PCRは東洋紡

GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA with TNP

[Code No. RMF101/NSR101, RMF101T/NSR101, RMF101/NSR102, RMF101T/NSR102, RMF-101, RMF-101T, RMF-111, RMF-111T]

取扱説明書

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

TOYOBO

—目次—

[1]　はじめに・・・　2
[2]　製品内容・・　3
[3]　製品のほかに用意するもの・・　4
[4]　使用方法・・　6
1. RNA 希釈・・・　7
2. 熱変性反応・・　8
3. cDNA 合成および増幅反応(RT-RamDA®反応)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　8
4. 2nd 鎖合成反応・・　11
5. ライブラリー調製・・　12
6. ライブラリー検証・・　17
[5]　トラブルシューティング・・・　19
[6]　関連製品・・　20
[7]　参考文献・・　20

—ご注意—

　本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断･臨床用試薬としては決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、製品 SDS をご参照いただき、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

※RamDA-seq®、RT-RamDA® 、Shin-RamDA-seq®は国立研究開発法人理化学研究所の登録商標です。
※GenNext®は、東洋紡株式会社の研究用試薬を示す登録商標です。
※その他の登録商標または商標は各権利者に帰属します。

[1] はじめに

GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA with TNP は、FFPE 由来 RNA などの分解の進んだ 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キットです。本キットをご使用いただくことで、完全長 total RNA-seq のための NGS ライブラリーを調製でき、ストランド解析も可能です。

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。さらに Shin-RamDA-seq®では、ストランド解析が実装されており、より高精度な RNA-Seq 解析が可能です。

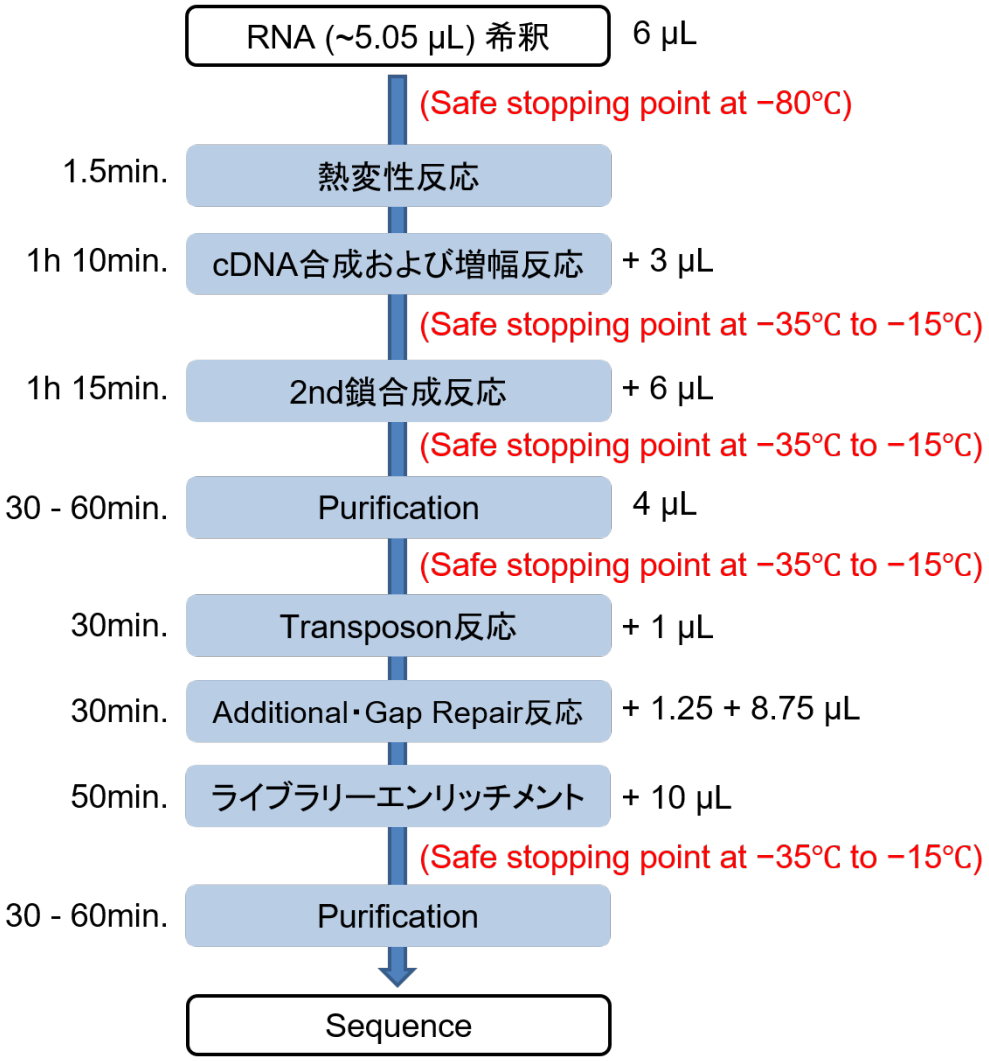


図 1. 本キットのワークフロー

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、ライブラリーエンリッチメントに使用する、磁性ビーズ、インデックスプライマー試薬を含みません。「[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. 微量 RNA から cDNA 調製可能
サンプルとして、10 pg~10 ng total RNA に対応

2. 分解の進んだ RNA を解析可能
分解の進んだ（RIN 値が 5 以下など）ターゲット RNA からライブラリー調製が可能（サンプルの状態によってはライブラリー調製ができない場合があります）

3. 様々な種類の RNA を検出可能
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

4. ストランド解析が可能
ストランド解析が可能です。

◆本キットの解析対象とするサンプルについて◆
本キットでは、FFPE 由来 RNA などの分解の進んだ RNA から NGS 解析用のライブラリー調製を行うため、全く分解していない RNA に対してはライブラリー調製効率がわずかに低下することがあります。また分解の指標については RIN 値や DV200 を参照することがあります。RIN 値や DV200 は Bioanalyzer（アジレント・テクノロジー株式会社）などの装置で解析することが可能です。

[2] 製品内容

GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA with TNP [Code No. RMF-101, RMF-101T] は、cDNA 合成および 2nd 鎖合成を行うキット（GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA [Code No. RMF-111, RMF-111T]）および、ライブラリー調製を行うキット（GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit [Code No. TNP-101, TNP-101T]）から構成されており、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。

GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA
[Code No. RMF-111, RMF-111T]

試薬名	保存	容量	容量
		RMF-111（96 回用）	RMF-111T（24 回用）
①Dilution Buffer	-20℃	480 µL	120 µL
②RNase Inhibitor	-20℃	54 µL	14 µL
③Nuclease free water	-20℃	960 µL	240 µL

④RT-RamDA® Buffer	-20℃	160 µL	40 µL
⑤gDNA Remover	-20℃	54 µL	14 µL
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	-20℃	60 µL	15 µL
⑦2nd strand synthesis Buffer	-20℃	330 µL	83 µL
⑧2nd strand synthesis Enzyme	-20℃	55 µL	14 µL

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit
[Cobe No. TNP-101, TNP-101T]

試薬名	保存	容量	
		TNP-101 （96 反応用*）	TNP-101T （24 反応用*）
①Tagmentation Buffer	-20℃	150 µL	37.5 µL
②Transposase for Tagmentation	-20℃	120 µL	30 µL
③Additional Solution	-20℃	120 µL	30 µL
④Gap Repair Buffer	-20℃	624 µL	156 µL
⑤Gap Repair Enzyme Mix	-20℃	216 µL	54 µL
⑥KOD Master Mix	-20℃	480 µL	120 µL

*カタログではそれぞれ 48 回用（TNP-101）、12 回用（TNP-101T）として販売されていますが、必要な試薬量が 1/2 のため、2 倍の反応が可能です。

―注意事項―

GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA with TNP [Code No. RMF-101, RMF-101T] には、cDNA 合成時に用いるプライマーが付属しておらず、NSR プライマーを別途ご用意いただく必要がございます。NSR プライマーをお持ちでない場合には、セット品 [Code No. RMF101/NSR101 or NSR102, RMF101T/NSR101 or NSR102] での販売もございます。また、磁性ビーズ、NGS 用インデックスプライマーが付属しておりません。【[3] 製品のほかに用意するもの】で後述する NSR プライマー、精製ビーズ、NGS 用インデックスプライマーを別途ご用意ください。

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® RamDA-seq® Single Cell Kit [Code No. RMD-101]、QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit [Code No. RMQ-101]、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit [Code No. RML-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。

・ NSR プライマー
本キットにはプライマーが付属しておらず、NSR Primer Set for human [Code No. NSR-101]または NSR Primer Set for mouse [Code No. NSR-102] を別途ご用意いただく必要がございます（NSR-101 や NSR-102 とのセット品には NSR プライマーが付属しています）。購入される場合は、次頁を参考にヒトまたはマウス用の NSR プライマーをご用意ください。

NSR Primer Set for human [Code No. NSR-101] 96 回用

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

NSR Primer Set for mouse [Code No. NSR-102] 96 回用

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

尚、ご自身で用意したプライマーを使用いただくことも可能ですが、NSR プライマー以外のプライマーを使用した場合、NGS の結果が著しく損なわれることがあります。ご自身で用意したプライマーを用いる場合には、RT-RamDA 反応時に用いる 1st プライマーを 50-60 μM 程度、2nd 鎖合成時に用いる 2nd プライマーを 40-50 μM 程度に濃度を調整してご使用ください。

・ 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。

・ 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。10 mM Tris-HCl (pH 8.0)緩衝液などでも代用可能です。

・ NGS 用インデックスプライマー
Nextera XT Library Prep Kit（Illumina 株式会社）などで使用可能なインデックスプライマー（次ページ参考）が使用できます。

製品名（例）	カタログ番号
Nextera XT Index Kit (24 Indexes, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A-D (96 Indexes, 384 Samples)	FC-131-2001 FC-131-2002 FC-131-2003 FC-131-2004
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654 20091656 20091658 20091660

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

1. RNA 希釈（RNA dilution）

Total RNA を 10 pg～10 ng (5 µL)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 溶液を調製してください。

(1) 精製済みの RNA 液を直接インプットする場合、以下を参考に RNA 溶液を必要量チューブに調製してください。（Nuclease free water の添加量を調整し、液量を 6 µL/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 10 pg~10 ng (2 ng/µL 以下)です。）

RNA 溶液の調製

	1 反応(µL)	20 反応(µL) ※
①Dilution Buffer	0.95	20.9
②RNase Inhibitor	0.05	1.1
RNA 液	x(~5)	x(~110)
③Nuclease free water	Up(5-x)	Up(110-x)
Total	6	132

※余分量を 10%とした場合

もしくは使用する RNA 液が高濃度の場合、以下を参考に RNA 希釈液を調製し、RNA 液を希釈することもできます。

RNA 希釈液の調製（100 µL 分）

②RNase Inhibitor	1
③Nuclease free water	99
Total	100

RNA 液を希釈する場合、RNA 希釈液を用いて RNA 液を 2 ng/µL 以下に希釈し、以下を参考に RNA 溶液を必要量チューブに調製してください。

RNA 溶液の調製

	1 反応(µL)	20 反応(µL) ※
①Dilution Buffer	0.95	20.9
希釈した RNA 液（2 ng/µL 以下）	5.05	111.1
Total	6	132

※余分量を 10%とした場合

(2) 必要に応じて 96 well プレートまたは 8 連チューブに調製した RNA 溶液を 1 well あたり 6 µL 分注します。

(3) その後、すみやかに次のステップ（セクション 2. 熱変性反応）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 6 µL 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) RNA サンプルの分注されたプレートやチューブを 4℃にて遠心し、以下の温度でインキュベートしてください（RNA の高次構造を変性させるために実施します）。

凍結サンプルを使用する場合は熱変性反応前に 4℃または氷上にて融解し、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℃	1.5 min.
	4℃	hold

3. cDNA 合成および増幅反応（RT-RamDA®）

サンプルとして精製 RNA を使用する場合の通常のプロトコルです*。

*ゲノム DNA が多量に混入している場合は本ステップの代わりに次ページの「Optional Protocol: ゲノム除去反応を実施する場合（Digestion of genomic DNA）」に従って実施することで結果が改善することがあります。

(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 Set for human [Code No. NSR-101]または NSR Primer Set for mouse [Code No. NSR-102]が必要です。これらのキット以外のプライマーを用いる場合は 50-60 µM 程度に濃度を調整したプライマーミックスをご使用ください。

RT-RamDA®反応液

	1 反応(µL)	20 反応(µL) ※
③Nuclease free water	0.35	7.7
④RT-RamDA® Buffer	1.2	26.4
⑤gDNA Remover	0.45	9.9
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	0.5	11
1st NSR Primer Mix for human* または 1st NSR Primer Mix for mouse*	0.5	11
Total	3	66

※余分量を 10%とした場合

(2) 熱変性反応を行った 96 well プレートまたは 8 連チューブに、RT-RamDA®反応液を 1 well あたり 3 µL 添加し、攪拌、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℃	10 min.
Priming 2	30℃	10 min.
Reverse transcription and amplification	37℃	30 min.
Reverse transcription 2	50℃	5 min.
Inactivation	98℃	5 min.
	4℃	hold

(3) RT-RamDA®反応後、すみやかに次のステップ（「4. 2nd 鎖合成反応（2nd strand synthesis）」）に進むか、-35℃～-15℃にて保管してください。

Optional Protocol: ゲノム除去反応を実施する場合（Digestion of genomic DNA）

本ステップは「3. cDNA 合成および増幅反応（RT-RamDA®）」を実施いただいた場合は不要です。スキップしてください*。

*本ステップはサンプル中に DNA が多量に混入している場合などに「3. cDNA 合成および増幅反応（RT-RamDA®）」の代わりに実施するプロトコルです。

(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。

ゲノム除去反応液の調製

	1 反応(µL)	20 反応(µL) ※
④RT-RamDA® Buffer	0.2	4.4
⑤gDNA Remover	0.45	9.9
③Nuclease free water＊	0.35	7.7
Total	1	22

※余分量を 10%とした場合

(2) 熱変性反応を行った 96 well プレートまたは 8 連チューブに、ゲノム反応液を 1 well あたり 1 µL 添加し、攪拌、遠心後、以下に示す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℃	5 min.
	4℃	hold

(3) 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 Set for human [Code No. NSR-101]または NSR Primer Set for mouse [Code No. NSR-102]が必要です。これらのキット以外のプライマーを用いる場合は 50-60 μM 程度に濃度を調整したプライマーミックスをご使用ください。

RT-RamDA®反応液

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※
④RT-RamDA® Buffer	1.0	22
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	0.5	11
1st NSR Primer Mix for human* または 1st NSR Primer Mix for mouse*	0.5	11
Total	2	44

※余分量を 10%とした場合

(4) ゲノム除去反応を行った 96 well プレートまたは 8 連チューブに、RT-RamDA®反応液を 1 well あたり 2 μL 添加し、攪拌、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℃	10 min.
Priming 2	30℃	10 min.
Reverse transcription and amplification	37℃	30 min.
Reverse transcription 2	50℃	5 min.
Inactivation	98℃	5 min.
	4℃	hold

(5) RT-RamDA®反応後、すみやかに次のステップ（「4．2nd 鎖合成反応（2nd strand synthesis）」）に進むか、-35℃～-15℃にて保管してください。

4. 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 Set for human [Code No. NSR-101]または NSR Primer Set for mouse [Code No. NSR-102]が必要です。これらのキット以外のプライマーを用いる場合は 40-50 μM 程度に濃度を調整したプライマーミックスをご使用ください。

2nd 鎖合成反応液

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※
⑦2nd strand synthesis Buffer	3	63
⑧2nd strand synthesis Enzyme	0.5	10.5
2nd NSR Primer Mix for human* または 2nd NSR Primer Mix for mouse*	2.5	52.5
Total	6	126

※余分量を 5%とした場合

(2) RT-RamDA®反応を行った 96 well プレートまたは 8 連チューブに、2nd 鎖合成反応液を 1 well あたり 6 μL 添加し、攪拌、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℃	60 min.
Inactivation	80℃	15 min.
	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、-35℃～-15℃にて保管してください。

5. ライブラリー調製（Library Preparation）

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit を用いた方法を以下に記載します。本キットには、Nextera XT Index Kit（Illumina 株式会社）や Agencourt AMPure XP ビーズ（Beckman Coulter 社）を含みません。【[3] 製品のほかに用意するもの】を参考に精製ビーズ、NGS 用インデックスプライマーを別途ご用意ください。

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 220 µL 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 180 µL と 1×AMPure XP beads 60 µL 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) 4.(3)の 2nd 鎖合成反応後の二本鎖 cDNA 溶液 15 µL に対して、4 分の 1 希釈 AMPure XP beads を 27 µL 添加してください。その後、遠心を行い、25℃、2,000 rpm 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 150 µL 加え、室温で 30 秒間インキュベートします。

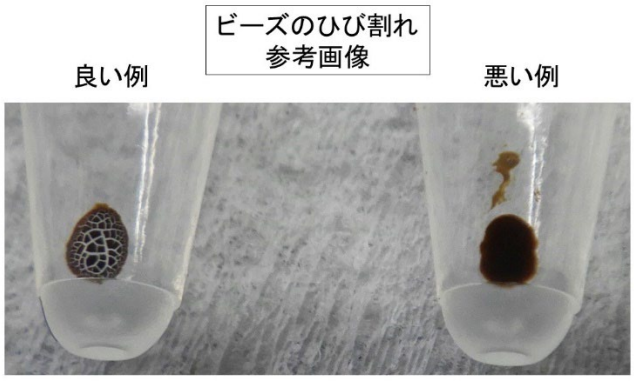
(5) エタノールを除去します。

(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 150 µL 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。



(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) ※1	20 反応(µL) ※1
①Tagmentation Buffer	1.5	30
Nuclease free water ※2	3.3	66
Total	4.8	96

※1　余分量を 14%とした場合

※2　GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA に付属の③Nuclease free water を使用できます

(10) 96 well プレートまたは 8 連チューブに、溶出液を 1 well あたり 4.2 µL 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 4 µL を新しいチューブあるいはプレートに移し、次のステップに進むか、-35℃～-15℃にて保管してください。

B. トランスポゾンによる断片化・タグメント化反応

(1) 精製した二本鎖 cDNA に対して②Transposase for Tagmentation を 1 well あたり 1 µL 添加し、攪拌、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	45℃	30 min.
	4℃	hold

C. Additional 反応

(1) タグメンテーションした二本鎖 cDNA に対し、③Additional Solution を 1 well あたり 1.25 µL 添加します。その後、遠心を行い、25℃、2000 rpm にて 1 分間撹拌し、5 分間静置してください。

D. Gap Repair 反応

(1) ④Gap Repair Buffer を 6.5 µL ずつ添加し、遠心します。

(2) ⑤Gap Repair Enzyme Mix を 2.25 µL ずつ添加し、攪拌、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

Gap Repair 反応

Step	Temperature	Time
Gap Repair	20℃	20 min.
Denature	75℃	10 min.
	4℃	hold

E. ライブラリーエンリッチメント

(1) Gap Repair 反応後の溶液 15 µL に対し、KOD Master Mix を 5 µL 添加し、遠心します。その後、Nextera XT Library Prep Kit などで使用可能な Index primer F と Index primer R をそれぞれ 2.5 µL ずつ（Nextera XT index Kit の場合）、またはプライマーミックスを 5 µL ずつ（Illumina DNA/RNA UD Indexes の場合）添加し、遠心します。

例えば、以下のインデックスプライマーキットは使用可能です。インデックスプライマーをご自身で用意される場合は 3 µM 程度に調整して使用ください。

製品名（例）	カタログ番号
Nextera XT Index Kit (24 Indexes, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A-D (96 Indexes, 384 Samples)	FC-131-2001 FC-131-2002 FC-131-2003 FC-131-2004
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654 20091656 20091658 20091660

(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	
Denature	94℃	2 min.	
PCR	98℃ 60℃ 68℃	10 sec. 30 sec. 30 sec.	14-20 cycles *
	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。*

RIN 値が 3 以上	RIN 値が 3 未満で DV200 が 60%以上	RIN 値が 3 未満で DV200 が 60%未満	PCR サイクル数
10 ng-100 pg	-	-	14-16
100 pg 未満	10 ng-100 pg	10 ng-1 ng	16-18
-	100 pg 未満	1 ng 未満	18-20

＊RIN 値が 6 以上でインプット量を 1 ng 以上とする場合、ライブラリー調製効率がわずかに低下することがあります。[5] トラブルシューティングもご参考ください。
＊ライブラリー収量が多い場合、PCR サイクルを減らすことで NGS 解析の結果が改善することがあります。
＊21 サイクル以上に増やすことも可能ですが、NGS 解析での結果に悪影響を及ぼす可能性があります。

F. ライブラリーの精製

(1) PCR 溶液　25 µL に対して 1×AMPure XP　beads を 25 µL 添加してください。その後、遠心を行い、25℃、2,000 rpm 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 150 µL 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 150 µL 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.13　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) 96 well プレートまたは 8 連チューブに TE Buffer を 1 well あたり 20 µL 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 20 µL 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、-35℃～-15℃にて保管してください。

6. 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 株式会社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。

(3) ライブラリーの再精製

(2)でライブラリー分布を確認した結果、100 - 150 bp 程度のアダプターダイマー様のバンドが確認されることがあります。目的のライブラリー部分に比べて少量（20%未満）であれば問題ありませんが、目的のライブラリー部分と等量以上確認されるような場合、NGS 解析の結果に影響する可能性があります。

このような場合、以下のプロトコルで再精製を実施することでサイズセレクションを行い、ダイマーの割合を減らすことが可能です（ただし、目的のライブラリー量もわずかに減少します）。

1. まず再精製するサンプルのプール液を調製します。前セクションで調製したサンプルのうち、NGS 解析予定のライブラリー溶液を等モル液量ずつ混合し、30 - 100 µL 程度のサンプルプール液を調製してください。

2. サンプルプール液に対して等量の 1×AMPure XP beads を添加してください。その後、遠心を行い、25℃、2,000 rpm 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 150 µL 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 150 µL 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。

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（p.13 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。

9. 96 well プレートまたは 8 連チューブに TE Buffer を 1 well あたり 20 - 50 µL 添加し、遠心します。

10. 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。

11. 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。

12. 透明な上清 20 - 50 µL を新しいチューブあるいはプレートに移し、再度 QC を実施するか、-35℃～-15℃にて保管してください。尚、得られたライブラリーにはプールした複数のサンプルが含まれているため、NGS 解析をする際の添加量やインデックスの指定にはご注意ください

[5] 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 の分解が進みすぎている	・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。 ・RNA 希釈のステップは氷上にて行ってください。 ・DV200 が 30%未満になると、ライブラリー調製の効率が著しく下がります。このような分解の進んだ RNA では、インプットする RNA 量を 1 ng 以上に増やすことで結果が改善することがあります。
	RIN 値が高すぎる、または RNA の持ち込み量が多すぎる	・RIN 値が 6 以上で RNA の量が 1 ng を超えている場合、ライブラリー調製効率がわずかに低下することがあります。このような場合には、RNA のインプット量を 1 ng 程度にすることで結果が安定することがあります。 また RNA の持ち込み量が 1 ng を下回る場合でも、RIN 値が高いサンプルでは、本製品の代わりに GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit with TNP [Code No. RML101/TNP101, RML101T/TNP101T] を用いることで収量が改善することがあります。
rRNA 率が高い	rRNA の残存	・rRNA 率を低減するために、Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit（カタログ番号 : 20037135、20040526）などの rRNA 除去試薬で処理した RNA を用いてライブラリー調製を行うことも可能です。 ・RIN 値が高いサンプルでは、本製品の代わりに GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit with TNP [Code No. RML101/TNP101, RML101T/TNP101T] を用いることで、NGS 解析における rRNA 率を低減できることがあります。

結果が安定しない、日間差、サンプル間差が大きい	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続く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。

[6] 関連製品

品名	内容	Code No.
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.
Illumina 株式会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
NGS 解析用 cDNA 調製キット **GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit**	96 回用	RMD-101
NGS 解析用ライブラリー調製キット（ライゲーションベース） **GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit**	96 回用	RML-101
NGS 解析用ライブラリー調製キット（トランスポゼースベース） **GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit with TNP**	96 回用	RML111/TNP101

[7] 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　遺伝子試薬・診断薬事業部　(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　遺伝子試薬・診断薬事業部　(東京)
〒104-8345　東京都中央区京橋一丁目17番10号
京橋　One Terrace
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　遺伝子試薬・診断薬事業部 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/