

SMART-Seq® Stranded Kit

SMART-Seq® Stranded Kit (製品コード 634442、634443、634444) は、1~1,000 個のインタクトな細胞または 10 pg~10 ng の哺乳類由来 total RNA からイルミナ社の高速シーケンスプラットフォームにおける次世代シーケンス (NGS) 解析に適したインデックス付きの cDNA ライブラリーを調製することが可能な試薬です。通常、作業は 7 時間以内に完了します。

本日本語版 At-A-Glance は、英語版ユーザーマニュアル Version 041922 に基づいて作成していますが、実際に製品を使用される際には、必ず[英語版ユーザーマニュアル \(最新版\)](#) を参照してください。

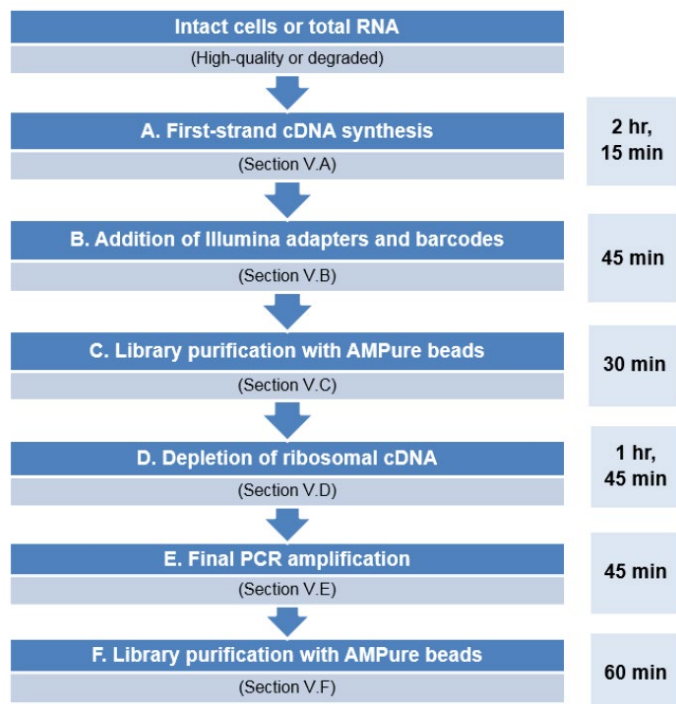


図 1. SMART-Seq® Stranded protocol overview

■ 製品に含まれるもの

表 1. SMART-Seq® Stranded Kit 構成試薬

SMART-Seq Stranded Kit	634442 (12 rxns)	634443 (48 rxns)	634444 (96 rxns)
Box 1			
Cap color	Cap label		
Brown	scTSO Mix	SMART scTSO Mix ^{1,2}	55 µl
Light Blue	scR-Probes	scR-Probes ¹	225 µl
		Control Total RNA ³ (1 µg/µl)	20 µl
			80 µl
			160 µl
Box 2			
	scZapR	scZapR	20 µl
Pink	scN6	SMART scN6 ¹	80 µl
			15 µl
Red	scRT Buffer	scRT Buffer	200 µl
Purple	SMART Scribe	SMARTScribe RT (100 U/µl)	400 µl
			25 µl
White	RRI	RNase Inhibitor (40 U/µl)	100 µl
			10 µl
Blue	ZapR™ Buffer	ZapR Buffer (10X)	40 µl
			200 µl
Orange		Tris Buffer (5 mM)	400 µl
			1.25 ml
Khaki	PCR2	PCR2 Primers ⁴	2 x 1.25 ml
			50 µl
		Nuclease-Free Water	200 µl
			1.25 ml
Green	SeqAmp	SeqAmp™ DNA Polymerase ⁵	4 x 1.25 ml
			50 µl
	CB Buffer	SeqAmp CB PCR Buffer (2X) ⁶	10 ml
			1.25 ml
		10X Lysis Buffer	1 ml
			0.5 ml

- 表 1 に記載の scR-Probes の凍結融解は 3 回までにしてください。凍結融解の繰り返しを避けるために、scR-Probes を複数のチューブに分注して使うことを推奨します。
- Nuclease-Free Water は「SMART-Seq® Stranded Kit Protocol」の A)、B)、E) で使用します。
※ B) と E) で使用するライブラリーアダプターの汚染が起らないように、A) で使用する分を事前に別のチューブに取り分けておくことを推奨します。

表 2. Indexing Primer Set HT for Illumina v2 構成試薬

Indexing primer sets:			
Kit Cat. No.	634442	634443	634444
Indexing primer set version	HT for Illumina v2 - 12	HT for Illumina v2 - 48	HT for Illumina v2 - 96
Size	12 rxns	48 rxns	96 rxns
<i>(Not sold separately. Store at -20°C.)</i>			
3' PCR primers	3' 1 ²	20 µl	20 µl
12.5 µM	3' 2	20 µl	20 µl
Full names of primers have been shortened ¹	3' 3	20 µl	20 µl
	3' 4	20 µl	20 µl
	3' 5	20 µl	20 µl
	3' 6	20 µl	20 µl
	3' 7	20 µl	20 µl
	3' 8	20 µl	20 µl
5' PCR primers	5' 1	15 µl	15 µl
12.5 µM	5' 2	15 µl	15 µl
Full names of primers have been shortened ¹	5' 3	15 µl	15 µl
	5' 4	15 µl	15 µl
	5' 5	15 µl	15 µl
	5' 6	15 µl	15 µl
	5' 7	15 µl	15 µl
	5' 8	15 µl	15 µl
	5' 9	15 µl	15 µl
	5' 10	15 µl	15 µl
	5' 11	15 µl	15 µl
	5' 12	15 µl	15 µl

■ 開始前に確認しておくこと

- SMART-Seq® Stranded Kit Protocol の E) はサンプル量が 100 µl であることを想定しています。使用するサーマルサイクラーの扱えるサンプル量が 50 µl までの場合は、各サンプルの反応を 2 つのチューブに分けて実施することをお勧めします。
- PCR チューブの保冷ラックは、各工程でサンプルを冷たく保つために不可欠です。使用する前に除染してください。

- Agencourt AMPure XP ビーズは、容器を開ける前に室温に戻す必要があります。そのため、受け取り次第ビーズを複数の 1.5 ml チューブに分取し、冷蔵で保存することを強くお勧めします。
- 使用する直前に、ボルテックスでビーズをよく分散させてください。ビーズは粘性があるため、使用時はゆっくりとビペティングしてください。
- 強力な磁気分離装置を使用することで、品質の高いライブラリーを高収量で得られます。サンプルの汚染を防ぐため、**SMART-Seq® Stranded Kit Protocol** の **C** と **D** で異なる磁気分離装置を使用することを推奨します。
- それぞれの工程のサンプル汚染を防ぐために、3つの隔離された作業エリアでの実施を推奨します。最終的なライブラリーの精製を行うエリアで新しい反応液を調製すると、汚染のリスクが高まります。

■ 使用するサンプルについて

RNA サンプルの場合

- 本キットで使用可能な RNA サンプルの量は 10 pg~10 ng で、最大液量は 7 µl です。
- 固定化された細胞から抽出した RNA を使用する場合、1 ng 以上の使用を推奨します。
- RNA を希釈する場合は、キット付属の Nuclease-Free Water を使用してください。TE や EDTA を含むバッファは使用しないでください。

細胞サンプルの場合

- 細胞から直接反応を開始する場合、固定化された細胞は使用できませんのでご注意ください。事前にソートおよび凍結された、インタクトな細胞からライブラリーを調製するためのプロトコールとなっています。
- FACS を使用する場合は、それぞれの well または tube に 7 µl の 1X PBS を含む 96-well plates または 8-tube strips を使用することをお勧めします。ソートした後すぐに、サンプルをアルミシールかチューブの蓋で密封し、クイックスピンします。細胞が液体中であることを確認し、ドライアイスで瞬間凍結します。使用するまで -70°C で保管してください。

- 培養細胞サンプルの希釈または培地除去をするには Mg²⁺- and Ca²⁺-free PBS で 2 回以上洗浄することをお勧めします。細胞をソートする際には、推奨のソーティングバッファを用いる必要があります（詳細は英語版ユーザーマニュアルのセクション IV. C）を参照。

■ SMART-Seq® Stranded Kit Protocol

ワークフローの選択

反応させるサンプル量に応じ、ultra-low-input (1~50 cells or 10~500 pg total RNA) または low-input (50~1,000 cells or 0.5~10 ng total RNA) のワークフローを選択してください (図 2)。ultra-low-input では最初の PCR (PCR1) で 10 サイクル、最後の PCR (PCR2) 後に 2 回の AMPure ビーズ精製が必要ですが、low input では PCR1 で 5 サイクルのみ、PCR2 後に 1 回の AMPure ビーズ精製を実施します。

さらに ultra-low-input では、使用するサンプルが 10 細胞未満もしくは 100 pg 未満の total RNA の場合、PCR1 後にサンプルを混合することも可能です。

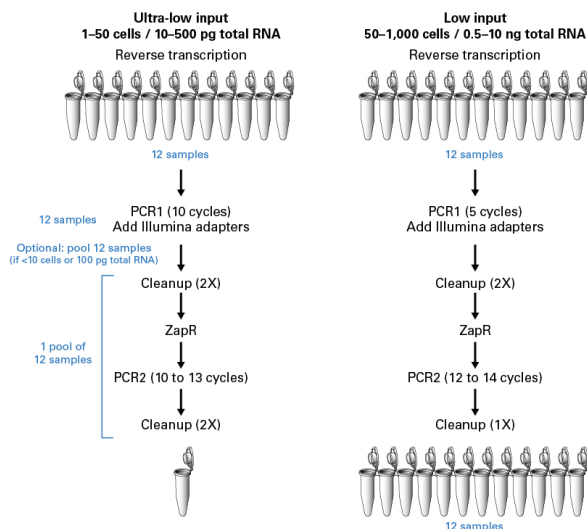


図 2. 量に応じたワークフローの選択

各サンプル量で推奨されるプロトコールは表 3 を確認してください。

表 3. SMART-Seq® Stranded Kit プロトコルまとめ

Input category	Cell input	RNA input	Post-PCR1 Pooling	PCR1 # of cycles	PCR2 # of cycles	# of final cleanups	Final elution volume (µl)
Ultra low	1	10 pg	Yes	10	12-13	2	12
			No	10	13		
	10	100 pg	Yes	10	10		
			No	10	11-12		
	10-50	100-500 pg	Yes	10	10		
Low	50-100	0.5-1 ng	No	5	14	1	22
	500	5 ng	No	5	13-14		
	1,000	10 ng	No	5	12-13		

- PCR サイクル条件を最適化する場合、PCR2 のみを変更してください。
- 過剰なバックグラウンド増幅に繋がるため、ultra-low-input の PCR2 については 13 サイクル、low-input の PCR2 については 16 サイクルを超えることをお勧めしません。
- 表 3 のサイクル条件は、正常組織から精製された total RNA を対象としています。固定化または化学修飾された組織から抽出した RNA を使用する場合、PCR2 のサイクル数を少なくとも 1~2 サイクル増やす必要があります。

表 4. サーマルサイクラーのプログラム条件

Program name	Program details		Used in
85-hold	85°C	forever	Option 1 の場合
72-hold	72°C	forever	Option 2 の場合
RT	42°C	90 min	A) 1本鎖cDNA合成
	70°C	10 min	
	4°C	forever	
PCR1	94°C	1 min	B) PCR1—Illumina AdaptersとIndexesの付加
	<u>5 or 10 cycles:</u>		
	98°C	15 sec	
	55°C	15 sec	
	68°C	30 sec	
	68°C	2 min	
	4°C	forever	
PreZap	72°C	2 min	D) scZapRとscR-ProbesによるRibosomal cDNAの除去
	4°C	forever	
Zap	37°C	60 min	D) scZapRとscR-ProbesによるRibosomal cDNAの除去
	72°C	10 min	
	4°C	forever	
PCR2	94°C	1 min	E) PCR2—最後のRNA-Seqライブラリー増幅
	<u>10-14 cycles:</u>		
	98°C	15 sec	
	55°C	15 sec	
	68°C	30 sec	
	4°C	forever	

サンプルの調製

Control RNA の希釈 (ポジティブコントロールの準備)

Control Total RNA の希釈液 (Control Total RNA + RNase Inhibitor) を用事調製してください。必要に応じて、以下に示す Step 2 で調製する 50 ng/µl Control Total RNA を -80°C で保管しておくことが可能です (注: 凍結融解は一回限りとする)。ただし、Step 2 を用いて希釈した溶液 (Step 3-5) は、使用後に保管せず廃棄してください。

- 398 µl の Nuclease-Free Water に 2 µl の RNase Inhibitor を加え、ボルテックスで混合後氷上に静置する。これを RNase Inhibitor Water (RRI Water) とする。
- 新しい 0.2 ml チューブに 38 µl の RRI Water と 2 µl の Control Total RNA (1 µg/µl) を混合し 50 ng/µl の Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 45 µl の RRI Water と 5 µl の Control Total RNA (50 ng/µl) を加え混合し 5 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 95 µl の RRI Water と 5 µl の Control Total RNA (5 ng/µl) を混合し 0.25 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 120 µl の RRI Water と 5 µl の Control Total RNA (0.25 ng/µl) を混合し 10 pg/µl Control Total RNA を作製する。
- 1 µl の 10 pg/µl Control Total RNA をポジティブコントロールとして使用する。

Control Total RNA の使用量は解析するサンプル量に揃え、同じ PCR サイクル数を適用してください。

初めてキットを使用する方は、少なくとも 100 pg 以上の Control Total RNA から反応を開始することをお勧めします。

A) 1本鎖 cDNA 合成

RNA の断片化時間は、使用する RNA の品質に応じて決定します。RIN ≥ 4 または DV200 $\geq 60\%$ の精製 RNA から開始する場合は断片化を実施しません (Option 1)。過度な分解が見られるサンプルから反応を開始する場合は、断片化処理を実施しないでください (Option 2)。RIN 値が 4 以下のサンプルの場合、

値が不安定になることがあるため、RNA の品質を評価するには DV200 の値を参考にすることをおすすめします。

表 5. 断片化反応の推奨ガイドライン

RNA quality	Protocol	Fragmentation time
RIN \geq 7 or cells	Option 1	6
RIN 5-7	Option 1	4
RIN 4/ DV200 \geq 60%	Option 1	2
DV200 <60%	Option 2	—

- 199 μ l の Nuclease-free water に 1 μ l の RNase Inhibitor (必要に応じてスケールアップすること) を添加し、RNase Inhibitor Water (RRI Water) とする。ボルテックスで攪拌し、氷上に置く。
- 10X Lysis Buffer に RNase Inhibitor を添加し、10X Lysis Mix を作製する。ピペティングで混合し、使用直前まで氷上に保管する。

19 μ l	10X Lysis Buffer
1 μ l	RNase Inhibitor
20 μ l	Total volume

(Option 1) 断片化が必要なサンプルの場合

- 総量 7 μ l のサンプルがチューブに入っていることを確認し、7 μ l 未満の場合は、RRI Water を加えて総量 7 μ l にし、氷上に置く。

ネガティブコントロールとして 7 μ l の RRI Water を必ず用意してください。

- サーマルサイクラーを 85°C に予熱する。
- 下記試薬を記載の順に氷上で混合し、総サンプル数 \times 1.1 倍量の Shearing Master Mix を作製する。

1 μ l	10X Lysis Mix
1 μ l	SMART scN6
4 μ l	scRT Buffer
6 μ l	Total volume per reaction

凍結細胞を扱う際は、細胞を保冷库から取り出す前に Shearing Master Mix を調製してください。細胞が氷上で溶けている段階、もしくは溶けてから数分以内に Shearing Master Mix を添加します。

- 各サンプルに 6 μ l の Shearing Master Mix を添加し、タッピングで優しく混合する。

- 遠心機でクイックスピンする。
- 細胞サンプルの場合は、85°C に予熱したサーマルサイクラーで 6 分間インキュベートする。サンプルが Total RNA の場合は表 5 に従い、反応時間を決定する。
- 反応後のサンプルはすぐに氷上の保冷ラックに移動し、2 分間静置する。
- サーマルサイクラーの「RT (逆転写反応)」プログラムをセットし、保留にしておく。

過度な断片化を避けるため、反応が終了したサンプルはすぐにサーマルサイクラーから取り出してください。1 本鎖 cDNA 合成を成功させるために、速やかに次の工程へ進んでください。下記試薬を記載の順に氷上で混合し、総サンプル数 \times 1.1 倍量の First-Strand Master Mix を作製します。

4.5 μ l	SMART scTSO Mix
0.5 μ l	RNase Inhibitor
2 μ l	SMARTScribe RT
7 μ l	Total volume per reaction

SMART scTSO Mix は非常に粘性が高いため、解凍後は使用時まで室温に置くことをお勧めします。First-Strand Master Mix を約 5 秒間ボルテックスで混合してからクイックスピンして、十分に均質化してください。

- 85°C で断片化したサンプルそれぞれに 7 μ l の First-Strand Master Mix を加え、約 5 秒間ボルテックスで混合し、クイックスピンする。
- サンプルをサーマルサイクラーにセットし、「RT」プログラムを開始する。

42°C	90 min
70°C	10 min
4°C	forever

□SAFE STOPPING POINT: サンプルは 4°C で一晩、もしくは -20°C で最長 2 週間保管可能

(Option 2) 断片化が不要なサンプルの場合

- 総量 7 μ l のサンプルがチューブに入っていることを確認し、7 μ l 未満の場合は、RRI Water を加えて総量 7 μ l にし、氷上に置く。

ネガティブコントロールとして 7 μ l の RRI Water を必ず用意してください。

- サーマルサイクラーを 72°C に予熱する。

3. 下記試薬を記載の順に氷上で混合し、総サンプル数×1.1 倍量の Annealing Master Mix を作製する。

1 µl	10X Lysis Mix
1 µl	SMART scN6
<hr/>	
2 µl	Total volume per reaction

4. それぞれの反応サンプルに 2 µl の Annealing Master Mix を添加し、優しくタッピングで混合し、クイックスピンする。
5. 予熱しておいたサーマルサイクラーにセットし、72°Cで 3 分間インキュベートする。
6. 反応後は速やかにサンプルを氷上の保冷ラックに移し、2 分間静置する。
7. サーマルサイクラーで「RT」プログラムをセットし、保留にしておく。

過度な断片化を避けるため、反応が終了したサンプルはすぐにサーマルサイクラーから取り出してください。1 本鎖 cDNA 合成を成功させるために、速やかに次の工程へ進んでください。

8. 下記試薬を記載の順に氷上で混合し、総サンプル数×1.1 倍量の First-Strand Master Mix を作製する。

4 µl	scRT Buffer
4.5 µl	SMART scTSO Mix
0.5 µl	RNase Inhibitor
2 µl	SMARTScribe RT
<hr/>	
11 µl	Total volume per reaction

SMART scTSO Mix は非常に粘性が高いため、解凍後は使用時まで室温に置くことをお勧めします。First-Strand Master Mix を約 5 秒間ボルテックスで混合してからクイックスピンして、十分に均質化してください。

9. 85°Cで断片化したサンプルそれぞれに 11 µl の First-Strand Master Mix を加え、2~3 秒間ボルテックスで混合し、クイックスピンする。
10. サンプルをサーマルサイクラーにセットし、「RT」プログラムを開始する。

42°C	90 min
70°C	10 min
4°C	forever

□SAFE STOPPING POINT：サンプルは 4°Cで一晩、もしくは -20°Cで最長 2 週間保管可能

B) PCR1—Illumina Adapters と Indexes の付加

- A)で Option 1 と Option 2 それぞれ別々に処理をしたサンプルは、この工程からまとめて作業することが可能です。
- この工程では、以下の試薬を使用します: Nuclease-Free Water, SeqAmp CB PCR Buffer (2X), SeqAmp DNA Polymerase, and 5' and 3' PCR Primer HT sets
- PCR1 の直後に C)を実施する場合は、事前に AMPure beads を室温に戻してください。

1. サーマルサイクラーで「PCR1」プログラムを設定し保留にしておく。
2. 総サンプル数×1.1 倍量の PCR1 Master Mix を調製する。以下の試薬を記載の順に添加してからよく混合し、クイックスピンする。

2 µl	Nuclease-Free Water
25 µl	SeqAmp CB PCR Buffer (2X)
1 µl	SeqAmp DNA Polymerase
<hr/>	
28 µl	Total volume per reaction

3. すべてのサンプルに 28 µl の PCR Master Mix を添加する。
4. 各サンプルに 1 µl ずつ 5' Primer HT と 3' PCR Primer HT を添加し、優しくボルテックスかタッピングで混合しクイックスピンする。
5. 予熱しておいたサーマルサイクラーにセットし、「PCR1」を実行する。ultra-low-input ワークフローに従う場合は 10 サイクルに設定し、low-input ワークフローに従う場合は 5 サイクルに設定する。

94°C	1 min
<u>5 or 10 cycles*</u> :	
98°C	15 sec
55°C	15 sec
68°C	30 sec
	}
68°C	2 min
4°C	forever

□SAFE STOPPING POINT：サンプルは 4°Cで一晩、もしくは -20°Cで最長 2 週間保管可能

C) AMPure Beads を用いた RNA-Seq ライブラリーの精製

- サンプルが 10 細胞未満または 100 pg 未満の total RNA の場合、ライブラリーの調製前にサンプルを混合することが可能です。この工程をスキップして、英語版ユーザーマニ

アル Appendix A の推奨事項に従い、**D)**で現在の工程を再開してください。

- この工程では、以下の試薬を使用します: AMPure beads (at room temperature), 80%エタノール (新たに作製した新鮮な溶液), Nuclease-Free Water

E)までの手順を続行する時間がない場合は、この工程を開始しないでください。

【事前の試薬準備】

- AMPure Beads を必要量、新しい 1.5 ml チューブに分取する。分取したビーズと Nuclease-Free Water を少なくとも 30 分間室温に戻す。ボルテックスでよく攪拌する。
 - ビーズ量：サンプル量は 1:1 とする。
 - 1 サンプルにつき 400 μ l の新鮮な 80%エタノールを準備する。
- D)**の準備として ZapR Buffer を -20°C から取り出し、室温で解凍する。
 - それぞれのサンプルに 35 μ l のビーズを添加し、5 秒間ボルテックスでしっかり攪拌する。
 - 室温で 8 分間インキュベートして、DNA をビーズに結合させる。
 - チューブを遠心機でクイックスピンし、溶液が完全に透明になるまでチューブを磁気分離装置に 5 分以上置く。
 - チューブを磁気分離装置にセットしたまま、ピペットで上清を取り除く。
 - 磁気分離装置上で各サンプルに 200 μ l の 80%エタノールを添加する。
 - 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。cDNA はビーズに結合したままである。
 - 磁気分離装置上で各サンプルに 200 μ l の 80%エタノールを添加する。
 - 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。
 - サンプルを遠心機でクイックスピンする。
 - サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。
 - ペレットに亀裂が入る直前まで、サンプルを室温で 5 分間

インキュベートする。

※ビーズの乾燥が進みペレットに亀裂が生じると、DNA がビーズから溶出されにくくなり、結果的に収量が低下する可能性があるので注意する。

- サンプルを磁気分離装置から外し、52 μ l の Nuclease-Free Water を加えてビーズを覆う。
- チューブの蓋を閉め、サンプルを磁気分離装置から外してボルテックスで混合する。
- サンプルを室温で 5 分間インキュベートした後に遠心機でクイックスピンする。
- サンプルを磁気分離装置にセットして 5 分以上静置し、上清が透明になるまで待つ。
- 50 μ l の透明な上清を、新しい PCR チューブへ移す。
- 各サンプルチューブに 40 μ l の AMPure beads を添加しボルテックスで 5 秒間混合する。
- 室温で 8 分間インキュベートして、DNA をビーズに結合させる。インキュベート中に **D)**を開始する。
- すぐに次の工程へ進む。

D) scZapR と scR-Probes による Ribosomal cDNA の除去

- この工程では、rRNA (18S および 28S) およびミトコンドリア rRNA (m12S および m16S) に由来するライブラリー産物が、scR プロブ (哺乳類特異的) の存在下で scZapR によって切断されます。
- 作業には以下の試薬が必要です: scR-Probes, scZapR, ZapR Buffer, Nuclease-Free Water

C)終了後、すぐに **D)**の 3. へ進んでください。

- scR-Probes と ZapR Buffer を室温で解凍する。scR-Probes は解凍したら使用するまで氷上に置き、ZapR Buffer は室温に置いておく。scZapR は常に氷上に保管し、使用後はすぐに冷凍庫に戻す。
- サーマルサイクラーでプログラム「PreZap」をセットし、保留にしておく。
- AMPure ビーズによる精製後 8 分間のインキュベーションが完了したら、サンプルチューブを軽く回転させて底に液体を集めます。溶液が完全に透明になるまで、サンプルチ

ューブを磁気分離装置上に 5 分間以上置きます。

4. 5 分間のインキュベーション時間中に、総サンプル数×1.1 倍量の scR-Probes (1 サンプルあたり 1.5 µl 使用) を予冷した PCR チューブにピペットで加え、氷上に置く。余った scR-Probes はすぐに -70°C の冷凍庫に戻す。

5. scR-Probes を含む PCR チューブを、プログラム「PreZap」を使用して、予熱したサーマルサイクラーでインキュベートする。

72°C	2 min
4°C	forever

6. scR-Probes の入ったチューブを 4°C のサーマルサイクラーで 2 分以上、最大で 15 分間まで静置する。

7. 磁気分離装置での 5 分間インキュベーションが完了したサンプルについて、透明になった上清をピペットで取り除く。

8. チューブを磁気分離装置にセットした状態で、80%エタノールを 200 µl 各サンプルに加える。

9. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。DNA はビーズに結合したままである。

10. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。

11. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。

12. サンプルを遠心機でクイックスピニングする。

13. サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。

14. ビーズが乾燥するまで、サンプルを室温で最大 5 分間インキュベートする。

15. ビーズを乾燥させている間に、総サンプル数×1.1 倍量の scZapR Master Mix を調製する。

※予熱および冷却した scR-Probes は必ず最後に添加し、使用後は -20°C の冷凍庫に戻すこと。

16.8 µl	Nuclease-Free Water
2.2 µl	10X ZapR Buffer
1.5 µl	scZapR
1.5 µl	scR-Probes
<hr/>	
22 µl	Total volume per reaction

16. ボルテックスでしっかり混合し、遠心機でクイックスピニングする。

17. 各サンプルの乾燥した AMPure ビーズに、22 µl の scZapR Master Mix を添加する。

18. チューブの蓋をしてから、チューブを磁気分離装置から外しボルテックスで混合する。

19. 室温で 5 分間インキュベートする。

20. チューブを遠心機でクイックスピニングする。

21. 溶液が完全に透明になるまで、チューブを磁気分離装置上に 1 分間以上置く。

22. 各サンプルの上清 20 µl をピペットで取り、新しい PCR チューブに移す。

23. サーマルサイクラーでプログラム「Zap」をセットし、予熱したサーマルサイクラーでチューブをインキュベートする。

37°C	60 min
72°C	10 min
4°C	forever

□SAFE STOPPING POINT: サンプルは 4°C で 1 時間まで保管可能だが、速やかに次の工程に進むことを推奨します。

E) PCR2—最後の RNA-Seq ライブラリー増幅

- この工程では、scZapR 反応によって切断されなかったライブラリー断片を濃縮します。NGS 解析に使用するバーコード配列はすでにライブラリーに付加されているため、単一のプライマーセットを使用します。
- 作業には以下の試薬が必要です: Nuclease-Free Water, SeqAmp CB PCR Buffer (2X), PCR2 Primers and SeqAmp DNA Polymerase

1. サーマルサイクラーで「PCR2」をセットし、保留にしておく。サイクル数は表 3 に従う。

2. 総サンプル数×1.1 倍量の PCR2 Master Mix を作製し、よく混合する。

26 µl	Nuclease-Free Water
50 µl	SeqAmp CB PCR Buffer
2 µl	PCR2 Primers
2 µl	SeqAmp DNA Polymerase
<hr/>	
80 µl	Total volume per reaction

3. 遠心機でクイックスピニングする。

4. 各サンプルに PCR2 Master Mix 80 µl を加え、タッピングで混合する。

サンプルの反応液量 100 µl は収量を得るために重要です。サーマルサイクラーが 100 µl の液量に対応できない場合は、PCR2 Master Mix を追加、混合、クイックスピニングした後に各サンプル

を2つのチューブ（それぞれ約 50 µl の液量）に均等に分割して反応を進めてください。

5. 遠心機でクイックスピンする。
6. 予熱したサーマルサイクラーにチューブをセットし、表 3 に従って決定したサイクル数を使用して PCR を実行する。

94°C	1 min
<u>10-14 cycles:</u>	
98°C	15 sec
55°C	15 sec
68°C	30 sec
4°C	forever

□SAFE STOPPING POINT：サンプルは 4°C で一晩、もしくは -20°C で 2 週間保管可能

F) AMPure Beads を用いた PCR2 RNA-Seq ライブラリーの精製

- ・ ultra-low-input workflow を実施する場合は 2 回目のビーズ精製を含むプロトコル全体を実施しますが、low-input workflow に従う場合、ビーズ精製は 1 回で終了します。ultra-low-input workflow では、すべてのアダプターダイマーを除去するために 2 回のビーズ精製が必要です。
- ・ 作業には以下の試薬が必要です: AMPure beads (常温の戻したもの), 80%エタノール (新たに作製した新鮮な溶液), Tris Buffer

【事前の試薬準備】

- ・ AMPure Beads を必要量、新しい 1.5 ml チューブに移し、これと溶出バッファー (Tris Buffer) を少なくとも 30 分間室温に戻す。ボルテックスでよく攪拌する。
 - ・ ビーズ量：サンプル量は 100 µl: 100 µl とする。
 - ・ 1 サンプルにつき 400 µl の新鮮な 80%エタノールを準備する。
1. それぞれのサンプルにビーズを 100 µl 添加し、5 秒間ボルテックスでしっかり攪拌する。
 2. 室温で 8 分間インキュベートして、cDNA をビーズに結合させる。
 3. チューブを遠心機でクイックスピンし、溶液が完全に透明になるまでチューブを磁気分離装置に 10 分以上置く。

4. チューブを磁気分離装置にセットしたまま、ピペットで上清を取り除く。
5. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。
6. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。cDNA はビーズに結合したままである。
7. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。
8. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。
9. サンプルを遠心機でクイックスピンする。
10. サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。
11. ペレットに亀裂が入る直前まで、サンプルを室温で 10 分間インキュベートする。
※ビーズの乾燥が進みペレットに亀裂が生じると、DNA がビーズから溶出されにくくなり、結果的に収量が低下する可能性があるため注意する。
12. サンプルを磁気分離装置から外し、22 µl の Tris Buffer を加えてビーズを覆う。
13. チューブの蓋を閉め、サンプルを磁気分離装置から外してボルテックスで混合する。
14. サンプルを室温で 5 分間インキュベートした後に遠心機でクイックスピンする。
15. サンプルを磁気分離装置にセットして 5 分以上静置し、上清が透明になるまで待つ。
16. 20 µl の透明な上清を、新しい PCR チューブへ移す。

low-input workflow を行う場合は、ここで作業を停止し cDNA の品質確認へ進んでください。

2 回目のビーズ精製

17. 各サンプルに 20 µl の AMPure ビーズを添加し、5 秒間ボルテックスで攪拌する。
18. 室温で 8 分間インキュベートして、DNA をビーズに結合させる。
19. チューブを遠心機でクイックスピンし、溶液が完全に透明になるまでチューブを磁気分離装置に 5 分以上置く。
20. チューブを磁気分離装置にセットしたまま、ピペットで上

清を取り除く。

21. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。
22. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。DNA はビーズに結合したままである。
23. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。
24. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。
25. サンプルを遠心機でクイックスピンする。
26. サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。
27. サンプルを室温で 5 分間インキュベートする。
28. サンプルを磁気分離装置から外し、12 µl の Tris Buffer を加えてペレットを覆う。
29. チューブの蓋を閉め、サンプルを磁気分離装置から外してボルテックスで混合する。
30. サンプルを室温で 5 分間インキュベートした後に遠心機でクイックスピンする。
31. サンプルを磁気分離装置にセットして 2 分以上静置し、上清が透明になるまで待つ。
32. 10~11 µl の透明な上清を、新しい PCR チューブへ移す。

□SAFE STOPPING POINT：サンプルは-20°Cで保管可能

G) Qubit と Agilent 2100 Bioanalyzer によるライブラリーの品質確認

cDNA の収量確認

- ・ ライブラリーは Qubit dsDNA HS kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して定量してください。さらなるライブラリーの検証と配列決定を実施するには、3 ng/µl 以上の収量が望ましいです。
- ・ 収量が不十分な場合は、後の PCR2 実験でサイクル数を 1 追加するか、収量が 10 ng/µl を超える場合はサイクル数を減らすことを検討してください。なお、PCR1 と PCR2 の合計サイクル数が 23 を超えないようにしてください。サイクル数が大きいほどバックグラウンドが高まり、ネガティブコントロールの収量が 1 ng/µl 程度になることもあります。そのためサンプルでライブラリーの収量が確認できて

も、それがライブラリーの調製成功を意味するわけではありません。陽性サンプルの収量が、陰性サンプルの 3 倍以上の収量である場合、バックグラウンドは許容されます。

cDNA の品質確認

【使用推奨機器・試薬】

Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, 製品コード 5067-4626)

1. それぞれのサンプルを約 1.5 ng/µl に希釈してから解析する。

- ・ cDNA 合成と増幅が成功した場合、Agilent High Sensitivity DNA Kit においてポジティブコントロール RNA サンプルで 200~2,000 bp の範囲に増幅産物が見られ、ピーク長は 300~450 bp となります。ライブラリーのサイズは、鋳型 RNA の分子サイズ+139 bp の大きさとなります。
- ・ ネガティブコントロールは、通常 200~1,000 bp の範囲よりも 1,000~2,000 bp の範囲でより多くの PCR 産物が確認されます。
- ・ 図 3 の D に見られるような約 150~200 bp の少量の PCR 産物は、シーケンス結果に影響を与えませんが、200 bp 未満の生成物が過剰に存在する場合は、AMPure Beads 精製の F) と同様にビーズ:サンプル比 1:1) を繰り返すことを検討してください。

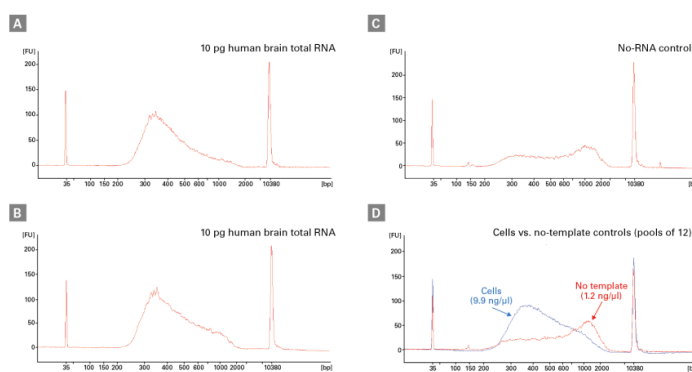


図 3. Bioanalyzer HS によるライブラリー解析結果の例

2. サンプルとコントロールの結果を比較し、イルミナシーケンスへ進む。

本製品を購入する際の注意事項

この製品は研究用途のみに使用できます。ヒトへの使用、治療または診断を含む他の目的に使用することはできません。当社の製品を第三者に譲渡することや、再販、再販のための改造、商業製品の製造を行うには事前に当社から書面による承認を得る必要があります。また、製品 Web ページに記載の該当するライセンス要件についても遵守する必要があります。

タカラバイオ株式会社

製品に関するご質問は下記お問い合わせ先までご連絡ください。

テクニカルサポートライン

Tel : 077-565-6999

Fax : 077-565-6995

v202403