

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

フィールドアプリケーションサイエンティスト

仲 健太

2018/2/28



© 2016 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, MiniSeq, 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

RNA-Seqライブラリー調製ワークフロー

1. イルミナのRNA-Seq用ライブラリー調製キットの紹介
2. RNAの準備
 - RNA抽出の注意点
 - 必要なRNA量
 - ライブラリー調製に適したRNAの品質
3. ライブラリー調製
 - TruSeq Stranded mRNA/Total RNA調製方法
4. ライブラリー評価
 - ライブラリーの定量と定性
5. シークエンス条件
 - シークエンサーインプットDNA量

イルミナのRNA-Seq用ライブラリー調製キットの紹介

TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit

mRNAの解析 RNA-Seqのスタンダード！

TruSeq RNA Access/ TruSight Pan-Cancer Library Prep Kit

ホルマリン固定パラフィン包埋（**FFPE**）組織由来の分解したRNAでも解析可能（対象生物はヒト）

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

TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Gold

rRNA（細胞質）を除去し、mRNAとpolyAを持たないRNAを解析。Goldではミトコンドリア由来のrRNAも除去対象。（対象生物はヒト・マウス・ラット）

TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Globin

rRNA（細胞質とミトコンドリア）と全血中に高濃度で存在するグロビンmRNAを除去して、RNA解析を行う（対象生物はヒト・マウス・ラット）

TruSeq small RNA Sample Prep Kit

miRNAといったSmall RNA解析

TruSeq Stranded Total RNA RiboZero Plant kit

葉、種、および根の組織から細胞質、ミトコンドリア、および葉緑体のrRNAを除去して、RNA解析を行う

ライブラリー調製キット紹介

- ライブラリー調製キット構成品単位変更

旧構成：キット内にライブラリー試薬とインデックスボックスが含まれる。

ライブラリー調製試薬	インデックス
<ul style="list-style-type: none">・ cDNA Synthesis PCR Box<ul style="list-style-type: none">・ Box1・ Box2	<ul style="list-style-type: none">・ Index Box



新構成：ライブラリー調製試薬とインデックスボックスを組み合わせる。

ライブラリー調製試薬	+	インデックス
<ul style="list-style-type: none">• サンプル数に応じてご選択ください• 48 samples / 96 samples		<ul style="list-style-type: none">• インデックスの数、種類に応じてご選択ください

ライブラリー調製試薬

- TruSeq Stranded mRNA Library Prep

ライブラリー調製試薬

- サンプル数に応じてご選択ください



インデックス

- インデックスの数、種類に応じてご選択ください

ライブラリー調製試薬

型番	製品名	価格 / キット
20020594	TruSeq Stranded mRNA Library Prep (48 Samples)	397,000円
20020595	TruSeq Stranded mRNA Library Prep (96 Samples)	794,000円

価格は2018年10月現在の価格です。

ライブラリー調製試薬

- TruSeq Stranded Total RNA Library Prep

ライブラリー調製試薬

- Ribo-Zeroの種類およびサンプル数に応じてご選択ください



インデックス

- インデックスの数、種類に応じてご選択ください

ライブラリー調製試薬

型番	製品名	価格 / キット
20020596	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat (48 Samples)	989,000円
20020597	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat (96 Samples)	1,790,000円
20020598	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold (48 Samples)	989,000円
20020599	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold (96 Samples)	1,790,000円
20020610	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant (48 Samples)	989,000円
20020611	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant (96 Samples)	1,790,000円
20020612	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Globin (48 Samples)	989,000円
20020613	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Globin (96 Samples)	1,790,000円

インデックス

ライブラリー調製試薬

- サンプル数に応じてご選択ください



インデックス

- インデックスの数、種類に応じてご選択ください

インデックス

型番	製品名	価格 / キット
20020492	TruSeq RNA Single Indexes Set A (12 Indexes, 48 Samples)	42,000円
20020493	TruSeq RNA Single Indexes Set B (12 Indexes, 48 Samples)	42,000円
20019792	TruSeq RNA CD Index Plate (96 Indexes, 96 Samples)	92,700円
20020591	IDT for Illumina – TruSeq RNA UD Indexes (24 Indexes, 96 Samples)	118,000円
20022371	IDT for Illumina – TruSeq RNA UD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	118,000円

価格は2018年10月現在の価格です。

Index Hoppingの問題を低減するため、NovaSeq、HiSeqX、HiSeq HD のお客様は、Unique Dualをご使用ください。

ライブラリー調製 必要準備品

- 試薬消耗品

製品名	製造販売元	型番	容量	1サンプルあたり必要量	反応サンプル数
Agencourt AMPure XP kit	Beckman Coulter	BC-A63880	5 ml	232 ul	20
		BC-A63881	60 ml		250
SuperScript II Reverse Transcriptase*	Thermo Fisher	18064-014	10,000 U	200 U	50
		18064-071	4x 10,000U		200
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent	5067-1504	25 Chip	1 Chip	12/Chip
Agilent RNA 6000 nano kit	Agilent	5067-1511	25 Chip	1 Chip	12/Chip
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher	Q32850	100 assay	2	50
		Q32853	500 assay		250

TruSeq Stranded Total RNA sample Prep kitご使用の場合、以下製品も必要です。

Agencourt RNAClean XP	Beckman Coulter	BC-A63987	40 ml	99 ul	>96
-----------------------	-----------------	-----------	-------	-------	-----

*ProtoScript II Reverse Transcriptase (NEW ENGLAND BioLabs) でも代用可

ライブラリー調製 必要準備品

- 機器

製品名	製造販売元	型番
Agilent 2100 Bioanalyzer (もしくは同等品)	Agilent	G2940CA
Qubit Fluorometer(もしくは同等品)	Thermo Fisher	Q32866
サーマルサイクラー(ヒートリッド付)	メーカー指定なし	
96ウェル専用マグネットスタンド	メーカー指定なし	
96ウェル深底プレート (MIDIプレート)	Thermo Fisher	AB-0859
96ウェルプレート	メーカー指定なし	
インキュベーター	SciGene	1057-30-O
ヒートブロック (MIDIプレート対応)	SciGene	BD-60-601
プレートシェーカー(1,800 rpmが可能なもの)	メーカー指定なし	

これらの機器は多検体同時処理を想定した準備品。少数検体処理の場合は代用品でも可能。

→次のスライド

代用可能な機器準備品

少数検体の場合

- ・ 96 wellプレート、96well深底プレート（MIDIプレート）はなくてもPCRチューブ、1.5 ml チューブでそれぞれ代用可能。

マグネットスタンドは、以下の製品が使いやすい。



日本ジェネティクス
Cat# FG-SSMAG2
NGS MagnaStand (YS-Model)
8Chx0.2ml PCRチューブ用

- ・ プレートシェーカーによる懸濁はピペッターでも可能。



よくビーズ・試薬を懸濁すること

* 国内での作業実績をもとにしております。正式なサポート内容については、Reference Guide (#1000000040498)をご参照ください。

RNA-Seqライブラリー調製ワークフロー

1. イルミナRNA-Seq用ライブラリー調製キット紹介

2. RNAの準備

- RNA抽出時の注意点
- ライブラリー調製に必要なRNA量
- ライブラリー調製に適したRNAの品質

3. ライブラリー調製

- TruSeq Stranded mRNA/Total RNA調製方法

4. ライブラリー評価

- ライブラリーの定量と定性

5. シークエンス条件

- シークエンサーインプットDNA量

RNAの準備

- RNA抽出時の注意点

- ✓ Reference Guide (part#1000000040498)にはRNA抽出の指定の方法、キットはない。

<抽出キット例>

- RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
 - NucleoSpin (Takara bio)
- ✓ RNA抽出時、DNase処理を実施。
 - 残存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。
 - ✓ キャリアは使用しない。
 - グリコーゲン、ヘパリンは酵素活性を阻害します。yeast tRNAはライブラリーの基質となります。
 - ✓ 抽出したRNAは吸光度測定し、精製度を確認しましょう。
 - 260/280 Ration Value : ~2.0、260/230 : 2.0-2.2

RNAの準備

- ライブラリー調製に必要なRNA量

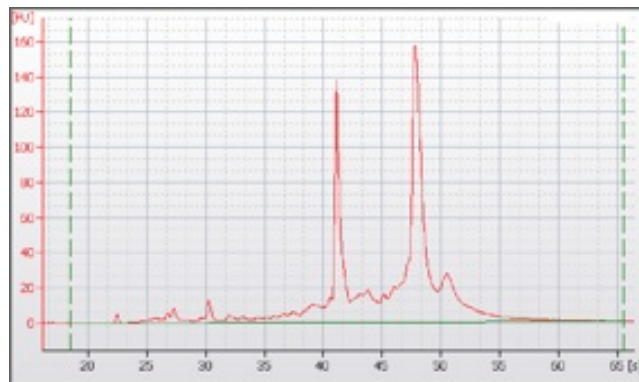
- ✓ TruSeq Stranded mRNAの場合
 - 2~80 ng/ μ l Total RNAを50 μ l（総量：100 ng ~ 4 μ g）、もしくは0.2~8 ng/ μ l 精製済mRNAを50 μ l（総量：10 ng ~ 400 ng）。
- ✓ TruSeq Stranded Total RNAの場合
 - 2~20 ng/ μ lのTotal RNAを50 μ l（総量：100 ng ~ 1 μ g）。
- ✓ RNA定量方法の指定はない。
 - Qubit、PicoGreen、NanoDropなどご使用ください。

RNAの準備

- ライブラリー調製に適したRNAの品質

Agilent 2100 Bioanalyzer、Tape Station、もしくは同等品を使用し、RIN値（RNA Integrity Number）でRNAの分解度を確認。

評価は1~10の数値（満点10）。



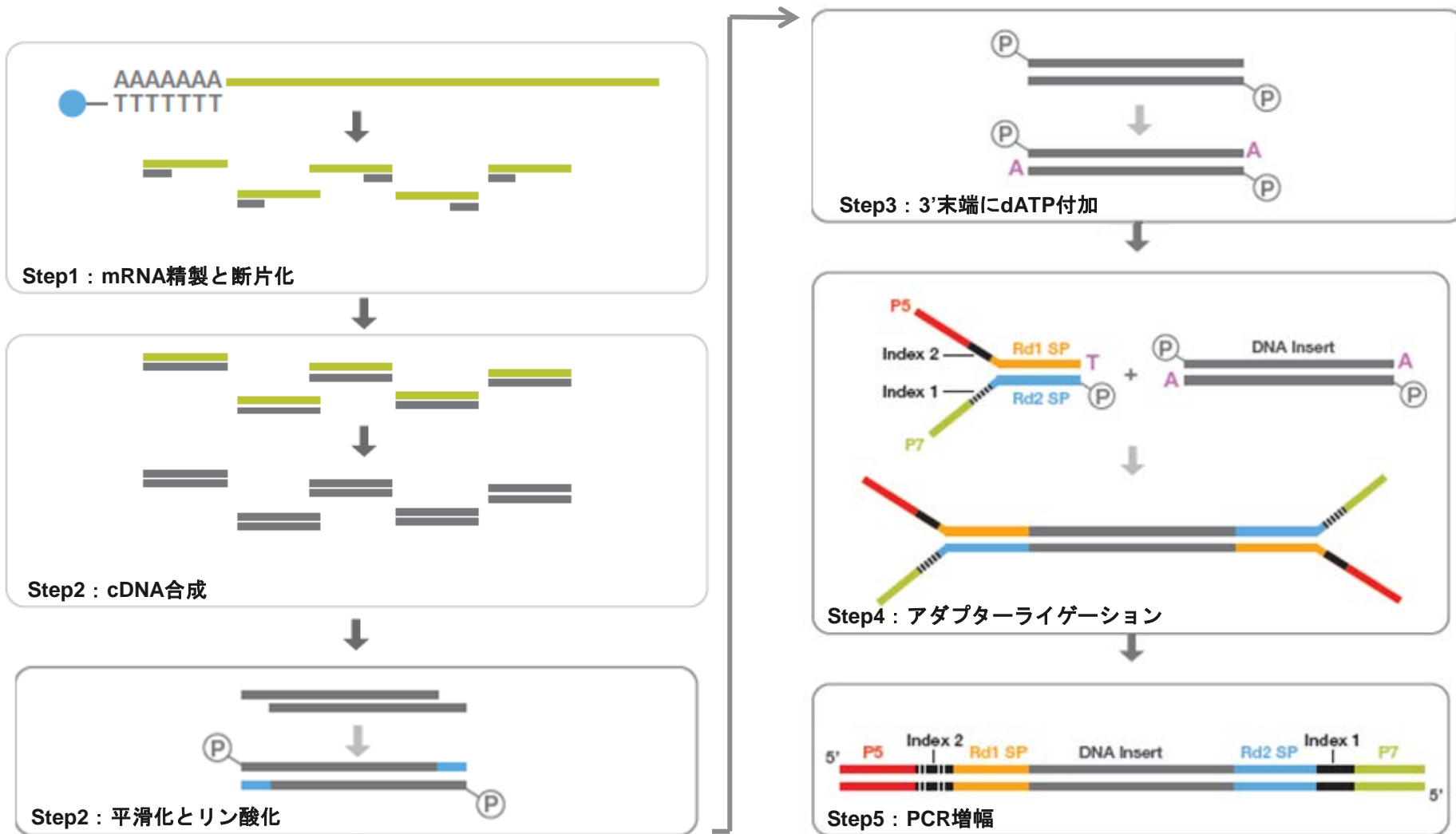
Bioanalyzerでの理想的なTotal RNA泳動図

- ✓ TruSeq Stranded mRNA : RIN値 ≥ 8 。
- ✓ TruSeq Stranded Total RNA : FFPEなど分解されているRNAでも解析。
 - Reference Guide (part#1000000040498)にRIN値記載はございませんが、経験的にRIN値 ≥ 4 であれば解析可能。
- ✓ 生物種（植物、昆虫など）によってBioanalyzer泳動図が上図と異なることがある。

RNA-Seqライブラリー調製ワークフロー

1. イルミナRNA-Seq用ライブラリー調製キット紹介
2. RNAの準備
 - RNA抽出時の注意点
 - ライブラリー調製に必要なRNA量
 - ライブラリー調製に適したRNAの品質
3. ライブラリー調製
 - TruSeq Stranded mRNA/Total RNA調製方法
4. ライブラリー評価
 - ライブラリーの定量と定性
5. シークエンス条件
 - シークエンサーインプットDNA量

TruSeq Stranded mRNAワークフロー

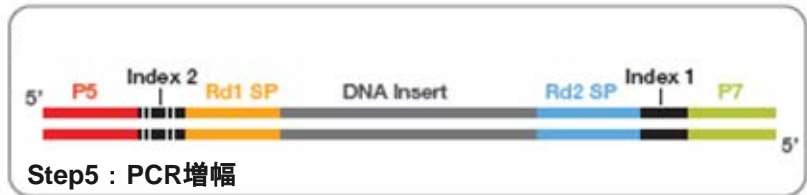
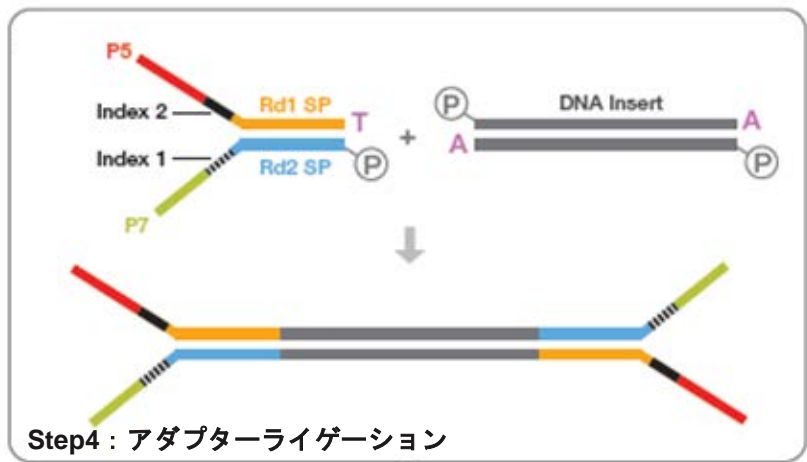
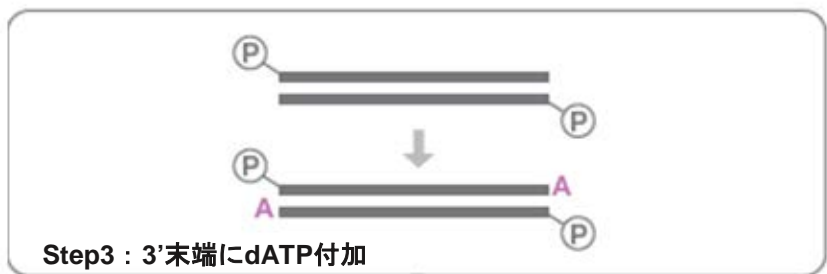
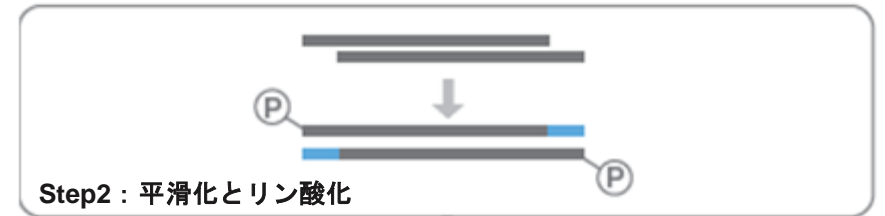
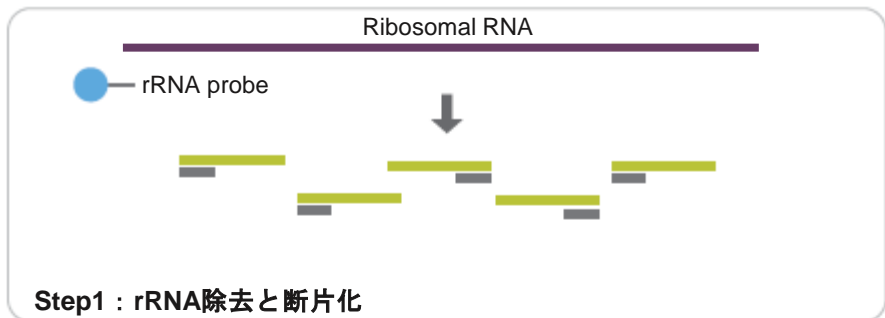


TruSeq Stranded Total RNAワークフロー

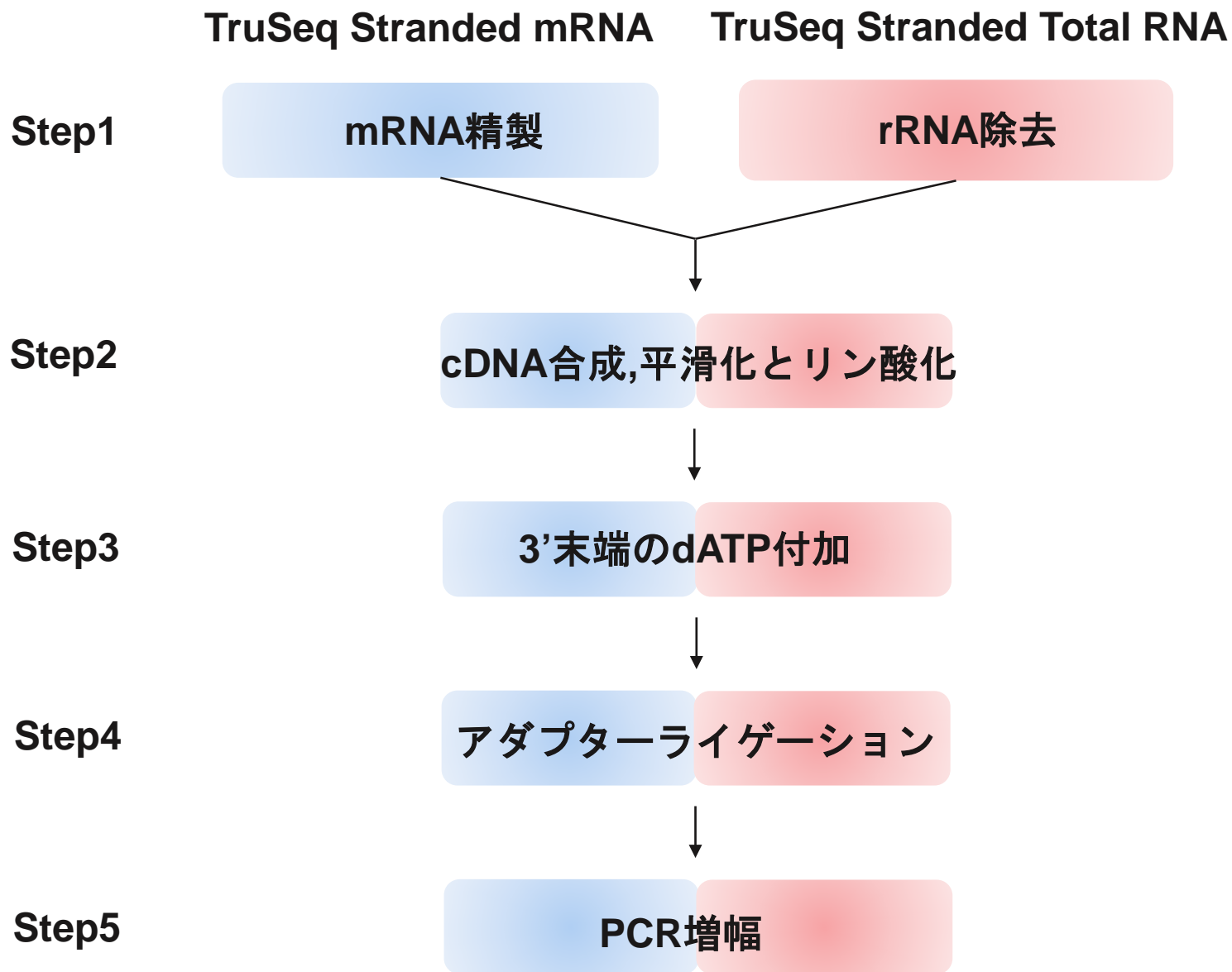
Total RNA

H/M/R Gold

Globin Plant

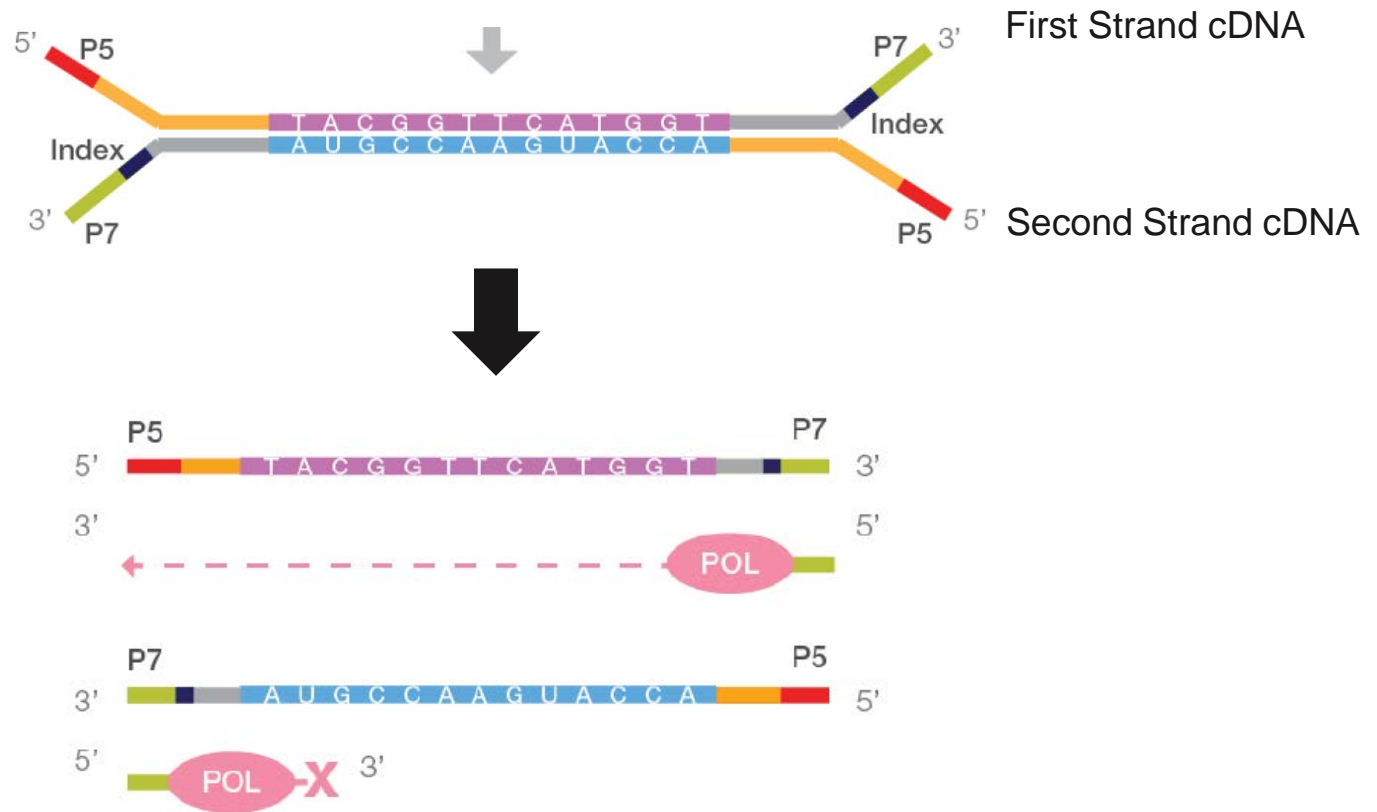


TruSeq Stranded mRNAとTotal RNAワークフローの違い



ストランド情報を維持

- Second Strand cDNA合成時にdUTPを使用



PCR増幅で使用するPolymeraseはdUTPを鋳型にできず、Second Strand cDNA鎖は増幅されず、First Strand cDNAのみ合成される。

Step1 : mRNA精製と断片化①

- ① Total RNA (2~80 ng/ μ l) 50 μ l
 RNA Purification Beads 50 μ l
 Total 100 μ l

プログラム名 : mRNA Denaturation Lid 温度 : 100°C
 65°C, 5分
 4°C, hold

室温, 5分

- ② マグネットスタンドに置き、5分。上清除去。

ビーズにmRNAが結合しているので回収するのはビーズです

- ③ 200 μ l Beads Wash Buffer(BWB)を加え、ビーズウォッシュ。

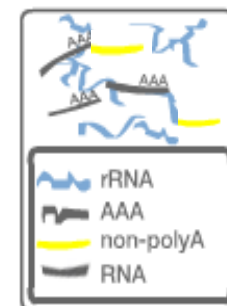
リボソームRNAや非メッセンジャーRNAを除去

- ④ 50 μ l Elution Buffer(ELB)を加える。

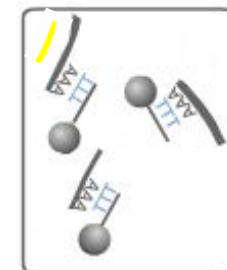
プログラム名 : mRNA Elution1 Lid 温度 : 100°C

80°C, 2分
 25°C, hold

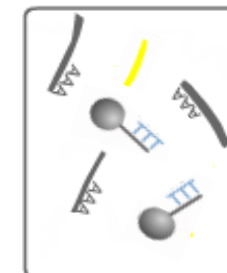
ビーズからmRNAを剥がす



Total RNA



mRNA Purification



rRNA Depletion

Step1 : mRNA精製と断片化②

- ⑤ ④に50 μ l Beads Binding Buffer(BBB)を加える。
室温, 5 分。
- ⑥ マグネットスタンドに置き、5 分。上清除去。
- ⑦ 200 μ l BWBを加え、ビーズウォッシュ。

このステップで1度剥がしたmRNAを再度ビーズに結合させることで1回目のwashで除ききれなかった非メッセンジャーRNAを除去します

- ⑧ 19.5 μ l Fragment Prime Finish Mix(FPF)を加える。

FPFには1st ストランドcDNA合成用ランダムプライマー、2価陽イオンが含まれています

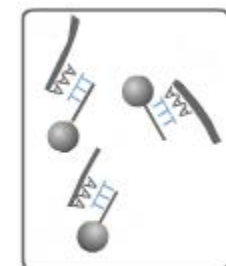
- ⑨ プログラム名 : Elution 2 – Frag – Prime Lid 温度 : 100°C
94°C, 8 分 4°C, hold

2価の陽イオンと熱の働きで、RNAが断片化されます。

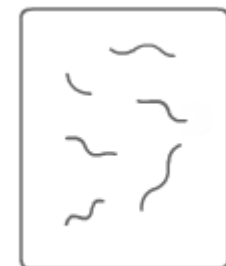
マグネットスタンドに置き、17 μ 上清を回収。

断片化され、cDNA合成用プライマーが張り付いたmRNAを回収

→すぐにStep2 : cDNA合成ステップへ



mRNA Purification



Fragmentation

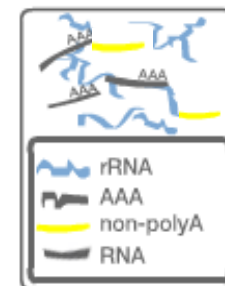
Step1 : rRNA除去と断片化①

① Total RNA (0.1~1 µg)	10 µl
RNA Binding Buffer	5 µl
rRNA Removal Mix	5 µl
Total	20 µl

プログラム名 : rRNA Denaturation

68°C, 5分 Lid 温度 : 100°C →4°C, holdはしない!

室温, 1分



Total RNA

- ② <次の実験準備>
 良く攪拌したrRNA Removal Bead(RRB)を予め準備した、新しいプレートに35 µl分注。

→①の反応チューブ直接に入れない!

Denatured RNAにRRBを添加するとrRNAが十分に除去できません。

- ③ 20 µl ①の反応溶液を②で準備したRRBに移す。

- ④ ピペッティング。 →素早く上下させることが重要。
 泡の発生を防ぐためチップの先は底につける。

H/M/R Gold

Globin Plant

Step1 : rRNA除去と断片化②

- ⑤ マグネットスタンドに置き、上清回収。

ビーズにはrRNAが結合しているので回収するのは上清です

- ⑥ ⑤で回収した上清を再度マグネットスタンドに静置し、上清回収。
→しっかりとビーズを除くことが重要！

- ⑦ RNAClean XP (AMPure XPのRNA用) を用いて、RNAを精製。
・ FFPEなど分解度の激しいサンプルを使用する場合、193 μ l加える
小さいサイズのRNAも回収します。
・ 上記以外の場合は99 μ l加える。→添加量が違うことに注意！

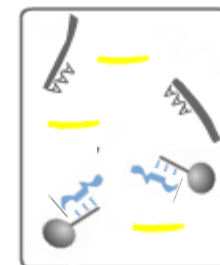
- ⑧ 11 μ l Elution Buffer(ELB)で溶出。

溶出液の一部を、Bioanalyzer
などで確認することも可能です

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| ⑨ Elution Bufferで溶出したrRNA除去RNA | 8.5 μ l |
| Elute, Prime, Fragment High Mix(EHP) | 8.5 μ l |
| <u>Total</u> | <u>17 μl</u> |

プログラム名 : Elution 2 – Frag – Prime Lid 温度 : 100°C
94°C, 8分

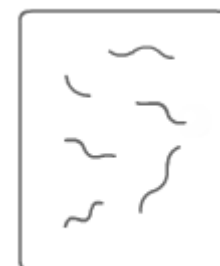
4°C, hold →すぐにStep2 : cDNA合成ステップへ



rRNA Depletion



rRNA Depletion



Fragmentation

Step2 : cDNA合成 (First Strand cDNA)

H/M/R Gold

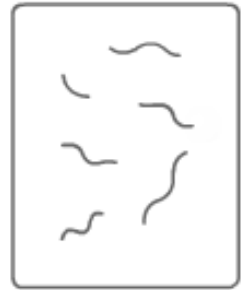
Globin Plant

- ① 17 μ l 断片化されたmRNA / rRNA除去RNA
- ② 以下のPremix 8 μ lを加えます（反応液の総量は25 μ l）。

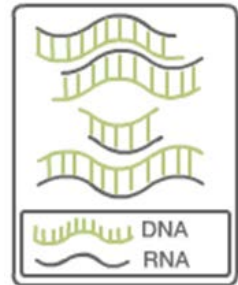
Reagent	1 rxn
First Strand Synthesis Act D Mix	9 μ l
SuperScriptII or Protoscript II	1 μ l
Total Volume	10 μ l

アクチノマインD：
ゲノムDNAからの逆転写反応を抑制する目的で加えます。発がん性があるので取扱いにはご注意ください。

- ③ プログラム名 : Synthesis 1st Strand Lid 温度 : 100°C
 25°C, 10 分
 42°C, 15 分
 70°C, 15 分
 4°C, hold



Fragmentation

DNA-RNA
ハイブリッド

→すぐに次のSecond Strand cDNA合成ステップへ

Step2 : cDNA合成 (Second Strand cDNA)

④ 25 μ l 反応溶液

⑤ 5 μ l Resuspension Bufferを加える。

Resuspension Bufferは1回目の融解時、よく攪拌した後、コンタミ対策のため小分けしましょう

⑥ 20 μ l Second Strand Marking Mix(SMM)を加える。

SMMにはpolymeraseやNTPsが含まれています。不要な凍結融解を低減するため1回目の融解時、よく攪拌した後、小分けにしましょう

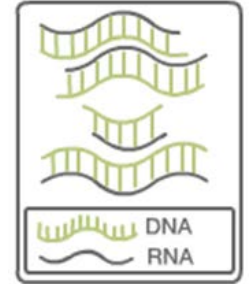
16°C, 1 hour ヒートリッドは30°C設定。
30°Cに設定できない場合は、サーマルサイクラーの蓋を開けたまま実施。

⑦ 90 μ l AMPure XPを加え、精製。

⑧ 17.5 μ l Resuspension Bufferを加え、溶出。

⑨ 15 μ l 上清を回収。

H/M/R	Gold
Globin	Plant



cDNA (2nd Strand)
作成 → ds cDNA

Step3 : 3'末端にdATP付加

H/M/R Gold

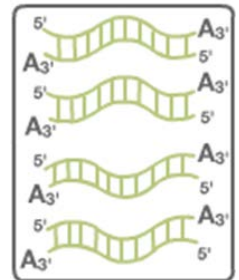
Globin Plant

① 回収したds cDNA	15 μ l
Resuspension Buffer	2.5 μ l
A-Tailing Mix (ATL)	12.5 μ l
Total	30 μl

A-Tailing MixにはKlenow(3'-5' exo-)が含まれております。不要な凍結融解を低減するため1回目の融解時、撹拌した後、小分けしましょう
撹拌にはVortexは避けましょう

プログラム名 : ATAIL70 Lid 温度 : 100°C
 37°C, 30 分
 70°C, 5 分
 4°C, hold

精製なしで、次のステップに進みます



→すぐにStep4 : アダプターライゲーションへ

Step4 : アダプターライゲーション

① アデニル化ds cDNA	30 μ l
Resuspension Buffer	2.5 μ l
<u>Ligation Mix</u>	<u>2.5 μl</u>
Total	35 μ l

② 2.5 μ l Index adapterを加える。

30°C, 10 分 Lid 温度 : 100°C

Index Adapterは4回以上、凍結融解しないことが推奨。それ以上、凍結融解を繰り返す場合は分注しましょう

③ 5 μ l Stop Ligation Buffer(STL)を加え、反応停止。

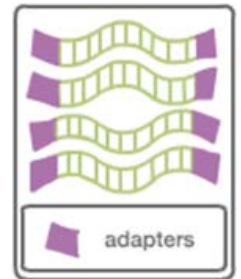
④ 42 μ l AMPure XPを加え、精製。

⑤ 52.5 μ l Resuspension Bufferを加え、溶出し。50 μ l 上清回収。

⑥ 50 μ l AMPure XPを加え、再度精製。

⑦ 22.5 μ l Resuspension Bufferを加え、溶出。20 μ l 上清回収

④～⑦ : 2回のAMPure XP精製を行い、未反応のアダプターの持ち込みを防ぎます



Step5 : PCR増幅

① アダプターライゲーションds cDNA	20 μ l
PCR Primer Cocktail(PPC)	5 μ l
PCR Master Mix(PMM)	25 μ l
<hr/>	
Total	50 μ l

プログラム名 : PCR Lid 温度 : 100°C

98°C, 30 秒
 98°C, 10 秒
 60°C, 30 秒
 72°C, 30 秒
 72°C, 5 分
 4°C, hold

} x15

PCRバイアス、PCRデュプリケートを
 防ぐためにPCRサイクル数の増やすのは
 避けましょう

- ② AMPure XPを加え、精製。
- ・ シングルインデックス使用の場合、AMPure XPを50 μ l加える。
 - ・ デュアルインデックス使用の場合、AMPure XPを47.5 μ l加える。
- AMPure XPの添加量が違います！

- ③ 32.5 μ l Resuspension Bufferを加え、溶出。

- ④ 30 μ l 上清を回収 **ライブラリー完成！**

AMPure XP / RNAClean XP

AMPure XP にはポリエチレングリコール（PEG）、NaCl、2価陽イオン、磁性ビーズ（SPRIビーズ）等が含まれています。

<核酸精製>

ポリエチレングリコール沈殿と同様な原理でDNAを精製。

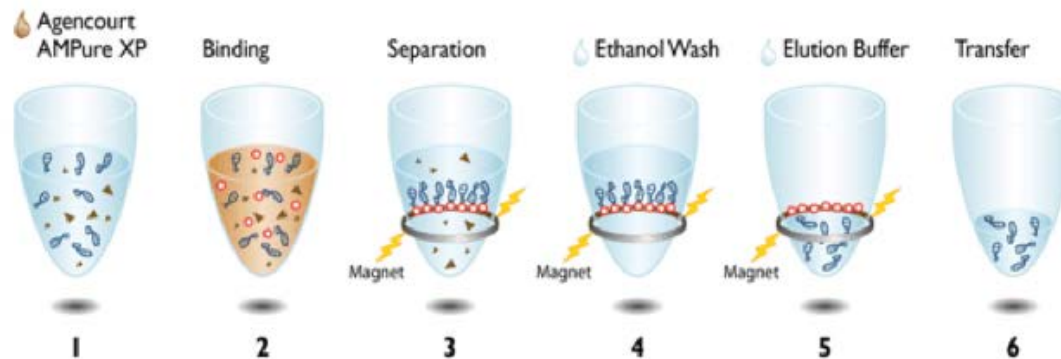


図. AMPure XP Beads プロトコール

<https://ls.beckmancoulter.co.jp/products/genomics/ampure-xp>

1. 2. 核酸を含む反応溶液にAMPure XPを加える。
3. ポリエチレングリコールによってDNAが沈殿し、ビーズに結合。マグネットスタンドに置き、上清除去。
4. EtOHでウォッシュ。
5. Elution Buffer（Resuspension Buffer, miliQなど）を加え、溶出。
6. マグネットスタンドに置き、上清回収。

AMPure XP / RNAClean XP

ビーズとDNAの結合にはポリエチレングリコールと塩濃度に依存。

<サイズ選択>

AMPure XPの添加量によって回収される核酸のサイズが変わります。
目的のDNAサイズを回収するためにはAMPure XPと核酸溶液の体積比が重要。

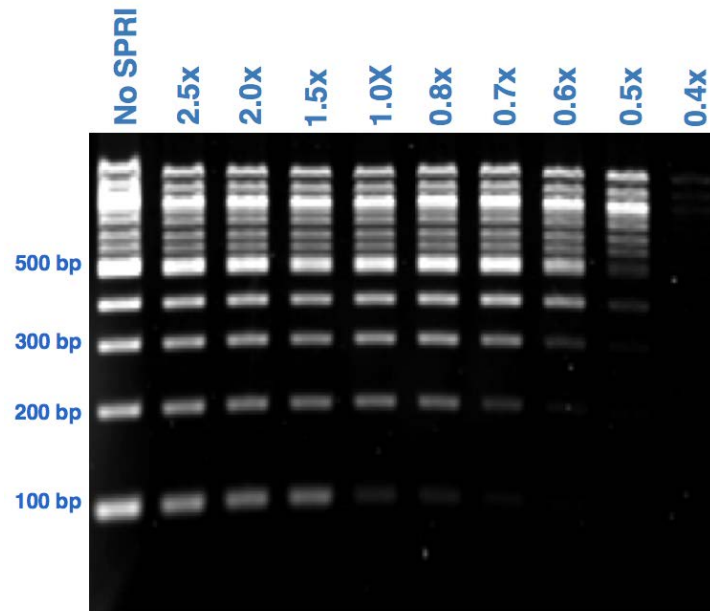


図. Size Selection “GA Boot Camp”

<https://www.broadinstitute.org/files/shared/illuminaids/SamplePrepSlides.pdf>

AMPure XP / RNAClean XP

- ワークフロー留意点

TruSeq Stranded mRNA / Total RNA sample Prep kit Reference Guide
AMPure XPワークフロー

1. DNA溶液にReference Guide記載の量のAMPure XPを加え、ピペティング。
静置、15分。

AMPure XPは使用する30分以上前に室温に出しておき、使用する直前にはボルテックスでよく撹拌してください。
AMPure XPは正確な量を加えて下さい

2. マグネットスタンドに置き、上清除去。

3. 80% エタノールを加え、30秒、静置し、上清を除去。

80% EtOHは用事調製

4. ステップ3.を再度実施。過度な風乾は溶出効率が低下します。
Reference Guideには風乾15分と記載していますが、多検体処理を前提としております。ビーズ表面にヒビが入った時点で過度となりますのでご注意ください。最大5分
5. 風乾、15分 →

6. プロトコール記載のResuspension Bufferを加え、マグネットスタンドから外し、2分、静置。

7. マグネットスタンドに置き、5分（上清が透明になるまで）静置。

8. プロトコール記載の量の上清を回収。

RNA-Seqライブラリー調製ワークフロー

1. イルミナRNA-Seq用ライブラリー調製キット紹介
2. RNAの準備
 - RNA抽出時の注意点
 - ライブラリー調製に必要なRNA量
 - ライブラリー調製に適したRNAの品質
3. ライブラリー調製
 - TruSeq Stranded mRNA/Total RNA調製方法
4. ライブラリー評価
 - ライブラリーの定量と定性
5. シークエンス条件
 - シークエンサーインプットDNA量

ライブラリー評価

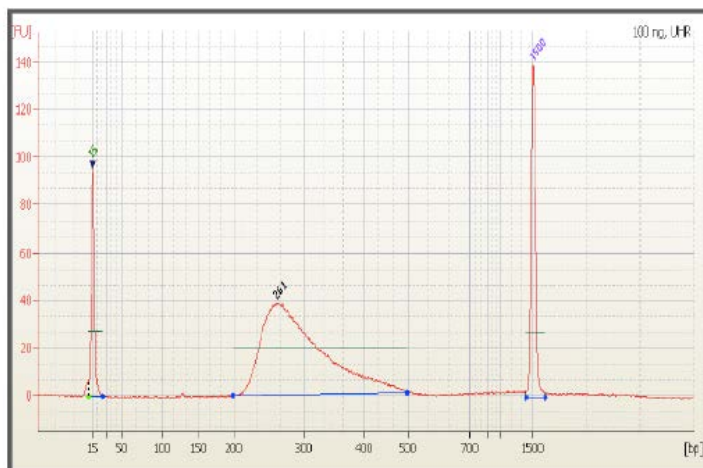
- ライブラリーの定量と定性

<定量方法>

- ・ ライブラリー調製初めての方、不慣れな方はQubit、qPCR、Bioanalyser（もしくは同等品）3つの手法で実施することが推奨。手法間で濃度に大きな相違がないことを確認して下さい。
- ・ 期待される収量は経験的に数十ng/μlであることが多いです。

<定性方法>

- ・ ライブラリー1 μl使用し、Agilent 2100 Bioanalyzer（DNA1000チップ）等でサイズ評価。
- ・ **260 bp**付近にピークがみられます。



Bioanalyzerでの理想的なライブラリー泳動図

RNA-Seqライブラリー調製ワークフロー

1. イルミナRNA-Seq用ライブラリー調製キット紹介
2. RNAの準備
 - RNA抽出時の注意点
 - ライブラリー調製に必要なRNA量
 - ライブラリー調製に適したRNAの品質
3. ライブラリー調製
 - TruSeq Stranded mRNA/Total RNA調製方法
4. ライブラリー評価
 - ライブラリーの定量と定性
5. シークエンス条件
 - シークエンサーインプットDNA量

シーケンス条件

- ライブラリーインプットDNA量

RNA-Seqライブラリーはインサート長が150-220 bpになり、クラスターができています。

はじめてRNA-Seqをする場合、シーケンサーへのインプットライブラリー量はSupport Bulletin記載（500 bpのライブラリーを想定）の濃度よりも少し控えめ（x0.7-x0.8）にしましょう。

Platform	インプット濃度	至適クラスター密度	RNA-Seq ライブラリーインプット濃度
HiSeq 2000/2500 High OutPut v3	12.0 pM	750 – 850K clusters/mm2	8.5 – 9.5 pM
HiSeq2500 High OutPut v4	18.0 pM	950 – 1050K clusters/mm2	12.5 – 14.5 pM
HiSeq 2500 Rapid Run v2	12.0 pM	850 – 1000K clusters/mm2	8.5 – 9.5 pM
MiniSeq	1.8 pM	170 – 220K clusters/mm2	1.2 – 1.5 pM
MiSeq v2 Reagents	12.5 pM	1000 – 1200K clusters/mm2	8.8 – 10.0 pM
MiSeq v3 Reagents	15.0 pM	1200 – 1400K clusters/mm2	10.0 – 12.0 pM
NextSeq 500/550	1.8 pM	170 – 220K clusters/mm2	1.2 – 1.5 pM

まとめ

- ✓ 必ずプロトコールに沿って、実験を行って下さい。
 - Input RNAの量、分解度
 - rRNA除去のステップ
- ✓ Resuspension Buffer、 Second Strand Marking Mix(SMM)、 A-Tailing Mix (ATL) は一回目の融解時、チューブに小分けしましょう。
- ✓ AMPure XPの取り扱いには注意しましょう。
- ✓ シーケンサーへのサンプル添加量は少し控えめにしましょう。

トラブルシューティング

- ライブラリー収量が極端に少ない。
 - スタートRNAが100 ng以上であることを再度ご確認ください。
 - RIN値が基準値以上であることを確認して下さい。
 - AMPure XP時、過度の風乾の可能性ががあります。
 - 凍結・融解の繰り返しによる酵素の失活
- 120 bp付近にライブラリーとは別のピークが見られる。
 - アダプター同士の連結物です。ライブラリーと等量のAMPure XPで精製して下さい。
- 期待したライブラリーサイズとは別の位置に低いピークが見られる。
 - AMPure XPを正確な量添加して下さい。
- 期待したクラスター密度よりも極端に少ない、あるいは多い。
 - 定量ミスの可能性がございます。qPCR等で再度、定量を実施して下さい。