

TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Guide (1/3)

ライブラリー作製

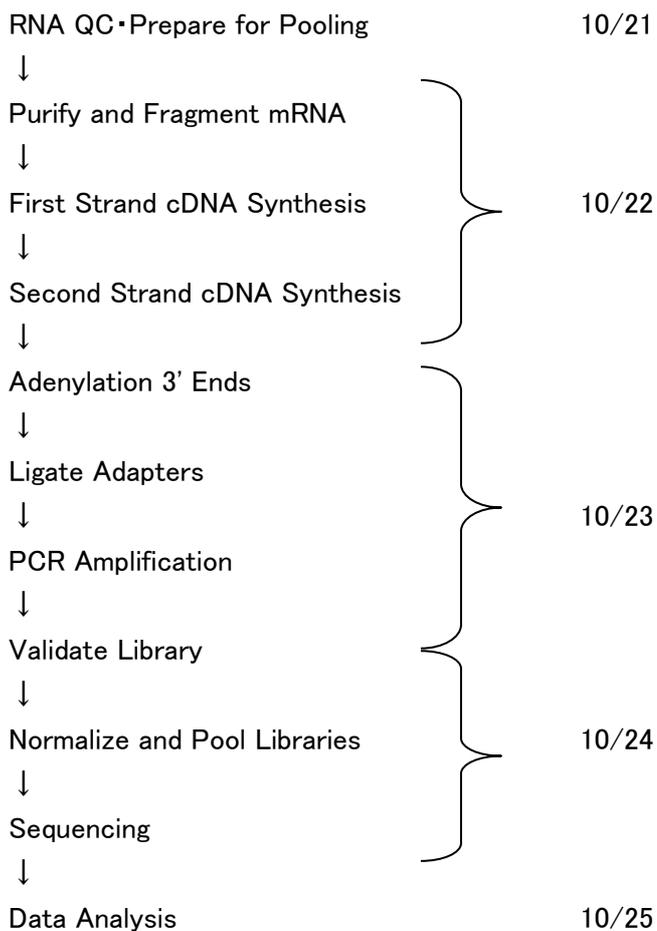
シーケンサー利用技術講習会

本講習は「TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Guide Part#15031047 Rev.D」に準拠した手法で行います

ターゲットとなるインサートサイズは150bを最頻長とした120-200bを想定しています

オプションのInline controlは使用しません

Sample Prep Workflow



使用頻度の高い器具・機器

ピペットマン各種 (1ul-1000ul)

フィルターチップ各種

卓上遠心機

200ul PCRチューブ用 マグネットスタンド

ボルテックスミキサー

サーマルサイクラー

アイスボックス

チルドブロック

Validate Libraryに使用する機器

Bioanalyzer

ABI StepOne plus

必要試薬 (シーケンス試薬を除く)

- TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit – SetA RS-122-2101
- (● TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit – SetB RS-122-2102)

TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 48 Samples, 12 Index Set A/(B)

TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 48 Samples, (Box 1 of 2)

TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 48 Samples, (Box 2 of 2)

TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit, 48 Samples, cDNA Synthesis PCR Box

- Agencourt AMPure XP 60ml kit (Beckman) A63881
- SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 18064-014
- Agilent DNA 1000 kit 5067-1504
- Kapa Library Quantification Kits Illumina GA KK4835
- Tris-HCl 10mM pH8.5 with 0.1% tween 20 General supplier
- Nuclease-free water General supplier
- Ethanol General supplier

●のついていない試薬・物品については同等の性能・機能を有するものであればメーカー・製品は問わない

サーマルサイクラーに以下のプログラムを登録しておく

01-rna-den	65C 5min – 4C hold
02-elution	80C 2min – 25C hold
03-elut-frag-prim	94C 8min – 4C hold
04-1st-strand	25C 10min – 42C 15 min – 70C 15min – 4C hold
05-2nd-strand	16C 60min – 4C hold
06-atail	37C 30min – 70C 5min – 4C hold
07-ligation	30C 10min – 25C hold
08-enrich-frag	98C 30sec – (98C 10sec–60C 30sec–72C 30sec)x15 – 72C 5min – 4C hold

付録

TruSeq Index 配列表

Low-Plex Pooling with TruSeq DNA or RNA Sample Prep Kit v2 Part # 15034135 Rev. A 準拠

Set	Index no	Index Sequence					
A	Index2	C	G	A	T	G	T
A	Index4	T	G	A	C	C	A

A	Index5	A	C	A	G	T	G
A	Index6	G	C	C	A	A	T
A	Index7	C	A	G	A	T	C
A	Index12	C	T	T	G	T	A
A	Index13	A	G	T	C	A	A
A	Index14	A	G	T	T	C	C
A	Index15	A	T	G	T	C	A
A	Index16	C	C	G	T	C	C
A	Index18	G	T	C	C	G	C
A	Index19	G	T	G	A	A	A

mix 数が4以下の場合はIndexの以下の組合せが推奨されている

2 mix

Index6, Index12

Index5, Index19

3mix

Index2, Index7, Index19

Index5, Index6, Index15

Index6, Index12, any other

Index5, Index19, any other

4mix

Index5, Index6, Index12, Index19

Index2, Index4, Index7, Index16

Index2, Index7, Index19, any other

Index5, Index6, Index15, any other

Part#15031047 RevD 準拠

Sample ID _____

- 20°C保存の以下の試薬を室温で溶かしておく
 - Beads Binding Buffer, Beads Washing Buffer, Elution Buffer
 - Elute,Prime,Fragment, Finish Mix Resuspension Buffer
- 4°C保存のRNA Purification Beads, Elution Bufferを室温に戻しておく
- サーマルサイクラーの電源を入れておく

- RNA Purification Beads をボルテックスして十分に混和させる
- PCRチューブ/プレートに下記組成の試薬を加え、ゆっくりピペティングで混ぜる
 - total RNA (0.1-4ug) 50ul *
 - RNA Purification Beads 50ul

※必要に応じてRnase Free Water でメスアップ

- ピペットの目盛りを85ulにセットして、6回以上ピペティング
- 01-rna-den**【68°C 5min→4°C hold】プログラムでインキュベート
- 4°Cに達したらサンプルをサーマルサイクラーから取りだし室温で5min静置
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドから外す
- Beads Wash Buffer を200ul加え、6回以上ピペティングして十分に混和する
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドから外す
- Elution Buffer を50ul加え、6回以上ピペティングして十分に混和する

- 02-elution** 【80°C 2min→ 25°C】プログラムでインキュベート
- 25°Cに達したらサンプルをサーマルサイクラーから取り出す
- Binding Buffer を50ul 加えて6回以上ピペティングして十分に混和する
- 室温で5minインキュベート
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドから外す
- Beads Wash Buffer を200ul加え、6回以上ピペティングして十分に混和する
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドから外す

- Elute,Prime,Fragment Mix を19.5ul加え、6回以上ピペティングして十分に混和する

- 03-elut-frag-prim**【94°C 8min →4°C hold】でインキュベート
 - * インサート長に応じて別途断片化条件有り

memo

- 4°Cに達したらサンプルをサーマルサイクラーから取り出す
- マグネットスタンドにセット、1min静置後に上清17ul回収

Synthesize First Strand cDNA

- 溶解したFirst Strand Synthesis Mix Act Dをスピンドウン
- First Strand Synthesis Act D 9ul に対してSuperScript II 1ulを加え、1st strand mixを調製する
- サンプルに1st strand mixを8ul加えて、15回以上ピペッティング
- サーマルサイクラーにセットし、**04-1st-strand**でインキュベート

25°C	10min	
42°C	15min	この間に以下の試薬を室温で溶かし、氷中保存しておく
70°C	15min	Second Strand Marking Master Mix
4°C	hold	Resuspension Buffer

Synthesize Second Strand cDNA

- 以下のPre-mixを調製する

	1sample あたり
Second Strand Marking Master Mix	20ul
Resuspension Buffer	5ul
- サンプルに2nd pre-mixを25ul加えて、15回以上ピペッティング
- ふたを閉め、スピンドウン
- サーマルサイクラーにセットし、**05-2nd-strand**でインキュベート

16°C	1hr	この間にAMPure XPを室温に戻しておく
4°C	hold	

Clean Up

- AMPure XPを十分にボルテックスする
- サンプルにAMPure XP を90ul 加え、20回以上ピペッティングして、十分に混和する
- 室温で15min 静置する
 - 80% EtOHを調製しておく
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- そのまま15min 風乾する
- マグネットスタンドから外して、Resuspension Buffer を20ul加る
- Beadsの固まりが見えなくなるまでピペッティング
- 2min 室温で静置する
- マグネットスタンドにセットし5min静置する
- 新しいPCRチューブに上清を17.5ul 回収する

-20°Cで保存可 7日以内に次工程を再開すること

ここまで1日で行うこと

Date _____

Adenylate 3' Ends

- A-Tailing Mixを12.5ul加え、10回以上ピペッティングして十分に混和する

- サーマルサイクラーにセットし、**06-atail**でインキュベート
 - 37°C 30min
 - 70°C 5min
 - 4°C hold

Ligate Adapters

- 以下の試薬をサンプルに加える

Resuspension Buffer	2.5ul	} Sample数x1.1 でpre-mix調製 5ul eachを分注
Ligation Mix	2.5ul	
Index adaptor (RNA)	2.5ul	

サンプルと使用するIDの対応を間違えないよう注意

Sample	Index no

- ピペットマンの目盛りを30-35ulに合わせ10回以上ピペッティング

- サーマルサイクラーにセットし、**07-ligation**【30C 10min - 25C hold】でインキュベート

- サーマルサイクラーから取り出し、Stop Ligation Bufferを5ul加える

- ピペットマンの目盛りを35-40ulに合わせ10回以上ピペッティング

第10回シーケンス講習会 TruSeq Stranded mRNA Sample prep

TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Guide (3/3)

Clean Up

- AMPure XPを十分にボルテックスする
- サンプルにAMPure XP を42ul 加え、20回以上ピペッティングして、十分に混和する
- 室温で15min 静置する
 - 80% EtOHを調製しておく
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を79.5ul除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- そのまま15min 風乾する
- マグネットスタンドから外して、Resuspension Buffer を52.5ul加える
- Beadsの固まりが見えなくなるまでピペッティング
- 2min 室温で静置する

- マグネットスタンドにセットし5min静置する
- 新しいPCRチューブに上清を50ul 回収する

- AMPure XPを十分にボルテックスする
- サンプルにAMPure XP を50ul 加え、20回以上ピペッティングして、十分に混和する
- 室温で15min 静置する
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を95ul除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- そのまま15min 風乾する
- マグネットスタンドから外して、Resuspension Buffer を22.5ul加る
- Beadsの固まりが見えなくなるまでピペッティング
- 2min 室温で静置する
- マグネットスタンドにセットし5min静置する
- 新しいPCRチューブに上清を20ul 回収する

Stopping Point -20°Cで保存可 7日以内に次工程を再開すること

Enrich DNA Fragment

Date _____

- 以下の試薬をサンプルに加える

PCR Primer Cocktail	5ul
PCR Master Mix 1280ul	25ul

- 10回以上ピペッティング
- サーマルサイクラーにセットし、08-enrich-fragでインキュベート

98°C	30sec	} x15 cycles
98°C	10sec	
60°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	5min	
4°C	hold	

Clean Up

- AMPure XPを十分にボルテックスする
- サンプルにAMPure XP を50ul 加え、20回以上ピペッティングして、十分に混和する
- 室温で15min 静置する
- チューブをマグネットスタンドにセットし、5min 静置、上清を95ul除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- マグネットスタンドに立てたまま80% EtOHを200ul加え30sec 静置、上清を除去する
- そのまま15min 風乾する
- マグネットスタンドから外して、Resuspension Buffer を32.5ul加る
- Beadsの固まりが見えなくなるまでピペッティング
- 2min 室温で静置する

- マグネットスタンドにセットし5min静置する
- 新しいPCRチューブに上清を30ul 回収する

Validate library

Bioanalyzer によるサイズ分布チェック

Date _____

- Bioanalyzer DNA1000 でサイズ分布をチェックする
 - 最頻長が260b付近にあることを確認する
 - Average sizeをメモしておく
 - 測定値からqPCRに適したおおよその希釈率を見積もる
 - 通常 20000-40000 dilution

Kapa Library Quantification Kits Illumina GA でライブラリーの濃度測定

Date _____

- ライブラリーを希釈する
- 以下の組成で反応液を調製してqPCR plateに 11ul/well分注する

qPCR反応液 組成

2x Reaction mix (primer added)	9ul
Nuclease free water	2ul
- Standard および 希釈したlibraryを4ul 分注する
- 以下の設定でqPCRをかける

95°C	5min	}	x35 cycles
95°C	30sec		
60°C	45sec		

Data detect

出てきた結果から、ライブラリー原液の濃度を算定する

KAPA qPCR 計算式

$$\text{原液濃度(nM)} = \frac{\text{【quantity meanの値】} \times \text{【希釈倍率】} \times 452}{\text{【average size】} / 1000}$$

- ライブラリーを同一濃度(2nM)に希釈する
 - 希釈前ライブラリー液をN ul 使用するケース
- $$\text{【必要なResuspension Buffer (ul)】} = (\text{【希釈元のライブラリー濃度(nM)】} \times N / 2) - N$$
- 必要に応じて、等量ずつ混ぜてPool Library とする

第10回シーケンス講習会 TruSeq Stranded mRNA Sample prep