

概要

GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded KitはRT-RamDA®法により、微量のRNAやシングルセル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キットです。本テクニカルノートでは、コントロールRNA (10 pg、100 pg) をもとにライブラリー調製まで行う具体的な実験操作や、実験した際に参考となるポイントをご紹介します。

使用したもの

< 試薬 >

- Universal Human Reference RNA (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：QS0639)
- GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit (東洋紡、カタログ番号：RML-101)
- NSR Primer Set for human (東洋紡、カタログ番号：NSR-101)
- IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes v2(96 Indexes,96 Samples)
(カタログ番号：20040870)
- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- Agencourt AMPure XP試薬 (Beckman Coulter、カタログ番号：A63880、A63881)

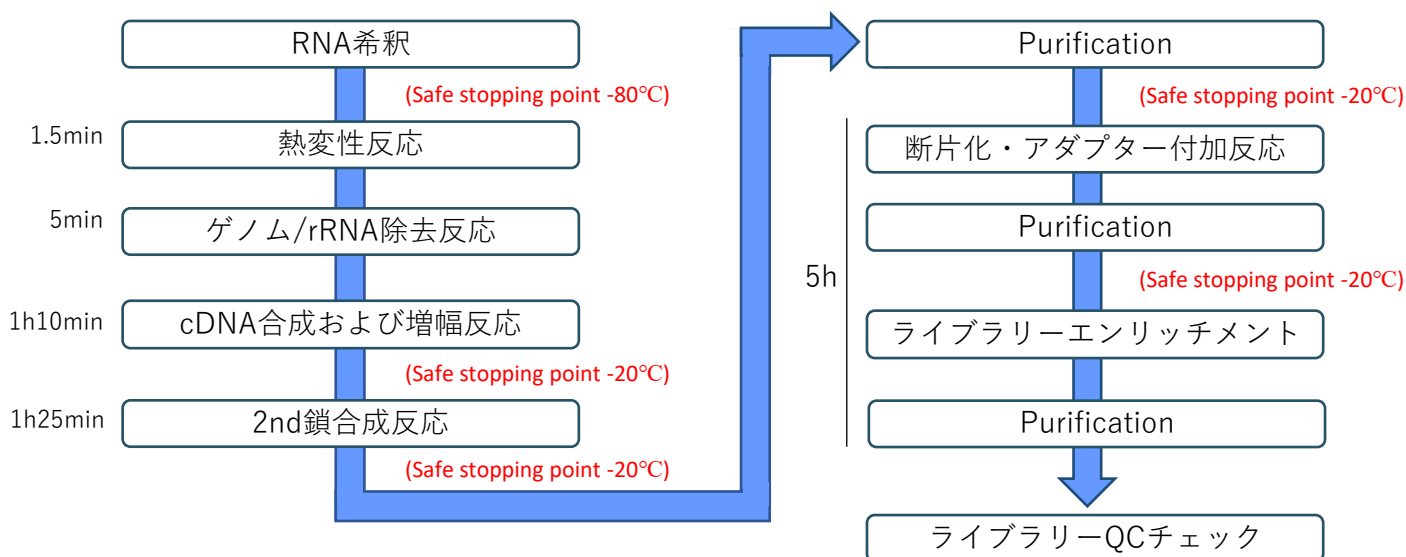
< 消耗品 >

- UC,EU Optical wide area 8-cap strip, Robust while flexible,with wide indented flat cap
(Nippon genetics/BIOplastics、カタログ番号：BPB79701-1)
- RP,UC,SFGC,Extra Robust,Fits shell Frame Grids (0.2 mL)
(Nippon genetics/BIOplastics、カタログ番号：BPB79701-1)

< 器具・機材 >

- Magna Stand for 8-well tube preparation (Nippon genetics、カタログ番号：FG-SSMAG2)

ワークフロー



実施条件

Universal Human Reference RNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を希釈して、No Template Control (NTC)をN=1、10 pg、100 pgをそれぞれN=2でライブラリー調製を実施。

※ 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°C、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

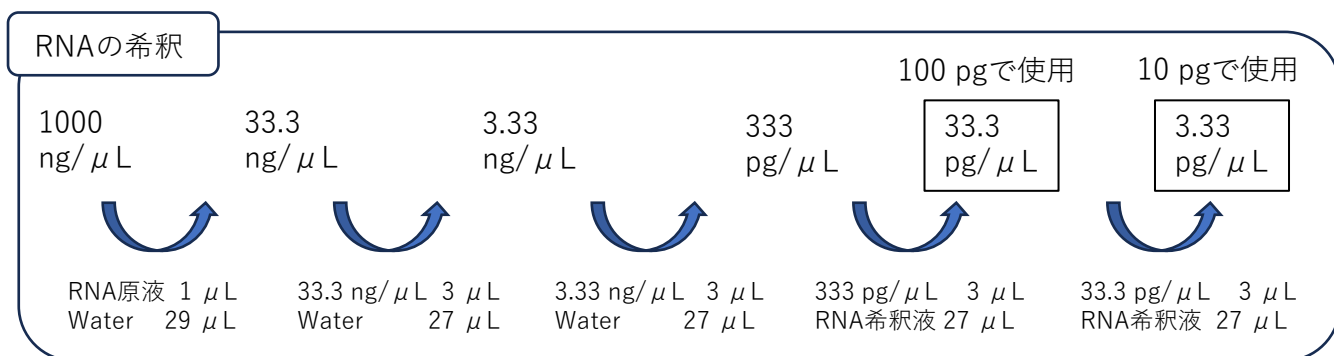
製品の詳細な使用方法是[取扱説明書](#)も併せてご確認ください。

1. サンプルの希釈

(1) まず、RNAを希釈するためのRNA希釈液を氷上で調製。

試薬	1反応 (μL)	20反応 (μL)
① Lysis Buffer	1	20
② Lysis Enhancer	0.95	19
③ RNase Inhibitor	0.05	1
④ Nuclease free water	1	20
合計	3	60

(2) Universal Human Reference RNAをRNA希釈液で希釈する。
希釈後のRNA溶液はRNA希釈液が90%以上となるようにする。



(3) 8連チューブにそれぞれのサンプルを以下のようにNTCにはRNA希釈液3 μL 分注。
100 pgには33.3 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、10 pgには3.33 $\text{pg}/\mu\text{L}$ を使用してN=2で3 μL ずつ分注。

測定サンプル	NTC	100 pg		10 pg	
	1	2	3	4	5

2. 熱変性反応

(1) 遠心して以下のサイクルで熱変性を実施。

<サイクル>
70°C 1.5 min
4°C hold

3. ゲノム / rRNA除去反応

(1) ゲノム除去反応に必要な試薬をチューブに氷上で調製。すべて添加後に混ぜて遠心。

試薬	1反応 (μL)	6反応 (μL) ※
⑤ RT-RamDA® Buffer	0.3	1.8
⑥ gDNA Remover	0.45	2.7
⑦ rRNA Remover	0.25	1.5
④ Nuclease free water	2	12
合計	3	18

※ 余分量を1サンプル分とした場合

(2) 熱変性反応を行った8連チューブに、調製したしたゲノム除去反応液を3μL ずつ添加し、混合。
遠心後、以下の温度でインキュベート。

<サイクル>	
30°C	5 min
4°C	hold

4. cDNA合成および増幅反応（RT-RamDA®反応）

(1) RT-RamDA®反応に必要な試薬をチューブに氷上で調製。すべて添加後に混ぜて遠心。

試薬	1反応 (μL)	6反応 (μL) ※
⑤ RT-RamDA® Buffer	1.5	9
⑧ RT-RamDA® Enzyme Mix	0.45	2.7
⑨ 1st NSR Primer Mix for human	0.45	2.7
④ Nuclease free water	0.6	3.6
合計	3	18

※ 余分量を1サンプル分とした場合

(2) ゲノム除去反応を行った8連チューブに、調製したRT-RamDA®反応液を3μL ずつ添加し、混合。
遠心後、以下の温度でインキュベート。

<サイクル>	
25°C	10 min
30°C	10 min
37°C	30 min
50°C	5 min
98°C	5 min
4°C	hold

参考情報：qPCRによるRT-RamDA®反応の増幅確認

ACTB遺伝子配列をターゲットとして、RT-RamDA®反応でcDNA増幅がきちんと行われているか確認する一例をご紹介します。

本方法は細胞種やターゲットによっても変わってきますので、あくまで目安としてご活用ください（本例はヒト由来の遺伝子増幅を確認しています）。

<StepOne™の場合>

実施条件

RT-RamDA®反応後の溶液 1 μ L を抜き取り、滅菌水で10倍希釈。
希釈後の反応液 2 μ L を鋳型とする。

以下を参考にマスターミックスを調製して、マスターミックスを18 μ L ずつ分注。
以下のサイクルでリアルタイムPCRを実施。

試薬	1反応 (μ L)	7反応 (μ L) ※
KOD SYBR™ qPCR Mix (Code No. QKD-201)	10	70
10uM F primer	0.4	2.8
10uM R primer	0.4	2.8
50x ROX	0.4	2.8
Nuclease free water	6.8	47.6
合計	18	126

ACTBプライマー配列

Forward : CGCGAGAAGATGACCCAGAT

Reverse : GCCAGAGGCGTACAGGGATA

<サイクル>

94°C 2 min

98°C 10 sec

60°C 10 sec

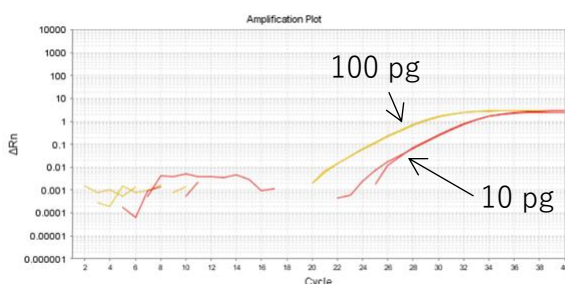
68°C 30 sec

melting curve

x 40 cycles

※ 余分量を1サンプル分とした場合

結果



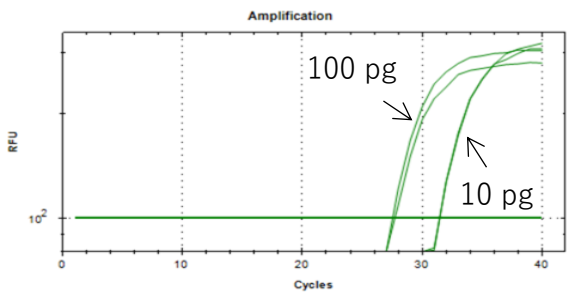
Threshold : 0.1

※ 反応がうまくいっているときにはN=2がそう傾向があります。

		cDNA増幅能のない 逆転写試薬 使用	RT-RamDA® 反応液	
ACTB	10 pg	28.23	23.89	24.12
	100 pg	24.48	20.09	20.35

<CFX96™の場合>

リアルタイムPCR反応液とサイクル条件はStepOne™と同様の条件で実施。



※反応がうまくいっているときにはN=2がそろそろ傾向があります。

		cDNA増幅能のない 逆転写試薬 使用	RT-RamDA® 反応液	
ACTB	10 pg	36.13	31.41	31.42
	100 pg	33.60	27.79	27.55

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氷上で調製。すべて添加後に混ぜて遠心。

試薬	1反応 (μL)	6反応 (μL) ※
⑩ 2nd strand synthesis Buffer	3	18
⑪ 2nd strand synthesis Enzyme	0.5	3
⑫ 2nd NSR Primer Mix for human	2.5	15
合計	6	36

※ 余分量を1サンプル分とした場合

(2) RT-RamDA®反応を行った8連チューブに、調製した2nd鎖合成反応液を6 μL ずつ添加し、混合。
遠心後、以下の温度でインキュベート。

※ qPCRによるRT-RamDA®反応の増幅確認を行い、1 μLを抜き取った場合には、
調製した2nd鎖合成反応液 6 μLの代わりに5.3 μL (8/9 倍量) を添加してください。

<サイクル>

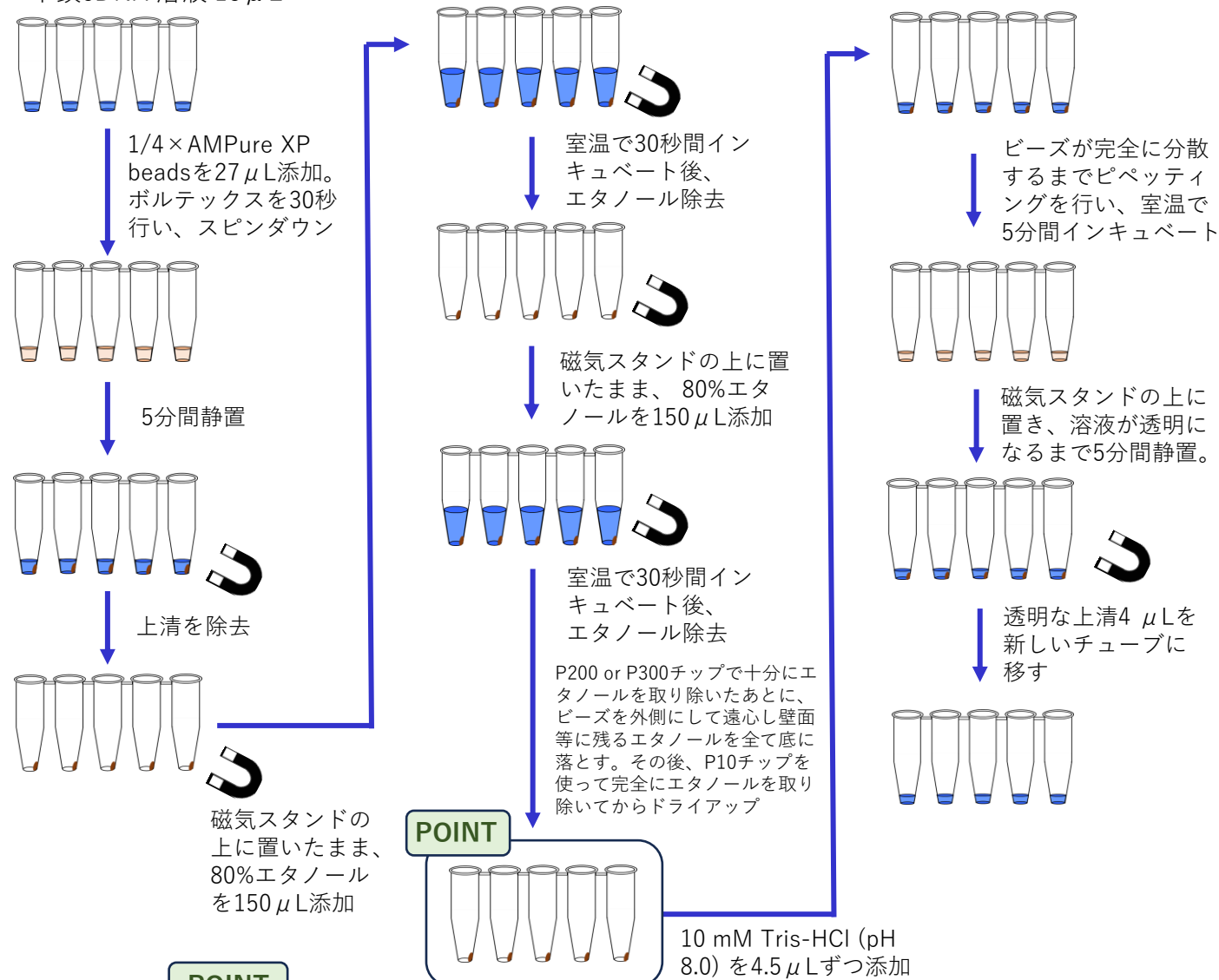
16°C 60 min
80°C 15 min
4°C hold

6. 2本鎖cDNAの精製

準備：4分の1希釈AMPure XP beadsの作製方法（8サンプル分）

- 1×AMPure XP beads 220 μ L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。
- aで回収した上清180 μ Lと1×AMPure XP beads 60 μ L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。

二本鎖cDNA 溶液 15 μ L



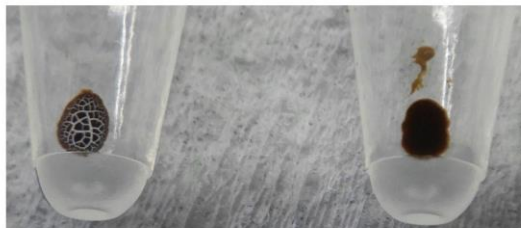
POINT

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



7. 断片化・末端修飾・アデニン付加反応

- (1) 断片化・末端修飾・アデニン付加反応に必要な試薬をチューブに氷上で調製。
すべて添加後に混ぜて遠心。

試薬	1反応 (μL)	6反応 (μL) ※
⑬ Fragmentase	1	6
⑭ ER+AT Buffer	0.8	4.8
⑮ ER+AT Enzyme	0.2	1.2
合計	2	12

- (2) 精製したDNA溶液4 μLに対し、断片化・末端修飾・アデニン付加反応液を2 μLずつ添加し、混合。遠心後、以下の温度でインキュベート。

<サイクル>	
30°C	30 min
65°C	5 min
4°C	hold

※ 断片化・末端修飾・アデニン付加反応後、すみやかに次のステップに進んでください。

8. アダプターライゲーション

準備：アダプターの希釈

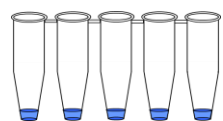
IDT for Illumina – TruSeq® DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)の原液を10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて300倍希釈。

- (1) ⑯ Ligation Solutionをよく攪拌します。
断片化・末端修飾・アデニン付加反応を行った各サンプルに、攪拌した⑯ Ligation Solutionを4 μLずつ添加し、混合。
- (2) 各サンプルに50 nMに希釈したアダプター溶液を1 μLずつ添加。このとき、各サンプルのindexはそれぞれ異なるようにすることに注意。
- (3) タッピングまたは軽くボルテックスすることによって混和し、遠心後、以下の温度でインキュベート。

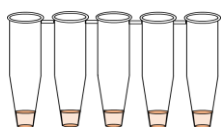
<サイクル>	
20°C	15 min
4°C	hold

9. DNAの精製

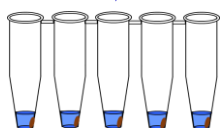
ライゲーション反応液
11 μ L



1×AMPure XPビーズ
を8.8 μ L添加。
ボルテックスを30秒
行い、スピンドウン



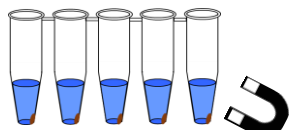
5分間静置



上清を除去



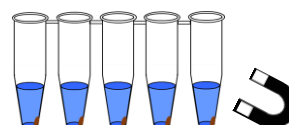
磁気スタンドの
上に置いたまま、
80%エタノール
を150 μ L添加



室温で30秒間イン
キュベート後、
エタノール除去



磁気スタンドの上に置
いたまま、80%エタ
ノールを150 μ L添加



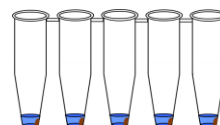
室温で30秒間イン
キュベート後、
エタノール除去

P200 or P300チップで十分にエ
タノールを取り除いたあとに、
ビーズを外側にして遠心し壁面
等に残るエタノールを全て底に
落とす。その後、P10チップを
使って完全にエタノールを取り
除いてからドライアップ

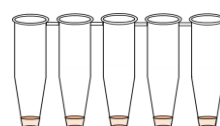
POINT



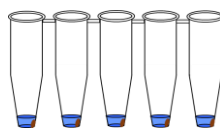
10 mM Tris-HCl (pH
8.0) を7 μ Lずつ添加



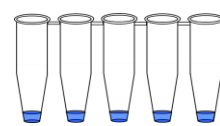
ビーズが完全に分散
するまでピペッティ
ングを行い、室温で
5分間インキュベート



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。



透明な上清6.5 μ L
を新しいチューブ
に移す



POINT

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



1 0. PCR（ライブラリーエンリッチメント）

（1）PCR（ライブラリーエンリッチメント）反応に必要な試薬をチューブに調製。

試薬	1反応（μL）	6反応（μL）※
⑰ Library Amplification Master Mix	2.5	15
⑱ Library Amplification Primer Mix	1	6
合計	3.5	21

※ 余分量を1サンプル分とした場合

（2）精製したDNA溶液6.5 μLに対してPCR反応液を3.5 μLずつ添加し、混合。遠心後、以下のサイクルで

PCRを実施。

<サイクル>	
94℃	30 sec
98℃	10 sec
60℃	10 sec
68℃	15 sec
4℃	hold
← x 20 cycles	

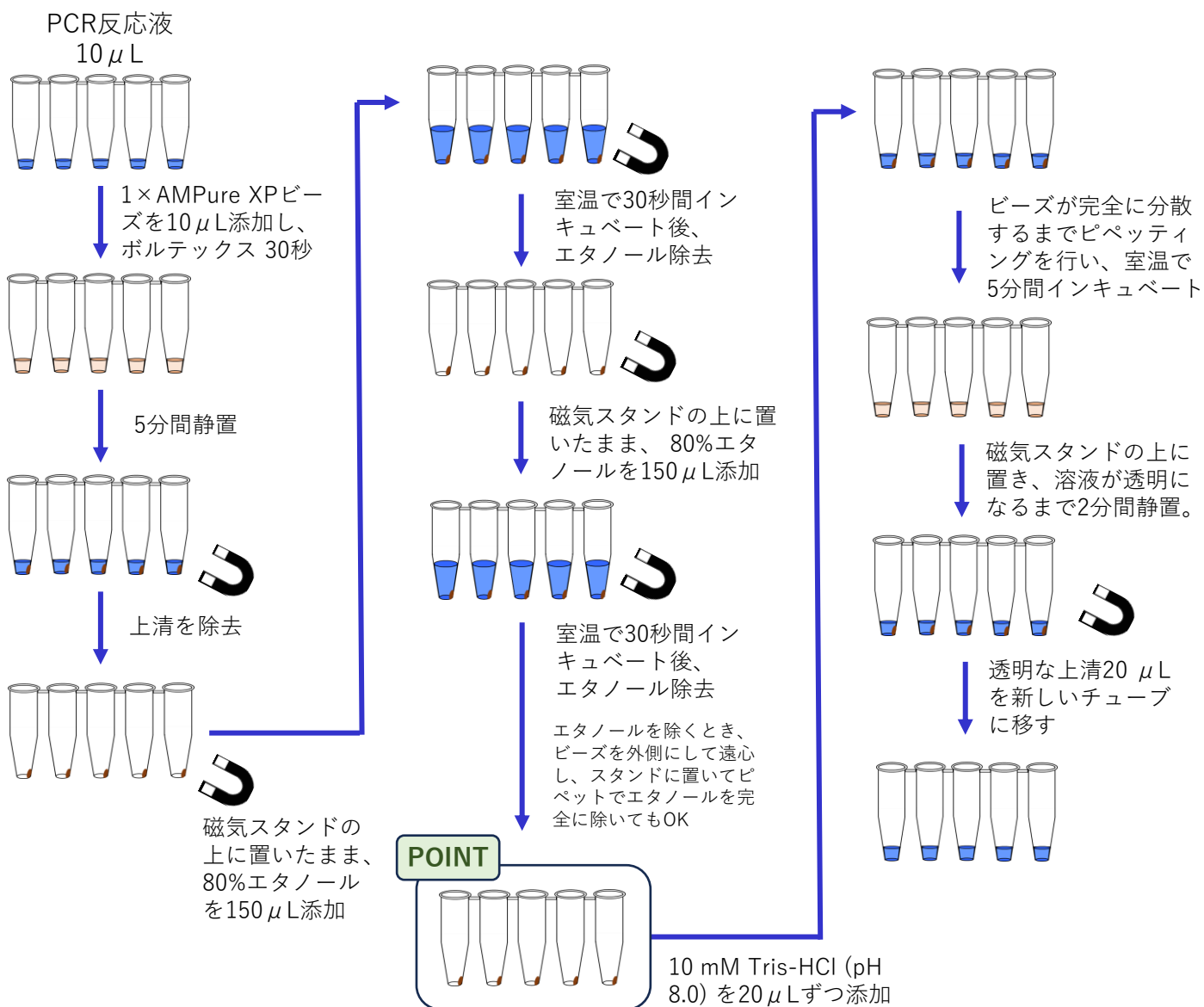
POINT

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	19
5-10pg	19-20

- * 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。

1 1. ライブラリーの精製



POINT

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

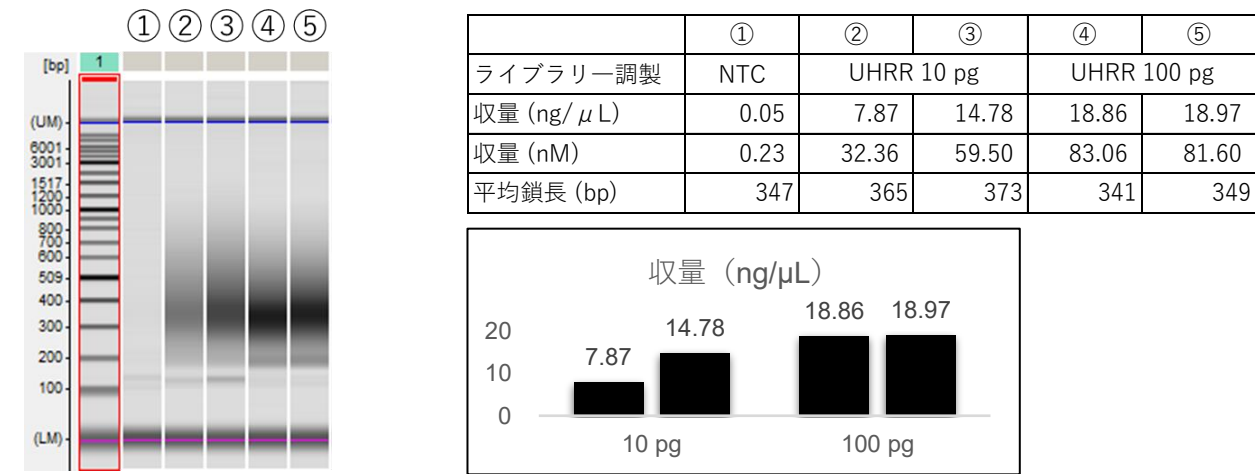
良い例

悪い例



1 2. ライブラリー QC

ライブラリーの分布を、MultiNA（株式会社島津製作所）の電気泳動で確認しました。ライブラリーの定量では、GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101)を使用し確認しました。



まとめ

GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kitを用いて、コントロールRNA（10 pg、100 pg）から十分量のライブラリーを得ることができました。
ライブラリー調製の際の参考や、手技の確認等にご活用ください。

品名	包装	Code No.
GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit *1	24回用	RML-101T
	96回用	RML-101
GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit *2	24回用	RMD-101T
	96回用	RMD-101
RamDA Cell Lysis Kit *3	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

*1 ライブラリー調製試薬を含みます。*2 ライブラリー調製試薬は含んでおりません。
*3 Code No. RMD-101, 101Tに含まれる細胞溶解試薬の大包装タイプです。RML-101, 101Tとの互換性はありません。
※ RT-RamDA®, RamDA-seq®, Shin-RamDA-seq®は理化学研究所の登録商標です。
その他の本資料に記載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

保存温度：-20℃



東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部

(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp
(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
(東京) 〒104-8345
東京都中央区京橋一丁目1 7 番 1 0 号
住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

テクニカルライン

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

WEBサイト

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



toyobo公式x