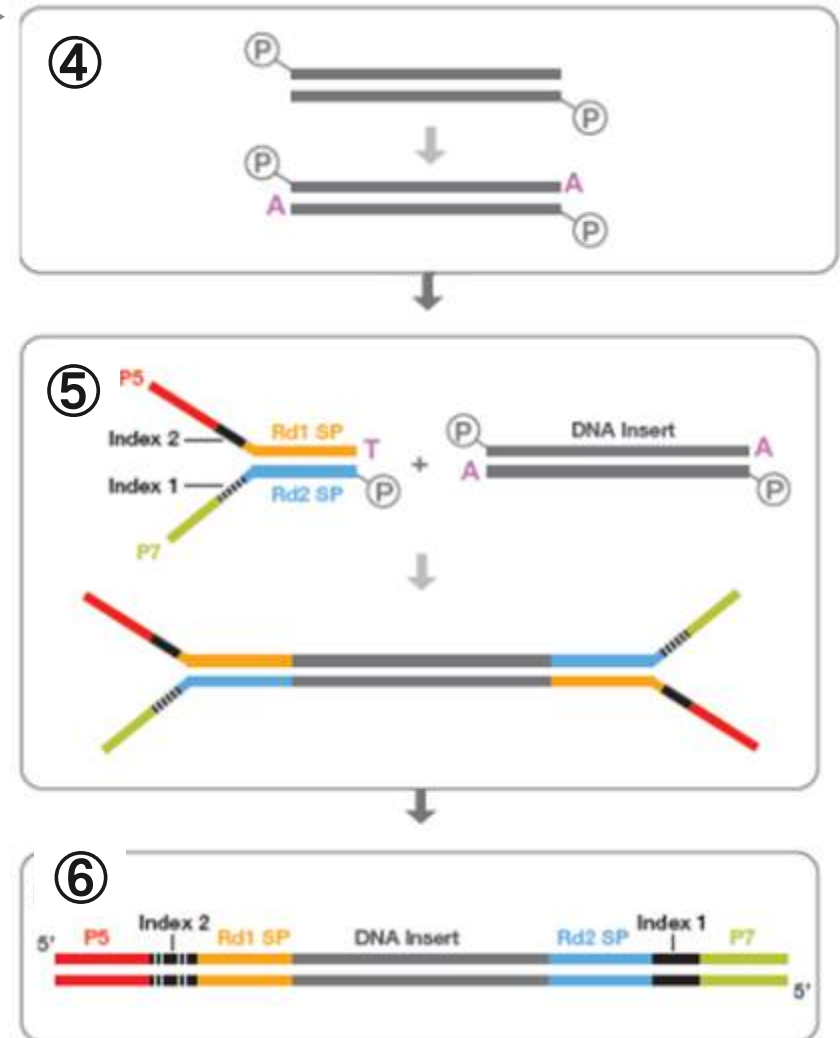
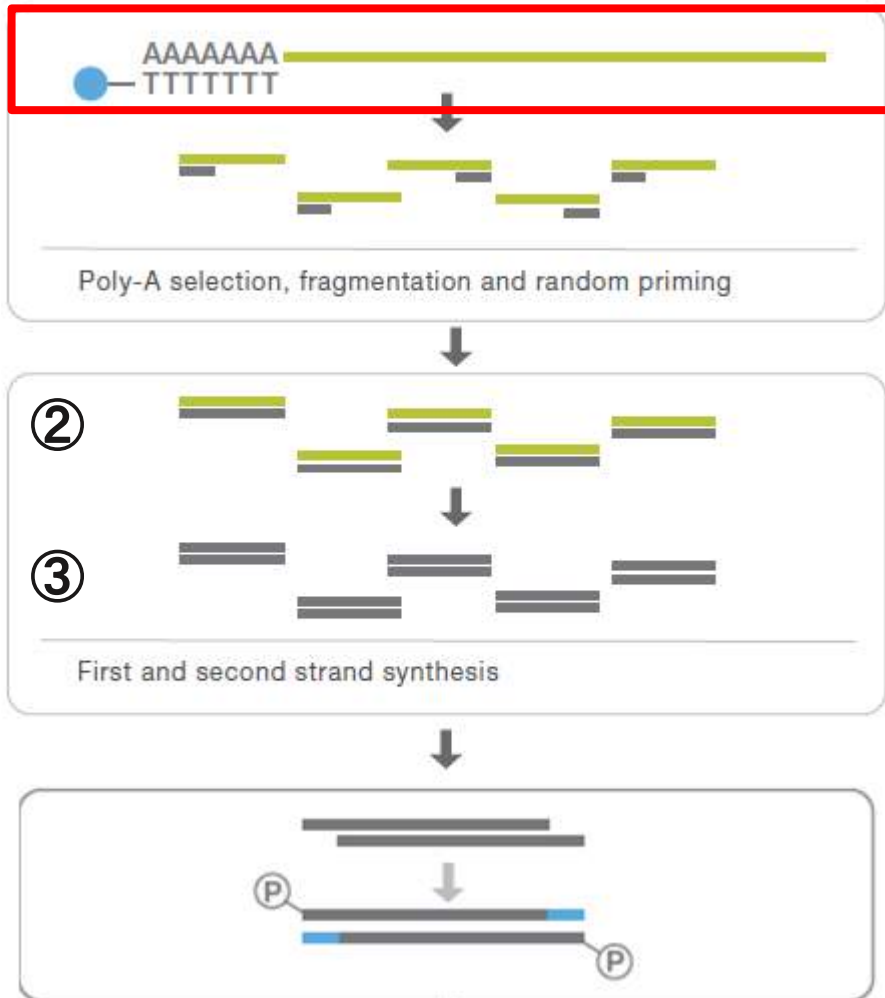
② TruSeq
Stranded
mRNA Library
Prep Kit*

Ribo-Zero(別購入)に
よるrRNAの除去

TruSeqキットの構成成品で、逆転写か
らアダプター連結・PCRを実施

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kitの実験ワークフロー

① PolyA精製の代わりに、Ribo-Zeroの実施

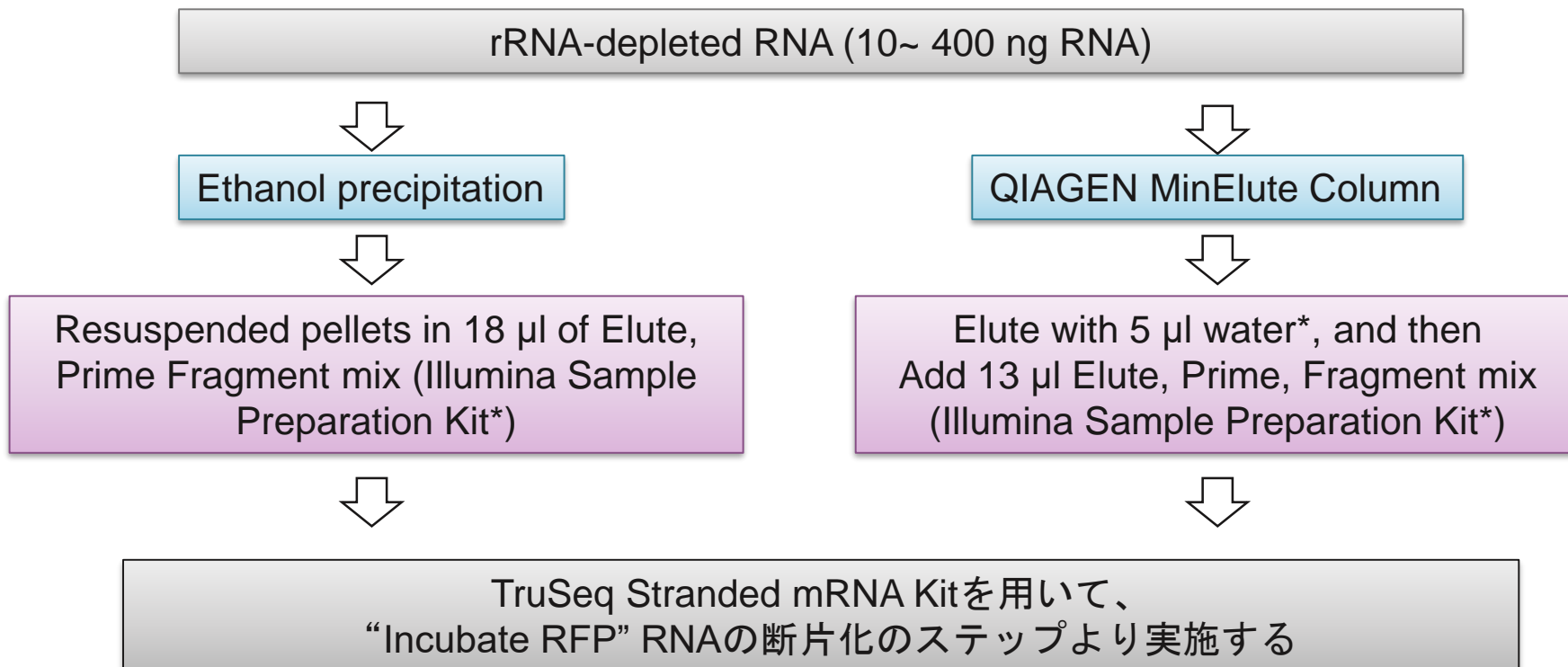


Ribo-Zero単体製品について

| カタログ番号 | 製品名 | 価格 | コメント |
|-----------|---|----------|----------------------|
| MRZMB126 | Ribo-Zero Bacteria Kit (6 Reactions) | 102,000円 | グラム陰性菌および陽性菌rRNA を除去 |
| MRZB12424 | Ribo-Zero Bacteria Kit (24 Reactions) | 361,000円 | |
| MRZGN126 | Ribo-Zero GramNegative Bacteria Kit (6 Reactions) | 102,000円 | グラム陰性菌rRNA を除去 |
| MRZGP126 | Ribo-Zero GramPositive Bacteria Kit (6 Reactions) | 102,000円 | グラム陽性菌rRNA を除去 |

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kitをお持ちのお客様は、こちらのRibo-Zeroをご購入いただければ、バクテリアRNA-Seq用のライブラリー調製が可能です。

バクテリアRNA-Seq、TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kitを用いた場合

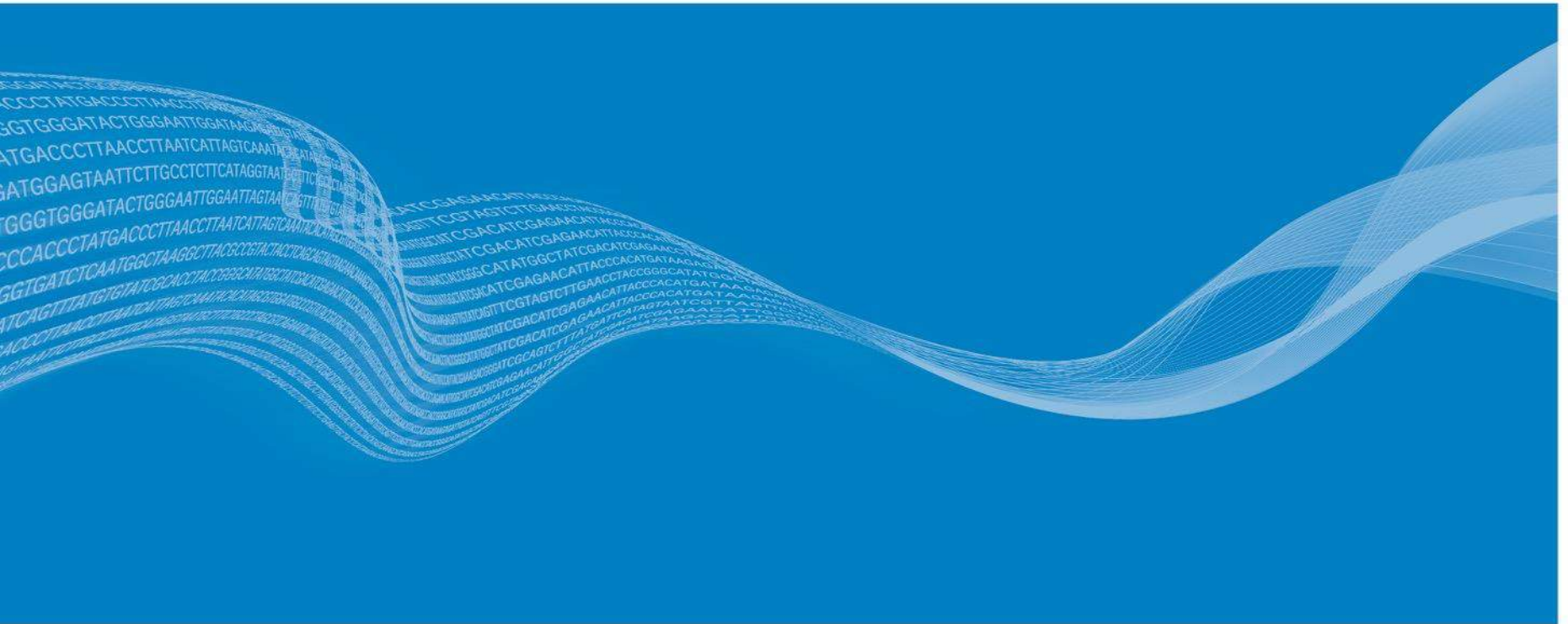


*Qiagen MinEluteカラムを使用する場合は、mRNAを5 µlのWaterで溶出させますが、溶出量が少ないことが原因でmRNAの50%が失われることがありますので、注意してください

バクテリアRNA-Seq、TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kitを用いた場合の手順について

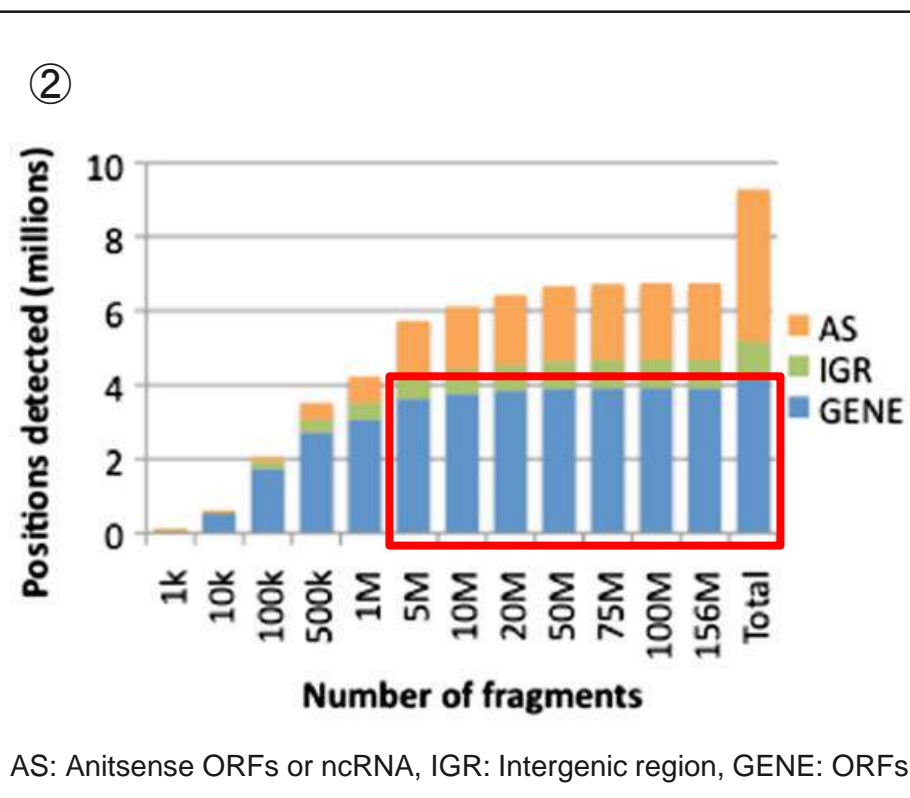
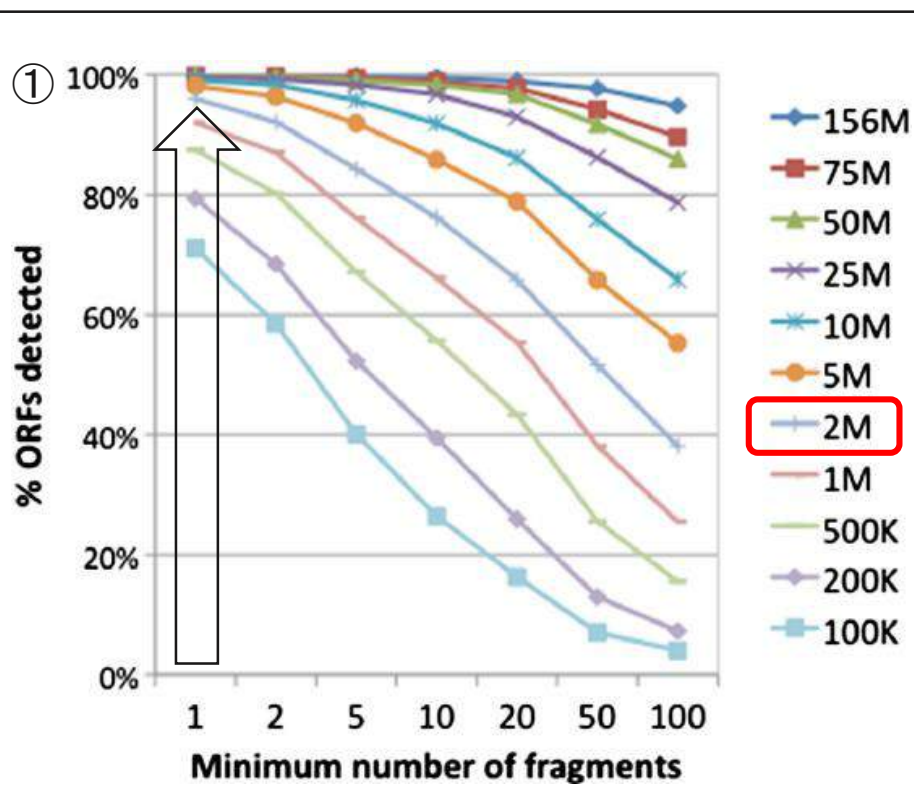
- Ribo-Zeroの作業工程は以下のSupport HPのReference Guideをご参考ください。
 - http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/ribo-zero-bacteria.html
- TruSeq Stranded mRNAの作業工程については、ウェビナー（録画・スライド）がございますので、こちらをご参照ください。
 - RNA-Seqをはじめよう ライブラリー調製編：絶対に失敗しないライブラリー調製【イルミナiSchool 初級】
 - <https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-180228-j.html>

バクテリアRNA-Seq シーケンスと情報解析



バクテリアRNA-Seqの必要リード数

- ① E. coli K-12株のRNA-Seqで1億5600万リードまで解析した結果、200万リードで90%以上のORFsを1リード以上でカバーできる。
- ② 500万リードで遺伝子領域を十分に網羅している。



シーケンス条件について

- **Single Read or Paired-End Read**

- どちらでも報告あり、Paired-End SequenceであればUnique Mappingできるといった利点がある。ただ、スプライシングバリエーションといった構造バリエーションはないので、Single Readで良いのでは。

- **リード長も50 bp~ 150 bpとさまざま**

- 配列の特性を考えると長く読む必要性は特にはない

- **その他**

- ScriptSeqとTruSeqともにカスタムシーケンスプライマーを用いずに、シーケンスを行うことが可能です。
- ScriptSeqとTruSeqでは、Read 1でmRNAのセンス鎖の配列、Read 2でアンチセンス鎖の配列が得られる。



イルミナシーケンサーのラインナップ



| システム | iSeq 100 | MiniSeq | | MiSeq | | NextSeq 500 | | HiSeq 2500 | | HiSeq 4000 |
|---------------|----------|---------|---------|---------|---------|-------------|---------|------------|---------|------------|
| ランモード | i1 | 中出力 | 高出力 | V2 | V3 | 中出力 | 高出力 | Rapid | 高出力 | - |
| 最大スループット (Gb) | 1.2 | 2.4 | 7.5 | 7.5 | 15 | 39 | 120 | 150 | 500 | 750 |
| 最大クラスター数 | 400万 | 800万 | 2,500万 | 1,500万 | 2,500万 | 1.3億 | 4億 | 3億 | 20億 | 25億 |
| ラン時間 | 17時間 | 4-24時間 | | 4-55時間 | | 12-29時間 | | 7-60時間 | 1-6日 | 1-3.5日 |
| 最大リード長 | 2 x 150 | 2 x 150 | 2 x 150 | 2 x 150 | 2 x 300 | 2 x 150 | 2 x 150 | 2 x 250 | 2 x 125 | 2 x 150 |

(1フローセルあたり)

スループット (bp) \div リード長 (bp) x クラスター数(リード数)

バクテリアRNA-Seq

遺伝子発現解析（200万リード、ScriptSeqキット）

| | | iSeq 100 | MiniSeq | MiSeq | |
|----------------|-------|--|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | | i1 Reagent | High Output | V2 | V3 |
| 使用する試薬 | Cat#: | 20021533 | FC-420-1001 | MS-102-2001 | MS-102-3001 |
| | 製品名 | iSeq 100 i1 Reagent (300 Cycles) | MiniSeq High Output Kit (75 Cycles) | MiSeq Reagent Kit v2 (50 Cycles) | MiSeq Reagent Kit v3 (150 Cycles) |
| シーケンス条件 | | 2 X 150 | 1 X 75 | 1 X 50 | 2 X 75 |
| 試薬コスト | | 110,000円 | 149,000円 | 148,000円 | 162,000円 |
| クラスター数 | | 400万 | 2,500万 | 1,500万 | 2,500万 |
| 解析可能検体数 | | 2検体 | 12検体 | 7検体 | 12検体 |
| 検体あたりのシーケンスコスト | | 55,000円 | 12,417円 | 21,000円 | 13,583円 |
| ライブラリー調製コスト | | 22,750円 (ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を使用) | | | |
| 検体あたりのトータルコスト | | 77,750円 | 35,167円 | 43,750円 | 36,333円 |

*注：価格は2018年4月現在の価格です。予告なく変更する場合があります。

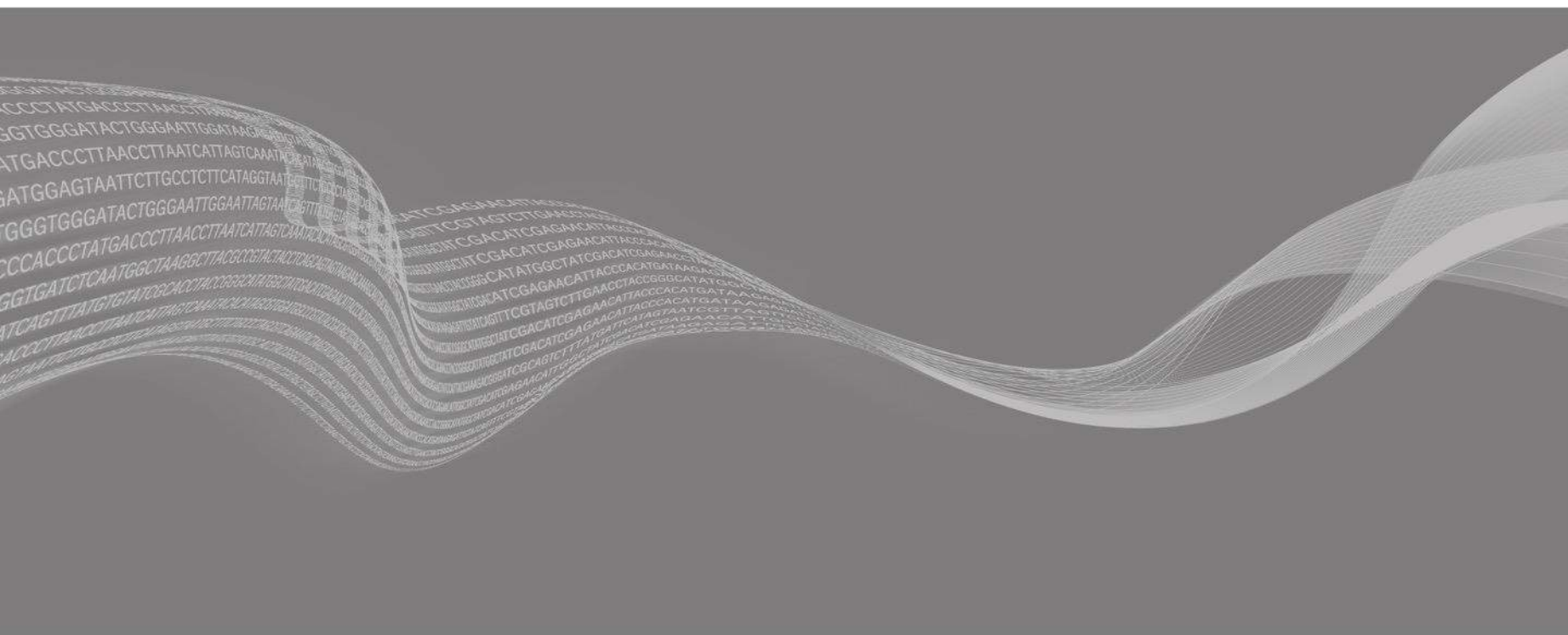
バクテリアRNA-Seq

より詳細なトランスクリプトーム解析（~500万リード、ScriptSeqキット）

| | | iSeq 100 | MiniSeq | MiSeq | |
|----------------|-------|--|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | | i1 Reagent | High Output | V2 | V3 |
| 使用する試薬 | Cat#: | 20021533 | FC-420-1001 | MS-102-2001 | MS-102-3001 |
| | 製品名 | iSeq 100 i1 Reagent (300 Cycles) | MiniSeq High Output Kit (75 Cycles) | MiSeq Reagent Kit v2 (50 Cycles) | MiSeq Reagent Kit v3 (150 Cycles) |
| シーケンス条件 | | 2 X 150 | 1 X 75 | 1 X 50 | 2 X 75 |
| 試薬コスト | | 110,000円 | 149,000円 | 148,000円 | 162,000円 |
| クラスター数 | | 400万 | 2,500万 | 1,500万 | 2,500万 |
| 解析可能検体数 | | 1検体 | 5検体 | 3検体 | 5検体 |
| 検体あたりのシーケンスコスト | | 110,000円 | 29,800円 | 49,000円 | 32,600円 |
| ライブラリー調製コスト | | 22,750円 (ScriptSeq Complete Kit (Bacteria)を使用) | | | |
| 検体あたりのトータルコスト | | 132,750円 | 52,550円 | 71,750円 | 55,350円 |

*注：価格は2018年4月現在の価格です。予告なく変更する場合があります。

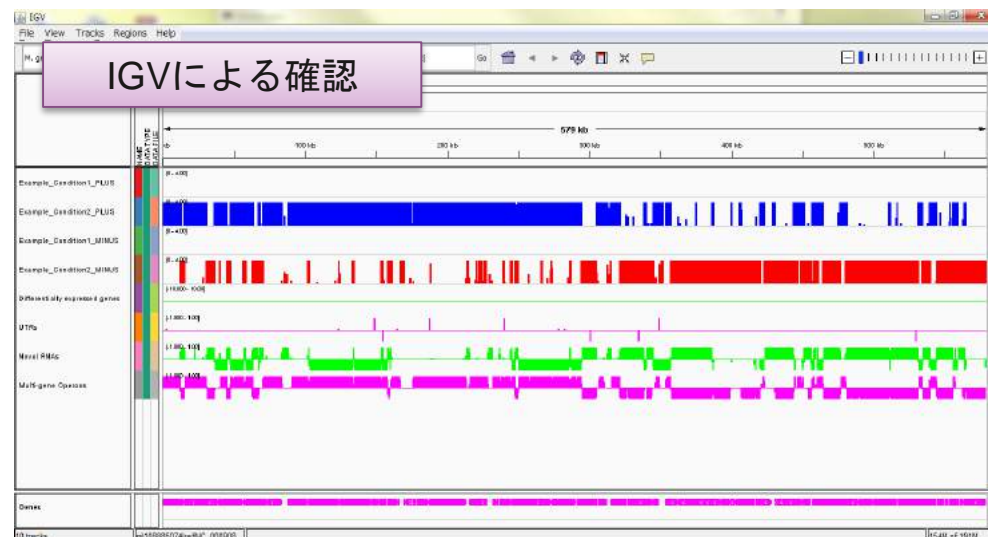
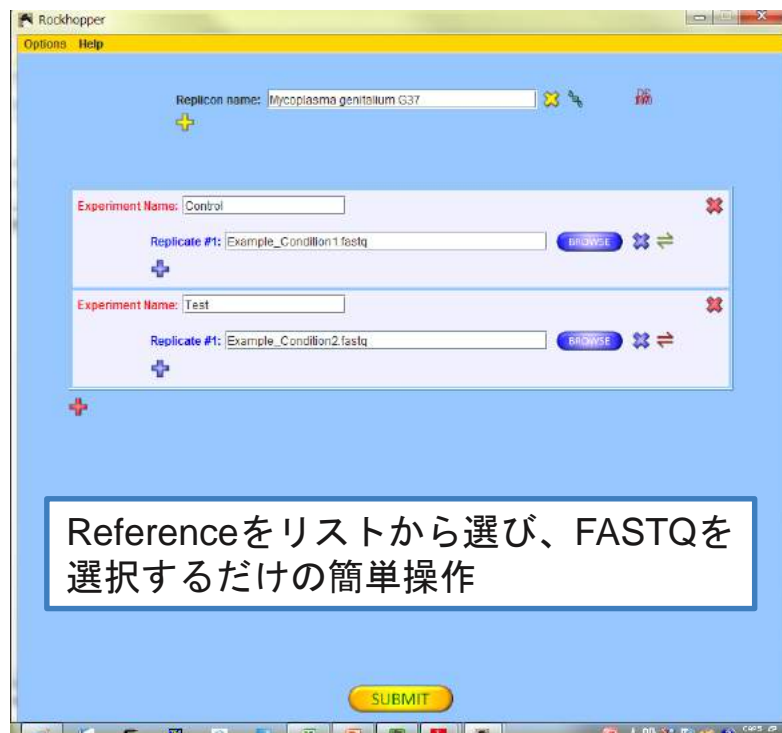
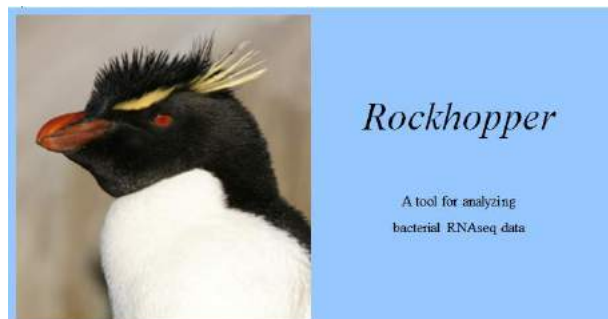
情報解析



イルミナではバクテリアRNA-Seqの情報解析ツールを提供していません

- 既報論文で以下の解析ツールを利用：
 - **TopHat と Cufflinks** といった標準のmRNA解析ツールを使う
 - ・ 参照配列(ゲノム配列[FASTA]と遺伝子情報[GFF])が必要
 - ・ Linux OSでのCommand Lineによる操作
 - **Rockhopper** (<http://cs.wellesley.edu/~btjaden/Rockhopper/>)
 - ・ クリック操作で簡単に操作が可能
 - ・ FASTQインプットのみ、Referenceは準備されている
 - ・ De novo assemblyも可能
 - ・ 動作環境はJava (Win, Mac, Linux)
 - **EDGE-pro** (<https://ccb.jhu.edu/software/EDGE-pro/index.shtml>)
 - ・ FASTQインプット参照配列のインプット必要
 - ・ Linux OSでのCommand Lineによる操作
 - ・ TopHatとCufflinksの作者が開発、原核生物専用

Rockhopperについて



| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
|----|------------|-------------|-------------|------------|--------|------|---------|---------------------|--------------------|-----------------|--------|--------------|
| 1 | Transcript | Translation | Translation | Transcript | Strand | Name | Synonym | Product | Expression Control | Expression Test | qValue | Control vs T |
| 2 | | | | | | aN | MG_001 | DNA polym | 0 | 228 | 1 | |
| 3 | | | | | | | MG_002 | DnaJ domo | 0 | 191 | 1 | |
| 4 | | | | | | rB | MG_003 | DNA gyrase | 0 | 201 | 1 | |
| 5 | | | | | | rA | MG_004 | DNA gyrase | 0 | 205 | 1 | |
| 6 | | | | | | rS | MG_005 | seryl-tRNA | 0 | 205 | 1 | |
| 7 | | | | | | ik | MG_006 | thymidylate | 0 | 212 | 1 | |
| 8 | | | | | | | MG_007 | DNA polym | 0 | 194 | 1 | |
| 9 | 9923 | 9156 | 9920 | 9922 | + | | MG_008 | tRNA modif | 0 | 194 | 1 | |
| 10 | | 11251 | 12039 | 12039 | + | | MG_009 | TatD family | 0 | 215 | 1 | |
| 11 | 12040 | 12068 | 12724 | 12724 | + | | MG_010 | DNA primase | 0 | 203 | 1 | |
| 12 | 13564 | 13564 | 12701 | 12696 | - | | MG_011 | hypothetical | 0 | 35 | 1 | |
| 13 | 12725 | | | 15554 | + | | | predicted antisense | 0 | 0 | 1 | |
| 14 | | 14432 | 13569 | 13565 | - | | MG_012 | alpha-L-gl | 0 | 30 | 1 | |
| 15 | 15221 | 15216 | 14395 | | - | foID | MG_013 | methylene | 0 | 39 | 1 | |
| 16 | 15369 | | | 15294 | - | | MG_014 | Ala tRNA | 0 | 313 | 1 | |
| 17 | 15451 | | | 15375 | - | | MG_015 | Ile tRNA | 0 | 378 | 1 | |
| 18 | 15555 | 15555 | 17426 | 17426 | + | | MG_016 | ABC transp | 0 | 40 | 1 | |
| 19 | 17427 | | | 17452 | + | | | predicted F- | 0 | 7 | 1 | |
| 20 | 17453 | 17473 | 19242 | 19251 | + | | MG_017 | ABC transp | 0 | 35 | 1 | |
| 21 | 19252 | 19252 | 22347 | 22347 | + | | MG_018 | SNF2 famil | 0 | 34 | 1 | |
| 22 | 22348 | | | 22377 | + | | | predicted F- | 0 | 4 | 1 | |
| 23 | 22378 | 22389 | 23558 | | + | dnaJ | MG_019 | chaperone | 0 | 40 | 1 | |
| 24 | | 23542 | 24468 | | + | plp | MG_020 | proline imir | 0 | 44 | 1 | |
| 25 | | 24468 | 26006 | 26006 | + | metS | MG_021 | methionyl- | 0 | 38 | 1 | |
| 26 | 26007 | | | 26019 | + | | | predicted F- | 0 | 4 | 1 | |
| 27 | 26020 | 26036 | 26473 | 26478 | + | rmF | MG_022 | DNA-direc | 0 | 30 | 1 | |

Alignment情報はwig形式になっているので注意、bam形式ではない。

Rockhopperについて

RockHopperのHP

<http://cs.wellesley.edu/~btjaden/Rockhopper/index.html>



ROCKHOPPER

HOME

Download

User Guide

FAQ

User Guide

- I. Obtaining Rockhopper
- II. Quick start with example files
- III. Input files
- IV. Rockhopper execution
- V. Output files
- VI. Options and parameters
- VII. Visualizing results in a genome browser

Answers to Frequently Asked Questions

Why is the system named "Rockhopper"?

Rockhopper is a type of penguin. The name has no significance.

What if my RNA-seq data are not in one of the formats supported by Rockhopper?

Rockhopper accepts files in the most commonly used formats: FASTQ or QSEQ or FASTA or SAM or BAM. FASTQ and QSEQ and FASTA files optionally may be gzipped. Future versions of Rockhopper may include support for additional file formats.

What if I did or did not preserve strand information in my RNA-seq experiment?

Rockhopper supports RNA-seq experiments both when strand information is preserved and when strand information is not preserved. By default, Rockhopper assumes strand information is preserved, but this can be modified in the *Parameter Settings* window.

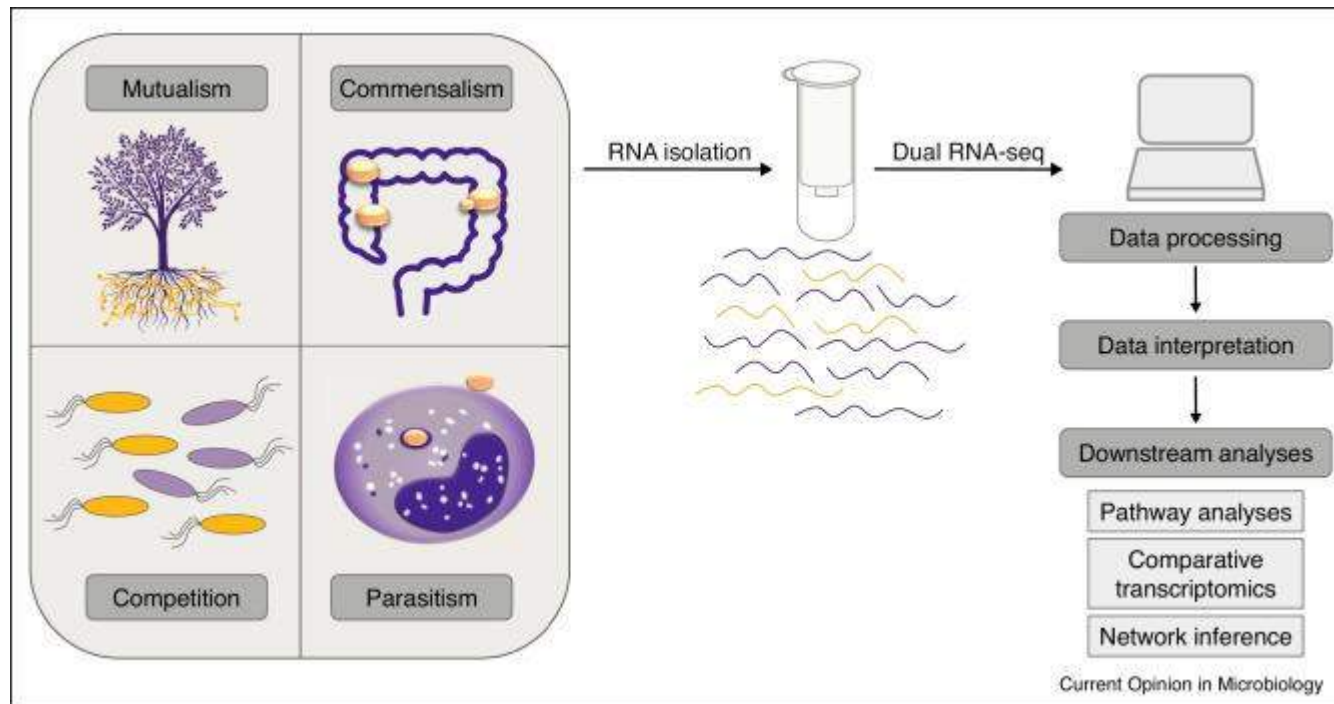
著者らのHPにUser GuideやFAQがございます

McClure, Ryan, et al. "Computational analysis of bacterial RNA-Seq data." *Nucleic acids research* 41.14 (2013): e140-e140.

Tjaden, Brian. "De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data." *Genome biology* 16.1 (2015): 1.

Dual RNA-Sequencingの紹介

Dual RNA-Seqは2つの種を物理的に分離せず、相互作用する2つの種の遺伝子発現を直接観察する手法です。

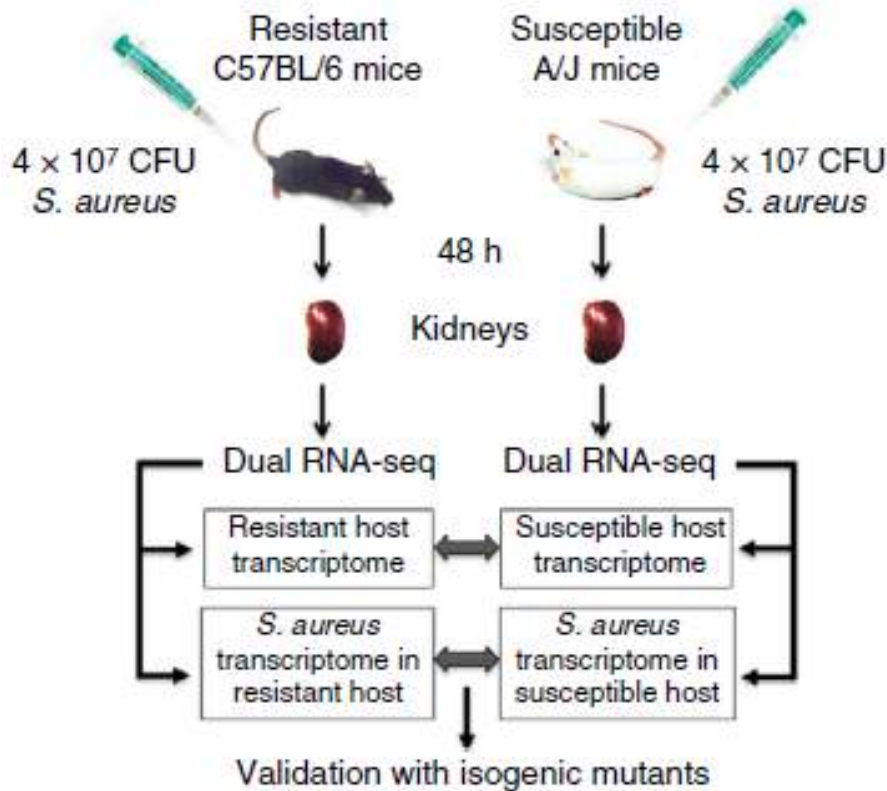


Wolf, Thomas, et al. "Two's company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq." *Current opinion in microbiology* 42 (2018): 7-12.

この分野の研究でも、Ribo-ZeroとScriptSeqの組み合わせたRNA-Seqが用いられています。

Dual RNA-Sequencing 宿主とバクテリアの両方の遺伝子発現解析

d



黄色ブドウ球菌に耐性を持つ・持たないマウスでの、宿主・バクテリア両方の遺伝子発現解析の実施

- バクテリアが感染した組織・細胞を用いて、宿主とバクテリアの両方の遺伝子発現解析を行う。
- 宿主の内在的遺伝子発現変化が感染中のバクテリアの遺伝子発現に及ぼす影響を把握することが可能。
- 宿主自体の固有遺伝子の可変性が、細菌の病原因子の発現に影響することを示した。
- ライブラリー調製は、**疫学用Ribo-Zero**と**ScriptSeq**を用いて実施。
- この論文では、HiSeqで、検体あたりシングルリードで8,400万リードから1億3,900万リードを読んでいる。(HiSeq 1レーン解析)

Thänert, Robert, et al. "Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during in vivo infection." *Nature communications* (2017).

疫学用Ribo-Zero (Epidemiology)のご紹介

- ヒト/マウス/ラット、グラム陰性菌、およびグラム陽性菌で構成されるRNAサンプルから細胞質とミトコンドリアのリボソームRNA (rRNA) を除去できます (=とにかく全部のrRNAを取り除く)。

ヒト、*E. coli*、*B. subtilis*の混合RNA検体を用いたrRNAの除去率の検討実験

| Ribo-Zero Gold (Epidemiology) Removes rRNA from Mixed Human/Bacteria Samples | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------------|--------------------------|----------------------------|------|------|------|--------|--------|-------------------------------------|------|------|---|------|------|
| % UHR | <i>E. coli</i> RNA | % <i>B. subtilis</i> RNA | Human rRNAs % rRNA Removal | | | | | | <i>E. coli</i> rRNAs % rRNA Removal | | | <i>B. subtilis</i> rRNAs % rRNA Removal | | |
| | | | 28S | 18S | 5.8S | 5S | 16S-mt | 12S-mt | 23S | 16S | 5S | 23S | 16S | 5S |
| 100 | 0 | 0 | >99% | >99% | >99% | >93% | >99% | >99% | — | — | — | — | — | — |
| 0 | 100 | 0 | — | — | — | — | — | — | >99% | >99% | >99% | — | — | — |
| 0 | 0 | 100 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | >99% | >99% | >99% |
| 90 | 5 | 5 | >99% | >99% | >96% | >92% | >99% | >99% | >99% | >99% | >96% | >99% | >99% | >95% |
| 50 | 25 | 25 | >99% | >99% | >99% | >90% | >99% | >99% | >99% | >99% | >97% | >99% | >99% | >98% |
| 10 | 45 | 45 | >99% | >99% | >99% | >88% | >99% | >99% | >99% | >99% | >99% | >99% | >99% | >99% |

<https://jp.illumina.com/products/by-type/molecular-biology-reagents/ribo-zero-gold-rRNA-removal-epidemiology.html>

Dual RNA-Sequencingのライブラリー調製ワークフロー (ScriptSeqを使用した場合)

実験
ワークフロー

Ribo-Zeroによる
rRNAの除去

逆転写・cDNA
合成

アダプター連結
とPCR

Ribo-Zero (疫学用・Epidemiology)を用いて、宿主とバクテリアの両方のrRNAを除去

ScriptSeqのワークフローでライブラリーを調製

ライブラリー調製キット

| カタログ番号 | 製品名 | 1反応あたりの価格 | 希望販売価格 |
|---------|---|-----------|----------|
| BEP1206 | ScriptSeq Complete Gold Kit (Epidemiology) (6 Reactions) | 24,384円 | 149,000円 |
| BEP1224 | ScriptSeq Complete Gold Kit (Epidemiology) (24 Reactions) | 22,750円 | 546,000円 |

Ribo-Zeroのみの購入

| カタログ番号 | 製品名 | 1反応あたりの価格 | 希望販売価格 |
|---------|--|-----------|----------|
| MRZE706 | Ribo-Zero Gold Epidemiology Kit (6 Reactions) | 17,000円 | 102,000円 |
| MRZE724 | Ribo-Zero Gold Epidemiology Kit (24 Reactions) | 15,042円 | 361,000円 |

バクテリアRNA-Seqのまとめ

1. バクテリアのmRNAはPolyAを持たないため、Ribo-ZeroによるrRNAの除去により、mRNAの濃縮を行います。Ribo-ZeroによるrRNAの除去工程は、必ずReference Guideに従い実施ください。
2. ライブラリー調製方法は、ScriptSeqとTruSeqの二通りがあり、ScriptSeq Complete Kit (Bacteria) にはRibo-Zeroが含まれています。
3. シーケンスは小型のデスクトップシーケンサーiSeq、MiniSeq、MiSeqで可能です。200万リードで発現解析、500万リードで遺伝子領域を十分に網羅することが可能です。
4. 情報解析の部分はイルミナは提供していません、3rd Partyのツールをご活用ください。紹介しましたRockhopperは簡単に動かすことが可能です。
5. 疫学用のRibo-Zero (Epidemiology)を用いることにより、感染しているバクテリアと宿主の両方のRNA-Seq (Dual RNA-Seq)を行うことが可能です。