

# シングルセル・微量RNAからの 『RT-RamDA®法』を用いたcDNA調製キット

次世代シーケンス解析用 cDNA 調製キット

## GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit

リアルタイム PCR 解析用 cDNA 調製キット

## RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit

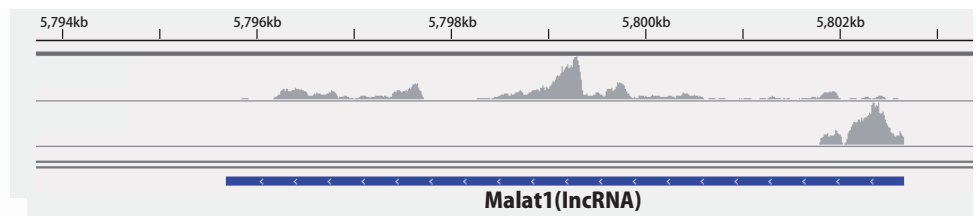
### ✓ シングルセルや微量 RNA に対応

1 ~ 100 細胞または 10pg ~ 1ng total RNA から cDNA の調製が可能です

### ✓ 完全長 cDNA の調製が可能

Oligo-dT primer のみを用いる既存法では困難であった 10kb 以上のターゲット RNA から cDNA の調製が可能であり、RNA 全長からシーケンスリードが得られます

RamDA-seq®  
A社キット



### ✓ poly(A) RNA に加え、non-poly(A) RNA の検出が可能

Oligo-dT primer に加え、NSR (Not so random primer) または random primer を使用することで、既存法では検出できなかった non-poly(A) RNA の検出も可能です

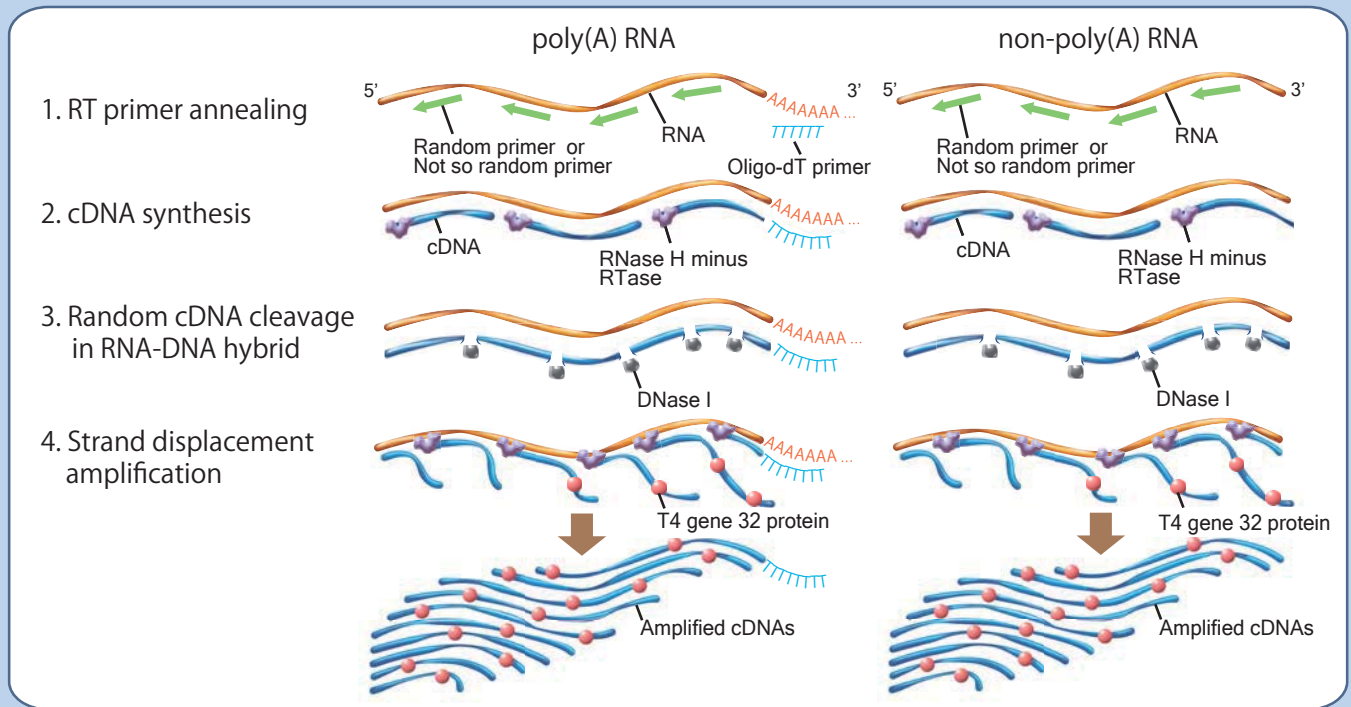
### ✓ 既存法に比べ検出遺伝子数がアップ

ヒストン RNA、lncRNA、pre-mRNA、circRNA などを含むさまざまな RNA の検出が可能です

Mouse ES RNA 10pg から 2 種類のキット (N=2) で cDNA 調製後、NGS 解析を実施

cDNA Synthesis Method	RamDA-seq®		A社キット	
Number of transcripts TPM>0.1	18,984	18,465	13,500	13,721

# RamDA-seq® の原理



二本鎖合成

次世代シーケンス用ライブラリー調製

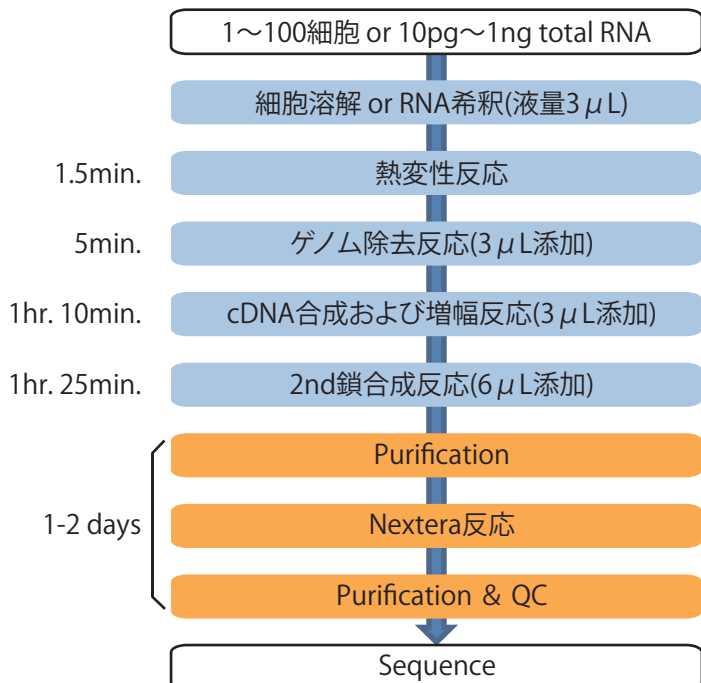
次世代シーケンス解析

RamDA-seq® (ラムダセック) は、理化学研究所 生命機能科学研究センター バイオインフォマティクス研究開発チームが開発した1細胞完全長トータルRNAシーケンス法「Random Displacement Amplification sequencing」の略です。既存の1細胞RNA解析法では、Oligo-dT primerのみを用いて逆転写するため、non-poly(A) RNAは合成できず、また途中でcDNA合成が止まった場合、全長の検出が困難でした。一方、RamDA-seq®法では、random primerあるいはNSR primer\*を使用するため、poly(A)配列以外からも合成が可能であり、non-poly(A) RNAも検出できます。また、これらprimerがRNAのさまざまな場所に結合しcDNA合成が開始されるため、RNA全長からシーケンスリードを得ることができます。さらにRamDA-seq®法は、cDNAが合成と同時に増幅されるため、従来法で実施している増幅用アダプター付加やPCRが必要なく増幅のバイアスを抑えることが可能です。

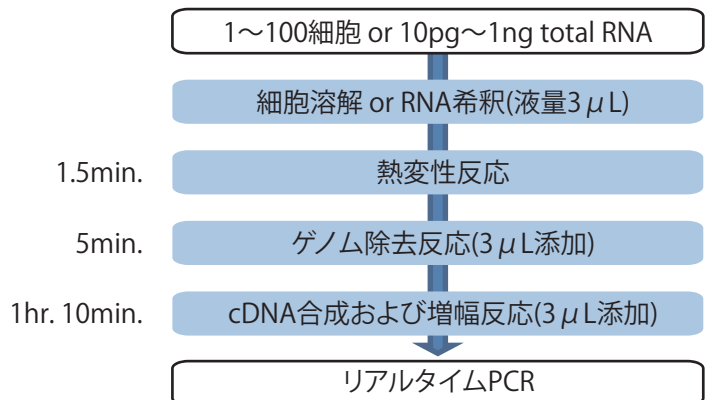
\*NSR Primerとは、Not so random primerの略で、18S、28S RNA遺伝子に完全にマッチする配列を計算上除外したrandom primerのことです。random primerの代わりにNSR Primerを用いることで、rRNAからのcDNA合成を抑制できます。

※RamDA-seq®とRT-RamDA®は理化学研究所の商標です。

## GeneNext® RamDA-seq® Single Cell Kit



## RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit

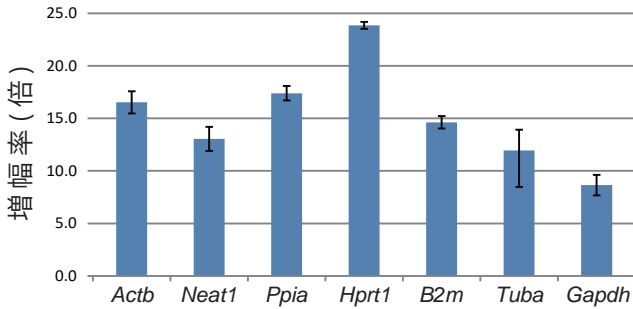


本製品の外、磁性ビーズ Agencourt AMPure XP試薬 (Beckman Coulter) およびライブラリー調製試薬 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (illumina) が必要です。

## 実施例1 cDNA 増幅率の検証

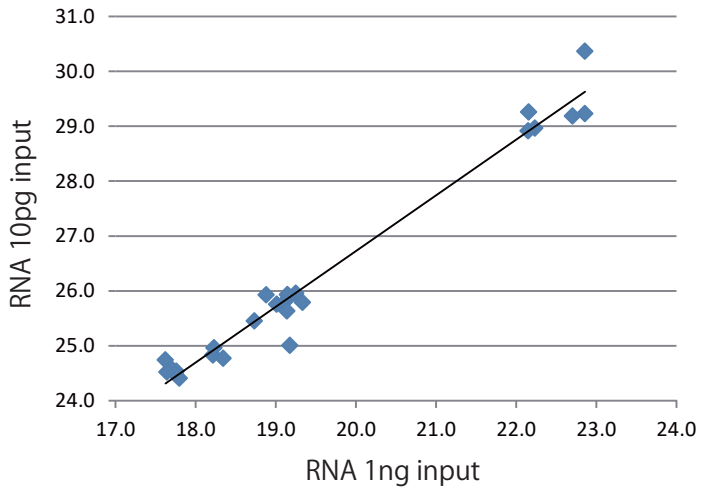
NIH3T3 total RNA 10pg から、従来の逆転写反応試薬および RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit にて、cDNA を調製し、リアルタイム PCR により各遺伝子を測定しました。その結果、従来の逆転写反応試薬を使用した際の cDNA 量に対して、RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit では9倍以上の cDNA を得ることができました。

$$\text{増幅率} = \frac{\text{RT-RamDA}^{\circlearrowleft} \text{法で得られた cDNA 量}}{\text{従来の逆転写反応で得られた cDNA 量}}$$



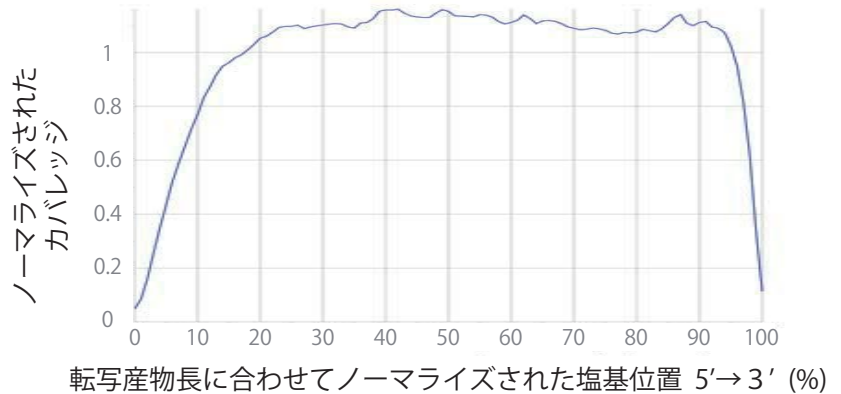
## 実施例2 インプット RNA 量の検証

10pg と 1ng の NIH3T3 total RNA を用いて RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit にて cDNA を調製し、リアルタイム PCR により8遺伝子 (N=3 で実施) の Ct 値を比較しました。その結果、10pg インプットと 1ng インプットで高い相関が認められ、微量のインプット量からも cDNA 調製が可能でした。



## 実施例3 カバレッジの均一性の確認

mES total RNA 10pg から GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit にて、cDNA、二本鎖 DNA を調製し、次世代シーケンス解析を行いました。解析には illumina MiSeq を使用しました。その結果、調製したライブラリーがおおむね遺伝子全体を均一にカバーしていることが確認できました。

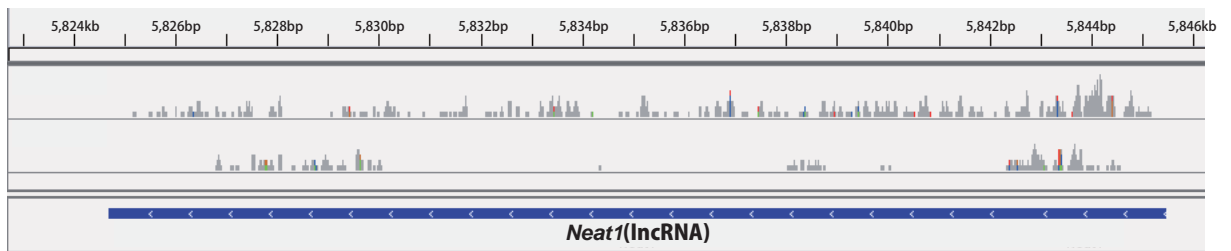


## 実施例4 長鎖 RNA における cDNA 調製の比較

mES total RNA 10pg から GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit および A 社キットにて、cDNA、二本鎖 DNA を調製し、次世代シーケンス解析を行いました。解析には illumina MiSeq を使用しました。その結果、GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit では、A 社キットではとらえることが難しい *Neat1* や *Malat1* のような lncRNA も全長にわたって検出することができました。

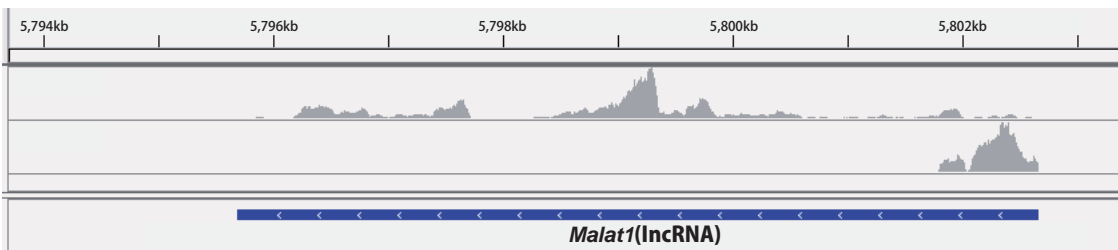
RamDA-seq®

A社キット



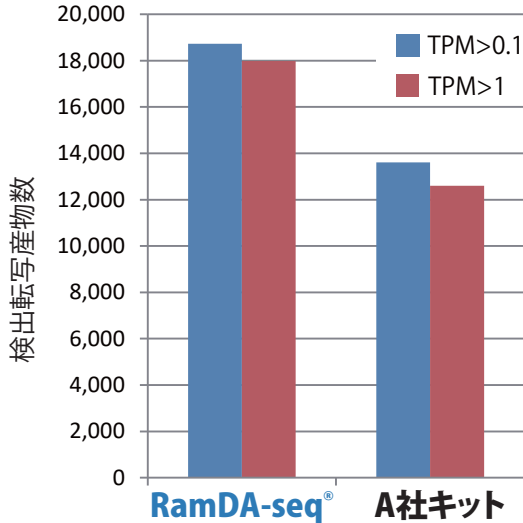
RamDA-seq®

A社キット



## 実施例5 検出転写産物数の比較および RNA 種類別リード数の検証

mES total RNA 10pg から GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit および A 社キットにて、cDNA、二本鎖 DNA を調製し、次世代シーケンス解析を行いました。GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit ではプライマーとして NSR Primer Set for mouse を使用しています。GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit では不要である cDNA 増幅のための PCR を A 社キットでは、18 サイクル実施しました。その後、Nextera XT DNA Sample Preparation Kit を用いてライブラリーを調製し、illumina MiSeq でシーケンスを行いました。その結果、A 社キットに比べて GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit の方が、約 5,000 転写産物をより多く検出することができました。



\*N=2 で実施した平均値です

Percentage of reads(%)	RamDA-seq®		A社キット	
	90.9	86.1	89.5	90.7
Mapped reads	90.9	86.1	89.5	90.7
rRNA+mitochondria	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
Number of transcripts TPM*>0.1	18,984	18,465	13,500	13,721
Number of transcripts TPM*>1	18,338	17,629	12,575	12,616

- ・各試薬について、N=2 で実施
- ・リード数を揃えて解析しています
- ・黄色のセルの数値は % ではなく個数になります

\*TPM (Transcripts Per Million) : 各転写産物のリードカウントに対して遺伝子長が 1,000bp となるように補正した後、各サンプルの総リード数をすべて 100 万に揃えた数値。

### 価格表

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
次世代シーケンス解析用 cDNA 調製キット <b>GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit</b> *1 ・細胞溶解試薬 ・ RT-RamDA™ 試薬 ・ 2 <sup>nd</sup> 鎖合成試薬	24 回用	-20℃	RMD-101T	¥ 118,000
	96 回用	-20℃	RMD-101	¥ 398,000
リアルタイム PCR 解析用 cDNA 調製キット <b>RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit</b> ・細胞溶解試薬 ・ RT-RamDA™ 試薬	24 回用	-20℃	RMD-201T	¥ 59,000
	96 回用	-20℃	RMD-201	¥ 198,000
<b>RamDA Cell Lysis Kit</b> *2 ・細胞溶解試薬	1,152 回用	-20℃	RMD-301	¥ 12,000
<b>NSR Primer Set for human</b> *3	96 回用	-20℃	NSR-101	¥ 24,000
<b>NSR Primer Set for mouse</b> *4	96 回用	-20℃	NSR-102	¥ 24,000

\*1 : 本製品には、ライブラリー調製試薬と磁性ビーズは含まれておりません。また、RT-RamDA® Primer Mix (Oligo-dT primer と Random primer) を含みますが、NSR Primer は含まれておりませんので、別売りの Code No. NSR-101、NSR-102 をご使用ください。 \*2 : Code No. RMD-101, 101T, 201, 201T に含まれる細胞溶解試薬の大包装タイプです。 \*3 : ヒト用の NSR です。 \*4 : マウス用の NSR です。

**TOYOBO**

**東洋紡株式会社**

バイオプロダクト営業部 (大阪)  
〒530-0001 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

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

**Toyobo テクニカルライン**

TEL 06-6348-3888  
(9:00 ~ 12:00 13:00 ~ 17:00 [土日祝日、休日を除く])  
FAX 06-6348-3833  
(E-mail) tech\_osaka@toyobo.jp

**Toyobo Web Site**

[<http://lifescience.toyobo.co.jp/>]



公式 twitter