

## 次世代シーケンサー(Next-generation sequencing: NGS) 網羅的病原体検査法手順書

### 必要な試薬

#### 【DNA/RNA 精製キット】

(以下の DNA/RNA 精製試薬を推奨)

- ❑ Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I  
特徴： 自動精製。キャリアーRNA 使用せず。マグネットビーズ精製
- ❑ MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer  
特徴： 臨床検体中の細菌破砕に有効
- ❑ ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)  
特徴： 臨床検体中の細菌破砕に有効
- ❑ Proteinase K Solution (WAKO 162-22751 : 20mg/ml)  
特徴： 4℃保存可能な Proteinase K 溶液
- ❑ ボルテックスアダプター Vortex Adapter for Vortex Genie 24 tubes (1.5-2.0ml)  
(13000-V1-24)  
特徴： Vortex Genie に取り付け可能なアダプター。高額な破砕機を購入しなくてもビーズ破砕が可能。

以下、その他キットいずれかでも対応可能。(若干の収量および品質に違いが見られる)

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)  
特徴： QIAcube 自動化可能。カラム精製。キャリアーRNA 添加 (以下の RNA-seq 用には無添加で精製を実施)
- ZR Viral DNA/RNA Kit™ (Zymo Research)  
特徴： カラム精製。キャリアーRNA 無添加。

#### 【RNA-Seq ライブラリー作成】

- ❑ ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation kit (24 回 SSV21124; Illumina)  
特徴： 精製全 RNA を対象にランダム RNA-Seq ライブラリーを調整。Poly-A の無い RNA も対象にライブラリー化。
- ❑ RNA-Seq Barcode Primers(Illumina-Compatible)  
(Set 1, 12 インデックス: RSBC10948; Epicentre, Illumina)  
(Set 1, Set 2, Set 3, Set 4 Cat. No. SSIP1234)

特徴： 片方 (Single) のみ index 配列を付加。PCR enrichment (~x15 cycle) で Reverse primer の代わりに使用してインデックス配列を付加。

❑ FailSafe PCR Enzyme Mix (FSE51100; Epicentre)

特徴： ScriptSeq v2 用の PCR 酵素

❑ MinElute PCR purification kit (QIAGEN)

特徴： PCR enrichment 用の template cDNA の濃縮に使用。AMPpure XP ビーズでも代用可

❑ Qubit RNA Assay Kit

特徴： RNA 定量。

❑ Qubit dsDNA Assay Kit

特徴： ds-DNA 定量。

❑ アガロース電気泳動関連試薬と装置 (一般実験で使用している物品で可能)

❑ GelRed™ Nucleic Acid Gel Stains

特徴： 毒性の低いインターカラーター。予めアガロースゲルに混合した Prestain が可能。

### 【DNA/RNA 抽出】

Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I により DNA/RNA 抽出

- 臨床検体 (200  $\mu$ l) と MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (600  $\mu$ l) を ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)へ混合
  - 20 mg/mL Proteinase K Solution を 10  $\mu$ l 添加
  - 軽くボルテックス
  - 55°C 20 分の加温
  - Vortex adapter にチューブを設置し、Max speed にて Vortex 10 分
  - 10,000 rpm, 3 分の遠心
  - 遠心上清 400  $\mu$ l を Roche MagNA compact による自動抽出機により精製
  - 50  $\mu$ l の溶出液量を設定
- 自動抽出機により抽出—

### 【RNA 吸光度測定】

Qubit RNA Assay Kit, 100 assays (Invitrogen)

- RNA buffer 197 $\mu$ l
  - 色素 1 $\mu$ l
  - 抽出 RNA 2 $\mu$ l
- 200 $\mu$ l

を混和し、すぐに軽く 2-3 秒 vortex して、2 分間静置後を測定

## ILLUMINA MiSeq (HiSeq, NextSeq500 等)で読解可能な RNA-Seq 用ライブラリー作成

基本、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation kit (Illumina)のプロトコールに準ずる。

<https://www.illumina.com/products/scriptseq-rna-seq-library-prep.html>

### 【cDNA 合成】

- Nuclease Free Water (9-X)  $\mu$ l
- RNA(500pg-50ng) X  $\mu$ l (RNA が少ない場合は 9  $\mu$ l)
- RNA Fragment solution 1  $\mu$ l
- cDNA Synthesis primer 2  $\mu$ l
- 12  $\mu$ l

↓

**65°C, 5 min** 加温(Thermal Cycler)

\* 保管状況等で臨床検体の傷みが激しい場合、85°C の熱処理ではさらに傷んでしまうため、65°C 5min が適性です。

On ice (急冷)

↓ (以下、別のチューブに用事調整)

- cDNA Synthesis Premix 3.0  $\mu$ l
- 100mM DTT 0.5  $\mu$ l
- StarScript Reverse Transcriptase 0.5  $\mu$ l (premix と DTT を混ぜてから RTase を混合)
- cDNA Synthesis Master Mix 4.0  $\mu$ l

↓

- 12  $\mu$ l に 4  $\mu$ l を加える
- 以下、PCR thermal cycler で反応
- 25°C 5 min,
- 42°C 20 min
- pause
- Finishing Solution を 1  $\mu$ l 加える (ピペッティングで混ぜる)。
- 37°C 10 min
- 95°C 3 min
- 25°C までクールダウン

↓ (以下、別のチューブに用事調整)

- ☐ Terminal Tagging Premix        7.5  $\mu$ l    (注意! : 粘稠性が高い)
- ☐ DNA Polymerase                0.5  $\mu$ l
- Terminal Tagging Master Mix   8.0  $\mu$ l

↓

- ☐ cDNA 溶液 (16  $\mu$ l) に用事調整した Terminal Tagging Master Mix 8  $\mu$ l を加える。
- ☐ 25°C 15 min
- ☐ 95°C 3 min インキュベーション
- ☐ 4°Cまでクールダウン (cDNA の di-Tag 化の完了)

↓

#### 【アダプター配列が連結した一本鎖 cDNA ライブラリーの精製】

**MinElute PCR purification kit (QIAGEN)** による cDNA の精製

- ☐ 上記反応液に 5 倍容量の Buffer PBI を加えて混和する (25  $\mu$ l + 125  $\mu$ l)。
- ☐ MinElute カラム (4°C保存) にサンプルを MinElute カラムにアプライし、遠心(13,000 rpm, 1 min)する。
- ☐ ろ液は棄てる。同じチューブの上に MinElute カラムを再度のせる。
- ☐ 洗浄のため、750  $\mu$ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加し、遠心(13,000 rpm, 1 min)する。
- ☐ ろ液は棄て、MinElute カラムを新しい 2 mL エッペンチューブに再度のせる。その時、チューブを 180° 回転させ、遠心壁を反転させる。
- ☐ 遠心(13,000 rpm, 1 min)する。
- ☐ Micro tube 1.5ml DNA LowBind (製品番号: 72.706.700) マイクロ遠心チューブに MinElute カラムをのせる。
- ☐ cDNA 溶出のため、25  $\mu$ l の Buffer EB(10 mM Tris·Cl、pH 8.5)をカラムに添加する。
- ☐ 65°C, 5 min 加温
- ☐ 遠心(13,000 rpm, 1 min) 回収する。

### 【アダプター配列が連結した RNA-Seq ライブラリーの PCR enrichment】

MiniElute kit で精製した cDNA (di-tagged cDNA) を template に、index の付加および PCR enrichment を行う。

<input type="checkbox"/>	di-tagged cDNA	22.5 $\mu$ l	
<input type="checkbox"/>	FailSafe PCR Premix E	25 $\mu$ l	
<input type="checkbox"/>	Forward PCR primer	1 $\mu$ l	
<input type="checkbox"/>	Reverse PCR primer	1 $\mu$ l	(もしくは Index primer)
<input type="checkbox"/>	FailSafe PCR Enzyme	0.5 $\mu$ l	
	Total	50 $\mu$ l	

↓

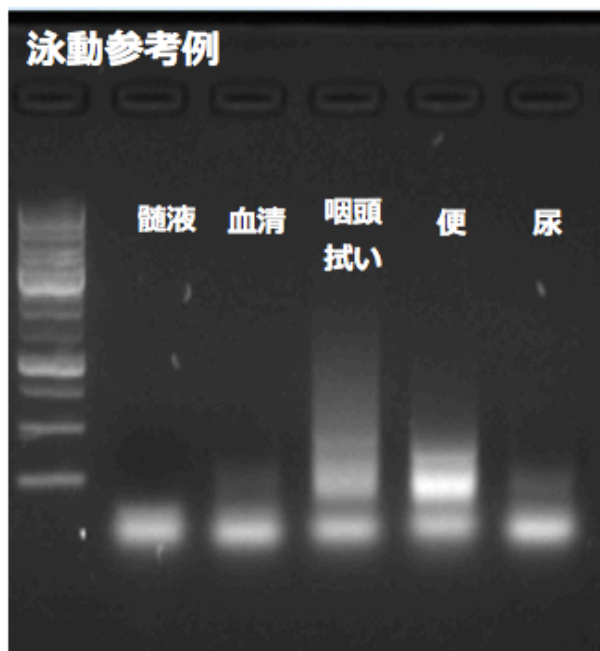
95°C 30 sec  
55°C 30 sec  
68°C 3 min  
68°C 7 min

15 cycle (15 cycle まで。これ以上は PCR エラーの増産を伴う)

↓

### 【アガロース電気泳動による RNA-Seq ライブラリーの精度判定とサイズセレクション】

- PCR 産物 50  $\mu$ l に 10 $\times$ dye 5 $\mu$ l を加え 1% TAE アガロースゲル電気泳動 (ゲル厚めに作成し、あらかじめゲルレッドで染色しておく)
- 250-500 bp を切り取り、ゲルは 2.0 mL チューブに回収し秤量する



### 【Wizard SV Minicolumn (Promega)を用いたゲル精製】

- ❑ Membrane binding solution を 1:1 (ゲル 10mg に対して 10 $\mu$ l) で混ぜて 65°C 5-10 min
- ❑ 各々の溶解したゲル片または PCR 反応に対して、1 本ずつ SV Column を Collection Tube に差し込んだもの (SV Minicolumn セット) を準備する。
- ❑ 溶解したゲル片混合液、または PCR 産物調製液を SV Minicolumn セットに移し、室温で 1 分間インキュベートする。
- ❑ SV Minicolumn セットを微量遠心機で 16,000 $\times$ g、1 分間遠心する。
- ❑ SV Minicolumn を SV Minicolumn セットから取り外し、Collection Tube 中の液体を捨てる。SV Minicolumn を Collection Tube に戻す。
- ❑ 700  $\mu$ l の Membrane Wash Solution を加え、カラムを洗浄する。SV Minicolumn セットを 16,000 $\times$ g、1 分間遠心する。前と同じように Collection Tube を空にし、Collection Tube に SV Minicolumn を戻す。
- ❑ 400  $\mu$ l の Membrane Wash Solution で洗浄を繰り返し、SV Minicolumn セットを 16,000 $\times$ g で 5 分間遠心する。
- ❑ カラムの底にフロースルーの液体がつかないように注意しながら、SV Minicolumn セットを遠心機から取り出す。フロースルーがカラムについてしまった場合は、Collection Tube の中味を捨て、SV Minicolumn セットを 1 分間再遠心する。
- ❑ SV Minicolumn を清浄な 1.5ml 微量遠心チューブに移す。50  $\mu$ l の Nuclease-Free Water をピペットチップでメンブレンに触れないように注意しながら、カラムの中心部に直接アプライする。
- ❑ 65°C 5 分間インキュベートする。16,000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
- ❑ SV Minicolumn を捨て、溶出した DNA が入った微量遠心チューブを 4°C または -20°C で保存する (-20°C で保存可能)。

### 【RNA-Seq ライブラリーDNA の定量】

Qubit dsDNA Assay Kit, 100 assays (Invitrogen)

- |              |                            |
|--------------|----------------------------|
| ❑ RNAbuffer  | 197 $\mu$ l                |
| ❑ 色素         | 1 $\mu$ l                  |
| ❑ <u>DNA</u> | <u>2 <math>\mu</math>l</u> |
|              | 200 $\mu$ l                |

を混和しすぐに vortex して測定

以降、Illumina sequencer に準じた手順にて配列解読を実施する。

文責： 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長・黒田誠

改訂履歴

平成29年2月7日： NGS 検査法 SOP v1 作成

平成29年9月4日： NGS 検査法 SOP v2 作成

以下の文章の容量修正

「上記反応液に5倍容量の Buffer PBI を加えて混和する (25  $\mu$ l + 125  $\mu$ l)。」