

イルミナシングルセル解析入門

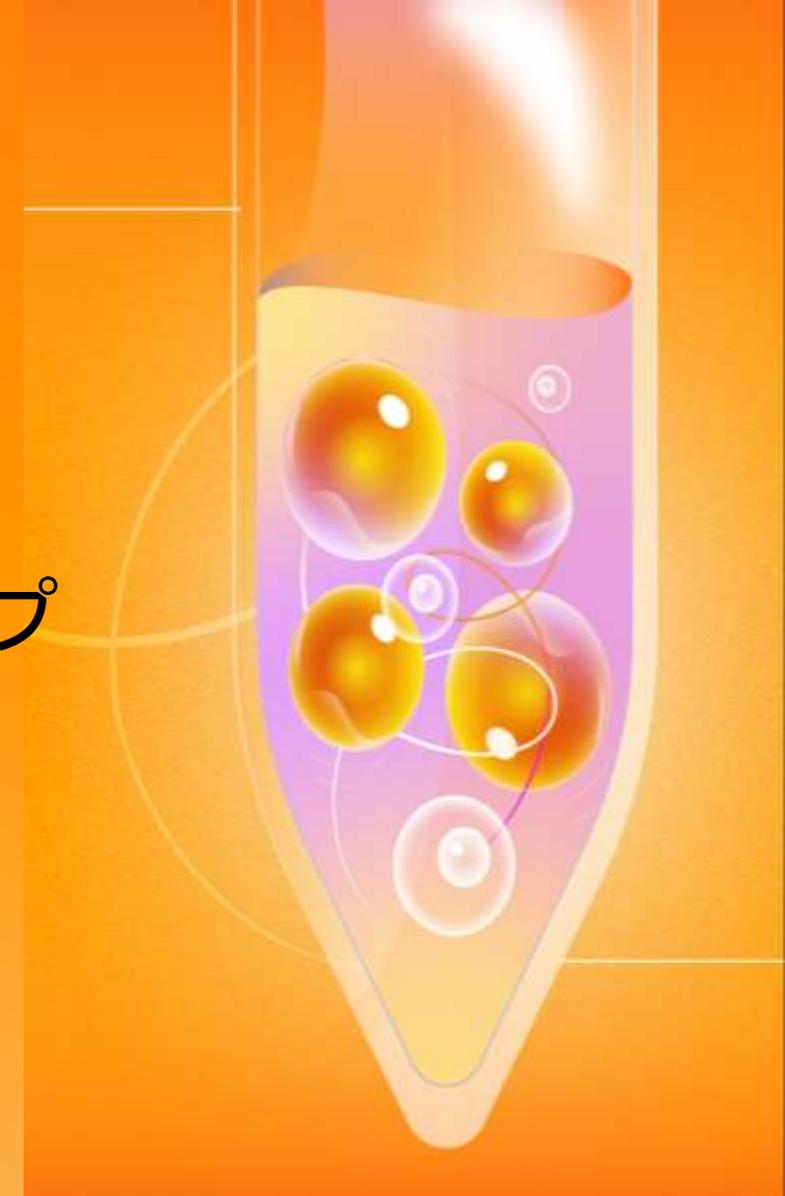
ウェット編：
サンプル調製からシーケンスまでの基本ステップ

高田 よう子

テクニカルアプリケーションサイエンティスト

イルミナ株式会社

29-JAN-2026



「イルミナシングルセル解析入門」シリーズのご案内

本ウェビナーは、Illumina Single Cell 3' RNA Prep Kitを初めて導入される方向けのシリーズです。全2回構成となっており、第1回はウェット編、第2回はドライ編をご紹介します。今回はシリーズの第1回として、細胞の処理・ライブラリー調製を中心に、基本のステップやトラブルシュートについてご紹介します。これにより、シングルセル解析を円滑に進めていただくための実践的な知識を習得いただけます。

ウェット編：2026年1月29日実施

Illumina Single Cell 3' RNA Prep Kitの概要に加えて、**細胞サンプルの準備方法**や**シーケンスにおける考慮点**を解説します。さらに、実際のライブラリー調製の流れをステップごとにご紹介し、よくあるトラブルとその解決方法についても取り上げます。シングルセル実験を円滑に進めるための基礎知識から実践的なノウハウまで学んでいただけます。

URL: <https://jp.illumina.com/events/webinar/2026/ts-webinar-20260129.html>

ドライ編：2026年1月30日実施

Illumina Single Cell 3' RNA Prep Kitの公式データ解析ツールである **DRAGEN™ Single Cell RNA**を用いた二次解析の手順やデータの見方を解説します。あわせて、可視化やフィルタリングを通じて結果をより深く理解するための三次解析プラットフォーム **Partek™ Flow™**もご紹介し、シングルセルデータ解析の一連の流れを学んでいただけます。

URL: <https://jp.illumina.com/events/webinar/2026/ts-webinar-20260130.html>

ご紹介内容はウェビナー実施時の情報に基づきます。
最新情報はWEBサイトでご確認ください。

Illumina Single Cell 3' RNA Prepのワークフロー

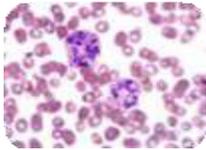
ウェット編：2026年1月29日実施

ドライ編：2026年1月30日実施



ライブラリー調製

Illumina Single Cell
3' RNA Prep



シーケンス

規模とアプリケーションに応じて必要な
データ量に対応する装置を選択



二次解析

DRAGEN Single Cell RNA

- BaseSpace™ Sequence Hub など
(クラウド環境)
- DRAGEN オンプレミスサーバー
(ローカル環境)

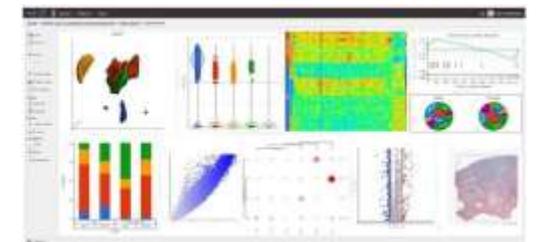


三次解析と視覚化

Partek Flow
(クラウド・ローカル環境)



Illumina Connected Multiomics



Agenda

01 Illumina Single Cell 3' RNA Prepの製品概要

02 Illumina Single Cell 3' RNA Prepのワークフロー

03 シーケンスの設定

04 トラブルシューティング

05 その他資料集



illumina Single Cell 3' RNA Prepの 製品概要

1

バルクRNA-SeqとシングルセルRNA-Seqの特徴



Bulk



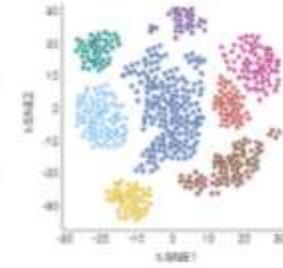
Single Cell



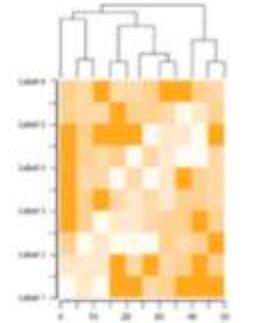
Complex tissue



Mixed cell suspension



Informatic cell clustering



Gene expression profiles

フルーツに例えると...

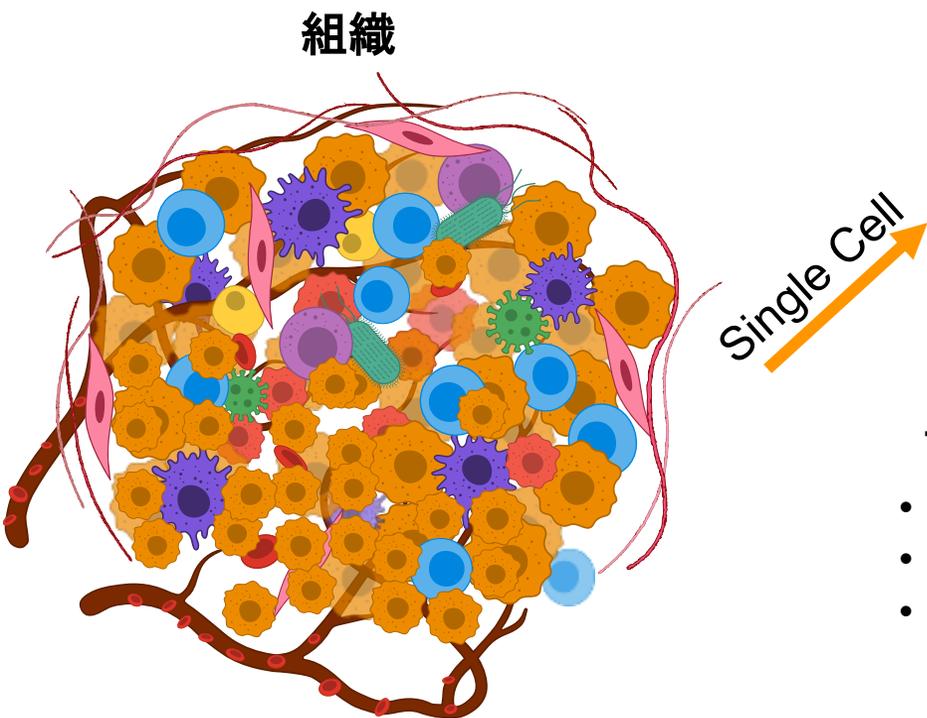
- バルクRNAシーケンスをフルーツに例えると「スムージー」様々なフルーツが混ぜ合わされている
- シングルセルRNAシーケンスは「フルーツサラダ」個々のフルーツを別々に味わうことができる

RNA-Seqにおいては...

- バルクRNAシーケンスでは、サンプル中の細胞から得られた全遺伝子発現の総体を評価
- シングルセルRNAシーケンスでは、複雑な組織を個々の細胞に分離し、細胞毎の遺伝子発現情報を取得。インフォマティクスによる細胞クラスタリングで、異なる細胞タイプを識別。細胞種ごとに遺伝子発現プロファイルを評価

<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01105-2>より改変

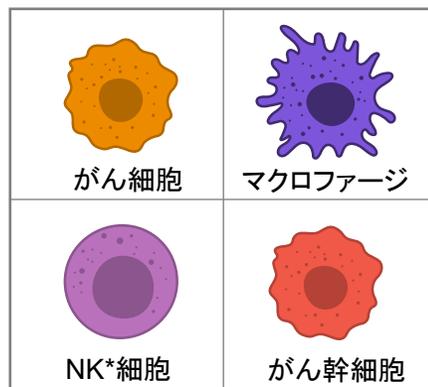
シングルセルRNA-Seqの長所と短所



例: 腫瘍微小環境

<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1293> より改変

Single Cell Input

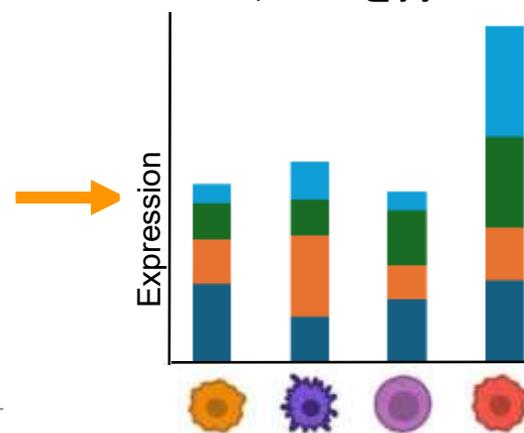


*NK: Natural Killer

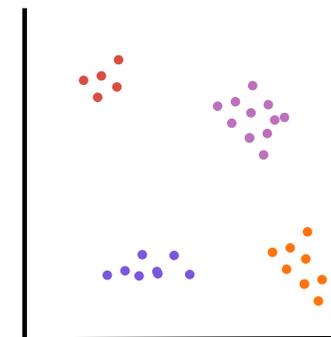
長所:

- 極めて希少な細胞も検出
- 複雑な組織をより正確に理解
- それぞれの細胞種の重要な生物学的情報を把握

より希少な細胞種も検出。
それぞれが異なる発現
パターンを持つ



不均一な集団や
サブ集団を同定



短所:

- ライブラリー調製およびシーケンスの費用がバルクより高額であることが多い
- 3'側解析の場合、基本的にカウンティング手法のみとなる
- サンプル調製時に細胞にストレスシグナルをもたらす可能性

Illumina Single Cell 3' RNA Prepの概要



アクセスしやすいワークフロー

- マイクロ流体デバイスや高額な装置は不要
- 既存のイルミナワークフローに手頃な価格で簡単に統合可能



高品質パフォーマンス

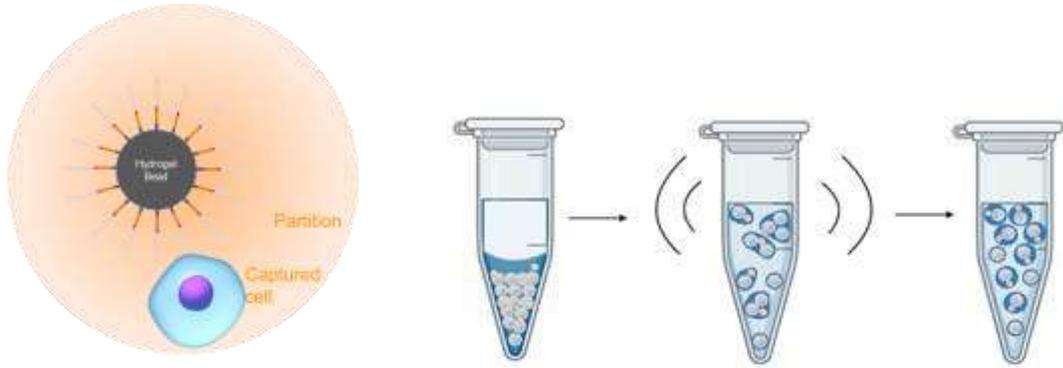
- 他の手法では捕捉が難しい脆弱な細胞やマイクロ流体を詰まらせるような細胞も検出可能
- 転写産物と遺伝子に対する高い感度



柔軟で拡張性の高いソリューション

- 100~100万細胞を処理可能
- 複数のサンプルを同時に処理可能
- エマルジョンを劣化させることなく、数日間保存可能

ボルテックスによるエマルジョン形成

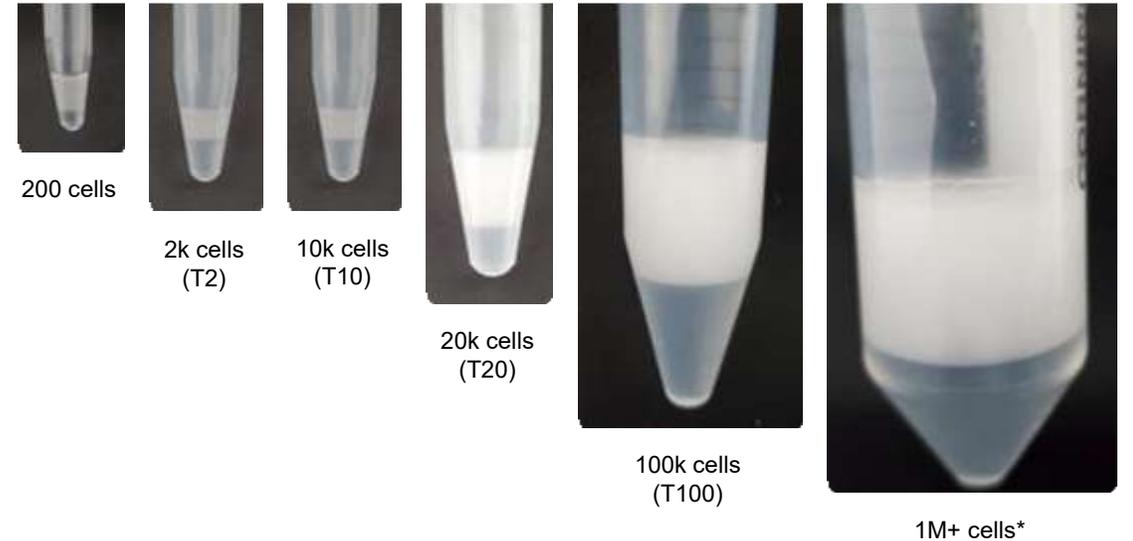


PIP™
(Pre-templated Instant Partitions)

シングルセル分離をシンプルなフローで数分で完了



低価格な機器と試薬キットで、均一なナノリットル規模の反応を実現



100から100万細胞まで、高い拡張性

*サンプルあたり100万細胞の反応は、社内で検証されていますが2025年時点でまだ市販品としてご提供していません。

*CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat

Illumina Single Cell 3' RNA Prep製品ラインアップ



カタログ #	製品名	概要
20135689	Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T2	2,000細胞/反応、8サンプル/キット
20135691	Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T10	10,000細胞/反応、8サンプル/キット
20135692	Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T20	20,000細胞/反応、4サンプル/キット
20135693	Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T100	100,000細胞/反応、2サンプル/キット
20132796	Illumina Single Cell Prep Starter Equipment	専用機器。初回のみご購入が必要

(オプション)

20132789	Illumina Single Cell Library Prep	ライブラリー調製試薬のみ
20132790	Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T2	細胞捕捉とcDNA合成試薬のみ
20132791	Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T10	細胞捕捉とcDNA合成試薬のみ
20132792	Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T20	細胞捕捉とcDNA合成試薬のみ
20132793	Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T100	細胞捕捉とcDNA合成試薬のみ
20132794	Illumina Single Cell Supplemental Enrichment and Amplification Kit	カスタム用のオプション
20132795	Illumina Nuclei Isolation Kit	Illumina single cell 3' RNA Prepに最適な核分離キット
20132788	Illumina Single Cell Unique Dual (UD) Indexes (96 indexes, 96 samples)	9サンプル以上の多検体マルチプレックスに必要なUD Index 96ウェルプレート

*cDNA: complementary DNA

Illumina Single Cell Prep Starter Equipmentの内容物(一部)



PIPseq™ボルテックスミキサー



PIPseqドライバス



チューブスタンド

キットサイズを選択

サンプルの不均一性・亜集団の頻度を考慮

同種サンプル・濃縮サンプル

同種もしくは濃縮サンプルに適する
例: 全細胞の20%以上を占める亜集団の同定



T2

captures \geq 2000 cells

異種サンプル

異種サンプルに適する
例: 全細胞の10%以上を占める亜集団の同定



T10

captures \geq 10,000 cells

希少なサンプル

希少な亜集団に適する
例: 全細胞の5%以上を占める亜集団の同定



T20

captures \geq 20,000 cells

非常に希少なサンプル

さらに希少な亜集団に適する
例: 全細胞の1%以上を占める亜集団の同定



T100

captures \geq 100,000 cells

解析したい細胞数、細胞の多様性や希少性に応じて、キット選択可能

必要なインプット細胞・核数

T2 Kit

T10 Kit

T20 Kit

T100 Kit

5,000 細胞・核

||

1,250生細胞/ μL

\times
4 μL^*

17,000 細胞・核

||

3,400生細胞/ μL

\times
5 μL^*

40,000 細胞・核

||

5,000生細胞/ μL

\times
8 μL^*

200,000 細胞・核

||

10,000生細胞/ μL

\times
20 μL^*

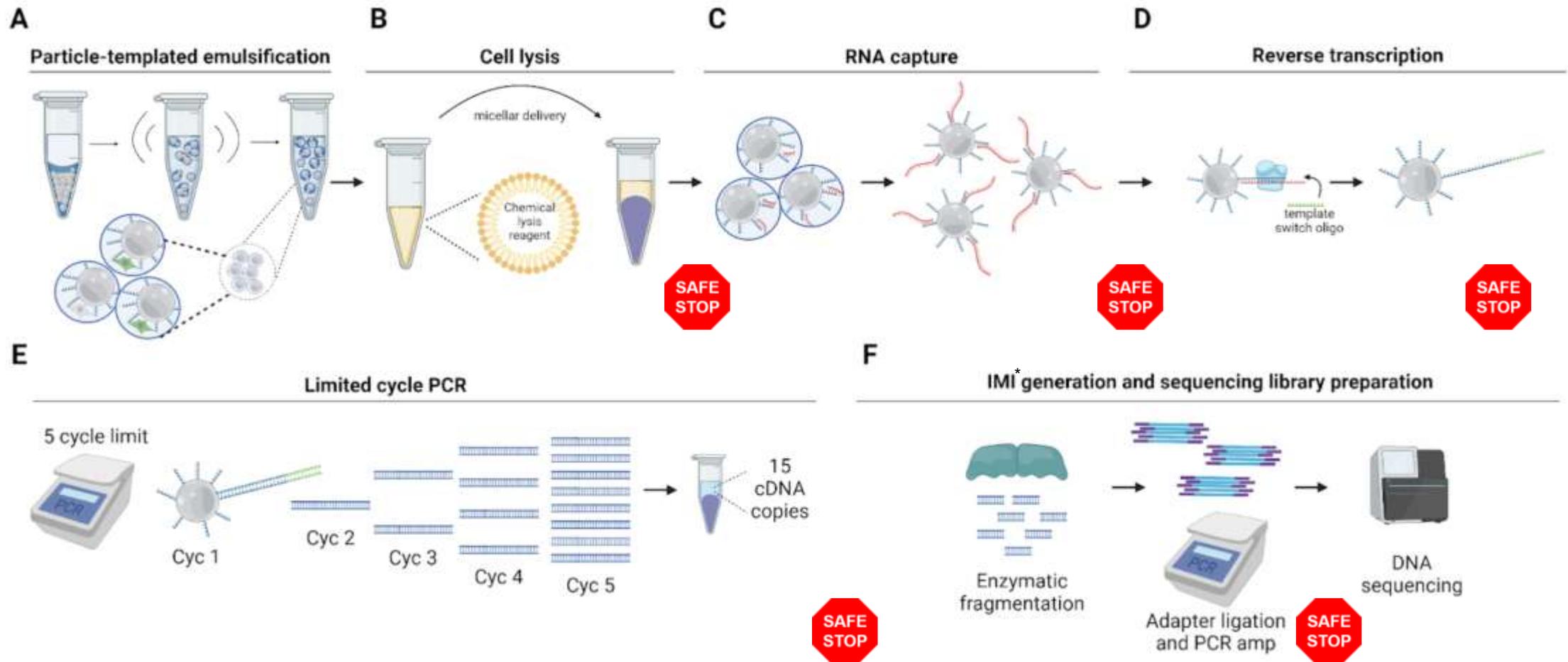
*ユーザーガイドの「Prepare Cell Suspension」のステップで、細胞は200 – 400 μL 、核は1000 μL の懸濁液として準備することに注意。途中のステップでロスが生じることも考慮し、十分な細胞または核を準備する。



illumina Single Cell 3' RNA Prepの ワークフロー

2

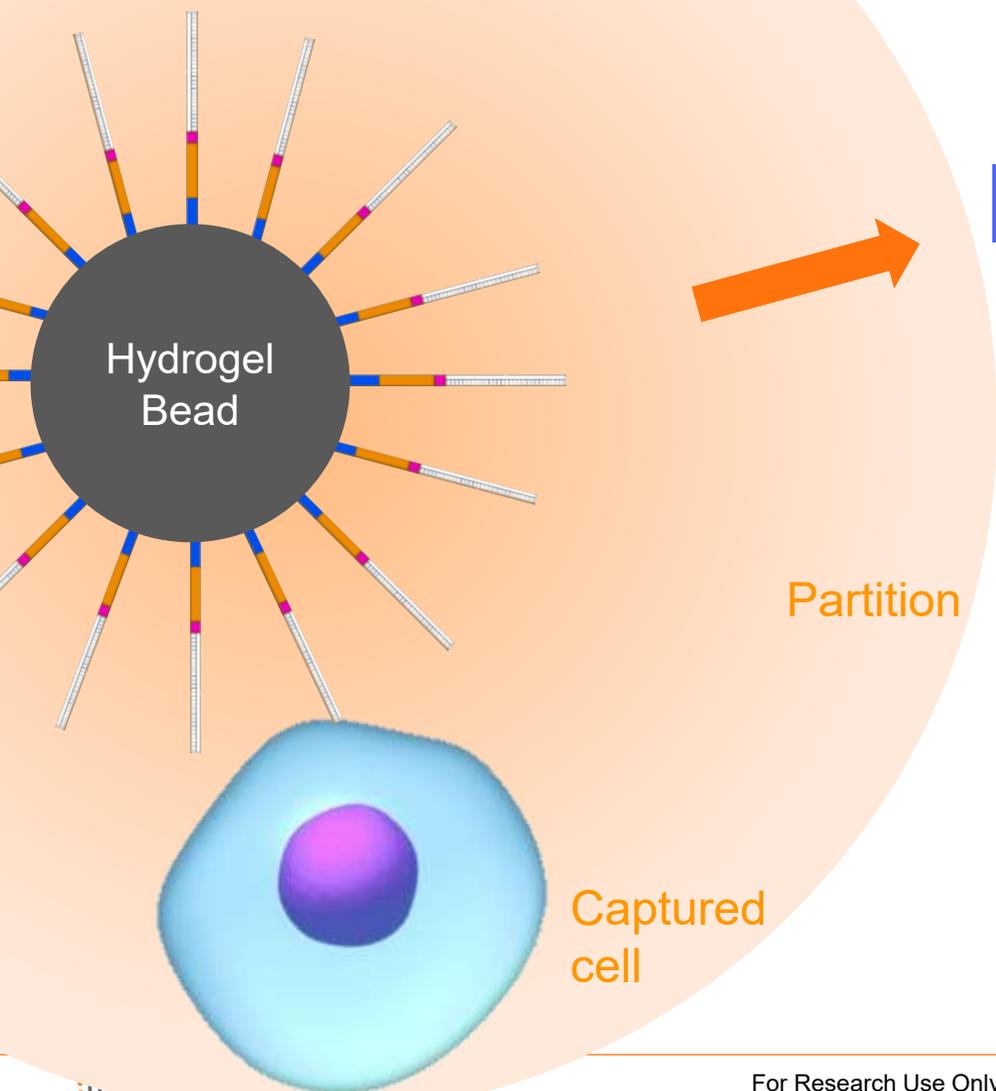
Illumina Single Cell 3' RNA Prepのワークフロー



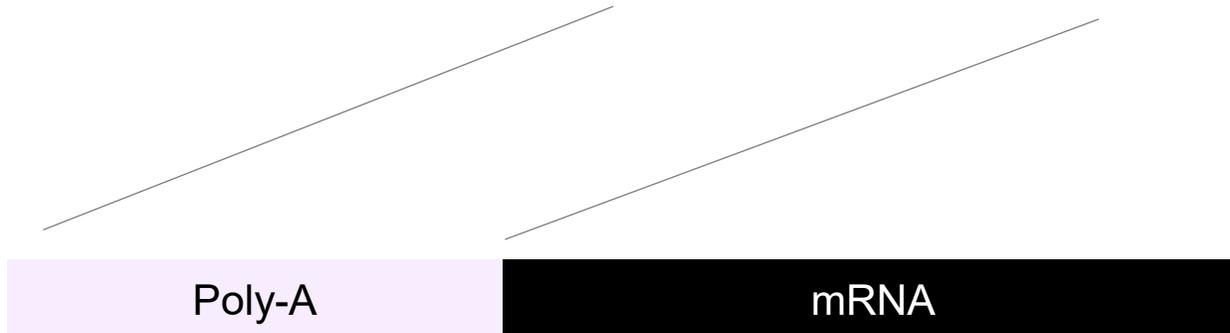
プロトコール内にセーフストップポイントを含みつつ、細胞からライブラリー作製まで約15時間のターンアラウンドタイム

*IMI: Intrinsic Molecular Identifier

PIP (Pre-templated Instant Partitions) の構造



ビーズ上のバーコード構造

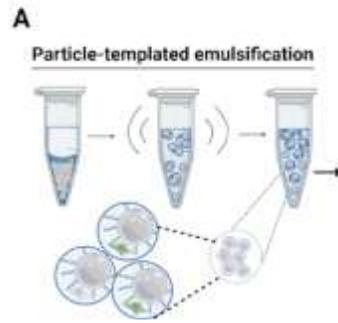


捕捉された細胞・核由来のmRNA

*mRNA: messenger RNA

A. 細胞の捕捉

1. PIPチューブに計数・濃度調整済み細胞懸濁液とRNase Inhibitorを添加しピペッティング
2. Partitioning Reagentを添加
3. PIPseqボルテックスミキサーを用い、1細胞/核とマイクロジェルビーズを含むエマルジョンを形成
 - ①アダプターヘッドをチューブが**水平**になる向きにセットしボルテックス:30秒 下図A
 - ②アダプターヘッドをチューブが**垂直**になる向きにセットしボルテックス:2分 下図B



Best Practices

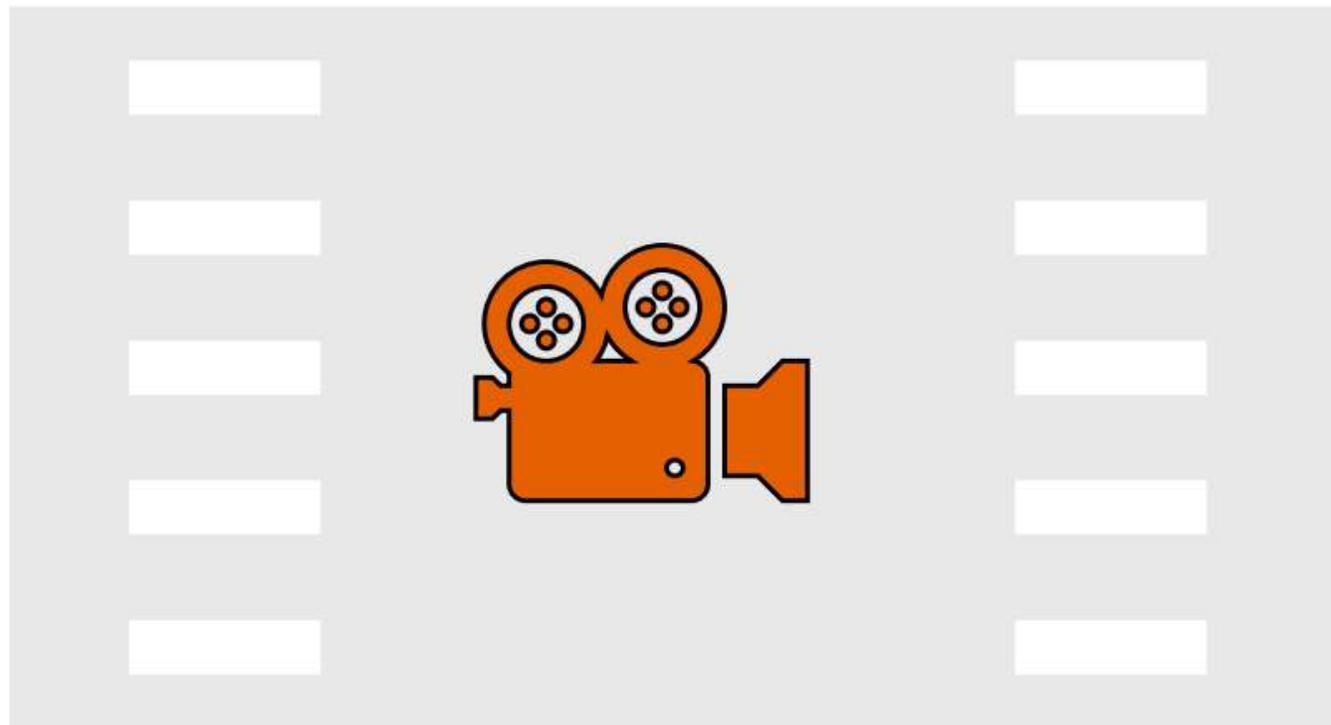
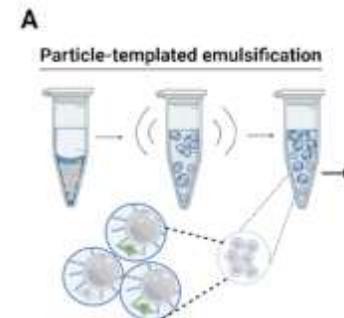
- バランスをとるため偶数個のサンプルでの実験を推奨 (T100に限り、ボルテックスは1チューブずつ行うことが推奨)
- サンプルとRNase InhibitorはPIP液面ではなくPIP液中に放出されるよう、ピペットチップを液中に差し込んで添加する



ボルテックス時のチューブの向き

A. 細胞の捕捉

PIPseqボルテックスミキサー



ウェビナー録画から動画をご視聴いただけます

A. 細胞の捕捉

Partitioning Reagentの除去

4. ボルテックス後、下層の余剰Partitioning reagentを除去

* キットによって除去量、方法は異なる

図参照

Best Practices

- Partitioning Reagent除去時は、チップまたはシリンジをゆっくりとチューブの底まで入れ、5秒待ち、チップ/シリンジに付着したPIPが上層へ浮上した後で液を吸う
- チップ/シリンジをチューブから抜く際はPIPをロスしないよう、チューブ内壁でその先端を拭う

T2:
計230 μ L除去



T10: 上下層境界
が”B”に来るまで
除去



T20: 上下層境界が”4”
に来るまで除去

T100:
上下層境界が1 mL
ラインに来るまで
除去



B. 細胞の溶解

5. Lysis BufferとPartitioning Reagentを含むChemical Lysis Emulsionを添加、インキュベーションを実行

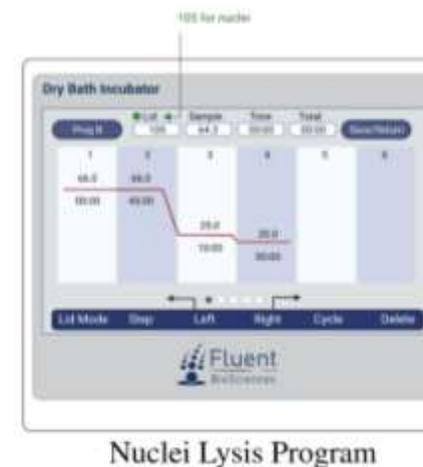
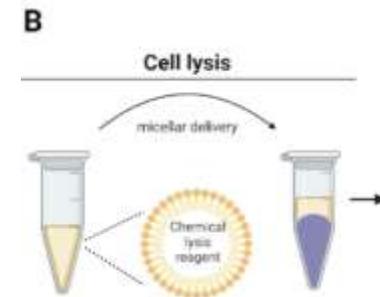
- エマルジョンにLysis Bufferが取り込まれ、細胞/核が溶解、mRNAがハイドロジェルビーズ表面のPoly-T構造に結合する

* インキュベーション完了後、20°Cで96時間の保管が可能

SAFE
STOP

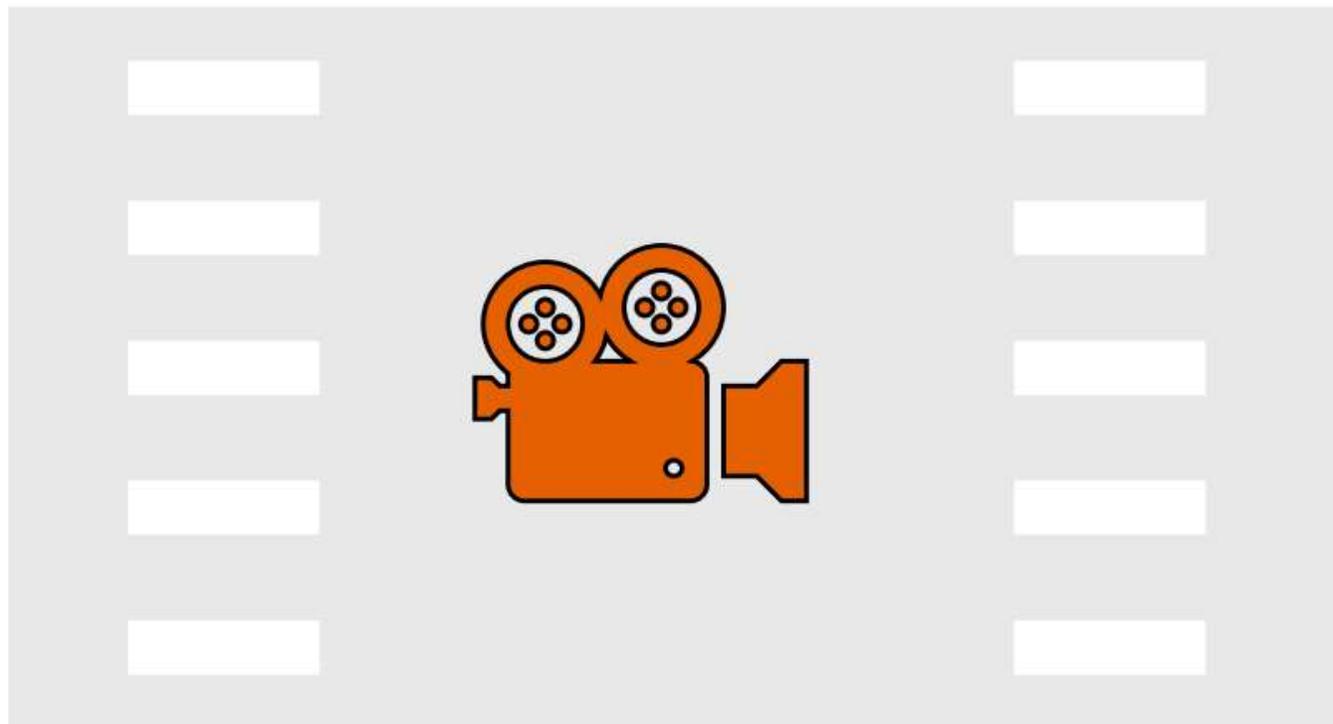
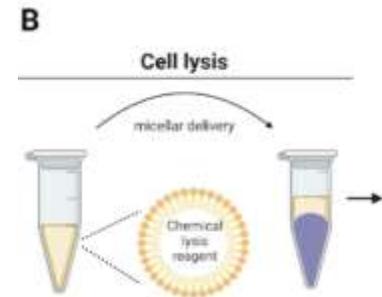
Best Practices

- Chemical Lysis Emulsion はサンプル数分を個別に作成し、ボルテックス、PIPチューブへの添加、混和をサンプルごとに1連の流れで行う
- サンプル調製から溶解インキュベーションまで、セーフストップポイントがないため手早く作業を進めさせ、RNase Inhibitorを適切に使用する
- インキュベーション完了後、PIPチューブを保管する際に冷蔵・冷凍しない



B. 細胞の溶解

PIPseqドライバス



ウェビナー録画から動画をご視聴いただけます

C. mRNAの単離

エマルジョンの破壊

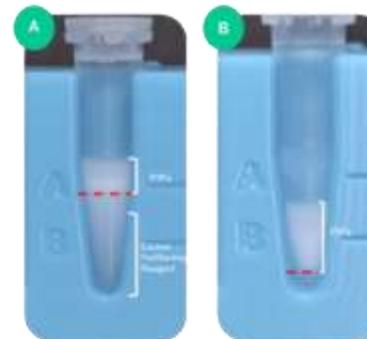
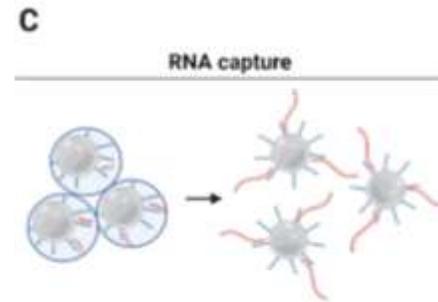
6. 下層の余剰Partitioning Reagentを除去

* キットによって除去量、方法は異なる

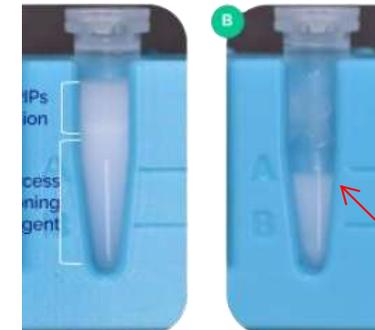
図参照

Best Practices

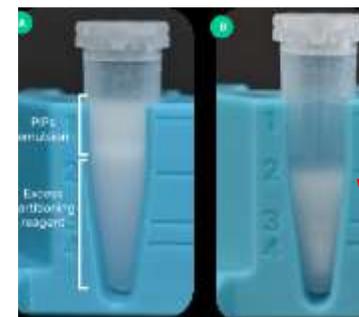
- 適切なピペット操作で下層を除去する



T2: 130 μ Lを除去



T10: "A" まで除去



T20: "2" まで除去



T100: 1.5 mLライン
まで除去

C. mRNAの単離

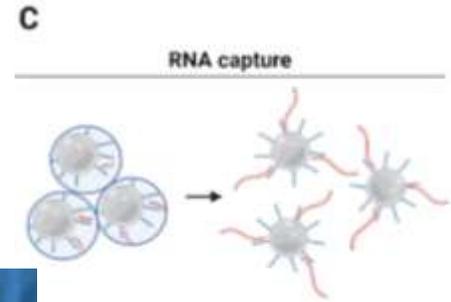
エマルジョンの破壊

7. Breaking Buffer (透明) と De-Partitioning Reagent (ピンク色) をチューブの壁を伝わらせて添加し転倒混和
8. 明確に2層に分離していることを確認 図A参照
9. ピペットチップ/シリンジ* でピンク色の下層を除去

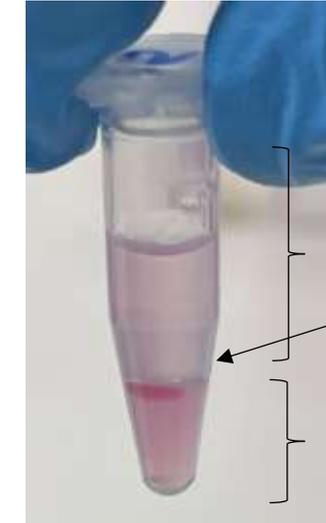
* キットによって異なる

Best Practices

- ボルテックスしない
- エマルジョンの破壊が不十分な場合は、各キットのガイドに従った量の De-Partitioning Reagent を追加し、転倒混和から繰り返す 図B参照
- 下層の液体は完全に除去する
- 破壊されていないエマルジョンや下層液は、逆転写を阻害し、cDNAの収量や断片長に悪影響を与える



図A



PIP+細胞溶液: 保持

“ドロップレット”: 廃棄

下層“Pink waste”: 廃棄

図B



- 分離が不明瞭でグラデーション状に見える
- 上層が濁っている

C. mRNAの単離

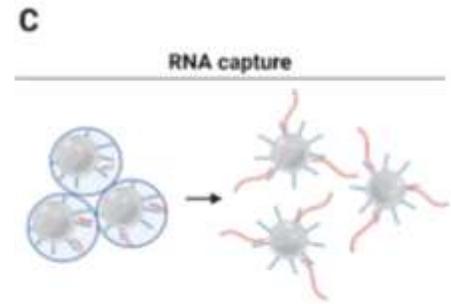
洗浄

10. PIPチューブのPIPを、分注・予冷したwash bufferチューブに移す
11. ボルテックス後、遠心しPIPをペレット化する
12. 上清を各キット規定の量まで除去 図参照
13. さらに洗浄ステップを繰り返す

* 液量、洗浄回数はキットによって異なる

Best Practices

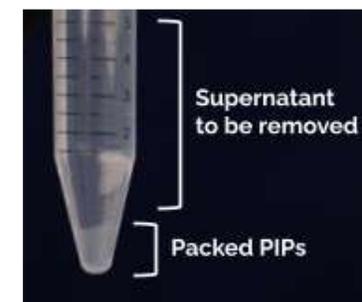
- 一度PIPを移したのち、PIPチューブを軽く遠心し、残ったPIPも完全に回収する
- PIPペレットは細胞ペレットと異なり透明であることに注意、バッファーはペレットの近くで吸引しない



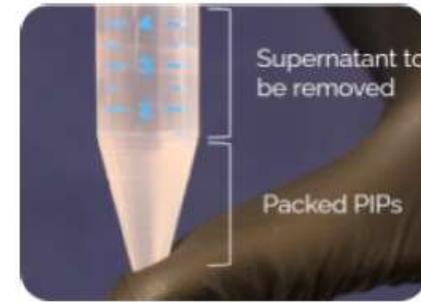
T2: “4”まで除去



T10: “3”まで除去



T20:
1 mLを残し除去



T100:
2 mLを残し除去

C. mRNAの単離

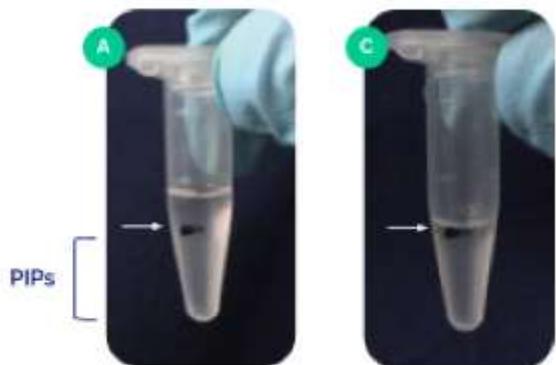
液量のノーマライズ

14. 洗浄後、cDNA合成ステップに進む前に各サンプルの液量を揃える

* キットによって除去量、方法は異なる [図参照](#)



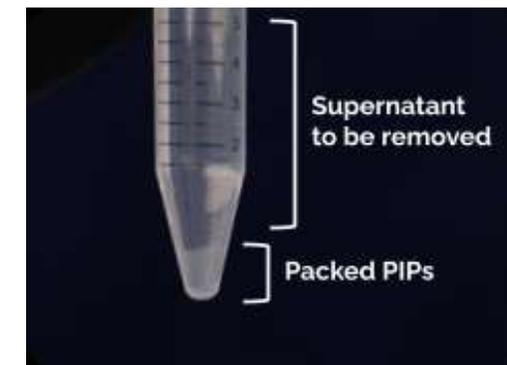
T2: ガイドワイヤーラックを使用



T10: 0.5 mLチューブにマーキング

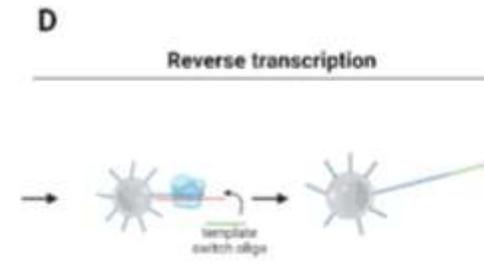
Measurements	How to calculate
Total Mass (mg)	Empty tube mass + PIPs
Empty Tube Mass (mg)	1.5 mL empty tube mass
PIP Solution Volume (μL)	Total mass - Empty tube mass = PIP mass / 1 (equation converts PIP mass to PIP Solution Volume in μL)
Washing Buffer to Remove (μL)	PIP solution volume - 250 μL

T20: PIP溶液の添加前後でチューブ重量測定、除去量を計算



T100: 1 mLを残して除去

D. cDNA合成



15. RT* Enzyme Mix、RT Additive Mix V、TSO*を融解しマスターミックスを作成
16. PIPの入ったチューブに分注し、インキュベーション
 - **T2**: 8連チューブを使用、サーマルサイクラーで反応
 - **T10/T20/T100**: 0.5/1.5mLチューブを使用、PIPseqドライバスで反応
17. インキュベーション後はwashing bufferで洗浄、ノーマライズ

25°C	30分
42°C	90分
85°C	10分
4°C	ホールド



Best Practices

- TSOは温度に敏感なため、氷上で融解



*RT: Reverse Transcription
TSO: Template Switch Oligo

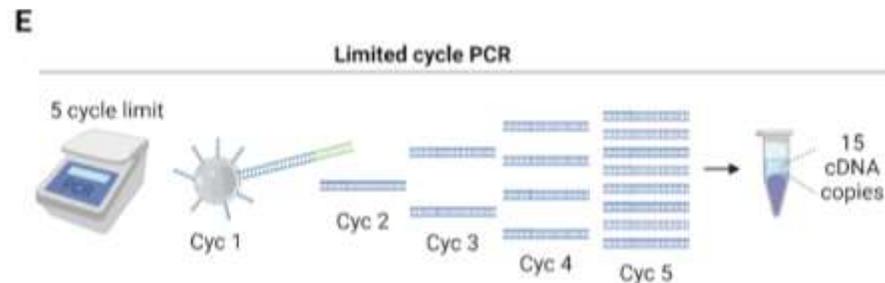
E. 全トランスクリプトーム増幅

- 18. サーマルサイクラーでビーズ上にあるcDNAをPCR増幅
- 19. 増幅されたcDNAを回収しビーズ精製、ビーズ上にあるオリジナルの分子は-80°Cで保存可能

SAFE
STOP

Best Practices

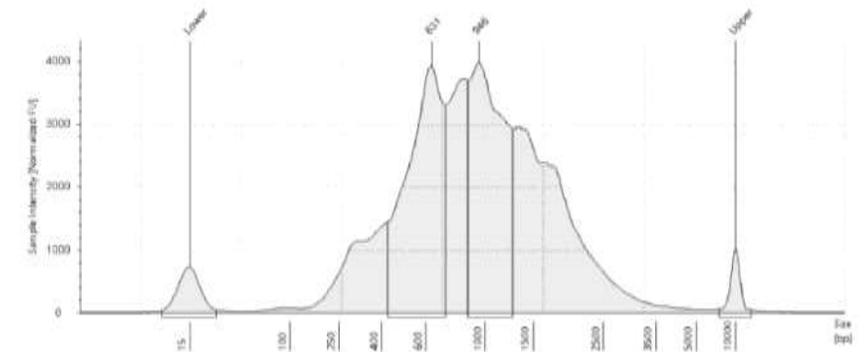
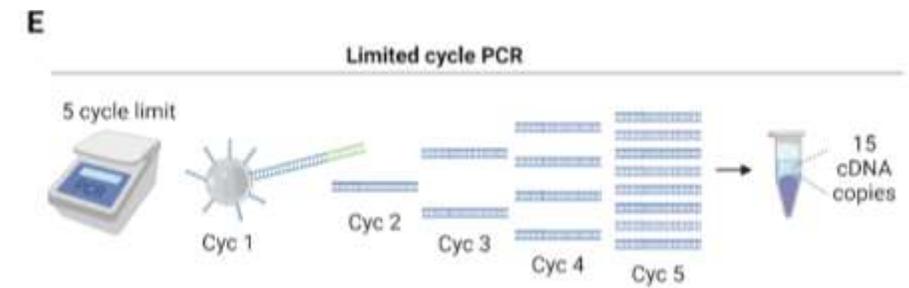
- 生成されるcDNAコピー数を制限するため、サイクル数は5サイクルで固定
- T10以上のキットは8連チューブに分注して反応
- PIPペレットはバックアップとして-80°Cで保存
- 保存したPIPペレットからcDNAの再合成を1度行うことが可能



温度 (°C)	時間	サイクル数
95	3分	x1
98	15秒	x5
69	10分	
72	5分	x1
4	ホールド	

cDNAクオリティチェック(QC)

- ビーズ精製後の残渣をPCR増幅し、収量とサイズ分布を確認する
収量: Qubit High Sensitivity kit (Thermo Fisher Scientific)
サイズ分布: TapeStation High Sensitivity D5000 (Agilent)
 - サイズ分布の確認には5,000 bp対応の消耗品を使用
- 断片長はサンプルタイプや実験条件に大きく依存するが、
平均断片長が500 bpに満たない場合は続行しない



ヒトHEK 293T・マウスNIH 3T3
混合サンプルのcDNAトレース



F. ライブラリー調製

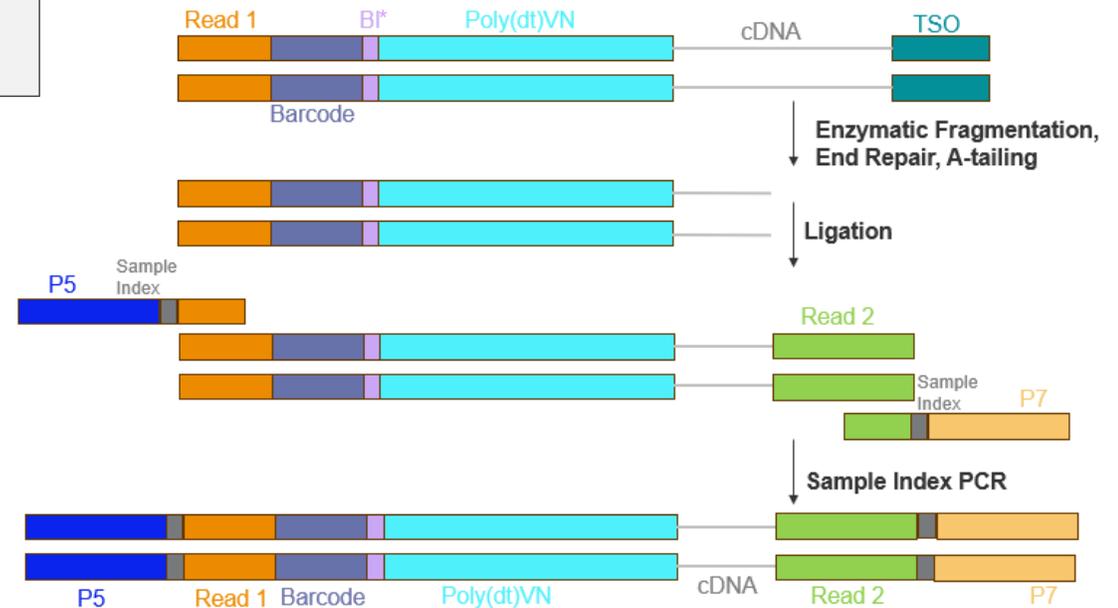
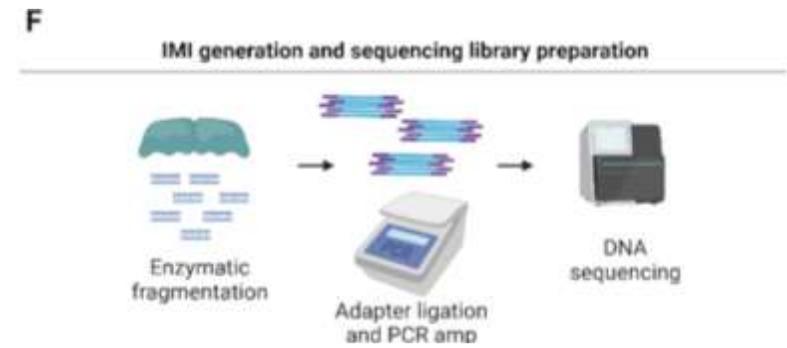
- cDNA QCでクオリティ確認済のWTA*産物を用い、断片化、アダプター付加、増幅を経てインデックス付ライブラリーを調製



CRITICAL: Check orientation of index strip tube to ensure the correct index combination is added and recorded for sequencing.



キット付属のインデックスプライマー(8サンプル分)



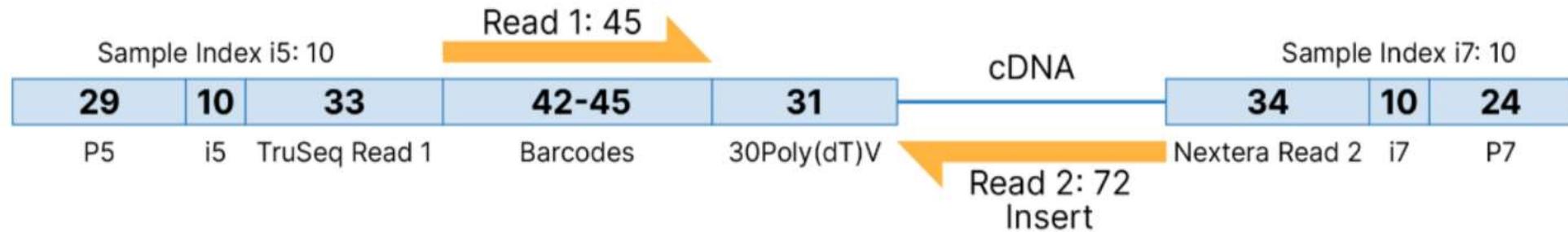
*WTA :whole transcriptome amplification
BI: binning index



シーケンスの設定

3

ライブラリー構造とシーケンス設定



- Read 1はバーコード情報(セルバーコード、ビニングインデックス)を含み、**45サイクル**のシーケンスが必要
- Read 2はcDNA配列を含み、**最小72サイクル**をシーケンス
- 100サイクルキット(Additional cycles分を含め、最大138サイクルの試薬を含む)を使用する場合、以下の通り設定
 - Read 1: 45 cycles + Index 1 (i7): 10 cycles + Index 2 (i5): 10 cycles + Read 2: 72 cycles = 合計137サイクル
 - 各シーケンシング試薬キットのAdditional cyclesを含む利用可能な最大サイクル数は「[How many cycles of SBS chemistry are in my kit? | Illumina Knowledge](#)」を参照
- シーケンス設定時またはシーケンス後に、**クオリティトリミング**や**アダプタートリミング**を使用しない(BCLからfastq.gzファイルに変換する際、アダプタートリミングをしないこと)
 - トリミングを行うとバーコードエラーが発生し、データの再解析が必要となる

シーケンスの推奨条件

- 実験条件ごとに、ライブラリーをすべてプールしてシーケンスすることを推奨
 - バッチ効果を最小限に抑え、インデックスによるカラーバランスの問題を防ぐ
- 最終的なライブラリーロードプールに1%以上のPhiXを添加
 - **NovaSeq™ Xシリーズを使用する場合は、PhiXを少なくとも2%以上添加することを推奨**
- 本ライブラリーをシーケンスする際の基準ライブラリー濃度の例(必要に応じて最適化が必要)
 - NextSeq™ 500/550: 1.6 pM(≥ 1% PhiX)
 - NextSeq 1000/2000: 550 pM(≥ 1% PhiX)
 - NovaSeq 6000: 210 pM(≥ 1% PhiX) * プール濃度1.05 nMに相当
 - NovaSeq X/X Plus: 190~200 pM(≥ 2% PhiX)
- その他の条件やデータ解析の詳細について、実験前に「[TRAINING PACKET: Illumina Single Cell 3' RNA Prep](#)」を参照することを推奨

1ランでシーケンス可能なサンプル数の目安

シーケンサー	NextSeq 550		NextSeq 1000/2000				NovaSeq 6000				NovaSeq X/X Plus		
シーケンスキット	Mid	High	P1	P2	P3*1	P4*1	SP	S1	S2	S4	1.5B	10B	25B
フローセル当たりのリード数	130M	400M	100M	400M	1.2B	1.8B	800M	1.6B	4.1B	10B	1.6B	10B	26B
T2 インプット細胞(5,000)あたり 20,000リード取得時	3	10	2	10	30	45	20	40	102	250*2	40	250*2	650*2
T10 インプット細胞(17,000)あたり 20,000リード取得時	-	2	-	2	6	9	4	8	20	50	8	50	130*2
T20 インプット細胞(40,000)あたり 20,000リード取得時	-	1	-	1	3	4	2	4	10	25	4	25	65
T100 インプット細胞(200,000)あたり 10,000リード取得時	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5	-	5	13

1. P3およびP4フローセルはNextSeq 2000システムでのみ使用可能
2. イルミナのSingle Cell Unique Dual Indexesは、96サンプルに対して96インデックスを提供。個別のレーンローディングにより、フローセルあたり96サンプル以上の実行が可能。
NovaSeq 6000システムでの個別レーンローディングにはNovaSeq 6000 Xpワークフローの使用が必要

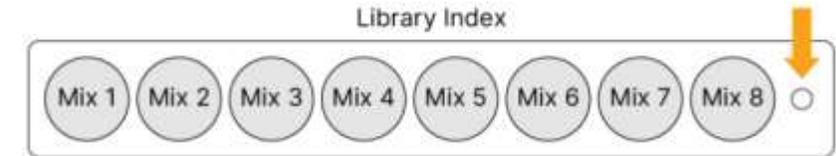
Index Color Balanceの考慮事項 (1/3)

- 複数検体をプールしてシーケンスする場合は、ライブラリー調整を始める前に適切なインデックスの組み合わせを計画する
 - シーケンサーによってガイドラインが異なるため、「[Index Adapters Pooling Guide](#)」でColor Balanceの推奨を確認
 - 例1) NextSeq 500/550, NextSeq 1000/2000 Standard-SBS, NovaSeq 6000の場合
インデックスリードの各サイクルで、赤/青 (A・C) もしくは緑 (A・T) のいずれかのチャンネル(できれば両方)にシグナルが存在するようにする
 - 例2) NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS™, NovaSeq X/X Plusの場合
インデックスリードの各サイクルで、緑 (C・T) と青 (A・C) の両方のチャンネルにシグナルが存在するようにする。難しい場合は、少なくとも緑のシグナルが存在するよう考慮
 - 「[インデックスカラーバランスのベストプラクティス \(XLEAP-SBS 試薬\)](#)」も併せて参照

Index Color Balanceの考慮事項 (2/3)

Illumina Single Cell Prep UDI Mix Strip

- キットには8種類のユニークデュアルインデックスが入ったUDI Mix Stripが付属
 - チューブの向きに注意
 - Mix1～8は、別売りのIllumina Single Cell Unique Dual Indexes (96 Indexes, 96 Samples) の3列目と同じ配列なので、組み合わせての使用は不可
- [Illumina Single Cell Prep UDI Mix Strip](#)を参照
 - 使用するシーケンサー・キットに応じて、推奨組み合わせより選択



Well	Index Name
Mix 1	SCUDP0017
Mix 2	SCUDP0018
Mix 3	SCUDP0019
Mix 4	SCUDP0020
Mix 5	SCUDP0021
Mix 6	SCUDP0022
Mix 7	SCUDP0023
Mix 8	SCUDP0024

Index Color Balanceの考慮事項 (3/3)

ILLUMINA Single Cell Unique Dual Indexes (96 Indexes, 96 Samples)

- 別売のILLUMINA Single Cell Unique Dual Indexes (96 Indexes, 96 Samples) を使用、特に2~9サンプルのLow-plexプーリングでのシーケンスを行う場合は、使用できない組み合わせが存在
- [ILLUMINA Single Cell Unique Dual Indexes \(96 Indexes, 96 Samples\)](#) を参照
 - 使用するシーケンサー・キットに応じて、推奨組み合わせより選択

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SCUDP 0001	SCUDP 0009	SCUDP 0017	SCUDP 0025	SCUDP 0033	SCUDP 0041	SCUDP 0049	SCUDP 0057	SCUDP 0065	SCUDP 0073V3	SCUDP 0081	SCUDP 0089
B	SCUDP 0002	SCUDP 0010	SCUDP 0018	SCUDP 0026	SCUDP 0034	SCUDP 0042	SCUDP 0050	SCUDP 0058	SCUDP 0066	SCUDP 0074V3	SCUDP 0082	SCUDP 0090
C	SCUDP 0003V3	SCUDP 0011	SCUDP 0019	SCUDP 0027	SCUDP 0035	SCUDP 0043	SCUDP 0051	SCUDP 0059	SCUDP 0067	SCUDP 0075V3	SCUDP 0083	SCUDP 0091
D	SCUDP 0004	SCUDP 0012	SCUDP 0020	SCUDP 0028	SCUDP 0036	SCUDP 0044	SCUDP 0052	SCUDP 0060	SCUDP 0068	SCUDP 0076V3	SCUDP 0084V3	SCUDP 0092
E	SCUDP 0005V3	SCUDP 0013	SCUDP 0021	SCUDP 0029	SCUDP 0037	SCUDP 0045	SCUDP 0053V3	SCUDP 0061	SCUDP 0069V3	SCUDP 0077	SCUDP 0085	SCUDP 0093
F	SCUDP 0006	SCUDP 0014	SCUDP 0022	SCUDP 0030	SCUDP 0038	SCUDP 0046V3	SCUDP 0054V3	SCUDP 0062	SCUDP 0070V3	SCUDP 0078	SCUDP 0086	SCUDP 0094
G	SCUDP 0007	SCUDP 0015	SCUDP 0023	SCUDP 0031	SCUDP 0039	SCUDP 0047	SCUDP 0055V3	SCUDP 0063	SCUDP 0071V3	SCUDP 0079	SCUDP 0087	SCUDP 0095
H	SCUDP 0008	SCUDP 0016	SCUDP 0024	SCUDP 0032	SCUDP 0040	SCUDP 0048	SCUDP 0056V3	SCUDP 0064	SCUDP 0072V3	SCUDP 0080	SCUDP 0088	SCUDP 0096



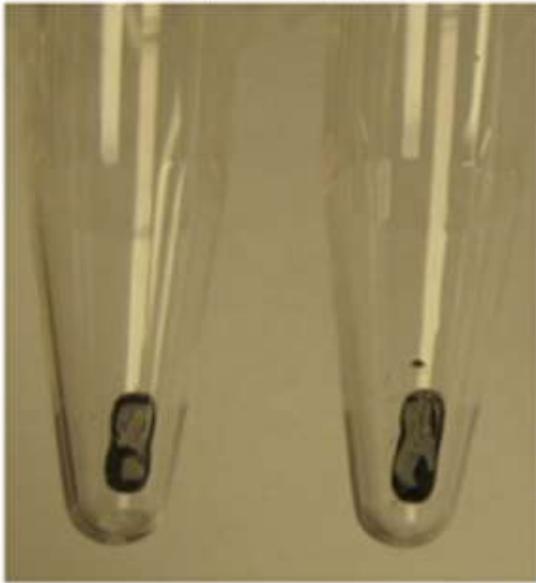
トラブルシューティング

4

ビーズ精製時の注意事項

- 残留エタノールを除去するため風乾: 磁気ビーズペレットにわずかに光沢が残った時点ですぐに再懸濁する
 - 磁気ビーズペレットの光沢が失われると、すぐにひび割れ(過剰乾燥)する可能性がある
- 風乾ステップは通常、0.2mLストリップチューブ、0.5 mLチューブでは2分程度、1.5 mlチューブでは3分程度
- 過剰に乾燥したビーズペレットは、溶出効率が大幅に低下する可能性がある

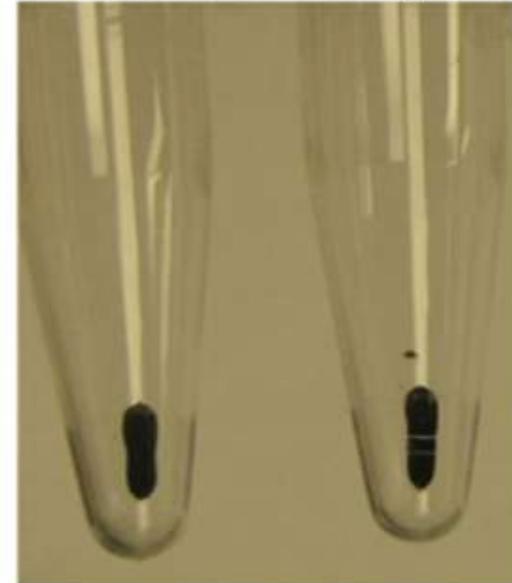
Shiny wet pellet



Matte dry pellet



Cracked overdried pellet



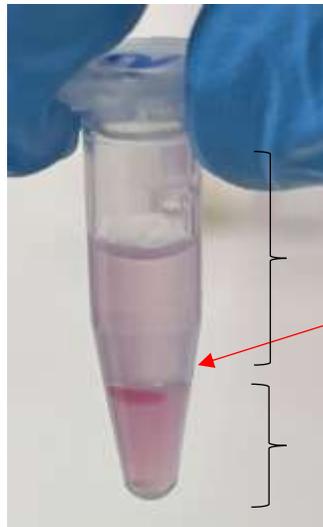
Best Practices

磁気ビーズが乾燥しすぎた場合

1. IDTEバッファーに再懸濁
2. マグネットスタンドから取り出して5分間インキュベーション
3. インキュベーション中、約30秒ごとにピペットでビーズを上下に混合

これにより、cDNAを捕捉している可能性のあるペレットを分散させることができる

不完全なエマルジョンの破壊



PIP+細胞溶液: 保持

“ドロップレット”: 廃棄

下層”Pink waste”: 廃棄



- 分離が不明瞭でグラデーション状に見える
- 上層が濁っている

Best Practices

De-partitioning Reagent(ピンク色)を加えた際に、しっかりと転倒混和しないと、エマルジョンの破壊が不完全となり、収量が低下する

ピンク色の下層とPIPを含む上部の水層との間に明瞭な境界が見られない場合は、De-partitioning Reagentを追加し、転倒混和するステップを繰り返す

PIPキャリーオーバー



Best Practices

cDNA単離中にPIPビーズがキャリーオーバーし、磁性ビーズ精製時に混入すると、磁性ビーズペレットの膨張を引き起こし、上清の吸引が困難になるため、PIPを吸引しないようにする

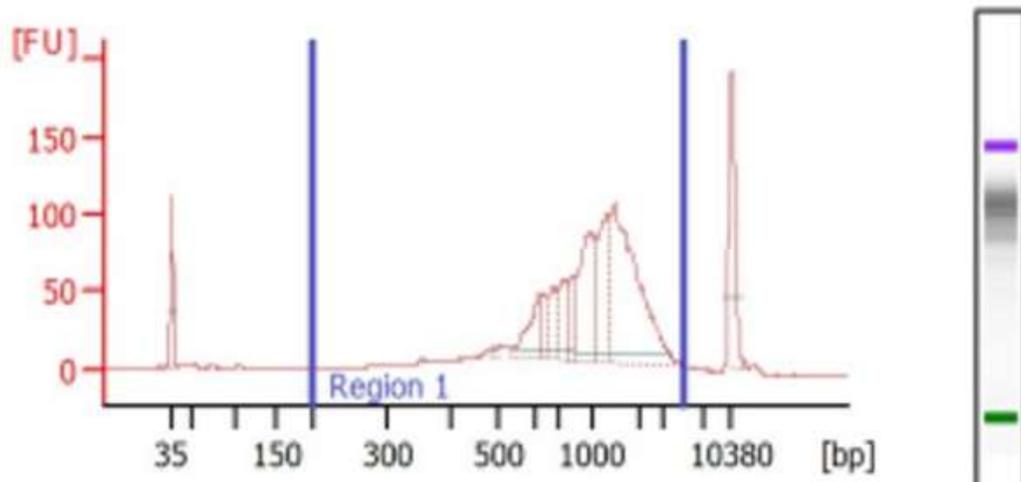
cDNA QC不合格

- cDNA平均長が500 bpに満たない場合は、ライブラリー調製に進むことを推奨しない

➤ トラブルシューティングが必要

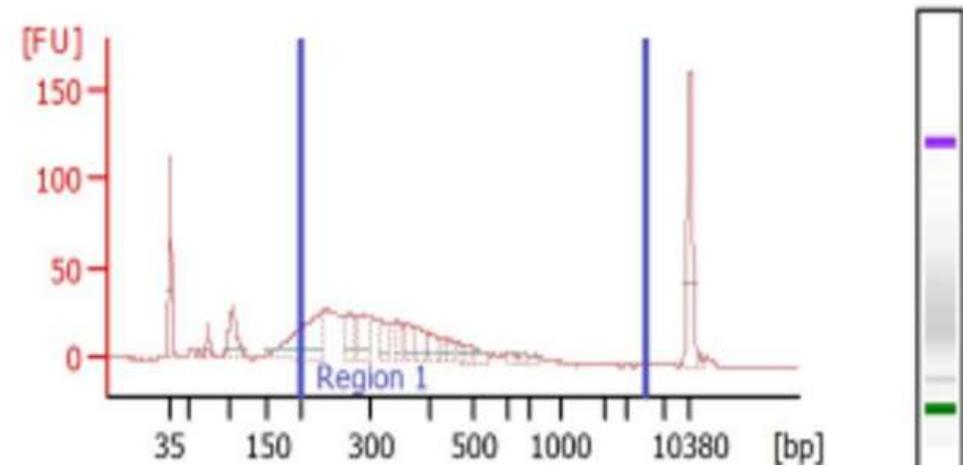
事例) 異なる部位のリンパ節サンプルを同じサンプル調製法で処理したところ、鼠径部サンプルは良好なcDNAトレースを示したが、腸間膜サンプルでは分解が見られた

→ 腸間膜サンプルは脂肪組織が多く、RNase活性が高いことが原因と考えられた
調製時にRNase inhibitorを追加し、処理法を最適化



Good quality cDNA trace

鼠径リンパ節サンプル



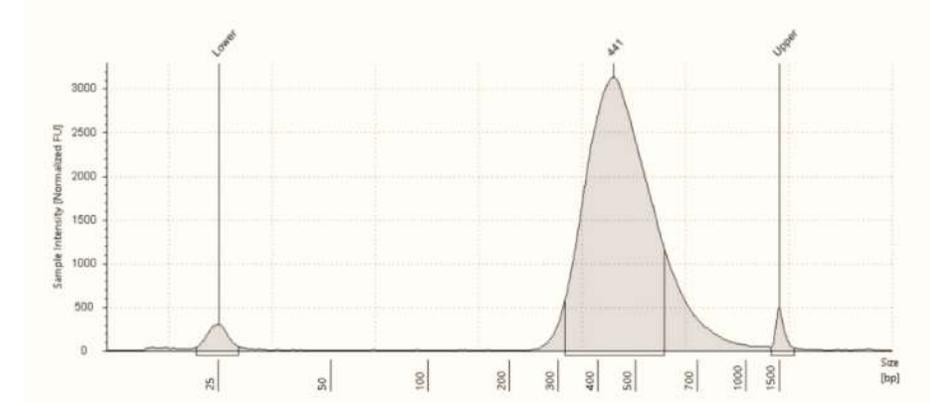
Degraded cDNA trace

腸間膜リンパ節サンプル

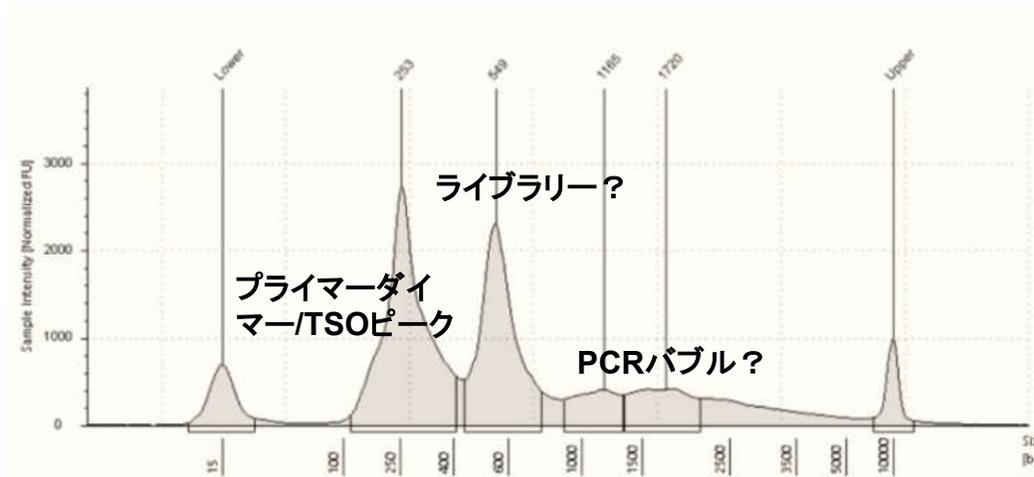
ライブラリーQC不合格

- 低品質ライブラリーの多くは低品質cDNAを用いたことに起因
- cDNA QC結果も併せたトラブルシューティングが必要
- QCパスしたcDNAを用いた場合は、ライブラリー調製に問題がある可能性がある

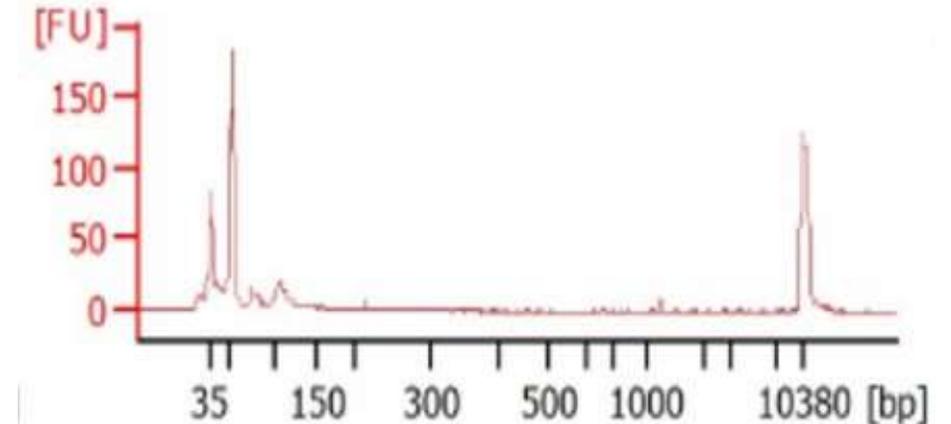
→ SEA kit*を用い-80°C保存のPIPペレットからcDNAを再合成可能(Replay)



良好なライブラリーサイズ分布



低品質ライブラリー



ライブラリー調製の失敗

*SEA kit: Illumina Single Cell Supplemental Enrichment and Amplification Kit

ライブラリーQC不合格

Replay

- cDNA QCをパスしたサンプルを用いたにもかかわらずライブラリー作製に失敗した場合、1回のみ、保存したPIPからcDNAの再合成を行うことが可能
 - プロトコール: [PIPSeq Replay User Guide](#)
 - 購入が必要なオプションキット:
 - (1) Illumina Single Cell Supplemental Enrichment and Amplification (SEA) Kit (Cat# 20132794)
 - (2) Illumina Single Cell Library Prep (Cat# 20132789)

1. WTAマスターミックスをサンプルチューブに加え、サーマルサイクラーで反応、ビーズ上にあるcDNAをPCR増幅
2. 元のプロトコール通り、増幅cDNAの回収、ビーズ精製、ライブラリー調製に進む

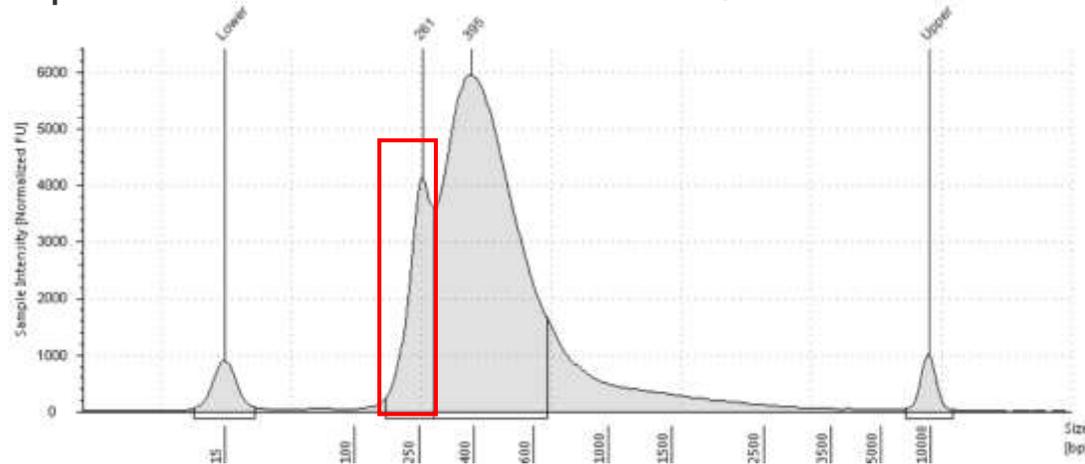
Best Practices

元の増幅プログラムよりもPCRが1サイクル少なくなっていることに注意

温度 (°C)	時間	サイクル数
95	3 min	x1
98	15 sec	x4
69	10 min	
72	5 min	x1
4	hold	

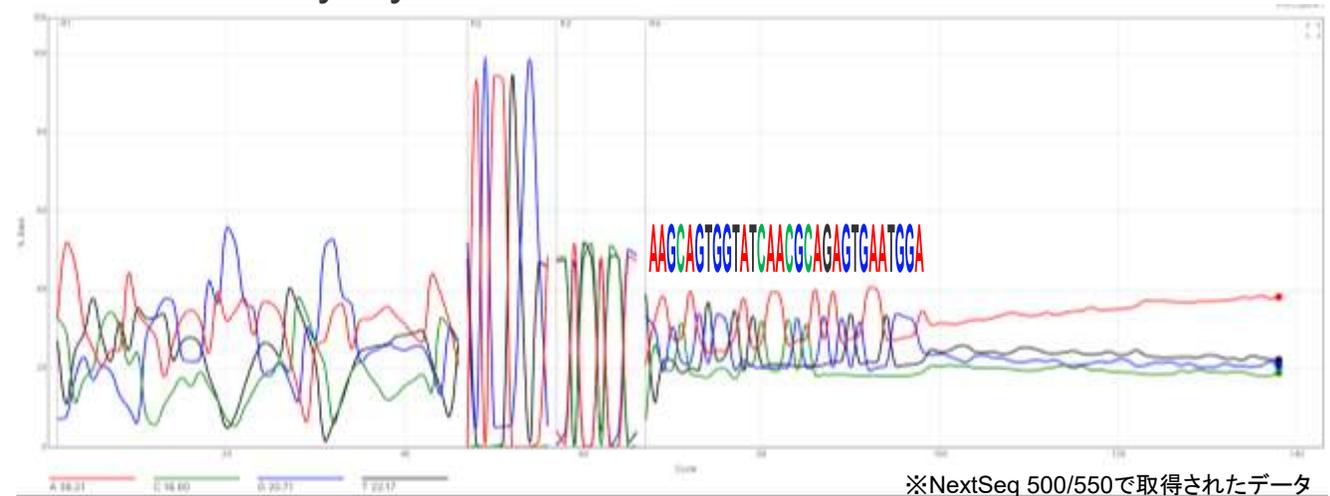
Read 2の先頭に見られるTSO配列

TapeStationでのライブラリーQC結果



**GSM8951967: PBMC*, Fluent V, sample F5A;
Homo sapiens; RNA-Seq (SRR33305141)
PIPSeq V5.0 (Latest version)**

SAV*のData by Cycle Chartでの%Base



※NextSeq 500/550で取得されたデータ

```
>gn|SRA|SRR33305141.11.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:19092:1051 Biological (Biological)
AAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGATGNCCCAACTAAATACTATTGTATGGCCACCATAATTAC
>gn|SRA|SRR33305141.33.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:21579:1069 Biological (Biological)
AAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGATCNCAGCTAGGAATAATGGGGTAGGACCGCGTTCTATTT
>gn|SRA|SRR33305141.57.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:20499:1086 Biological (Biological)
AAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGATCNGCCTCTTCTACACATTGGGCGAGGCCTATATTACGG
>gn|SRA|SRR33305141.78.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:24649:1086 Biological (Biological)
TAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGAGTNACGCGCATGAATGGATGGACGAGATTCCCCTGTGCC
>gn|SRA|SRR33305141.83.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:25472:1086 Biological (Biological)
AAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGGTANGAGTCAAATCTTGATGGGGTGGCTATAAAAAATGTAAA
>gn|SRA|SRR33305141.93.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:19315:1103 Biological (Biological)
AAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGAGCNTAGGCAACAGAATGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAA
>gn|SRA|SRR33305141.97.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:19761:1103 Biological (Biological)
GAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGAGANGCAGAGATCCAAAAACAAGTATATGACCAGAGTTAGA
>gn|SRA|SRR33305141.107.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:21305:1103 Biological (Biological)
AAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGACTNACTCCTCACACCAATTGGACCAATCTATCACCCCTA
>gn|SRA|SRR33305141.132.2VH00738:294:2225K7CNX:1:1101:24391:1103 Biological (Biological)
CAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGATANACGATGCCGACCGCGGTGCGGCGCGTTATCCCAT
```

*SAV: Sequencing Analysis Viewer, PBMC: peripheral blood mononuclear cells



その他資料

5

製品関連文書リンク

キット共通の注意事項が記載された資料(必読)

- [TRAINING PACKET: Illumina Single Cell 3' RNA Prep](#)

T2、T10、T20、T100それぞれのProduct Documentation(使用キットの文書を必読)

- [Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T2, Product Documentation](#)
- [Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T10, Product Documentation](#)
- [Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T20, Product Documentation](#)
- [Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T100, Product Documentation](#)

細胞用のDSP*メタノール固定プロトコル

- [DSP-Methanol Fixation for Cells, Protocol Instructions](#)

細胞核用のDSPメタノール固定プロトコル

- [DSP-Methanol Fixation for Nuclei, Protocol Instructions](#)

細胞核抽出キットであるIllumina Single Cell Nuclei Isolation KitのProduct Documentation

- [Illumina Single Cell Nuclei Isolation, Product Documentation](#)

Illumina Single Cell RNA Prep Knowledge

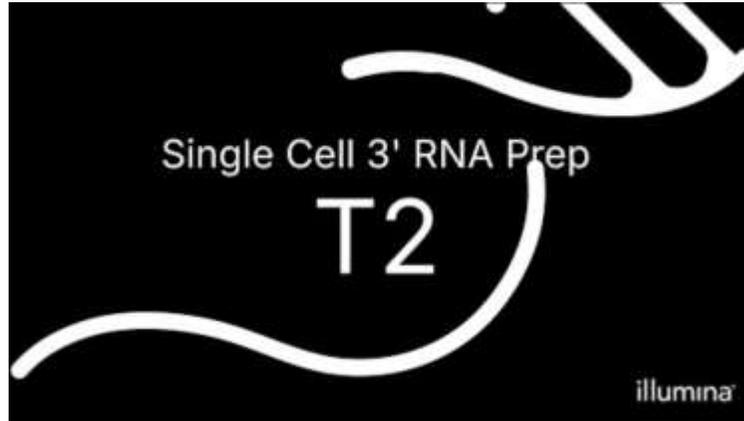
- [Illumina Single Cell RNA Prep | Illumina Knowledge](#)

*DSP: dithiobis(succinimidyl propionate)

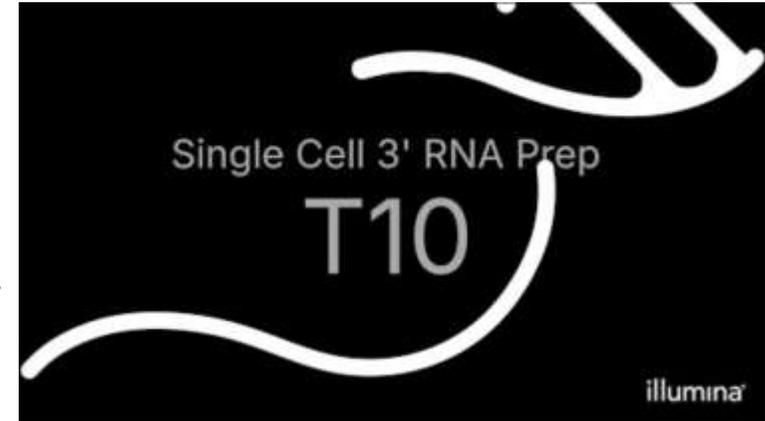
製品動画リンク

ウェットパートの動画(使用するキットに対応する動画の視聴を推奨)

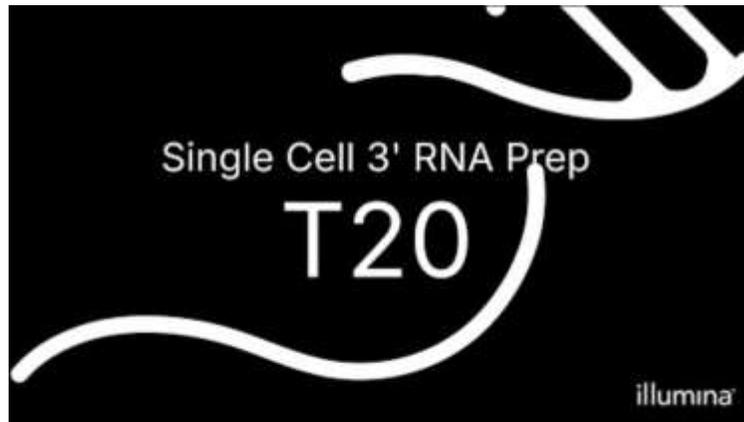
[Illumina Single Cell
3' RNA Prep, T2
Workflow - YouTube](#)



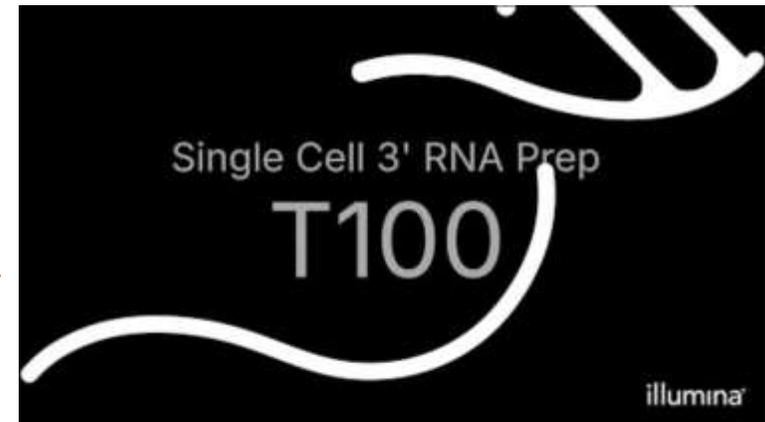
[Illumina Single Cell
3' RNA Prep, T10
Workflow - YouTube](#)



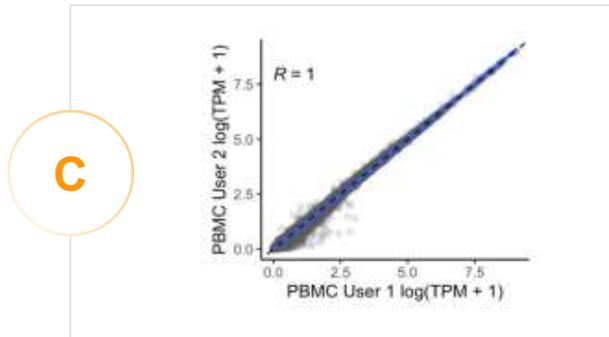
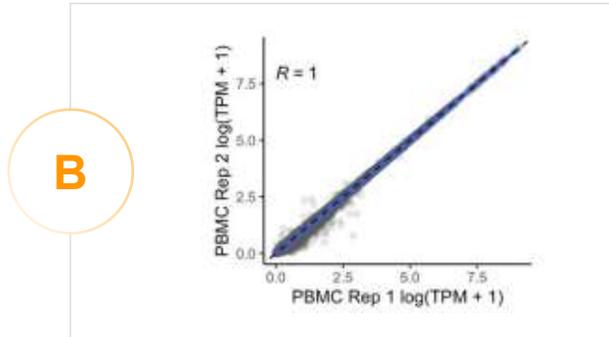
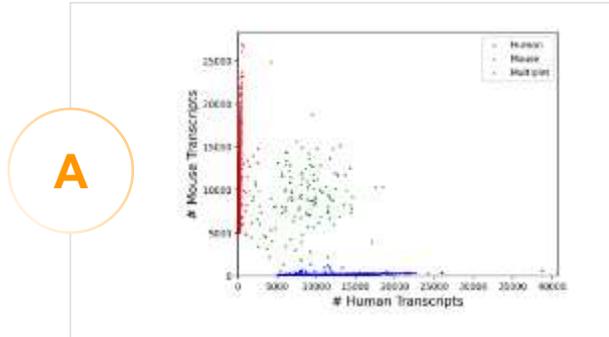
[Illumina Single Cell
3' RNA Prep, T20
Workflow - YouTube](#)



[Illumina Single Cell
3' RNA Prep, T100
Workflow - YouTube](#)



パフォーマンスと仕様



A

ヒト/マウス(HEK 293T / NIH 3T3の混合細胞)の分離から、低いマルチプレット率(~2%)を確認

B

PBMCを用いたIllumina Single Cell 3' RNA Prepの繰り返し実験において、細胞あたりの検出遺伝子に非常に高い再現性を確認

B: 同一ユーザー内再現性

C: 2名の異なるユーザー間再現性

C

キット構成	T2	T10	T20	T100
細胞アウトプット (反応ごと)	2,000細胞まで	10,000細胞まで	20,000細胞まで	100,000細胞まで
利用例	<ul style="list-style-type: none"> 培養細胞 フローソーティング 薬剤試験 	<ul style="list-style-type: none"> 複雑な組織の解析 臨床サンプルのバリデーション Cell atlas 		<ul style="list-style-type: none"> 神経科学 免疫細胞 サンプルマルチプレックス
キットごとの反応数	8	8	4	2
細胞捕捉率	85%まで			
マルチプレット率	5%未満から8%程度			
細胞捕捉の所要時間	ハンズオン10分			
ライブラリー調製時間	2日			
仕様*	遺伝子/細胞:1,800以上、転写物/細胞:4,000以上 (細胞あたり2万リード取得した場合)			

* Validated with PBMCs

ウェビナーのご紹介



イルミナウェビナー

手ごろな価格で
あらゆる規模に対応、
新しいイルミナシングルセル
ソリューションのご紹介

日時

2025/04/24

03:00 PM

Location

Japan

Asia

Presenter

イルミナ株式会社

プロダクトマーケティングマネージャー

藤原 鈴子

Topic

Cellular & molecular biology, Neuroscience

[ウェビナーを見る](#)

[\[ウェビナー視聴ページ\]手ごろな価格であらゆる規模に対応、新しいイルミナシングルセルソリューションのご紹介](#)

Thank you

Yoko TAKATA

Technical Applications Scientist, Illumina KK

techsupport@illumina.com



Appendix

Agenda

- 01 生細胞・細胞核懸濁液調製に関するベストプラクティス

- 02 DSPメタノール固定法

- 03 Supplemental Enrichment and Amplification (SEA) kit
による拡張アプリケーション

- 04 FACS (Fluorescence-activated cell sorting) を使用した
手法

- 05 論文紹介

生細胞・細胞核懸濁液調製 に関するベストプラクティス

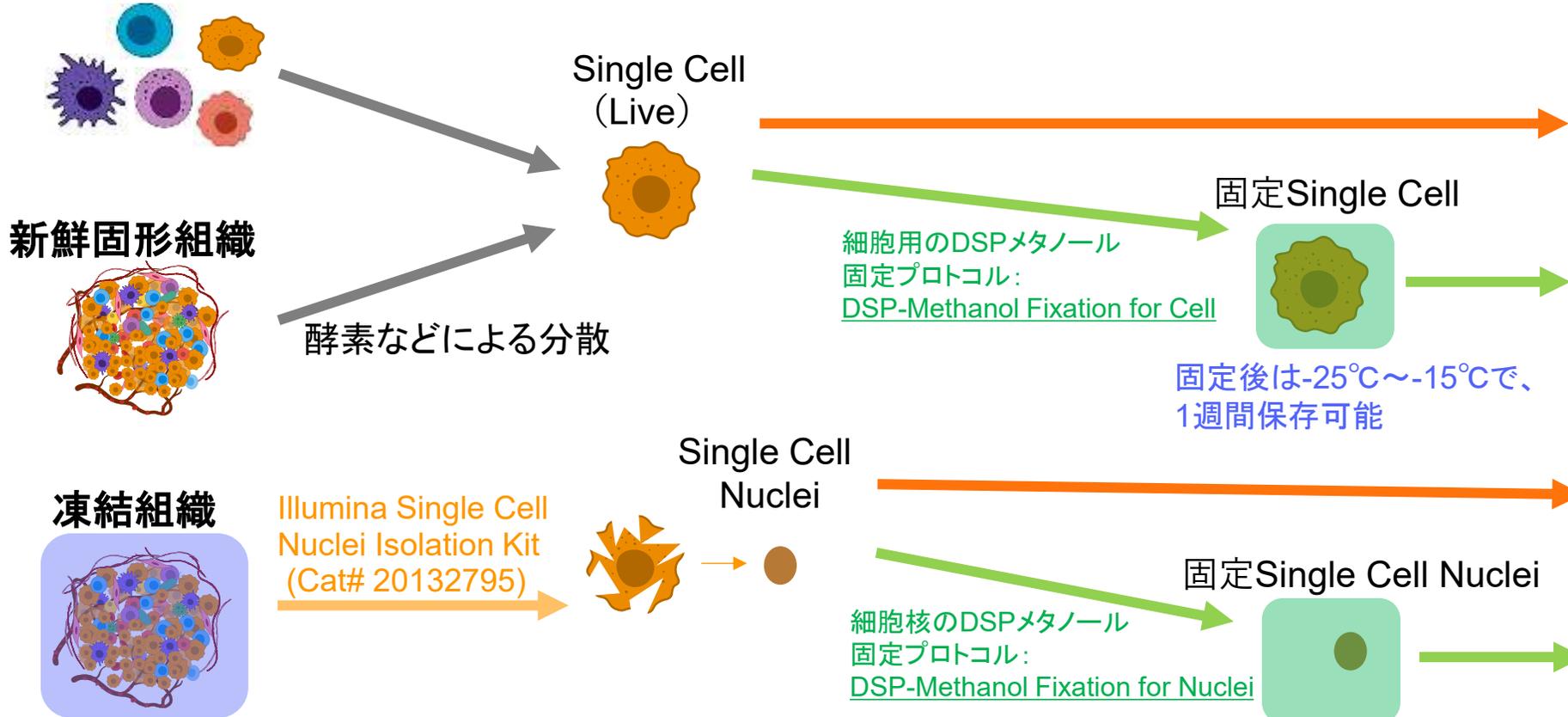
1

Illumina Single Cell 3' RNA Prepの対応サンプル



凍結保存細胞、新鮮Bloodサンプルなど
Single cell生細胞

*FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded)、ホルマリン固定サンプルには対応していません。
*新鮮固形組織からのSingle cell Suspensionの調製法は、個々のお客様にて最適化ください。



Illumina Single Cell 3' RNA Prep,
T2 (Cat# 20135689)
T10 (Cat# 20135691)
T20 (Cat# 20135692)
T100 (Cat# 20135693)

Clean up済cDNAは
-25°C~-15°Cで最大4週間安定
Clean up済ライブラリーは
-25°C~-15°Cで最大30日間安定

<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1293> より改変

固定後は-25°C~-15°Cで、
2か月保存可能

*DSP: dithiobis(succinimidyl propionate)

生細胞懸濁液の調製のベストプラクティス



- 新鮮な細胞、組織、または凍結保存された細胞から開始する(凍結組織は不可)。
- 作業は迅速に行い、ピペティングと遠心分離は最小限に抑える。ピペティングは必要に応じてワイドボアチップを使用し、ゆっくり穏やかに行う。
- 理想的な細胞懸濁液は、生存率が90%以上で、デブリや凝集体が最小限に抑えられている必要がある。生存率が75%未満の場合は調製に進むことは推奨されず、以下のオプションを検討する。
 - サンプル調製の最適化
 - 生細胞、死細胞のソーティング
 - 死細胞除去キット(Third Party)の使用

イルミナでは、個々の組織の生細胞懸濁液調製ステップに関する製品やキットをご用意しておりません。組織からの生細胞懸濁液調製の際には、既存の論文や確立された手法をご自身で検証し、調製法の最適化をご実施ください。

Third Party製品情報も含めた、全般的なBest Practiceに関する情報は、[TRAINING PACKET Illumina Single Cell 3' RNA Prep](#)をご参照ください。

凍結組織片からの細胞核懸濁液調製のベストプラクティス



Illumina Single Cell Nuclei Isolation Kit (Cat# 20132795)は、凍結した哺乳類組織から細胞核を分離するための試薬セットです。このキットは非哺乳類細胞には推奨しません。また新鮮組織では性能が保証されておりません。このキットには、凍結組織サンプル(最大50-200 mg、組織によって異なる)4つ分から核を分離するのに十分な量が含まれております。

大きな組織は小さなサイズに切り分けてから、重量を測定して等重量ずつ凍結すると、凍結融解サイクルの回数を最小限に抑えることができます。長期保存の場合は、組織を液体窒素で保存してください。核抽出の際には、迅速に、必ず低温環境下で作業を実施してください。

核抽出後には、AO/PI*染色による蛍光染色と自動蛍光細胞計数器の使用を推奨しています。AO/PI染色する際は、核の計数には赤色チャンネル(死細胞)の計数を核のカウントに使用してください。

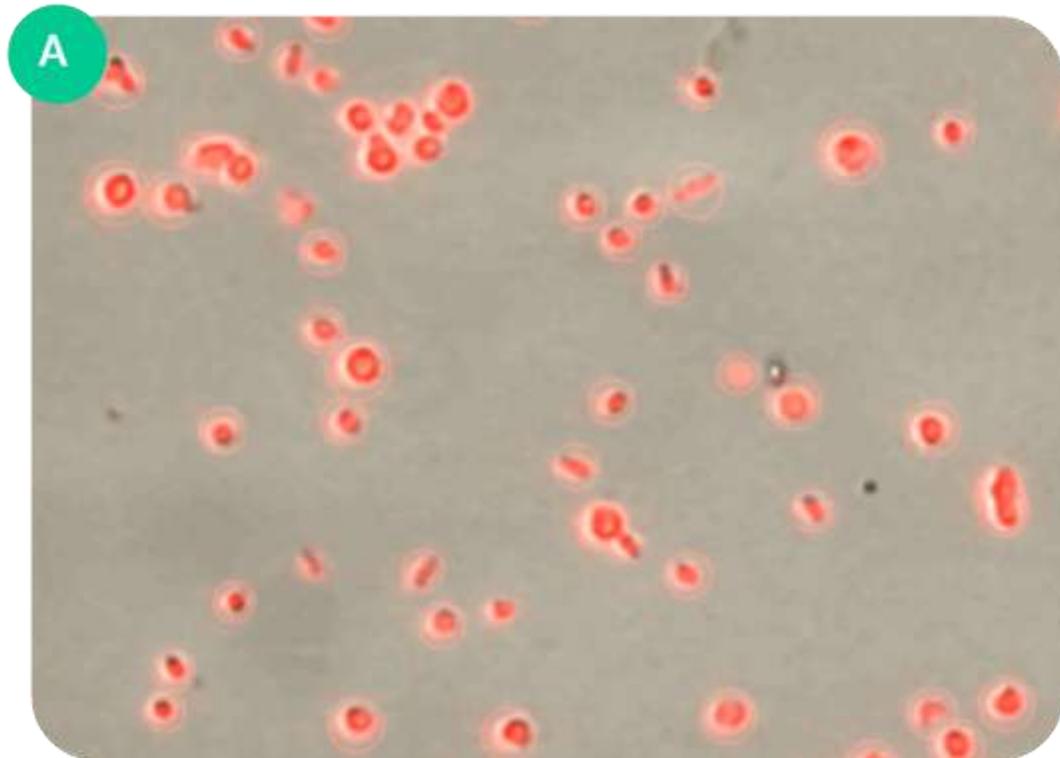
- 1 Reagent Preparation
Total: 15 min
- 2 Nuclei Isolation Process
Total: 40 min
- 3 Tissue Dissociation and Lysis
Total: 20 min
- 4 Nuclei Isolation and Cleanup
Total: 20 min
- 5 Sample QC
Total: 15 min

細胞核抽出のプロトコル: [Illumina Single Cell Nuclei Isolation](#)

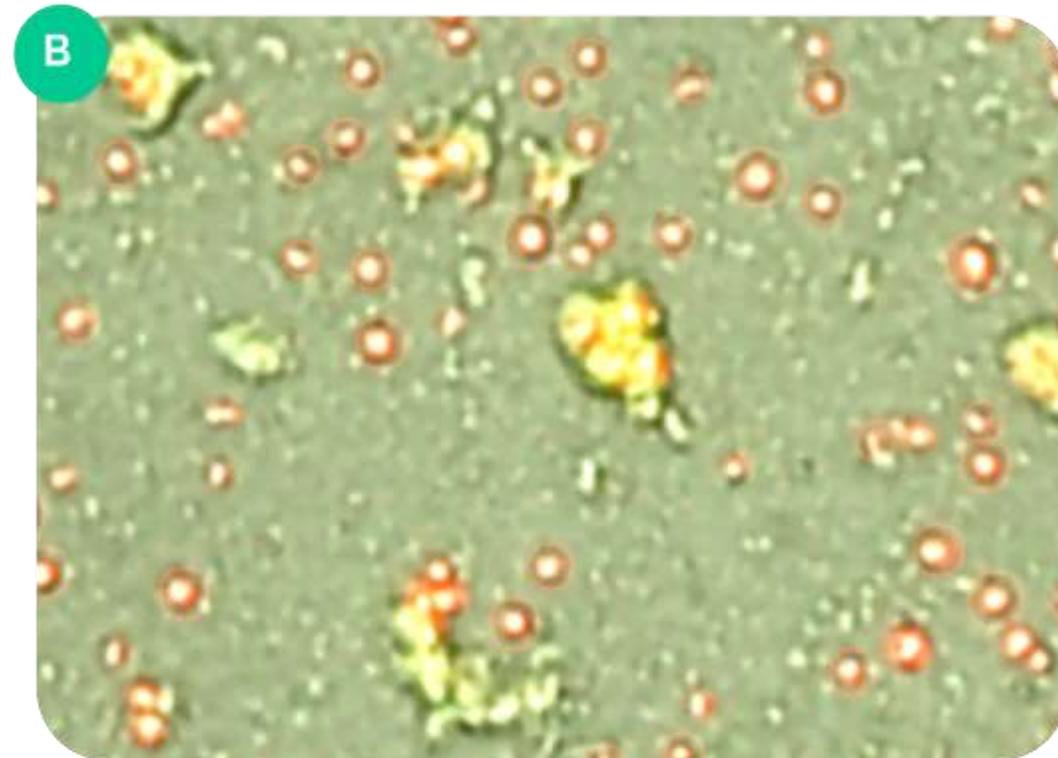


*AO: Acridine Orange, PI: Propidium Iodide

細胞核懸濁液：AO/PI染色例



AO/PI染色後の高品質な核は、主に単一の核(明るい赤色の円形形状で示される)を有す
高品質の核懸濁液では、デブリや凝集体は最小限に抑えられる



AO/PI染色後の低品質な核は、多くのデブリ(緑色の蛍光で示される)や凝集を伴う
デブリの量が多い組織の場合は、デブリの混入を減らすため、インプット量を減らすことを推奨

【重要】実験系に影響する成分



実験系に影響する成分がサンプル懸濁液中に多く含まれている場合は、実験前に洗浄を十分行うことが重要です。

例) PBS 2 mLで少なくとも3回の洗浄、その後Fluent CellまたはNuclei Suspension Buffer 1mLでの洗浄

1. **FBS**(胎児牛血清):最終的な細胞または細胞核の懸濁液中で、FBSは0.1%以下に抑える。FBSが含まれると、cDNAの収量が低下し、断片サイズが小さくなる可能性がある。
2. **カルシウムイオン**:高濃度のカルシウム成分が含まれていないことを確認する。カルシウムイオンが高すぎると、エマルジョンが不安定になり、RNAの結合を妨げる可能性がある。
3. **DNase I**:DNase IがPIPバーコード構造を破壊する可能性があるため、混入は避ける。
4. **BSA**(牛血清アルブミン):BSAの使用は1%以下に抑える必要がある。高濃度のBSAがエマルジョンを壊し、エマルジョン破壊後の際のピンク色の層の除去を妨げ、cDNA収量や断片サイズが低下する可能性がある。
5. **有機溶媒**(例:**DMSO**、**メタノール**など):有機溶媒はエマルジョンの安定性やRNAハイブリダイゼーションに悪影響を与える可能性がある。
6. **高分子量ポリマー添加物**(例:**PVSA**、**DEPC**など):DEPCやPVSAは使用せず、代わりにRNase inhibitorを使用する。これらの添加物はRNAを分解し、解析結果に悪影響を与える可能性がある。

* PBS: phosphate-buffered saline FBS: fetal bovine serum, BSA: bovine serum albumin, DMSO: Dimethyl sulfoxid, PVSA: polyvinyl sulfonic acid, DEPC: diethylpyrocarbonate

DSPメタノール固定法

2

DSPメタノール固定 – 細胞 & 細胞核



本キットは、3,3'-ジチオジプロピオン酸 ジ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル) (DSP) とメタノールを用いて固定された細胞もしくは細胞核を使用することが可能です。この固定により、細胞培養などで長期間の保存や取り扱いの間にスパンが空く場合や細胞が凍結保存されている場合、処理が完了するまで時間がかかる場合などに、RNAの分解を防ぎ、後で解析に使用するための高品質なRNAを保持するのに役立ちます。

DSPメタノール固定法では、タンパク質を変性させ、RNAを安定化させることが主な目的です。DSPは、タンパク質のシステイン残基に結合し、タンパク質をクロスリンクさせて構造を固定します。そのため、FBSやBSAなどのタンパク質成分が懸濁液中に多く含まれている場合は、洗浄してから固定を行う必要があります。これらの成分が固定強度を下げるためです。

細胞用のDSPメタノール固定プロトコル: [DSP-Methanol Fixation for Cell](#)
固定後は -25°C ～ -15°C で、1週間安定です。

細胞核のDSPメタノール固定プロトコル: [DSP-Methanol Fixation for Nuclei](#)
固定後は -25°C ～ -15°C で、2ヶ月間安定です。

Supplemental Enrichment and Amplification (SEA) kit による拡張アプリケーション

3

Supplemental Enrichment and Amplification kit (SEA)

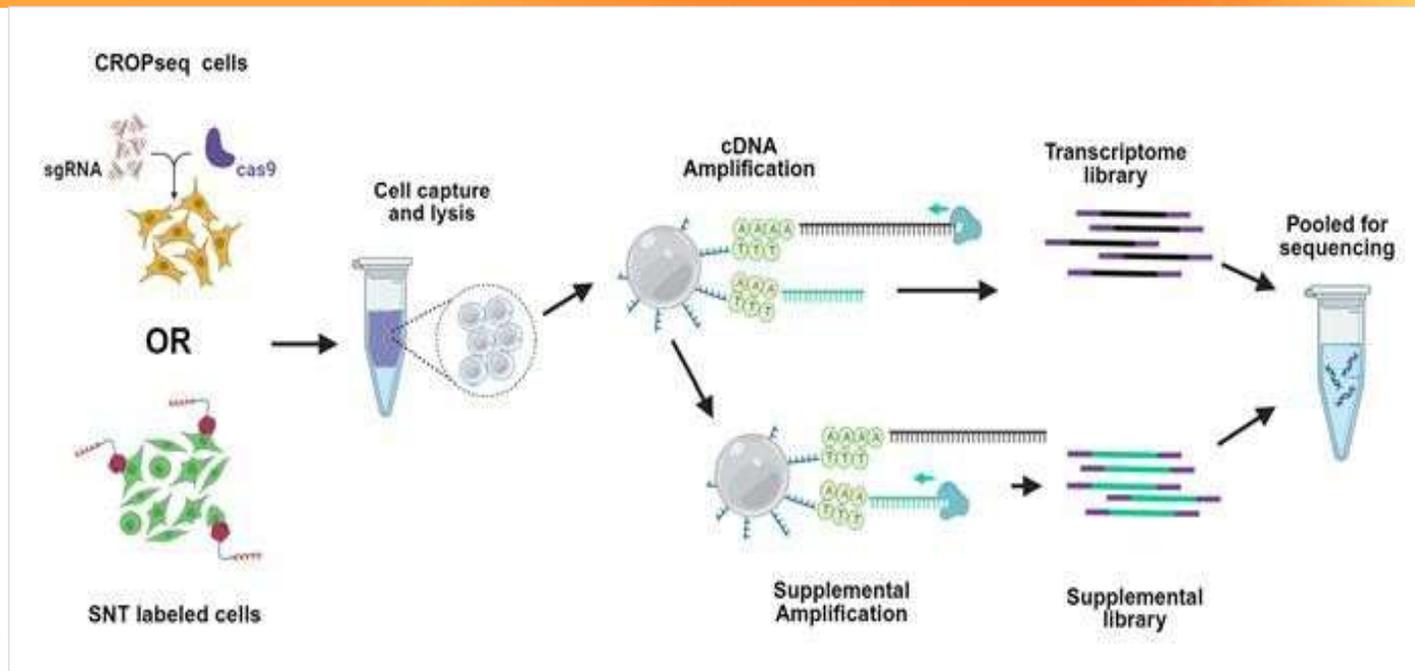


SEA kit



複数アプリケーション対応:

- ⊙ Synthetic Nucleotide Tags (SNTs、合成ヌクレオチドタグ)
- ⊙ Antibody DNA Tags (ADT、抗体DNAタグ)でのCITE-Seq
- ⊙ Hash Tag Oligos (HTO)を用いたCell Hashing
- ⊙ CRISPR guide RNAスクリーニング
- ⊙ CROP-seq PolyA guide RNAレポーター発現
- ⊙ CRISPRノックアウト、阻害、活性化
- ⊙ カスタムアンプリコンターゲット
- ⊙ Lab developed workflows



各3' RNA Prepキット組み合わせた時のSEA kit 1キットあたりの最大アッセイ数

	T2	T10	T20	T100
SNTs(ADTおよびHTO)のターゲットエンリッチメント	25	14	8	2
guide RNA tagのターゲットエンリッチメント	36	19	10	2
cDNAの回収もしくはターゲットエンリッチメント	31	18	9	2

*CITE-Seq: Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing, CROP-seq: CRISPR droplet sequencing

CRISPRスクリーニング – CROP-seq



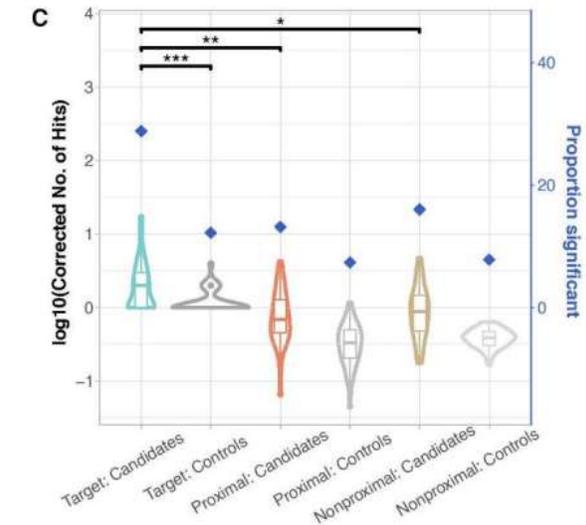
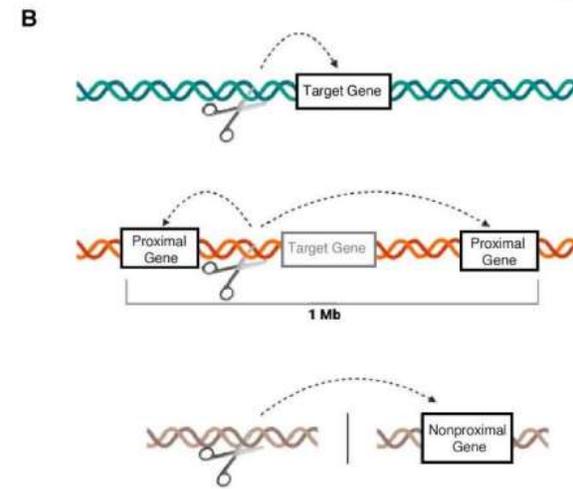
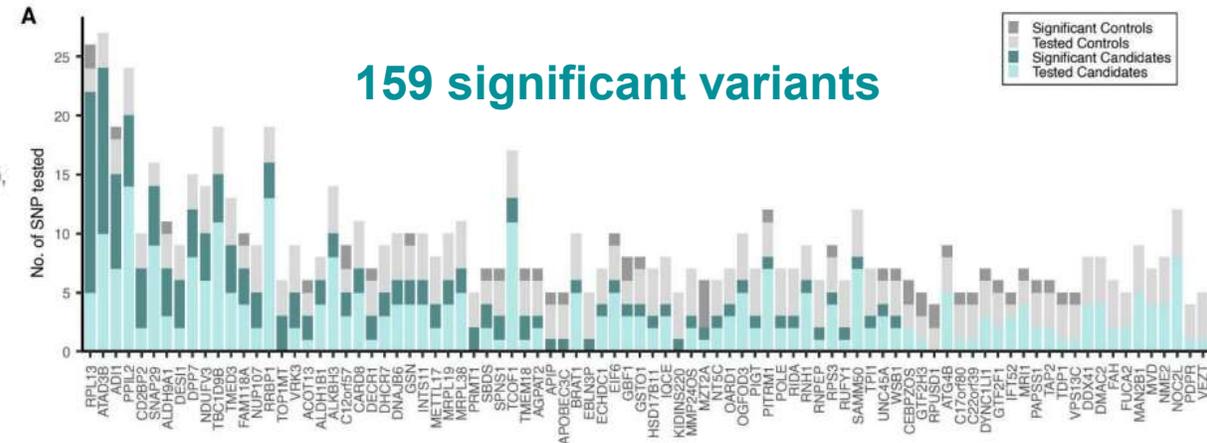
Haplotype rather than single causal variants effects contribute to regulatory gene expression associations in human myeloid cells



Emily Greenwood, Mingming Cao, Ciaran M. Lee, Aidi Liu, Buhle Moyo, Gang Bao, Greg Gibson

doi: <https://doi.org/10.1101/2025.01.30.635675>

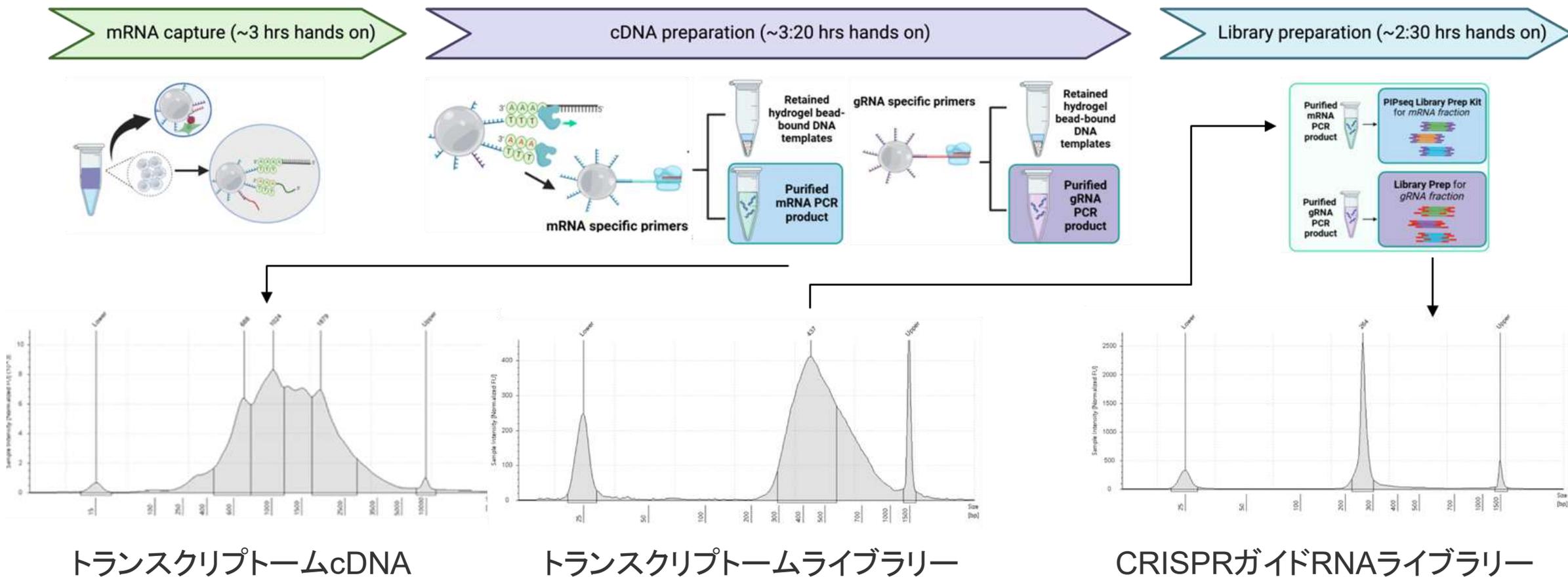
- T20およびT100キットを用いたCROP-seqは、炎症性腸疾患に關与する臨床的に重要な非常にまれなバリエントを迅速に確認するための実行可能なアプローチである。
- 89遺伝子にわたる465の希少バリエント候補を標的とした1,170のgRNA
- 465個の希少バリエントのうち159個が遺伝子発現の破壊因子として正しく同定される



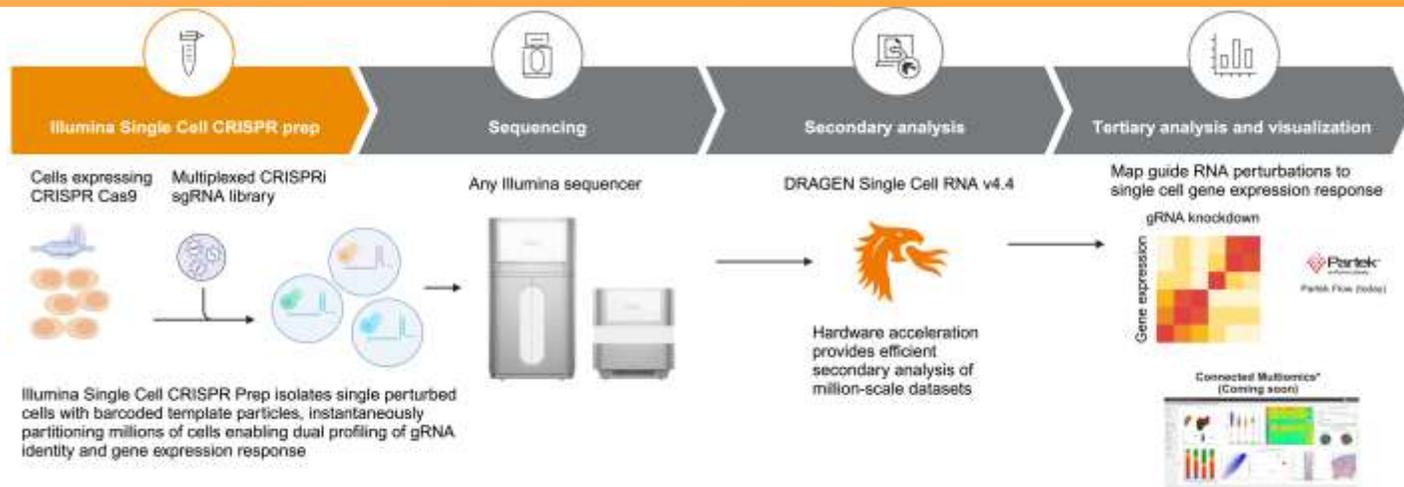
ダイレクトCRISPRガイドキャプチャーワークフロー



既存のSEAキットのワークフローと同様、独立してガイドの増幅が可能

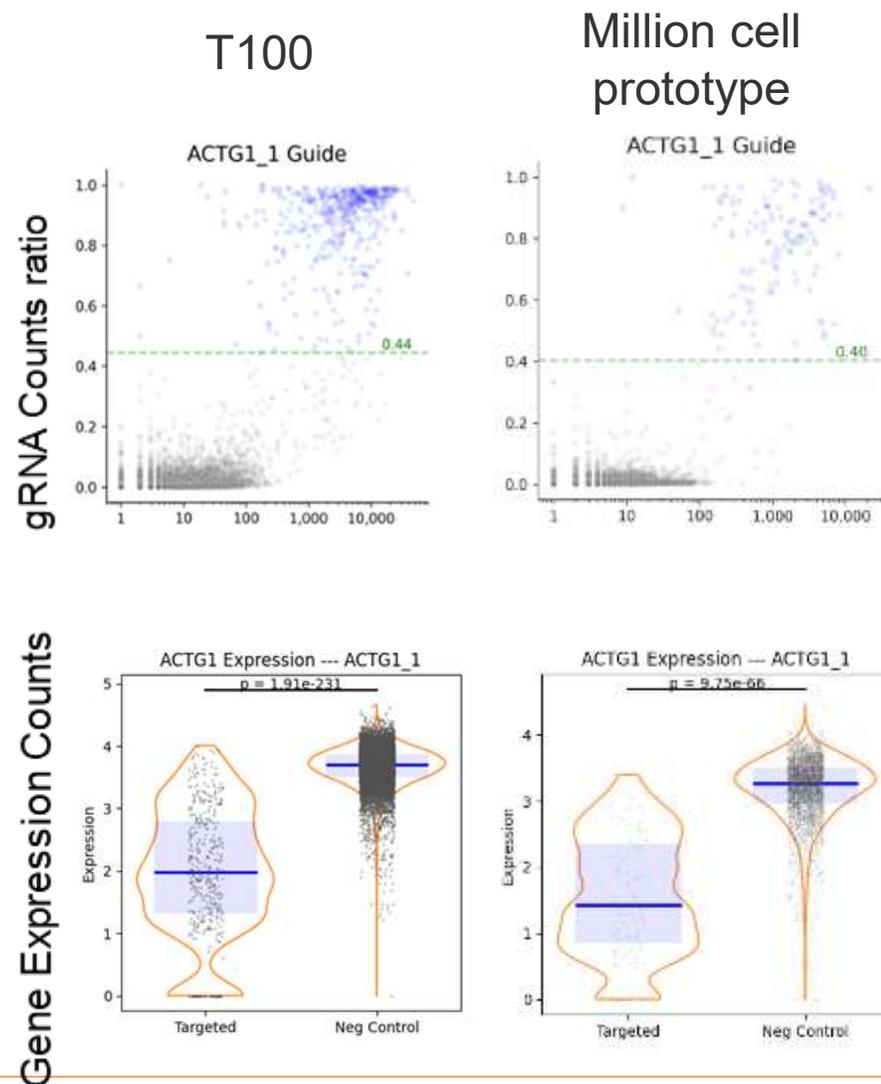


ダイレクトCRISPRガイドキャプチャーワークフロー

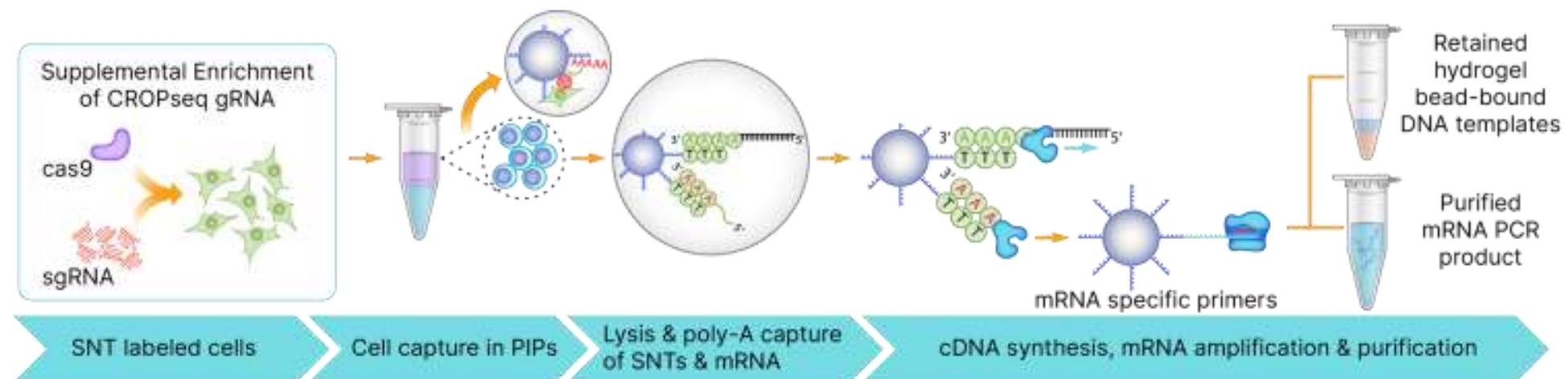


192種類のsgRNAライブラリを用いたアッセイ検証の主要な結果

- 検出されたガイドの98-99%が単一発現細胞として検出された
- CRISPRガイドの存在と遺伝子発現のノックダウンとの相関関係が確認できた
- k-meansクラスタリングアルゴリズムを用いた単一細胞検出は、低シーケンス深度におけるガイドの閾値設定を改善
- 10万細胞から100万細胞のプロトタイプまで一貫した性能を示した

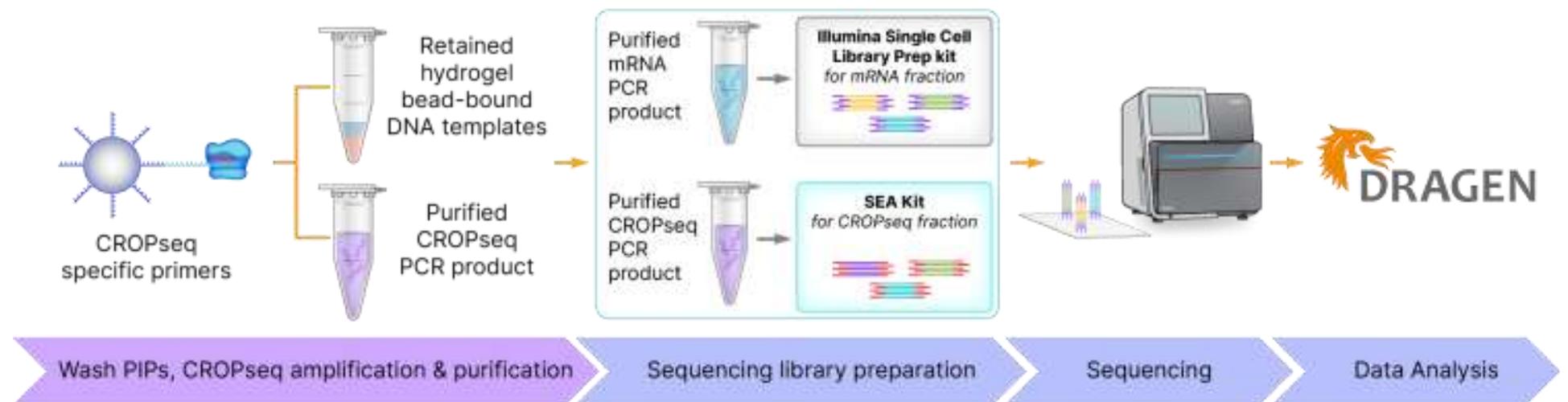


sgRNA Enrichment

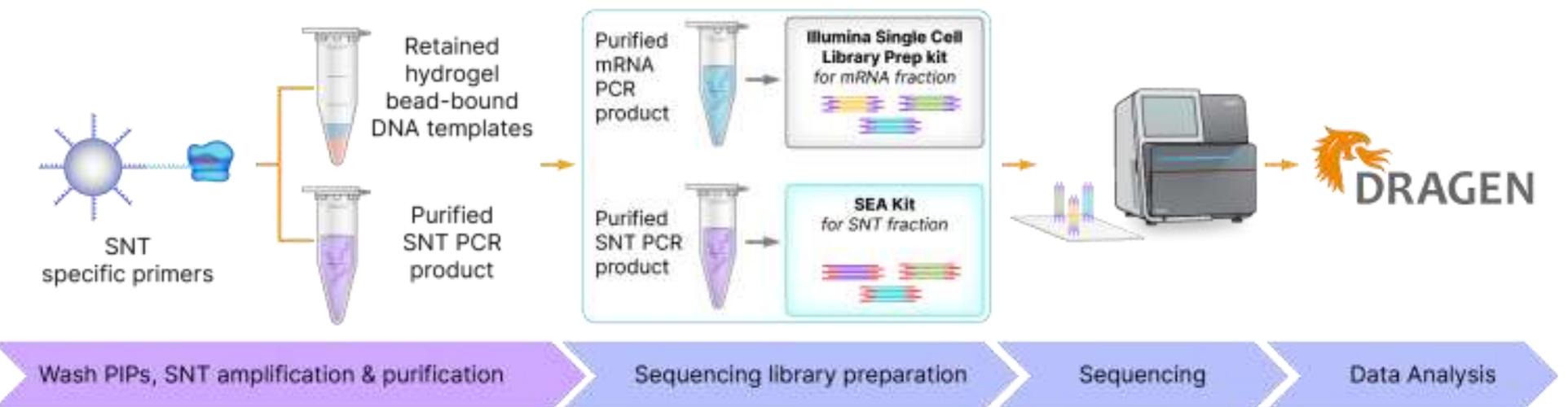
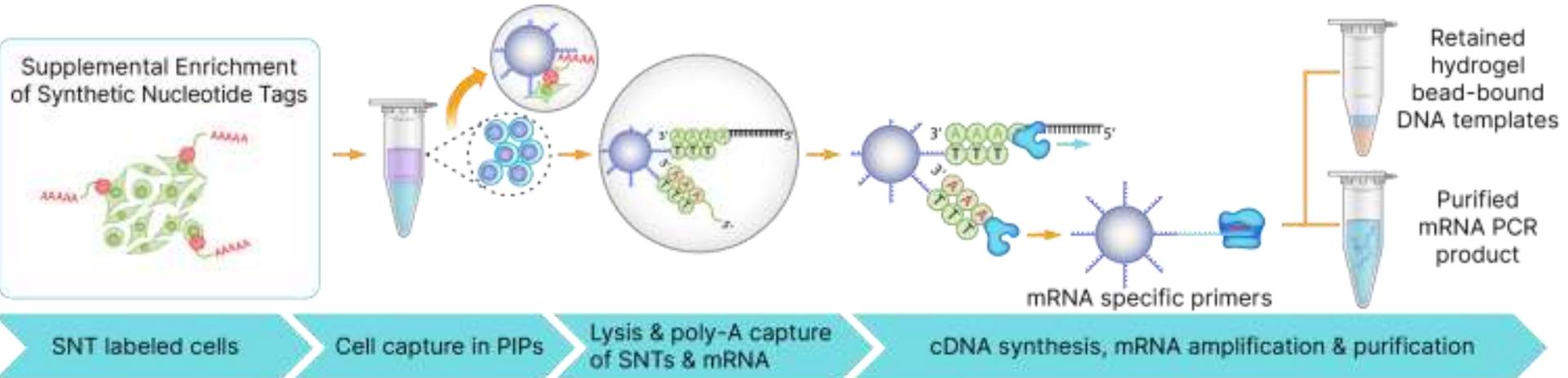


ガイドは以下より閲覧できます

- [Illumina Single Cell RNA T2 Guide RNA Enrichment Product Documentation](#)
- [Illumina Single Cell RNA T10 Guide RNA Enrichment Product Documentation](#)
- [Illumina Single Cell RNA T20 Guide RNA Enrichment Product Documentation](#)
- [Illumina Single Cell RNA T100 Guide RNA Enrichment Product Documentation](#)



Synthetic Nucleotide Tag Enrichment



- ガイドは以下より閲覧できます
- [Illumina Single Cell RNA T2 Synthetic Nucleotide Tag Enrichment Product Documentation](#)
 - [Illumina Single Cell RNA T10 Synthetic Nucleotide Tag Enrichment Product Documentation](#)
 - [Illumina Single Cell RNA T20 Synthetic Nucleotide Tag Enrichment Product Documentation](#)
 - [Illumina Single Cell RNA T100 Synthetic Nucleotide Tag Enrichment Product Documentation](#)

FACS (Fluorescence-activated cell sorting)を使用した手法

4

PURE-seqによる希少細胞集団のシーケンス



PURE-seq identifies *Egr1* as a Potential Master Regulator in Murine Aging by Sequencing Long-Term Hematopoietic Stem Cells



Sixuan Pan, Kai-Chun Chang, Inés Fernández-Maestre, Stéphane Van Haver, Matthew G. Wereski, Robert L. Bowman, Ross L. Levine, Adam R. Abate

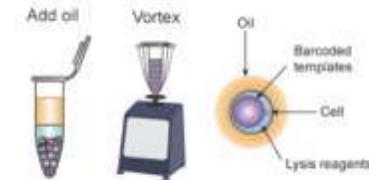
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.12.607664v1>

- 希少な細胞のシーケンスを目的としたPURE-seq (PIP-seq for Rare-cell Enrichment and Sequencing) が開発された
- PURE-seqは、セルソーターからPIP-seq反応液へ細胞を直接ロードでき、細胞損失が低減すると考えられている
- 実証実験では、100万分の1の割合で存在する希少細胞もT2キットで捕捉可能であることが示唆された

FACS Sorting into PIP-seq tube



PIP-seq Single Cell Encapsulation

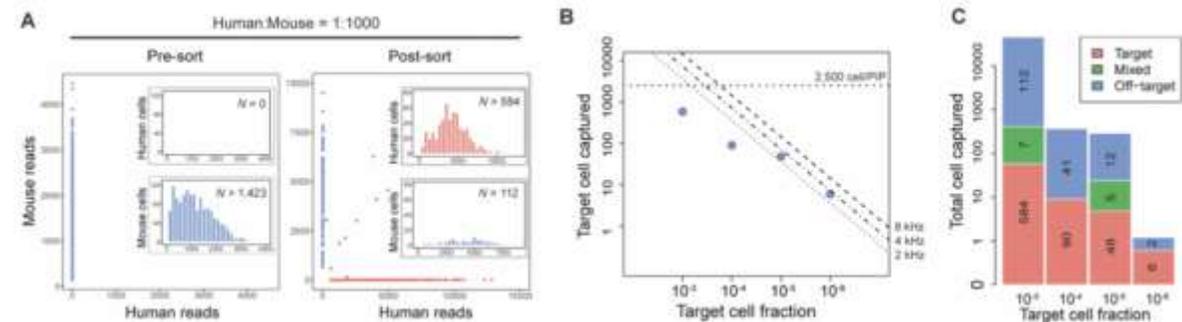


PIP-seq Library Preparation

Reverse transcription



Whole-transcriptome amplification, library preparation



論文紹介

5



- Clark, Iain C., et al. "Microfluidics-free single-cell genomics with templated emulsification." *Nature Biotechnology* 41.11 (2023): 1557-1566.
- Fontanez, Kristina M., et al. "Intrinsic molecular identifiers enable robust molecular counting in single-cell sequencing." *bioRxiv* (2024): 2024-10.
- Agarwal, Devansh., et al. "Human retinal ganglion cell neurons generated by synchronous BMP inhibition and transcription factor mediated reprogramming" *npj Regenerative Medicine* 8 (2023): 55