

お客様各位

次世代シーケンス解析 Total RNA QCガイド

謹啓

時下ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。
 この度は、弊社次世代シーケンス解析サービスをご利用いただき、誠に有り難うございます。
 弊社では、貴重なサンプルをお預かりしての解析で確実にデータを出すため、またスムーズに解析を進めるため、
 解析に問題のない質・量のTotal RNAを予めご用意くださいます様ご協力をお願いいたしております。
 つきましては、Total RNAサンプルの品質検定には、下記推奨法もしくは同等の方法にて分解の少ない
 十分量のサンプルのご用意をお願い致します。
 お忙しい中大変恐縮ではございますが、何卒ご協力のほど、宜しくお願い申し上げます。

敬白

弊社推奨 Total RNA品質検定法

Total RNAサンプルの品質検定には 1)分光光度計での測定、および 3)Agilent 2100 BioAnalyzer での測定を推奨いたしておりますが、BioAnalyzerがお手許にてご利用できない場合は代替法として 2)アガロースゲル電気泳動でご確認ください。

1)分光光度計での測定

分光光度計での測定にてサンプルの純度(A260/A280 ratio、A260/A230 ratio)および濃度が下記基準を満たしていることをご確認ください。

純度: A260/A280、A260/A230 ともに ≥ 1.8

<Illumina HiSeq2500 / MiSeq>

アプリケーション	サンプル種別	必要量	
mRNA-Seq (方向性無し)	精製済みTotal RNA	5 μ g	40ng/ μ l 以上
	精製済みmRNA	200ng	10ng/ μ l 以上
mRNA増幅+mRNA-Seq (方向性無し)	精製済みTotal RNA	50ng	2ng/ μ l 以上
Stranded mRNA-Seq (方向性有り)	精製済みTotal RNA	5 μ g	40ng/ μ l 以上
	精製済みmRNA	200ng	10ng/ μ l 以上
rRNA除去+rRNA-Seq (方向性無し)	精製済みTotal RNA	10 μ g	200ng/ μ l 以上
rRNA除去+Stranded RNA-Seq (方向性有り)	精製済みTotal RNA	10 μ g	200ng/ μ l 以上
small RNA-Seq	精製済みTotal RNA	5 μ g	200ng/ μ l 以上
	精製済みsmall RNA	200ng	10ng/ μ l 以上

2)アガロースゲル電気泳動

サイズマーカーと共にサンプルの変性アガロースゲル電気泳動を行い、EtBr等で染色後、下記をご確認ください。
 (ただし、生物種によってはこの限りではありません。ご不明な点はお相談ください。)

- 1)28S / 18S rRNAのバンドがシャープに認められる
- 2)28Sの方がバンドが濃い
- 3)バンド間・低分子領域にスミアがない

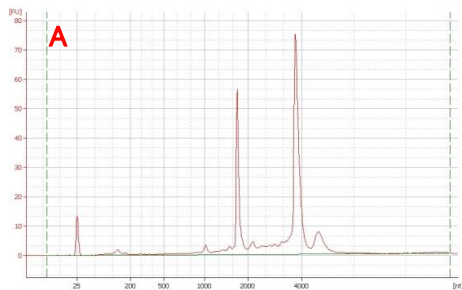
3)Agilent 2100 BioAnalyzer

サンプルのRIN(RNA Integrity Number)の値が8.0以上、28S/18SRNAの値が1.4以上であることをご確認ください。
 ※生物種によっては(rRNAのサイズによって)RIN値が算出されない場合がございます。その際は、rRNAのピークがシャープである(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ご確認ください。
 (別途、測定機器が必要です。詳細はメーカーカタログ等をご確認ください。)

RNA品質検定の例 (Agilent BioAnalyzerデータおよびゲルイメージ)

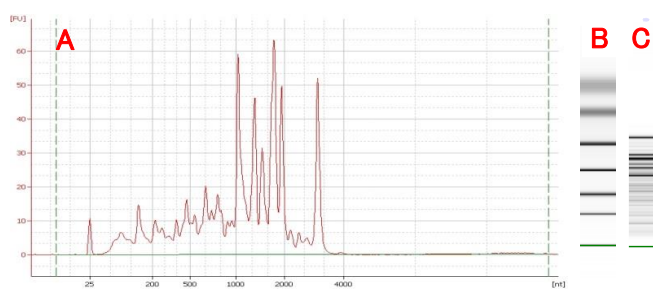
① 分解の無いRNA です。

28S rRNA と18s rRNA のピークがはっきり現れています。



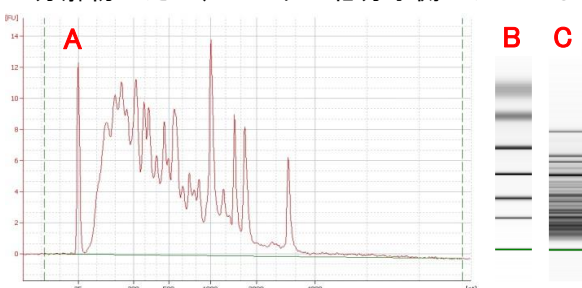
② 少し分解されたRNA です。

28S rRNA のピークが低くなりベースラインが乱れています。



③ 著しく分解されたRNA です。

分解物のため、ピークが低分子側にシフトしています。



A: サンプルのエレクトロフェログラム
 B: マーカーのゲル電気泳動イメージ
 (下から200,500,1000,2000,4000bp)
 C: サンプルのゲル電気泳動イメージ

※ご不明な点がございましたら、弊社担当(下記)までお問い合わせください。

北海道システム・サイエンス株式会社
 ライフサイエンス本部 解析部
 次世代シーケンス解析サービス担当
 TEL: 011-768-5903
 E-mail: hss-ngs@hssnet.co.jp