

第10回 シーケンス講習会

TruSeq Stranded mRNA sample prep概略

理化学研究所 (RIKEN)

ライフサイエンス技術基盤研究センター (CLST)

機能性ゲノム解析部門 (DGT)

ゲノムネットワーク解析支援施設 (GeNAS)

野間 将平

Hiseq/Miseq 用 Sequence libraryの要件

- DNAであること
 - RNAの場合、cDNA化する工程が必要
- 両端にSequencing反応に必要なアダプター配列をもつこと
- サイズが適切な範囲に収まっていること(200-600b*)

*望ましいサイズ分布範囲は実験目的・library作製法により異なります

RNAをSequence library化するのに必要なこと

- PolyA RNA を分取する / Ribosomal RNA (rRNA) を除去する
 - Total RNAのうち90-99%はrRNA

- RNAを適切な長さに断片化する
 - 熱処理

- RNAをcDNA化する
 - ランダムヘキサマーによる逆転写

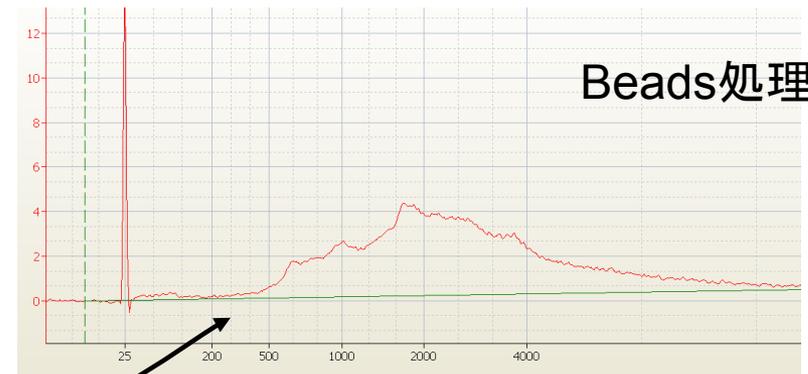
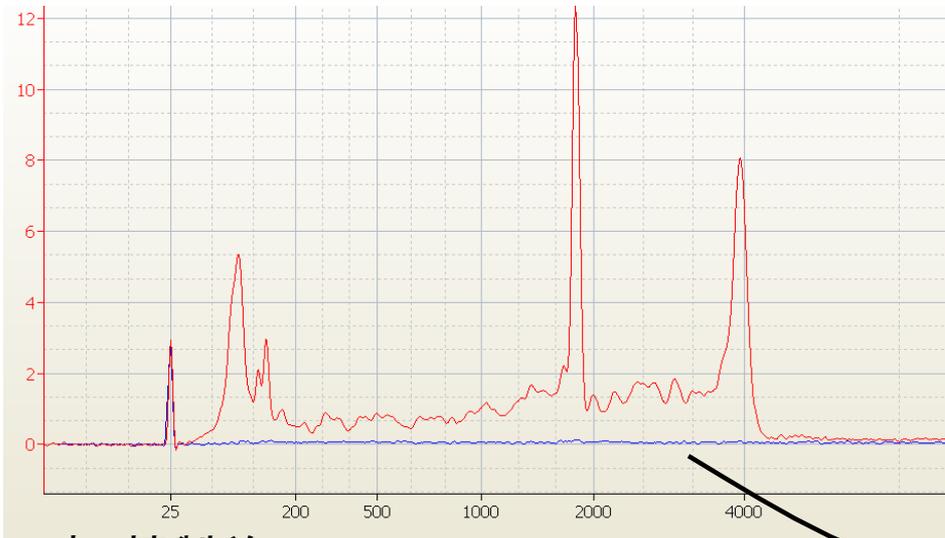
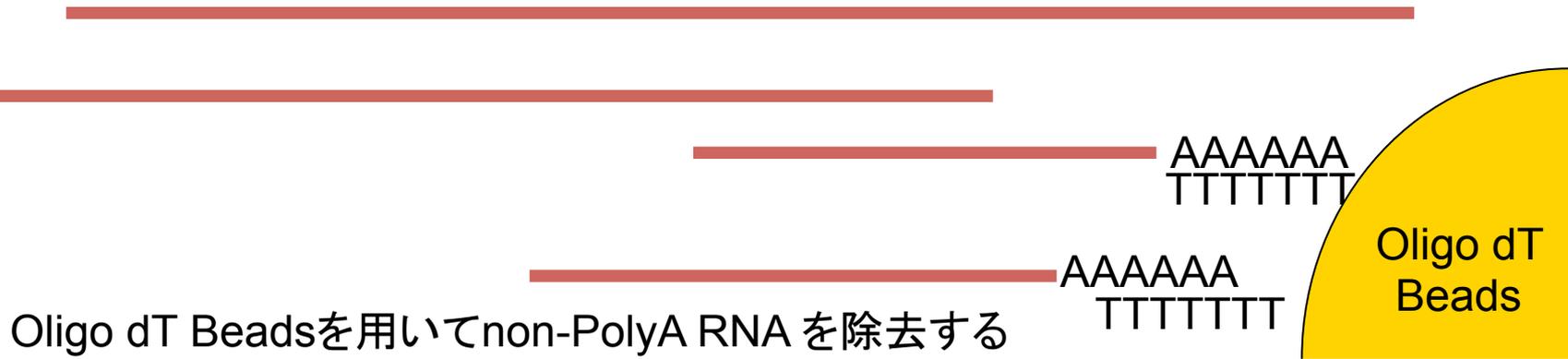
**RNAは不安定なので、
可能な限りここまでを1日で行う**

- 末端をA突出になるよう処理し、TA ligation でIlluminaのシーケンス用アダプターを付加する
- PCR反応により、アダプターが付加されたDNA断片をEnrich する
- できたLibraryのサイズ分布と濃度を確認する

シーケンス...

TruSeq Stranded RNA Sample prep

Pulify mRNA

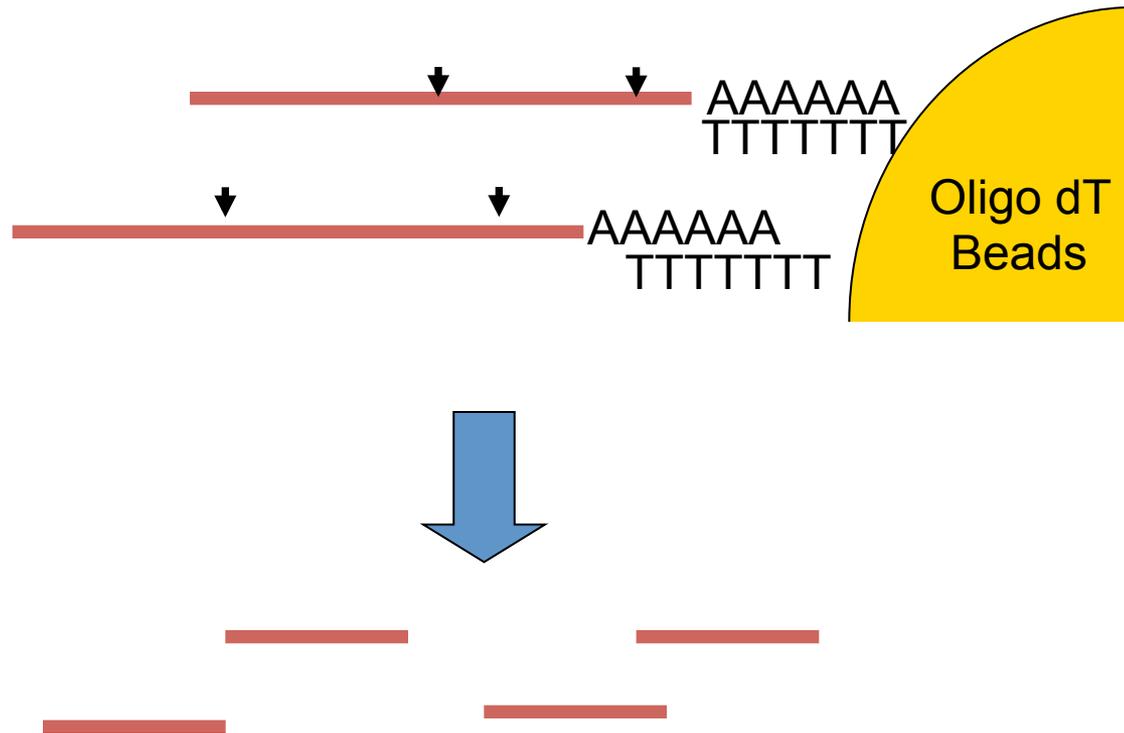


赤:精製前
青:精製後

一見、何も残っていないように見えるが高感度チップで測定するとrRNA peakが消えたプロファイルが得られているのがわかる

TruSeq Stranded RNA Sample prep

Fragment mRNA



断片化用のBuffer中で熱処理することでランダムにmRNAを断片化する*

*サンプル状態や実験目的により断片長はある程度調整する必要がある
条件詳細はIlluminaのマニュアルに記載有り

TruSeq Stranded RNA Sample prep

cDNA synthesis /Ligate adapter / PCR amplification



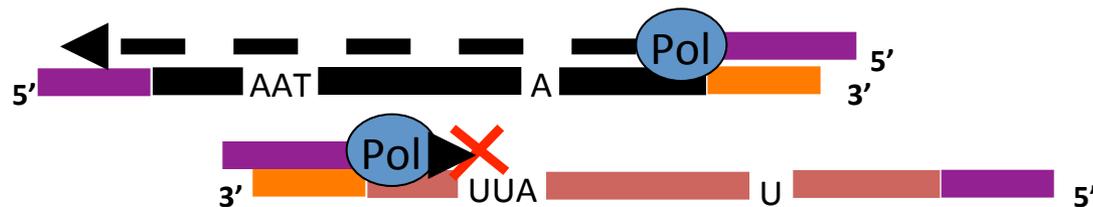
1st strand cDNA synthesis with random hexamer



2nd cDNA synthesis with random hexamer
Incorporates dUTP instead of dTTP



End repair, adenilation
Adapter ligation

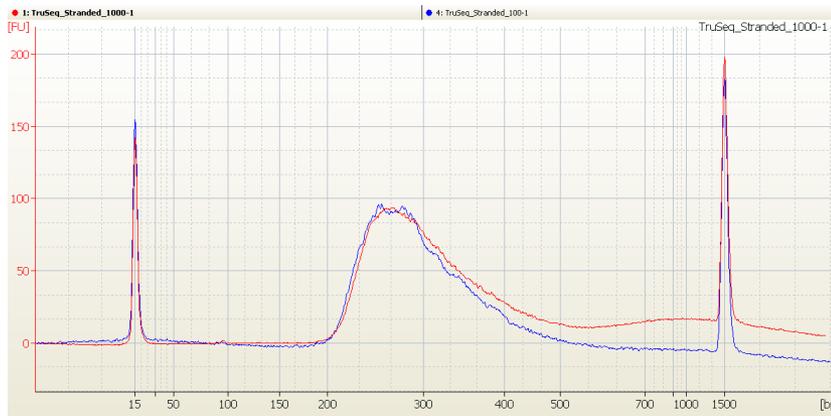


Amplify with High-fidelity Taq
Strand selective amplification

今回の実習内容

- Library 調製キット
 - TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit –SetA- (RS-122-2101)
 - Input RNA 0.1-4ug total RNA

- RNA sample
 - 理研で用意した標準 RNA もしくは持参したRNA
 - **Human Brain Total RNA (Lifetechnologies AM7962)**
 - Start material 1ug, 100ng で各1 library もしくは持参したRNA



Library調製の成功例
 (Bioanalyzer によるQC)
 赤: total RNA 1ug start
 青: total RNA 100ng start

TruSeq Stranded RNA Sample prep 必要な操作(スキル)

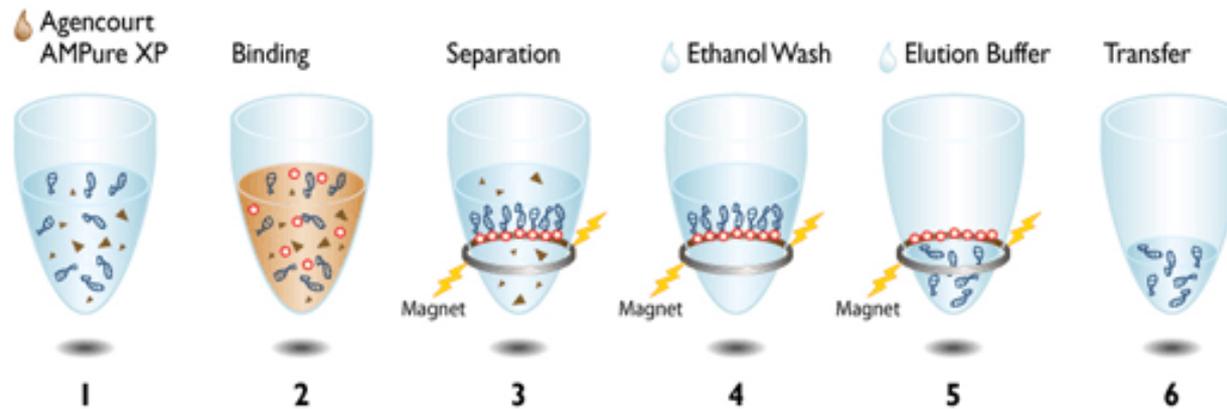
- チューブ内で試薬を混ぜる
- インキュベートする
- AMPure Beads (SPRI: solid phase paramagnetic beadの一種)により精製する

基本的に、上記3操作の繰り返しで高度な技量は要求されない

RNAを扱う工程ではRNase を持ち込まないように注意深く操作する

PCRをかけるまでQCポイントは設定されていない

付録: AMPure Beadsによる精製についての補足



http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product01/AMPure_xp.html

- Beckman から販売されている核酸精製の試薬

- 用途

- 未反応プライマーなど短断片の除去
 - Buffer 交換 (精製)

- サンプル溶液: Beads溶液の混合比を調節することで除去サイズを調整可能