

さらなる高感度化を実現した Ultra-Low Input mRNA-Seq

SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing **NEW!**

SMART 技術と LNA 技術の融合：

LNA(Locked nucleic acid)技術の採用によりテンプレート・スイッチング効率を改善

大幅な高感度化：

SMARTer Ultra Low 従来品および SMART-Seq2 よりも高感度な RNA-Seq 解析を実現

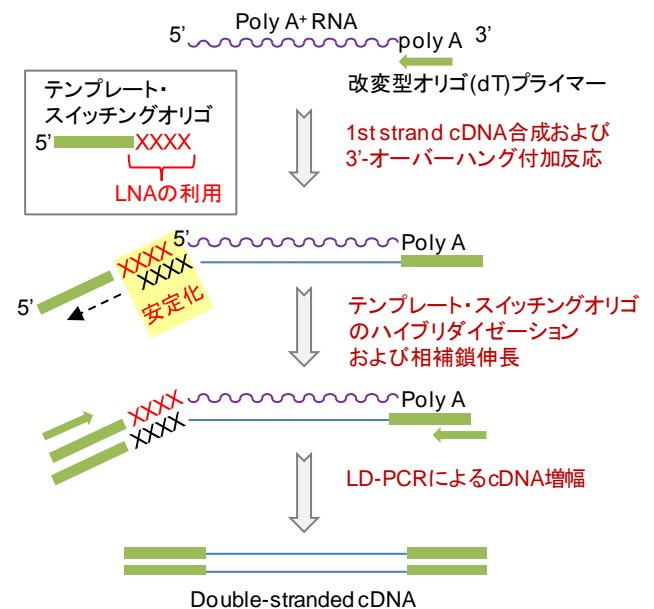
幅広いインプット量からの高い再現性：

10 pg ~ 10 ng の total RNA インプット量から再現性に優れたシーケンシング・ライブラリーの作成が可能

概要

次世代シーケンサー(NGS)の登場に伴い、貴重な微量サンプルやシングルセルを対象とした信頼性の高い網羅的転写産物解析を実現する試みが今日でも進められています。こうした最先端研究分野からの要望に応えるべく、クロンテック社が新たに開発した SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (SMART-Seq v4)は、クラス最高のシングルセル mRNA-Seq 解析を可能とする SMARTer Ultra Low シリーズの中でも最高の遺伝子検出感度を有する第 4 世代の製品です。本キットを用いた mRNA-Seq 解析では、SMART-Seq2 や SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing - v3 (SMARTer Ultra Low v3)をはじめとするクロンテック社従来品よりも優れたゲノムマッピング率とより多数の転写産物の同定を再現性良く実現可能です。

第 3 世代 SMARTer Ultra Low シリーズ製品である SMARTer Ultra Low v3 では、SMARTer 反応後の精製工程を排除することでプロトコール上のロスを実質的に低減するとともに、GC リッチ配列に対しても優れた増幅能力を持つ SeqAmp DNA ポリメラーゼを採用することで、cDNA 収量の向上と GC バイアスによる配列特異的な転写産物の収量低下を改善しました。本製品を基本として改良された SMART-Seq v4 では、ラドウィック癌研究所のリカード・サンドバーグ博士らのグループにより開発された SMART-Seq2 法 (Picelli et al., 2013)の技術を採用し、さらに最適化を行うことで、SMARTer Ultra Low v3 ならびに SMART-Seq2 に優る高感度化を実現しました。すなわち、SMART-Seq v4 のテンプレート・スイッチング用オリゴ (SMART-Seq v4 オリゴ)の一部には、SMART-Seq2 同様、locked nucleic acid (LNA)が利用されており、SMART-Seq v4 オリゴと、Reverse Transcriptase (RTase)によって付加された First-strand cDNA の 3'-オーバーハング構造との相互作用



LNAとは？

Locked Nucleic Acid (LNA)とは、リボース環の2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋(赤色)されたRNAアナログの一種です。LNAを含むオリゴヌクレオチドは、相補的なDNAやRNAに対する熱安定性が上昇し、極めて高い結合親和性と配列特異性を示します。

LNA

図 1. SMART-Seq v4 による改変型オリゴ(dT)プライマーとテンプレートスイッチングによる cDNA 合成

用が安定的化されます(図 1)。また、従来製品同様、極めて高効率なテンプレート・スイッチング効率を有する SMARTScribe RTase を採用し、テンプレート・スイッチング反応系を改めて最適化することで、収率の向上と極めて高い遺伝子検出感度を実現しました。以上の大幅な改良を加えられた SMART-Seq v4 では、シングルセルを始めとするサブナノグラム以下の微量 total RNA からの網羅的トランスクリプトーム解析の信頼性向上に大きく寄与することが期待できます。

従来法よりも大幅に改善された RNA-Seq 解析結果

シングルセル相当の total RNA (Mouse Brain Total RNA, 10 pg)より、SMART-Seq v4、SMARTer Ultra Low v3、SMART-Seq2 の 3 種の cDNA 増幅法を用いて mRNA-Seq ライブラリーを作製し、MiSeq(イルミナ社)による NGS 解析を行いました(各 2 連で実施、表 1)。その結果、SMART-Seq v4 キットを用いて得られた増幅 cDNA の収量(10.6 ng, 11.2 ng [17 cycles])は、他の従来技術よりも大幅に向上し(SMARTer Ultra Low v3: 4.7 ng, 6.0 ng [18 cycles] / SMART-Seq2: 12.6 ng, 8.1 ng [18 cycles])、また、SMART-Seq v4 で得られたシーケンスリードのゲノムマッピング率についても(96%, 95%)、SMART-Seq2(72%, 93%)よりも再現性良く高い値が得られました。

すなわち、これらの結果は、SMART-Seq v4 では、cDNA 調製時の正確性を損なうことなく、収量改善が実現されていることを示しています。加えて、SMART-Seq v4 により得られた検出遺伝子数(14,731, 14,813 [FPKM > 0.1])は、SMARTer Ultra Low v3 キット(11,647, 10,885 [FPKM>0.1])、または、SMART-Seq2(12,080, 12,039 [FPKM > 0.1])の従来技術よりも飛躍的に増加しました。このことから、SMART-Seq v4 を用いることで、シングルセル相当の total RNA 量から従来法よりも多数の転写産物の同定が可能であることが示されました。

Sequencing Metrics Comparing Different cDNA Synthesis Protocols							
RNA source	10 pg Mouse Brain Total RNA						
cDNA synthesis	SMARTer Ultra Low v3		SMART-Seq v4		SMART-Seq2		
Yield (ng)	4.7	6.0	10.6	11.2	12.6	8.1	
Percentage of reads (%):							
Mapped to rRNA	0.8	0.4	6.5	6.1	6.9	3.8	
Mapped to mitochondria	6.0	5.4	3.4	3.4	5.1	7.2	
Mapped to genome	96	97	96	95	72	93	
Mapped to exons	73	73	76	76	66	67	
Mapped to introns	21	21	19	20	28	27	
Mapped to intergenic regions	6.0	6.2	4.7	4.7	5.8	5.8	
Number of genes	FPKM >0.1	11,647	10,885	14,731	14,813	12,080	12,039
	FPKM >1	9,729	9,105	12,501	12,591	10,270	10,058

表 1. 10 pg の Mouse Brain total RNA より作製した mRNA-Seq ライブラリーの NGS 解析結果比較

10 pg の Mouse Brain total RNA より SMART-Seq v4、SMARTer Ultra Low v3、SMART-Seq2 のそれぞれを用いて増幅 cDNA を調製し(各 2 連)、Nextera® XT DNA Library Preparation Kit (イルミナ社)を使用してライブラリー化後、MiSeq(イルミナ社)により解析した(<<方法>>を参照)。各方法による cDNA 増幅は、SMART-Seq2 法および SMARTer Ultra Low v3 キットでは 18 サイクル、SMART-Seq v4 については 17 サイクルの PCR にて行った。

改善された低発現転写産物検出の再現性

SMARTer Ultra Low、ならびに、SMART-Seq2 を用いた mRNA-Seq 解析の利点として、インプット total RNA 量が微量の場合にも良好な再現性を有する解析が可能であることが挙げられます。

次に、表 1 に示した 3 種の cDNA 増幅法を用いて作製した各 mRNA-Seq ライブラリーの NGS 解析結果の再現性を、FPKM 値(注 1)の Scatter plot 解析により比較しました(図 2)。その結果、各 cDNA 増幅法により得られた 2 連の NGS 解析で検出された全転写産物に対する FPKM 値の相関係数(Pearson R)は、何れの方法を用いた場合にも 0.91 (SMARTer Ultra Low v3 = 0.911 [パネル A-右] / SMART-Seq v4 = 0.972 [パネル B-右] / SMART-Seq2 = 0.966 [パネル C-右])を超える高い値が得られました。一方、FPKM >100 の高発現転写産物を除いた低発現遺伝子のみを比較した場合には、SMARTer Ultra Low v3 (0.376 [パネル A-左])、および、SMART-Seq2 (0.496 [パネル C-左])と比較し、SMART-Seq v4 (0.739 [パネル B-左])で高い相関関係が維持されることが確認できました。本結果より、SMART-Seq v4 では、従来技術では実現困難であった相対的に発現レベルの低い転写産物の検出についても高い再現性が得られることが確認できました。

加えて、SMART-Seq v4 を用いて作製した 2 連のライブラリーのうち、単一のライブラリーのみから検出が認められた転写産物の内、高発現なもの数は極めて少数であり、また、その FPKM 値が最大 70 であったのに対し、SMARTer Ultra Low v3 と SMART-Seq2 を用いた場合の最大値は、それぞれ 364、236 であったことから、SMART-Seq v4 を使用した cDNA 増幅の再現性が従来技術に優ることが明らかとなりました。

注 1) FPKM : Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped。検出された転写産物発現量を転写産物長(1 キロベース当り)と全マッピング遺伝子数(100 万当り)で正規化した値。

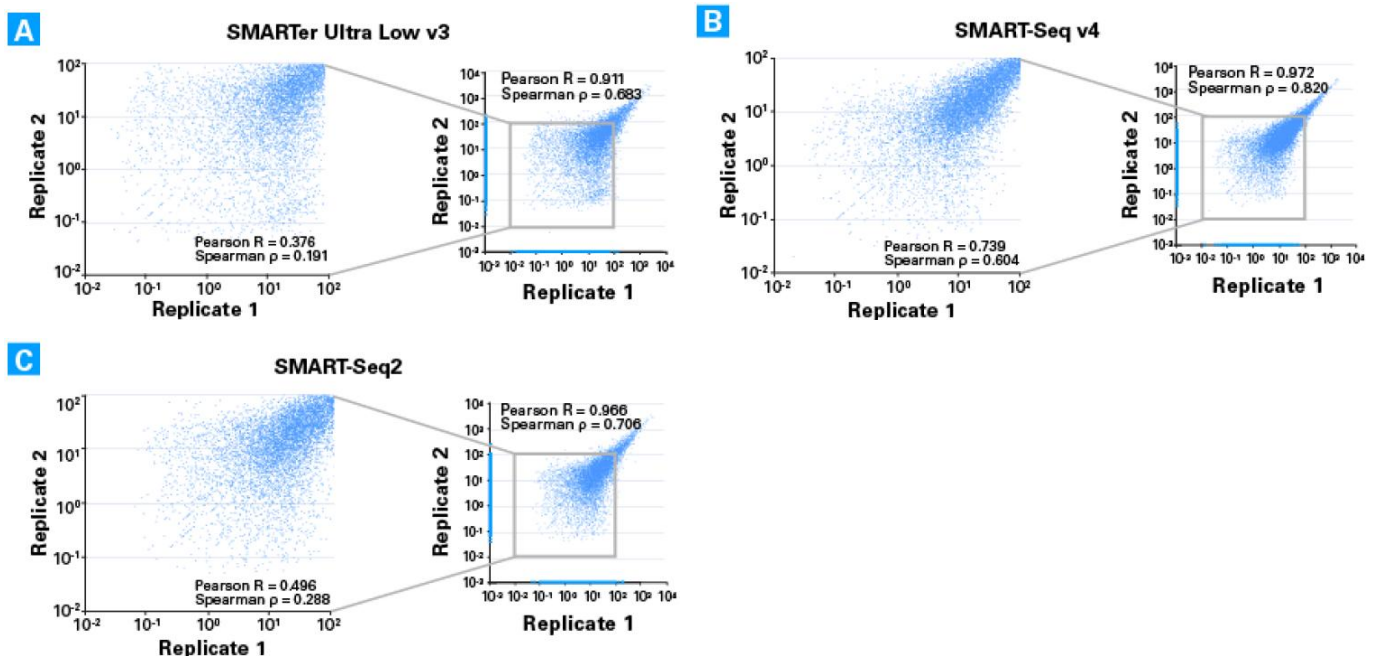


図 2. 10 pg の Mouse Brain Total RNA より SMARTer Ultra Low v3 (パネル A)、SMART-Seq v4 (パネル B)、SMART-Seq2 (パネル C)を使用し 2 連で作製した mRNA-Seq ライブラリー由来の FPKM 値相関関係の比較

A~C の各パネル中、右図は全転写産物に対する FPKM 値、左図は FPKM <100 の低発現転写産物に対する FPKM 値の相関関係を表す。

均一な遺伝子カバレッジ

SMART-Seq v4をはじめとする SMARTer Ultra Low シリーズの従来品、ならびに、SMART-Seq2 で採用されているオリゴ(dT)とテンプレート・スイッチング反応による cDNA 合成法の大きな利点として、転写バリエーションなどの解析を可能にする転写産物全長を網羅する cDNA ライブラリーの構築が挙げられます。図 3 の 10 pg Mouse Brain Total RNA より 3 種の cDNA 増幅法を用いて作製したライブラリーの遺伝子カバレッジの比較結果から、SMART-Seq v4 を用いた場合、転写産物 5' 側にわずかに偏りを生じるものの、SMARTer Ultra Low v3 および SMART-Seq2 と同等に概ね遺伝子全体を均一にカバーするライブラリー構築が可能であることが明らかになりました。

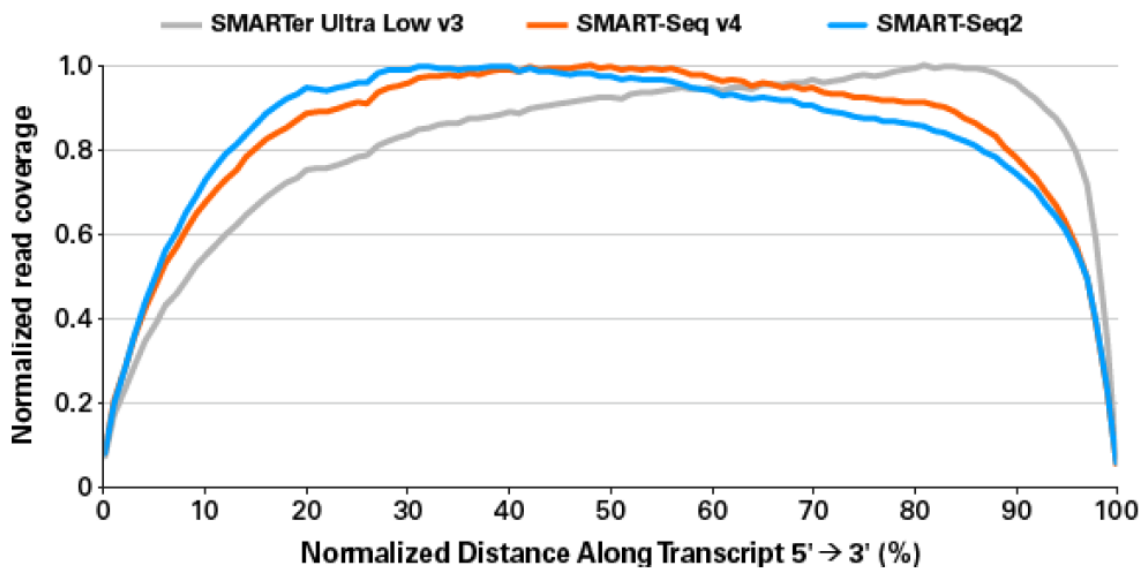


図 3. 10 pg の Mouse Brain total RNA より 3 種の cDNA 増幅法を用いて作製した mRNA-Seq ライブラリーの遺伝子カバレッジの比較

広範囲の RNA インプット量からの優れたライブラリ構築

10 pg ~ 10 ng の Human Brain Total RNA より SMART-Seq v4 を用いてライブラリー構築を行い、その結果得られた NGS 解析結果を表 2 に示しました。本結果より、SMART-Seq v4 を用いることで、10 pg ~ 10 ng の微量 total RNA 量より、rRNA へのマッピング率が低く、また、ゲノムおよびエクソンへのマッピング率が高い多数の転写産物の同定が可能なライブラリー構築が可能であることが確認できました。すなわち、こうした微量インプット total RNA、ならびに、1 ~ 1000 の相当の細胞(データ省略)から、高品質で再現性の高いシーケンシング結果の取得が可能であることが明らかになりました。

Sequencing Metrics Comparing Input RNA Amounts										
RNA source		Human Brain Total RNA								
Input amount		10 pg		100 pg		1 ng		10 ng		
Yield (ng)		3.2	3.2	5.2	5.6	3.5	4.4	6.7	6.1	
Percentage of reads (%):										
Mapped to rRNA		1.6	1.4	1.9	1.9	3.83	3.8	11.8	11.6	
Mapped to mitochondria		8.7	9.0	8.7	9.0	9.5	9.4	9.6	9.3	
Mapped to genome		93	94	95	96	95	95	94	95	
Mapped to exons		76	77	76	76	75	75	73	73	
Mapped to introns		19	19	19	19	20	20	22	22	
Mapped to intergenic regions		4.7	4.4	4.6	4.7	4.8	4.8	5.2	5.1	
Number of transcripts		FPKM >0.1	14,169	22,367	22,367	22,531	24,449	24,469	24,524	24,522
		FPKM >1	11,627	11,227	16,460	16,600	17,218	17,119	17,383	17,333
Pearson R		0.96		0.99		1.00		1.00		

表 2. 10 pg ~ 10 ng の Mouse Brain total RNA より SMART-Seq v4 を用いて作製した mRNA-Seq ライブラリーの解析結果

10 pg ~ 10 ng の Mouse Brain total RNA より SMART-Seq v4 を用いて増幅 cDNA を調製(各 2 連)し、Nextera® XT DNA Library Preparation Kit (イルミナ社)を使用してライブラリー化後、MiSeq(イルミナ社)により解析した。10 pg、100 pg、1 ng、10 ng の total RNA からの cDNA 増幅は、それぞれ 17、14、10、7 サイクルの PCR を用いて行った(<<方法>>を参照)。

<<方法>>

3 種の cDNA 合成法を用いた 10 pg Mouse Brain Total RNA からの RNA-Seq 解析

SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing - v3、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing、SMART-Seq2 法を用いた 10 pg Mouse Brain Total RNA からの増幅 cDNA の調製は、ユーザーマニュアルまたは参考文献(Picelli et al., 2013)に従い各 2 連で行った。NGS 解析用アダプターとインデックス配列の付加による NGS 解析用ライブラリーの構築は、各 100 pg の増幅 cDNA を用い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit (イルミナ社)を使用して行い、配列解析は MiSeq (イルミナ社)を用いた 400 万リードのペアエンド解析(2 × 75 bp)で行った。

SMART-Seq v4 を用いた 10 pg ~ 10 ng Human Brain Total RNA からの RNA-Seq 解析

SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing を用いた 10 pg ~ 10 ng の Human Brain Total RNA からの増幅 cDNA の調製は、ユーザーマニュアルに従い、各濃度 2 連で行った。NGS 解析用アダプターとインデックス配列の付加による NGS 解析用ライブラリーの構築は、各 100 pg の増幅 cDNA を用い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit を使用して行い、配列解析は MiSeq を用いた 310 万リードのペアエンド解析(2 × 75 bp)で行った。

情報解析

Mouse および Human Brain Total RNA 由来のシーケンスリードを、CLC Genomics Workbench でトリムした後、rRNA (Mapped to rRNA、表 1, 2) およびミトコンドリアゲノム (Mapped to mitochondria、表 1, 2) に対して マッピングし全リードに対する割合(%)として表した。また、rRNA およびミトコンドリアゲノムに対してマッピングされなかったリードについては、RefSeq のアノテーション情報が付加されたマウスゲノム(mm10、表 1)、または、ヒトゲノム(hg19、表 2) を参照配列として CLC によるマッピングを行い、エクソン (Mapped to exons、表 1, 2)、イントロン (Mapped to introns、表 1, 2)、またはインタージェニック領域 (Mapped to intergenic regions、表 1, 2) にマッピングされたリード数について RefSeq にマッピングされたリード数に対する割合(%)として表した。さらに、同定遺伝子数 (Number of genes) については、FPKM 値が 0.1 以上を対象に算出した。

Scatter plot 解析(図 2)は、CLC によるトランスクリプトームへのマッピングにより得られた FPKM 値を用いて行い、2 連で作製したライブラリーの一方でのみ検出された転写産物の解析は、FKPM 値 0.001 を超えるものを対象として行った。

遺伝子カバレッジ(図 3)は、RSeQC geneBody_coverage.py モジュールを使用して決定し、シーケンスリードによるカバレッジは、Excel を用いて標準化した。

<<参考文献>>

Picelli, S., et al., (2013) Nat. Methods 10(11)1096-1098.

製品名	容量	製品コード	価格 (税別)
SMART-Seq™ v4 Ultra™ Low Input RNA Kit for Sequencing	12 回	634888	¥267,800
	24 回	634889	¥494,400
	48 回	634890	¥803,400
	96 回	634891	¥1,236,000
	192 回	634892	¥2,060,000
	480 回	634893	¥4,923,400
	960 回	634894	¥5,500,000