

微量のTotal RNAおよびエクソソーム由来のRNAを用いたsmall RNA-seq

本報告は国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 小坂展慶、落谷孝広 両先生のご厚意により作成いたしました。

通常のプロトコールでは、1 μ gのTotal RNAまたは1 μ gのTotal RNAから精製したsmall RNAを使用します。しかし、実験対象のサンプルが微量しか得られない場合やエクソソーム由来のRNAを用いて実験を行いたい場合があります。

本報告では、微量のRNAを用いたsmall RNA-seqについてご紹介します。

1 サンプル

マウス細胞株より抽出したTotal RNAおよび、エクソソーム由来のsmall RNAを使用しました。全サンプルとも極めて微量のため、使用可能な最大量を用いて実験を行いました。サンプル

の濃度および品質のチェックは、分光光度計NanoDrop™ (Thermo Scientific)およびバイオアナライザ(Agilent)を使用し、スタート量決定にはバイオアナライザを用いました。

■実験に使用したRNA量

サンプル名	NanoDrop濃度 (ng/ μ L)	バイオアナライザ濃度 (pg/ μ L)	バイオアナライザスタート量 (ng)
Total RNA-1	72.26	4621	19.19
Total RNA-2	66.05	19402	88.12
エクソソーム由来RNA-1	104.79	84000	240.48
エクソソーム由来RNA-2	111.58	93000	250.04

2 シークエンスライブラリ作製

シークエンスライブラリの作製は、TruSeq™ Small RNA Sample Prep Kit(illumina)を用いました。キットの推奨プロトコールでは、シークエンスライブラリにおけるmicroRNA分画のゲル切り出しを行うことになっていますが、本報告ではゲル切り出しの濃縮効果を検証するため、切り出しを実施しない場合のシークエンスライブラリも作製し、small RNAに占めるmicroRNAの比率の違いを検証しました。なお、切り出しには、PippinPrep (日本ジェネティクス)を用いました。22ntのmicroRNA分画は、両端にシークエンスアダプタを付加した後に切り出し精製を行うので、実際には約125-175bpのDNAフラグメントをターゲットとして切り出しました。

3 シークエンス

HiSeq 2000 (illumina)を用い、今回の6サンプルを含め12サンプルを1レーンにプールし、50bp シングルエンドリードの条件でシークエンスしました。

4 データ解析

得られたリードは、small RNAのアノテーションが整備されているマウスゲノム mm9にアライメントしました。アライメントツールはCOBWeB (Agilent)を用い、既知small RNAにアライメントされたリードの分類を行いました。

5 結果および考察

リード数の集計とリードがアライメントされたsmall RNAの分類を行いました。

A リード数の集計

微量のTotal RNAの場合、切り出し精製を行ってmicroRNA分画をシークエンスした方が、得られるリード数が3倍以上になることが確認できました。

エクソソーム由来RNAを用いた場合もTotal RNAと同等のリード数が得られていることが確認できました。

■リード数の集計

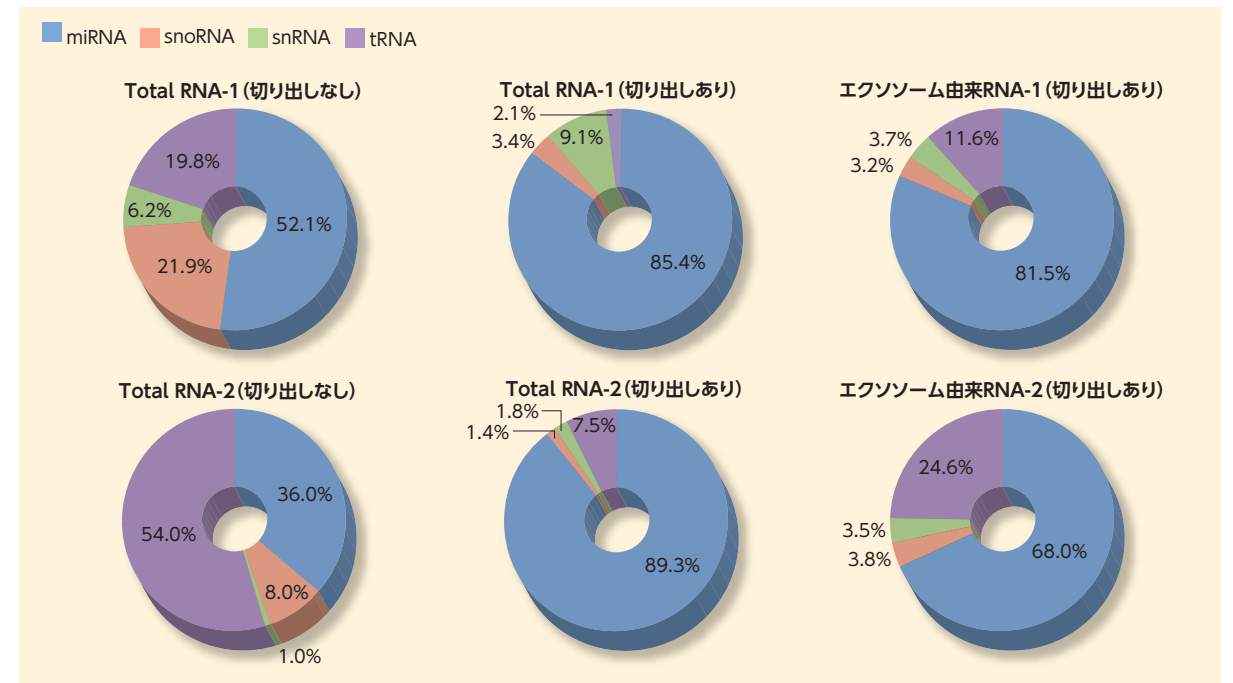
Alignment Statistics	Total RNA-1 (切り出しなし)	Total RNA-2 (切り出しなし)	Total RNA-1 (切り出しあり)	Total RNA-2 (切り出しあり)	エクソソーム由来 RNA-1	エクソソーム由来 RNA-2
Total number of reads	3,487,203	4,516,359	20,493,566	14,229,378	23,763,385	13,382,986
Aligned reads	1,437,313	1,317,776	10,786,608	4,069,464	9,312,980	4,850,577
all_count	1052	1046	1241	1163	1246	1177

Aligned reads; マウスゲノムmm9にアライメントされたリード数 all_count; リードがアライメントされた既知のsmall RNAの総数

B Small RNAの分類

リードがアライメントされた領域のsmall RNAの分類を行いました。Total RNAの場合、切り出した方が、microRNAの割合が飛躍的に大きくなりました。エクソソーム由来RNAを用い

た場合、microRNAの割合はTotal RNAで切り出しを実施したものに近いことが示されました。



6 まとめ

1 μ g以下のTotal RNAを用いた検討で、切り出し精製を行うとmicroRNAの割合が飛躍的に大きくなることが確認できました。エクソソーム由来RNAを用いる場合、約200ngでTotal RNAと同等のリード数が得られていることが確認できました。

株式会社DNAチップ研究所

所在地 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-1-43
Tel (代表) 045 (500) 5211
(営業) 045 (500) 5225
(技術サポートセンター) 045 (500) 5218
URL <http://www.dna-chip.co.jp/>
E-mail dnachip-support@dna-chip.co.jp

次世代シークエンスのほか、マイクロアレイ、リアルタイムPCR、Luminex® 受託も承っております。