

NGS 解析にあたっての RNA サンプルの準備について

目次

<参考>RNA の抽出・精製方法.....	2
RNA の必要量及びクオリティチェックについて.....	4
お問い合わせ先.....	7

<参考>RNA の抽出・精製方法（主に真核生物を対象）**Trizol を用いた RNA 抽出・精製**

1. サンプル（100 mg）を、液体窒素等を使用して破砕した後、直ちに Trizol を 1 ml 加える。
2. 30℃で 30 分インキュベートする。
3. Trizol 1 ml あたり 200 μ l のクロロホルムを加え、15 秒間 Vortex にかける。
4. 30℃で 2 分インキュベートする。
5. 4℃、15 分、12,000 $\times g$ で遠心し、上清を新しいエッペンチューブに移す。
6. Trizol 1 ml あたり 500 μ l のイソプロピルアルコールを加える（多糖類が多い場合は 250 μ l のイソプロピルアルコールと High-salt Solution for Precipitation (TaKaRa) を 250 μ l 加える)。
7. 30℃で 10 分インキュベートする。
8. 4℃、10 分、12,000 $\times g$ で遠心し、上清を除去、1 ml の 75%エタノール（用事調製）を加えて Vortex を行う。
9. 4℃、5 分、7,500 $\times g$ で遠心し、上清を除去する。
10. 8 及び 9 を繰り返す。
11. 10 分風乾後、TE に溶解（10~20 μ l）、60℃で 10 分インキュベート、濃度測定

DNase 処理（Invitrogen DNase I を使用 Cat.No.18068-015）

1. 以下の組成で調製（RNA サンプルは 600 ng/ μ l 以上必要）

RNA サンプル	10 μ g
DNase I	サンプルの 1/10 μ l
10 \times Buffer	2 μ l
Free 水	total 20 μ l となるよう添加

2. 室温で 15 分インキュベートする。
3. 溶液の 1/10 量の 25 mM EDTA を添加し、65℃で 10 分インキュベートする。

RNA の再精製（RNeasyPlant mini kit（QIAGEN）を使用）

1. DNase 処理した RNA 溶液に RLT を加え、450 μ l にする。
2. 1 の溶液に 250 μ l のエタノールを添加する。
3. 全量を RNeasy spin column にアプライ、5,000 rpm、1 分間遠心、スルーを捨てる。
4. RW 700 μ l をカラムにアプライ、12,000 rpm、1 分間遠心、コレクションチューブを捨てる。
5. RPE（EtOH 添加済み） 500 μ l をカラムにアプライ、12,000 rpm、1 分間遠心、スルーを捨てる。
6. RPE（EtOH 添加済み） 500 μ l をカラムにアプライ、12,000 rpm、1 分間遠心、スルーを捨てる。
7. 13,000 rpm、2 分間遠心、カラムを付属の 1.5 ml チューブに移す。
8. RNase Free 水 40 μ l をカラムにアプライ、5 分間静置し、12,000 rpm、1 分間遠心する。
9. 35 μ l を回収し、RNA 溶液とする。

<参考>RNAの抽出・精製方法（細菌を対象）

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いた RNA の抽出

1. RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN)を使用して、菌体ペレットを取得する。
2. 15 mg/mlのリゾチームを含んだTEバッファー(30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 100 μ lに、10 μ lの Proteinase K (QIAGEN)を添加し、この混合液 110 μ lをペレットに添加する。
3. ボルテックスで懸濁し、その後室温で 10 分インキュベートする。少なくとも、2 分毎にボルテックスによる混合を行う。
4. 350 μ lの Buffer RLT を添加し、ボルテックスで激しく混合する。
5. 100%エタノールを 250 μ l 添加し、ピペッティングで懸濁する。
6. 700 μ l をカラムにアプライし、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心、フロースルーを捨てる。
7. 700 μ l の Buffer RW1 をカラムにアプライし、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心、フロースルーを捨てる。コレクションチューブを新しいものに変える。
8. 500 μ l の Buffer RPE をカラムにアプライし、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心、フロースルーを捨てる。この操作をもう一度繰り返す。
9. 8,000 $\times g$ 以上で 2 分間遠心し、完全に乾かす。
10. カラムを付属の 1.5 ml チューブに移す。25 μ l の RNase free 水をメンブレンに直接添加し、1 分間インキュベートする。8,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心し、溶出液を得る。この操作をもう一度繰り返し、最終的に 50 μ l の total RNA 溶液を得る。

DNase 処理 (Ambion, TURBO DNA-free Kit を使用 Cat. No. AM1907)

1. total RNA 溶液を 10 μ g/50 μ l (200 ng/ μ l) に希釈する。
2. 0.1 倍量の 10 \times TURBO DNase Buffer と 0.5 μ l の TURBO DNase を RNA に添加し、ピペッティングで混合する。
3. 37 $^{\circ}$ Cで 30 分間インキュベート後、さらに 0.5 μ l の TURBO DNase を添加し、30 分間 37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。
4. 0.1 倍量の DNase Inactivation Reagent を添加し、ピペッティングで混合する。
5. 室温で 5 分間インキュベートする。30 秒に 1 回程度、指ではじいて軽く混合する。
6. 10,000g で 90 秒間遠心し、上清を RNA として新しいチューブに移す。

RNA の再精製 (RNeasy Mini Kit を使用)

1. DNase 処理サンプル 100 μ l に、350 μ l の Buffer RLT を添加しよく混合する。
2. 100%エタノールを 250 μ l 添加し、ピペッティングでよく混合する。
3. 700 μ l をカラムにアプライし、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心、フロースルーを捨てる。コレクションチューブを新しいものに変える。
4. RNeasy Mini Kit を用いた RNA の抽出プロトコル 7-10 と同じ操作を行う。

RNA の必要量及びクオリティチェックについて

必要量 生物種によって異なります。

<原核生物の場合>

必要量は **1 μ g~5 μ g (Total RNA)**、液量は最大 **50 μ l** です。

(**rRNA 除去済み** サンプルの場合)
必要量は **1 ng~100 ng**、液量は最大 **5 μ l** です。

※初期濃度が高いほど PCR によるバイアスが少なくなります。以下を参考にして下さい。

rRNA 除去済み RNA インプット量	サイクル数
1 ng	12~13
10 ng	9~10
50 ng	7~8
100 ng	6~7

Total RNA の場合、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Illumina) を使用して、こちらで rRNA を除去します。なお 1 サンプルあたり、18,000 円の追加料金がかかります。

<真核生物の場合>

必要量は **10 ng~1,000 ng (Total RNA)**、液量は最大 **50 μ l** です。

※初期濃度が高いほど PCR によるバイアスが少なくなります。以下を参考にして下さい。

Total RNA インプット量	サイクル数
10 ng	15~16
100 ng	12~13
1,000 ng	8~9

原核生物、真核生物両方ともに、ライブラリ調製キットは「NEB NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep」を使用します (<https://www.neb.jp/products/detail/2037>)。

クオリティチェック

遺伝子実験棟でのクオリティチェック（4点）に用いるため、必要量とは別に、以下に示す量をあらかじめ分注してお持ちください。

1) 電気泳動：2 μ l …1本

(サンプルが微量の場合は省略可ですが、解析結果に影響が出る場合がございます。ご了承ください。)

電気泳動（1%Gel）にて 28S / 18S rRNA（原核生物の場合は 23S / 16S）のバンドがシャープに認められ、28S のバンドの方が濃いこと、分解および低分子の混入がみられないことを確認します。

(生物種によってはこの限りではありません。ご不明な点をご相談ください。)

2) OD 測定：3 μ l …1本

純度（OD260/OD280、OD260/OD230）が 1.8 以上となるようにサンプル調製して頂きます。また、吸収スペクトルに異常（ピークが確認されない、ピークが高波長側にシフトなど）が認められないことを確認します。

3) 蛍光定量：1.5 μ l …1本

Invitrogen 社の Qubit または Promega 社の Quantus を用いて RNA の蛍光定量を行います。これらの定量値と OD 測定値に乖離がある場合は、RNA の再精製をお勧めしております。

4) バイオアナライザ測定：1.5 μ l …1本

28S, 18S rRNA（原核生物の場合は 23S, 16S）のバンドがシャープである（細くて高い）事、またバックグラウンドピークが少ないことを確認します。サンプルの RIN（RNA Integrity Number）の値が 7.0 以上、rRNA ratio（28S / 18S, 23S / 16S）の値が 1.0 以上であることも確認します（生物種によっては RIN 値が算出されない場合があります）。

以上4点で RNA のクオリティチェックを行います。

クオリティチェック済みのサンプルをお持ちいただくことも可能ですが、その際はデータをご提出頂きますよう、お願い致します。

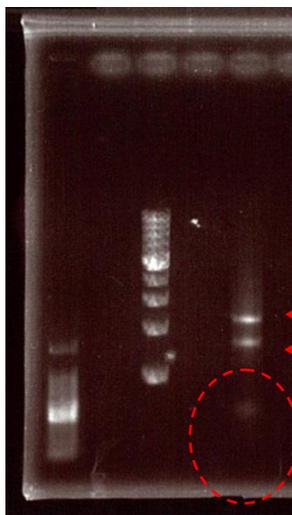
注：泳動図は、分解及び低分子の混入を確認するため、

100 bp 付近が確認できる泳動図をご提出ください（切り取ったりしないで下さい）。

分解及び混入サイズ確認のため、マーカーの種類及び分子量もお知らせ下さい。

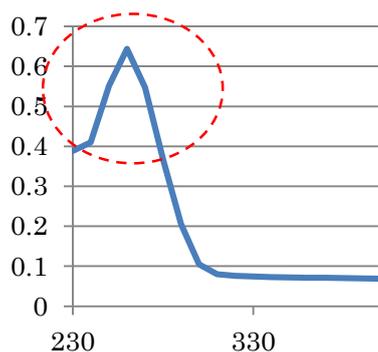
RNA クオリティチェックのデータ (参考)

1) 電気泳動



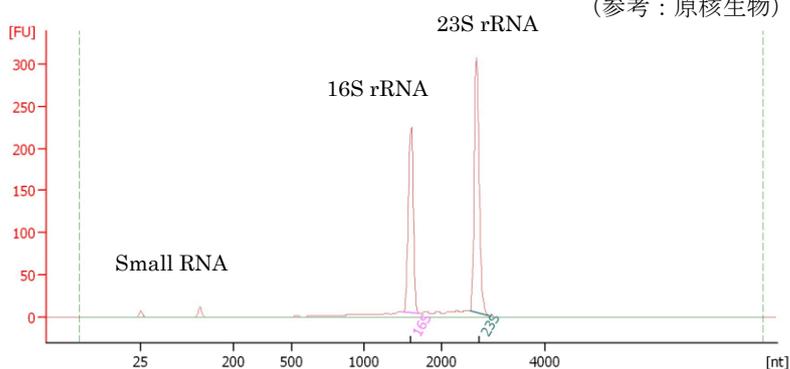
- ・ 28S 及び 18S のバンドが認められるか (原核生物の場合は 23S 及び 16S)
- ・ 分解及び低分子は混入していないか。

2) OD 測定



- ・ OD 確認
- ・ 吸収スペクトルに異常 (ピークがない、ピークの位置がシフトしている等) はないか。

4) バイオアナライザ測定



- ・ バンドはシャープか。
- ・ バックグラウンドピークはどうか。
- ・ rRNA ratio の確認
- ・ RIN 値の確認 (生物種によっては RIN 値が算出されない場合もあるので、注意する。)

お問い合わせ先

ご不明な点がございましたら、下記お問い合わせ先にご連絡ください。

- ・ 次世代シーケンス解析担当者共通アドレス
kyoudou@suml.cii.ac.jp
- ・ 准教授 道羅英夫 (TEL : 054-238-6354)
dora.hideo@shizuoka.ac.jp
- ・ 特任助教 兼崎友 (TEL : 054-238-4385)
kanesaki.yuh@shizuoka.ac.jp
- ・ 技術職員 森内良太 (TEL : 054-238-5061)
moriuchi.ryota@shizuoka.ac.jp

2019.5.30