GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit
(Code No. RMD-101, RMD-101T)

NSR Primer Set for human
(Code No. NSR-101)

NSR Primer Set for mouse
(Code No. NSR-102)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

—目次—

[1] はじめに・・・

[1] はじめに

RamDA-seq® Single Cell Kit は、シングルセルや微量の RNA から次世代シーケンス解析(NGS)用のライブラリー調製を行うための cDNA 合成キットです。本キットをご使用いただくことで、RNA 全長をカバーした解析のための cDNA を調製できます。

本キットでは、国立研究開発法人理化学研究所で開発された、Reverse Transcription with Random Displacement Amplification(RT-RamDA®) 法[参考文献(1)]を採用しています。RT-RamDA®法は、ランダムプライマーと逆転写酵素の鎖置換活性を利用した新規 cDNA 増幅方法であり、poly(A) RNA に加え、non-poly(A) RNA 由来の cDNA を高感度に検出します。このため RT-RamDA®法を用いて調製したライブラリは、従来技術に比べ、検出遺伝子数が多いことが特長です。

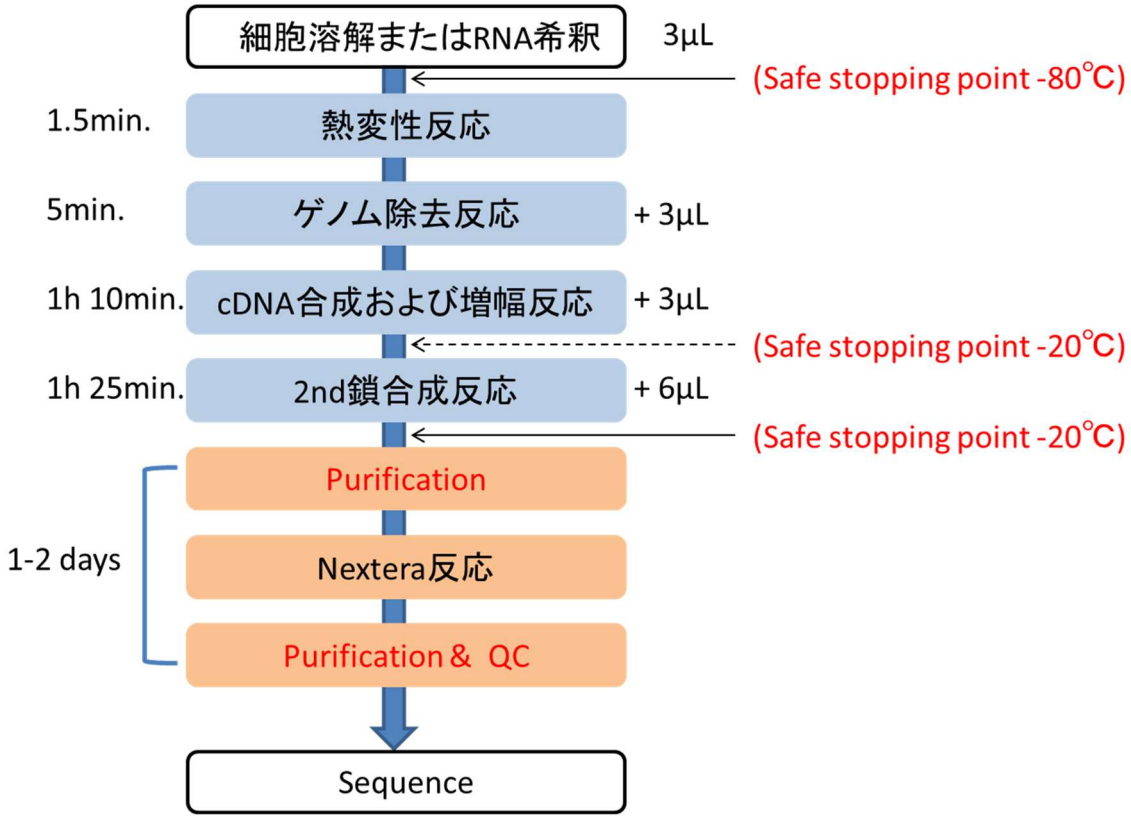


図 1. 本キットのワークフロー

各ステップの反応時間と反応液の添加量、作業を休止いただく際の作業休止ポイントを示します。本キットには、ワークフロー中の Purification、Nextera 反応に使用する、磁性ビーズ、ライブラリ調製試薬を含みません。「[3] 製品のほかに用意するもの」(p.4)を参照し、ご用意ください。

◆本キットの特長◆

1. シングルセルや微量 RNA から cDNA 調製可能
サンプルとして、1～100 細胞 または 10pg~1ng total RNA に対応

2. RNA 全長をカバーした解析が可能
10kb 以上のターゲット RNA の全長をリードでカバーできる cDNA を調製可能

3. 様々な種類の RNA を検出可能、従来技術より検出遺伝子数がアップ
Poly(A) RNA の解析以外にも様々な RNA の解析にご利用いただけます。
◇アイソフォームや選択的スプライシングの同定
◇poly(A) RNA や non-poly(A) RNA (ヒストン RNA や lncRNA)の検出
◇核内 RNA(pre-mRNA や lncRNA)の検出

[2] 製品内容

本キットには、以下の試薬が含まれております。試薬は-20℃で保存してください。

RamDA-seq® Single Cell Kit (Code:RMD-101,RMD-101T)

試薬名	保存	容量(RMD-101)	容量(RMD-101T)
①Lysis Buffer	-20℃	480μL	120μL
②Lysis Enhancer	-20℃	108μL	27μL
③RNase Inhibitor	-20℃	22μL	6μL
④Nuclease free water	-20℃	960μL	240μL
⑤RT-RamDA® Buffer	-20℃	240μL	60μL
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	-20℃	54μL	14μL
⑦RT-RamDA® Primer Mix	-20℃	54μL	14μL
⑧gDNA Remover	-20℃	54μL	14μL
⑨2nd strand synthesis Buffer	-20℃	330μL	83μL
⑩2nd strand synthesis Enzyme	-20℃	55μL	14μL
⑪2nd strand synthesis Primer Mix	-20℃	275μL	69μL

—注意事項—

本キットに含まれる試薬の中には、弊社より販売している別キット、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Kit (Code: RML-101)、QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit (Code: RMQ-101)などと名称が同一の試薬が含まれますが、別キットによる試薬の代替はできませんのでご注意ください。

本キットでは微量のサンプルから cDNA の増幅、ライブラリー調製を行うため、作業工程中で環境中の DNA などが混入すると、実験結果が著しく損なわれる可能性があります。清浄度の高い部屋で作業を行うなど、コンタミネーション対策には十分注意してください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本キットのほかに、以下の機器・試薬類をご用意ください。

・ サーマルサイクラー、またはインキュベーター
ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

・ 磁性ビーズ
Agencourt AMPure XP 試薬（Beckman Coulter、カタログ番号：A63880、A63881 等）を推奨いたします。ご使用にあたっては試薬の取扱説明書に従ってください。

・ 磁気スタンド
磁性ビーズを用いた精製の際に使用します。
磁気スタンドにはマグネットプレート BiT-Mag96(サンプラテック 品番：30550)がお使いいただけます。

・ 80%エタノール
磁性ビーズを用いた精製の際の洗浄液として使用します。

・ ライブラリー調製試薬
Illumina 株式会社 Nextera™ XT DNA Sample Kit をご使用ください。

製品名	カタログ番号
Nextera XT DNA Library Preparation Kit (24 samples)	FC-131-1024
Nextera XT DNA Library Preparation Kit (96 samples)	FC-131-1096

また上記キットに対応したインデックス付 PCR プライマーをご使用ください。

・ NSR プライマー
本キットでは、NSR Primer Set for human (Code: NSR-101)または NSR Primer Set for mouse (Code:NSR-102)を使用することができます。

NSR Primer Set for human (Code: NSR-101)

1st NSR Primer Mix for human	-20℃	54μL
2nd NSR Primer Mix for human	-20℃	275μL

NSR Primer Set for mouse (Code: NSR-102)

1st NSR Primer Mix for mouse	-20℃	54μL
2nd NSR Primer Mix for mouse	-20℃	275μL

・ TE Buffer（10mM Tris 1mM EDTA）pH8.0
ライブラリー調製時に DNA の溶出に使用します。水での代用はできません。

以下の消耗品は動作確認済みとなります。

チューブ及びキャップ	メーカー	カタログ番号
UC,EU Optical wide area 8-cap strip, Robust while flexible,with wide indented flat cap	Nippon genetics /BIOplastics	BPB79701-1 /BPB79701-1
RP,UC,SFGC,Extra Robust,Fits shell Frame Grids (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPK69901/ K69901

96 well プレート及びシール	メーカー	カタログ番号
RP,LF,SEMI k,cuttable,96 well plate (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPB50651/ B50651
EU Optical wide area 96 cap plate with wide area indented flat caps	Nippon genetics /BIOplastics	BPB57601/ B57601

マグネットスタンド	メーカー	カタログ番号
Magna Stand for 8-well tube preparation	Nippon genetics	FG-SSMAG2
BiT-Mag96	サンプラテック	30550

[4] 使用方法

・ 全ステップにおいて、試薬の添加後はピペットやミキサー、タッピング等で十分に攪拌を行ってください。
【参考】
試薬添加→遠心→攪拌（ミキサー: 2000 rpm、4℃、1 min）→遠心
試薬添加→攪拌（ピペッティング: 20 回 on ice）→遠心　　など

・ 本キットは、サンプルとして、細胞、または total RNA から、ライブラリー調製のための cDNA を合成することができます。
ご使用になるサンプルに合わせて、下表に示すセクション 1.A～B のいずれかの「細胞溶解／RNA 希釈」を行った後、「熱変性」以降の操作に進んでください。

サンプル		細胞溶解 / RNA 希釈	熱変性
細胞	FACS による細胞取得	セクション 1. A (p.6)	セクション 2 (p.10)
	FACS 以外による細胞取得	セクション 1. B (p.7)	
Total RNA		セクション 1. C (p.9)	

1. 細胞溶解／RNA 希釈（Cell lysis or RNA dilution）

A. FACS を用いて細胞取得を行う場合

(1) 細胞溶解に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に、必要量より余分量をみて調製してください。

細胞溶解液の調製

	1 反応(μL)	20 反応(μL)※	100 反応(μL)※
①Lysis Buffer	2	44	220
②Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④Nuclease free water	0.5	11	55
Total	3	66	330

※余分量を 10%とした場合

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに、細胞溶解液を 1well あたり 3μL 分注します。分注は氷上で行い、分注後すぐに qPCR 用シールや熱圧着式シールにてシーリングを行ってください。 ソーティングまで、プレートを氷上または 4℃で保管します。

(3) ご使用の FACS の取扱説明書やメーカーが推奨するパラメーターに従い、細胞溶解液を分注したプレートに細胞のソーティングを実施してください。

(4) ソーティング後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(5) その後、すみやかに次のステップに進むか、－80℃でサンプルを保管してください。

B. FACS 以外で細胞取得を行う場合

1 サンプルあたり、細胞溶解サンプル 3μL を調製します。マニュアルピッキングなどで細胞を分取する際は、細胞溶解液 2.5μL に 0.5μL の細胞サンプルを添加します。

(1) 以下を参考に細胞溶解液をチューブに調製します。（細胞サンプルが 0.5μL 未満の場合、細胞溶解液に Nuclease free water を加え、調整してください）

細胞溶解液の調製
例) 細胞サンプルの液量が 0.5μL の場合

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
① Lysis Buffer	2	44	220
② Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③ RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
Total	2.5	55	275

※余分量を 10%とした場合

例) 細胞サンプルの液量が 0.5μL 未満(xμL)の場合

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
① Lysis Buffer	2	44	220
② Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③ RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④ Nuclease free water	0.5-x	(1-x)X22	(1-x)X110
Total	3-x	(3-x)X22	(3-x)X110

※余分量を 10%とした場合

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに細胞溶解液を 1well あたり 2.5μL（細胞サンプルが 0.5μL 未満の場合は(3-x)μL）分注します。分注は氷上にて行い、分注後すぐにシーリングを行い、遠心してください。プレートは、細胞サンプルの添加まで氷上または 4℃にて保管してください。

(3) 細胞サンプルの添加までプレートを氷上または 4℃にて保管を行い、細胞サン

プル 0.5μL（細胞サンプルが 0.5μL 未満の場合は xμL）の添加を行ってください。

(4) 細胞サンプルの添加後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(5) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80℃にてサンプルを保管してください。

C. 精製済みの total RNA を使用する場合

次工程に total RNA を 10pg～1ng (3μL)インプットするため、RNA 溶液を調製します。RT-RamDA による増幅反応に必要になりますので、全てのパーツを用いて RNA 希釈液を調製してください。

(1) 以下を参考に予め RNA 希釈液を必要量チューブに調製し、その後 RNA 液を添加してください。（Nuclease free water の添加量を調整し、液量を 3μL/1 反応に合わせてください。またインプットする RNA の推奨量は 10pg~1ng 程度です。使用する RNA 液が高濃度の場合は、予め RNase フリーの滅菌水や TE 緩衝液で RNA 液を希釈してください。）
滅菌水や TE 緩衝液に RNA を溶解した場合、RNA 液を 0.5μL/1 反応までアプライできます。

RNA 溶液の調製

	1 反応(μL)
①Lysis Buffer	2
②Lysis Enhancer	0.45
③RNase Inhibitor	0.05
④Nuclease free water	1-x
RNA 液	x(~0.5)
Total	3

または RNA 希釈液を先に調製し、RNA を希釈することもできます。この場合、まず以下を参考に RNA 希釈液を必要量チューブに作製してください。この RNA の希釈液を用いて、3.3～333 pg/μL となるように RNA を希釈してください。
尚、希釈後の RNA 溶液中の RNA 希釈液が 90%以上となるように希釈してください。

RNA 希釈液の調製

	100 反応(μL) ※
①Lysis Buffer	220
②Lysis Enhancer	49.5
③RNase Inhibitor	5.5
④Nuclease free water	55
Total	330

※余分量を 10%とした場合

RNA 希釈例)

1ng Input を行う場合（333pg/μL total RNA 溶液）

	(μL)	RNA 希釈液 終濃度
10ng/μL total RNA	1	
RNA 希釈液	29	97%
Total	30	

10pg Input を行う場合（3.3pg/μL total RNA 溶液）

	(μL)	RNA 希釈液 終濃度
333pg/μL total RNA	1	
RNA 希釈液	99	99%
Total	100	

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに希釈した RNA 溶液を 1well あたり 3μL 分注します。

(3) 分注後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(4) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80℃にてサンプルを保管してください*。

*-80℃で保存する場合は、分注後の 3μL の状態で保存してください。低濃度の状態で長期間保存し再度分注を行う場合、チューブ等への吸着によりRNAをロスする恐れがあります。

2. 熱変性反応（Denature）

(1) 細胞溶解サンプルや RNA サンプルの分注されたプレートやチューブを 4℃にて遠心を行い、以下の温度でインキュベートしてください。

凍結サンプルを使用する場合は熱変性反応前に 4℃にて融解し、遠心した後に熱変性反応に進んでください。

熱変性反応

Step	Temperature	Time
Denature	70℃	1.5min.
	4℃	hold

3. ゲノム除去反応（Digestion of genomic DNA）

RT-RamDA による増幅反応に必要になりますので、ゲノム除去反応はスキップせず必ず実施して下さい。

(1) ゲノム除去反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。

＊ERCC RNA 等、コントロール RNA を使用する場合は④Nuclease free water の添加量を調整して下さい。

ゲノム除去反応液の調製

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
⑤RT-RamDA® Buffer	0.3	6.6	33
⑧gDNA Remover	0.45	9.9	49.5
④Nuclease free water＊	2.25	49.5	247.5
Total	3	66	330

※余分量を 10%とした場合

(2) 熱変性反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに、ゲノム反応液を 1well あたり 3μL 添加し、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

ゲノム除去反応

Step	Temperature	Time
Genomic DNA digestion	30℃	5min.
	4℃	hold

(3) ゲノム反応後、すみやかに次のステップに進んでください。

4. cDNA 合成および増幅反応（RT-RamDA®）

(1) RT-RamDA®反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。

＊NSR Primer を使用する場合は、⑦RT-RamDA® Primer Mix の代わりに 1st NSR Primer Mix for human、または 1st NSR Primer Mix for mouse を使用してください。

RT-RamDA®反応液

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
⑤RT-RamDA® Buffer	1.5	33	165
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	0.45	9.9	49.5
⑦RT-RamDA® Primer Mix*	0.45	9.9	49.5
④Nuclease free water	0.6	13.2	66
Total	3	66	330

※余分量を 10%とした場合

(2) ゲノム除去反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに、RT-RamDA®反応液を 1well あたり 3μL 添加し、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

RT-RamDA®反応

Step	Temperature	Time
Priming 1	25℃	10min.
Priming 2	30℃	10min.
Reverse transcription and amplification	37℃	30min.
Reverse transcription 2	50℃	5min.
Inactivation	98℃	5min.
	4℃	hold

(3) RT-RamDA®反応後、すみやかに次のステップに進むか、-20℃～-30℃にて保管してください。

5. 2nd 鎖合成反応（2nd strand synthesis）

(1) 2nd 鎖合成反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。

＊NSR Primer を使用する場合は 2nd strand synthesis Primer Mix の代わりに 2nd NSR Primer Mix for human または 2nd NSR Primer Mix for mouse を使用してください。

2nd 鎖合成反応液

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
⑨2nd strand synthesis Buffer	3	63	315
⑩2nd strand synthesis Enzyme	0.5	10.5	52.5
⑪2nd strand synthesis Primer Mix*	2.5	52.5	262.5
Total	6	126	630

※余分量を 5%とした場合

(2) RT-RamDA®反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに、2nd 鎖合成反応液を 1well あたり 6μL 添加し、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

2nd 鎖合成反応

Step	Temperature	Time
Second-strand synthesis	16℃	60min.
Inactivation	70℃	10min.
	4℃	hold

(3) 2nd 鎖合成反応後、すみやかに次のステップに進むか、-20℃～-30℃にて保管してください。

6. ライブラリー調製（Library Preparation）

本キットのライブラリー調製プロトコルは、Illumina 株式会社「Nextera™ XT DNA ライブラリー調製ガイド」で推奨されている反応容量に対し、4 分の 1 で実施するプロトコルを記載しています。以下のプロトコルに含まれる変更は、本キットのみに適応されることに留意してください。

ライブラリー調製の詳細な手順については、Illumina 株式会社「Nextera™ XT DNA ライブラリー調製ガイド」をご確認ください。

本キットには、Nextera™ XT DNA Sample Kit や Agencourt AMPure XP beads を含みません。「[3] 製品のほかに用意するもの」（p.4）を参照し、ご用意ください。

A. 二本鎖 cDNA の精製

(1) 精製を始める前に、4 分の 1 希釈した AMPure XP beads を作製してください。希釈液は、AMPure XP beads を遠心し、その上清を希釈液として使用してください。

例) 8 サンプル分の 4 分の 1 希釈 AMPure XP beads の作製方法

a. 1×AMPure XP beads 220μL をマグネットスタンドに静置し、磁性ビーズが完全に吸着した後、上清を回収します。

b. a で回収した上清 180μL と 1×AMPure XP beads 60μL を良く混合し、4 分の 1 希釈 AMPure XP beads として使用してください。

(2) 5.(3)の 2nd 鎖合成反応後の二本鎖 cDNA 溶液 15μL に対して、4 分の 1 希釈 AMPure XP beads を 27μL 添加してください。その後、遠心を行い、25℃、2,000rpm にて 2 分間撹拌し、5 分間静置してください。

(3) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。その後、上清を除去します。

(4) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを150μL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(5) エタノールを除去します。

(6) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを150μL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(7) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。
エタノールが残存している場合は、シングルピペットマンを用いてエタノールを除去してください。

(8) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、25℃で 5 分間、または室温にて 5 分～10 分ドライアップします＊。

＊エタノールが残存していると反応がうまくいかない可能性があります。磁性ビーズがひび割れはじめるまでドライアップ（下記参照）してください。室温や湿度により、ドライアップの時間を調整してください。

ビーズのひび割れ
参考画像

良い例　　悪い例

(9) ドライアップの間に溶出に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。

溶出液

	1 反応(μL)	100 反応(μL) ※
Tagment DNA Buffer (Nextera™ XT DNA Sample prep kit)	2.5	270
④Nuclease free water	1.25	135
Total	3.75	405

※余分量を 8%とした場合

(10) 96well プレートまたは 8 連チューブに、溶出液を 1well あたり 3.75μL 添加し、遠心します。

(11) ビーズが完全に分散するまで Vortex を行い、25℃で 5 分間インキュベートします。

(12) 遠心後、チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで 5 分間静置します。

(13) 透明な上清 3.75μL を新しいチューブあるいはプレートに移し、次のステップに進んでください。

B. タグメンテーション(Nextera™ XT DNA ライブラリー調製)

(1) 精製した二本鎖 cDNA に対して Amplicon Tagment Mix を 1well あたり 1.25μL 添加し、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

タグメンテーション反応

Step	Temperature	Time
Tagmentation	55℃	5min.
	10℃	hold

C. 中和反応(Nextera™ XT DNA ライブラリー調製)

(1) タグメンテーションした二本鎖 cDNA に対し、Neutralization Buffer を 1well あたり 1.25μL 添加します。その後、遠心を行い、25℃、2000rpm にて 1 分間撹拌し、5 分間静置してください。

D. ライブラリーエンリッチメント(Nextera™ XT DNA ライブラリー調製)

(1) 中和した 2 本鎖 cDNA に対し NPM PCR Master Mix を 1well あたり 3.75μL 添加し、遠心します。その後、各 well に Index primer(S5XX)と Index primer(N7XX)をそれぞれ 1.25μL ずつ添加し、遠心します。

(2) 遠心後、以下のサイクルで PCR を行ってください。

ライブラリーエンリッチメント反応

Step	Temperature	Time	
	72℃	3min.	
Denature	95℃	30sec.	
PCR	95℃ 55℃ 72℃	10sec. 30sec. 30sec.	14 cycles＊
	72℃	5min.	
	4℃	hold	

＊ 下記記載の表を参考に PCR サイクルを変更してください。

Estimated amount of total RNA per cell / total RNA amount	Typical Number of PCR Cycles
>10pg	14
5-10pg	14-15

＊ RNA 量が 5pg より少ない場合は PCR サイクルを増やしてください。

＊ 得られるライブラリー収量が多い場合、PCR サイクルを減らしていただくことも可能です。

E. ライブラリーの精製

(1) PCR 溶液 12.5μL に対して 1×AMPure XP beads を 15μL 添加してください。その後、遠心を行い、25℃、2,000rpm にて 2 分間撹拌し、5 分間静置してください。

(2) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。その後、上清を除去します。

(3) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 150μL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(4) エタノールを除去します。

(5) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 150μL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(6) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。

(7) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、25℃で 5 分間、または室温にて 5 分～10 分ドライアップします＊。

＊エタノールが残存していると反応がうまくいかない可能性があります。磁性ビーズがひび割れはじめる（p.14 参考画像）までドライアップしてください。室温や湿度により、ドライアップの時間を調整してください。

(8) 96well プレートまたは 8 連チューブに TE Buffer を 1well あたり 24μL 添加し、遠心します。

(9) ビーズが完全に分散するまで Vortex を行い、25℃で 2 分間インキュベートを行い、遠心します。

(10) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで 2 分間静置します。

(11) 透明な上清 24μL を新しいチューブあるいはプレートに移し、QC のステップに進むか、-20℃にて保管してください。

7.ライブラリーの検証

(1) ライブラリーの定量

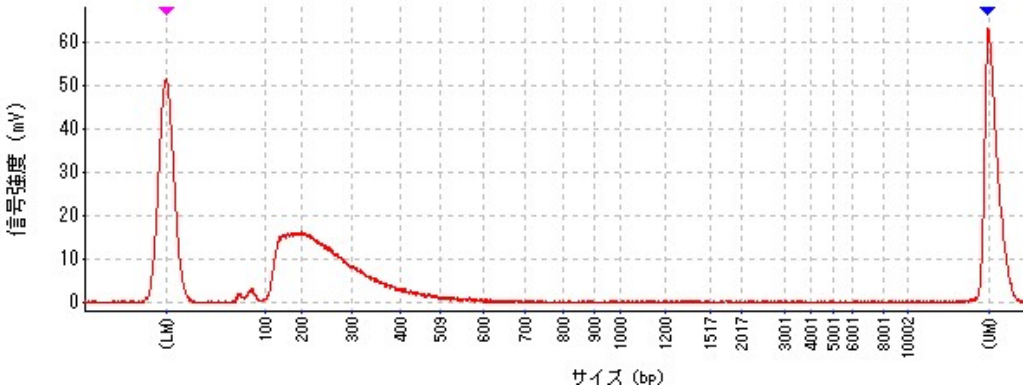
GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) 、あるいは同等の市販品を用いて、qPCR で定量することを推奨いたします。GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) は illumina 次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットで、Illumina 株式会社が採用している P5、P7 アダプター配列に対応しており、フローセル上に結合できるライブラリーのみを特異的、かつ正確に定量します。

(2) ライブラリーサイズ分布の確認

ライブラリーの分布を確認する場合は、Bioanalyzer（アジレント・テクノロジー株式会社）、MultiNA®（株式会社島津製作所）等の電気泳動で確認することをお勧め致します。

ライブラリー分布例

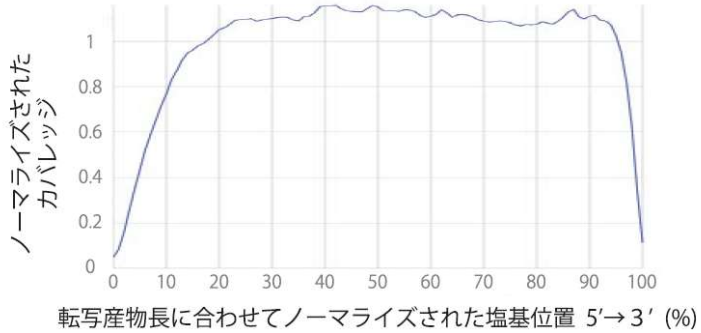
本キットと Nextera™ XT DNA ライブラリー調製キット(14cycle)を用いてマウス ES 細胞 1 細胞からライブラリーを調製した場合、下図にように約 100～600bp にライブラリー分布が確認され、収量としては約 10~20nM(TE 24μL 溶出)得られます。



※100～150 bp 付近のアダプターダイマー量が多い場合は、サンプル液量に対して 1.0 倍量の AMPureXP beads を用いて、再度ライブラリーの精製を実施することでダイマーの割合を低減することができます。本工程はサンプルを等濃度にプールした後でも実施可能です。

8.シーケンスデータの確認

シーケンスデータを解析する前に、カバレッジの均一性を確認することをお勧めします。本キットでは下図のような均一なカバレッジを得ることが可能です。



[5] 実施例

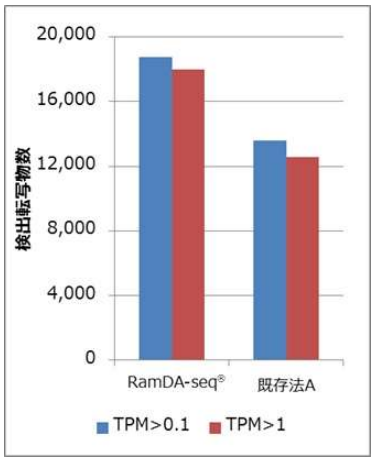
1.検出転写産物数の比較および各領域へのアライメント割合の比較

＜方法＞

Mouse ES 細胞から抽出した Total RNA 10pg を用いて、GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit (Code: RMD-101)と A 社キット用いて調製した cDNA について、NGS による比較解析を行いました。GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit では、プライマーとして NSR Primer Set for mouse(NSR-102)を使用しました。A 社キットでは、cDNA 増幅のため、18 サイクルの PCR を実施しました（GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit では PCR は行いません）。cDNA 調製後、Nextera XT DNA Library Preparation Kit を用いてライブラリーを作製し、illumina Miseq でシーケンスを行いました。

＜結果＞

Percentage of reads(%)		RamDA-seq® (NSR使用)		A社キット	
Mapped reads		90.9	86.1	89.5	90.7
rRNA+mtRNA		24.0	23.0	9.0	9.9
CDS		27.8	26.3	41.9	41.5
UTR		16.5	15.8	21.9	22.3
Introns		16.2	14.8	9.1	9.0
Intergenic regions		6.4	6.2	7.6	8.0
転写産物数	TPM>0.1	18,984	18,465	13,500	13,721
	TPM>1	18,338	17,629	12,575	12,616



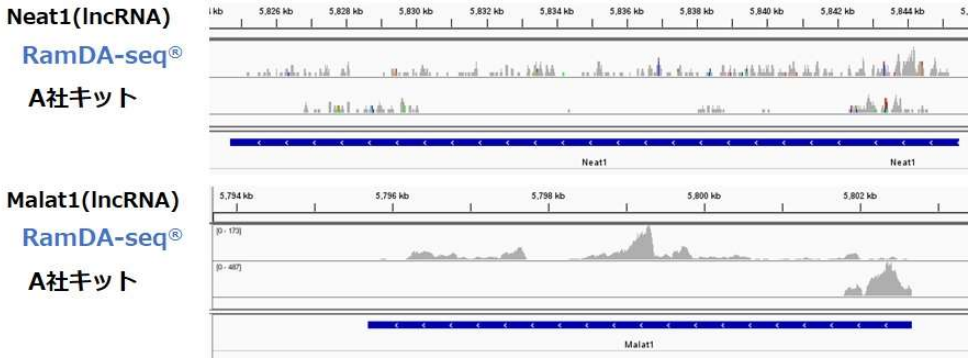
GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit は、A 社キットに比べて、転写産物を約 5,000 多く検出することができました。

2.長鎖 RNA における全長性の比較

＜方法＞

実施例 1 の方法にて得られたシーケンスデータについて、個別の遺伝子のリードについて、比較を行いました。

＜結果＞



GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit では、A 社キットでは捉えることの難しかった Neat1 や Malat1 遺伝子のような lncRNA についても全長にわたって検出することが可能です。

[6] トラブルシューティング

現象	原因	対策
得られる cDNA 量が少ない	RNA が分解している	・RNA が分解していないか確認してください。 ・チップやチューブなどに RNase がコンタミしていないか確認してください。 ・細胞溶解や RNA 希釈のステップは氷上にて行ってください。
ライブラリー収量が少ない	精製時のエタノールが残存している	・磁性ビーズをエタノールで洗浄した際にエタノールが残存していると後反応を阻害することがあります。磁性ビーズが乾燥しているか確認してください。 ・作業部屋の湿度が高いとビーズの乾燥がされにくい場合があります。作業部屋の湿度を 55%以下にすることをお勧めします。

[7] 関連製品

品名	内容	Code No.
リアルタイム PCR 解析用 cDNA 調製キット **RT-RamDA® cDNA synthesis Kit**	96 回用	RMD-201
	24 回用	RMD-201T
RamDA Cell Lysis Kit	1,152 回用	RMD-301
NSR Primer Set for human	96 回用	NSR-101
NSR Primer Set for mouse	96 回用	NSR-102

品名	内容	Code No.
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット **GenNext® NGS Library Quantification Kit**	500 回用 /20μL 反応	NLQ-101

品名	内容	Code No.
RT-RamDA®法による NGS 解析用ライブラリー調製キット **GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit**	96 回用	RML-101
	24 回用	RML-101T

[8] 参考文献

(1) Hayashi .T et al.Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nature Communications. 9:619(2018)

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

https://lifescience.toyobo.co.jp/

TOYOBO

【製造・販売元】

ー価格・在庫に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(大阪)
〒530-0001　大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(東京)
〒104-8345　東京都中央区京橋一丁目17番10号
住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ https://lifescience.toyobo.co.jp/

オプションプロトコル

GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit
(Code No. RMD-101, RMD-101T)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

—目次—

[1] はじめに・・・

[1] はじめに

本プロトコルは GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [Code No. RMD-101, RMD-101T]のオプションプロトコルになります。標準プロトコルでは 2nd 鎖合成後に磁性ビーズを用いた精製を行ったあとに、ライブラリー調製を実施する必要がありますが、本プロトコルは 2nd 鎖合成後の精製工程が不要となり、作業性が向上しています。

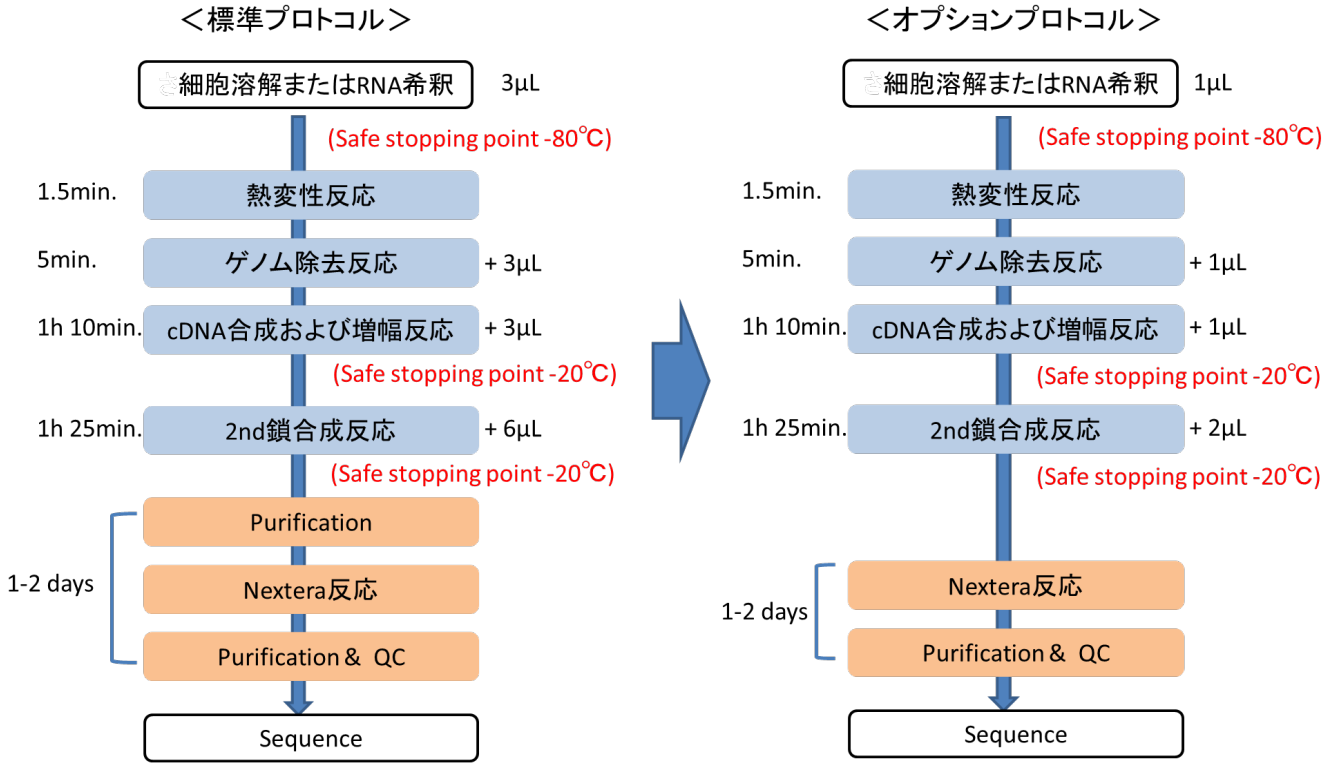


図 1. 本キットのワークフロー比較

各ステップの反応時間と反応液の添加量、作業を休止する際の作業休止ポイントを示します。本キットには、ワークフロー中の Purification、Nextera™ 反応に使用する、磁性ビーズ、ライブラリー調製試薬を含みません。「[3] 製品のほかに用意するもの」(p.4)を参照し、ご用意ください。

オプションプロトコルの変更点

反応液量	オプションプロトコルでは細胞溶解から 2nd 鎖合成までの反応液量が標準プロトコルの 3 分の 1 スケールとなっています。
2nd 鎖合成条件	オプションプロトコルでは 2nd鎖合成条件における不活化温度が 70℃10 分から 80℃15 分に変更になっています。
2nd 鎖合成後の精製工程	オプションプロトコルでは 2nd 鎖合成後の精製が不要です。精製していない二本鎖 cDNA1μL を次反応に用います。
ライブラリー調製工程	標準プロトコルでは Illumina 株式会社「Nextera™ XT DNA ライブラリー調製ガイド」で推奨されている反応液量に対し、4 分の 1 で実施するプロトコルでしたがオプションプロトコルでは 5 分の 1 で実施するプロトコルになっております。

◆本キットの特長◆

1. シングルセルや微量 RNA から cDNA 調製可能
サンプルとして、1～100 細胞 または 10pg~1ng total RNA に対応

2. RNA 全長をカバーした解析が可能
10kb 以上のターゲット RNA の全長をリードでカバーできる cDNA を調製可能

3. 様々な種類の RNA を検出可能、従来技術より検出遺伝子数がアップ
Poly(A) RNA の解析以外にも様々な RNA の解析にご利用いただけます。
◇アイソフォームや選択的スプライシングの同定
◇Poly(A) RNA や non-poly(A) RNA (ヒストン RNA や lncRNA)の検出
◇核内 RNA(pre-mRNA や lncRNA)の検出

[2] 製品内容

本キットには、以下の試薬が含まれています。試薬は-20℃で保存してください。

RamDA-seq® Single Cell Kit (Code No.RMD-101,RMD-101T)

試薬名	保存	容量 (RMD-101)	容量 (RMD-101T)
①Lysis Buffer	-20℃	480μL	120μL
②Lysis Enhancer	-20℃	108μL	27μL
③RNase Inhibitor	-20℃	22μL	6μL
④Nuclease free water	-20℃	960μL	240μL
⑤RT-RamDA® Buffer	-20℃	240μL	60μL
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	-20℃	54μL	14μL
⑦RT-RamDA® Primer Mix	-20℃	54μL	14μL
⑧gDNA Remover	-20℃	54μL	14μL
⑨2nd strand synthesis Buffer	-20℃	330μL	83μL
⑩2nd strand synthesis Enzyme	-20℃	55μL	14μL
⑪2nd strand synthesis Primer Mix	-20℃	275μL	69μL

—注意事項—

本キットに含まれる試薬の中には、弊社より販売している別キット、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Kit (Code: RML-101)、QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit (Code: RMQ-101)などと名称が同一の試薬が含まれますが、別キットによる試薬の代替はできませんのでご注意ください。

本キットでは微量のサンプルから cDNA の増幅、ライブラリー調製を行うため、作業工程中で環境中の DNA などが混入すると、実験結果が著しく損なわれる可能性があります。清浄度の高い部屋で作業を行うなど、コンタミネーション対策には十分注意してください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本キットのほかに、以下の機器・試薬類をご用意ください。

・ サーマルサイクラー、またはインキュベーター
ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

・ 磁性ビーズ
Agencourt AMPure XP 試薬（Beckman Coulter、カタログ番号：A63880、A63881 等）を推奨いたします。ご使用にあたっては試薬の取扱説明書に従ってください。

・ 磁気スタンド
磁性ビーズを用いた精製の際に使用します。
磁気スタンドにはマグネットプレート BiT-Mag96(サンプラテック　品番：30550)がお使いいただけます。

・ 80%エタノール
磁性ビーズを用いた精製の際の洗浄液として使用します。

・ ライブラリー調製試薬
Illumina 株式会社　Nextera™ XT DNA Sample Kit をご使用ください。

製品名	カタログ番号
Nextera™ XT DNA Library Preparation Kit (24 samples)	FC-131-1024
Nextera™ XT DNA Library Preparation Kit (96 samples)	FC-131-1096

また上記キットに対応したインデックス付 PCR プライマーをご使用ください。

・ NSR プライマー
本キットでは、NSR Primer Set for human (Code: NSR-101)または NSR Primer Set for mouse (Code:NSR-102)を使用することができます。

NSR Primer Set for human (Code: NSR-101)

1st NSR Primer Mix for human	-20℃	54μL
2nd NSR Primer Mix for human	-20℃	275μL

NSR Primer Set for mouse (Code: NSR-102)

1st NSR Primer Mix for mouse	-20℃	54μL
2nd NSR Primer Mix for mouse	-20℃	275μL

・ TE Buffer（10mM Tris 1mM EDTA）pH8.0
ライブラリー調製時に DNA の溶出に使用します。水での代用はできません。

以下の消耗品は動作確認済みです。

チューブおよびキャップ	メーカー	カタログ番号
UC,EU Optical wide area 8-cap strip, Robust while flexible,with wide indented flat cap	Nippon genetics /BIOplastics	BPB79701-1 /BPB79701-1
RP,UC,SFGC,Extra Robust,Fits shell Frame Grids (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPK69901/ K69901

96 well プレートおよびシール	メーカー	カタログ番号
RP,LF,SEMI k,cuttable,96 well plate (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPB50651/ B50651
EU Optical wide area 96 cap plate with wide area indented flat caps	Nippon genetics /BIOplastics	BPB57601/ B57601

マグネットスタンド	メーカー	カタログ番号
Magna Stand for 8-well tube preparation	Nippon genetics	FG-SSMAG2
BiT-Mag96	サンプラテック	30550

[4] 使用方法

・ 全ステップにおいて、試薬の添加後はピペットやミキサー、タッピング等で十分に攪拌を行ってください。
【参考】
試薬添加→遠心→攪拌（ミキサー: 2000 rpm、4℃、1 min）→遠心
試薬添加→攪拌（ピペッティング: 20 回 on ice）→遠心　　など

・ 本キットは、サンプルとして、細胞、または total RNA から、ライブラリ調製のための cDNA を合成することができます。
ご使用になるサンプルに合わせて、下表に示すセクション 1.A～B のいずれかの「細胞溶解／RNA 希釈」を行った後、「熱変性」以降の操作に進んでください。

サンプル		細胞溶解 / RNA 希釈	熱変性
細胞	FACS による細胞取得	セクション 1. A (p.6)	セクション 2 (p.9)
	FACS 以外による細胞取得	セクション 1. B (p.7)	
Total RNA		セクション 1. C (p.8)	

1. 細胞溶解／RNA 希釈（Cell lysis or RNA dilution）

A. FACS を用いて細胞分取を行う場合

(1) 細胞溶解に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に、必要量より余分量をみて調製してください。

細胞溶解液の調製

	1 反応 (μL)	3 反応 (μL)	24 反応 (μL)※	96 反応 (μL)※
①Lysis Buffer	0.67	2.0	20	80
②Lysis Enhancer	0.15	0.45	4.5	18
③RNase Inhibitor	0.017	0.05	0.5	2
④Nuclease free water	0.17	0.5	5	20
Total	1.0	3.0	30	120

※余分量を 25%とした場合

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに、細胞溶解液を 1well あたり 1μL 分注します。分注は氷上で行い、分注後すぐに qPCR 用シールや熱圧着式シールにてシーリングを行ってください。 ソーティングまで、プレートを氷上または 4℃で保管します。

(3) ご使用の FACS の取扱説明書やメーカーが推奨するパラメーターに従い、細胞溶解液を分注したプレートに細胞のソーティングを実施してください。

(4) ソーティング後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(5) その後、すみやかに次のステップに進むか、－80℃でサンプルを保管してください。

B. FACS 以外で細胞分取を行う場合

1 サンプルあたり、細胞溶解サンプル 1μL を調製します。マニュアルピッキングなどで細胞を分取する際は、細胞溶解液 0.83μL に 0.17μL の細胞サンプルを添加します。細胞溶解が不十分となるため、細胞とともに持ち込まれる PBS などの持込液量は 0.17μL 以下としてください。細胞サンプルが 0.17μL 未満の場合、細胞溶解液の調製時に Nuclease free water を加え、調整してください。

(1) 細胞溶解に必要な試薬をチューブに作製します。

例) 細胞サンプルの液量が 0.17μL の場合

	1 反応 (μL)	3 反応 (μL)	24 反応 (μL)※	96 反応 (μL)※
①Lysis Buffer	0.67	2.0	20	80
②Lysis Enhancer	0.15	0.45	4.5	18
③RNase Inhibitor	0.017	0.05	0.5	2
Total	0.83	2.5	25	100
細胞サンプルが 0.17μL 未満(xμL)の場合				
Nuclease free water	0.17-x	(0.17-x) X3	(0.17-x) X30	(0.17-x) X120

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに細胞溶解液を 1well あたり 0.83μL(または(1-x)μL)分注します。分注は氷上にて行い、分注後すぐにシーリングを行い、遠心してください。プレートは、細胞サンプルの添加まで氷上または 4℃にて保管してください。

(3) 細胞サンプルの添加までプレートを氷上または 4℃にて保管を行い、細胞分取用機器のマニュアルに従い、細胞サンプルの添加を行ってください。

(4) 細胞サンプルの添加後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(5) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80℃にてサンプルを保管してください。

C. 精製済みの total RNA を使用する場合

次工程に total RNA を 10pg～1ng (1μL)インプットするため、RNA 溶液を調製します。RT-RamDA®による増幅反応に必要になりますので、全てのパーツを用いて RNA 希釈液を調製してください。

(1) 以下を参考に RNA 希釈液を必要量チューブに作製してください。この RNA の希釈液を用いて、10～1,000 pg/μL となるように RNA を希釈してください。尚、希釈後の RNA 溶液中の RNA 希釈液が 90%以上となるように希釈してください。

RNA 希釈液の調製

	96 反応(μL)
①Lysis Buffer	80
②Lysis Enhancer	18
③RNase Inhibitor	2
④Nuclease free water	20
Total	120

※RNA 希釈例

10pg Input を行う場合（10pg/μL total RNA 溶液）

	(μL)	RNA 希釈液終濃度
1,000pg/μL total RNA	1	
RNA 希釈液	99	99%
Total	100	

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに希釈した RNA 溶液を 1well あたり 1μL 分注します。

(3) 分注後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(4) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80℃にてサンプルを保管してください。

*-80℃で保存する場合は、分注後の 3μL の状態で保存してください。低濃度の状態で長期間保存し再度分注を行う場合、チューブ等への吸着によりRNAをロスする恐れがあります。

2. 熱変性反応（Denature）

(1) 細胞溶解サンプルや RNA サンプルの分注されたプレートやチューブを 4℃にて遠心を行い、以下の温度・時間でインキュベートしてください。

凍結サンプルを使用する場合は熱変性反応前に 4℃にて融解し、遠心した後に熱変性反応に進んでください。

熱変性反応

Step	Temperature	Time
Denature	70℃	1.5min.
Cooling	4℃	hold

3. ゲノム除去反応（Digestion of genomic DNA）

RT-RamDA®による増幅反応に必要になりますので、ゲノム除去反応はスキップせず必ず実施して下さい。

(1) ゲノム除去反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。
＊ERCC RNA 等、コントロール RNA を使用する場合は④Nuclease free water の添加量を調整してください。

ゲノム除去反応液の調製

	1 反応 (μL)	3 反応 (μL)	24 反応 (μL) ※	96 反応 (μL) ※
⑤RT-RamDA® Buffer	0.1	0.3	3	12
⑧gDNA Remover	0.15	0.45	4.5	18
④Nuclease free water＊	0.75	2.25	22.5	90
Total	1	3	30	120

※余分量を 25%とした場合

(2) 熱変性反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに、ゲノム除去反応液を 1well あたり 1μL 添加し、遠心後、以下の温度・時間でインキュベートしてください。

ゲノム除去反応

Step	Temperature	Time
Genomic DNA digestion	30℃	5min.
Cooling	4℃	hold

(3) ゲノム除去反応後、すみやかに次のステップに進んでください。

4. cDNA 合成および増幅反応（RT-RamDA®）

(1) RT-RamDA®反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。

＊NSR Primer を使用する場合は、⑦RT-RamDA® Primer Mix の代わりに 1st NSR Primer Mix for human、または 1st NSR Primer Mix for mouse を使用してください。

RT-RamDA®反応液

	1 反応 (μL)	3 反応 (μL)	24 反応 (μL) ※	96 反応 (μL) ※
⑤RT-RamDA® Buffer	0.5	1.5	15	60
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	0.15	0.45	4.5	18
⑦RT-RamDA® Primer Mix*	0.15	0.45	4.5	18
④Nuclease free water	0.2	0.6	6	24
Total	1	3	30	120

※余分量を 25%とした場合

(2) ゲノム除去反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに、RT-RamDA®反応液を 1well あたり 1μL 添加し、遠心後、以下の温度・時間でインキュベートしてください。

RT-RamDA®反応

Step	Temperature	Time
Priming 1	25℃	10min.
Priming 2	30℃	10min.
Reverse transcription and amplification	37℃	30min.
Reverse transcription 2	50℃	5min.
Inactivation	98℃	5min.
Cooling	4℃	hold

(3) RT-RamDA®反応後、すみやかに次のステップに進むか、-20℃～-30℃にて保管してください。

5. 2nd 鎖合成反応（2nd strand synthesis）

(1) 2nd 鎖合成反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。

＊NSR Primer を使用する場合は 2nd strand synthesis Primer Mix の代わりに 2nd NSR Primer Mix for human または 2nd NSR Primer Mix for mouse を使用してください。

2nd 鎖合成反応液

	1 反応 (μL)	3 反応 (μL) ※	24 反応 (μL) ※	96 反応 (μL) ※
⑨2nd strand synthesis Buffer	1	3	30	120
⑩2nd strand synthesis Enzyme	0.17	0.5	5	20
⑪2nd strand synthesis Primer Mix＊	0.83	2.5	25	100
Total	2	6	60	240

※余分量を 25%とした場合

(2) RT-RamDA®反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに、2nd 鎖合成反応液を 1well あたり 2μL 添加し、遠心後、以下の温度・時間でインキュベートしてください。

2nd 鎖合成反応

Step	Temperature	Time
Second-strand synthesis	16℃	60min.
Inactivation	80℃	15min.
Cooling	4℃	hold

(3) 2nd 鎖合成反応後、すみやかに次のステップに進むか、-20℃～-30℃にて保管してください。
（次ステップへ持ち込む液量は 1μL です。残りの 4μL は予備として-20℃～-30℃にて保管可能であり、リアルタイム PCR などの QC（品質評価）を行うこともできます。）

6. ライブラリー調製（Library Preparation）

本プロトコルはオプションプロトコルのため 2nd 鎖合成後の精製工程は不要です。本キットのライブラリー調製プロトコルは、illumina®社「Nextera™ XT DNA ライブラリー調製ガイド」で推奨されている反応容量に対し、5 分の 1 で実施するプロトコルを記載しています。以下のプロトコルに含まれる変更は、本キットのみに適応されることに留意してください。

ライブラリー調製の詳細な手順については、illumina®社「Nextera™ XT DNA ライブラリー調製ガイド」をご確認ください。

本キットには、Nextera™ XT DNA Sample Kit や Agencourt AMPure XP beads を含みません。「[3]　製品のほかに用意するもの」（p.4）を参照し、ご用意ください。

A. タグメンテーション(Nextera™ XT DNA ライブラリー調製)

(1) タグメンテーション反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製してください。精製していない二本鎖 cDNA　1μL に対してタグメンテーション反応液を 1well あたり 3.2μL 添加し、遠心後、以下の温度・時間でインキュベートしてください。

タグメンテーション反応液

	1 反応(μL)
Tagment DNA Buffer (Nextera™ XT DNA Sample prep kit)	2.2
Amplicon Tagment Mix	1.0
Total	3.2

	1 反応(μL)
精製していない二本鎖 cDNA*	1.0
タグメンテーション反応液	3.2
Total	4.2

タグメンテーション反応

Step	Temperature	Time
Tagmentation	55℃	10min.
Cooling	10℃	hold

* 残りの 4μL は予備として-20℃～-30℃にて保管可能であり、リアルタイム PCR などの QC（品質評価）を行うこともできます。

B. 中和反応(Nextera™ XT DNA ライブラリー調製)

(1) タグメンテーションした二本鎖 cDNA に対し、Neutralization Buffer を 1well あたり 1μL 添加します。その後、遠心を行い、25℃、2000rpm にて 1 分間撹拌し、5 分間静置してください。

C. ライブラリーエンリッチメント(Nextera™ XT DNA ライブラリー調製)

(1) 中和した 2 本鎖 cDNA に対し NPM PCR Master Mix を 1well あたり 3.0μL 添加し、遠心します。その後、各 well に Index primer(S5XX)と Index primer(N7XX)をそれぞれ 1μL ずつ添加し、遠心します。

(2) 遠心後、以下のサイクルで PCR を行ってください。

ライブラリーエンリッチメント反応

Step	Temperature	Time	
	72℃	3min.	
Denature	95℃	30sec.	
PCR	95℃ 55℃ 72℃	10sec. 30sec. 30sec.	17 cycles＊
Extension	72℃	5min.	
Cooling	4℃	hold	

＊RNA 量が少なく、十分なライブラリー収量が得られない場合は、PCR サイクルを増やしてください。
＊得られるライブラリー収量が多い場合、PCR サイクルを減らすことも可能です。

D. ライブラリーの精製

(1) PCR 溶液 10.2μL に対して 1×AMPure XP beads を 12μL 添加してください。その後、遠心を行い、25℃ 2,000rpm にて 2 分間撹拌し、5 分間静置してください。

(2) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。その後、上清を除去します。

(3) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 150μL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(4) エタノールを除去します。

(5) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを150μL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

(6) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。

(7) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、25℃で 5 分間、または室温にて 5 分～10 分ドライアップします＊。

＊エタノールが残存していると反応がうまくいかない可能性があります。磁性ビーズがひび割れはじめるまでドライアップ（下記参照）してください。室温や湿度により、ドライアップの時間を調整してください。

(8) 96well プレートまたは 8 連チューブに TE Buffer を 1well あたり 24μL 添加し、遠心します。

(9) ビーズが完全に分散するまで Vortex を行い、25℃で 2 分間インキュベートを行い、遠心します。

(10) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで 2 分間静置します。

(11) 透明な上清 24μL を新しいチューブあるいはプレートに移し、QC のステップに進むか、-20℃にて保管してください。

7.ライブラリーの検証

(1) ライブラリーの定量

GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code No. NLQ-101) 、あるいは同等の市販品を用いて、qPCR で定量することを推奨いたします。GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code No. NLQ-101) は illumina®次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットで、illumina®社が採用している P5、P7 アダプター配列に対応しており、フローセル上に結合できるライブラリーのみを特異的、かつ正確に定量します。

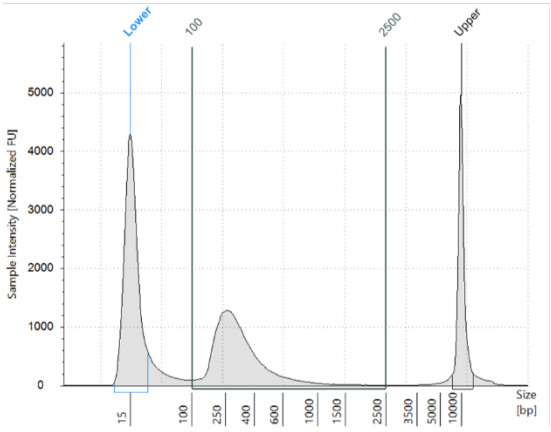
(2) ライブラリーサイズ分布の確認

ライブラリーの分布を確認する場合は、Bioanalyzer、TapeStation（アジレント・テクノロジー株式会社）、MultiNA®（株式会社島津製作所）等の電気泳動で確認することをお勧め致します。

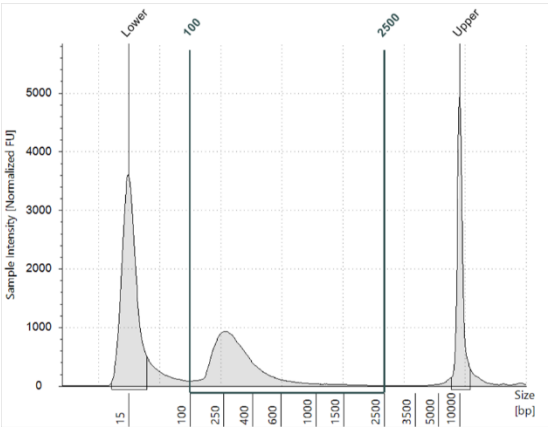
ライブラリー分布例

NIH3T3 total RNA 10pg からライブラリーを調製し TapeStation にて泳動した場合、下図にように約 100～600bp にライブラリー分布が確認され、収量としては約 10~20nM(TE 24μL 溶出)得られます。 標準プロトコルとオプションプロトコルのライブラリー分布は同様のパターンが確認されます。

標準プロトコル

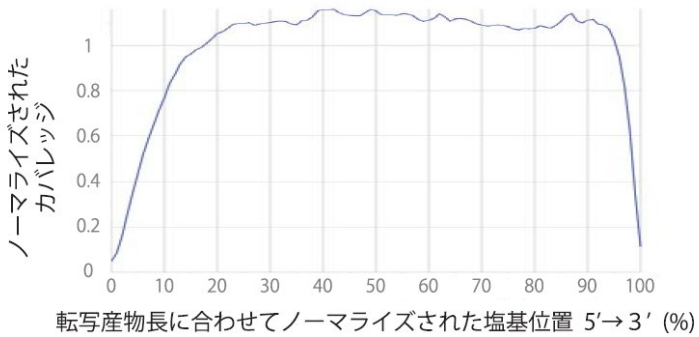


オプションプロトコル



※100～150 bp 付近のアダプターダイマー量が多い場合は、サンプル液量に対して 0.8 倍量の AMPureXP beads を用いて、再度ライブラリーの精製を実施することでダイマーの割合を低減することができます。本工程はサンプルを等濃度にプールした後でも実施可能です。

8.シーケンスデータの確認



シーケンスデータを解析する前に、カバレッジの均一性を確認することをお勧めします。本キットでは左図のような均一なカバレッジを得ることが可能です。

[5] 実施例

1. 標準プトロコルとオプションプロトコルの性能比較

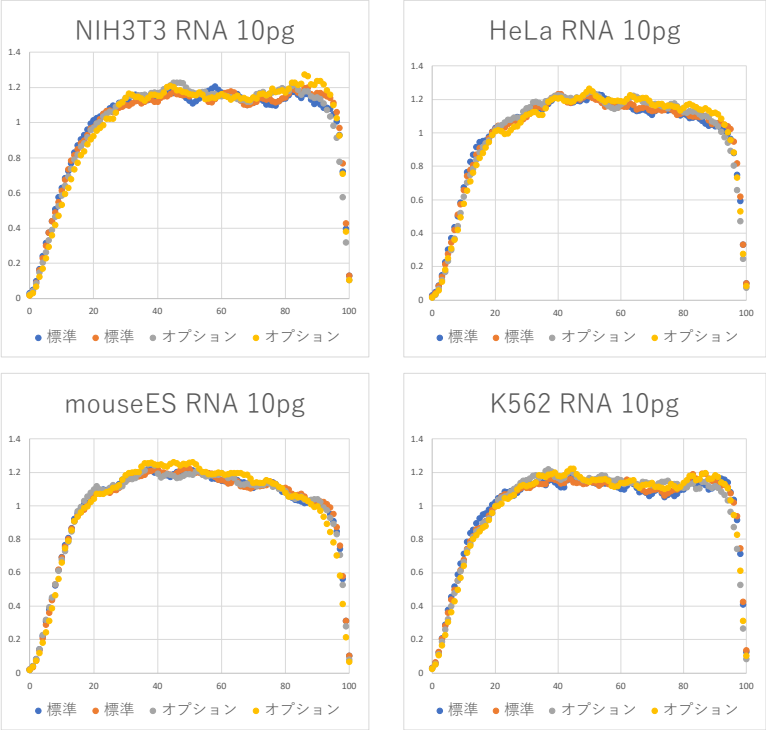
＜方法＞

各 total RNA 10pg (n=2)から GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [Code No. RMD-101] の標準プロトコルとオプションプロトコルにて、cDNA、二本鎖 DNA を調製し、Nextera™ XT DNA Sample Preparation Kit を用いてライブラリーを調製し（標準プロトコル 15 サイクル、オプションプロトコル 17 サイクル）、illumina® MiSeq でシーケンスを行いました。プライマーとして NSR Primer set for mouse [Code No. NSR-102]を使用しました。

＜結果＞

RNA種	NIH3T3 RNA 10pg		オプション/標準	mouseES RNA 10pg		オプション/標準
プロトコール	標準	オプション		標準	オプション	
平均収量(nM)	26.2	16.4	63%	48.0	37.3	78%
平均マッピング率(%)	87.4	89.0	102%	89.8	89.6	100%
平均rRNA率(%)	30.4	19.9	65%	24.1	17.0	71%
検出遺伝子数 (TPM>0)	26,723	25,374	95%	32,838	31,394	96%
検出転写産物数 (TPM>0)	13,330	12,923	97%	15,784	15,321	97%

RNA種	HeLa RNA 10pg		オプション/標準	K562 RNA 10pg		オプション/標準
プロトコール	標準	オプション		標準	オプション	
平均収量(nM)	34.2	21.7	63%	32.2	14.8	46%
平均マッピング率(%)	88.4	89.3	101%	84.2	83.1	99%
平均rRNA率(%)	29.0	18.9	65%	26.9	15.2	57%
検出遺伝子数 (TPM>0)	39,402	36,518	93%	35,979	33,445	93%
検出転写産物数 (TPM>0)	17,144	16,211	95%	15,505	14,655	95%



オプションプロトコルでは収量が標準プロトコルより低くなりましたが検出遺伝子数・転写産物数は標準プロトコルの 90%以上であることが確認できました。
またカバレッジに関しても同等のパターンが確認できました。

[6] トラブルシューティング

現象	原因	対策
得られる cDNA 量が少ない	RNA が分解している	・RNA が分解していないか確認してください。 ・チップやチューブなどに RNase がコンタミしていないか確認してください。 ・細胞溶解や RNA 希釈のステップは氷上にて行ってください。

[7] 関連製品

品名	内容	Code No.
リアルタイム PCR 解析用 cDNA 調製キット **RT-RamDA® cDNA synthesis Kit**	96 回用	RMD-201
	24 回用	RMD-201T
RamDA Cell Lysis Kit	1,152 回用	RMD-301
NSR Primer Set for human	96 回用	NSR-101
NSR Primer Set for mouse	96 回用	NSR-102

品名	内容	Code No.
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット **GenNext® NGS Library Quantification Kit**	500 回用 /20μL 反応	NLQ-101

[8] 参考文献

(1) Hayashi .T et al.Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nature Communications. 9:619(2018)

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

https://lifescience.toyobo.co.jp/

TOYOBO

【製造・販売元】

－価格・在庫に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(大阪)
〒530-0001　大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号　大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(東京)
〒104-8345　東京都中央区京橋一丁目17番10号　住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ https://lifescience.toyobo.co.jp/