

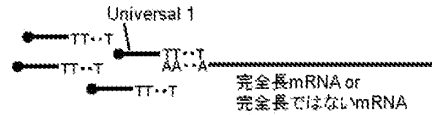
[図1]

Terminal transferase活性を有する逆転写酵素を用いた液相系nonTS/TAS-Seq

Step 1:

Target RNA capture

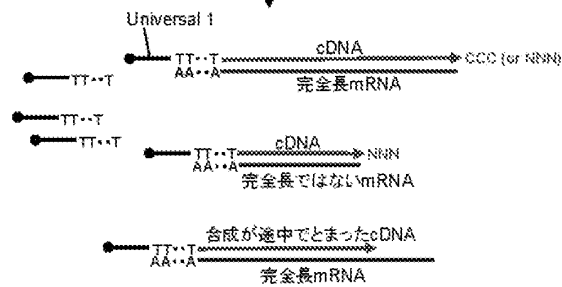
Poly A RNA捕捉オリゴでmRNAを捕捉



Step 2:

Reverse transcription

terminal transferase活性を有する逆転写酵素を用いて逆転写反応
(cDNAの合成、3'末端へのCCCなどの付加配列追加)

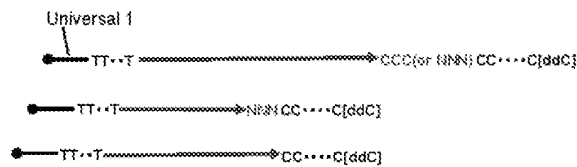


Step 3:

Removal of unreacted oligos
by column purification etc.

Step 4:

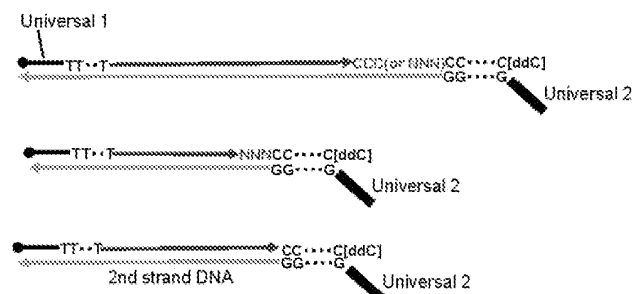
RNA degradation and homopolymer tailing



Step 5:

2nd strand synthesis

プライマー 5'-GG...G-3'を添加して第2鎖合成



Step 6: PCR amplification

[圖2]

Terminal transferase活性を有するが鎖置換活性を持たない逆転写酵素を用いたTS/TAS-Seq(固相系)

Step 1:

Target RNA capture

Poly A RNA捕捉オリゴでmRNAを捕捉

Step 2:

Reverse transcription and template switching

テンプレートスイッチングオリゴの共存下、terminal transferase活性を有する逆転写酵素を用いて逆転写反応(cDNAの合成、3'末端へのCCCなどの付加配列追加、テンプレートスイッチングオリゴのハイブリダイズ)

Step 3:

Removal of unreacted oligos by exonuclease treatment

固相洗浄により未反応のテンプレートスイッチングオリゴを除去した後、未反応のPoly A RNA捕捉オリゴをエキソヌクレアーゼ処理により除去

Step 4:

RNA degradation and homopolymer tailing

Step 5:

2nd strand synthesis

ロングプライマー-5'  GG...G-3'
および
ショートプライマー-5'  -3'
を添加して第2鎖合成

Step 6: PCR amplification

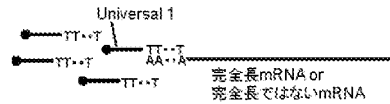
[図4]

Terminal transferase活性を有するが鎖置換活性を持たない逆転写酵素を用いたTS/TAS-Seq (液相系)

Step 1:

Target RNA capture

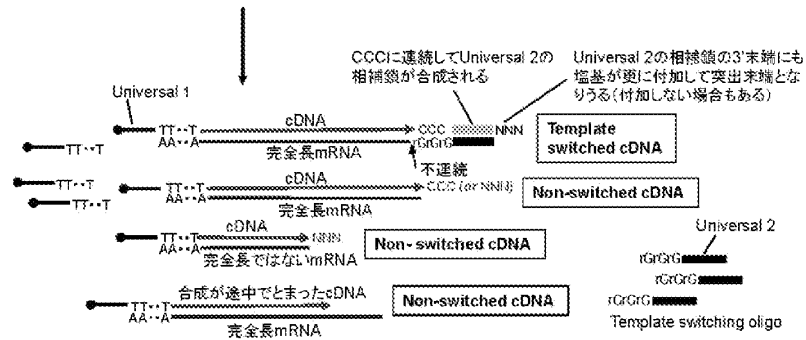
Poly A RNA捕捉オリゴでmRNAを捕捉



Step 2:

Reverse transcription
and template switching

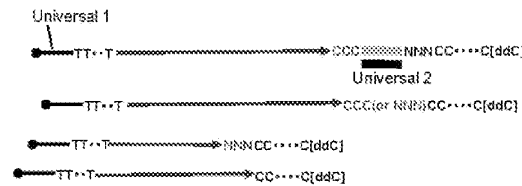
テンプレートスイッチングオリゴの
共存下、terminal transferase活性
を有する逆転写酵素を用いて逆転
写反応
(cDNAの合成、3'末端へのCCCな
どの付加配列追加、テンプレート
スイッチングオリゴのハイブリダイ
ズ)



Step 3:

Removal of unreacted oligos
by column purification etc.

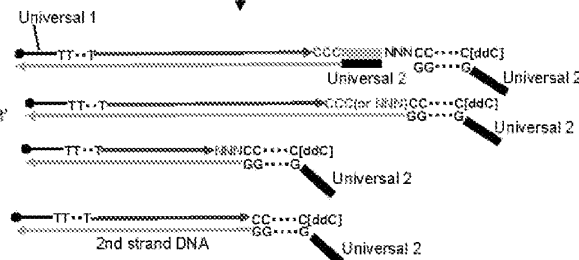
Step 4:

RNA degradation and
homopolymer tailing

Step 5:

2nd strand synthesis

ロングプライマー 5'-GG...G-3'
および
ショートプライマー 5'-3'
を添加して第2鎖合成



Step 6: PCR amplification

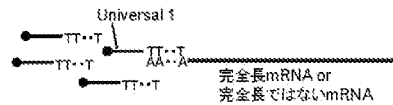
[図5]

Terminal transferase活性及び鎖置換活性を有する逆転写酵素を用いたTS/TAS-Seq (液相系)

Step 1:

Target RNA capture

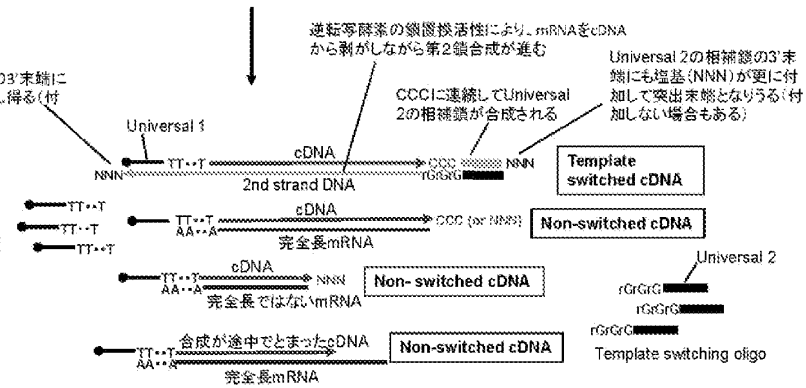
Poly A RNA捕捉オリゴでmRNAを捕捉



Step 2:

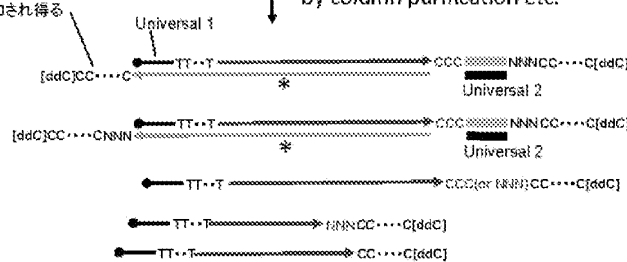
Reverse transcription and template switching

テンプレートスイッチングオリゴの共存下、terminal transferase活性及び鎖置換活性を有する逆転写酵素を用いて逆転写反応 (cDNAの合成、3'末端へのcccなどの付加配列追加、テンプレートスイッチングオリゴのハイブリダイズ、switched cDNAに対する第2鎖合成)

Step 3:
Removal of unreacted oligos
by column purification etc.

Step 4:

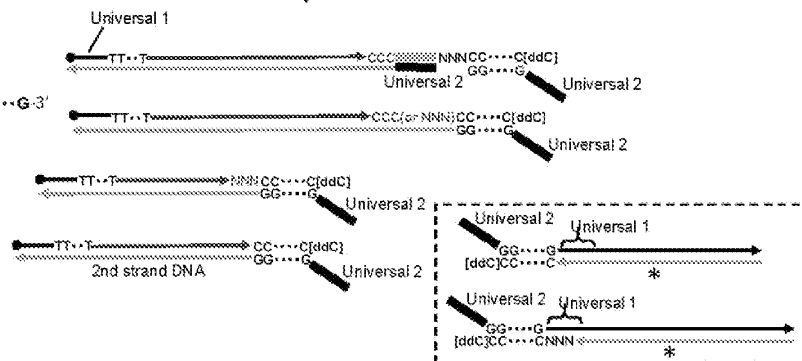
RNA degradation and homopolymer tailing



Step 5:

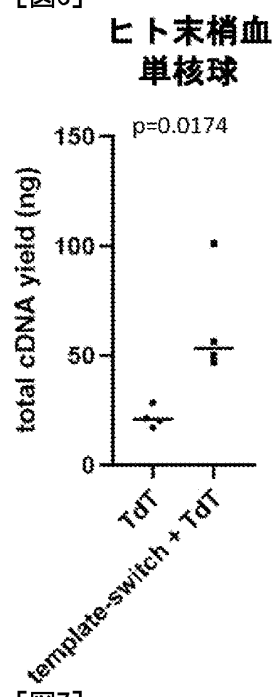
2nd strand synthesis

ロングプライマー 5'-GG...G-3' および ショートプライマー 5'-...-3' を添加して第2鎖合成

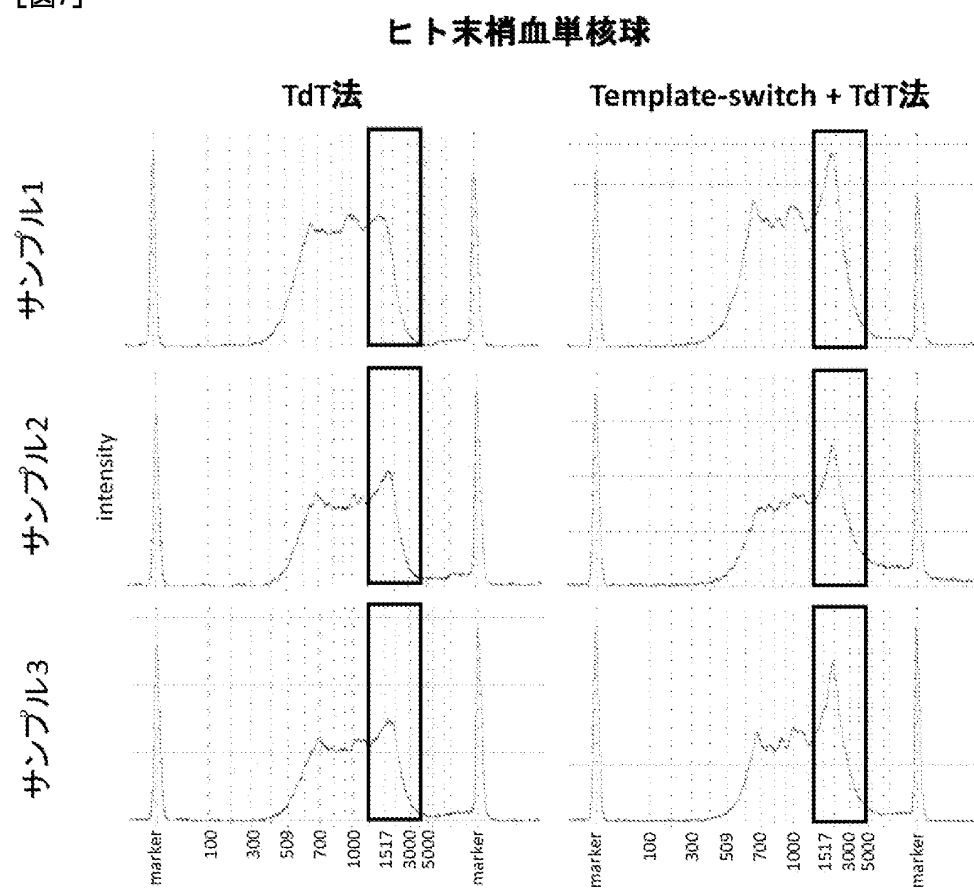


Step 6: PCR amplification

[図6]

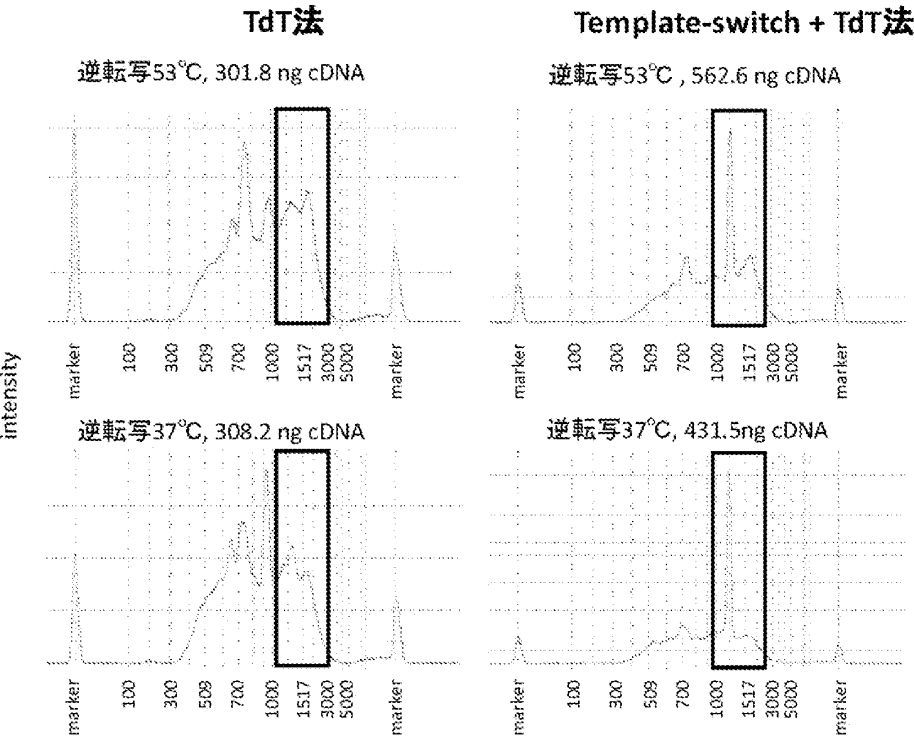


[図7]



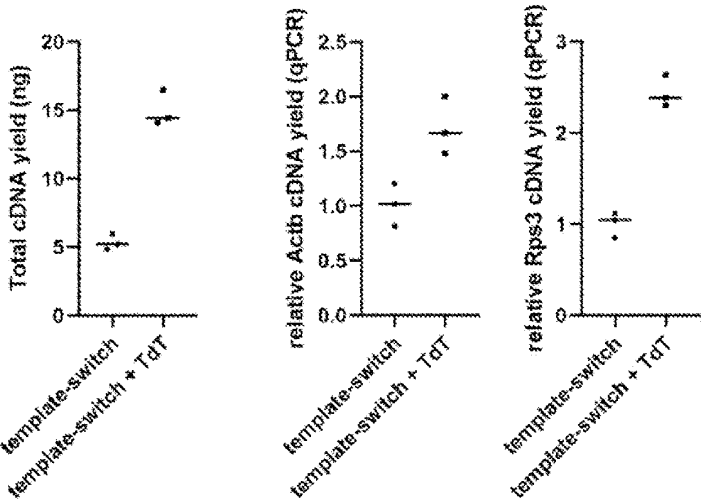
[図8]

ヒト末梢血単核球

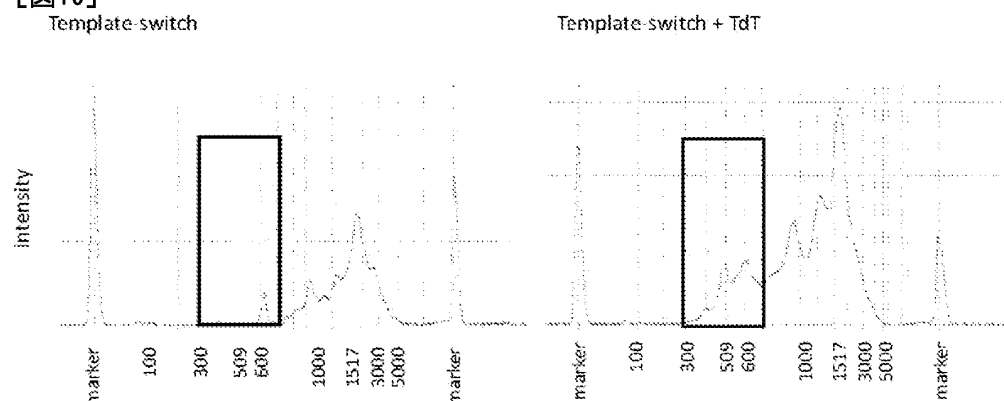


[図9]

NIH3T3細胞由来全RNA

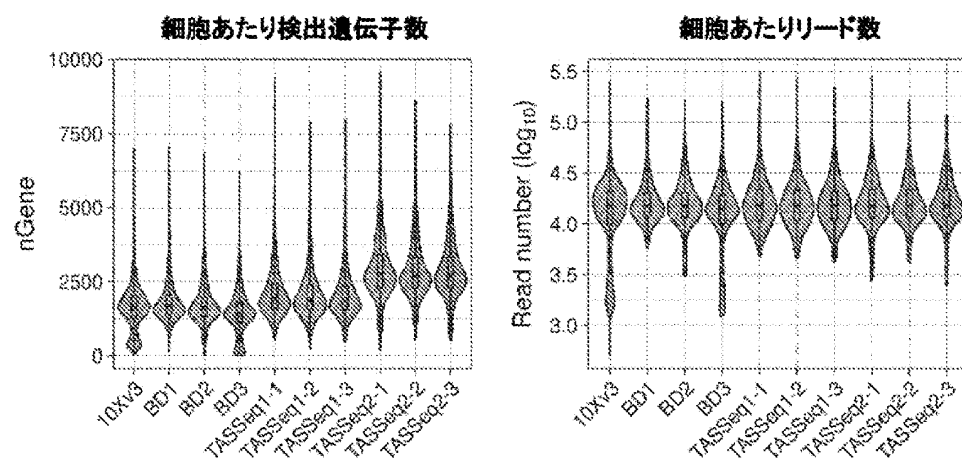


[図10]



[図11]

マウス脾臓細胞



10X v3: 10X Chromium v3 (GSE192930) include-intron mode (template switching法、液相系)

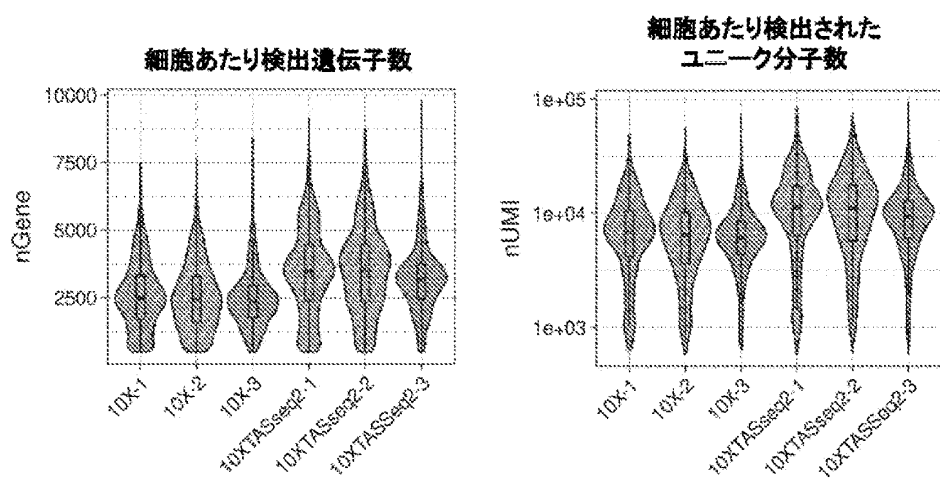
BD1-BD3: BD Rhapsody WTA キット (random priming法、固相ビーズ)

TAS-Seq1-1~1-3: TAS-Seq (TdT法単体、固相ビーズ)

TAS-Seq2-1~2-3: TAS-Seq2 (template-switch + TdT法、固相ビーズ)

[図12]

ヒト末梢血単核球

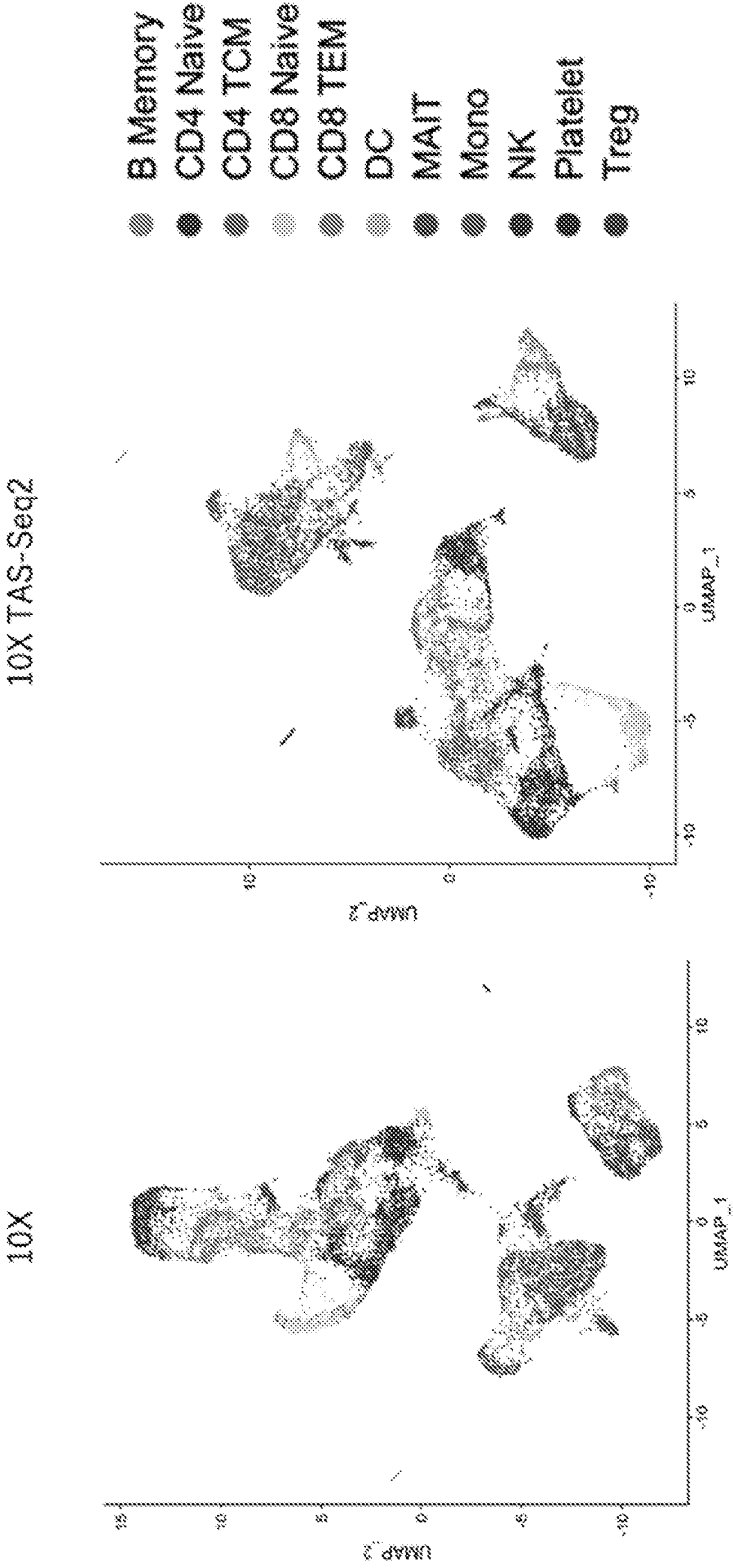


10X: 10X Chromium v3 (template switching法、液相系)

10XTASSeq2: 10X Chromium v3 + TAS-Seq2 (template switching+TdT 法、液相系)

末尾の番号はサンプルの種類を示す。

[図13]



[図14]

