



Application

効果的なstranded RNA-Seq用ライブラリー調製キット 選定評価試験

～ Embryonic stem cell (ES cell) およびPrimitive endoderm cell (PrE cell)
を用いたrRNA depletion RNA-Seq ～

製品名

KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (KK8560, KK8561)

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 梅田 茉奈 様、林 哲太郎 様、笹川 洋平 様、二階堂 愛 様のご厚意により掲載させていただきました。
研究室URL : <http://bit.riken.jp/>

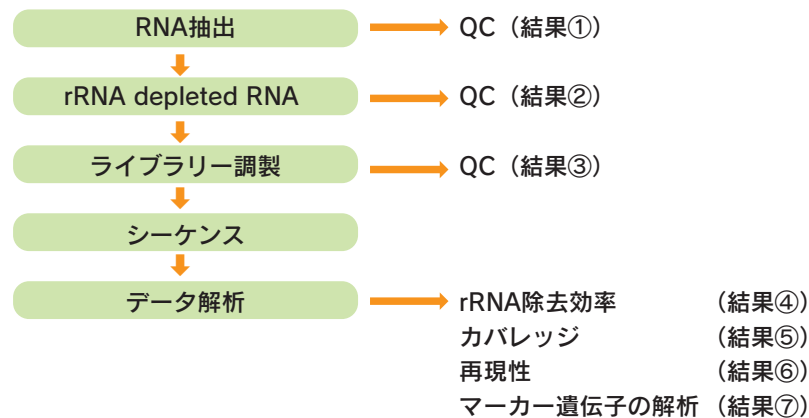
はじめに (日本ジェネティクス)

KAPA RNA HyperPrep Kitシリーズ*は、従来のstranded RNA-Seqライブラリー調製キットで実施される複数の酵素反応ステップを統合し、ワークフローをstreamline化した新しいキットです。

(*「mRNAキャプチャー」や「rRNA除去(対象：ヒト、ラット、マウス)」モジュールが付属したキットも提供されております。)

このように、ワークフローのstreamline化で「操作の煩雑性」や「精製によるサンプルロスリスク」を低減させることにより、これまでよりも短時間の操作で、再現性高く、ストランド特異的な発現解析が可能となります。今回は、効果的なstranded RNA-Seq用ライブラリー調製キットの選定を目的として、KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboEraseを用い、マウスEmbryonic stem cell (ES cell) と、そこから分化させたPrimitive endoderm cell (PrE cell) についてそれぞれrRNA depletion (rRNA除去) RNA-Seqを行い、評価した事例についてご紹介します。

評価デザイン



KAPA RNA HyperPrep Kitの特長

- 従来よりも酵素反応と精製のステップを最小化することでライブラリー調製操作を省力化
 - 短時間 (約4時間) でライブラリー調製が可能
 - 以下のモジュール付属キットも提供可
mRNAキャプチャー
rRNA除去 (ヒト、ラット、マウス)
- 注：アダプターは含まれておりません。
詳細はお問い合わせください。

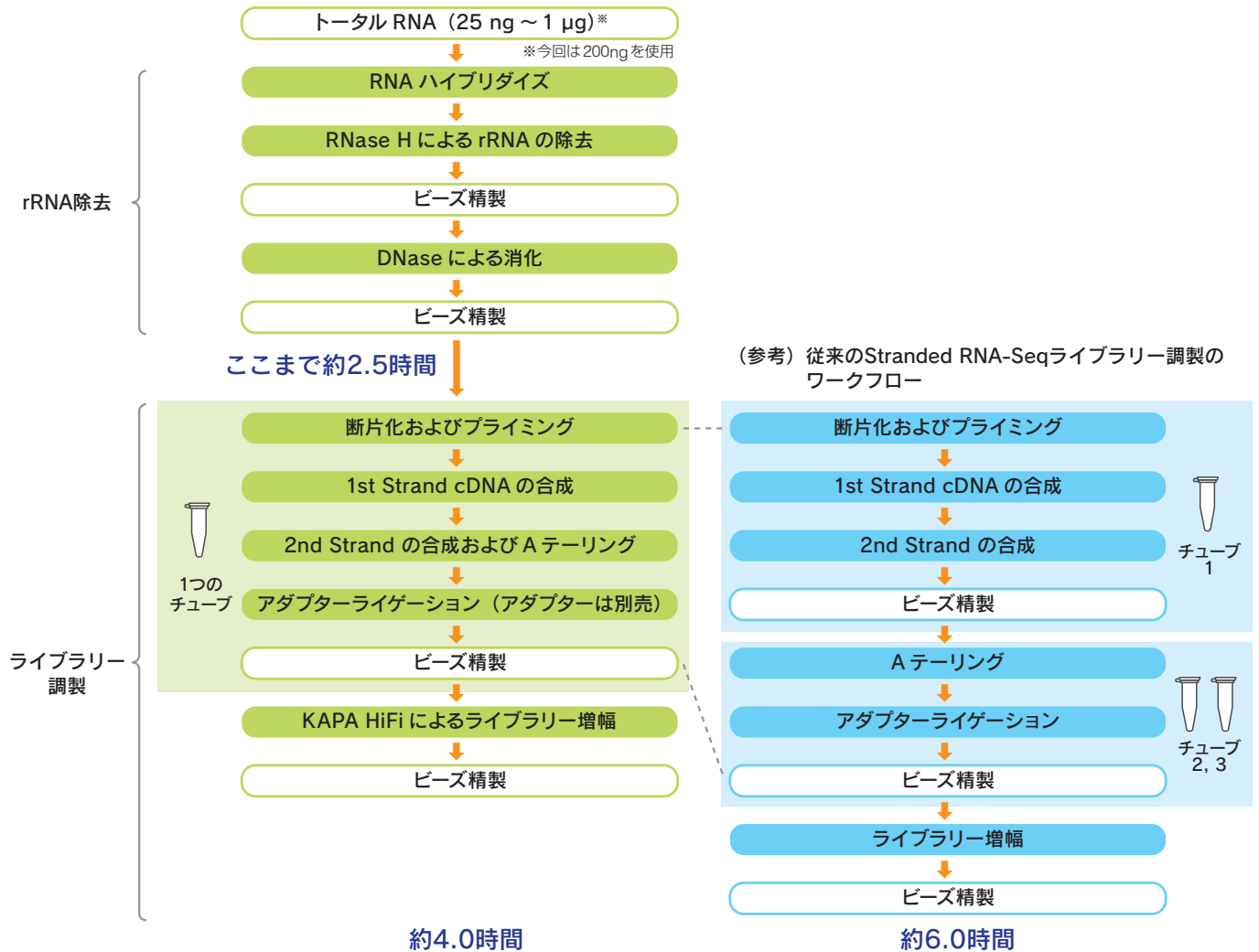


〈実験条件〉

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 初発サンプル (細胞) : マウスEmbryonic stem cell (ES cell)
マウスPrimitive endoderm cell (PrE cell)
* PrE cellは、ES cellをデキサメタゾンで72hr.処理して誘導、分化させた。 RNA抽出方法 : 1.0×10⁶個の細胞をQIAzol Lysis Reagent (Qiagen)で溶解し、Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research)でDNase I処理も行ってからtotal RNAを抽出した。 抽出したRNAの確認 : 品質 Bioanalyzer RIN >9.5、濃度測定 Nano-drop ライブラリー調製キット : KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase
* 全てプロトコール推奨反応量の1/2量で実施 インプットRNAの調製 : i. ES cell total RNA
ii. ES cell poly (A) selected RNA (*)
iii. PrE cell total RNA
iv. PrE cell poly (A) selected RNA (*)
* 今後の検証のため、NEB社キットでpoly (A) RNAを精製したサンプルも調製した。
条件を揃えるためrRNA除去ステップから行った。 | <ul style="list-style-type: none"> インプットRNA量 : i~iv各200ng, n=3
* poly (A) selected RNAサンプルについては、total RNA 200 ng 換算量を用いた。 外部評価用 spike RNA : ERCC RNA Spike-In Mix (ThermoFisher)
* 推奨条件で添加 (1ngあたり0.00001倍希釈したものを2μL添加)
* poly(A) selected RNAサンプルにおいても、total RNA 200 ng 換算で添加 RNA断片化条件 : 85℃ 6min (目標サイズ : 300-400 bp) 使用アダプター : SeqCap Adapter Kit (Roche) アダプター添加濃度 : 1.5 μM ライブラリー増幅サイクル数 : 7~8cycle シーケンサー : HiSeq 2500 |
|---|---|

KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboEraseのワークフロー

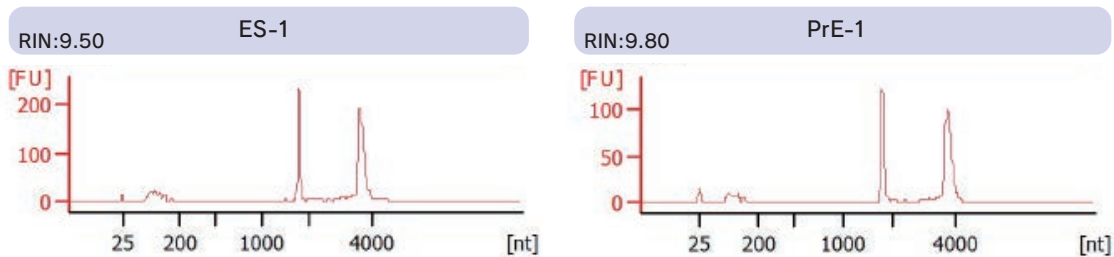
KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR)



従来の stranded RNA-Seqライブラリー調製キットで実施される複数の酵素反応ステップが統合され、ワークフローがstreamline化されている。

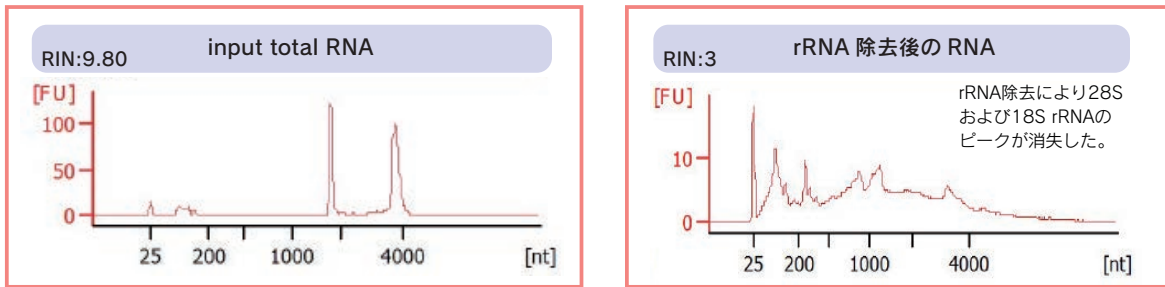
結果

① 抽出した RNA の品質 (一部) (Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano Kit)

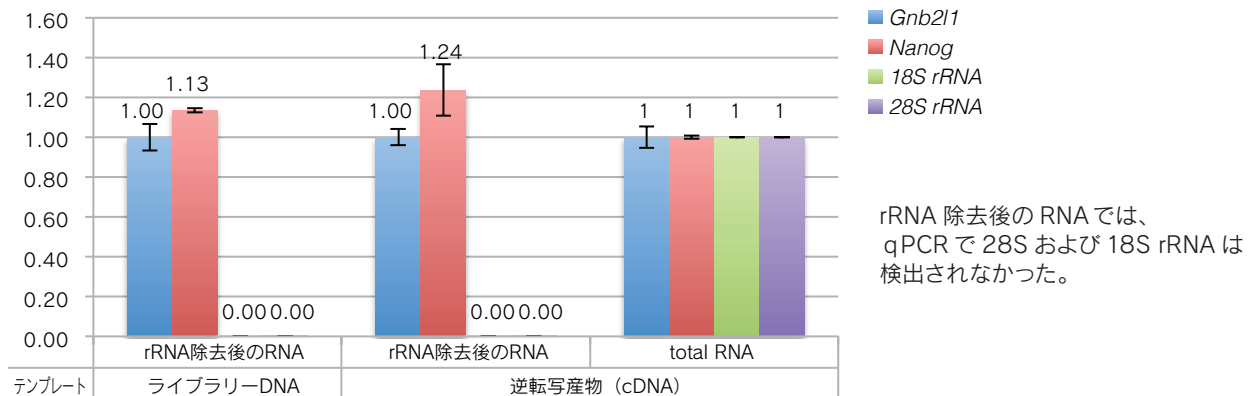


全てのサンプルでRIN>9.50であることを確認した。

②-1 rRNA 除去後のRNAの品質 (Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Pico Kit)



②-2 rRNA 除去後のRNAの品質 (qPCRによる特定遺伝子の定量)



rRNA 除去後の RNA では、qPCR で 28S および 18S rRNA は検出されなかった。

※ Gnb211 の検出量で補正した値を用いて total RNA の逆転写産物を1とした時の相対値

(参考) rRNA 除去後の RNA の品質チェックで適切な結果が得られなかった事例

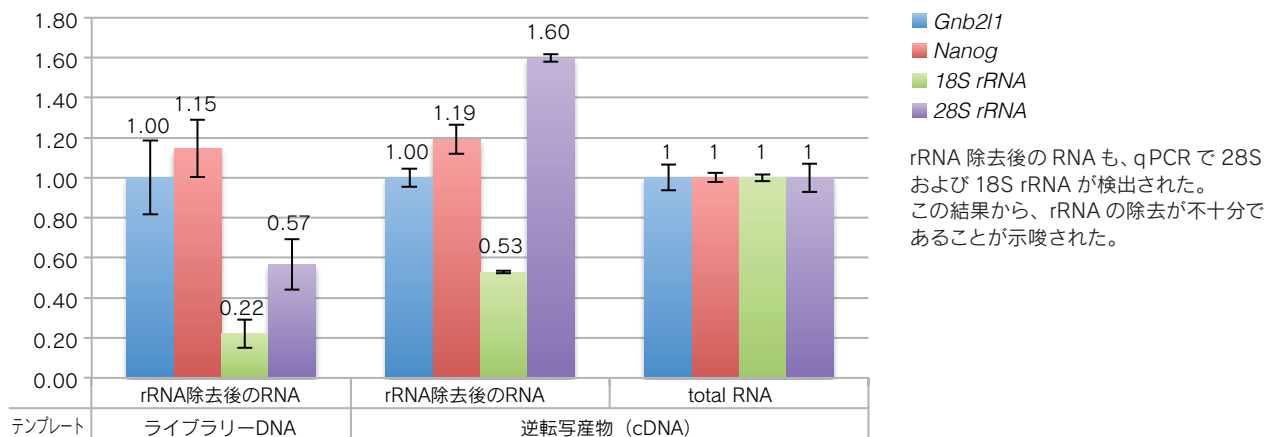
マウス ES cell から抽出した total RNA 200ng を インプット RNA として使用し、他社キットで rRNA 除去から 2nd strand synthesis まで行った後、KAPA HyperPrep Kit (DNA-Seq 用) を用いてライブラリーを作製した。

何回か実施したが、下記のデータのとおり、rRNA 除去後の QC において、想定通りの品質が得られなかった。

そこからライブラリー作製も試みたが、結果的に意図したサイズ分布を示さなかった。

その後、同様のサンプルを用いて KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase を評価したところ、安定してライブラリーを得ることができた。

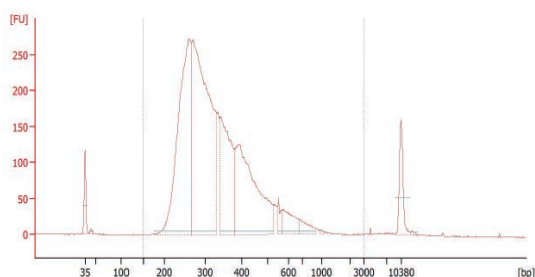
rRNA 除去後の RNA の品質 (qPCR による特定遺伝子の定量)



rRNA 除去後の RNA も、qPCR で 28S および 18S rRNA が検出された。この結果から、rRNA の除去が不十分であることが示唆された。

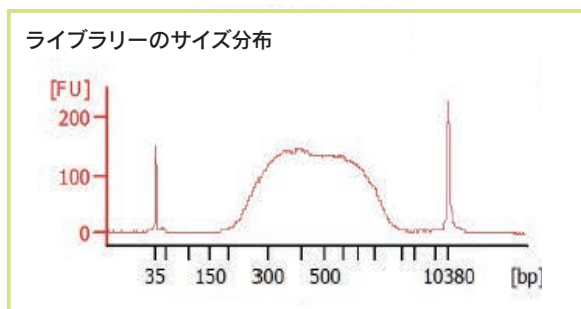
※ Gnb211 の検出量で補正した値を用いて total RNA の逆転写産物を1とした時の相対値

作製したシーケンスライブラリーDNAの品質



ライブラリー DNA のサイズ分布を確認したところ、意図とは異なるサイズ分布を示した。

③ 作製したシーケンスライブラリDNAの品質 ～意図したサイズ分布と安定した収量

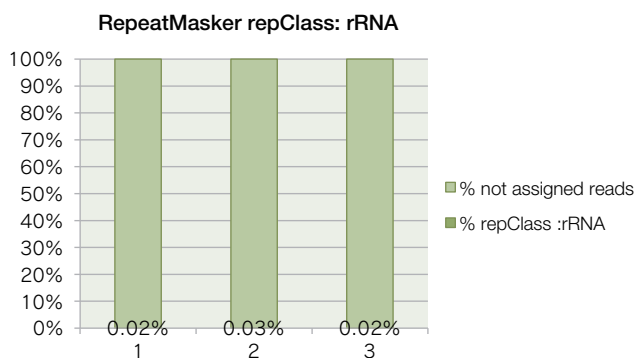


Library DNA の収量	平均 (ng)	標準偏差 (ng)	PCR cycle
i. ES cell total RNA	59.92	5.70	7
ii. ES cell poly (A) selected RNA	48.13	3.79	8
iii. PrE cell total RNA	61.33	4.44	7
iv. PrE cell poly (A) selected RNA	47.27	4.89	8
(参照) 別途実施 ES cell total RNA	41.64	1.73	6

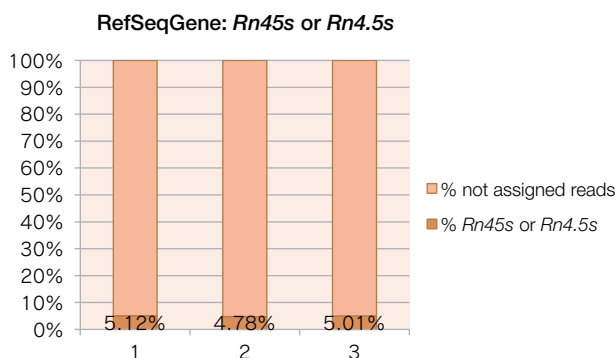
※各n=3

④ rRNAの除去効率

得られたシーケンスリードについて、rRNAのReferenceデータを参照としてrRNA由来リードの混入率を検証したところ、rRNAが効果的に除去され、十分に低いことが確認された。

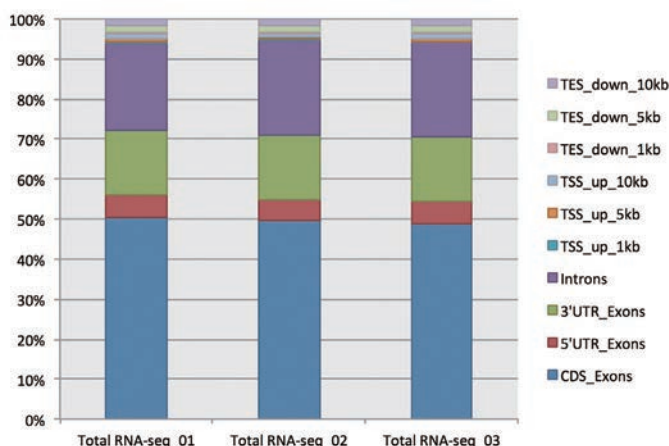


RepeatMaskerのrepClass: rRNA (total 1564 sites)をReferenceに用いて計算したもの。
この計算方法では、rRNAはほとんど除去されている。



RefSeqGeneの*Rn45s* (45S pre-ribosomal RNA) と *Rn4.5s* (4.5S RNA) をReferenceに用いて計算したもの。
この計算方法では、約5%のrRNAの混入が認められる。

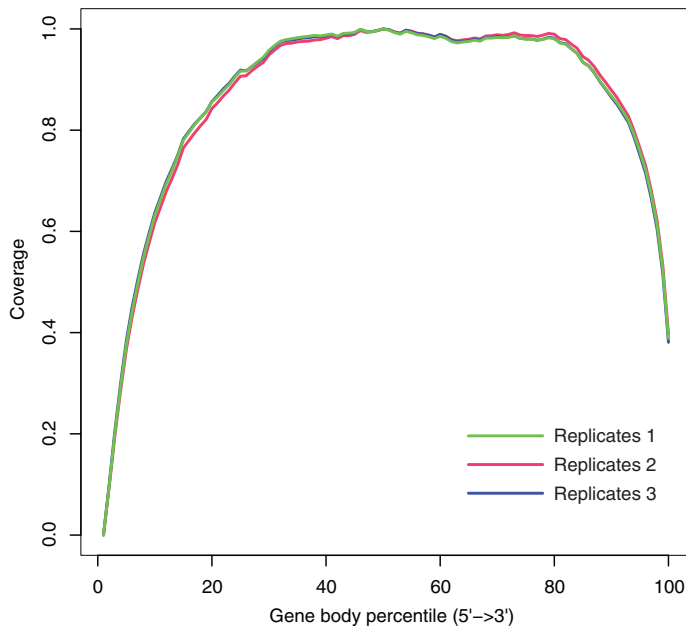
rRNA 除去を実施した RNA-Seq のリードの構成



シーケンスリードの構成を調べたところ、リードの20%以上をIntrons (■紫) が占めており、poly (A) 型だけでなく、非poly (A) 型RNAも効率良くシーケンスされていることが確認された。

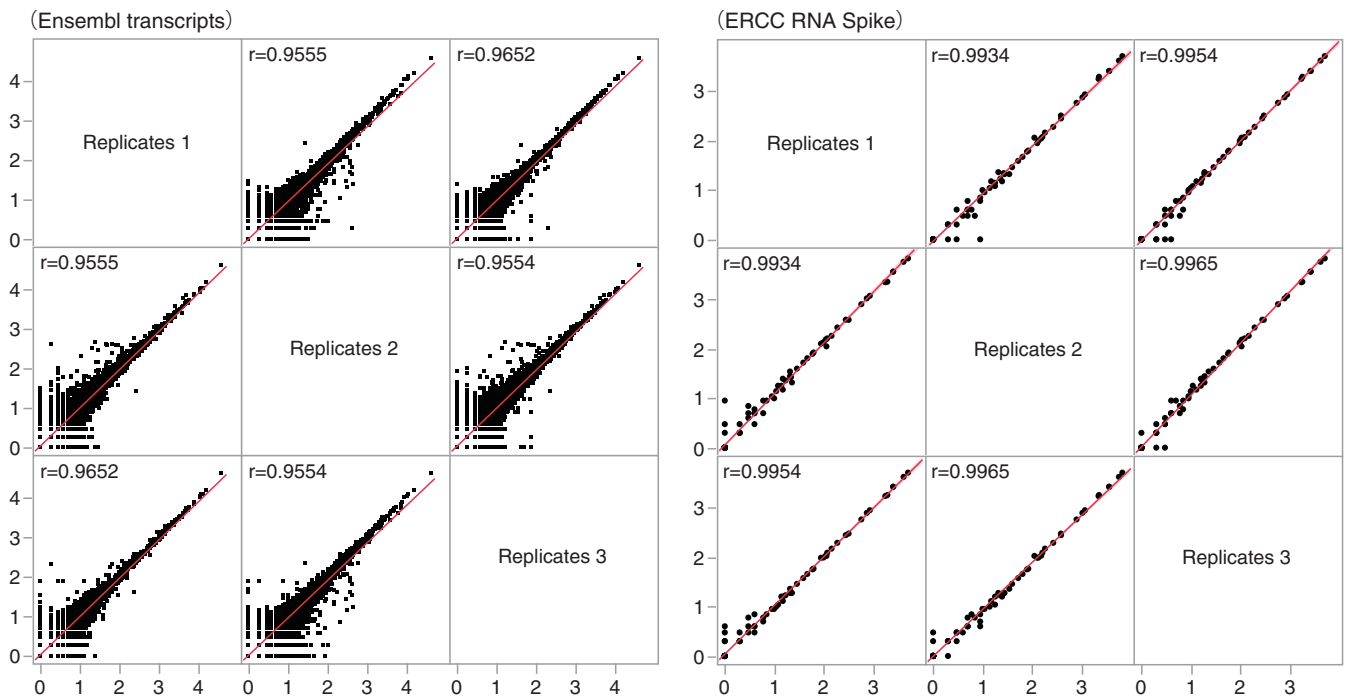
⑤ カバレッジ

遺伝子構造を確認するのに重要な「トランスクリプトのカバレッジ」が非常に均一であった。



⑥ 再現性

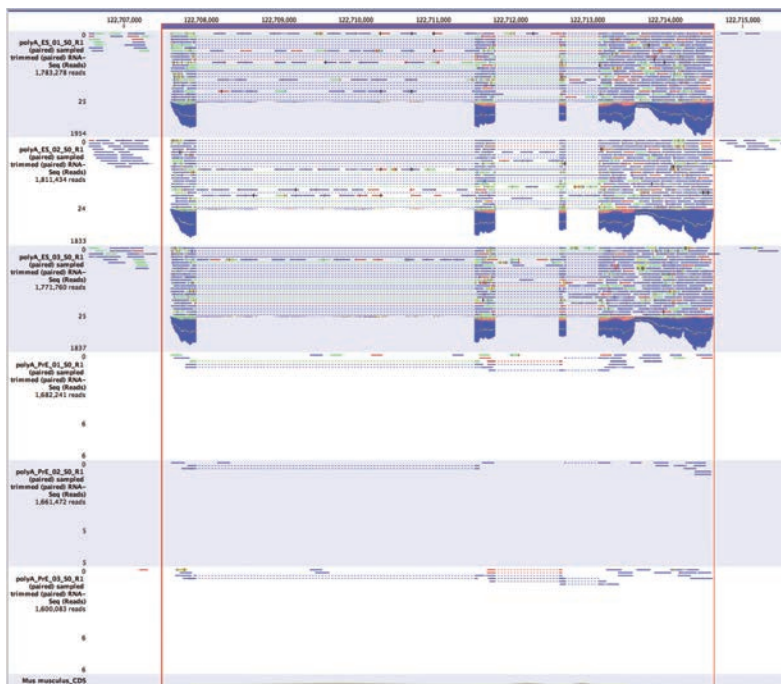
発現量の散布図から、遺伝子発現の十分な再現性が認められた。ERCC spikeなど外部評価RNAでも十分な相関が有ることが確認された。



⑦ マーカー遺伝子の解析

実際にゲノムビューワーで確認した。RNA-Seqの結果として、ES細胞、PrE細胞それぞれの細胞に特異的なマーカー遺伝子が確認された。

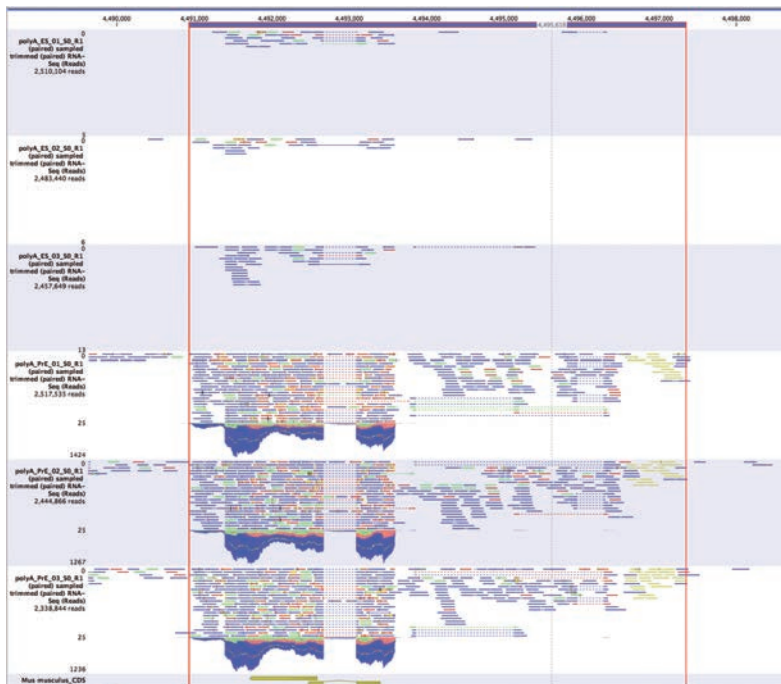
ES cell



ES cell
特異的マーカー遺伝子

PrE cell
特異的マーカー遺伝子

PrE cell



ES cell
特異的マーカー遺伝子

PrE cell
特異的マーカー遺伝子



お客様のコメント

rRNA-depletion 以降からの Library 調整のステップがより簡素化・高速化されているため、実務作業として楽に感じられました。従来製品より、より安定して RNA-seq を運用できると期待されます。

RNaseH 方式による rRNA-depletion では、RNA 溶液を 45℃ に保ったまま次の試薬を加えて混ぜる必要があるのですが、この過程は比較的煩雑に感じました。しかし、再現性の有る rRNA-depletion が行えたのでとても満足しました。

Poly-A RNA-seq だと上述のような煩雑な過程を必要としないため、さらに簡便です。実際に操作を行うにあたり、注意点が詳細にプロトコルに書かれていますので、問題は特に感じずプロトコル通りに進めるだけで問題ないと感じました。十分な精度が安定して出ているため、rRNA-depletion 方式の RNA-seq kit としてファーストチョイスになると思います。