



FFPE 対応 SureSelect XT RNA Direct プロトコル トランスクリプトームエンリッチメントと リボソーム RNA 除去を同時に実現

アプリケーションノート

著者

Jennifer Carter Jones, Alex Siebold, and
Anne Bergstrom Lucas

概要

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から RNA を抽出し、RNA シーケンシング (RNA-Seq) のためのライブラリを作製することにより、疾患の発症や進行、治療耐性を示す新たなバイオマーカーの同定や検証の可能性が広がります。しかし、FFPE サンプル由来の RNA は一般的に品質が低いため、これまで次世代シーケンス (NGS) によるトランスクリプトームプロファイリングや研究のためのリソースとしてあまり使用されてきませんでした¹。

このたび、Agilent Strand Specific RNA ライブラリ調製キットの cDNA ライブラリのターゲットエンリッチメントのプロトコルを改良することで、リボソーム RNA のコンタミネーションを最小に抑えつつ良好なシーケンスカバレッジで RNA-Seq データを取得できることが明らかになりました。本アプリケーションノートでは、腫瘍サンプルと正常サンプルそれぞれに、新鮮凍結 (FF) と FFPE 由来の RNA のペアを使用し、事前にリボソーム RNA 除去や poly (A) 精製を必要としないプロトコルを用いることで、FFPE サンプルから高品質のデータを取得可能なことを示します。SureSelect XT RNA Direct プロトコルと対応する試薬 SureSelect XT RNA Direct キットを用いた場合、転写産物の発現量の増加・減少ともに、FF および FFPE の両サンプルで同等レベルの変化を同等の信頼性で検出することができました。これは、FFPE ブロックに保存された RNA が、重要な遺伝子発現研究に使用できることを示しています。



Agilent Technologies

はじめに

組織染色など従来の顕微鏡ベースの多くのアッセイのために組織の構造を保存する標準的な手法として、ホルマリン固定後にパラフィンで包埋する方法が世界で広く使用されています。しかし、固定により起こるクロスリンクは組織の構造を維持するうえで利点となりますが、組織内の核酸を保存するには最良とは言えません。FFPE 由来の RNA の品質は、保存されている組織の種類、保存方法、保管方法 (保管期間や保管状態)、RNA の抽出方法により大きく異なる可能性があります。FFPE 由来の total RNA には poly (A) 鎖がないことが多く、RNA-Seq 実験で用いる mRNA 単離方法では、大きな偏りが生じることもよくあります。

RNA 転写プロファイリングの別のワークフローを検討するために、SureSelect RNA ターゲットエンリッチメントプロトコルを改良し、腫瘍組織と正常組織のマッチドペアの FF および FFPE 由来の 4 つを 1 組として実験を行いました。FFPE 由来の RNA の分解度に基づき、ターゲット RNA シーケンシングに適した高品質のライブラリを作製するため適切な改良を加えました。サンプルを最大限生かせるよう、FFPE 由来の RNA 用の標準ワークフローにおいて、スタート量、断片化時間、PCR 条件の調整、AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Genomics) を用いた精製手順を変更しました。シーケンスデータの各種統計値は FFPE と FF サンプル間で全体として類似しており、腫瘍対正常組織の遺伝子発現データから、FFPE と FF からエクソームをターゲットとしてキャプチャしたサンプル間で良好な一致性と相関性を示しました。

材料と方法

RNA サンプル

Asterand Technologies から入手した結腸腫瘍組織と正常組織のマッチドペアの新鮮凍結 (FF) と FFPE の 4 サンプルを 1 組とし、total RNA を抽出しました。これらの 4 つの異なる RNA サンプル、正常組織の FF、腫瘍組織の FF、正常組織の FFPE、腫瘍組織の FFPE、それぞれにテクニカルレプリケート 3 個ずつ、計 12 サンプルのライブラリを調製しました。

Total RNA サンプルの品質確認

RNA-Seq プロトコルの多くで、アジレントのバイオアナライザまたは TapeStation を用いて、RNA サンプルの RNA Integrity Number (RIN または RIN[®]) を確認することが推奨されており、ほとんどのプロトコルで、高品質を意味する 8.0 以上の RIN が求められます。残念ながら、FFPE 組織由来の total RNA の RIN 値は 8.0 より低く、低い値の RIN の場合、新しいプロトコルの成否を判断するには RIN は指標として最適ではありません。その代わりに、200 nt 以上の RNA フラグメントの比率 (DV₂₀₀) を計算することで、FFPE サンプルの質を確実に判断する指標となることがわかりました²。FFPE のスミアサンプルで少なくとも 20% のフラグメントが 200 nt 以上になる場合、1 回の反応に total RNA を 200 ng 使用することが推奨されます。非 FFPE

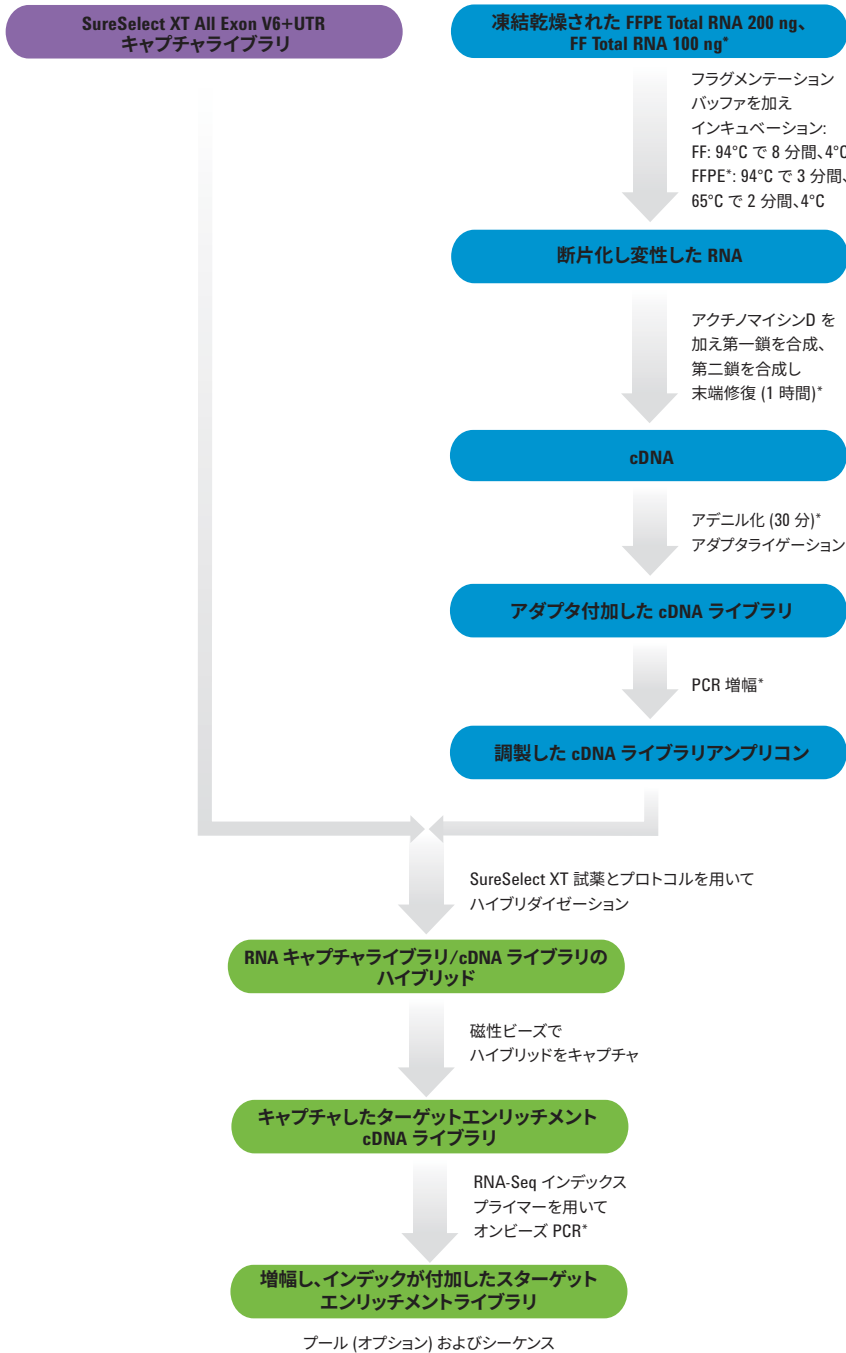
由来の total RNA を使用する際は、total RNA のスタート量は 100 ng が推奨です。Total RNA の推奨スタート量を表 1 に示します。

本アプリケーションノートでは、Agilent 2100 バイオアナライザで RNA6000 ピコキット (5067-1513) を Eukaryote Total RNA Assay で使用し、バイオアナライザのエレクトロフェログラムから RIN と DV₂₀₀ の値を算出しました。RNA サンプルの品質は、NanoDrop 分光光度計も使い、A260/A280 および A260/A230 を測定しました。両方の比率ともできるだけ 2.0 に近いのが理想的であり、NanoDrop で計算された濃度から、反応に使用する total RNA の量を計算しました。

品質	% RNA >200 nt	推奨インプット量
Good FFPE RNA	>50%	200 ng
Poor FFPE RNA	20% ~ 50%	200 ng
適応不可の FFPE RNA	<20%	使用しないことを推奨
インタクトな (非 FFPE) RNA	>70%	100 ng

表 1. 200 nt 以上の RNA フラグメントの比率に基づく、total RNA の推奨インプット量。SureSelect XT RNA Direct プロトコルに使用するには、FFPE サンプルで少なくとも 20% (DV₂₀₀ >20%) のフラグメントが 200 nt 以上であることが理想的です。

ワークフローの概要



RNA のフラグメンテーション

一般的にリボソーム RNA の除去や poly (A) の単離は、RNA-Seq ライブラリの調製において最初に行う手順です。このステップは、SureSelect XT RNA Direct プロトコルから省きました。SureSelect XT RNA Direct ライブラリ調製キットを用いたワークフローでは、最初に RNA の断片化とプライマーのアニーリングを行います。ほとんどの場合、FFPE 由来の RNA はすでに分解しており、フラグメンテーションが不要、もしくはフラグメンテーション時間を短くします。Good FFPE RNA サンプル ($DV_{200} > 50\%$)、Poor FFPE RNA サンプル ($DV_{200} > 20\%$)、インタクトな非 FFPE サンプルそれぞれに適したフラグメンテーションとアニーリングの方法を表 2 に示します。

Pre-capture ライブラリ調製

試薬は SureSelect XT RNA Direct キット (PN G7564A, G7564B) を使用し、ワークフローの変更箇所は図 1 の*で示しています。

Step	温度	時間
Good FFPE RNA*		
Step 1	94°C	3 minutes
Step 2	65°C	2 minutes
Step 3	4°C	Hold
Poor FFPE RNA サンプル*		
Step 1	65°C	5 minutes
Step 2	4°C	Hold
インタクトな (非 FFPE) RNA サンプル*		
Step 1	94°C	8 minutes
Step 2	4°C	Hold

表 2. 各種の FFPE サンプル由来の total RNA、インタクトな非 FFPE 由来の total RNA のサーマルサイクラー設定の推奨。FFPE 由来の RNA は品質にばらつきがあるため、最善の性能を得るには、各ステップのインキュベーション時間の最適化が必要になる場合があります。

図 1. 新しい SureSelect XT RNA Direct プロトコルでは、Agilent SureSelect Strand Specific RNA ライブラリ調製キットから poly (A) を精製する手順を省き、total RNA からスタートします。インキュベーションおよび他の手順は、*の注記に示すとおりに変更しました。

SureSelect XT RNA ターゲットエンリッチメントプロトコルの pre-capture ステップの変更として、第二鎖の合成手順でのインキュベーション時間を 60 分に、dA 付加反応時間を 30 分に延長しました。また、精製ステップの AMPure XP ビーズの量の比率を、1.2 倍から 1.8 倍に増やしました。アダプタを付加した cDNA ライブラリの PCR 増幅は、14 サイクルで行いました。PCR のサイクル数は、FFPE の total RNA サンプルの種類に応じて増減する必要があります。

キャプチャおよびキャプチャ後のライブラリ調製

SureSelect XT RNA Direct プロトコルでは、1 回のハイブリダイゼーション反応に cDNA を 200 ng インプットする必要があります。プローブとして SureSelect XT Human All Exon V6+UTR キャプチャライブラリ (16 反応、ターゲットサイズ 91 Mb、型番: 5190-8881) を各反応に 5 μ L ずつ使用し、65°C で 24 時間ハイブリダイゼーションを行いました。他にも、SureSelect XT RNA Direct プロトコルの大きな変更として、ハイブリダイゼーション後のライブラリをキャプチャするのに T1 ストレプトアビジンビーズの代わりに M-270 ストレプトアビジンビーズ (Thermo Fisher Scientific) を使用しました。M-270 ビーズでビオチン化ライブラリをキャプチャする際、最後の溶出手順を省き、代わりに nuclease-free water に入れ再懸濁した M-270 ビーズに結合した状態で、キャプチャしたライブラリの PCR 増幅を行いました。この on-bead PCR は 19 μ L (再懸濁した M-270 ビーズの約半量) を用いて 12 サイクルで行い、キャプチャしたライブラリを増幅しインデックスタグを付加しました。PCR のサイクル数は、FFPE の total RNA サンプルの種類に応じて増やす必要があります。12 サイクルの PCR で十分量が得られなかった場合、残り半分のサンプルを用いて、シーケンスに必要なおよそ 10 nM の最終ライブラリを作製します。

次世代シーケンシングおよびデータ処理

個々のレプリケートサンプルに異なるインデックスを付加してキャプチャ後にプールし、Illumina HiSeq 2500 High Output (version 4 ケミストリ、100 bp のペアエンド) で 2 レーン使用してシーケンスを行いました。HiSeq のランの出力結果を bcl2fastq v1.8.2 で demultiplex を行い fastq ファイルを作成し、トリミング後に TopHat 2.0 を用いて hg19 にアラインしました。Broad Institute が開発した RNA-SeQC ツールを用いて、TopHat BAM ファイルを解析し RNA-Seq QC メトリクスを作成しました⁴。遺伝子発現の比較解析のためリード数が 2 千万になるよう各サンプルを正規化しました。

遺伝子発現差解析

RNA-SeQC ツールを使用し、Ensembl のトランスクリプトにマップされた RPKM (reads per kilobase of transcript per million mapped reads) で計算された遺伝子発現メトリクスを記録したテキストファイルを作成しました。RPKM メトリクスにより、遺伝子の長さやマップされた総リード数の両方の観点から転写産物のリードカウントが正規化されます。RPKM により、サンプルおよび遺伝子間のばらつきの原因についても情報が得られます。Strand NGS ソフトウェア⁵ を使用し RPKM 遺伝子発現データを解析し視覚化しました。

結果

Total RNA 品質の解析

4 サンプル (腫瘍結腸組織と隣接する正常組織からの新鮮凍結 (FF) サンプルと FFPE サンプル) を一組として、抽出した total RNA から、SureSelect XT RNA Direct プロトコルを使用し RNA-Seq ライブラリを調製しました。バイオアナライザで RNA Pico キットを使用し Eukaryote Total RNA Assay を行ったエレクトロフェログラムを重ね合わせた例を図 2 に示しました。4 つのサンプルについて、200 nt 以上のフラグメントの比率 (DV_{200})、RNA Integrity Number (RIN) を算出しました。予想されたとおり、FF サンプルでは 18 S と 28 S のピークが見られましたが、FFPE サンプルではより断片化されておりピークは観察されませんでした。さらに NanoDrop 分光光度計を用い、A260/A280 および A260/A230 の値から RNA サンプルの質を測定しました。NanoDrop およびバイオアナライザによる解析結果を表 3 にまとめました。

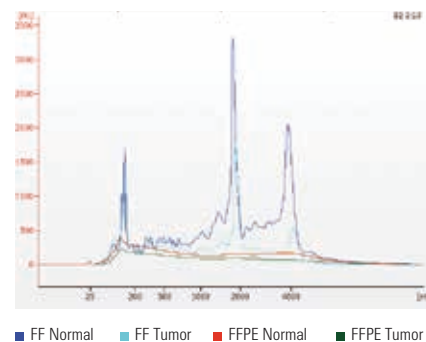


図 2. アジレントのバイオアナライザ RNA Pico Assay のエレクトロフェログラムから、FF および FFPE 由来の total RNA サンプルの違いが明確に示されています。RNA サンプルの種類別に線を色分けしています。200 nt の目盛りの右側にあるピークまたはスミアピークは、200 nt 以上のフラグメントを示しています。

Pre-capture サンプル調製結果

FFPE および FF の total RNA サンプルの DV₂₀₀ 値は、どちらも 70% より大きかったため、FFPE の total RNA 200 ng とインタクトな FF の total RNA 100 ng を凍結乾燥しました。凍結乾燥したサンプルを 19 µL のフラグメンテーションバッファに再懸濁しました。表 1 に示す total RNA の品質基準に基づき、FFPE の RNA を「Good FFPE RNA」、FF RNA を「インタクト (非 FFPE)」と判別し、表 2 の推奨インキュベーション条件を適用しました。断片化・変性し、プライマーをアニーリングさせた RNA を使用してライブラリを調製しました。改善された SureSelect XT RNA Direct プロトコルでは、第二鎖の合成およびアデニル化のステップでの時間が延長されています。また、精製ステップで加える AMPure XP ビーズの比率を、反応量の 1.8 倍に増やしました。14 サイクルで pre-capture 増幅を行い、pre-capture cDNA ライブラリの一部を、Agilent 4200 TapeStation で D1000 ScreenTape を用いて測定しました。FFPE サンプルのエレクトロフェログラムの例を図 3 に示します。SureSelect XT RNA Direct プロトコルに従った結果、図 4 に示すように 12 サンプルすべてから十分な cDNA が得られたので、ターゲットキャプチャに進みました。

サンプル	A260/A280	RIN	DV ₂₀₀
FF Normal	1.96	6.7	85%
FF Tumor	2.10	6.1	74%
FFPE Normal	1.93	2.3	75%
FFPE Tumor	1.93	2.3	74%

表 3. FF および FFPE の total RNA サンプルの RNA 品質

Post-capture サンプル調製結果

SureSelect XT Human All Exon V6+UTR キャプチャライブラリのプローブで 24 時間 65°C でハイブリダイゼーションした後、ハイブリダイゼーション後のライブラリを M-270 ストレプトアビジンビーズでキャプチャしました。標準的なターゲット RNA-Seq のプロトコルの最終ステップの溶出を省き、M-270 ビーズを nuclease-free water 40 µL に再懸濁しました。

M-270 ビーズに結合したライブラリ 19 µL を用いてライブラリを増幅し、インデックスを付加しました。この最終増幅ステップでは 12 サイクルで PCR を行いました。インデックス付加した増幅ライブラリを AMPure XP ビーズで精製し、Agilent 4200 TapeStation で High Sensitivity D1000 ScreenTape を使用し cDNA の最終 post-capture ライブラリを測定しました。FFPE サンプルのエレクトロフェログラムの例を図 3 に示します。

Agilent 4200 TapeStation による FFPE 由来のライブラリの代表的なエレクトロフェログラム

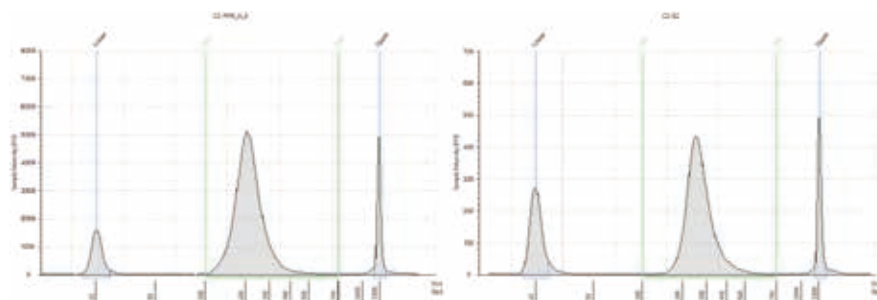


図 3. Agilent 4200 TapeStation で D1000 ScreenTape を使用して得た pre-capture ライブラリ (左) と、High Sensitivity D1000 ScreenTape を使用して得た post-capture ライブラリのエレクトロフェログラム (右)。どちらも FFPE_N_B02 テクニカルレプリケート サンプルのエレクトロフェログラムですが、すべてのサンプルの代表例です。

Pre-capture PCR 収量: Tumor 対 Normal、FF 対 FFPE (200 ng がキャプチャに必要)

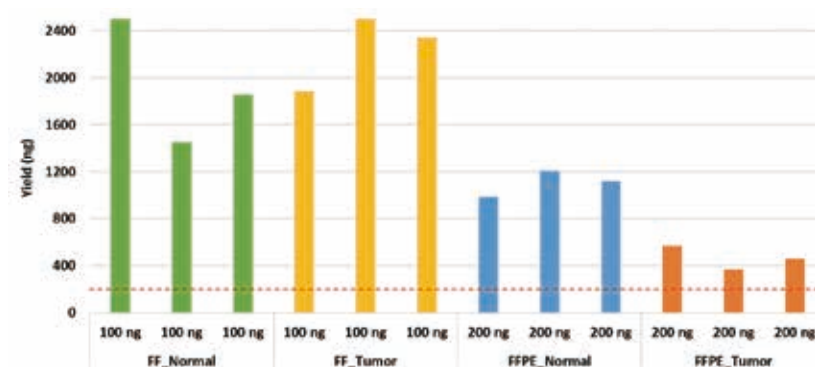


図 4. テクニカルレプリケート間の pre-capture ライブラリ収量の比較 (FF サンプルは total RNA 100 ng、FFPE サンプルは 200 ng インプット) テクニカルレプリケートサンプル間で差はありますが、サンプル調製に使用している total RNA 量が半分であっても、FF サンプルのほうが、ペアの FFPE サンプルよりも収量が大きくなっています。グラフの赤線は、ハイブリダイゼーションキャプチャステップに必要な最低収量 (200 ng) を表します。

12 サンプルの post-capture の収量の比較を図 5 に示します。pre-capture と post-capture の収量、この実験に使用した主要条件をまとめた内容を表 4 に示します。

次世代シーケンシング、データ処理、RNA-Seq QC メトリクス

12 のテクニカルレプリケートサンプルに異なるインデックスを付加しキャプチャ後にプール、Illumina HiSeq 2500 (100 bp ペアエンド) の 2 レーンを使用しシーケンシングしたところ、サンプルごとに平均 8 千万のペアエンドリードが得られました。比較のため、12 ライブラリすべてで得られたリードの数を、2 千万リード/ライブラリに正規化しました。図 6 の青色のバーで示されるように、予測されるストランドに一致するリードは、FFPE サンプルのほうが FF サンプルより少ないことが観察されました。SureSelect XT Human All Exon V6+UTR キャプチャライブラリのプローブがターゲットにした領域では、どのサンプルのリード量も非常に類似しており (黄色のバー、約 87%)、平均して 95% のリードが、ターゲット領域の 100 bp 以内に一致しました (データ示さず)。重複リードの比率は FF サンプルで平均 17%、FFPE サンプルで平均 24% でした (緑色のバー)。FFPE の total RNA サンプルは断片化されていることを考慮すると、重複リードの比率が高いのは想定内でした。この実験

で、リボソーム RNA のリードの比率は非常に低く全リード数の 0.3% ~ 1.3% だったため、図 6 では rRNA がマップされたリードの数をわかりやすく表示するため 10 倍の値で示しています (赤色のバー)。

マップされたリードの比率

FFPE サンプルと FF サンプル間で、ヒトのトランスクリプトームの各要素 (Intergenic/exonic/intronic) に対するマッピングについての統計値を比較しました。Intergenic rate とは、遺伝子の間にマップされたリードの比率を、exonic rate とは、エクソン内にマップされたリードの比率を、intronic rate とは、イントロン内にマップされた比率を表します。

図 7 で示されたとおり、どのライブラリでもエクソンの比率 (およそ 90%)、イントロンの比率 (およそ 9%)、遺伝子間の比率 (およそ 1%) が類似していることがわかりました。イントロンリードの数は、SureSelect XT Human All Exon V6+UTR キャプチャライブラリに含まれるイントロンプローブを反映しています。

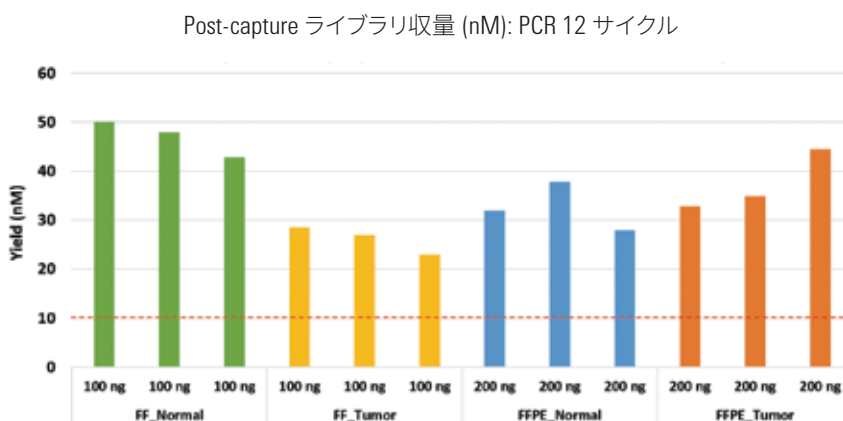


図 5. 200 ng の cDNA をハイブリダイゼーション反応した際の、テクニカルレプリケートサンプル間での post-capture ライブラリの収量比較。グラフの赤線は、シーケンスのためのインデックス付きサンプルをプールするのに必要な最低濃度 (10 nM) を表します。

プロトコルの変更および PCR 収量の早見表

サンプル	RIN	DV ₂₀₀	Total RNA のインプット (ng)	フラグメンテーション時間/温度	Pre-capture PCR サイクル数	レプリケートサンプルの pre-capture 収量 (ug)	Post-capture PCR サイクル数	レプリケートサンプルの post-capture 収量 (nM)
FF Normal	6.7	85%	100	8 min @ 94°C	14	2.8, 1.5, 1.9	12	50, 48, 43
FF Tumor	6.1	74%	100	8 min @ 94°C	14	1.9, 2.5, 2.3	12	29, 27, 23
FFPE Normal	2.3	75%	200	3 min @ 94°C, 2 min @ 65°C	14	1.0, 1.2, 1.1	12	32, 38, 28
FFPE Tumor	2.3	74%	200	3 min @ 94°C, 2 min @ 65°C	14	0.6, 0.4, 0.5	12	33, 35, 45

表 4. Total RNA の品質、プロトコルの変更点、pre-capture と post-capture PCR 収量の一覧

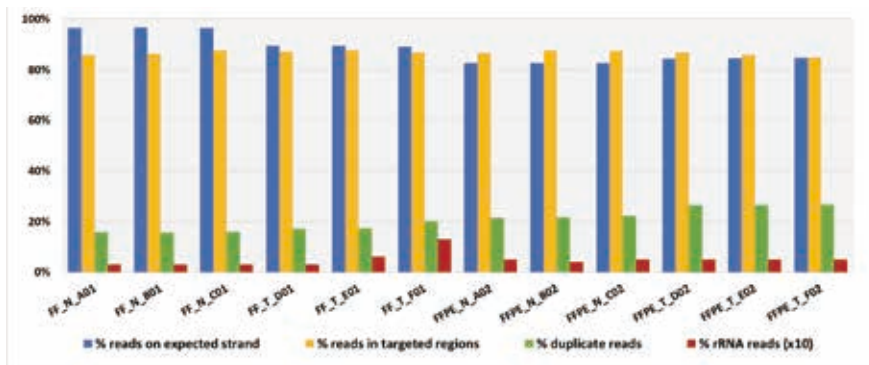


図 6. ライブラリ調製およびシーケンスを行った FF ライブラリと FFPE ライブラリのストランド特異性とターゲットエンリッチメント効率

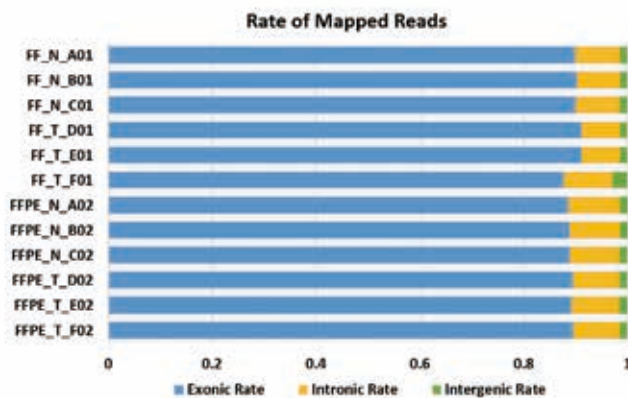


図 7. エクソン、イントロン、遺伝子間にマップされたリードの比率

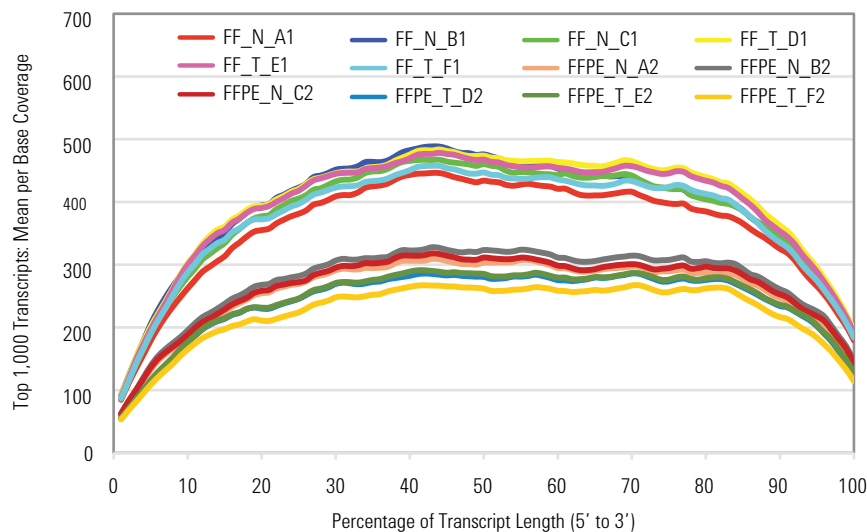


図 8. 上位 1,000 個の発現遺伝子に対する、5' から 3' までの転写産物のカバレッジ。線の色は、グラフに示すサンプル名に対応しています。

転写産物の 5' および 3' 末端でのカバレッジ

転写産物を正しく同定するには、遺伝子の 5' および 3' 末端でのカバレッジが重要です。既知の転写産物の 5' から 3' 末端までの長さのパーセンタイルごとに平均カバレッジを求め、FF ライブラリと FFPE ライブラリ間で偏りによる違いがあるかを判断しました。FF ライブラリの複雑性が高いため (重複の比率が低い)、上位 1,000 個の発現遺伝子に対する平均カバレッジは、FF ライブラリのほうが FFPE ライブラリよりきわめて高くなりました。図 8 に示されているように、両者のライブラリの複雑性が異なるにもかかわらず、転写産物の全長にわたり、FF サンプルと FFPE サンプルの両方でカバレッジが非常に均一であることがわかります。

レプリケートサンプル間の良好な相関関係

Strand NGS プログラムを用いて RPKM リードの主成分分析を行ったところ、図 9 に示すとおり、FF Tumor サンプル以外のどのサンプルでも、テクニカルレプリケートの 3 サンプルがほぼ同じ箇所に集まりました。この解析で識別された上位 2 つの主成分は生物学的な組織の種類 (腫瘍または正常) であり、X 軸上のばらつきは 39%、Y 軸上のばらつきは 29% でした。

RPKM リードの階層的クラスター分析 (Euclidean similarity measurement/Wards linkage rule) を Strand NGS プログラムを用いて行ったところ、サンプルの第一層のクラスタリングは、FFPE または FF というサンプルの保管状態に関係なく、正常組織のサンプルと腫瘍サンプルが別々にクラスタリングされました (図 10)。

サンプルの種類に次ぐ第二層のクラスターリングは保管状態を基に形成され、FF サンプルと FFPE サンプルが別々にクラスターリングされました。また、階層的クラスター分析により、サンプルの種類および保管状態が異なっていても発現量が似た転写産物が多数存在すること、サンプルの種類（正常または腫瘍）に相関する明確な違いがあることもわかりました。

FF サンプルと FFPE サンプルでの遺伝子発現結果の類似性

すべてのレプリケートサンプルから少なくとも 1 つのリードが Ensembl 転写産物にマップされた (RPKM >0) 75,263 個の Ensembl 転写産物について、腫瘍対正常組織の \log_2 比に非常に高い相関関係が見られました。Fold-change (腫瘍対正常組織) の統計的有意性を Volcano plot で図 11 に示します。図では、 \log_2 fold-change の値が X 軸に、 $-\log_{10}$ の補正 p 値が Y 軸にプロットされています。統計的に有意 (Benjamini Hochberg 法で多重検定補正した p 値が 0.05 未満、緑色の横線) かつ発現差が 2 fold-change 以上 (緑色の縦線) である発現転写産物は赤く表示されており、統計的に有意な発現転写産物の数は、保管状態別に赤字で図 11 のグラフに表示しています。

FF および FFPE 由来の total RNA サンプル間で遺伝子発現比に高い相関性があることを明確に示すため、図 11 の 2 つのボルケーノプロットで X 軸にプロットした、腫瘍対正常組織の fold-change の \log_2 比を図 12 に再度プロットし比較しました。FF と FFPE それぞれで発現した 75,236 個の Ensembl 転写産物の遺伝子発現 \log_2 比を比較した結果、直線の傾きが 0.93 であることと、図 12 の各点にフィットした直線の $r^2 = 0.70$ であることから、両方の条件で高く一致することが判明しました。

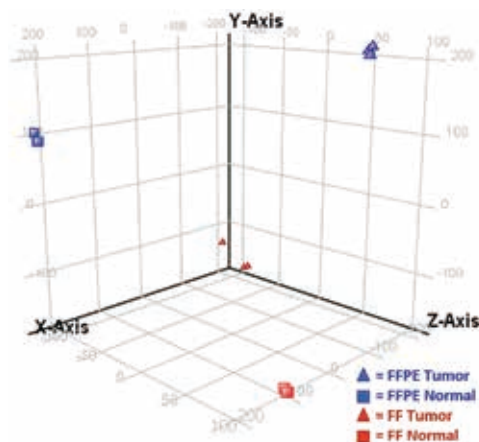


図 9. テクニカルレプリケートサンプル間に高い相関関係があり、サンプルは、細胞生物学的な状態 (腫瘍または正常) および組織の保管方法 (FFPE または FF) により明確に区別されることが、主成分分析で認められます。

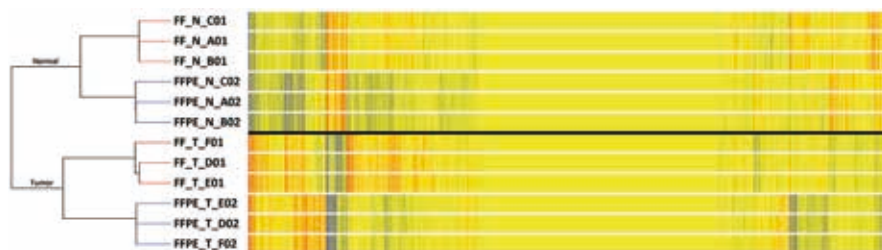


図 10. PPKM 発現の階層的クラスター分析の結果、クラスターリングの第一層が保管状態ではなく、サンプルの種類にあることから、サンプル間の生物学的な違い (腫瘍対正常組織) が、組織の保管方法 (FFPE または FF) の違いより影響が大きいことが判明しました。

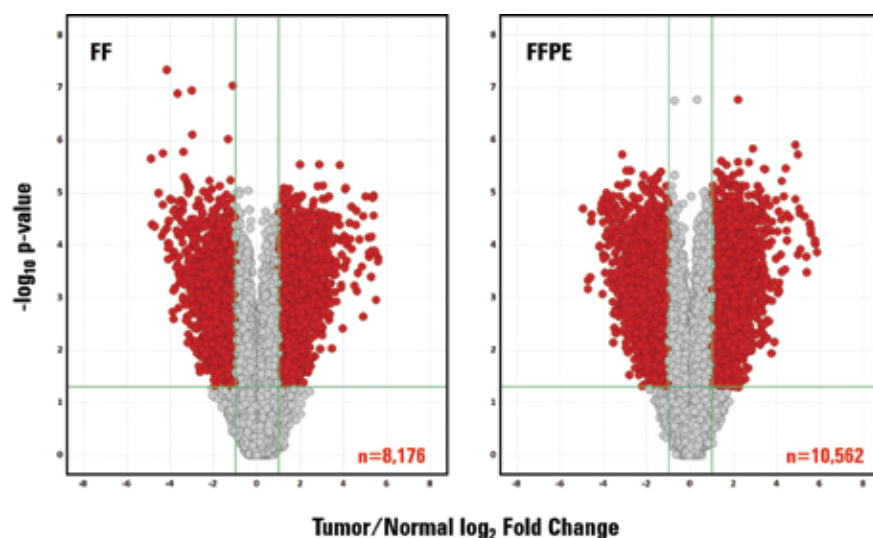


図 11. 統計的に有意な fold-change を示す volcano plot。X 軸は腫瘍対正常組織の \log_2 fold-change を、Y 軸は $-\log_{10}$ の補正 p 値を示します。赤い点は、発現比が 2 倍より大きく、補正 -p 値が 0.05 より大きい遺伝子を示します。グラフの緑の縦線は、2 倍の発現比を、緑の横線は 0.05 の -p 値を表します。

結論

このアプリケーションノートでは、FFPE サンプルをターゲットキャプチャした遺伝子発現データが、FFPE とペアとなる新鮮凍結組織から抽出した RNA で得たデータと一致率が高いことを示し、SureSelect XT RNA Direct プロトコルが、FFPE サンプル由来の total RNA のシーケンスに最適な方法であることを示しました。また、ハイブリベースのキャプチャを行いトランスクリプトームを解析することで、ライブラリの調製前に poly (A) 精製モリボソーム RNA 除去も不要なワークフローになっています。この改良されたワークフローでは、サンプルが M-270 ストレプトアビジンビーズに結合したまま (オンビーズ PCR) post-capture の増幅反応を行うため、溶出・中和・ビーズ精製のステップが不要になり、収量の減少や、望ましくない偏りがシーケンスデータに生じるリスクを回避することができます。

FFPE サンプルおよび FF サンプル由来の total RNA について、いずれのタイプのサンプルでも転写産物全体で偏りのないシーケンスカバレッジを得られることに加えて、オンターゲット率やマッピング率も同等であることを示しました。高い PCR 重複率が示すように、FFPE 由来のライブラリの複雑性は低いものの、発現量の増加・減少という最終的な結果については、FFPE、FF の両サンプル種で非常に類似していました。また、階層的クラスター分析だけでなく主成分分析でも、今回のサンプルの第一の差別化要因は、発現データを特徴づけるサンプルソース (腫瘍対正常組織) に起因する生物学的なものであり、FF または FFPE という保管方法ではないことが明らかになりました。

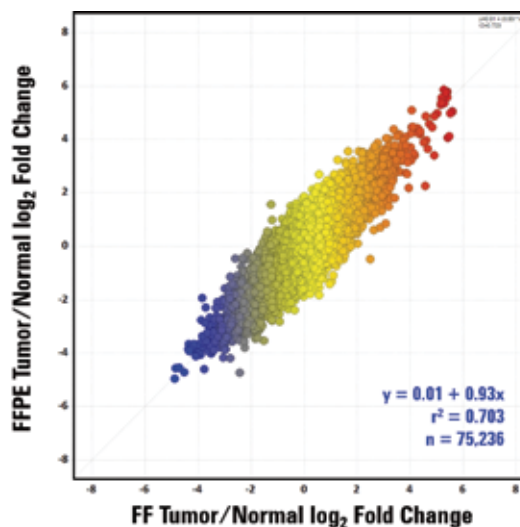


図 12. FF および FFPE の total RNA サンプル間の遺伝子発現 fold-change 比の相関

今回得られたデータにより、アジレントの効率化された SureSelect XT RNA Direct ワークフローを用いて、FFPE 由来の RNA からライブラリを調製し、生物学的に意義のあるシーケンス結果を得ることが十分に可能であることが示されました。

参考文献

1. Cieslik M, Chugh R, Wu YM, Wu M, Brennan C, Lonigro R, Su F, Wang R, Siddiqui J, Mehra R, Cao X, Lucas D, Chinnaiyan AM, and Robinson D “The use of exome capture RNA-Seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing” *Genome Research* **25**, 1372-1381 (2015)
2. “Evaluating RNA Quality from FFPE Samples” Illumina publication number 470-2014-001
3. “SureSelect^{XT} RNA Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing Strand Specific Library Prep and Target Enrichment Protocols” Agilent publication number G9691-90000
4. Deluca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire MD, Williams C, Reich M, Winckler W, Getz G “RNA SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization” *Bioinformatics* **28**, 1530-1532 (2012)
5. Strand NGS software, Version 2.8, Build 230243. © Strand Life Sciences, Bangalore, India

Trusted Answers, Together

<http://AgilentGenomics.jp>

本資料掲載の製品は全て研究用です。その他の用途にご利用いただくことはできません。このアプリケーションノートの情報、記述、および仕様は予告なく変更されることがあります。Agilent Technologies は本書に含まれる誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2017

Published in Japan, May 24, 2017

5991-8119JAJP



Agilent Technologies