

QuantSeq 3' mRNA-Seq 次世代シーケンス解析用ライブラリ調製キット V2

本製品は mRNA の 3' 末端付近に対して cDNA ライブラリを調製するキットです。ライブラリの配列情報を読み取り、リファレンス配列にマップされたリード数をカウントすることで、網羅的な mRNA の定量解析が可能です。イルミナ社機器に対応したライブラリ調製キットをご用意しています。

アプリケーション

サンプル中の mRNA の 種類・量 を網羅的に調べる
サンプル間で同一遺伝子の発現量を比較する

記事 ID 検索 : 45054



コストを抑えたい方に

- 最大 9,216 サンプルまでマルチプレックス解析可能
- 転写産物の 3' 末端側のみシーケンス解析するためリード数を抑えられる



FFPE サンプルに対応

- FFPE サンプルのような、RNA クオリティの低いサンプルにも対応
- 必要な Total RNA 量はわずか 1 ng



データ解析が容易

- 1 転写産物あたり 1 分子の断片が逆転写されるため、リード数を転写産物長で補正する必要なし

POINT リード数は従来の RNA-Seq 法のわずか 1/10。シーケンスランに使用する試薬を節約できます。

研究者が使ってみました!

Application Note

あぶりけーしょんのーと

QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit を用いたトランスクリプトーム解析について、実際に使った見解をレポートしていただいております。詳しくは、本紙をめくってご覧ください。

ユーザーレポート

魚崎 英毅 先生

自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部



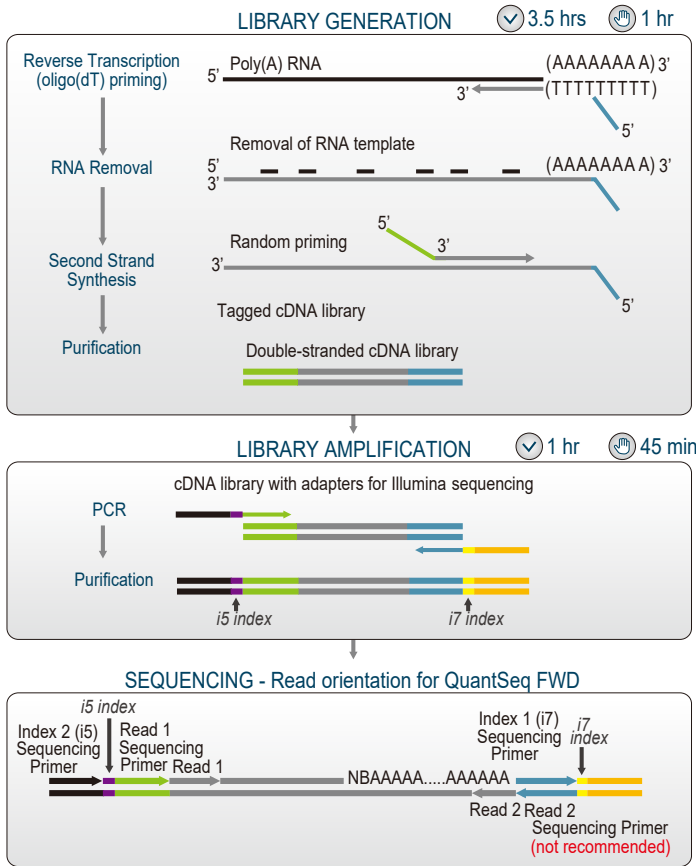
OPEN!



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

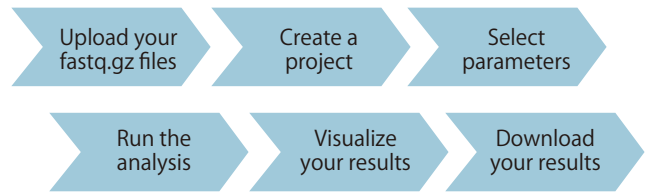
QuantSeq ライブラリ調製



はじめに、oligo(dT) プライマーを用いて poly(A) 特異的に逆転写反応を行います。次に、RNA の鋳型を除去し、ランダムプライミングにより第二鎖を合成します。第二鎖合成に使用するプライマーに Read 1 リンカー配列を含むため、シーケンスリードは poly(A) tail に向かって得られます。Read 1 配列は mRNA の 3' 末端付近に対応するため、シーケンス解析時にサンプルあたりの総リード数を抑えることができます。

データ解析

QuantSeq 3' mRNA-Seq ライブラリ調製キット V2 には Kangooroo での無料データ分析用のコードが付属します。詳細は、<https://www.lexogen.com/data-analysis-solutions/> をご参照ください。

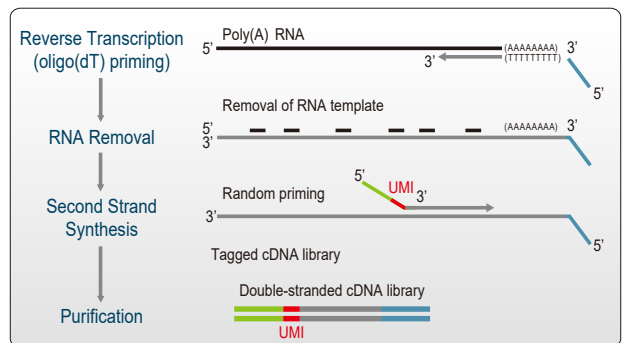


また、Lexogen 社独自の Demultiplexing / Error Correction Tool 「iDemux」をご用意しております。詳細は、<https://www.lexogen.com/support-tools/i1-demultiplexing-tool/> をご参照ください。

ライブラリ調製時のオプション (別売品)

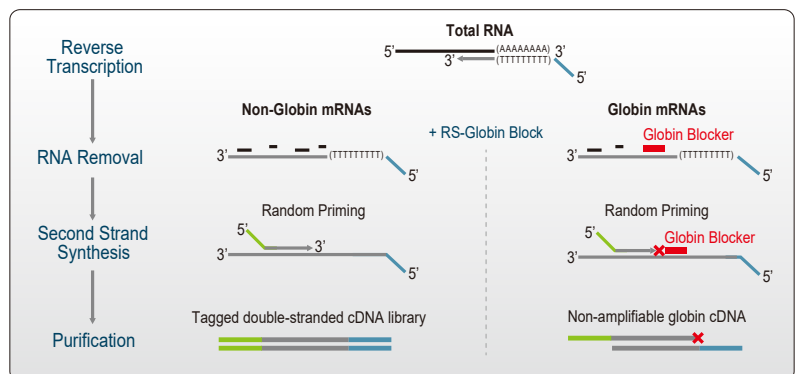
■ Unique Molecular Identifier (UMI) 分子バーコード

QuantSeq FWD キットの Second Strand Synthesis Mix 1 と置き換えて使用することで、各リードに UMI の配列を持たせ、PCR 時の増幅バイアスを確認することが可能です。



■ Globin Block (血液サンプル用)

血液サンプルから QuantSeq 3'mRNA-Seq ライブラリーを調製する際に使用することで、グロビン由来断片の増幅を防ぎます。



研究者が使ってみました！

Application Note あぶりけーしょんのーと

QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit を用いたトランスクリプトーム解析

ユーザーレポート

魚崎 英毅 先生

自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部



Products

QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (品番：015.96)

Application Noteで使用しているQuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (品番：015.96) は販売終了となりました。後継品のQuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt (品番：191.96, 192.96, 194.96, 195.96, 196.96) をご使用ください。

メーカー：Lexogen GmbH メーカー略号：LEX

かつてトランスクリプトーム解析といえばマイクロアレイであったが、超並列シーケンサー (Massive Parallel Sequencer, MPS) の発展により、すっかりその座は RNA シーケンス (RNA-seq) に取って代わられた。超並列シーケンサーでは、同時に数百万から数十億のシーケンス反応を並行して行い、長きに渡りシーケンサー界で不動の地位を築いていたサンガーシーケンサーに対し、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) とも呼ばれる。RNA-seq では、細胞や組織から RNA を抽出し、逆転写したものを MPS によりシーケンスを行うことで網羅的に配列情報を得る。得られたそれぞれの配列を由来となった種の参照ゲノム配列や遺伝子産物の配列と一致する場所を探す (マップする) ことで、どの遺伝子産物がどれくらい発現しているかをマップされた数 (カウント) として得ることができる。広く使われている RNA-seq ではリボゾーム RNA の除去やオリゴ dT ピーズを用いたポリ A が付加した mRNA を濃縮し、その後、ランダムプライマーを使って逆転写した cDNA を用いる。これにより、mRNA 全長をマップし、mRNA の発現だけでなく、転写産物のスプライシングなどまで解析することができる。1 サンプルを解析するために必要な配列 (リード) 数は 1,000 万から 3,000 万と言われている。最新のシーケンサーであれば、数十億から百億のオーダーまで読めるようになっており、多検体の解析にも対応できるが、そういった最新鋭の機器を保有している研究機関は多くない。

我々の研究室で、RNA-seq を立ち上げた検討した際、経時的トランスクリプトームや様々な薬剤処理・遺伝的な操作に対する細胞の応答を解析しようと考えていたため、同時に数十~数百検体の解析が必要となる見込みであった。また、学内で NextSeq550 (Illumina 社) が

自由に使える環境であった。NextSeq550 では最大 4 億リードが得られる機器であるため、1 サンプルあたり 3,000 万リードと概算した場合、同時に解析できるサンプル数は 12 程度と、必要なデータを得るためには相当数シーケンスを行う必要があると想定していた。そんな中コスモ・バイオのカタログで出会ったのが、Lexogen 社の QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (以下 QuantSeq) である。QuantSeq ではオリゴ dT プライマーを用いて total RNA から逆転写を行い、さらにランダムプライマーで 2 本鎖 cDNA を作製する (図 1)。つまり、mRNA の精製・濃縮ステップもなく、簡便な操作だけで mRNA の 3' 末端のみの cDNA ライブラリができる。これにより mRNA の全長から cDNA を作製するのに対し、大幅なリード数削減が期待され、100 万~1,000 万リードで十分である (図 2)。キットには 96 種類のバーコード配列 (最近ではデュアルインデックスを使い 384 まで対応) が同梱されており、我々の研究室では同時に 48~96 サンプルからライブラリを作製し、NextSeq を使ってシーケンスを行っている [Chanthra, Sci Rep, 2020; Miyamoto, Cell Rep Methods, 2021]。

3' 末端のみをシーケンスすることで転写産物のカウンティングの定量性も高く、遺伝子長で補正する必要もないため、解析がシンプルである。また、試薬・シーケンスコストが低く抑えられ、1 サンプルあたり 1 万円以下 (QuantSeq および Illumina のシーケンスキットの価格をサンプル数 96 で割った場合。人件費やその他必要なチップなど消耗品代は別) でトランスクリプトームが得られるなど非常に魅力的である。一方、スプライシングなどの解析には向いておらず、目的に応じた使い分けが必要となる。

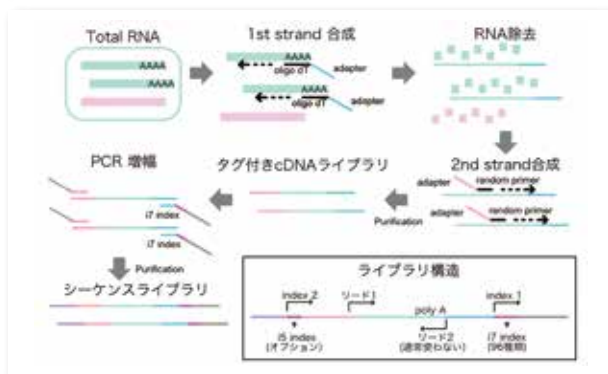


図 1. ライブラリ作製の流れ

Total RNA のうち、ポリ A 配列を持つ mRNA が選択的に oligo dT プライマーにより逆転写される。RNA 除去後、ランダムプライマーにより 2nd strand が合成される。以上の 2 種類のプライマーには PCR 増幅用の配列が付加されており、PCR 増幅の際に i5/i7 index が追加される。本キットには i7 index だけで 96 種類が添付されており、96 種類のサンプルを同時にシーケンスすることができる。通常のシーケンスではリード 1 のみを用いるシングルエンドでシーケンスを行う。Lexogen 社に問い合わせたところ、MiSeq では 50 塩基読む SE50 を、NextSeq では 75 塩基読む SE75 を推奨しており、ユニークマップ率を上げたいければ、もう少し長く 100-150 塩基程度シーケンスすると良いとの回答を得ている。

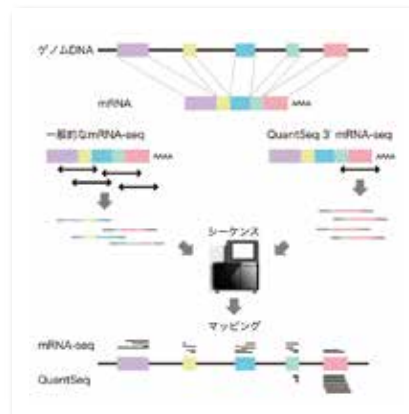


図 2. 一般的な mRNA-seq と QuantSeq 3' mRNA-seq の比較

一般的な mRNA-seq の場合、mRNA 全域をカバーするようなライブラリが作られる。そのため、検出されるエクソンからスプライシングバリエーションのレベルで評価することができる。一方で、十分な定量性を得るにはシーケンスリード数が多く必要である。また、mRNA 一分子あたりの塩基数は、mRNA の長さ依存するため、長い mRNA ほど検出されやすくなる。そのため遺伝子発現解析を行う場合は、mRNA の長さによる補正を行う必要がある。QuantSeq 3' mRNA-seq の場合、ライブラリは mRNA の 3' 末端に偏るため、リード数が少なくとも定量性が保たれる。また、長さによる補正も必要ないといった特徴がある。一方、スプライシングが検出できないこと、ユニークマップ率が低くなりやすいといった特徴もある。

価格表

Lexogen GmbH メーカー略号: LEX

品名	品番	包装	希望販売価格
QuantSeq 3' mRNA-Seq (FWD) Unique Dual Indexing ライブラリ調製キット V2			
付属の Unique Dual Index (UDI) を使用することで、インデックスホッピングの影響を抑えることが可能です。			
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set A1, (UDI12A_0001-0024), 1 rxn/UDI	191.24	24 prep.	¥215,000
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set A1, (UDI12A_0001-0096), 1 rxn/UDI	191.96	96 prep.	ご照会
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set B1, (UDI12B_0001-0024), 1 rxn/UDI	192.24	24 prep.	¥215,000
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set B1, (UDI12B_0001-0096), 1 rxn/UDI	192.96	96 prep.	ご照会
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Sets A1-A4, (UDI12A_0001-0384), 1 rxn/UDI	193.384	384 prep.	ご照会
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set A2, (UDI12A_0097-0192), 1 rxn/UDI	194.96	96 prep.	ご照会
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set A3, (UDI12A_0193-0288), 1 rxn/UDI	195.96	96 prep.	ご照会
QuantSeq 3' mRNA-Seq V2 Library Prep Kit FWD with UDI 12 nt Set A4, (UDI12A_0289-0384), 1 rxn/UDI	196.96	96 prep.	ご照会
Unique Molecular Identifier (UMI) 分子バーコード			
QuantSeq FWD キットの Second Strand Synthesis Mix 1 と置き換えて使用することで、各リードに UMI の配列を持たせ、PCR 時の増幅バイアスを確認することが可能です。			
UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD (Illumina, Read 1)	081.96	96 rxn	¥52,000
PCR Add-on Kit			
最適な PCR サイクル数を決定するために使用します。			
PCR Add-on and Reamplification Kit V2	208.96	96 rxn	¥83,000
Globin Block			
血液サンプルから QuantSeq 3' mRNA-Seq ライブラリーを調製する際に使用することで、グロビン由来断片の増幅を防ぎます。			
RS-Globin Block, Homo sapiens	070.96	96 rxn	¥155,000
RS-Globin Block, Sus scrofa	071.96	96 rxn	¥155,000

関連商品

品名	品番	包装	希望販売価格
QuantSeq-Pool Sample-Barcoded 3' mRNA-Seq ライブラリ調製キット			記事 ID 検索: 42988
大規模な mRNA 発現解析におすすめです。バーコードを付加し、早い段階でサンプルをプールすることで、最大 36,864 サンプルのマルチプレックス解析が可能です。			
QuantSeq-Pool Sample-Barcoded 3' mRNA-Seq Library Prep Kit for Illumina	139.96	96 prep.	ご照会
QuantSeq 3' mRNA-Seq (REV) ライブラリ調製キット V2			記事 ID 検索: 43253
3'UTR 配列の解析、選択的ポリAデニル化の解析におすすめです。			
QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (REV) for Illumina with Custom Sequencing Primer	225.24	24 prep.	¥220,000
	225.96	96 prep.	ご照会



詳細情報は Web へ

コスモ・バイオ Web サイトトップページ「記事 ID 検索」に、上記の記事 ID で示された数字を入力して検索してください。ダイレクトにページへ行くことができます。

取扱店

お願い / 注意事項 記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

希望販売価格 記載の希望販売価格は 2024 年 9 月 1 日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいませ。表示価格に消費税は含まれておりません。

使用範囲 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

<https://www.cosmobio.co.jp/>



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

- 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ
TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9623
- 商品に関するお問い合わせ
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9619

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル