



Application

# 微量RNA（無脊椎動物由来10pg total RNA）の 効果的なRNA-Seqライブラリー作製法

製品名

KAPA Hyper Prep Kit (KK8500, KK8502, KK8504)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては、公益財団法人かすさDNA研究所 技術開発研究部 ヒトDNA解析グループ 渡辺 崇 様のご厚意により掲載させていただきます。

## 方法

RNA-Seqを行う場合に問題になるのがインプット量である。

多くのキットがtotal RNAで10-100ng程度を必要とするが、我々が用いる組織が微量なため、この量を用意することが困難であった。この問題を解決するために、10pgのtotal RNAからcDNAを作製するSMARTer® Ultra™ Low Input RNA kitとKAPA Hyper Prep kitを組み合わせたライブラリー作製方法を検証した。

初発サンプル量 : total RNA 10pg  
 生物種 : 無脊椎動物  
 RNA抽出方法 : TRIzol (LifeTechnologies) 無脊椎動物組織1mm四方片あたり1mlを使用 RNA収量約5ng  
 cDNA調製 : SMARTer® Ultra™ Low Input RNA Kit (634848, Clontech Laboratories)  
 cDNA断片化方法 : Covaris S2  
 ライブラリー調製 : KAPA Hyper Prep Kit illumina® platforms (KK8502 KAPA BIOSYSTEMS)  
 アダプター\* : SeqCap Adapter Kit A (07141530001, Roche)  
 シーケンサー : HiSeq2000 (illumina)

※アダプター添加量

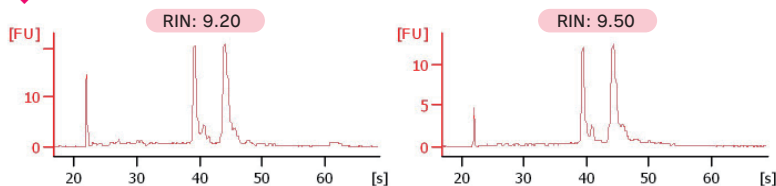
Input DNA	ストック濃度	1反応あたり添加量
0.5ng	150nM	5μl
1.0ng	300nM	5μl
2.5ng	750nM	5μl

## 結果

### <Workflow>

total RNAの抽出 ..... TRIzolで抽出後、RNAClean XP Kitにて精製

↓  
 Agilent BioanalyzerによるQC ..... RNA6000 Pico kitを使用

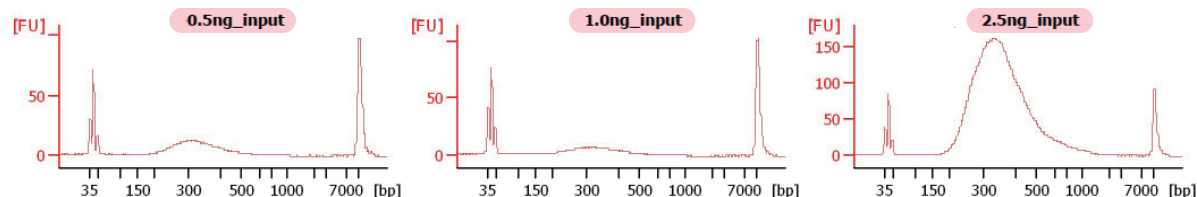


cDNA synthesis (input total RNA 10pg) ..... SMARTer® Ultra™ Low Input RNA Kit (634848) を使用  
 ↓  
 ds cDNA (約5ng) ..... 増幅サイクル：18 (推奨値)

↓  
 shearing (input 0.5 or 1 or 2.5ng) ..... Covaris S2 (200bp:175W 3min)

↓  
 Library prep ..... KAPA Hyper Prep Kit Illumina® platforms (KK8502)

↓  
 QC ..... Qubit dsDNA HS Assay kit  
 Agilent Bioanalyzer High Sensitivity

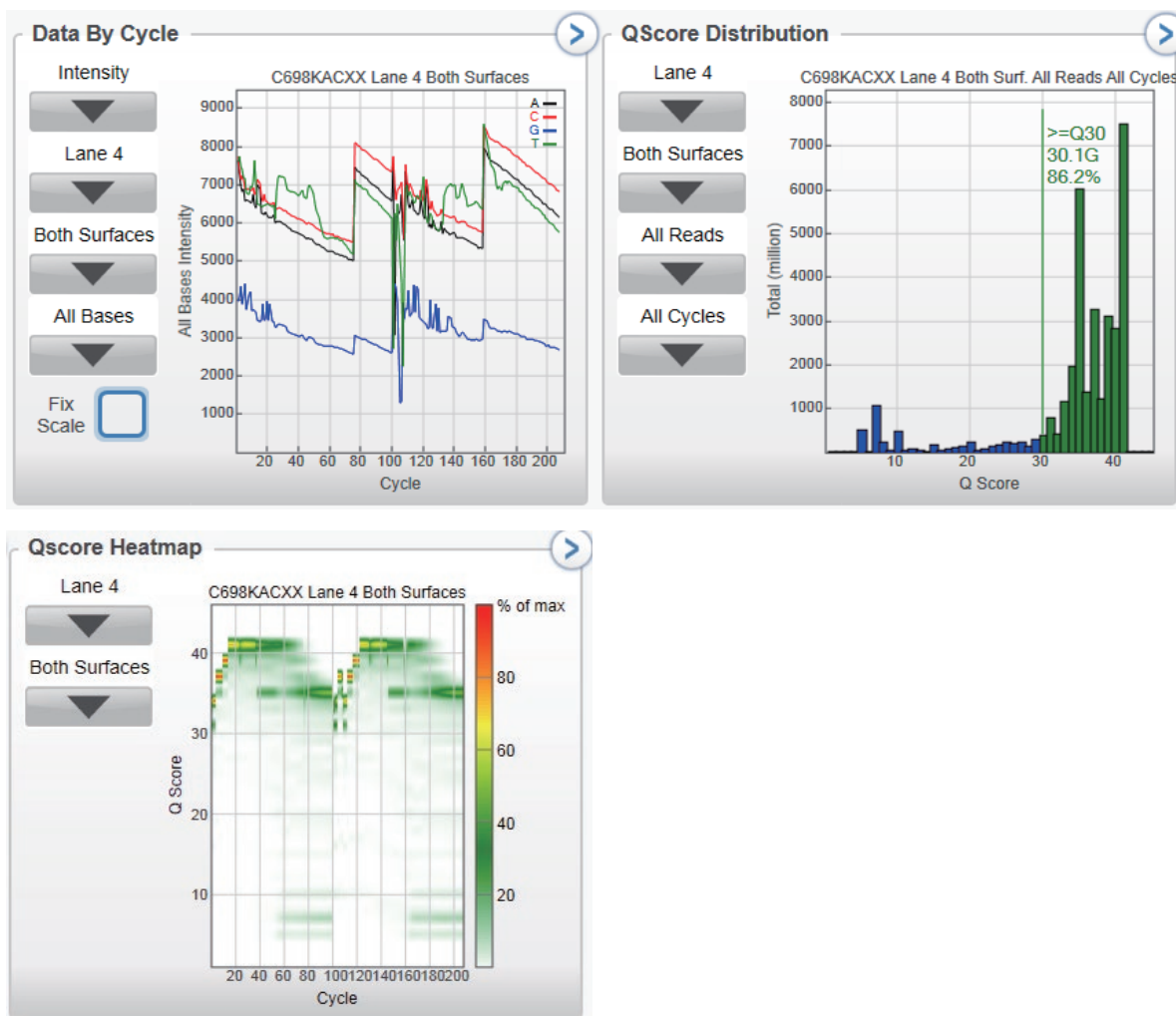


input ds cDNA(ng)	Final Adapter conc(nM)	PCR cycle	amplification Library conc(ng/ul)	total Library(ng)
0.5	7	16	0.427	21.35
1	14	14	0.211	10.55
2.5	34	12	4.34	217

Library pool (2nM) ..... 限られたds cDNAサンプルでの再解析の可能性、かつ、より少ないPCR cycle数を考慮し、input cDNA量を1ngで作製したLibraryをpoolした

↓  
 Sequence ..... HiSeq2000 High Out Put PE100

## 結果



	Lane	Tiles	Density (K/mm <sup>2</sup> )	Clusters PF (%)	Phas/Prephas (%)	Reads PF (M)	Intensity Cycle1	% Intensity Cycle20
Read 1	4	96	659 +/- 111	92.4 +/- 1.9	0.179 / 0.070	167.79	7650 +/- 823	80.6 +/- 1.5
Read 2(index)	4	96	659 +/- 111	92.4 +/- 1.9	0.000 / 0.000	167.79	7453 +/- 889	0.0 +/- 0.0
Read 3	4	96	659 +/- 111	92.4 +/- 1.9	0.143 / 0.058	167.79	7365 +/- 791	78.8 +/- 1.3

## シーケンスデータ

Total length (bp)	153,426,328
GC content(%)	41.6031543165134

初発10pgのRNAを用い、PE100でQ30=86.2% 30.1Gと、非常に高品質のデータが得られた。  
 また、今回の検証では、断片化を行うことでdT30シーケンスとリード2のSMARTアダプターによるクオリティの低下を回避したため、結果として *de novo assembly* にペアエンドのリードデータが使用可能となった。



## お客様のコメント

本製品は1ngの鋳型より作製が可能という点と、試薬構成がシンプルなため簡便に反応を進めることができる点が魅力である。  
 そのため多検体を処理する際にも抵抗なく作製が可能である。  
 今回のケースでは微量の鋳型からシーケンスを行うための十分なライブラリー量を作製でき、*de novo assembly* に必要量の高品質データを得ることができた。

この手法を用いた実験が論文に掲載されました。

**De Novo Assembly of the Transcriptome of *Turritopsis*, a Jellyfish That Repeatedly Rejuvenates**  
 ZOOLOGICAL SCIENCE 33: 366–371 (2016)

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved. 2015.MAY