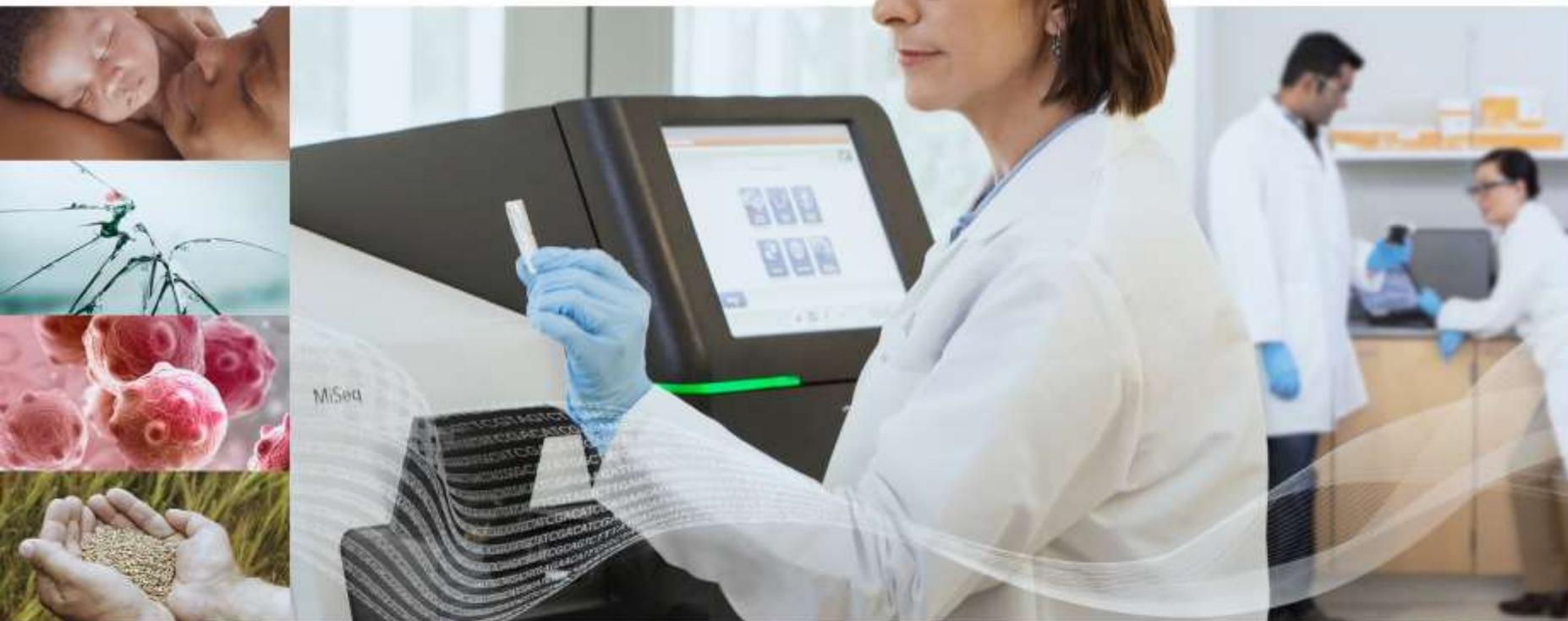


RNA-Seqをもう一度： 新しいライブラリー調製キットでより簡単・確実に

テクニカルサポート部
高田 よう子

2020年11月25日



QB#11439

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

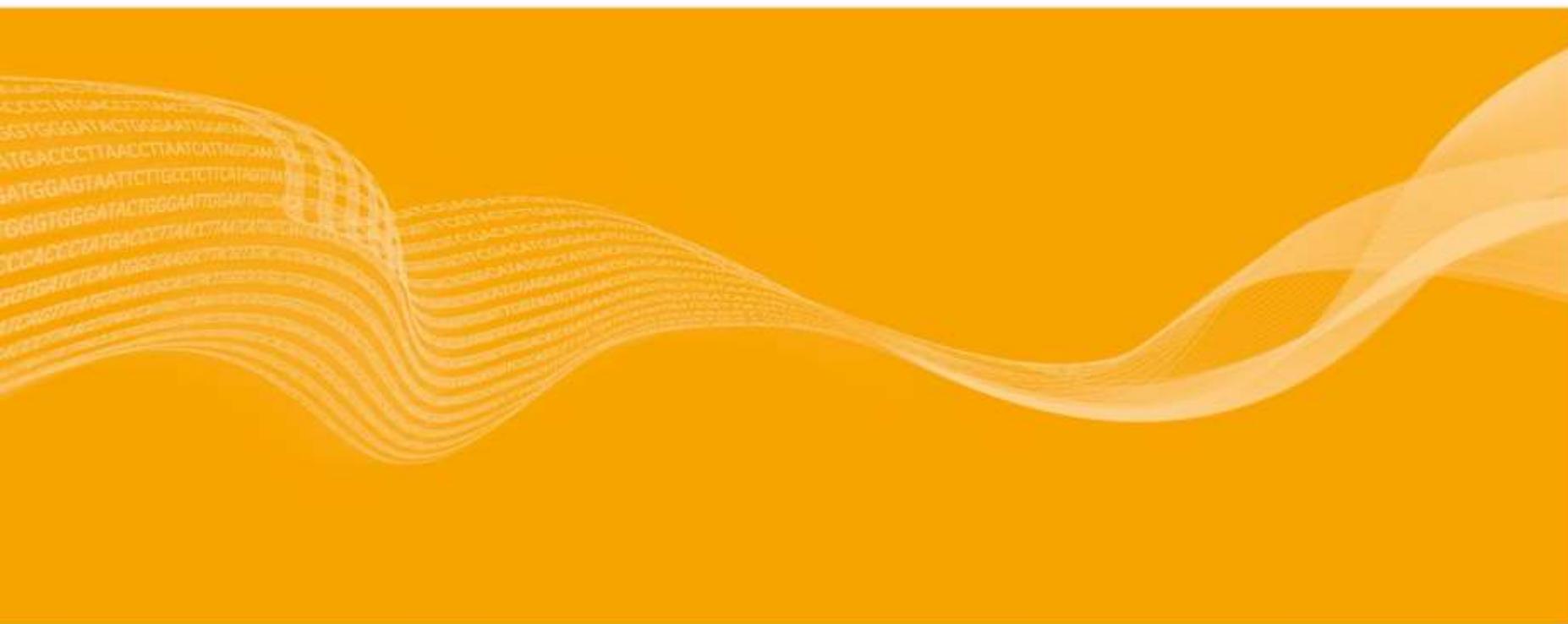
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

illumina[®]

本日のアジェンダ

1. RNA-seq の概要とライブラリー調製キットの選び方
2. Illumina Stranded mRNA/total RNA のワークフロー
3. Illumina Stranded mRNA/total RNA の注意点
4. Illumina RNA Prep with Enrichment のワークフロー
5. まとめ

RNA-seqの概要とライブラリー調製キットの選び方



キット選びの前に

- 対象生物種は？
- 得られるRNAの量と質は？
- どのRNA種に興味があるか？
(mRNA? lncRNA? miRNA?)
- 解析の目的は？
(単純な発現解析？トランスクリプトーム解析？)

RNAの種類と対応するライブラリー調製法

Total RNAサンプル

— rRNA

— rRNA以外のRNA

- ・ Coding RNA (mRNA)
- ・ Non-coding RNA (lncRNA, tRNA, miRNA等)



small RNA-seq ライブラリー調製
・ miRNA等のsmall RNAが対象

ターゲット RNA-seq ライブラリー調製
・ パネルに応じて様々な用途に応用可能
例) Exome panelを使用し、劣化した
RNA/FFPE*由来RNAからRNA-seq

mRNA-seq ライブラリー調製

- ・ poly-A tailを持ったmRNAをoligo dTビーズで精製
- ・ 劣化したRNAは不可

Total RNA-seq ライブラリー調製

- ・ rRNAをプローブを用いて除去
- ・ 特定の生物種のみに対応
- ・ 中程度に劣化したRNAも可

* FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded (ホルマリン固定パラフィン包埋)

RNA-seq ライブラリー調製キット

mRNA-seq kit	Total RNA (ng)	FFPE	Stranded	Time	index
TruSeq RNA Library Prep Kit v2	100-1000			~10.5 時間	Single: 24
TruSeq Stranded mRNA kit	100-1000		✓	~10.5 時間	Single: 24 CD, UD: 96
NEW! Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation	25-1000		✓	~7 時間	UD: 384
Total RNA-seq kit	Total RNA (ng)	FFPE	Stranded	Time	index
TruSeq Stranded total RNA kit	100-1000	✓	✓	~11.5 時間	Single: 24 CD, UD: 96
NEW! Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation	1-1000	✓	✓	~7 時間	UD: 384
ターゲット RNA-seq kit	Total RNA (ng)	FFPE	Stranded	Time	index
TruSeq RNA Exome	10-20	✓	✓	~2 日	Single: 24
NEW! Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation	10-100	✓		~9 時間	UD: 384
miRNA-seq kit	Total RNA (ng)	FFPE	Stranded	Time	index
TruSeq Small RNA Library Prep Kit	1000			~1日	Single: 24

新製品 Illumina RNA シリーズの特徴



作業時間の短縮



少量インプットに対応



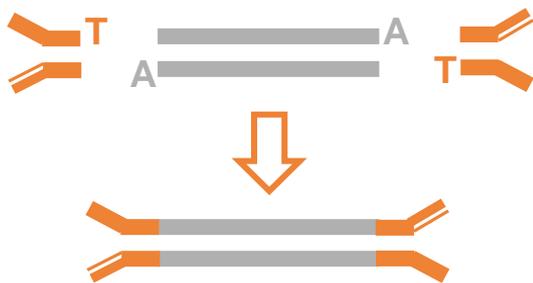
384 Unique Dual (UD) indexに対応

* Index PCRのアンカー配列の付け方はキットによって異なる

mRNA

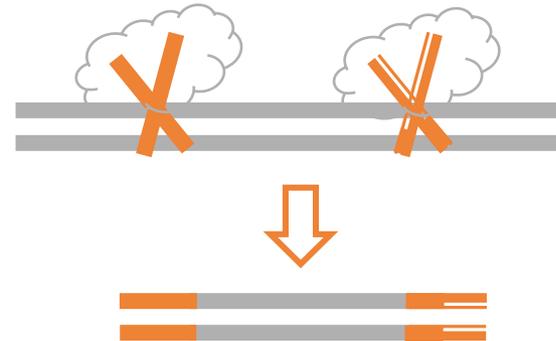
Total RNA

Illumina Stranded mRNA/Total RNA Prep
= **Ligation** (ライゲーション)



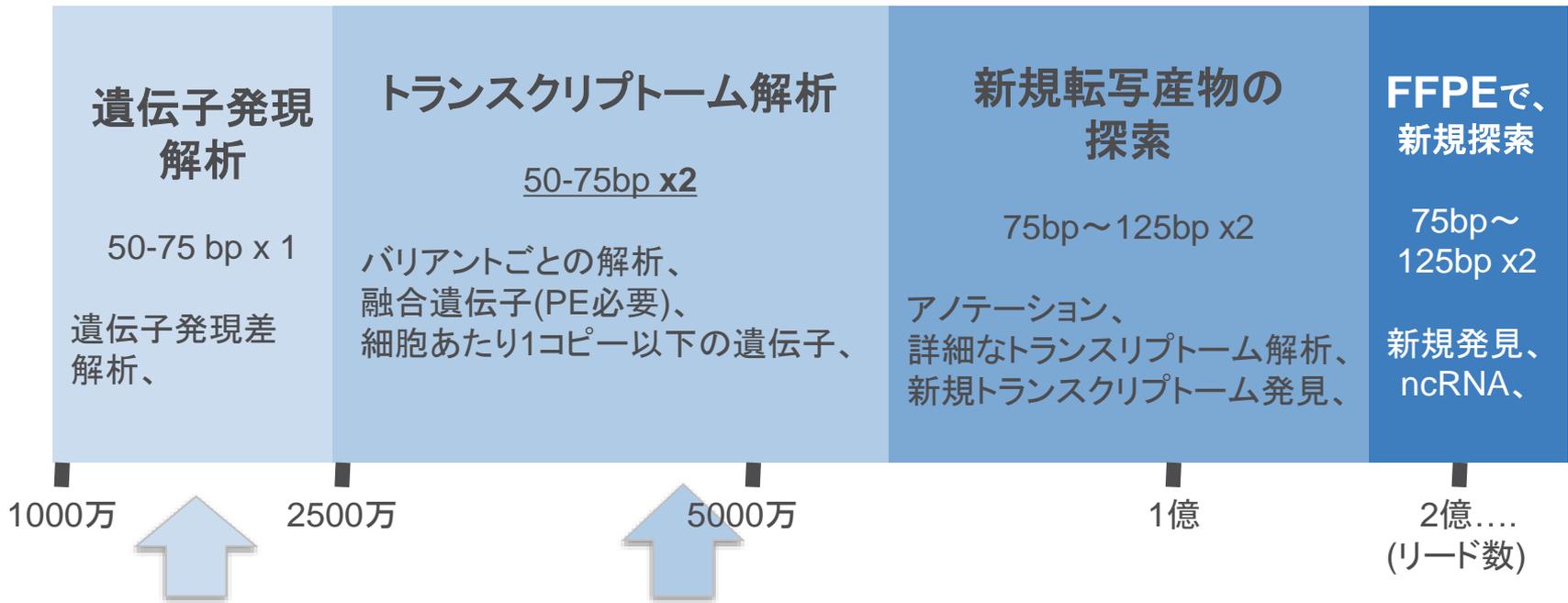
Enrichment

Illumina RNA Prep with Enrichment
= **Tagmentation** (タグメンテーション)



RNA-Seq の目的と実験デザイン (ヒト・マウスの例)

サンプルあたりのコスト:



単純な遺伝子発現解析:
mRNA-seq: 1,000万リード以上
Total RNA-seq: 2500万リード以上

トランスクリプトごとの正確な解析:
mRNA-seq: 2,500万リードx2以上
Total RNA-seq: 5,000万リードx2以上

Considerations for RNA-Seq read length and coverage:

<https://jp.support.illumina.com/bulletins/2017/04/considerations-for-rna-seq-read-length-and-coverage-.html>

日本語ウェビナー： RNA-Seqをはじめようシリーズ（2018）



【実験デザイン編 -これからRNA-Seqを始める方に-】

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-180131-j.html>



【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】

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-180228-j.html>

・ TruSeq Stranded mRNA/Total RNA kitのご紹介



**新製品Illumina RNA Prep kitsがリリースされました
(本日のウェビナーでご紹介します)**



【情報解析編：初めての方でも大丈夫、クラウドを用いた簡単クリック情報解析】

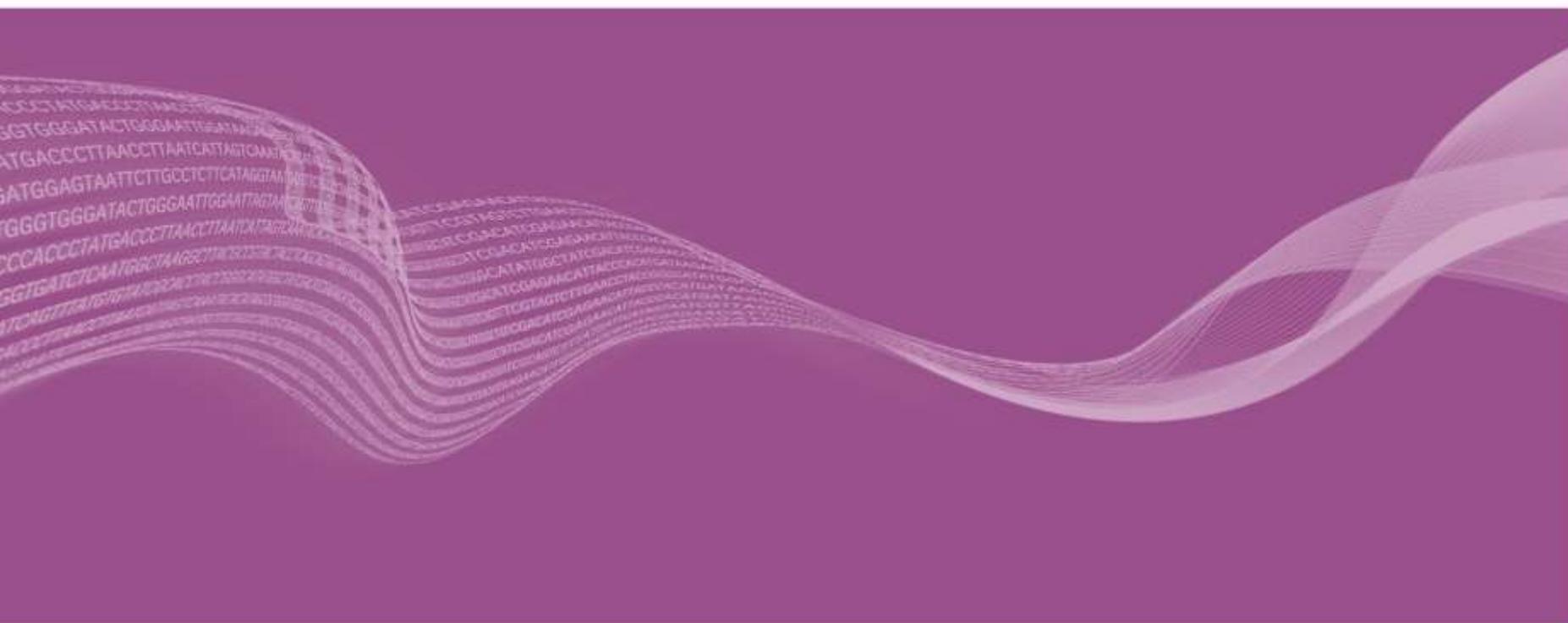
<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-180328-j.html>

・ BSSH RNA-Seq Alignment Appなどのご紹介



**新BSSH App, DRAGEN RNA Pipeline appがリリースされました
(2021年2月ウェビナー開催予定)**

Illumina Stranded mRNA Prepのワークフロー



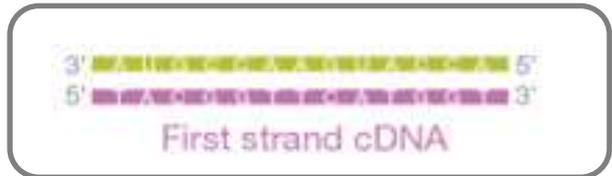
Illumina Stranded mRNA Prep Ligation

mRNA

のワークフロー (②~⑥はmRNAとTotal RNAで共通)



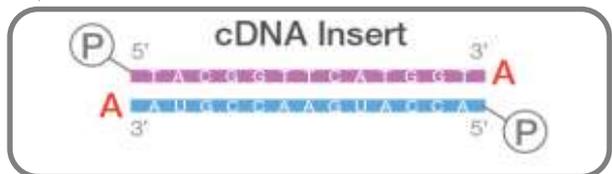
① mRNA精製と断片化



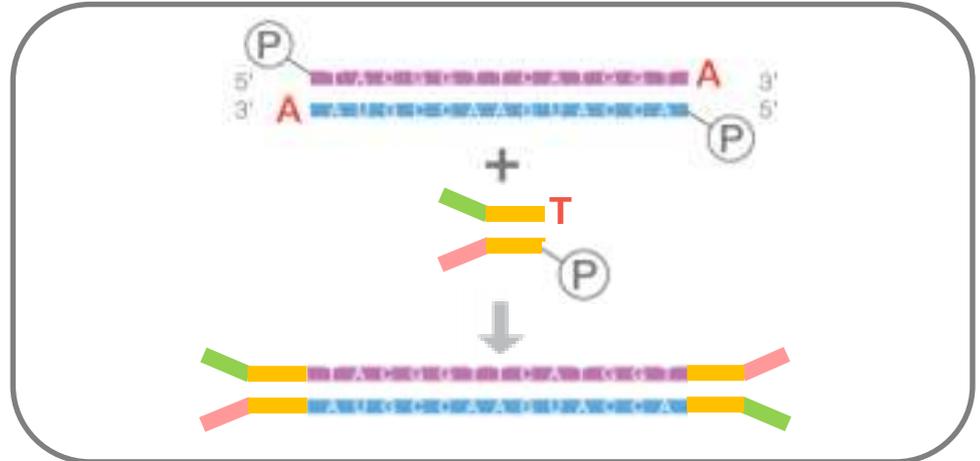
② ランダムプライマーを用いてcDNA合成



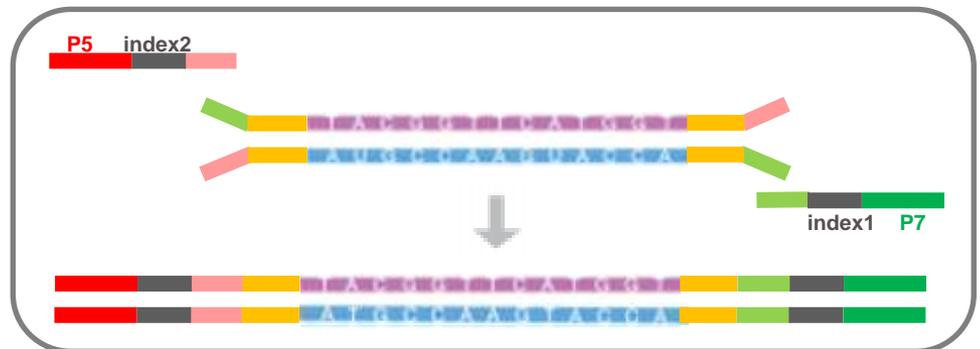
③ 2nd Strandの合成とリン酸化



④ A-Tailの付加



⑤ アンカー (UD indexの足場配列) のライゲーション



⑥ UD index でPCR (アダプターとインデックスの付加、およびライブラリーの増幅)

Illumina Stranded mRNAの必要準備品： ライブラリー調製試薬＋インデックス

mRNA

ライブラリー調製試薬

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20040532	Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 Samples)	128,200円
20040534	Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 Samples)	676,500円

インデックスキット (10 bp のUnique Dual (UD) Index)

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20040553	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	107,600円
20040554	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	107,600円
*	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	*
*	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	*

* 近日販売開始予定

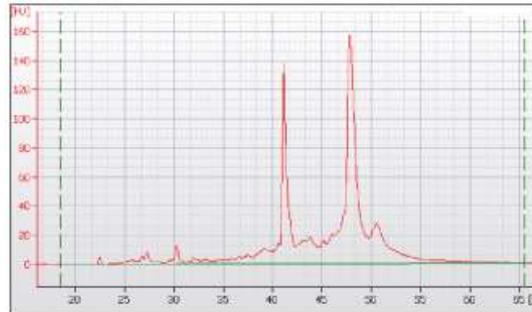
2020年11月の価格となります

Illumina Stranded mRNA インプットRNAの準備

- ・ RNA抽出に指定のキットはないが、DNase処理を含める
(定量に影響するため)
- ・ Agilent 2100 Bioanalyzer、もしくは同等品を使用し、RNAの分解度を確認
RIN* \geq 8

* RIN (RNA Integrity Number) = RNA分解度の指標

- ・ Qubit、もしくは同等品を使用し、RNAの濃度を測定
1~40 ng/ μ l のTotal RNA 25 μ l が必要 (Total 25~1000 ng)



(例) RIN \geq 8のTotal RNAのBioanalyzerでの泳動図

Illumina Stranded mRNA

mRNA

Step 1 : mRNAの精製と断片化①



(1) サンプルとビーズを混合

Total RNA (1~40 ng/ μ l)	25 μ l
RNA purification Beads (RPBX)	25 μ l
Total	50 μ l

プログラム名 : mRNA_CAP (Lid 温度 : 100°C)

65°C, 5分

4°C, 30秒

23°C, 5分

23°C, hold

ビーズは使用前に室温に戻し
vortexで十分に懸濁する

(2) マグネットスタンドで2分静置。上清除去。

ビーズにmRNAが結合して
いるので、ビーズを回収

(3) 100 μ l BeadsWashBuffer (BWB)を加え、ビーズウォッシュを行い上清を除去。

(4) ビーズに25 μ l Elution Buffer (ELB)を加える。 プログラム名 : mRNA_ELТ (Lid 温度 : 100°C)

80°C, 2分

25°C, hold

ビーズが入ったままサーマル
サイクラーにかける

Illumina Stranded mRNA

mRNA

Step 1 : mRNAの精製と断片化②



(5) (4)に25 μ l Beads Binding Buffer (BBB)を加える。
室温で5分静置。

(6) マグネットスタンドに置き、5分静置。上清除去。

(7) 100 μ l BWBを加え、ビーズウォッシュを行い上清を除去。

(8) ビーズに**Fragmentation Master Mix**を19.5 μ l加え懸濁し、室温で2分静置
プログラム名 : DEN94_8 (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を断片化

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

Fragmentation Master Mix	(1x)
Nuclease-free ultrapure water	10.5 μ l
EPH3	10.5 μ l
Total	21.0 μ l

(9) マグネットスタンドに置き、2分静置。上清を17 μ l 回収。

上清に断片化されたmRNAが含まれます

→すぐにStep 2 : First Strand cDNA合成へ進む

Illumina Stranded mRNA/Total RNA

Step 2 : First Strand cDNA合成

mRNA

Total RNA

- (1) Step1で精製・断片化されたRNA 17 μ lに、
First Strand Synthesis Master Mixを
8 μ l 加える（反応液の総量は25 μ l）。



First Strand Synthesis Master Mix	(1x)
First Strand Synthesis Act D Mix (FSA)	9 μ l
Reverse Transcriptase (RVT)	1 μ l
Total	10 μ l

プログラム名 : FSS (Lid 温度 : 100°C)
25°C, 10 分
42°C, 15 分
70°C, 15 分
4°C, hold

→すぐにStep 3 : Second Strand cDNA合成へ進む

Illumina Stranded mRNA/Total RNA

Step 3 : Second Strand cDNA合成

mRNA

Total RNA

(2) Step 2の反応液 25 μ l にSecond Strand Marking Mix (SMM) を25 μ l 加える (反応液の総量は50 μ l) 。



プログラム名 : SSS (Lid 温度 : 40°C)
16°C, 60分
16°C, hold

Lidの温度に注意！ 100°Cでは
酵素が失活してしまいます

(3) 90 μ l AMPure XPを加え、精製。

ビーズは使用前に室温に戻し
vortexで十分に懸濁する

(4) 19.5 μ l Resuspension Buffer (RSB)を加え、溶出。

(5) 17.5 μ l の上清を回収。

SAFE STOPPING POINT
-20°Cで7日間まで保存可能

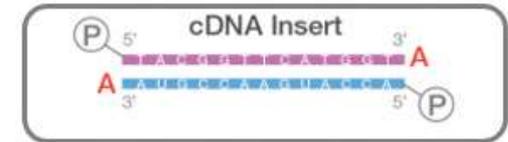
Illumina Stranded mRNA/Total RNA

mRNA

Step 4 : 3'末端のアデニル化

Total RNA

- (1) Step 3の二本鎖 cDNA 17.5 μ l に、
A-Tailing Mix (ATL) を12.5 μ l 加える。



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

4°Cまで下がったらプレートを取り出し
精製なしで次のステップに進む

→すぐにStep 5 : アンカーライゲーションへ進む

Illumina Stranded mRNA/Total RNA

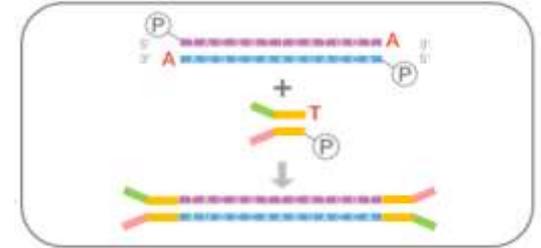
Step 5 : アンカーライゲーション

mRNA

Total RNA

(1) Step5の反応液 (30 μ l) に、下記の試薬を順番に加える。

	スタートのインプットRNA量	
	≤ 100 ng	> 100 ng
① Resuspension buffer (RSB)	2.5 μ l	-
② RNA Index Anchors	2.5 μ l	5.0 μ l
③ Ligation Mix (LIGX)	2.5 μ l	2.5 μ l
Total	37.5 μ l	37.5 μ l



↓

① Resuspension buffer (RSB)
 ② RNA Index Anchors
 ③ Ligation Mix (LIGX)

プログラム名 : LIG (Lid 温度 : 100°C)
 30°C, 10 分
 4°C, hold

- ・ 緑のプレート 
- ・ 全ウェルに同じアンカーが入っている
- ・ 1サンプルにつき、1ウェルを使用

(2) 5 μ l Stop Ligation Buffer (STL)を加え、反応停止。

(3) 34 μ l AMPure XPを加え、精製。

直前に-20°Cから取り出し、
 使用後はすぐに-20°Cに戻す

(4) 22 μ l Resuspension Bufferを加え溶出。20 μ l の上清を回収。

SAFE STOPPING POINT
 -20°Cで7日間まで保存可能

Illumina Stranded mRNA/Total RNA

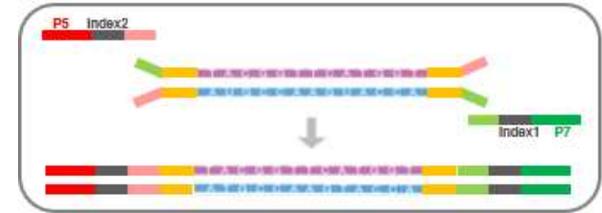
mRNA

Step 6 : アダプター付加とライブラリー増幅

Total RNA

(1) Step 4の反応液 (20 μ l) に、下記の試薬を順番に加える。

① Adapter Mix (UDP0XXX)	10 μ l
② Enhanced PCR Mix (EPM)	20 μ l
Total	50 μ l



- ・ 透明のプレート 
- ・ Index 1とIndex 2 のpremix
- ・ 1サンプルにつき1ウェルを使用

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

Xサイクル

インプットRNA量に応じてサイクル数を決定。

- ・ 1~10 ng (total RNA workflow) : X=15*
 - ・ 25 ng (mRNA workflow) : X=15
 - ・ 100 ng : X=13*
 - ・ 1000 ng : X=10*
- *FFPE/bacteria由来
の場合、+2 cycles

SAFE STOPPING POINT : -20°Cに移し、7日間まで保存可能

(2) 50 μ l AMPure XPを加え、精製。

(3) 19.5 μ l RSBを加え溶出。 17.5 μ l の上清を回収。

ライブラリー完成!

-20°Cで30日間まで保存可能

ライブラリーQC

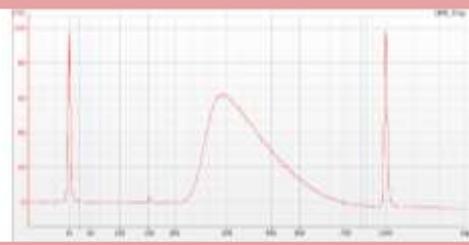
mRNA

Total RNA

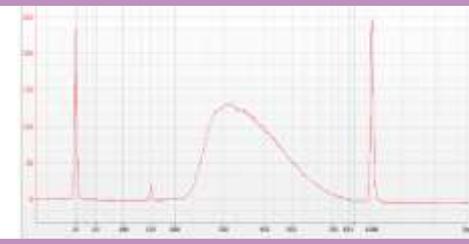
<サイズ確認>

1 μ lをAgilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Kitで定性

Illumina Stranded mRNA
平均長 : ~300 – 400 bp



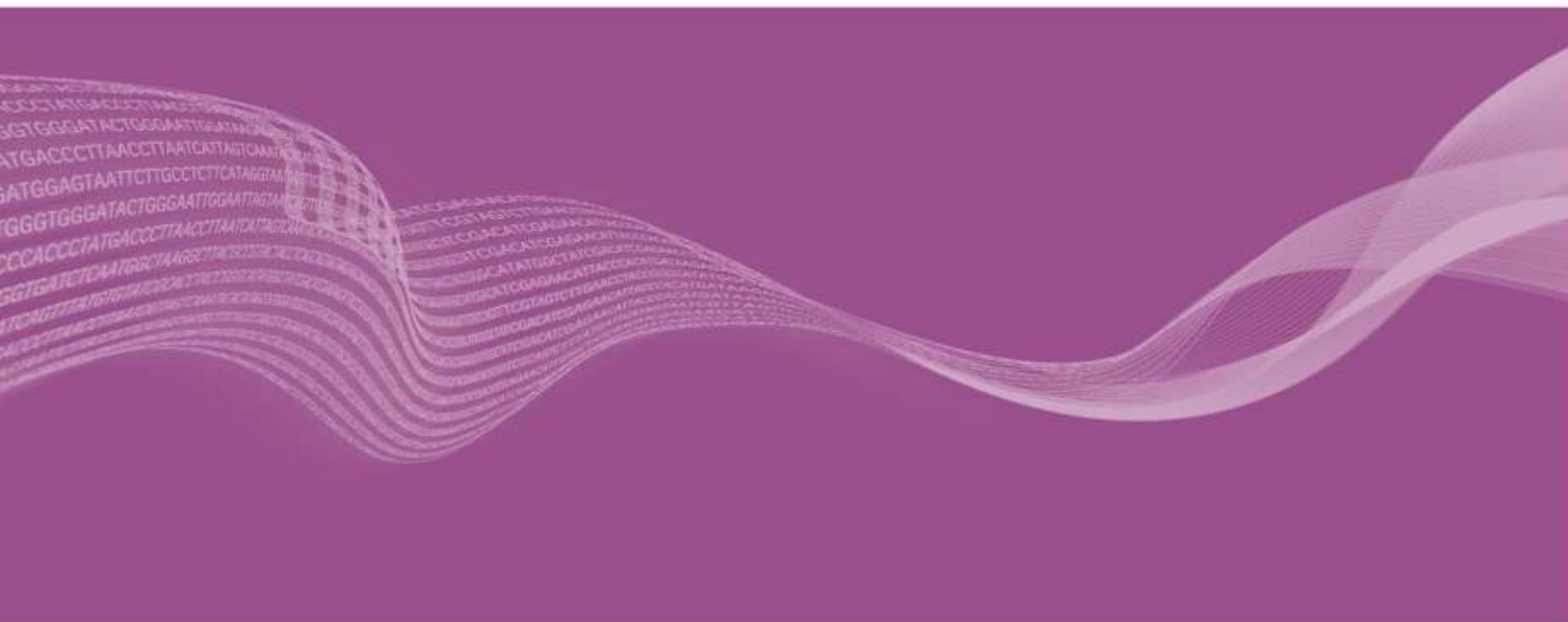
Illumina Stranded Total RNA
平均長 : ~375 – 475 bp



<定量>

2 μ l をQubit dsDNA BR Assay Kit で定量 (qPCR定量も可)

ILLUMINA Stranded Total RNA Prepのワークフロー



Ribo-Zero 製品の対応表

製品名	カタログ番号 (サンプル数)	ヒト/マウス/ラット 細胞質 rRNA	ヒトミトコン ドリア rRNA	ヒトβグロビン 転写産物	植物 rRNA	バクテリア rRNA
TruSeq Stranded total RNA, Human/Mouse/Rat	20020596 (48) 20020597 (96)	✓				
TruSeq Stranded total RNA, Gold	20020598 (48) 20020599 (96)	✓	✓			
TruSeq Stranded total RNA, Globin	20020612 (48) 20020613 (96)	✓	✓	✓		
TruSeq Stranded total RNA, Plant	20020610 (48) 20020611 (96)				✓	
TruSeq Stranded total RNA, Bacteria	販売終了					✓
NEW! Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus	20040525 (16) 20040529 (96)	✓	✓	✓		✓

Illumina Stranded Total RNAの必要準備品： ライブラリー調製試薬＋インデックス

Total RNA

ライブラリー調製試薬

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20040525	Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 Samples)	263,900円
20040529	Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 Samples)	1,414,500円

インデックスキット (10 bp のUnique Dual (UD) Index)

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20040553	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	107,600円
20040554	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	107,600円
*	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set C, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	*
*	IDT for Illumina® RNA UD Indexes Set D, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	*

* 近日販売開始予定

2020年11月の価格となります

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



Illumina Stranded Total RNA インプットRNAの準備

Total RNA

RNA抽出に指定のキットはないが、DNase処理を含める。

(定量に影響するため。また、残存DNAはライブラリー化されてしまう。)

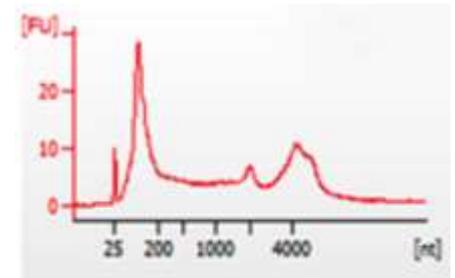
- ・ Agilent 2100 Bioanalyzer、もしくは同等品を使用し、RNAの分解度を確認

(A) 高品質RNA : RIN* ≥ 9

(B) 分解のあるRNA、もしくはFFPE由来RNA : DV₂₀₀ $\geq 55\%$**

* RIN (RNA Integrity Number) = RNA分解度の指標

** DV₂₀₀ = 200 塩基以上の RNA フラグメントの比率



- ・ Qubit、もしくは同等品を使用し、RNAの定量

0.9~9.1 ng/ μ l のTotal RNA 11 μ l からのスタートが推奨 (10~100 ng)

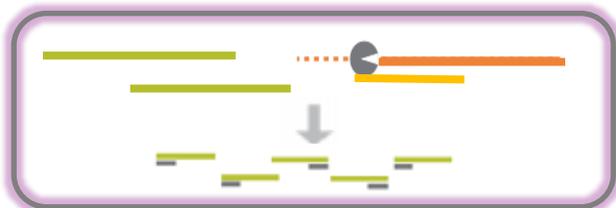
(A) 1~1000 ng も可 (0.09~91 ng/ μ l)

(B) 10~100 ng が必須

(B) の例: RIN 2.9 DV₂₀₀ = 55

Illumina Stranded Total RNA Prep Ligation with Ribo-Zero Plus のワークフロー

Total RNA



① リボソームRNAの除去とRNAの断片化



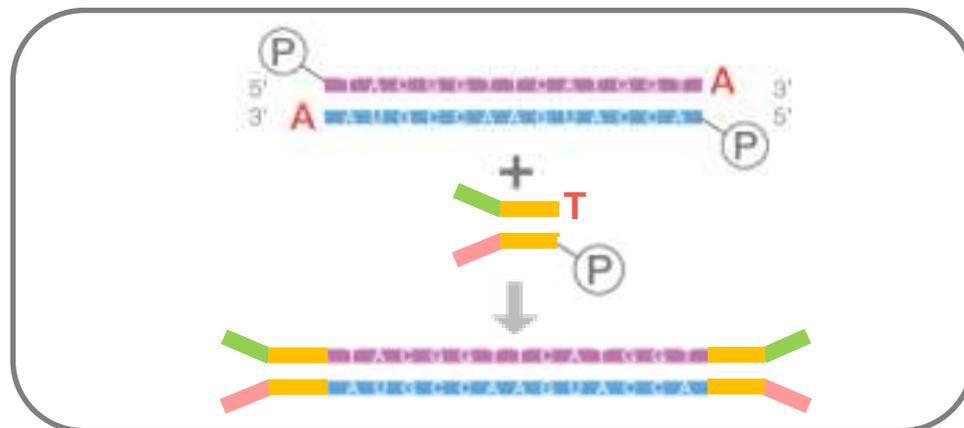
② ランダムプライマーを用いてcDNA合成



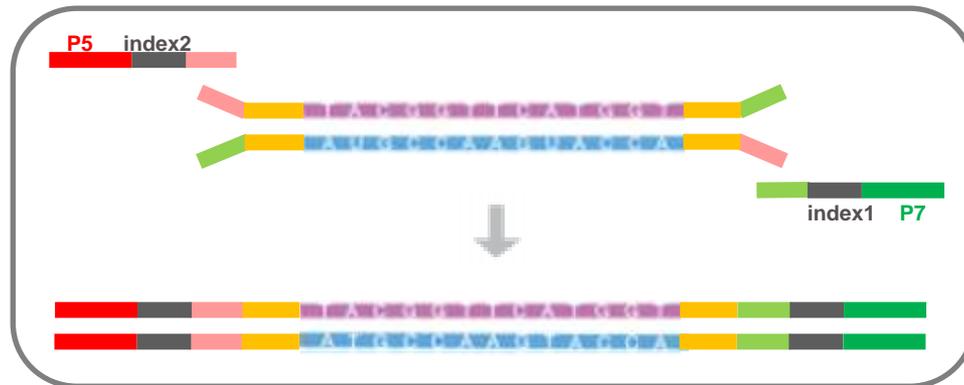
③ 2nd Strandの合成とリン酸化



④ A-Tailの付加



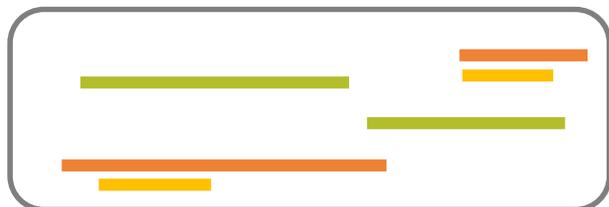
⑤ アンカー (UD indexの足場配列) のライゲーション



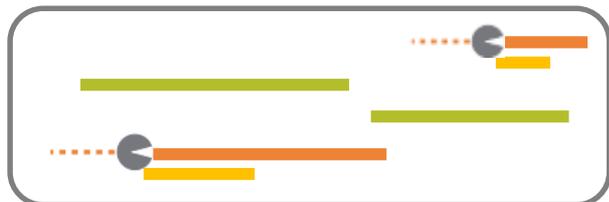
⑥ UD index でPCR (アダプターとインデックスの付加、およびライブラリーの増幅)

Ribo-Zero Plusのワークフロー

Total RNA



① DNAプローブの結合

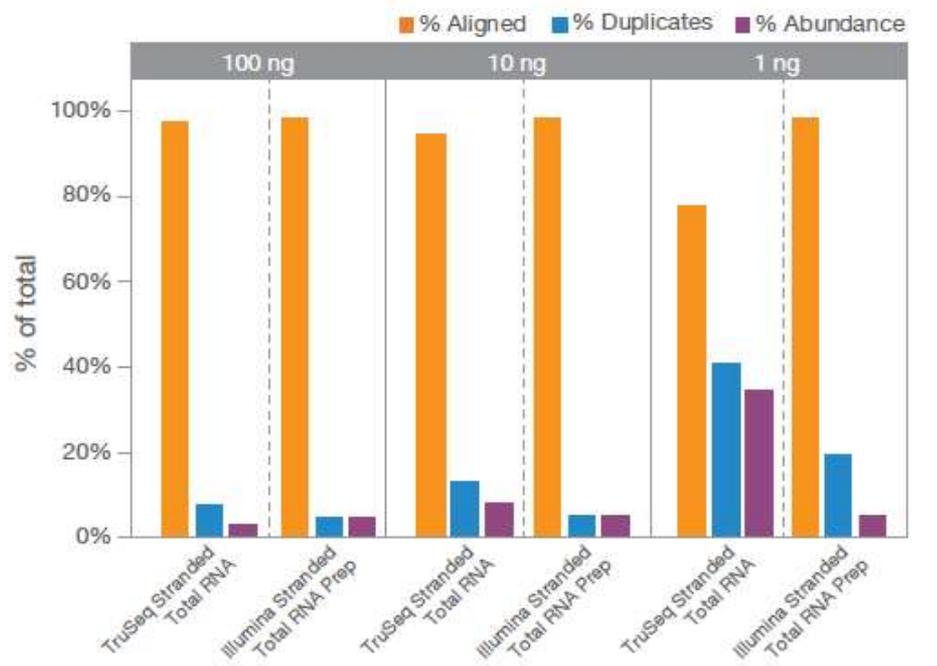


② プローブが結合したRNAを酵素で分解



③ DNAプローブの除去

ビーズの代わりに、酵素反応を用いることで、1つのチューブ内で対象RNAの除去が完結。ロスがないため、少量のRNAから高品質のデータが得られる。



Data Sheet :

[Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero™ Plus](#)

[Microbial RNA sequencing enabled with the Illumina Ribo-Zero™ Plus rRNA Depletion Kit](#)

Illumina Stranded Total RNA

Step 1 : rRNAの除去と断片化①

Total RNA

(1) 11 μl の Total RNA (0.9~9.1 ng/ μl) に **Hybridize Probe Master Mix** を4 μl 加える。

高品質RNAの場合: 0.09~91 ng/ μl



Hybridize Probe Master Mix (1x)	
● Depletion Probe Buffer (DB1)	3.6 μl
● Depletion Probe Pool (DP1)	1.2 μl
Total	4.8 μl

プログラム名 : HYB_DP1 (Lid 温度 : 100°C)
95°C, 2分
↓ 0.1 °C/secで37°Cまで下げる
37°C, hold

サーマルサークルのrampingの割合を設定。
ゆっくりと温度を下げるのがハイブリダイズに重要!

(2)(1) の反応液に **rRNA Depletion Master Mix** を5 μl ずつ加える。

プログラム名 : RNA_DEP (Lid 温度 : 100°C)
37°C, 15分
4°C, hold



rRNA Depletion Master Mix (1x)	
● RNA Depletion Buffer (RDB)	4.8 μl
● RNA Depletion Enzyme (RDE)	1.2 μl
Total	6.0 μl

Illumina Stranded Total RNA

Step 1 : rRNAの除去と断片化②

Total RNA

(3) (2)の反応液に **Probe Removal Master Mix** を 10 μ l ずつ加える。

プログラム名 : PRB_REM (Lid 温度 : 100°C)

37°C, 15分

70°C, 15分

4°C, hold



Probe Removal Master Mix	(1x)
● Probe Removal Buffer (PRB)	7.7 μ l
● Probe Removal Enzyme (PRE)	3.3 μ l
Total	11.0 μ l

(4) 60 μ l RNAClean XPを加え、精製。

(5) 10.5 μ l Elution buffer (ELB)を加え溶出。 8.5 μ l の上清を回収。

(6) 8.5 μ l Elute, Prime, Fragment High Mix (EPH3) を加える。

プログラム名 : DEN_RNA (Lid 温度 : 100°C)

94°C, 2分

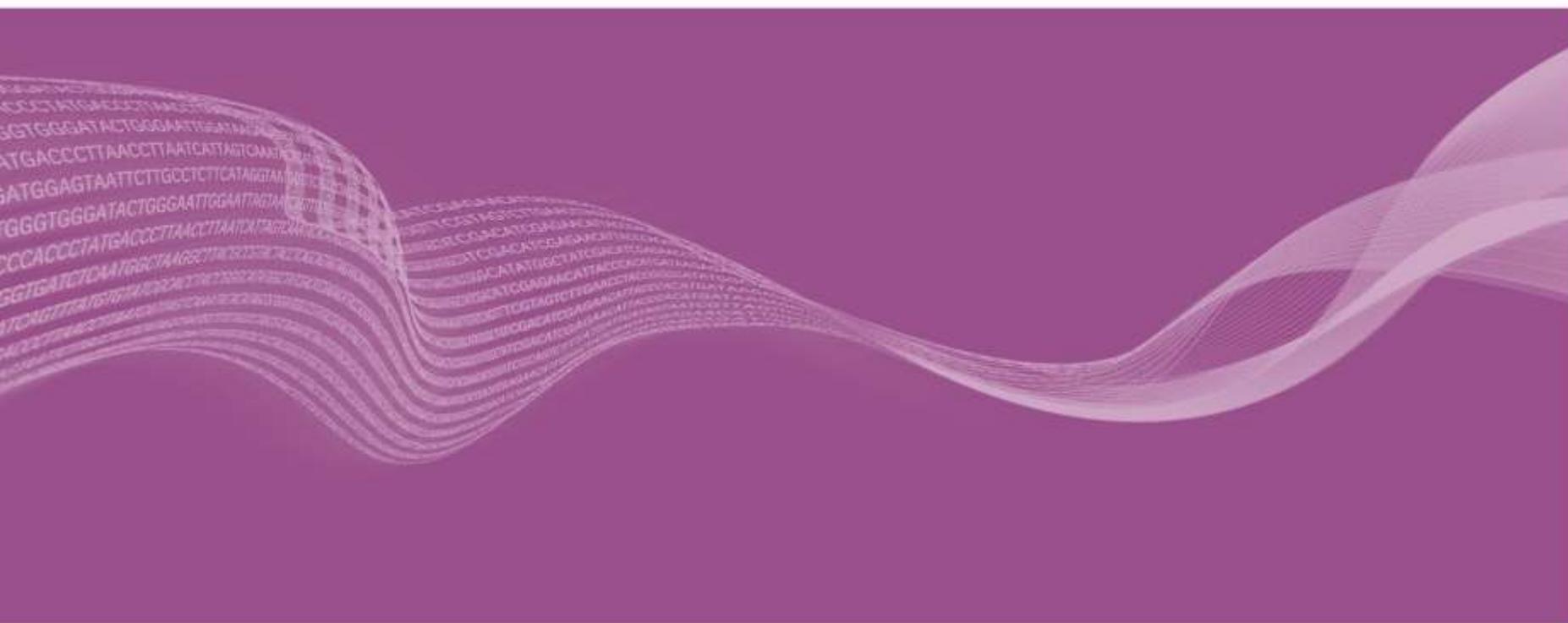
4°C, hold

2価の陽イオンと熱の働きでRNAを断片化

→すぐにStep2 : cDNA合成へ進む (16ページ)*

*Step 2からは、Illumina Stranded mRNAと共通ですので、本資料p.16-21をご覧ください

ILLUMINA Stranded mRNA/Total RNA ライブラリーの 注意点



新製品の主な変更点（既存ユーザー様向け）

TruSeq Stranded RNA → Illumina Stranded RNA

mRNA

Total RNA

Ribo Zero depletion
ビーズ → 酵素

アダプターの配列
TruSeq系 → 旧Nextera系

アダプター付加のワークフロー

- ① インデックス配列を含むアダプターをライゲーション
- ② 両端の配列でPCR

- ① アンカーをライゲーション
- ② インデックス配列を含むアダプターでPCR

逆転写酵素
別売り → キットに付属
(SuperScript II) (RVT)

AMPure XP ビーズ精製の処理時間
インキュベーション：15分 → 5分
風乾：15分 → 2分~

PCRのサイクル数
固定 → インプットの量に応じて変える
(15 cycles) (10~15 cycles)



illumina®

Illumina Stranded RNA の注意点 :

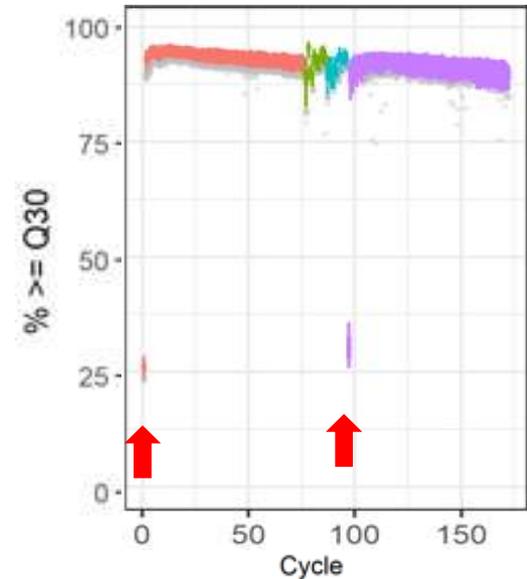
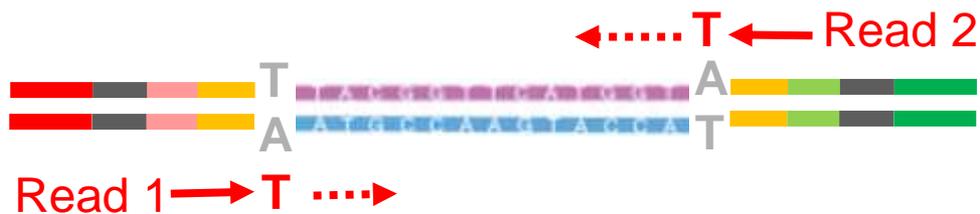
1塩基目にTが読まれる

mRNA

Total RNA

アダプターはタグメンテーションライブラリー系の配列だが、ライゲーションで付加するためインサートとアダプターの間にはT-オーバーハングが存在。

そのため、Read 1、およびRead 2の1塩基目にTが読まれる。



Read 1、Read 2の1サイクル目でQ30が低下するがラン全体には影響ない。

Illumina Stranded RNA の注意点 :

1塩基目のTのトリム方法 : bcl2fastq2, MSR, LRM

mRNA

Total RNA

Bcl2fastq2, MiSeq Reporter (MSR) の場合、
サンプルシートに右の設定を加える

(注) シングルリードの場合はRead1のみ

[Settings]

Read1StartFromCycle,2

Read2StartFromCycle,2

Local Run Manager (LRM) の場合、Module-specific Settingsから、
Advanced module settingsを開き、下記の設定を加える

Module-Specific Settings

i No module-specific settings available for the selected Library Prep Kit.

Show advanced module settings...

③

Read1StartFromCycle

2

Read2StartFromCycle

2

+ Add custom setting

②

(注) シングルリードの場合はRead1のみ

Illumina Stranded RNA の注意点 :

mRNA

1塩基目のTのトリム方法: BCL Convert, FASTQ Toolkit

Total RNA

BCL Convert の場合、サンプルシートにランの設定に応じて下記のオプションを加える

(例) 76+10+10+76 サイクルのラン

```
[BCLConvert_Settings]  
OverrideCycles,N1Y75;I10;I10;N1Y75
```

(例) 101+10+10+101 サイクルのラン

```
[BCLConvert_Settings]  
OverrideCycles,N1Y100;I10;I10;N1Y100
```

(注) Sample Sheet V1を使用する場合は [BCLConvert_Settings] を [Settings] に変更

FASTQ生成後にトリムする場合、BaseSpace Sequence Hub (BSSH) の **FASTQ Toolkit**を使用



Base Trimming

Bases can be trimmed from either the 5'- or 3'-end by specifying a number of bases for each end. Alternatively, bases can be trimmed from the 3'-end by specifying a maximum read length after trimming (e.g. to trim 150bp reads to 100bp reads).

Click to expand/hide base trimming settings

Trim reads from the 3'-end to this length

Trim reads at the 5'-end by n positions

1

Trim reads at the 3'-end by n positions

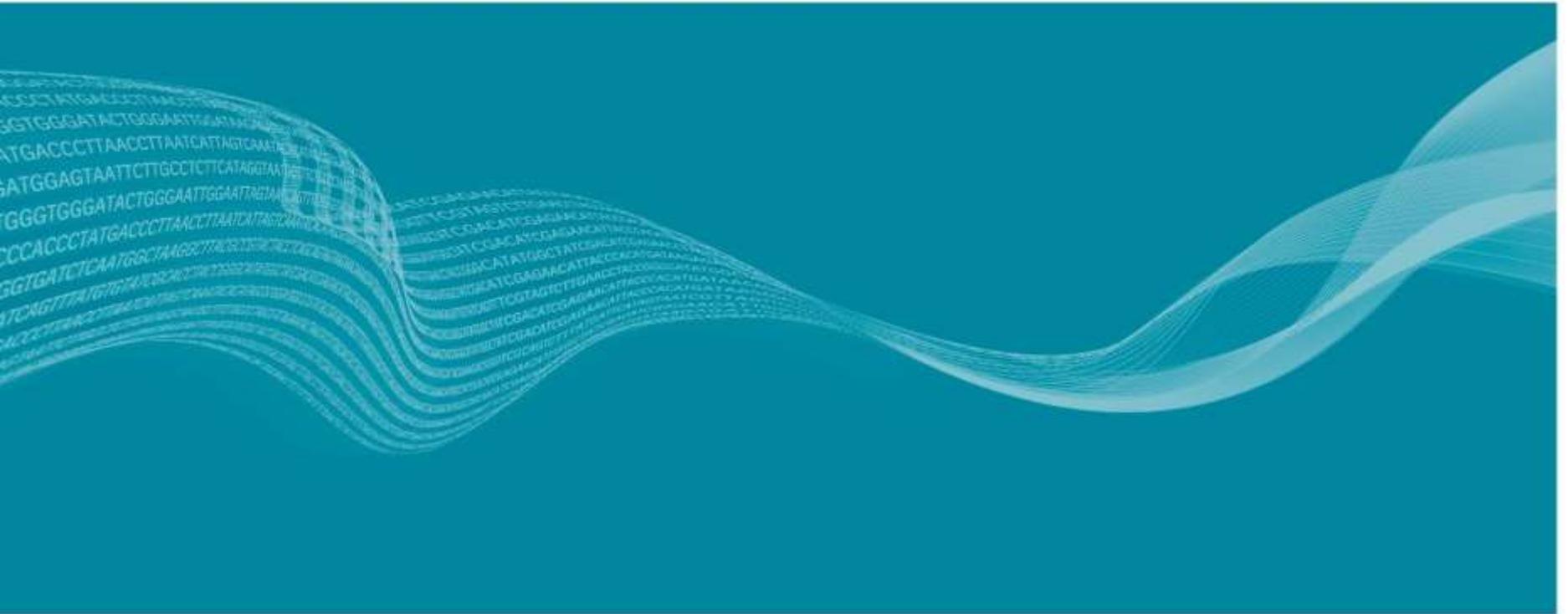
Illumina Stranded mRNA/Total RNA Prepの まとめ

mRNA

Total RNA

- 所要時間が約7時間に短縮、少量インプット、384 UD indexに対応
- mRNA Prepはoligo-dTビーズによるmRNAの精製、Total RNA Prepはプローブと酵素反応によるrRNAの除去からスタートし、cDNA合成以降のワークフローは共通
- ライブラリー作成は、アンカーのライゲーショント、UD indexを用いたPCRにより行う
- 1塩基目にT-オーバーハングが読まれるので、ラン後にトリムを行う

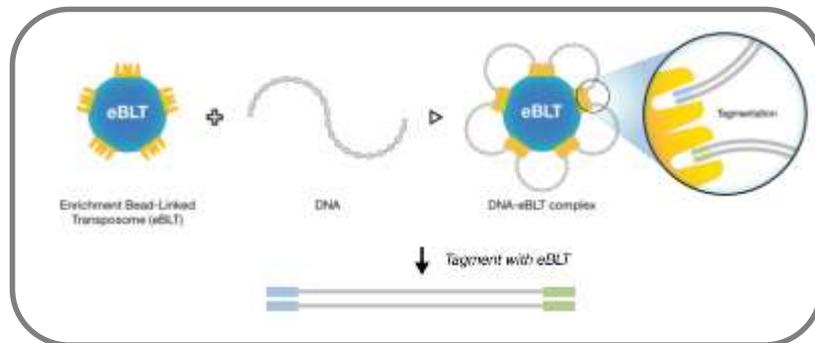
ILLUMINA RNA Prep with Enrichmentの ワークフロー



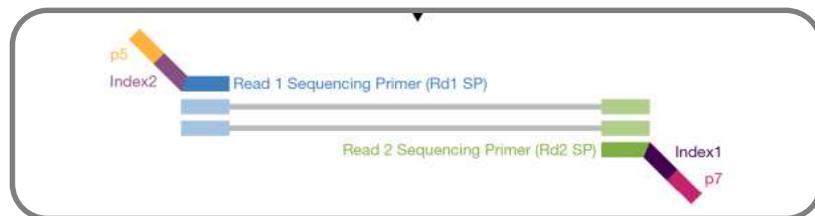
Illumina RNA Prep with Enrichment

(L) Tagmentation のワークフロー

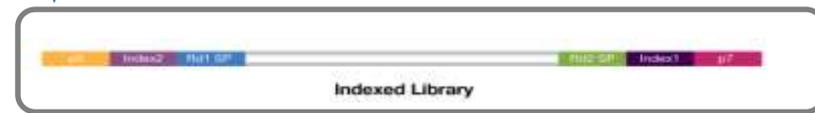
① cDNA合成



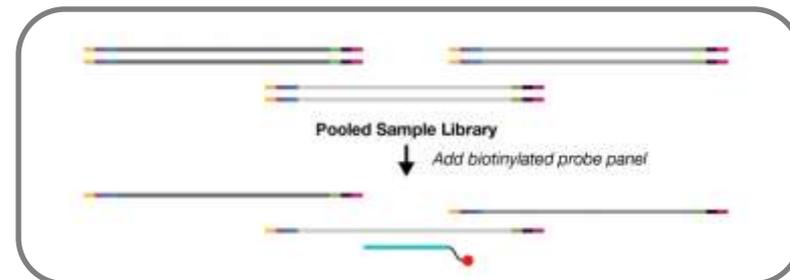
② cDNAの断片化とタグメンテーション



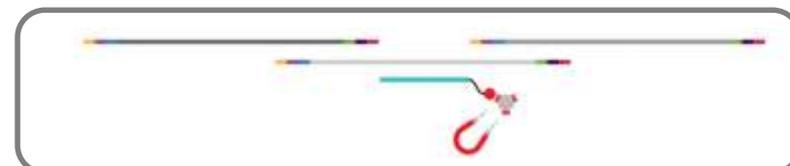
③ PCRによるインデックスアダプターの付加



④ ライブラリーの定量、プール



⑤ パネルプローブのハイブリダイゼーション



⑥ ビーズによるプローブ結合ライブラリーの濃縮



⑦ PCRによる濃縮ライブラリーの増幅

Illumina RNA Prep with Enrichment :

Enrichment

ライブラリー調製試薬+インデックス+パネル

ライブラリー調製試薬

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20040536	Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 Samples)	461,200円
20040537	Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 Samples)	1,768,100円

インデックスキット (10 bp のUnique Dual (UD) インデックス)

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20027213	IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	107,600円
20027214	IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	107,600円
*	IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation	*
*	IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation	*

オリゴパネル (イルミナで検証されているパネルは下記の2製品)

* 近日販売開始予定

カタログ番号	製品名	希望販売価格
20020183	Exome Panel (45 Mb) (32 reactions)	275,400円
20044311	Respiratory Virus Oligos Panel V2 (32 reactions)	92,300円

2020年11月の価格となります

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

illumina

Illumina RNA Prep with Enrichment

インプットRNAの準備

RNA抽出に指定のキットはないが、DNase処理を含める。
(定量に影響するため。)

- ・ Agilent 2100 Bioanalyzer、もしくは同等品を使用し、RNAの分解度を確認
(A) fresh/frozen 検体由来RNA : $DV_{200} \geq 80\%$
(B) FFPE 検体由来RNA : $DV_{200} \geq 36.5\%$

* DV_{200} = 200 塩基以上の RNA フラグメントの比率

- ・ Qubit、もしくは同等品を使用し、RNAの定量
(A) 1.2~11.8 ng/ μ l のTotal RNA 8.5 μ l が必要 (10~100 ng)
(B) 2.4~11.8 ng/ μ l のTotal RNA 8.5 μ l が必要 (20~100 ng)

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 1 : RNAの断片化とcDNA合成①

(1) RNAとEHP3を混合

Total RNA (1.2~11.8 ng/μl)	8.5 μl
Elute, Prime, Fragment High Mix (EPH3)	8.5 μl
Total	17 μl

プログラム名 : DEN_RNA (Lid 温度 : 100°C)

94°C, 2 分

4°C, hold



2価の陽イオンと熱の働きでRNAを断片化

(2) (1)の反応液17 μlに、**First Strand Synthesis Master Mix**を8 μlを加える。

プログラム名 : FSS (Lid 温度 : 100°C)

25°C, 10 分

42°C, 15 分

70°C, 15 分

4°C, hold



First Strand Synthesis Master Mix	(1 x)
First Strand Synthesis Act D Mix (FSA)	9 μl
Reverse Transcriptase (RVT)	1 μl
Total	10 μl

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 1 : RNAの断片化とcDNA合成②

(3) (2)の一本鎖cDNAにSecond Strand Marking Mix (SMM) を
25 μ l 加える。



プログラム名 : SSS (Lid 温度 : 40°C)
16°C, 60分
16°C, hold

Lidの温度に注意！ 100°Cでは
酵素が失活してしまいます。

(4) 90 μ l AMPure XPを加え、精製。

ビーズは使用前に室温に戻し
vortexで十分に懸濁する

(5) 19.5 μ l Resuspension Buffer (RSB)を加え、溶出。

(6) 17.5 μ l の上清を回収。

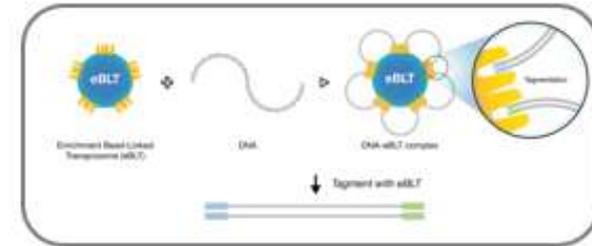
SAFE STOPPING POINT
-20°Cで7日間まで保存可能

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 2 : タグメンテーション

Enrichment

- (1) Step1の上清17.5 μ l に **Tagmentation Master Mix** を 32.5 μ l 加える。



プログラム名 : TAG program
(Lid 温度 : **100°C**)
55°C, 5 分
10°C, hold

Tagmentation Master Mix	(1x)
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	11.5 μ l
Enrichment Bead-Linked Transposomes (EBLTL)	11.5 μ l
Nuclease-free ultrapure water	14.5 μ l
Total	37.5 μ l

- (2) 室温に2分置く。

- (3) Stop Tagment Buffer 2 (ST2) 10 μ l を添加し、プレートにシールをして攪拌 (2200 rpm, 1分) した後、室温に5分置く。

- (4) マグネットスタンドにセットし、100 μ l の TWB buffer で3回ウォッシュ。

TWBは泡立ちやすいので
ピペティングは慎重に

→ ビーズの乾燥を防ぐために、最後のWashで上清を除かずに
プレートをマグネットスタンドに置いたまま次のステップへ

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 3 : インデックスアダプターの付加①

(1) PCR Master Mix を作成

PCR Master Mix (1x)

Enhanced PCR Mix (EPM)	23 μ l
Nuclease-free ultrapure water	23 μ l
Total	46 μl



(2) Step 2のプレートから上清を除く。

← 泡が残っていても問題ないのですぐ次に進む

(3) 乾燥させずに、すぐにPCR master Mix 40 μ lを加える。

(4) Index Adapters 10 μ lを加える。

(5) プレートにシールをして攪拌 (2200 rpm, 1分)。

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 3 : インデックスアダプターの付加②

(6) プログラム名 : TAG_PCR (Lid 温度 : 100°C)



98°C, 3 分

98°C, 20 秒

60°C, 30 秒

72°C, 1 分

72°C, 3 分

10°C, hold

Xサイクル

インプットRNAに応じてサイクル数を決定

- ・ High-quality RNA ($DV_{200} \geq 80$) : X=14
- ・ degraded RNA ($DV_{200} < 80$) : X=17

(7) マグネットスタンドに静置し、45 μ lの上清を新しいプレートに移す。

(8) 81 μ l AMPure XPを加え、精製。

(9) 17 μ l Resuspension Buffer (RSB)を加え、溶出。

(10) 15 μ lの上清を回収。

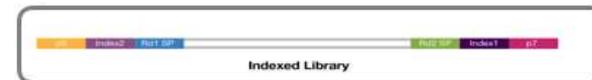
SAFE STOPPING POINT
-20°Cで30日間まで保存可能

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 4 : ライブラリーの定性、定量とプーリング

(1) ライブラリー1 μ lをQubitで定量。

期待される収量
> ~200 ng



(2) 【Optional】 ライブラリー1 μ lをBioanalyzer DNA 1000 Kitで定性。

(3) 定量結果に基づき希釈とプールを行う。

[Respiratory Virus Oligo Panel v2]

1-plex: 希釈せずに7.5 μ l を使用 (total: 収量により変動)

3-plex: 3ライブラリーを各200 ng、液量の合計が7.5 μ lになるようにプール(total: 600 ng)

[Exome panel、その他]

1-plex: 1ライブラリー200 ngを7.5 μ l に希釈 (total: 200 ng)

3-plex: 3ライブラリーを各200 ng、液量の合計が7.5 μ lになるようにプール (total: 600 ng)

液量の合計が7.5 μ lを超えてしまう場合 :

オプション1 : バキューム遠心機を使用

- ・ no heat、medium drying rateで行う

オプション2 : Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter unit (0.5 ml, 30 kDa)を使用

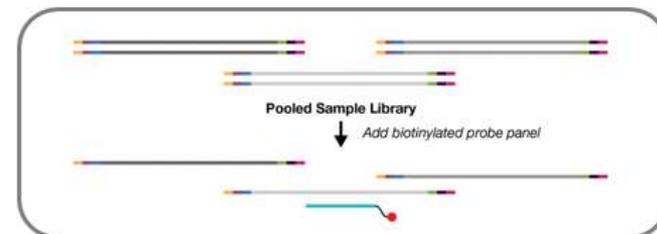
- ・ フィルターの事前のリンスは不要
- ・ 所要時間5分程度だが、液量によっては~30分かかる

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 5 : プローブのハイブリダイゼーション

(1) Step4 のライブラリー (1-plex / 3-plex) 7.5 μ l に
下記の試薬を順番に加える。

ライブラリー	7.5 μ l
① Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	12.5 μ l
② Enrichment oligos	2.5 μ l
③ Enrich Hyb Buffer 2 (EHB2)	2.5 μ l
Total	25.0 μl



(2) プログラム名 : HYB (Lid 温度 : 100°C)

95°C, 5 分

94°C, 1 分

92°C, 1 分

⋮

⋮

60°C, 1 分

58°C, 90 分

58°C, hold (24時間まで放置可能)

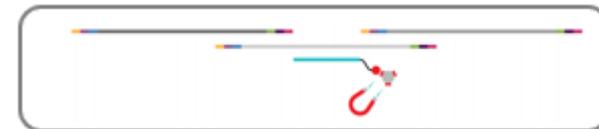
2°C下げて1分間反応を繰り返す。94°Cから60°Cまで18ステップ。

室温で解凍後、50°Cで5分加熱。
完全に透明になるまで、Vortexと
ピペティングを繰り返す。

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 6 : プローブ結合ライブラリーの濃縮

注意！ウォッシュ中の温度コントロールが非常に重要



前準備：

- ①EEWを58°Cに温めておく (Washが終わるまでEEWの温度キープ)
- ②**Elution Master Mix**の作成

Elution Master Mix	(1x)
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	28.5 μ l
HP3 (2 N NaOH)	1.5 μ l
Total	30.0 μ l

- ③サーマルサイクラーを設定：58°C, Hold (Volume 100 μ l, Lid 温度 **70°C**)
- ④SMBを室温に戻し、vortexで十分に懸濁

(1) ハイブリダイズ後のサンプル25 μ l にSMB 62.5 μ lを添加しピペットで丁寧に懸濁。

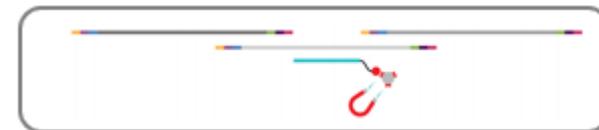
(2) 58°C, 15分インキュベーション。

(3) マグネットスタンドに移し、上清が透明になったら上清を捨てる。

→ビーズを乾かさず、EEWウォッシュに進む

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 6 : プローブ結合ライブラリーの濃縮



(4) EEWのウォッシュを4回行う :

- ① プレートをマグネットから外し、58°CのEEW 50 μ lを添加
- ② プレートをシールし、プレートシェーカーで攪拌
- ③ 58°Cで5分インキュベート
- ④ マグネットスタンドにセットし、上清が透明になったら上清を捨てる

1回目 : 2400 rpm, 4分
2~4回目 : 2000 rpm, 1分

(5) 完全に上清を取り除いた後、23 μ l **Elution Master Mix**を添加。

ビーズを乾かさな
ように手早く行う

(6) プレートをシールし、プレートシェーカーで攪拌 (2600 rpm, 1分)。

(7) 室温2分インキュベーション, マグネットスタンドにセット、21 μ lの上清を回収。

(8) 4 μ lのET2を添加。

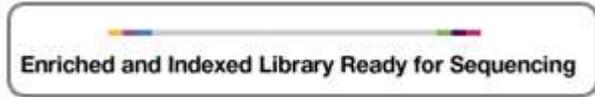
(9) プレートをシールし、プレートシェーカーで攪拌 (2000 rpm, 1分)。

SAFE STOPPING POINT
-20°Cで7日間まで保存可能

Illumina RNA Prep with Enrichment

Step 7 : PCRによる濃縮ライブラリーの増幅

- (1) Step 6 のライブラリー 25 μ l に、PPC 5 μ l と EPM 20 μ l をこの順に加える。



Enriched and Indexed Library Ready for Sequencing

プログラム名 : AMP (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

10°C, hold

14 cycles

SAFE STOPPING POINT :

10°C Holdで24時間、もしくは4°Cで2日間まで保存可能

- (3) 90 μ l AMPure XPを加え、精製。
- (4) 32 μ l Resuspension Buffer (RSB)を加え、溶出。
- (5) 30 μ l の上清を回収。

ライブラリー完成！

-20°Cで7日間まで保存可能

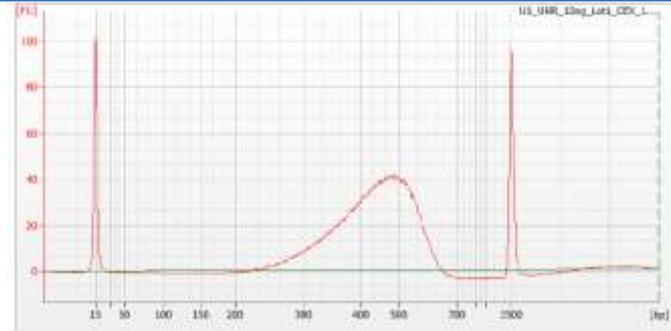
Illumina RNA Prep with Enrichment ライブラリーQC

Enrichment

<サイズ確認>

1 μ lをAgilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Kitで定性

平均長 : ~380 - 450 bp



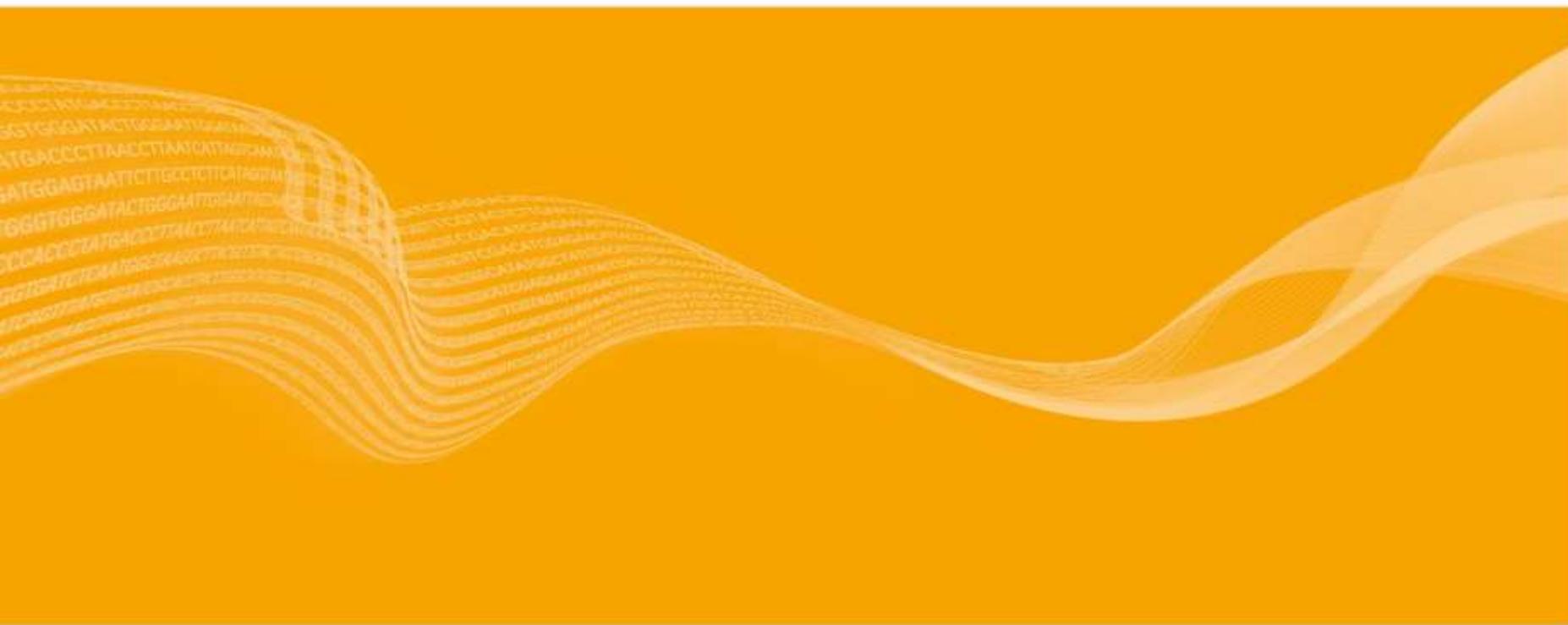
<定量>

1 μ l をQubit dsDNA BR Assay Kit で定量 (qPCR定量も可)

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment の まとめ

- 所要時間が約9時間に短縮、384 UD indexに対応
- Total RNAからのcDNA合成、ライブラリー作成、プローブパネルによる濃縮が一連のワークフローで完結
- ライブラリー作成は、タグメンテーション（トランスポソームによるcDNA断片化と足場配列の付加）と、UD indexを用いたPCRにより行う
- 濃縮反応は、温度コントロールと、ビーズを乾かさないうちに特に注意して行う

本日のまとめ



本日のまとめ

1. 新製品Illumina RNAシリーズは、所要時間の短縮を可能にし、少量インプットと384 UD indexに対応。
2. 実験を始める前に、解析に必要なサンプル数やデータ量を確認し、試料の準備から解析法まで具体的に計画する。
3. ライブラリー調製は必ずプロトコールに沿って行う。

Appendix :

ビーズハンドリングベストプラクティス

mRNA

Total RNA

Enrichment

- ・ 凍結してしまったものは使用不可
- ・ 粘性があるので、ゆっくりピペット操作を行う
- ・ 使用前に室温に戻す（30分以上）
- ・ 使用前に十分にvortexで懸濁する（30秒以上）
- ・ ウォッシュに使用する80% Ethanolは用事調整する
- ・ ビーズは乾かしすぎない

Appendix :

トラブルシューティングガイド

mRNA

Total RNA

Enrichment

- ・ライブラリー収量が極端に少ない。
 - スタートのインプットRNA量が想定より低かった可能性があるので再定量を行う。
 - RIN値が基準値以上であった可能性があるので、定性結果を確認する。
 - AMPureXP時に過度に風乾してしまった可能性。
 - 凍結・融解の繰り返しにより酵素が失活している可能性。
- ・130 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、ライブラリーと等量のAMPure XPで精製を行う。
- ・期待したライブラリーサイズとは別の位置にピークが見られる。
 - AMPure XPの添加量が正確でなかった可能性。
- ・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考えられるので、ライブラリーの再定量を行う。

Appendix : プーリングガイドとインデックス配列

mRNA

Total RNA

Enrichment

プーリングガイド (IDT for Illumina UD Indexesの項目参照)

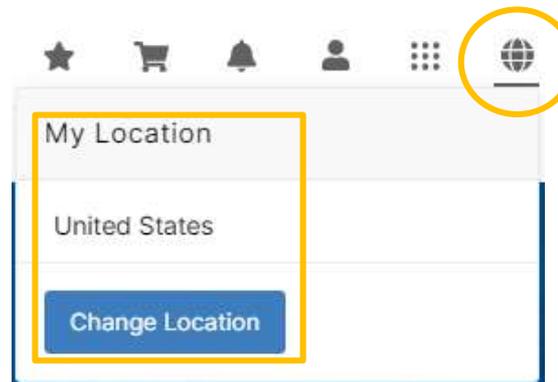
Index Adapters Pooling Guide :

<https://support.illumina.com/downloads/index-adapters-pooling-guide-1000000041074.html>

各インデックスの配列 (IDT for Illumina UD Indexes の項目参照)

Illumina Adapter Sequences Document :

<https://support.illumina.com/downloads/illumina-adapter-sequences-document-1000000002694.html>



リンク先が表示されない場合、画面右上のアイコンをクリックし、My LocationをUnited Statesにご変更下さい。

Appendix:

ILLUMINA Stranded mRNA Prep Ligation の資料

製品ページ

<https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-mrna-prep.html>

リファレンスガイド（日本語版あり） ・ 準備品リスト等

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/illumina-stranded-mrna-ligation/documentation.html

FAQ

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/illumina-stranded-mrna-ligation/questions.html

Illumina Stranded mRNAの必要準備品： 試薬消耗品

mRNA

製品名	製造販売元	型番	備考
Agencourt AMPureXP, 60 ml	Beckman Coulter	A63881	約340サンプル分
Ethanol (absolute) for molecular biology	Sigma Aldrich	E7023	同等品可
Nuclease free water	メーカー指定なし		
1.7 ml チューブ (RNase-free)	メーカー指定なし		
フィルター付きピペットチップ (20, 200, 1000 ul)	メーカー指定なし		マイクロピペット推奨品
96-well PCRプレート	Fisher Scientific VWR	E951020303 47744-106	推奨外のサーマルサイクラーを使用する場合、その推奨品
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad	MSB-1001	推奨外のサーマルサイクラーを使用する場合、その推奨品
コニカルチューブ (15 ml or 50 ml)	メーカー指定なし		
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies	5067-1504	
Disposable Pipetting Reservoir (RNase/DNase-free)	VWR	89094-658	同等品可

llumina Stranded mRNAの必要準備品： 機器

mRNA

製品名	製造販売元	型番	備考
マイクロピペット（シングル） 20, 200, 1000 ul	メーカー指定なし		
マイクロピペット（8連） 20, 200 ul	メーカー指定なし		
マイクロプレート遠心機	メーカー指定なし		
遠心機	メーカー指定なし		
Vortexミキサー	メーカー指定なし		
Qubit Fluorometer 4.0	Thermo Fisher	Q33226	同等品可
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2940CA	同等品可
マグネットスタンド ・ DynaMag-96 Side Magnet ・ Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Thermo Fisher	12331D AM10027	【Shaking workflow】の場合 【Pipette workflow】の場合
BioShake iQ + PCR plate adapter	Q Instruments	1808-0506 1808-1041	【Shaking workflow】のみで 使用
サーマルサイクラー ・ Bio-Rad C1000 Touch ・ T100	Bio-Rad Bio-Rad	1851196 AM10027	Heat Lid 機能 (40°C/100°C) が必要

Appendix:

ILLUMINA STRANDED ILLUMINA STRANDED TOTAL RNA PREP LIGATION WITH RIBO-ZERO PLUS の資料

製品ページ

<https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.html>

リファレンスガイド（日本語版あり） ・ 準備品リスト等

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/illumina-stranded-total-rna-ligation-ribo-zero-plus/documentation.html

FAQ

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/illumina-stranded-total-rna-ligation-ribo-zero-plus/questions.html

ILLUMINA Stranded Total RNAの必要準備品 : Total RNA 試薬消耗品

製品名	製造販売元	型番	備考
Agencourt RNAClean XP, 40 ml	Beckman Coulter	A63987	約650サンプル分
Agencourt AMPureXP, 60 ml	Beckman Coulter	A63881	約340サンプル分
Ethanol (absolute) for molecular biology	Sigma Aldrich	E7023	同等品可
Nuclease free water	メーカー指定なし		
1.7 ml チューブ(RNase-free)	メーカー指定なし		
フィルター付きピペットチップ (20, 200, 1000 ul)	メーカー指定なし		マイクロピペット推奨品
96-well PCRプレート	Fisher Scientific VWR	E951020303 47744-106	推奨外のサーマルサイクラー を使用する場合、その推奨品
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad	MSB-1001	推奨外のサーマルサイクラー を使用する場合、その推奨品
コニカルチューブ(15 ml or 50 ml)	メーカー指定なし		
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies	5067-1504	
Disposable Pipetting Reservoir (RNase/DNase-free)	VWR	89094-658	同等品可

ILLUMINA Stranded Total RNAの必要準備品 : Total RNA 機器

製品名	製造販売元	型番	備考
マイクロピペット (シングル) 20, 200, 1000 ul	メーカー指定なし		
マイクロピペット (8連) 20, 200 ul	メーカー指定なし		
マイクロプレート遠心機	メーカー指定なし		
遠心機	メーカー指定なし		
Vortexミキサー	メーカー指定なし		
Qubit Fluorometer 4.0	Thermo Fisher	Q33226	同等品可
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2940CA	同等品可
マグネットスタンド ・ DynaMag-96 Side Magnet ・ Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Thermo Fisher	12331D AM10027	【Shaking workflow】の場合 【Pipette workflow】の場合
BioShake iQ + PCR plate adapter	Q Instruments	1808-0506 1808-1041	【Shaking workflow】のみで 使用
サーマルサイクラー ・ Bio-Rad C1000 Touch ・ T100	Bio-Rad	1851196 AM10027	Heat Lid 機能 (40°C/100°C) Ramp 機能 (0.1°C/sec)が必要

Appendix:

ILLUMINA RNA Prep with Enrichment の資料

製品ページ

<https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html>

リファレンスガイド（日本語版あり） ・ 準備品リスト等

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/illumina-rna-enrichment-l-tagmentation/documentation.html

FAQ

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/illumina-rna-enrichment-l-tagmentation/faqs.html

ILLUMINA RNA Prep with Enrichmentの 必要準備品：試薬消耗品

Enrichment

製品名	製造販売元	型番	備考
Agencourt AMPureXP, 5 ml	Beckman Coulter	A63880	約19サンプル分
Ethanol (absolute) for molecular biology	Sigma Aldrich	E7023	同等品可
Nuclease free water	メーカー指定なし		
1.7 ml チューブ(RNase-free)	メーカー指定なし		
フィルター付きピペットチップ (10, 20, 200, 1000 ul)	メーカー指定なし		マイクロピペット推奨品
96-well PCRプレート	Fisher Scientific VWR	E951020303 47744-106	推奨外のサーマルサイクラー を使用する場合、その推奨品
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad	MSB-1001	推奨外のサーマルサイクラー を使用する場合、その推奨品
コニカルチューブ (15 ml or 50 ml)	メーカー指定なし		
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies	5067-1504	
Disposable Pipetting Reservoir (RNase/DNase-free)	VWR	89094-658	同等品可

ILLUMINA RNA Prep with Enrichmentの 必要準備品：機器

Enrichment

製品名	製造販売元	型番	備考
マイクロピペット（シングル） 10, 20, 200, 1000 ul	メーカー指定なし		
マイクロピペット（8連） 10, 20, 200 ul	メーカー指定なし		
マイクロプレート遠心機	メーカー指定なし		
遠心機	メーカー指定なし		
Vortexミキサー	メーカー指定なし		
Qubit Fluorometer 4.0	Thermo Fisher	Q33226	同等品可
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2940CA	同等品可
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher	AM10027	
プレートシェーカー ・ BioShake iQ ・ BioShake XP	Thermo Fisher	1808-0506 1808-0505	
Bio-Rad C1000 Touch with 96- Deep Well Reaction Module	Bio-Rad	1851197	Heat Lid 機能 (40°C/70°C) が必要

ご清聴ありがとうございました。

