



GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®]
Single Cell Stranded Kit
(Code No. RML-101, RML-101T)

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. 細胞溶解または RNA 希釈	7
	2. 熱変性反応	10
	3. ゲノム除去反応	11
	4. cDNA 合成および増幅反応(RT-RamDA [®] 反応)	11
	5. 2nd 鎖合成反応	12
	6. ライブラリー調製	13
	7. ライブラリー検証	19
[5]	実施例	20
[6]	トラブルシューティング	23
[7]	関連製品	24
[8]	参考文献	24

—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、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、東洋紡株式会社の登録商標です。

※その他の登録商標または商標は各所有者に帰属します。

[1] はじめに

GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit は、GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit の改良版にあたり、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、rRNA のさらなる低減や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。

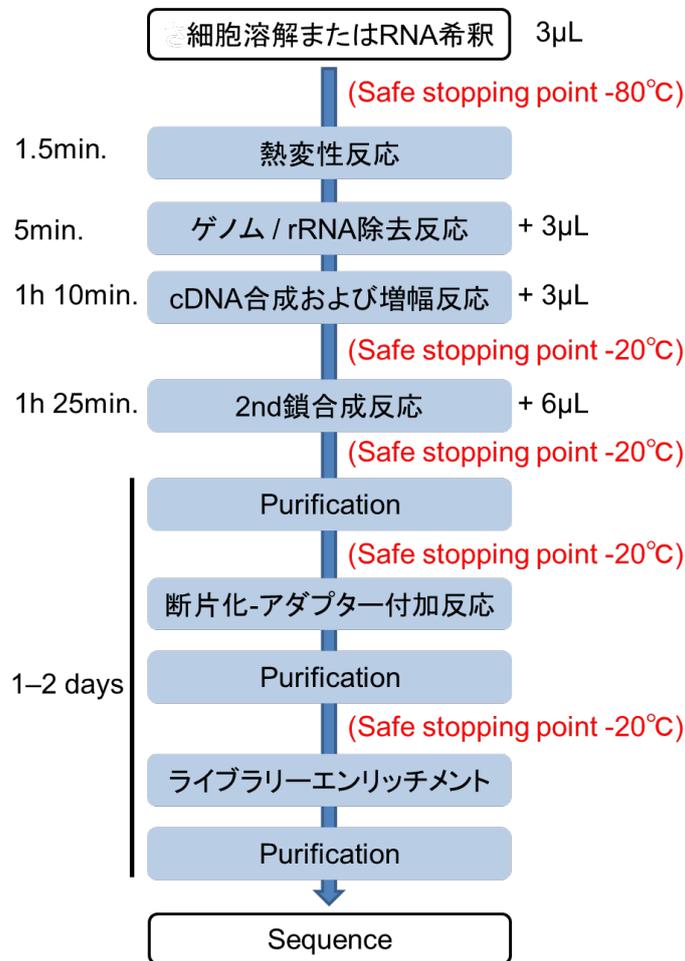


図 1. 本キットのワークフロー

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、アダプター付加反応に使用する、磁性ビーズ、インデックスアダプタ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. 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. 完全長 cDNA を解析可能

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

4. ライブラリー調製まで対応(別途アダプターは必要)

本キットで cDNA 増幅後の Illumina 株式会社 NGS 用ライブラリー調製まで行うことができます(別途 Agencourt AMPure XP 試薬(Beckman Coulter 社)などの精製ビーズ、TruSeq[®] DNA Single Indexes (Illumina 株式会社)などのアダプターキットが必要です)。

5. スtrand解析が可能

strand解析が可能です。

[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。

GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®] Single Cell Stranded Kit
(Code: RML-101, RML-101T)

試薬名	保存	容量 (RML-101)	容量 (RML-101T)
① Lysis Buffer	-20℃	240 μL	60 μL
② Lysis Enhancer	-20℃	240 μL	60 μL
③ RNase Inhibitor	-20℃	22 μL	6 μL
④ Nuclease free water	-20℃	960 μL	240 μL
⑤ RT-RamDA [®] Buffer	-20℃	240 μL	60 μL
⑥ gDNA Remover	-20℃	54 μL	14 μL
⑦ rRNA Remover	-20℃	30 μL	8 μL
⑧ RT-RamDA [®] Enzyme Mix	-20℃	54 μL	14 μL
⑨ RT-RamDA [®] Primer Mix	-20℃	54 μL	14 μL
⑩ 2nd strand synthesis Buffer	-20℃	330 μL	83 μL

⑪2nd strand synthesis Enzyme	-20℃	55 μL	14 μL
⑫2nd strand synthesis Primer Mix	-20℃	275 μL	69 μL
⑬Fragmentase	-20℃	120 μL	30 μL
⑭End Repair and A-tailing Buffer	-20℃	96 μL	24 μL
⑮End Repair and A-tailing Enzyme	-20℃	24 μL	6 μL
⑯Ligation Solution	-20℃	480 μL	120 μL
⑰Library Amplification Master Mix	-20℃	300 μL	75 μL
⑱Library Amplification Primer Mix	-20℃	120 μL	30 μL

—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® RamDA-seq® Single Cell Kit (Code: RMD-101)、RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit (Code: RMD-201)、RamDA シリーズ用 Cell Lysis Kit (Code: RMD-301)、QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit (Code: RMQ-101)、GenNext® NGS Library Prep Kit (Code: LPK-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 (サンブラテック 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。

- インデックスアダプター
インデックスを有する TruSeq®(Illumina 株式会社)などのライブラリー作製で一般的に使用されるアダプターが使用できます。

製品名(例)	カタログ番号
TruSeq® DNA Single Indexes Set A (12 Indexes, 24 Samples)	20015960
TruSeq® DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	20015949
IDT for Illumina – TruSeq® DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)	20040870

- 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°C	54µL
2nd NSR Primer Mix for human	-20°C	275µL

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

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

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
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	サンブラテック	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°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

- 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.7)	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.8)	
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	1	22	110
②Lysis Enhancer	0.95	20.9	104.5
③RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④Nuclease free water	1	22	110
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°C 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(セクション 2. 熱変性反応)に進むか、-80°C 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 3 μ L 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 μ L に 1 μ L 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 1 μ L 以下としてください。

- (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 1 μ L 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 1 μ L の場合

	1 反応(μ L)	20 反応(μ L) ※	100 反応(μ L) ※
① Lysis Buffer	1	22	110
② Lysis Enhancer	0.95	20.9	104.5
③ RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
Total	2	44	220

※余分量を 10%とした場合

例) 細胞サンプルの液量が 1 μ L 未満(x μ L)の場合

	1 反応(μ L)	20 反応(μ L) ※	100 反応(μ L) ※
① Lysis Buffer	1	22	110
② Lysis Enhancer	0.95	20.9	104.5
③ RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④ Nuclease free water	1-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 μ L (細胞サンプルが 1 μ L 未満の場合は(3-x) μ L) 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ Cにて保管を行い、細胞サンプル 1 μ L (細胞サンプルが 1 μ L 未満の場合は x μ L) 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(セクション 2. 熱変性反応)に進むか、-80 $^{\circ}$ Cにてサンプルを保管してください*。

*-80 $^{\circ}$ Cで保存する場合は、分注後の 3 μ L 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。

C. 精製済みの total RNA を使用する場合

次工程に total RNA を 10pg~1ng (3 μ L)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なになりますので、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 3 μ L/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 1 μ L/1 反応までアプライできます。

RNA 溶液の調製

	1 反応(μ L)
①Lysis Buffer	1
②Lysis Enhancer	0.95
③RNase Inhibitor	0.05
④Nuclease free water	1-x
RNA 液	x(~1)
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/ μ L 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(μ L)
①Lysis Buffer	110
②Lysis Enhancer	104.5
③RNase Inhibitor	5.5
④Nuclease free water	110
Total	330

RNA 希釈例)

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

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

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

	(μ L)	RNA 希釈液 終濃度
333pg/ μ L 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 3 μ L 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(セクション 2. 熱変性反応)に進むか、-80 $^{\circ}$ C にてサンプルを保管してください*。

*-80 $^{\circ}$ C で保存する場合は、分注後の 3 μ L 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C	1.5min.
	4 $^{\circ}$ C	hold

3. ゲノム / rRNA 除去反応 (Digestion of genomic DNA and rRNA)

RT-RamDA®による増幅反応に必要なになりますので、ゲノム / rRNA 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
⑥gDNA Remover	0.45	9.9	49.5
⑦rRNA Remover	0.25	5.5	27.5
④Nuclease free water *	2	44	220
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 / rRNA 除去反応

Step	Temperature	Time
Genomic DNA / rRNA digestion	30°C	5min.
	4°C	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。次ページを参考に調製してください。

* NSR Primer を使用する場合は、⑨RT-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
⑧RT-RamDA® Enzyme Mix	0.45	9.9	49.5
⑨RT-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°C	10min.
Priming 2	30°C	10min.
Reverse transcription and amplification	37°C	30min.
Reverse transcription 2	50°C	5min.
Inactivation	98°C	5min.
	4°C	hold

- (3) RT-RamDA®反応後、すみやかに次のステップに進むか、-20°C~-30°C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) ※
⑩2nd strand synthesis Buffer	3	63	315
⑪2nd strand synthesis Enzyme	0.5	10.5	52.5
⑫2nd 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 6 μ L 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 $^{\circ}$ C	60min.
Inactivation	80 $^{\circ}$ C	15min.
	4 $^{\circ}$ C	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 $^{\circ}$ C~-30 $^{\circ}$ Cにて保管してください。

6. ライブラリー調製 (Library Preparation)

本キットには、TruSeq[®] DNA Single Indexes (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」(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 ビーズ (本製品には含まれません) を作製してください。希釈液は、AMPure XP ビーズを遠心し、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 ビーズの作製方法

- 1 \times AMPure XP ビーズ 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 \times AMPure XP ビーズ 60 μ L を良く混合し、4 分の 1 希釈 AMPure XP ビーズ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 15 μ L に対して、4 分の 1 希釈 AMPure XP ビーズを 27 μ L 添加してください。その後、遠心を行い、25 $^{\circ}$ C、2,000rpm にて 2 分間攪拌し、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 μ L 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 μ L 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、マイクロピペット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 $^{\circ}$ Cまたは室温で5分間、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(参考写真を下記に掲載)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) 96wellプレートまたは8連チューブに、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を1wellあたり4.5 μ L 添加し、遠心します。
- (10) ビーズが完全に分散するまでボルテックスまたはピペッティングを行い、25 $^{\circ}$ Cまたは室温で5分間インキュベートします。
- (11) 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。
- (12) 透明な上清4 μ L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、-30 $^{\circ}$ C~-20 $^{\circ}$ Cにて保管してください。

B. 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作製します。以下を参考に調製してください。

断片化・末端修飾・アデニン付加反応液

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
⑬Fragmentase	1	22	110
⑭ER+AT Buffer	0.8	17.6	88
⑮ER+AT Enzyme	0.2	4.4	22
Total	2	44	220

※余分量を 10%とした場合

- (2) 精製した DNA 溶液 4μL に対し、断片化・末端修飾・アデニン付加反応液を 2μL 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。

断片化・末端修飾・アデニン付加反応

Step	Temperature	Time
Fragmentation+ER+AT	30°C	30min.
Inactivation	65°C	5min
	4°C	hold

- (3) 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。

C. アダプターライゲーション

- (1) アダプター(本製品には含まれません)を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて 50 nM に希釈します。

尚、以下表中の製品を使用する場合、原液を 300 倍希釈してください。

製品名	カタログ番号
TruSeq® DNA Single Indexes Set A (12 Indexes, 24 Samples)	20015960
TruSeq® DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	20015949
IDT for Illumina – TruSeq® DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)	20040870

- (2) ⑯Ligation 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⑯Ligation Solution を 4 μL ずつ添加します。

- (3) 各サンプルに 50 nM に希釈したアダプター溶液を 1 μ L ずつ添加します。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してください。
- (4) 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してください。

アダプターライゲーション

Step	Temperature	Time
アダプターライゲーション	20°C	15min.
	4°C	hold

D. DNA の精製 (サイズセレクション)

- (1) アダプターライゲーション後の反応液 11 μ L に対して、1 \times AMPure XP ビーズを 8.8 μ L 添加してください。その後、遠心を行い、25°C、2,000rpm にて 2 分間攪拌し、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 μ L 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 μ L 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。エタノールが残存している場合は、マイクロピペットを用いてエタノールを除去してください。
- (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°Cまたは室温で 5 分間、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(参考写真を 6.A 二本鎖 cDNA の精製-(8)に掲載)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、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 1well あたり 7 μ L 添加し、遠心します。

- (9) ビーズが完全に分散するまでボルテックスまたはピペッティングを行い、25°C または室温で5分間インキュベートします。
- (10) 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。
- (11) 透明な上清 6.5 μ L 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、-20°C~-30°Cにて保管してください。

E. 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作製します。以下を参考に調製してください。

PCR 反応液

	1 反応(μ L)	20 反応(μ L) ※	100 反応(μ L) ※
⑰Library Amplification Master Mix	2.5	55	275
⑱Library Amplification Primer Mix	1	22	110
Total	3.5	77	385

※余分量を 10%とした場合

- (2) 精製した DNA 溶液 6.5 μ L に対して PCR 反応液を 3.5 μ L ずつ添加し、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°C	30sec.	
PCR	98°C	10sec.	19-20 cycles*
	60°C	10sec.	
	68°C	15sec.	
	4°C	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	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。

F. ライブラリーの精製

- (1) PCR 溶液 10 μ L に対して 1 \times AMPure XP ビーズを 10 μ L 添加してください。その後、遠心を行い、25 $^{\circ}$ C、2,000rpm にて 2 分間攪拌し、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 μ L 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 μ L 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 $^{\circ}$ Cまたは室温で 5 分間、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(参考写真を 6.A 二本鎖 cDNA の精製-(8)に掲載)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 10 mM Tris-HCl (pH8.0)(または TE Buffer (pH8.0))を 1well あたり 20 μ L 添加し、遠心します。
- (9) ビーズが完全に分散するまでボルテックスまたはピペッティングを行い、25 $^{\circ}$ Cまたは室温で 5 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 μ L 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 $^{\circ}$ C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 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。分布例は続く[5]実施例の 実施例 1. 細胞からのライブラリー調製、NGS 解析 などをご参考ください。

[5] 実施例

実施例1 細胞からのライブラリー調製、NGS 解析

<方法>

本製品を用いて、平均化したマウス由来 NIH3T3 細胞 1 細胞分からライブラリー調製を行い、Agilent 4200 TapeStation システム(アジレント・テクノロジー株式会社)によるライブラリーサイズ分布の確認、Miseq(Illumina 株式会社)による NGS 解析を行いました(n = 4)。

尚、逆転写反応時および 2nd 鎖合成反応時のプライマーとして本製品付属のプライマー(⑨RT-RamDA® Primer Mix、⑫2nd strand synthesis Primer Mix)または NSR プライマー(NSR Primer Set for mouse、NSR-102)を用いました。インデックスアダプターとしては TruSeq® DNA Single Indexes Set A(12 Indexes, 24 Samples)を用い、ライブラリーエンリッチメント反応時の PCR サイクル数は 20 サイクルで実施しました。

<結果>

まずライブラリーサイズ分布はランダムプライマーであっても大きな変化はなく、300 bp 前後、10~60 nM 程度のライブラリーが得られました(図 1、2)。

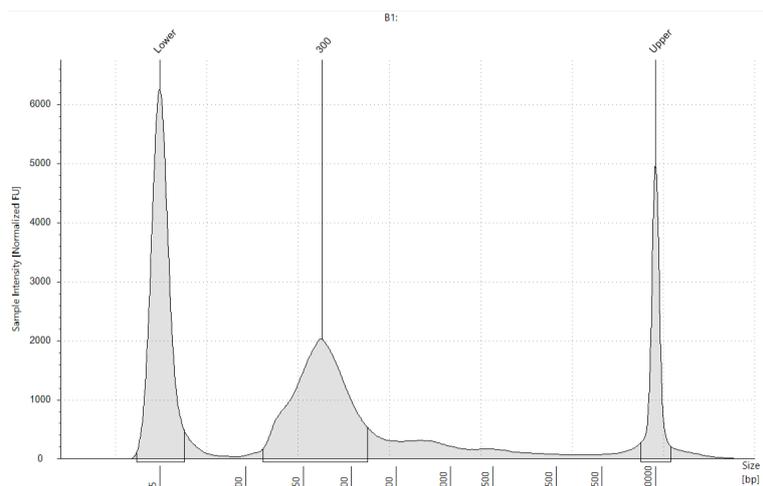


図 1. ランダムプライマーでのライブラリーサイズ分布

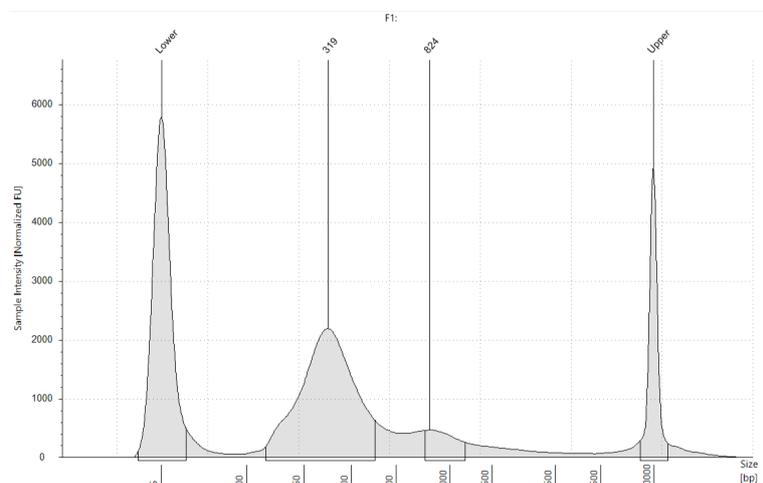


図 2. NSR プライマーでのライブラリーサイズ分布

また NGS 解析で得られたシーケンスデータを BaseSpace Sequence Hub (Illumina 株式会社) 上の RNA-Seq Alignment Version 2.0.2 (Illumina 株式会社) にて Mus musculus/mm10 (RefSeq) をリファレンスとして解析したところ、表 1 および図 3 のような結果が得られました。マッピング率やストランド解析率が高く、アバンダントな遺伝子である rRNA 率を抑えての解析が可能であり、遺伝子の全長性(カバレッジ)にも優れていることがわかります。

表 1. NGS 解析の基礎データ

	マッピング率	rRNA率	ストランド解析率
Shin-RamDA-seq® Kit (ランダムプライマー)	91.54%	28.57%	97.24%
Shin-RamDA-seq® Kit (NSRプライマー)	90.50%	11.47%	96.94%

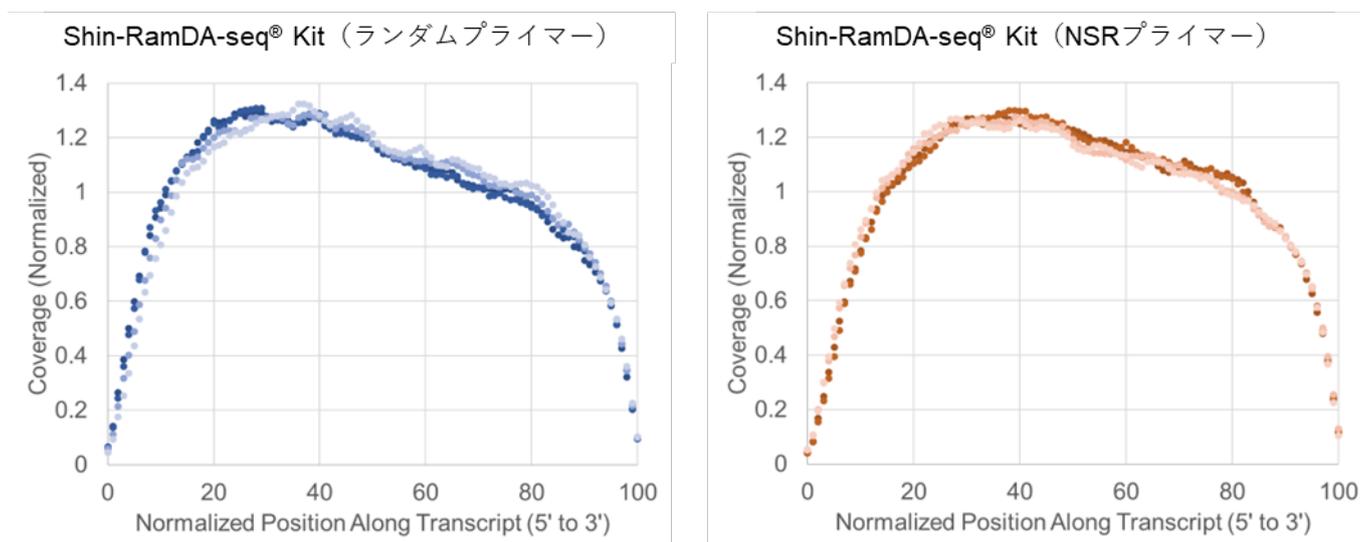


図 3. NGS 解析における全遺伝子の平均カバレッジ

横軸はマッピングされた全遺伝子における 5'末端(横軸における 0)から 3'末端(横軸における 100)の平均カバレッジを示しており、縦軸は平均が 1 になるように正規化されたカバレッジの高さを示しています。

実施例 2 個々の遺伝子におけるカバレッジ解析、ストランド解析

<方法>

本製品を用いて、平均化したヒト白血病細胞株 K562 細胞 1 細胞分からライブラリー調製を行い、実施例 1 と同様に Miseq (Illumina 株式会社) による NGS 解析を行いました (n = 4)。

尚、逆転写反応時および 2nd 鎖合成反応時のプライマーとして本製品付属のプライマー NSR プライマー (NSR Primer Set for mouse, NSR-102) を用いました。インデックスアダプターとしては TruSeq® DNA Single Indexes Set A (12 Indexes, 24 Samples) を用い、ライブラリーエンリッチメント反応時の PCR サイクル数は 20 サイクルで実施しました。

<結果>

NGS 解析で得られたシーケンスデータをシングルセル RNA-Seq 用のカバレッジ解析ツールである Millefy ^{参考文献(2)} (<https://github.com/yuifu/millefy>) を用いて解析しました。長鎖ノンコーディング RNA である NEAT1 遺伝子 (3.7 kb 程度の NEAT1_1 と 23 kb 程度の NEAT1_2 の 2 種類) および、逆向きに転写され、かつ隣接する遺伝子である RBM18 遺伝子と MRRF 遺伝子について解析したところ、図 4 および図 5 のような結果が得られました。長鎖ノンコーディング RNA における全長性や、逆向きに転写される RNA のストランド解析においても高い性能を発揮していることがわかります。

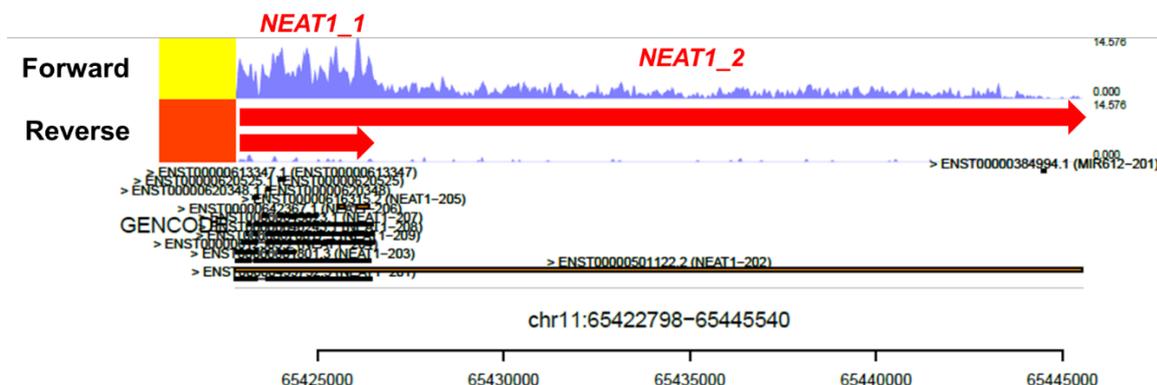


図 4. NEAT1 遺伝子のカバレッジ解析の結果

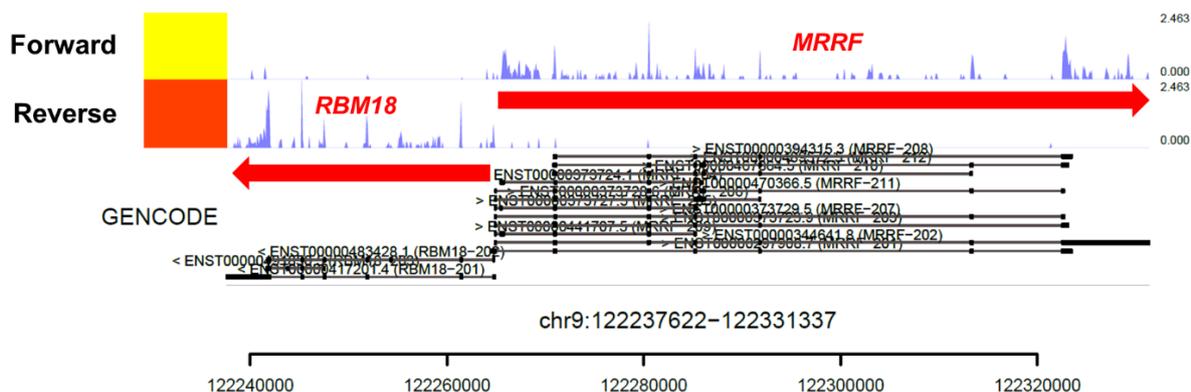


図 5. MRRF 遺伝子および RBM18 遺伝子のカバレッジ解析の結果

[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	<ul style="list-style-type: none">・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	<ul style="list-style-type: none">・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く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%以下にすることを勧めします。

[7] 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 /20 μ L 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

[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)
- (2) Ozaki H., et al. Millefy: visualizing cell-to-cell heterogeneity in read coverage of single-cell RNA sequencing datasets. *BMC Genomics* 21:177 (2020)

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/>