



Application

無脊椎動物由来トータルRNAからの *de novo* RNA-seq (stranded mRNA-Seq)

製品名

KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (KK8420)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のアプリケーションデータは理化学研究所情報基盤センター バイオインフォマティクス研究開発ユニット 笹川洋平 様のご厚意により掲載させていただきます。

方法

KAPA BIOSYSTEMS社KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (KK8420) を用い、無脊椎動物由来のトータルRNAからの*de novo* RNA-seqを試みた。

主な評価内容は、以下のとおり。

- (1) 断片化において、想定どおりのライブラリーサイズ分布が得られるか
- (2) 極少量なサイクル数で、期待どおりのライブラリー量が得られるか
- (3) シーケンス結果において、十分なデータ量を得られるか

初発サンプル : 無脊椎動物 (生物種AおよびB) 由来トータルRNA 4 μ g

RNA精製方法 : フェノール抽出試薬で抽出したRNAを、更にQiagen社RNeasy Mini kit (DNase処理追加) で精製

ライブラリー調製キット : KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (KK8420)

次世代シーケンサー : illumina HiSeq2500 (Rapid mode, Paired end 171bp)

<KAPA Stranded mRNA-Seq Kit ワークフロー>



*1: KAPA社独自のwith beadsプロトコールにより、これらのステップはひとつのチューブ内で実施



磁気ビーズによる精製ステップには、微量サンプル用マグネットスタンドMagna Stand YS-Model (8連×0.2mlPCRチューブ用Cat#FG-SSMAG2) を使用

*2: 添加したアダプター濃度100nM (最終濃度)

*3: ライブラリー増幅の最適サイクル数を決定するため、「KAPA ライブラリー増幅キット リアルタイムPCRキット (KK2701)」を使用

- ①ライブラリーサンプルの1/10量を用い、KAPA ライブラリー増幅キットリアルタイムPCRキットでリアルタイムPCRを実施
- ②キットのプロトコールどおりに最適サイクル数を確認*
- ③残りの9/10量のライブラリーサンプルを用い、KAPA Stranded mRNA-Seq kit付属のKAPA HiFi HotStart ReadyMixでライブラリー増幅を実施

* [KAPA ライブラリー増幅キット リアルタイムPCRキット (KK2701)] では、増幅曲線において、添付の蛍光スタンダード1~3の間のCt値が最適サイクル数と決定できる。実際のライブラリー増幅では、残りの9/10量を使用することから、ここでは、スタンダード1付近のサイクル数を最適サイクル数とした。

ライブラリー作製結果

生物種A, Bのライブラリー作製のデータ

【条件1】 インサートサイズ200-300bpの断片化

断片化の条件 : 94°C 7min
 (ライゲーション後のライブラリー増幅は4サイクルで実施)
 *本キットのプロトコルでは、200-300bpの断片化の条件として94°C 6minを推奨。
 今回は200bp付近を目標として、94°C 7minで実施した。

【条件2】 インサートサイズ300-400bpの断片化

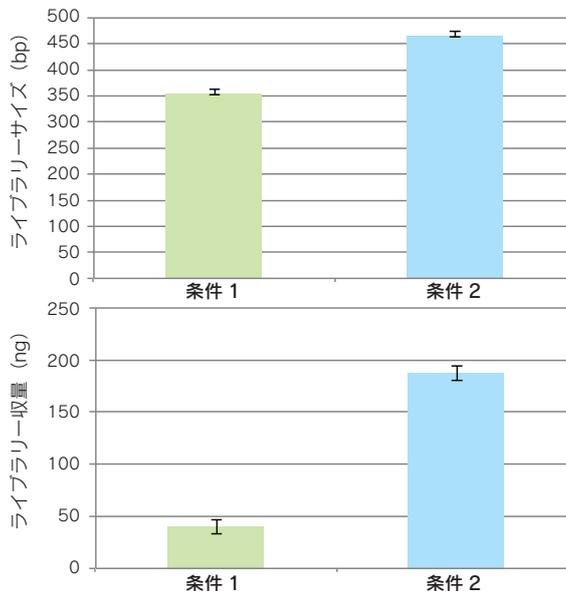
断片化の条件 : 85°C 6min
 (ライゲーション後のライブラリー増幅は5サイクルで実施)

ライブラリー平均サイズ (bp)

		【条件1】 インサート200-300bp	【条件2】 インサート300-400bp
生物種 A	A1	348	463
	A2	349	468
生物種 B	B1	359	468
	B2	365	464
Ave.		356	466
SD		8.18	2.68

ライブラリー収量 (ng)

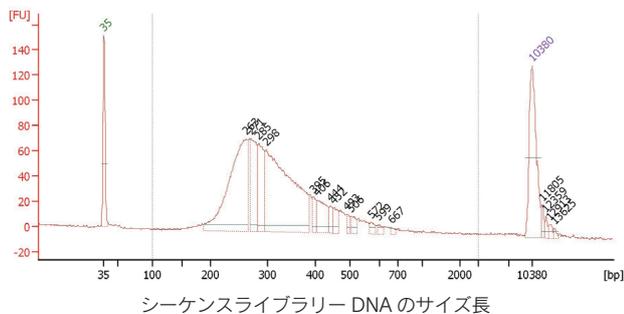
		【条件1】 インサート200-300bp	【条件2】 インサート300-400bp
生物種 A	A1	30.96	172.69
	A2	44.65	181.65
生物種 B	B1	46.35	191.13
	B2	38.80	204.31
Ave.		40.19	187.44
SD		6.95	13.53



ライブラリー作製データから、サイズ、収量とも、均一なライブラリーが得られていた。ライブラリーサイズは、条件1では平均356bp (インサートサイズ235bp)、条件2では平均466bp (インサートサイズ345bp) であり、目的どおりのサイズが得られていた。また、少ないサイクル数で、安定したライブラリー量が得られていた。

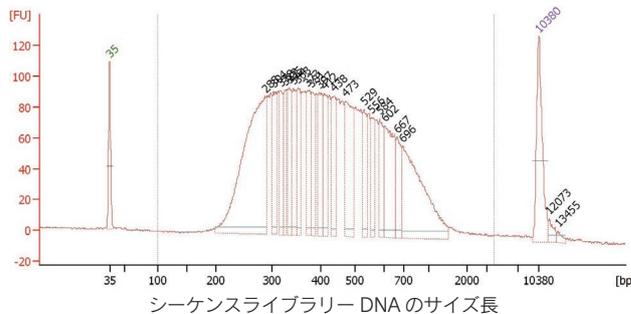
【条件1】 インサート200-300bp

ライブラリー濃度 (nM) 12.84



【条件2】 インサート300-400bp

ライブラリー濃度 (nM) 11.92



シーケンス結果 (生物種A, A1+A2)

Total sequence length (bp)	1.15508E+11	Contig N10	5289	Median contig length (bp)	363
Total sequence reads	337,743,242	Contig N20	3708	Average contig (bp)	737.71
Total trinity 'genes'	155014	Contig N30	2698	total assembled bases	131232666
Total trinity transcript	177892	Contig N40	1951		
Percent GC (%)	39.47	Contig N50	1351		

上記は、条件2: インサートサイズ300-400bpから作製したライブラリーのうち、生物種A (A1+A2) の解析データを示した。十分なトランスクリプトが捉えられていると判断された。また、このコンティグデータから目的遺伝子を見つけることに成功した。



お客様のコメント

本製品はwith beadsプロトコルを採用しており、一つのチューブ内で反応を進めることができる。初めて本方式を試したが、簡便で抵抗なく導入できた。またpoly-A RNA精製後の断片化の後、A richな配列を除かないための工夫がされており、データ上からもその効果が見られた。安定した目的サイズ長と十分な量の収量のライブラリー DNAを得ることが出来た。トランスクリプトの方向性を考慮した*de novo* assemblyを行い十分な性能を得ることが出来た。