

■ RNA SHIELDER を使用した次世代シーケンス (NGS) 実験データ

RNA SHIELDER (+) 4℃保存、RNA SHIELDER (-) -80℃保存のサンプルから調製したのに対して次世代シーケンス解析を実施したところ、同等の結果が得られ、RNA SHIELDER で保存したサンプル RNA が、次世代シーケンス実験系において阻害なく使用できることが実証されました。

【サンプル準備～シーケンスサンプル作製】

実験に使用する totalRNA は、末梢血から一般的な抽出キット・精製キットを用いて準備しました。サンプル RNA を RNA SHIELDER (+)と(-)に分けた後、(+)のサンプルを 4℃で、(-)のサンプルを-80℃で 5 日間保存しました。この時点で RNA の品質チェックを電気泳動によって実施しました。

以下は、それぞれのサンプル RNA の電気泳動品質チェック結果です。

RNA SHIELDER (+)のサンプル RNA は4℃の冷蔵保存でも、リファレンスの-80℃保存のサンプル RNA と比較して遜色ありません。

RNA 保存後ゲル電気泳動結果



① λ hind III

② SHIELDER(-) -80℃保存

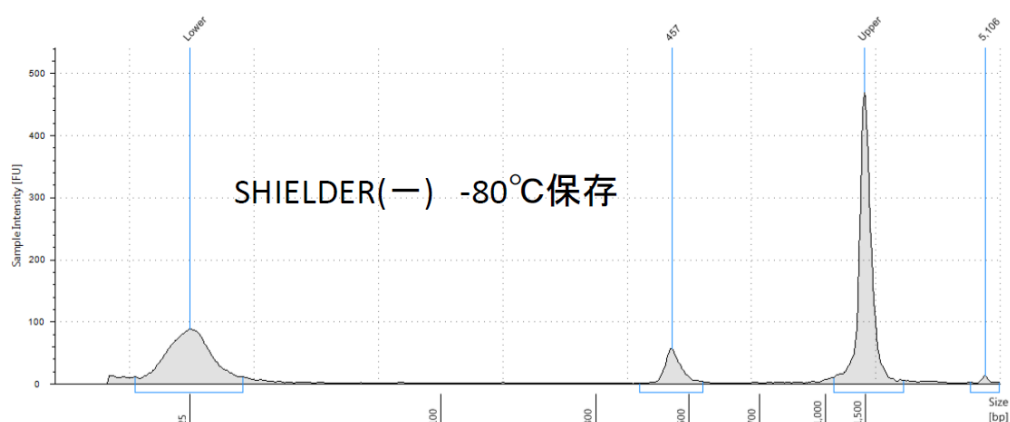
③ SHIELDER(+) 4℃保存

その後、それぞれのサンプル RNA から溶液一定量を採取し、iCubate 自動 PCR システムを用いて等量の RNA をテンプレートに逆転写および arm-PCR を実施することによってシーケンスサンプルを作製しました。この時点で増幅産物の品質チェックを tapestation での電気泳動によって実施しました。

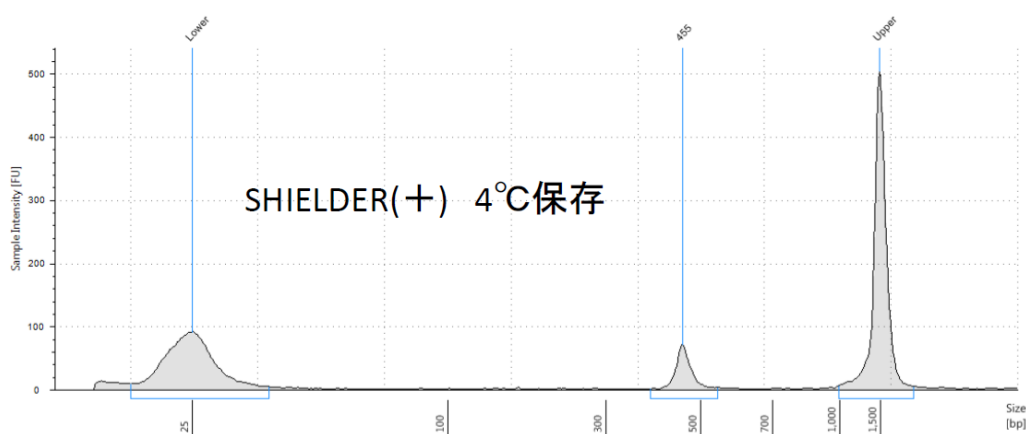
以下は、それぞれの増幅産物の tapestation による泳動結果です。

下図の Size 455 bp 近傍のピークが目的の増幅産物です。RNA SHIELDER (+) の 4℃ 冷蔵保存サンプル由来の増幅産物は、リファレンスの -80℃ 保存サンプル由来の増幅産物と比較して遜色ありません。

tapestation による増幅産物の泳動結果



Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	Observations
25	411	25300	Lower Marker
457	92.8	313	
1,500	580	595	Upper Marker



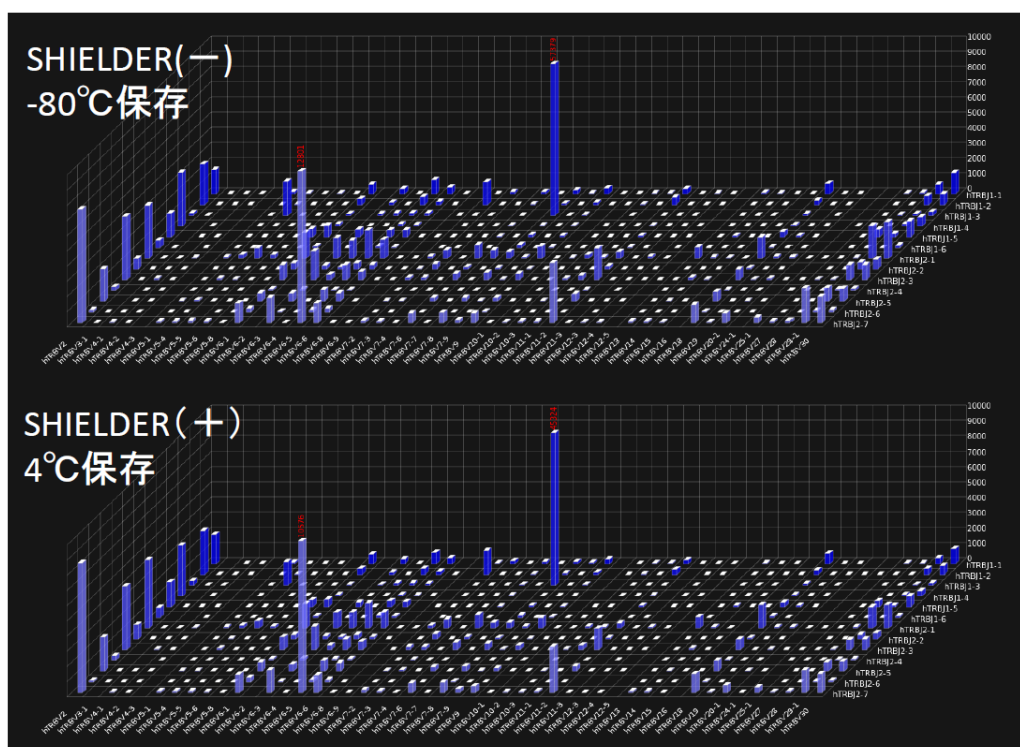
Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	Observations
25	421	25900	Lower Marker
455	101	342	
1,500	580	595	Upper Marker

【次世代シーケンスによる解析結果】

RNA SHIELDER によって 4℃保存されたサンプル RNA「RNA SHIELDER (+)」と -80℃保存のサンプル RNA「RNA SHIELDER (-)」から、前述の流れでシーケンスサンプルを調製し、ヒト TCR β の多様性解析を次世代シーケンスで実施したデータを以下に示します。

以下に示されるとおり RNA SHIELDER (+)の 4℃冷蔵保存サンプル RNA からの解析結果は、リファレンスの-80℃保存サンプル RNA からの解析結果と比較して遜色ありません。

このことより、RNA SHIELDER で 4℃保存したサンプル RNA が、次世代シーケンス実験系において阻害なく使用できることが実証されました。



CDR3配列 TOP10

	SHIELDER(-) -80℃保存				SHIELDER(+) 4℃保存			
1	ASRRTGSPGNTIY	hTRBV7-8	hTRBJ1-3	56647	ASRRTGSPGNTIY	hTRBV7-8	hTRBJ1-3	44755
2	ASSSSGGDEQY	hTRBV6-5	hTRBJ2-7	10774	ASSSSGGDEQY	hTRBV6-5	hTRBJ2-7	8617
3	ASTPTSGRYEQY	hTRBV2	hTRBJ2-7	3500	ASTPTSGRYEQY	hTRBV2	hTRBJ2-7	4016
4	ASSDRVEKLF	hTRBV2	hTRBJ1-4	3053	ASSDRVEKLF	hTRBV2	hTRBJ1-4	2888
5	ASSLGDGSGLEQY	hTRBV11-2	hTRBJ2-7	2986	ASSLGDGSGLEQY	hTRBV11-2	hTRBJ2-7	2167
6	ASSDLDSEGNTIY	hTRBV5-4	hTRBJ1-3	2193	ASSDLDSEGNTIY	hTRBV5-4	hTRBJ1-3	1528
7	ASSLRDSTDTQY	hTRBV11-2	hTRBJ2-3	1585	ASSDLDSEGNTIY	hTRBV5-4	hTRBJ1-3	1528
8	ASSSDTSYGYT	hTRBV7-2	hTRBJ1-2	1482	ASSERNGYTY	hTRBV2	hTRBJ1-2	1495
9	ASSERNGYTY	hTRBV2	hTRBJ1-2	1471	ASSPDRNTDTQY	hTRBV6-3	hTRBJ2-3	1073
10	ASSPDRNTDTQY	hTRBV6-3	hTRBJ2-3	1438	ASSHTDTQY	hTRBV2	hTRBJ2-3	1060