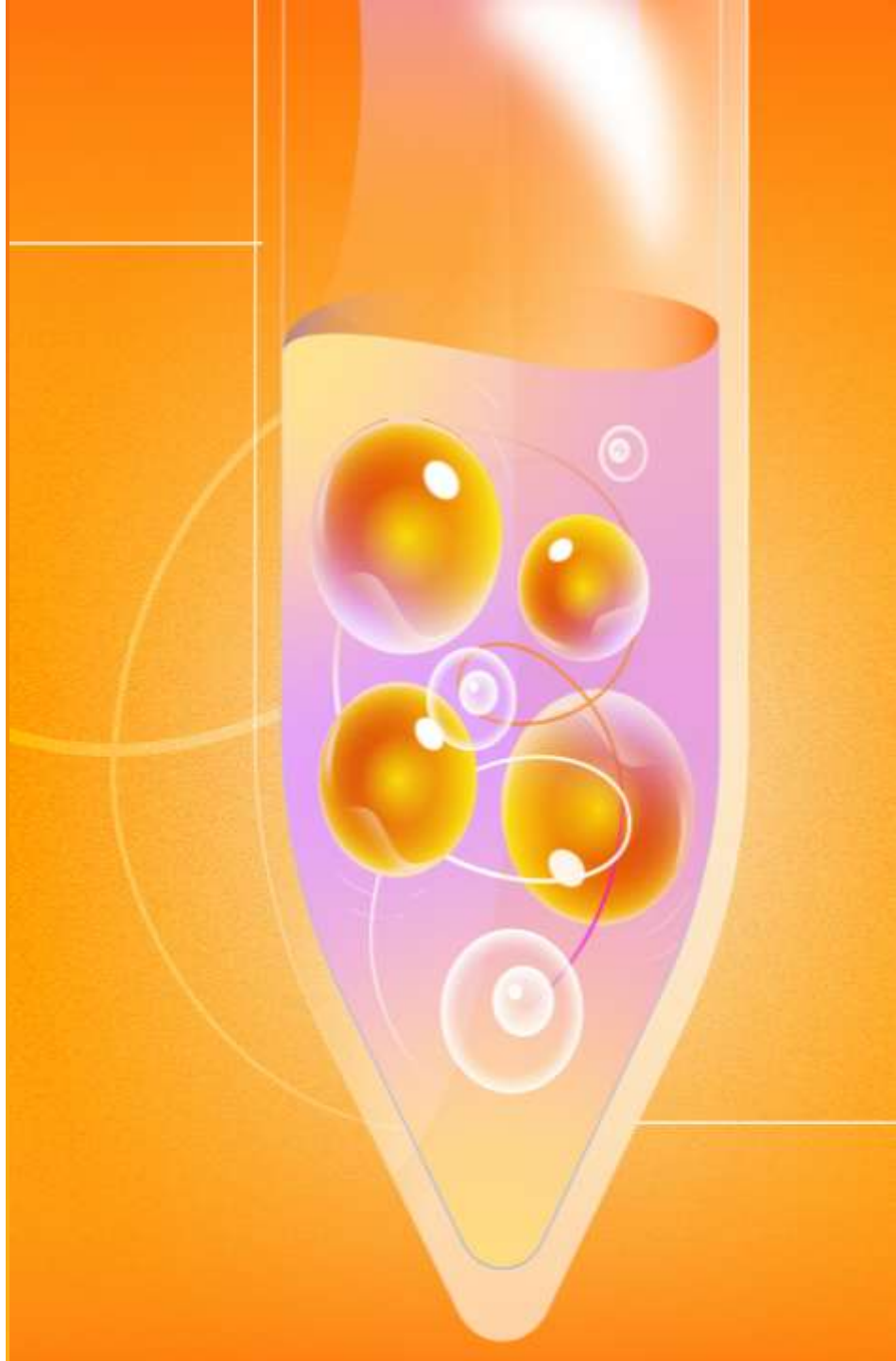
イルミナシングルセル解析入門

ドライ編：
解析ワークフローとデータの評価



山口　和晃

フィールドアプリケーションサイエンティスト
イルミナ株式会社

30-JAN-2026

illumina®

イルミナウェビナー

「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いたします。
今回はシリーズの第2回として、**データ解析**を中心に、実際のワークフローや解析のポイントをご説明いたします。
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クエ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アプリ** 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

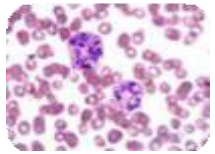
ご紹介内容はウェビナー実施時の情報に基づきます。
最新情報はWEBサイトでご確認ください。

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

ライブラリー調製

Illumina Single Cell 3′ RNA Prep



シーケンス

全てのイルミナシーケンサーで対応可能
（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NGSを選択）

ドライ編：2026年1月30日実施

二次解析

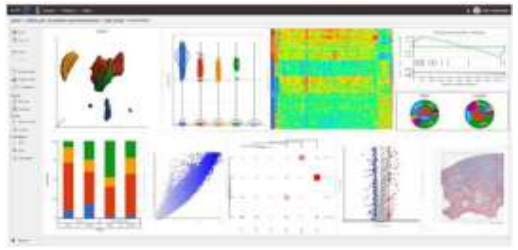
DRAGEN Single Cell RNA
- BaseSpace™ Sequence Hub など（クラウド環境）
- DRAGEN オンプレミスサーバー（ローカル環境）

三次解析と視覚化

Partek Flow
（クラウド・ローカル環境）

Partek
an Illumina company

Illumina Connected Multiomics



*NGS: Next Generation Sequencing

Agenda

1. 1細胞レベルでの遺伝子発現定量
   ～Illumina Single Cell 3′ RNA Prep の分子カウンティングの特徴～
2. データ解析の流れと提供プラットフォーム
3. 二次解析①: DRAGEN Single Cell RNA の実行方法
   ～BaseSpace Sequence Hub (BSSH) アプリの使用準備と設定～
4. 二次解析②: DRAGEN Single Cell RNA の結果確認
   ～出力データの見方とQCによる評価～
5. 三次解析: Partek Flow のご紹介
   ～Illuminaまたはサードパーティ製ソフトウェアでの下流解析に関する補足～

Appendix

*QC: Quality Control

1細胞レベルでの遺伝子発現定量

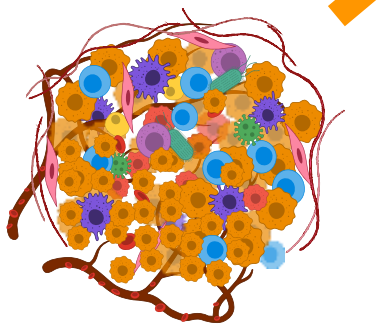
～Illumina Single Cell 3′ RNA Prep の分子カウンティングの特徴～

1

シングルセルRNA-Seq解析の基本

細胞レベルでの遺伝子発現の定量化（分子カウンティング）

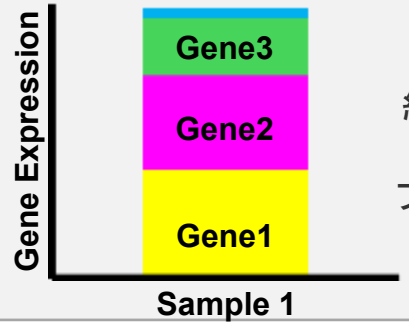
シングルセルRNA-SeqはバルクRNA-Seqとは異なり、**細胞ごとに遺伝子発現量を定量化**することができるため、個々の細胞レベルでの状態や機能を理解できる。一方で、1細胞あたりのmRNA量は非常に少なく、PCRなどによる誤差も発生するため、統計的に信頼性の高い分子カウンティングを実施することが重要である。



細胞集団

バルクRNA-Seq

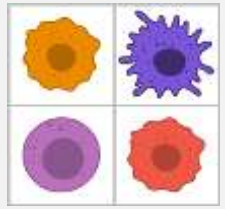
1チューブでまとめて
ライブラリーを調製



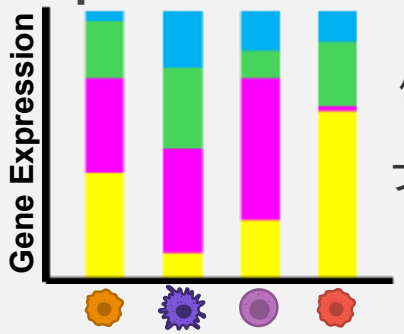
細胞集団における
遺伝子発現量の
プロファイルを定義

1細胞ごとの遺伝子発現量を求めることはできず、どういった細胞集団がどの程度の割合で含まれていたかなどの情報が欠落する。

シングルセルRNA-Seq



細胞ごとに
ライブラリーを調製



個々の細胞ごとに
遺伝子発現量の
プロファイルを定義

遺伝子発現のパターンに基づき各細胞の種類や機能を推定

- 細胞集団の内訳
- 機能的特徴の発見
- 細胞亜集団の発見
- 細胞運命分岐の発見

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

illumina®

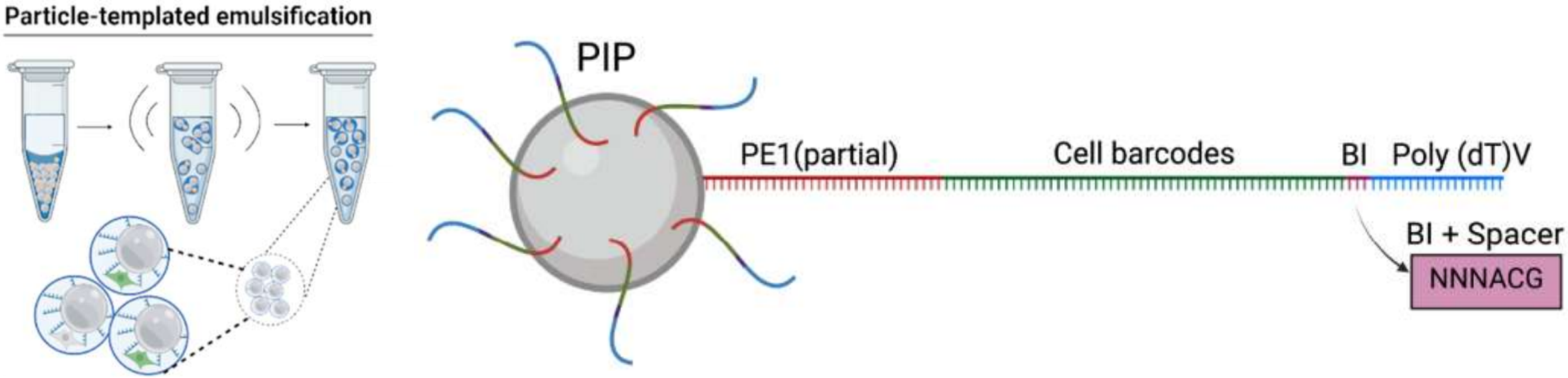
*mRNA: messenger RNA
PCR: Polymerase Chain Reaction

シングルセルRNA-Seq解析の基本

セルバーコードとは？

シングルセルRNA-Seqにおいて、**どのリードがどの細胞由来かを識別するために導入される固有の配列タグ**

Illumina Single Cell 3′ RNA Prepは**PIPseq™ Vケミストリー**を採用しており、細胞または核を粒子（PIP: Particle-templated Instant Partition）に封入し、そこに含まれるバーコード化ビーズとともに逆転写反応を行う。
このとき、各ビーズには**ユニークなセルバーコード配列**が結合しており、生成されるcDNAはそのバーコード配列を持つことで「このリードはこの細胞由来である」と区別することができる。

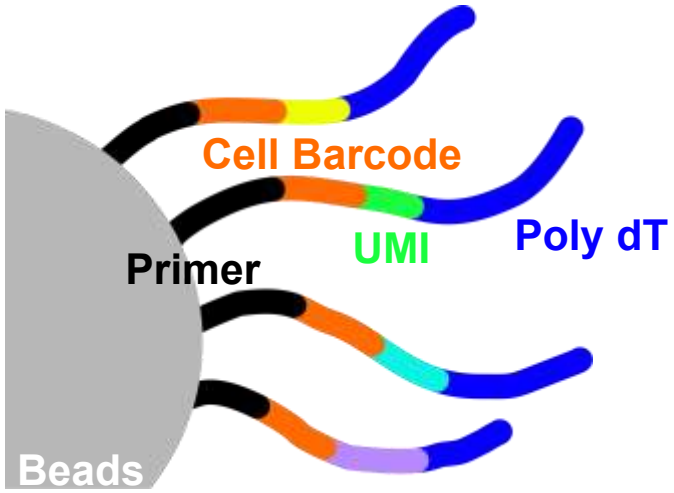


*cDNA: complementary DNA
BI: Binning Index

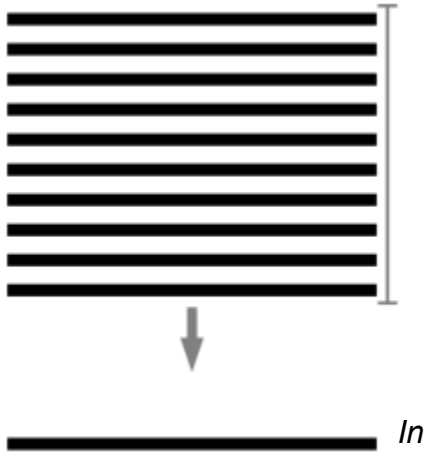
UMIを利用した従来の分子カウンティングの概念と課題

1細胞あたりのmRNA量は極めて少ないため、**分子カウントの精度**が定量解析の信頼性を左右する。

従来のシングルセル解析では、**Unique Molecular Identifier (UMI)** と呼ばれる6～10塩基のランダム配列を利用し、同一分子由来の重複リードを識別・統合することで、PCR増幅によるバイアスを補正している。



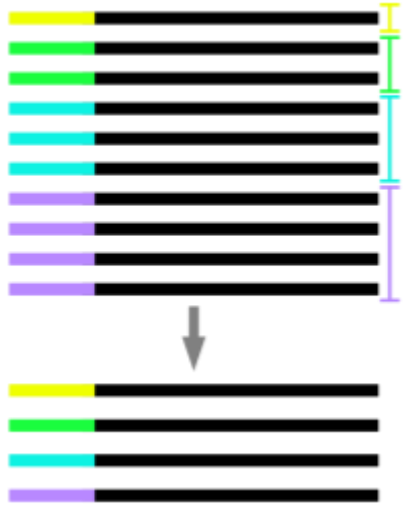
❖ **UMIを使用しない場合**



同じ分子の
PCR重複
&
別分子由来

*In silico*での
collapseが発生

❖ **UMIを使用した場合**



➢ **同じUMI ＋ 同じマッピング位置**
：同一分子のPCR重複である可能性が高い

➢ **同じUMI ＋ 異なるマッピング位置**
：別の分子

PCR重複を適切に除外して精度の
高い分子カウントを実現

しかし、分子カウントにおけるUMIの利用には、精度を低下させる複数の技術的な課題*が存在

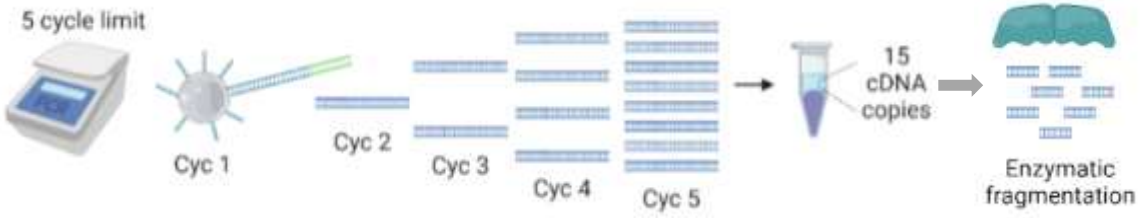
*識別能力の限界（UMI衝突、誤マージや誤分離など）や配列選択バイアス（mRNAのPoly-A tailとの相互作用）など

illumina®

PIPseq Vケミストリーにおける分子カウンティングの基本的な概念

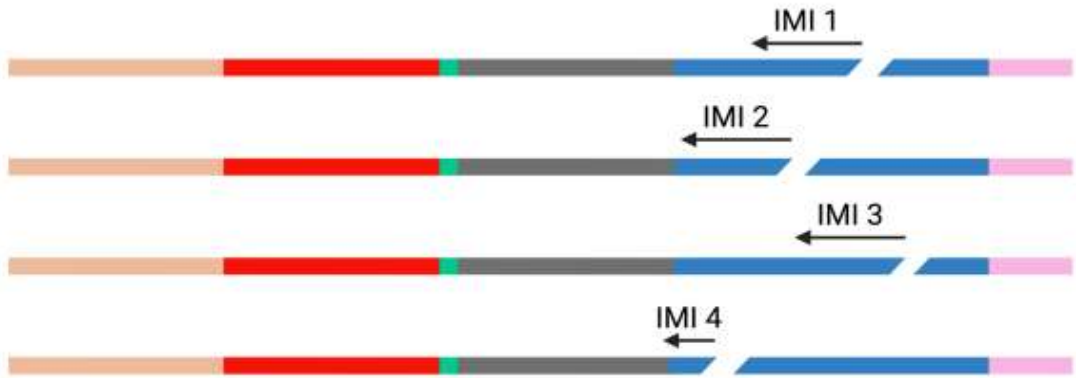
Intrinsic Molecular Identifier (IMI) と Binning Index (BI)

PIPseq Vケミストリーを採用する本ワークフローではUMIを使わず、IMIとBIを用いた独自の分子カウンティングを採用。



増幅されたcDNA分子の構造

酵素による断片化によって生じるIMI



- **Intrinsic Molecular Identifier (IMI)**
  増幅と断片化処理の過程でランダムに生じる切断位置を利用
  - 各分子ごとに最大15種類の断片が生じ、それらの切断位置の情報を分子の識別子として利用
  - 従来の外部配列（UMI）を使わず、cDNA断片化時に生じる転写産物上の切断位置情報に基づく内因的な識別を行うため、高精度かつバイアスの少ない分子カウントが可能

- **Binning Index (BI)**
  3塩基の配列で、各mRNA由来リードをグループ化
  - PCR増幅時の重複を除去し、分子数の変動を補正
  - 少数の分子でも、同一分子由来の可能性が高いリードを、同じリードグループ（ビン）として識別可能

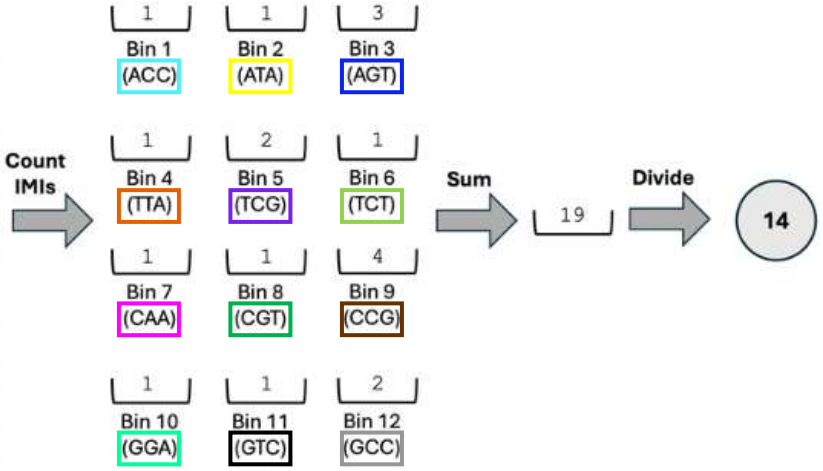
*TSO: Template Switch Oligo

PIPseq Vケミストリーにおける補正係数の役割

PCR増幅によって生じるコピー数の過剰なカウントを補正し、実際の分子数に近づけるために、
補正係数 (IPM: IMIs per Molecule) を利用

- 1つの分子から断片化の過程で、複数の切断位置 (IMI) を有するコピーが生じ得る
- そのため、単純に「コピー数 ＝ 分子数」とみなすと、実際の分子数より多くカウントしてしまう
- そこで「平均的に1分子から得られるIMI数（IPM）」を算出し、その補正係数を用いて分子数を補正する

Barcode	Gene	BI	IMI	Reads	
				Raw	Unique
CCACCTCT TATTGG AAGCTC AATGTATG	CD14	ACC	140,633,101	12	1
		ATA	140,633,107	3	1
		AGT	140,631,790	1	1
			140,632,057	4	1
			140,632,995	10	1
		TTA	140,631,790	7	1
		TCG	140,633,098	3	1
			140,633,101	1	1
		TCT	140,633,108	1	1
		CAA	140,633,109	3	1
		CGT	140,633,455	9	1
		CCG	140,632,099	5	1
			140,632,125	16	1
			140,632,128	20	1
			140,632,675	1	1
		GGA	140,633,106	8	1
		GTC	140,632,098	4	1
		GCC	140,632,057	1	1
			140,632,126	2	1



補正の流れ（イメージ） ※計算プロセスはAppendixを参照

1. ユニークBI数を基準に、同じ分子由来と推定されるIMIをビンとしてまとめる
2. 実際のIMI数とユニークBI数の関係から、補正係数（IPM）を推定する

   例：あるサンプルでは平均して
   1分子＝1.35個のIMIが得られた
3. 各Barcode + GeneごとのIMI数をIPMで割ることで、実際の分子数に近い値に補正される

   例：19 IMI ÷ 1.35 ≈ 14
   →「約14分子」と推定

データ解析の流れと提供プラットフォーム

2

データ解析の流れ

シーケンス（一次解析）

二次解析

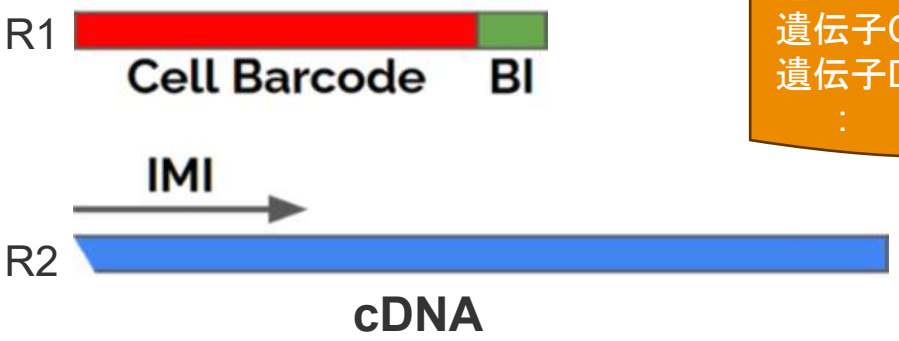
三次解析と視覚化

DRAGEN Single Cell RNA パイプライン

分子カウンティング

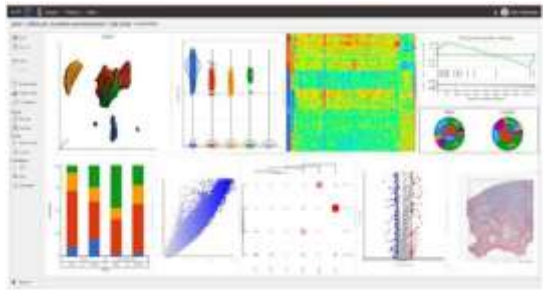
	細胞1	細胞2	細胞3・・
遺伝子A	0	3	0
遺伝子B	5	0	0
遺伝子C	0	0	1
遺伝子D	1	0	4
：			

「遺伝子 × 細胞」のカウントマトリックス



Partek Flow

Illumina Connected Multiomics

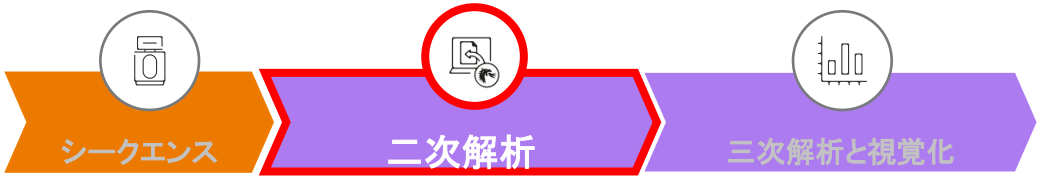


統計解析・可視化・解釈

サードパーティ製ソフトウェア*（Seuratなど）を用いた下流解析

*動作保証の対象外となります

二次解析プラットフォーム一覧



専用の二次解析ソフトウェア DRAGEN Single Cell RNAを様々なプラットフォームで提供

解析環境	クラウド			ローカル
プラットフォーム	**BaseSpace Sequence Hub (BSSH)**	**Illumina® Connected Analytics (ICA)**	**DRAGEN マルチクラウド (AWS / Azure)**	**DRAGEN オンプレミス サーバー**
解析パイプライン	DRAGEN Single Cell RNA（v4.4以降）	DRAGEN Single Cell RNA（v4.4以降）	DRAGEN Single Cell RNA（v4.4以降）	DRAGEN Single Cell RNA（v4.4以降）
利用条件	- 無償の登録が必要 - **解析費用は無料**	- 無償の契約注文が必要 - **解析費用は無料**	AWSと別途契約が必要	サーバー本体が必要
特徴	- 主にクリック操作でのユーザーフレンドリーな解析 - 1 TByte 以上のデータ保存には有償契約アカウントが必要	- クリック操作またはCLI/APIでの解析に対応 - 入出力データの**ストレージコスト**は別途負担が必要	- 既存のAWS / Azureユーザーに選択肢を提供	- 専用の無償ライセンス（PIPseq）を提供

- 「**FASTQ**」から三次解析に必要な「**遺伝子×細胞のカウントマトリックス（分子カウント）**」ファイルを生成
- 各種メトリクス出力や、簡易的なUMAPによる可視化まで実施可能だが、より詳細な解析には三次解析が必要
- Cell Ranger（10x Genomics社）は、Illumina Single Cell 3′ RNA PrepのIMI＋BIを処理できないため非対応

*CLI: Command Line Interface
API: Application Programming Interface
AWS: Amazon Web Services
UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection

三次解析プラットフォーム一覧

DRAGEN Single Cell RNAの出力ファイルは多くの三次解析ソフトウェアに持ち込み可能

解析環境	クラウド・ローカル	クラウド	-
プラットフォーム	**Partek Flow**	**Illumina Connected Multiomics (ICM)**	サードパーティ製ソフトウェア（Seurat など）
利用条件	年間ライセンス契約が必要	年間ライセンス契約が必要	使用ツールに依存
特徴	- 主にクリック操作でのユーザーフレンドリーな解析 - シングルセルをはじめとしたマルチオミクスの解析や可視化に対応* - 教育機関向けの専用ライセンスあり	- 主にクリック操作でのユーザーフレンドリーな解析 - シングルセルをはじめとしたマルチオミクスの解析や可視化に対応* - Partek Flowの後継ツールとして提供	- 二次解析の出力形式は一般的なシングルセル解析ツールに対応 - ほとんどがコマンドライン操作 - イルミナの技術サポート範囲外

*バルクRNA-Seq、シングルセル、空間トランスクリプトミクス、ChIP-Seq、ATAC-Seq、DNA-Seq、メタゲノム、マイクロアレイデータ など

- Partek Flow / ICMは、膨大かつ複雑なシングルセルデータの統計的解析や可視化を簡単な操作で可能に

*ATAC: Assay for Transposase-Accessible Chromatin
ChIP: Chromatin Immunoprecipitation

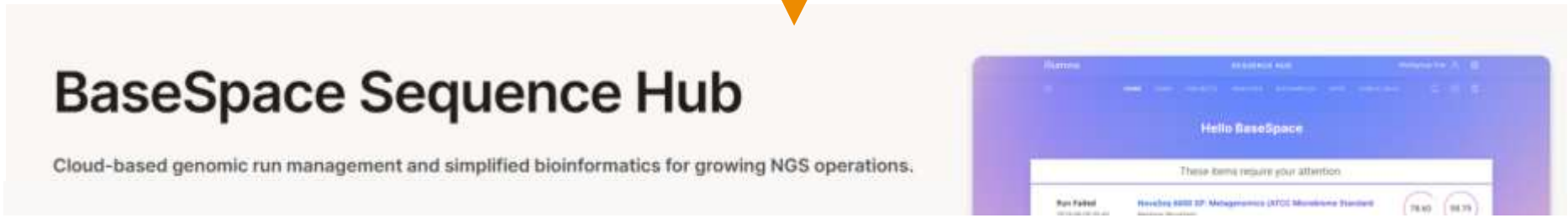
二次解析①:
DRAGEN Single Cell RNA の実行方法

3

～BaseSpace Sequence Hub (BSSH) アプリの使用準備と設定～

BSSHへのログイン (1/2)

1. イルミナHPからBSSHへログイン
   https://jp.illumina.com/
   ※言語を変更する場合は、右上の地球マークをクリック



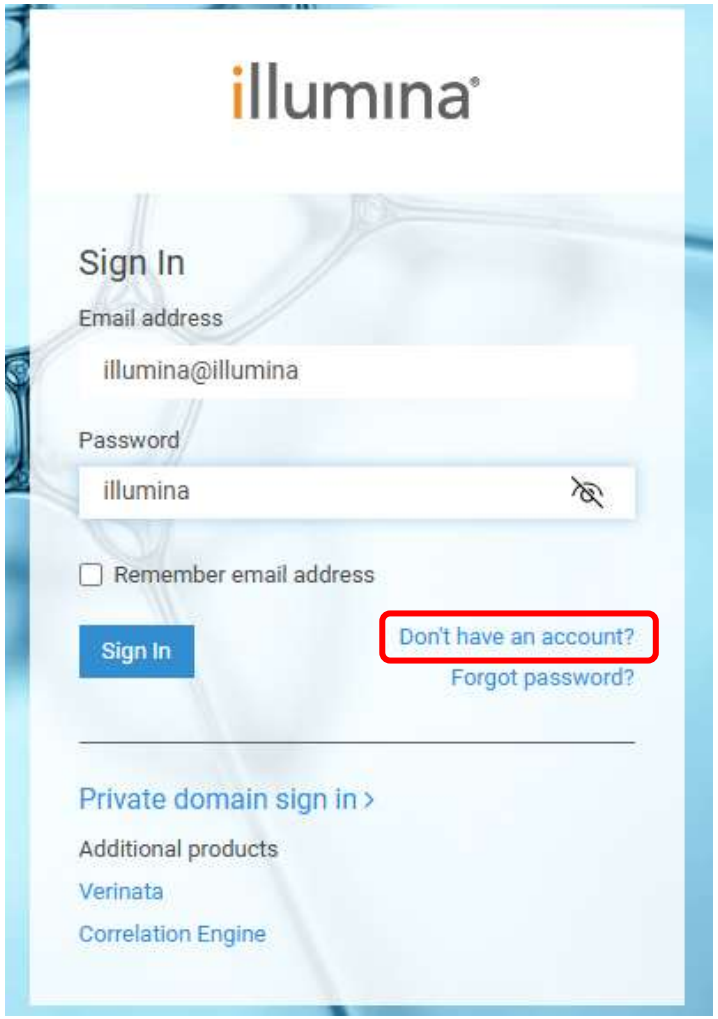
Already have an account?

Log into BaseSpace Sequence Hub below and start analyzing your data.

Log into BaseSpace

2. 遷移先の画面をスクロールし、「Log into BaseSpace」をクリック

BSSHへのログイン (2/2)



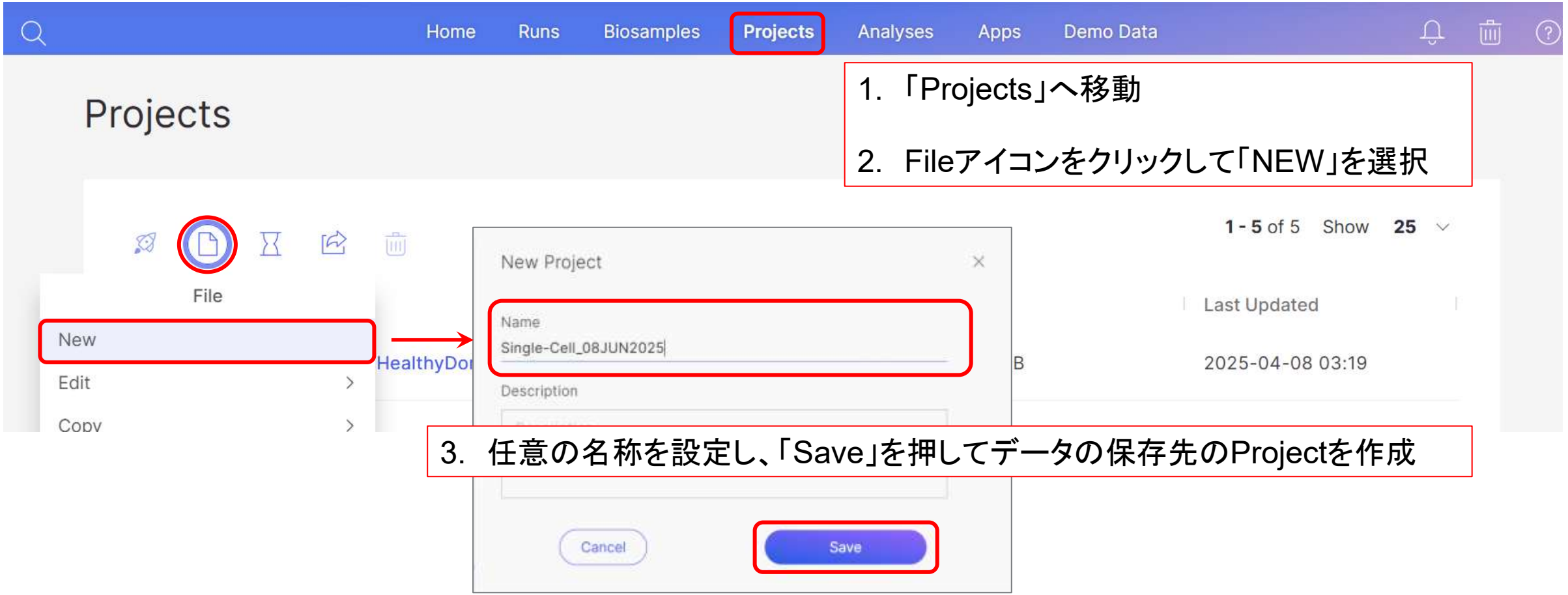
3. アカウントをお持ちでない場合は「Don't have an account?」をクリックし、Registerからアカウントの情報の新規登録を実施

4. 登録が完了したら、Sign Inのページにメールアドレスとパスワードを入力し、Sign Inをクリック

ポータルサイトのURLアドレスからも
アクセス可能（ブックマーク推奨）
https://basespace.illumina.com/

BSSHでの解析準備

データのアップロード・解析・保存は、「Project」ごとに管理 → まずは**新しいProject を作成**



BSSHへのサンプルデータ（FASTQ）のアップロード

Read1 (R1) FASTQ

Read2 (R2) FASTQ

BaseSpace

物理ストレージ

ウェブブラウザ
※Appendixを参照

BaseSpace

コマンドライン

BaseSpace

ラン設定時に、BSSHのアカウントにログインし、ランデータの保存先をBSSHに設定することで、ラン中にランデータのアップロードやFASTQ生成（Application: DRAGEN BCL Convert 選択）が自動で実施可能。

ドラッグ&ドロップのみで簡便に実施可能。ただし、1サンプルずつのアップロードにのみ対応。
数サンプル・数GBのファイルまでのアップロードでのみ使用を推奨。

多数のサンプルをアップロードする場合、BSSH CLI の利用を推奨。
1度のコマンド実行で複数サンプルの効率的なアップロードが可能。

How to upload and download FASTQ files to BaseSpace with BaseSpace CLI を参照

コマンドラインを用いたBSSHへのFASTQアップロード (1/4)

BaseSpace Sequence Hub CLI

How to upload and download FASTQ files to BaseSpace with BaseSpace CLI を参照

環境セットアップ（初回のみ必要な準備）:

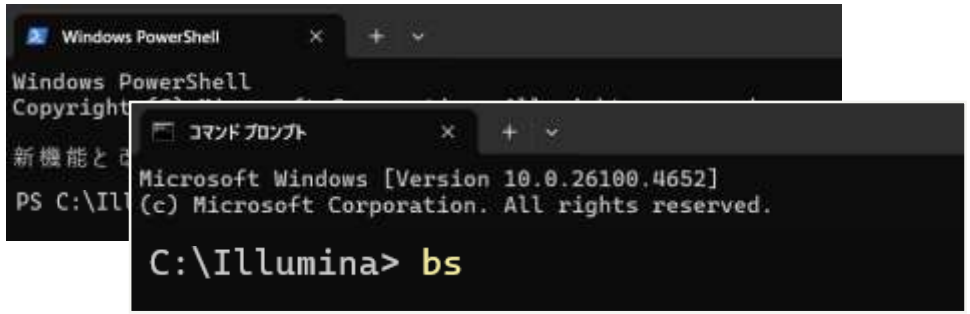
1. 対応するOSの実行ファイルを端末環境にダウンロード

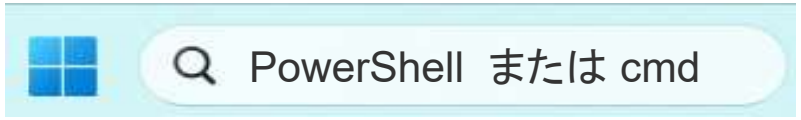
Install:

- Mac OS X
- Linux
- Windows

例 : bs.exe → C:¥Illumina¥bs.exeに保存 →

PowerShellやコマンドプロンプト (cmd) から実行






```
> cd C:¥Illumina¥
> bs -h
```

→ まずcd [change directory] コマンドで作業フォルダに移動すると実行しやすい

→ CLI が実行できるか、ヘルプを表示させるコマンド (-h オプション) で確認

コマンドラインを用いたBSSHへのFASTQアップロード (2/4)

環境セットアップ（初回のみ必要な準備）:

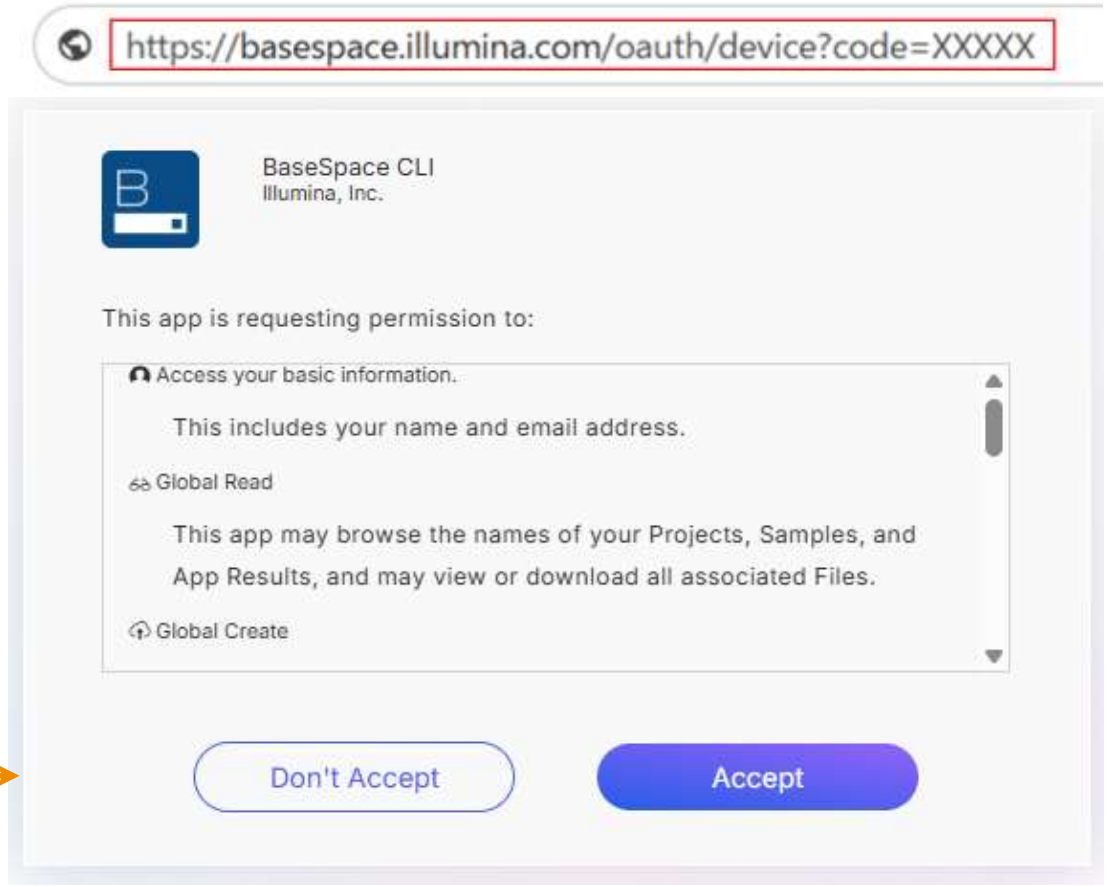
2. 端末とBSSHアカウントの接続認証を実施

以下のコマンドを入力

```
> bs auth
```

表示されたURLにウェブブラウザ経由でアクセスし、
紐づけたいBSSH アカウントにログイン

```
Please go to this URL to authenticate:
https://basespace.illumina.com/oauth/device?
code=XXXXX
```



“Accept” で接続を認証し、準備完了

コマンドラインを用いたBSSHへのFASTQアップロード (3/4)

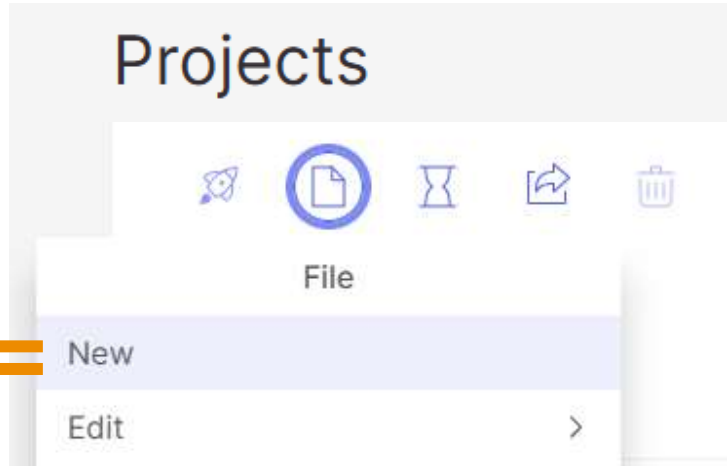
FASTQアップロード実行の準備：

3. アップロード先のProjectを作成・確認

以下のbsコマンド（例）またはBSSHブラウザから新規Projectを必要に応じて作成

```
> bs project create -n ‘Test Project 1’
```

この例では「Test Project 1」という名称のProjectを作成



以下のbsコマンドまたはBSSHブラウザのURLからアップロード先ProjectのID（数字）を特定

```
> bs project list
```

```
+------------------------------+---------------+--------------+
|          Name                |      Id       | TotalSize    |
+------------------------------+---------------+--------------+
|Test Project 1                | 468478011     |0             |
|Test Project 2                | 17406399      |6283469       |
+------------------------------+---------------+--------------+
```

コマンドラインを用いたBSSHへのFASTQアップロード (4/4)

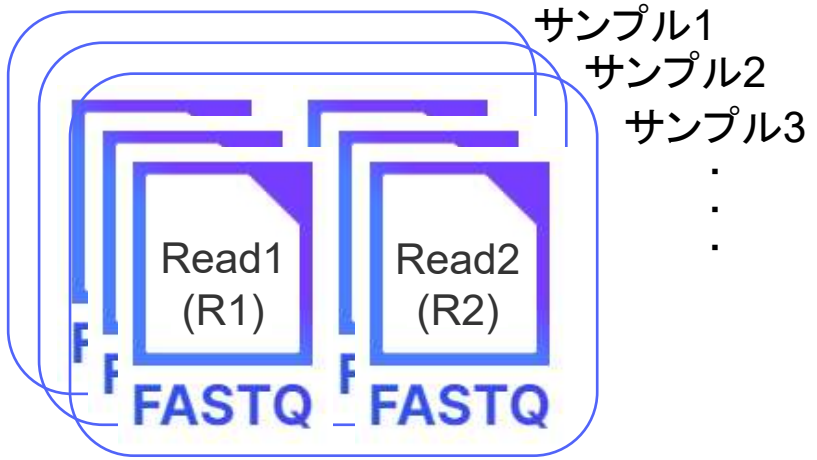
FASTQアップロード実行：

4. アップロードのコマンドを実行

以下のコマンド（例）を入力してFASTQファイルをアップロード

```
> bs dataset upload -p 468478011 --recursive C:¥Illumina¥Fastq
```

この例では「468478011」というIDのProject内に、「C:¥Illumina¥Fastq」内の全サンプルのFASTQを同時アップロード



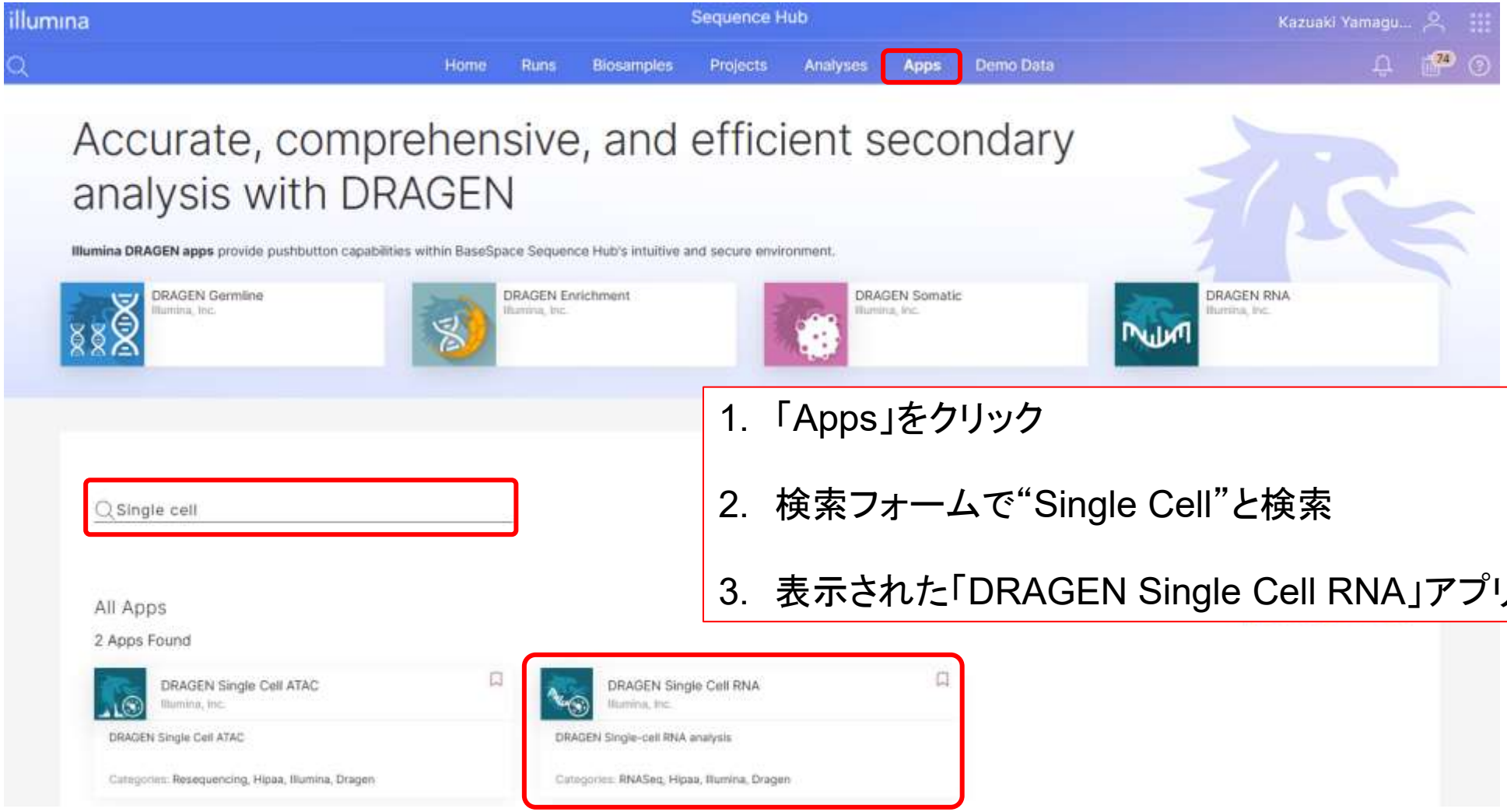
アップロード完了の出力例

```
Creating sample: Sample001
Sample001_S1_L001_R1_001.fastq.gz  9.69 GiB / 9.69 GiB [=========================================] 100.00%
Sample001_S1_L001_R2_001.fastq.gz  13.66 GiB / 13.66 GiB [=========================================] 100.00%
```

FASTQファイルの命名規則：[サンプル名]_[サンプル番号]_[レーン番号]_[リード番号]_001.fastq.gz

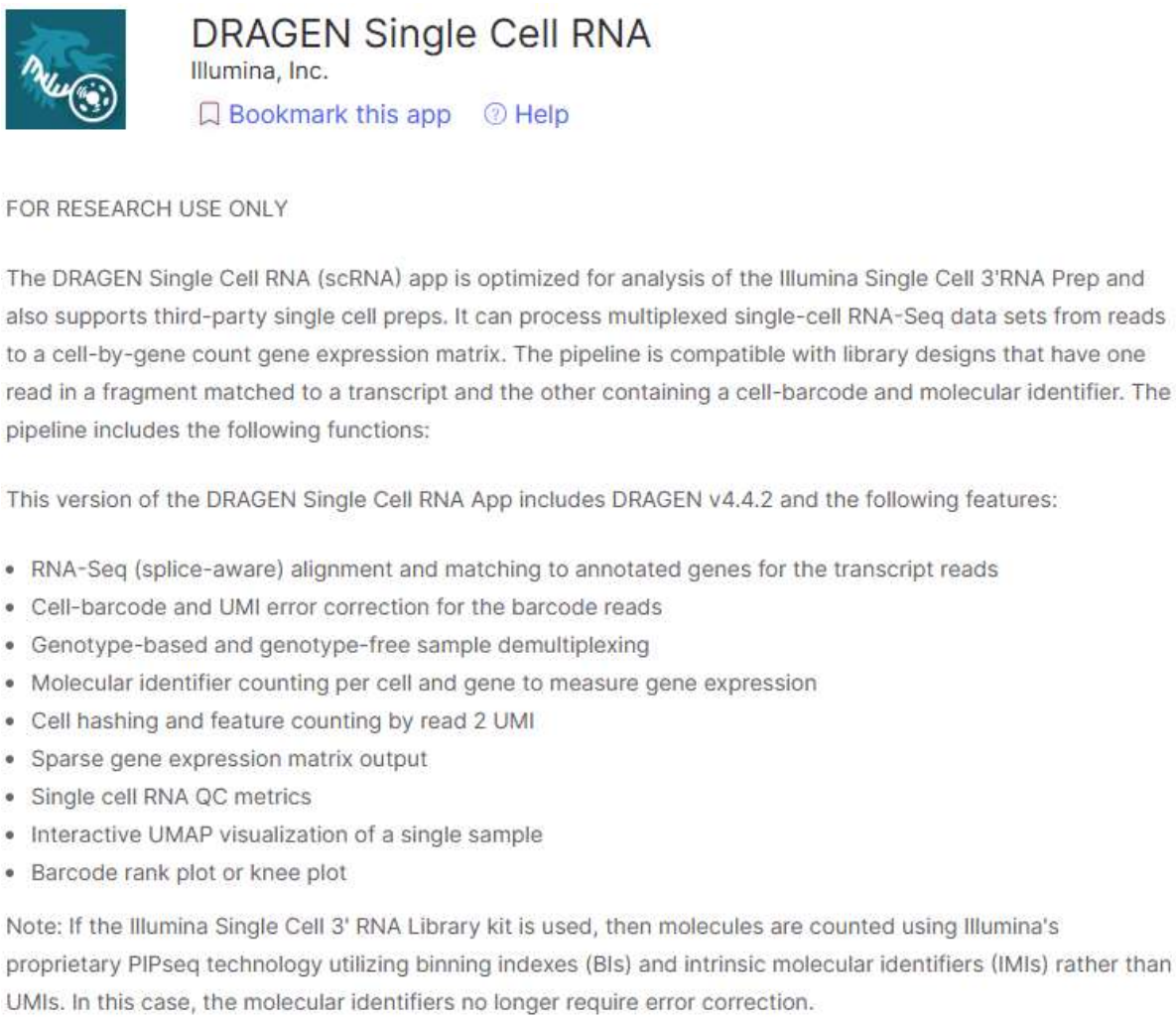
- 多数サンプルのFASTQファイルについても、各サンプルのペアリードがファイル名から自動的に認識され、[サンプル名] がBSSH上でのサンプル（BioSample）名として用いられる
- NextSeq 1000/2000 でレーンマージされ [レーン番号] がない場合には、ファイル名にL001を上記例のように追加し、さらに、`--allow-invalid-readnames` オプションをコマンドラインに追加する

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (1/8)



1. 「Apps」をクリック
2. 検索フォームで“Single Cell”と検索
3. 表示された「DRAGEN Single Cell RNA」アプリをクリック

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (2/8)



DRAGEN Single Cell RNA
Illumina, Inc.
Bookmark this app Help

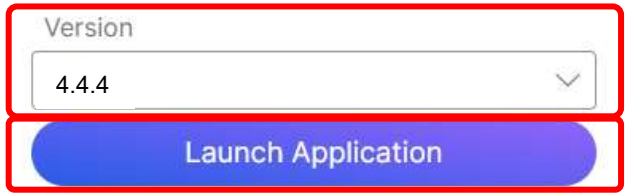
FOR RESEARCH USE ONLY

The DRAGEN Single Cell RNA (scRNA) app is optimized for analysis of the Illumina Single Cell 3'RNA Prep and also supports third-party single cell preps. It can process multiplexed single-cell RNA-Seq data sets from reads to a cell-by-gene count gene expression matrix. The pipeline is compatible with library designs that have one read in a fragment matched to a transcript and the other containing a cell-barcode and molecular identifier. The pipeline includes the following functions:

This version of the DRAGEN Single Cell RNA App includes DRAGEN v4.4.2 and the following features:

- RNA-Seq (splice-aware) alignment and matching to annotated genes for the transcript reads
- Cell-barcode and UMI error correction for the barcode reads
- Genotype-based and genotype-free sample demultiplexing
- Molecular identifier counting per cell and gene to measure gene expression
- Cell hashing and feature counting by read 2 UMI
- Sparse gene expression matrix output
- Single cell RNA QC metrics
- Interactive UMAP visualization of a single sample
- Barcode rank plot or knee plot

Note: If the Illumina Single Cell 3' RNA Library kit is used, then molecules are counted using Illumina's proprietary PIPseq technology utilizing binning indexes (BIs) and intrinsic molecular identifiers (IMIs) rather than UMIs. In this case, the molecular identifiers no longer require error correction.



Version
4.4.4
Launch Application

Compute cost
Free

Published
2025-01-08 04:50

Categories
RNA-Seq
HIPAA
Illumina
Dragen

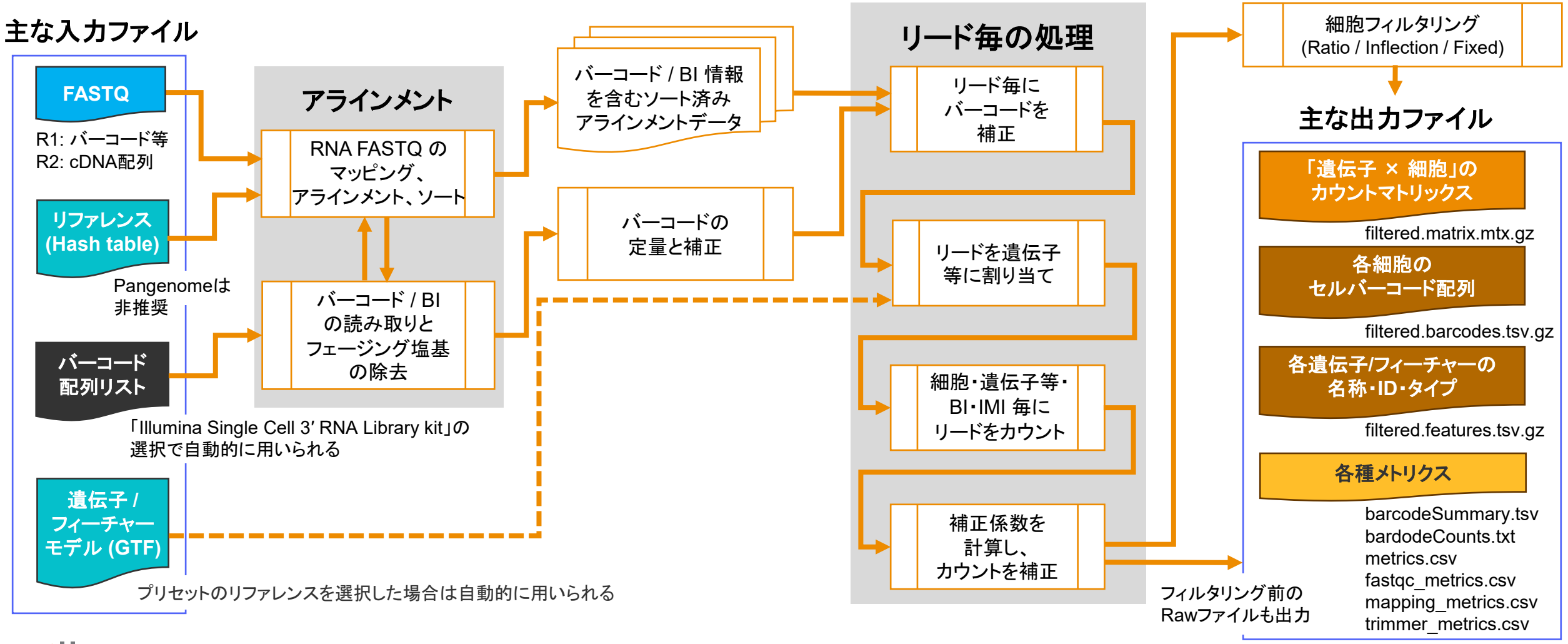
Developer
Visit Website

Terms
EULA
Privacy

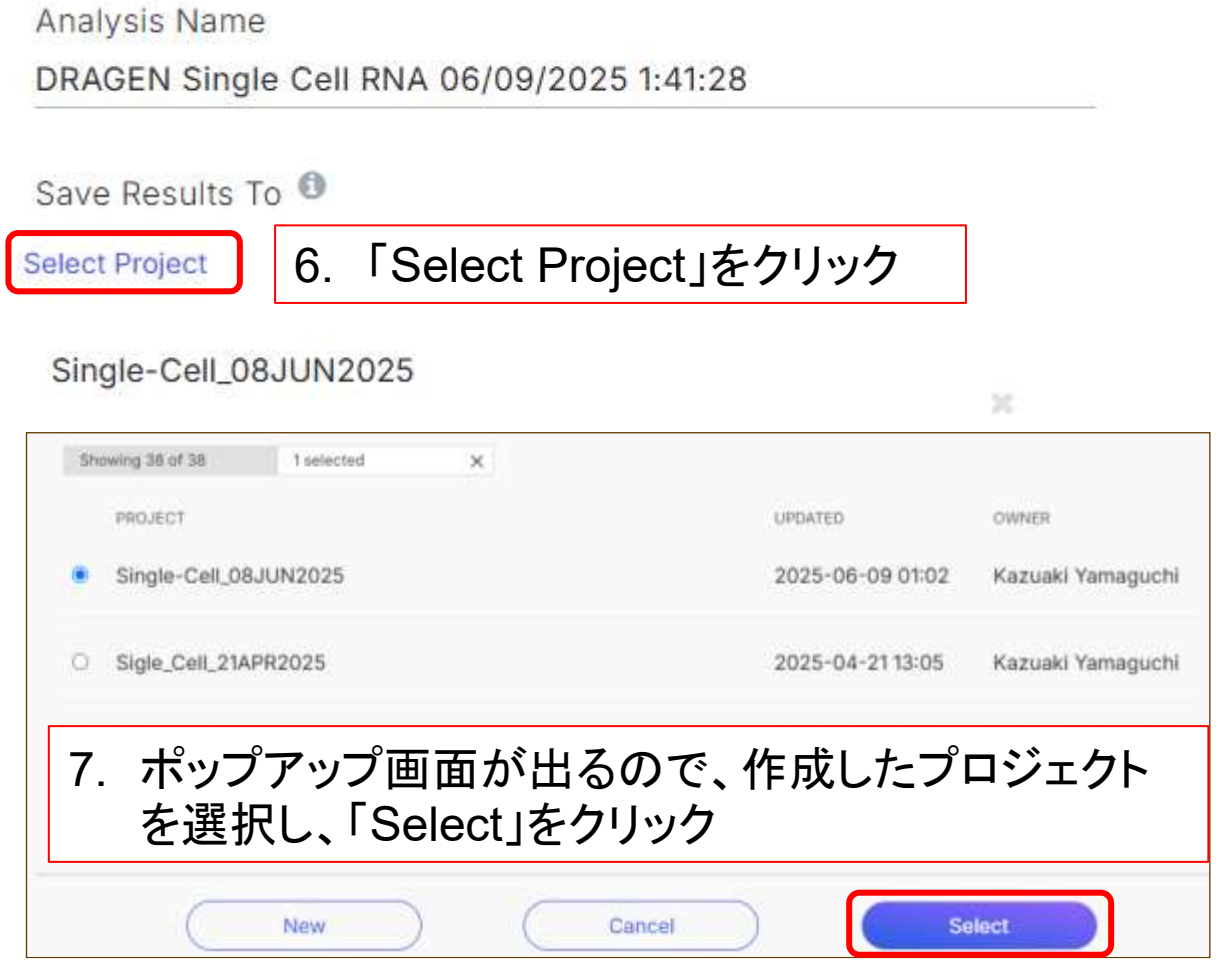
4. Versionで4.4.x以降を選択
5. 「Launch Application」をクリック

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (3/8)

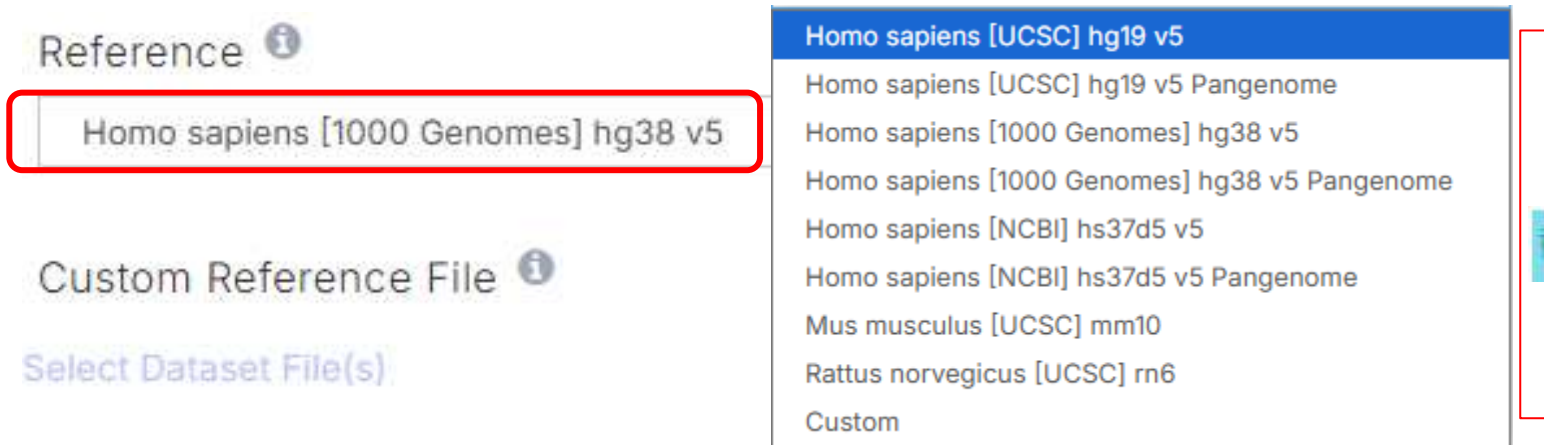
DRAGEN Single Cell RNA のワークフロー



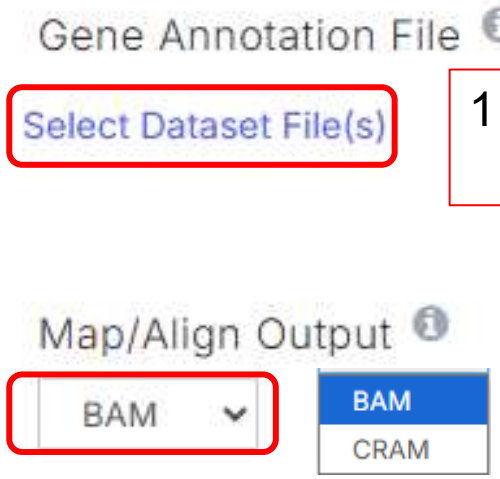
BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (4/8)



BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (5/8)



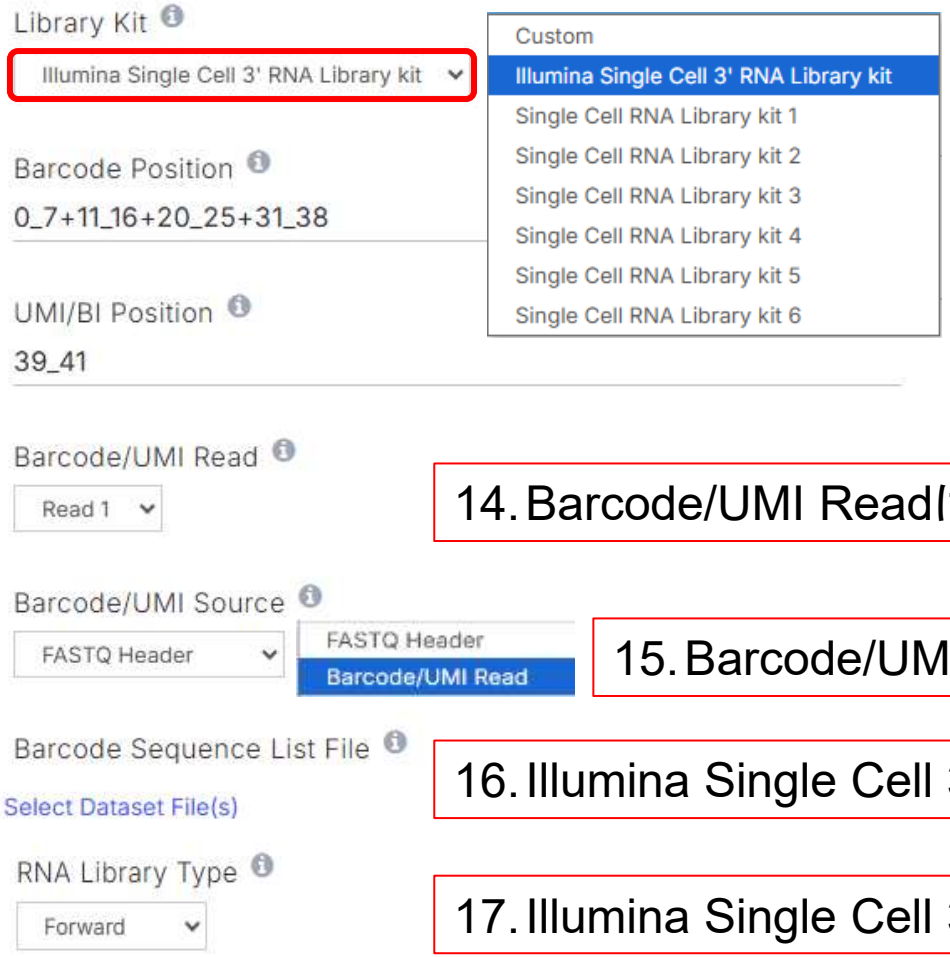
10. Referenceのプルダウンから選択
※Pangenome と記載の「ない」、リニアリファレンスがRNA解析では推奨
※Customの場合、FASTAファイルから「**DRAGEN Reference Builder（有償アプリ）**」で事前に“Include RNA Data in Reference”オンで作成し、Custom Reference Fileから選択する



11. カスタムGene Annotation Fileを追加したい場合は、事前にProjectにアップロードしておいたGTFファイル (.gtf または .gtf.gz圧縮形式) を選択する

12. Map/Align Outputのプルダウンから任意のものを選択する

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (6/8)



13. Library Kitから「Illumina Single Cell 3′ RNA Library kit」を選択
※「Illumina Single Cell 3′ RNA Library kit」を選択すると、Barcode PositionとUMI/BI Positionが自動で入力される

14. Barcode/UMI Readは「Read 1」を選択

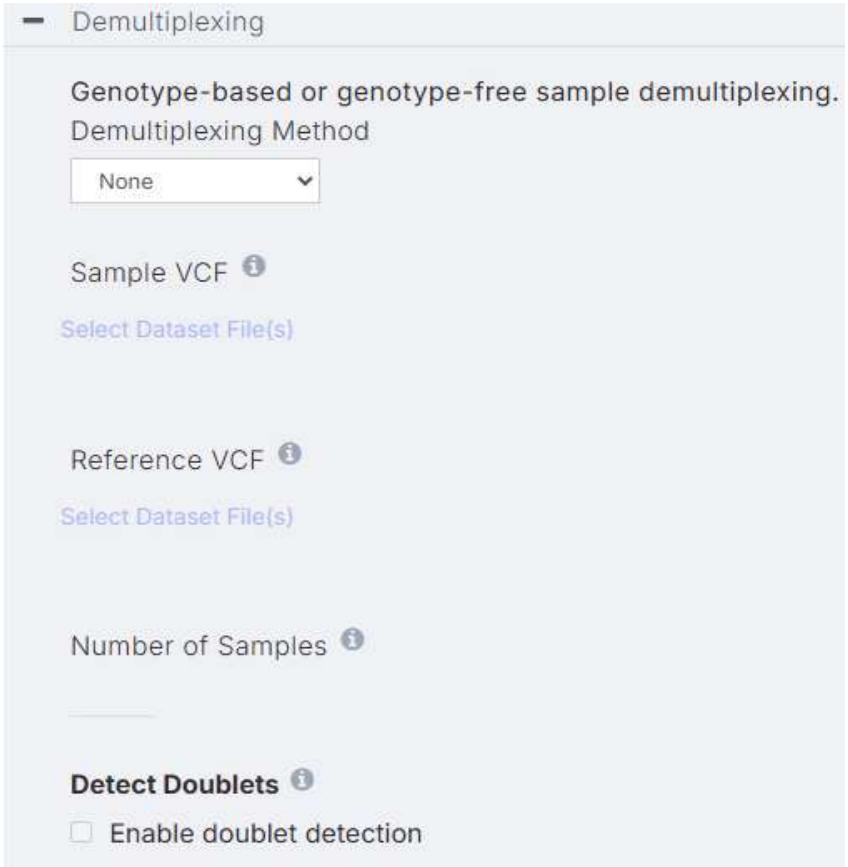
15. Barcode/UMI Sourceは「Barcode/UMI Read」を要選択

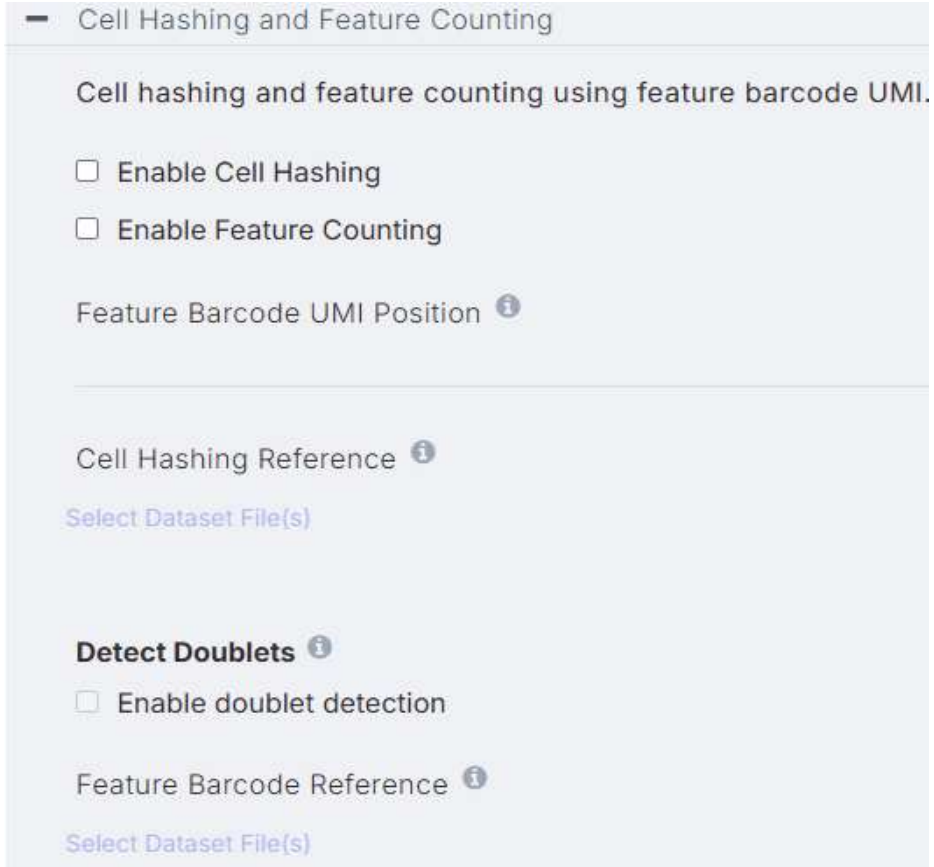
16. Illumina Single Cell 3′ RNA Prep用のファイルが自動的に用いられるため未選択のまま

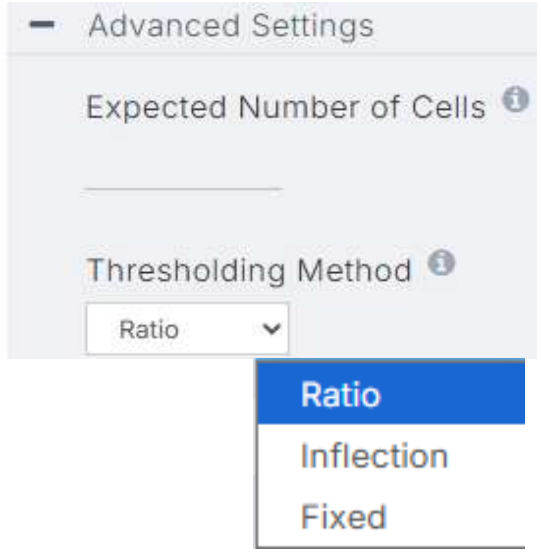
17. Illumina Single Cell 3′ RNA PrepではForwardを選択

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (7/8)

以降は、オプションの設定内容であるため、必要に応じて設定を実施

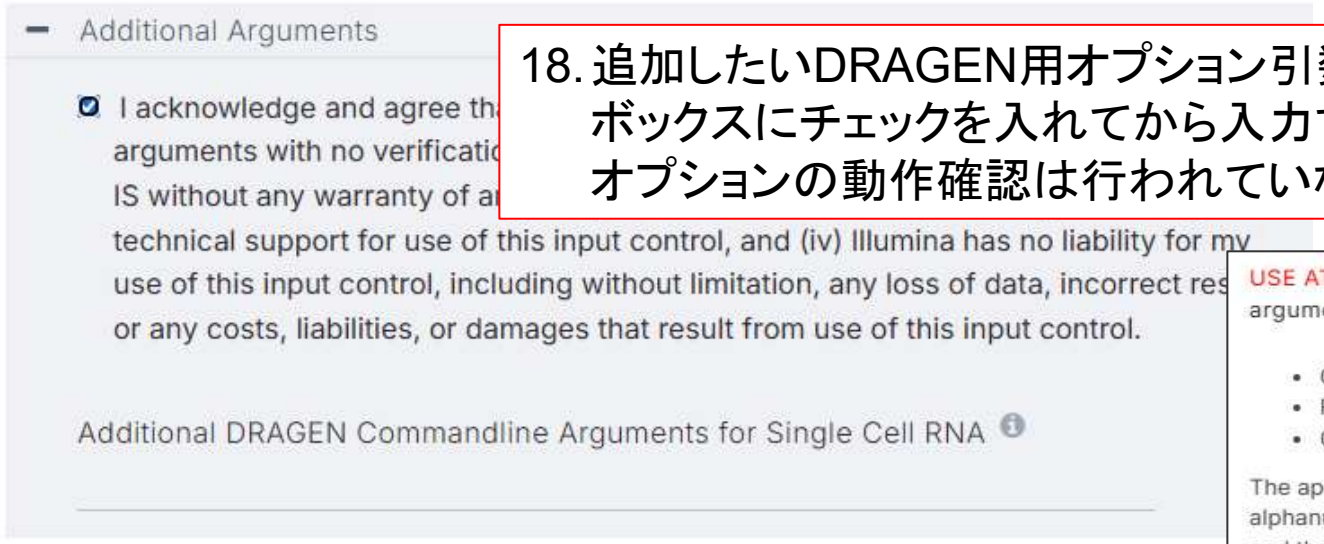






細胞のフィルタリングで
利用する閾値の選択は
後のスライドで解説
（スライド39ページ目）

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリの実行 (8/8)



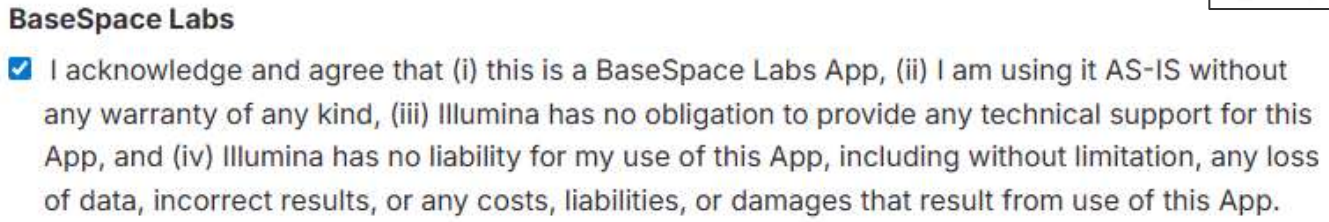
18. 追加したいDRAGEN用オプション引数がある場合は、「Additional Arguments」のチェックボックスにチェックを入れてから入力する。ただし、BSSHアプリではすべてのDRAGEN用オプションの動作確認は行われていないことに注意

USE AT YOUR OWN RISK. This field allows the user to add any DRAGEN command line argument, which can cause DRAGEN to:

- Crash/fail/hang
- Run for a very long time
- Generate unexpected or invalid results

The app appends this input text to the DRAGEN command line for scRNA (valid characters are alphanumeric plus `._-"'`). Note that there is **no validation** of the contents. If you use this field and the appsession aborts, the output*.log appsession log file may help to understand the cause of the failure.

オプション引数の詳細は以下を参照
Illumina PIPseq scRNA | DRAGEN



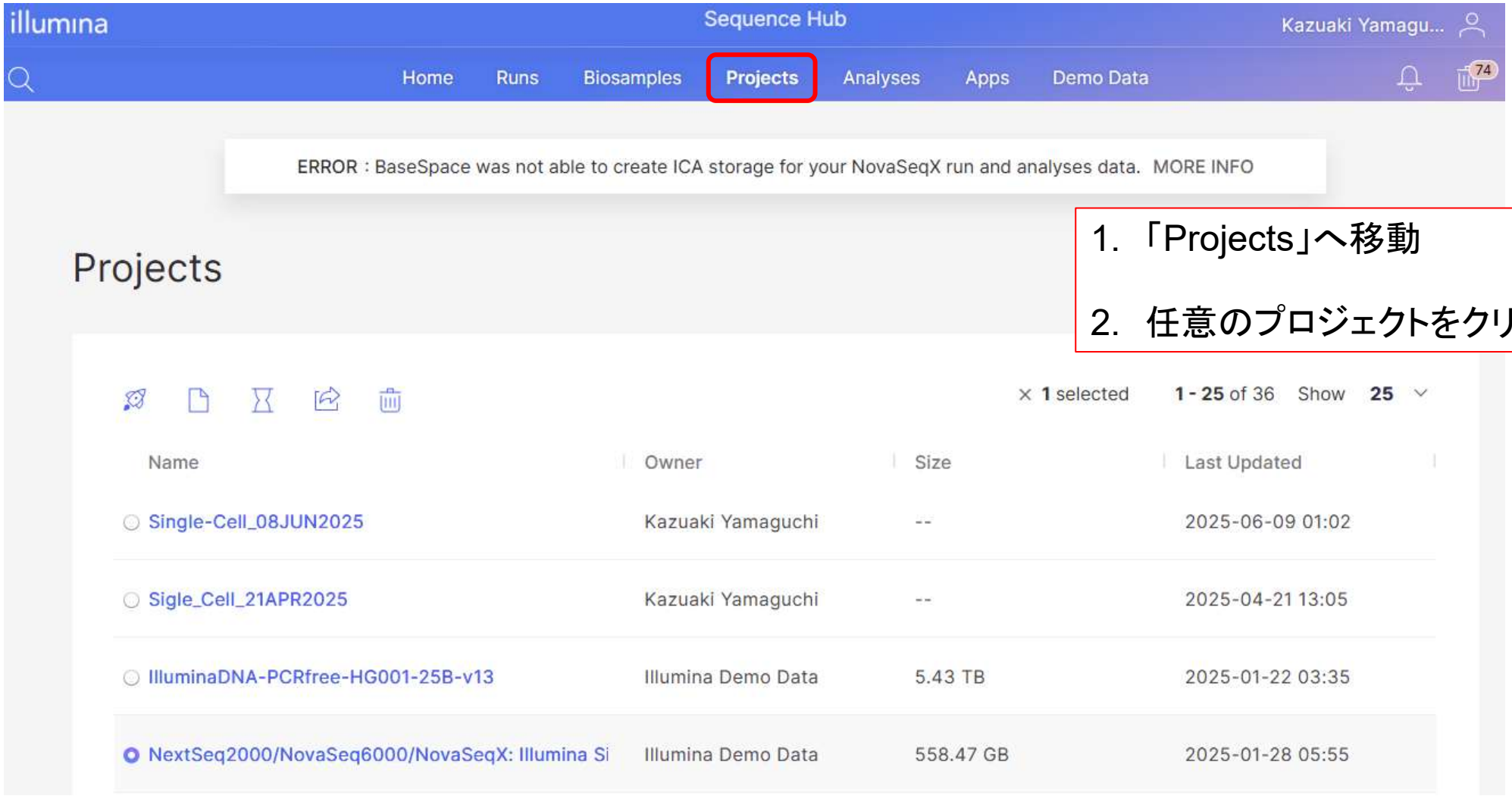
19. 利用規約への同意にチェックを入れ、「Launch Application」をクリック

二次解析②:
DRAGEN Single Cell RNA の結果確認

4

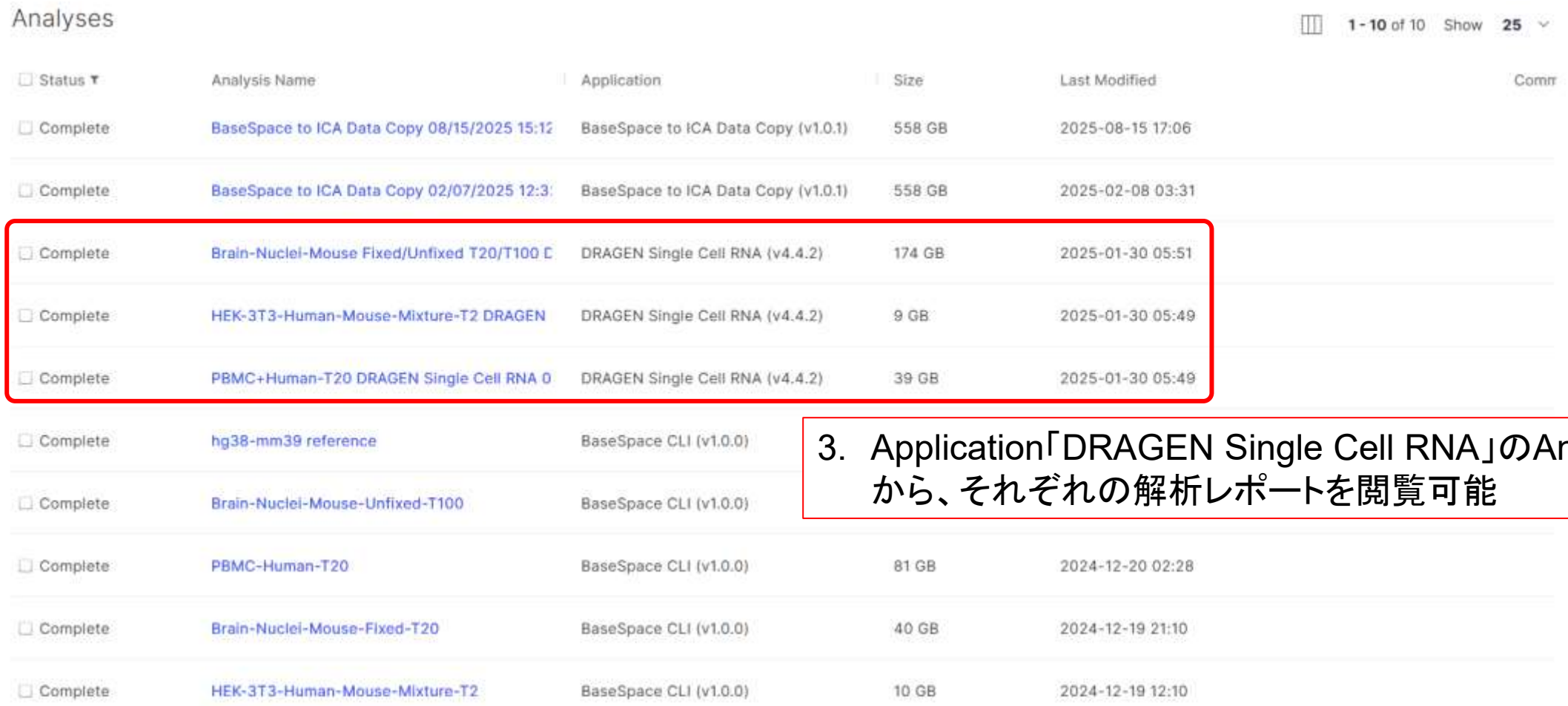
～出力データの見方とQCによる評価～

レポートの確認方法 (1/3)



1. 「Projects」へ移動
2. 任意のプロジェクトをクリック

レポートの確認方法 (2/3)



3. Application「DRAGEN Single Cell RNA」のAnalysisから、それぞれの解析レポートを閲覧可能

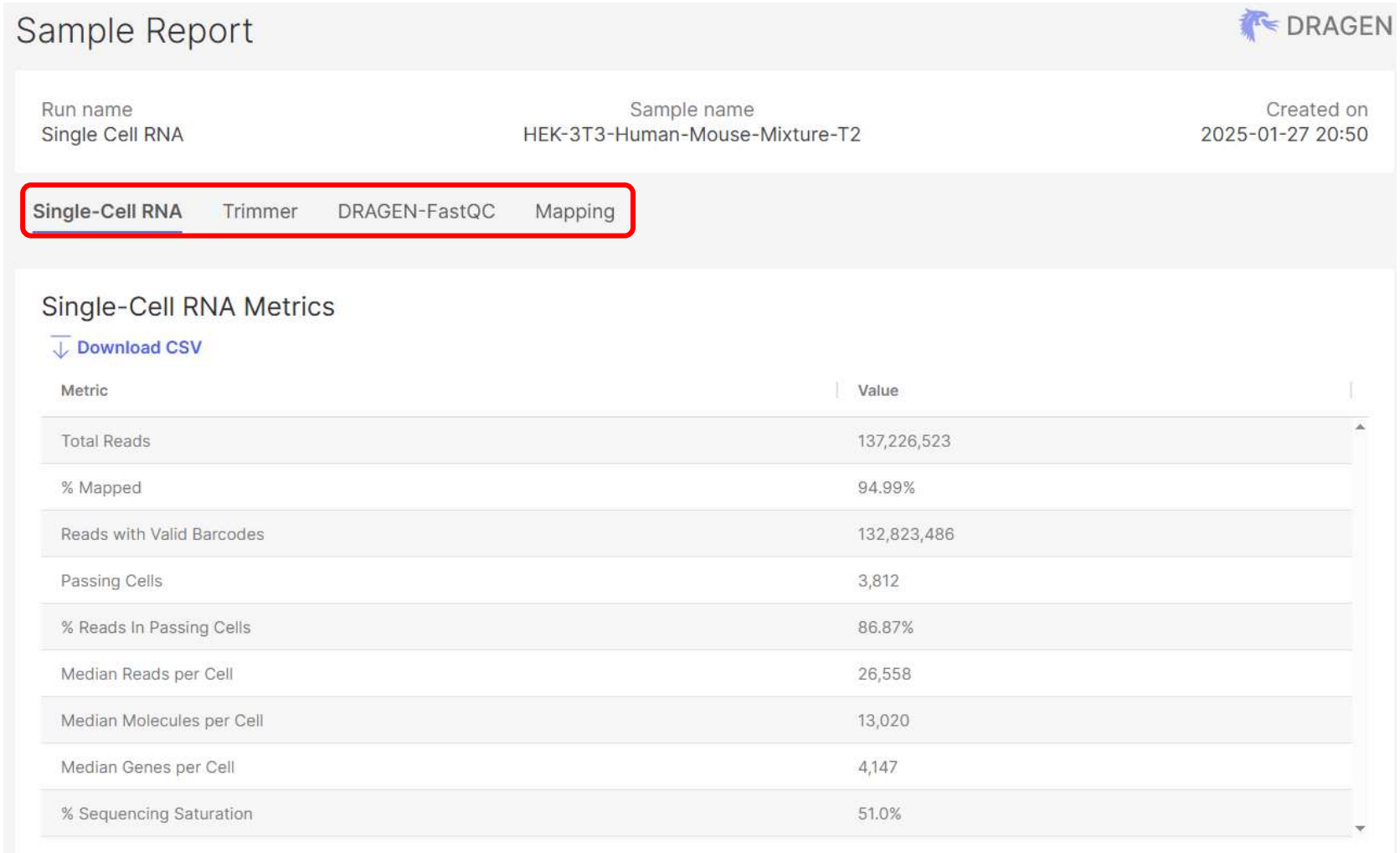
レポートの確認方法 (3/3)

Summary：サンプルごとのレポート概要

Report：各サンプルごとのBarcode Rank Plot、UMAP Plotを含む詳細なレポート

Metric：各サンプルごとの詳細なMetrics情報

Reportファイルのメトリクス情報確認



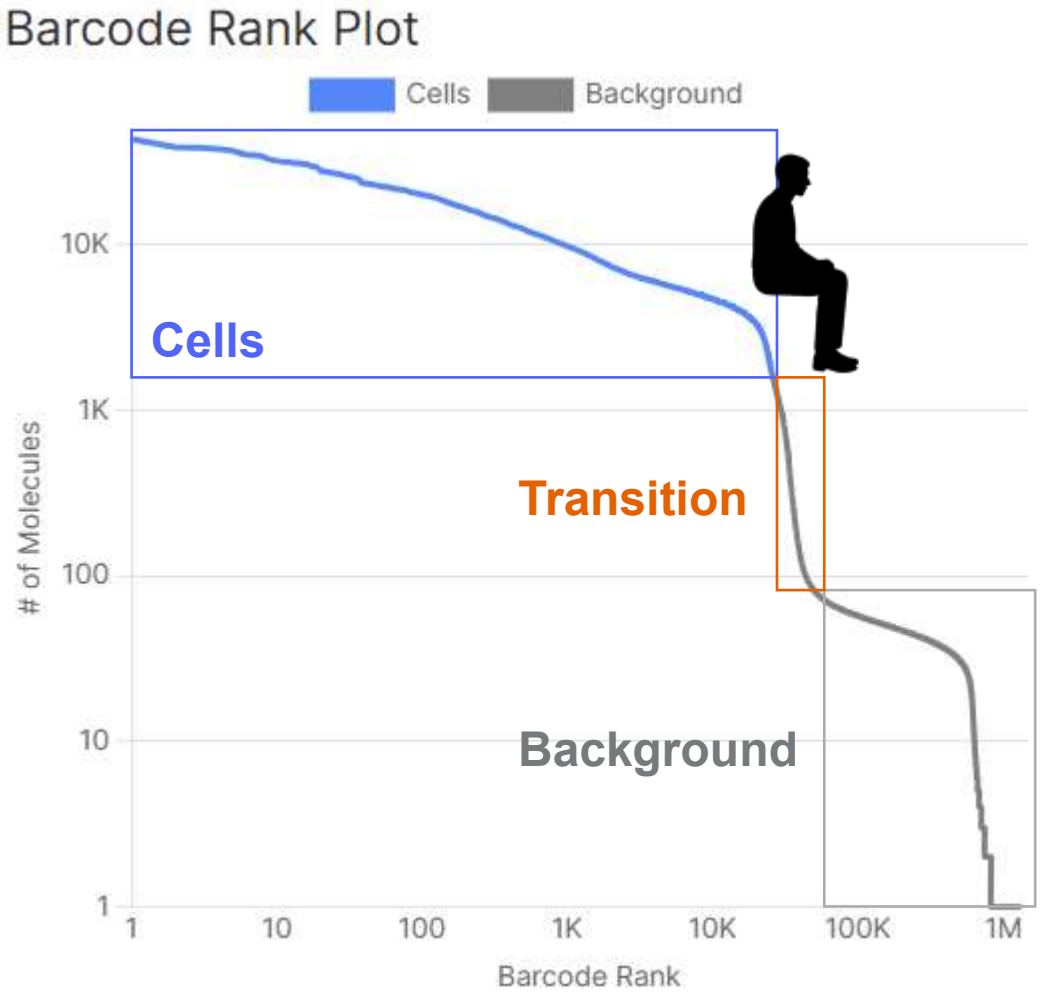
Sample Reportからは以下の4項目のレポートを確認可能

- Single-Cell RNA
- Trimmer
- DRAGEN-FastQC
- Mapping

Single-Cell RNA Metricsの解説

項目	説明	解釈・目安 ※下記の目安はあくまで一例であり、細胞の種類や実験ハンドリングに依存するため、必ずしも以下の範囲内が最良というわけではないことに注意
Total Reads	解析に投入されたリード総数	シーケンス全体の規模を示す。シングルセル解析では通常1万～2万リード程度/細胞の取得が推奨。 例：T10で17,000細胞インプットの場合、1万～2万リード×17,000細胞＝1億7,000万～3億4,000万 (170M～340M) リード程度のTotal Reads取得が推奨。
% Mapped	参照配列へアライメントされたリード割合	通常70～90%以上が望ましい。低い場合はリードの質や参照配列の問題、DNAコンタミ等を疑う。
Reads with Valid Barcodes	有効なセルバーコードが認識されたリード数（PIP由来と判定されたもの）	高いほど良好（Total Readsの70～90%以上）。低い場合は、①バーコード位置指定、②バーコードallowlistの誤り、③OverrideCycles設定、を疑う。
Passing Cells	Barcode Rank Plotに基づき「細胞由来」と判定された細胞数	使用したキットに大きく依存する；T2は2,000 cells, T10は10,000 cells, T20は20,000 cells、T100は100,000 cells前後。実際は捕捉効率によりキットの推定捕捉細胞数の70～90%程度であれば良好と判断。細胞試料の品質・生存率、ライブラリー調製効率、細胞フィルタリング閾値設定により増減。
% Reads In Passing Cells	全リードのうち、Passing Cellに割り当てられた割合	高いほど有効（高い: >70%、中程度: 50~70%、低い: <50%）。低い場合は過度な閾値設定、デブリ・死細胞の混入、RNA品質不良を疑う。
Median Reads per Cell	各細胞に割り当てられたリード数の中央値	Passing Cellsにおいても、推奨リード数/細胞と大きな乖離がないかの評価に利用。Passing Cellsが少ないと高く、多いと低くなりやすい。乖離が大きい場合はシークエンス深度や細胞投入数を調整。
Median Molecules per Cell	各細胞で同定された一意な分子数（IMI / BIによる推定）の中央値	ライブラリー多様性・細胞捕捉効率を示す指標。値はシーケンス深度やライブラリー調製効率だけでなく、細胞種ごとのRNA量の違いにも強く依存。Reads数や% Sequencing Saturationと合わせて解釈する必要がある。
Median Genes per Cell	各細胞で検出された遺伝子数の中央値	サンプル依存で大きく変動。普遍的な推奨値はなく、サンプル種、細胞種、シークエンス深度、サンプル品質を考慮に入れ解釈。極端に低い場合はライブラリ品質不良や死細胞混入を疑う。
% Sequencing Saturation	シーケンス飽和度 ＝100 × [1 − (ユニーク分子数 / 総リード数)]	高いほど新規分子検出が頭打ち。初回は推奨リード数で測り、以後はこの値と細胞捕捉率を考慮して、シーケンス深度を調整。

細胞フィルタリング — Barcode Rank Plot



各バーコードに割り当てられた**分子数**を降順に並べて描いたグラフ
- **横軸**：バーコード（セル）を多い順に並べたランク
- **縦軸**：バーコードごとの分子数（通常logスケール）

閾値線（Ratio / Inflection / Fixed いずれかで算出）が引かれ、その左側が **Passing Cells**、右側が **Low / non-cell barcodes** と判定される。
- カーブが急峻で膝（knee）が明確 → 高品質なサンプル。
- カーブがなだらかで膝（knee）が不明瞭 → 死細胞やデブリ混入、過剰に細胞を投入した可能性。

Barcode Rank Plotは3つのエリアに分けられる。
- Cells：高カウントで「確実に細胞」と言えるもの
- Background：低カウントでノイズ由来と考えられるもの
- Transition：曖昧な領域。低RNA量の細胞もしくはノイズ

Barcode Rank PlotのKneeの最適化 (1/2)

DRAGEN Single Cell RNAのThresholding MethodでRatio、Inflection、Fixedの3つから選択可能

Ratio法

- DRAGENが **2つの閾値候補 (Te, Tm)** を計算し、その大きい方を採用
  - **Tm** = 期待細胞数の10パーセンタイルにある細胞のカウントの10%
  - **Te** = 期待細胞数の中で最も少ない細胞のカウントの50%
- **特徴**：期待細胞数に応じて **柔軟にカットオフ**を設定できる
- **用途**：デフォルト推奨。大半のサンプルで安定して動作

Inflection法

- カウントの累積分布を解析し、変曲点（カーブが折れる点）を閾値に設定
- **特徴**：Barcode Rank曲線の「膝（knee）」や「変曲点」を検出する方法
- **用途**：ノイズが多いサンプルや、期待細胞数を明確に設定しにくい場合に有効

Fixed法

- ユーザーが **期待する細胞数を強制的に固定**
- 閾値は、その細胞数を得るように設定される
- **特徴**：実際のバーコード分布にかかわらず指定数を出力
- **用途**：実験デザイン上「細胞数が確定している」場合や、再現性を優先したい場合

Barcode Rank PlotのKneeの最適化 (2/2)

均質な細胞集団（細胞株など）

一般的にBarcode Rank Plotの「knee」まで（青い線がTransitionエリアの上部まで伸びている）呼び出すことを推奨

- 例：**HEK293** や **CHO細胞**などの培養細胞株は、ほとんどの細胞が類似した大きさ・RNA量を持つため、カウント分布が比較的均一である。そのため、「knee」以降のバーコードは急激にカウントが落ち、明確にバックグラウンドと区別できることが多く、**kneeまでをCellsと定義すれば妥当**である。
- このケースでは、Transition領域を広く含める必要はほとんどない。

不均一な集団

一般的な手法として Barcode Rank Plotの「knee」を特定し、そのKnee Pointで特定されたバーコードの数よりも**約30%多くバーコードを同定**することを推奨

- 例：**PBMC（末梢血単核球）**では、リンパ球（小型でRNA量が少ない）と単球（大型でRNA量が多い）が混在する。単純にknee で区切ると、RNA量が少ないリンパ球由来のバーコードが **Backgroundと誤って除外**される可能性がある。
- そこで、kneeからさらに**30%程度多め**にバーコードを含めることで、「低発現だが実際には細胞」であるものを拾うことが可能。同様に、**脳組織**や**腫瘍サンプル**なども細胞の大きさ・転写活性にバリエーションが大きいため、この方法が有効である。この「30%ルール」により、ランクプロットの「cliff」（急落部分）の**1/3～1/2程度まで**がCellsとして扱われ、Transition領域の一部を救済可能。

*HEK293: Human Embryonic Kidney cells 293
*CHO: Chinese Hamster Ovary cells
*PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

Barcode Summary Metrics

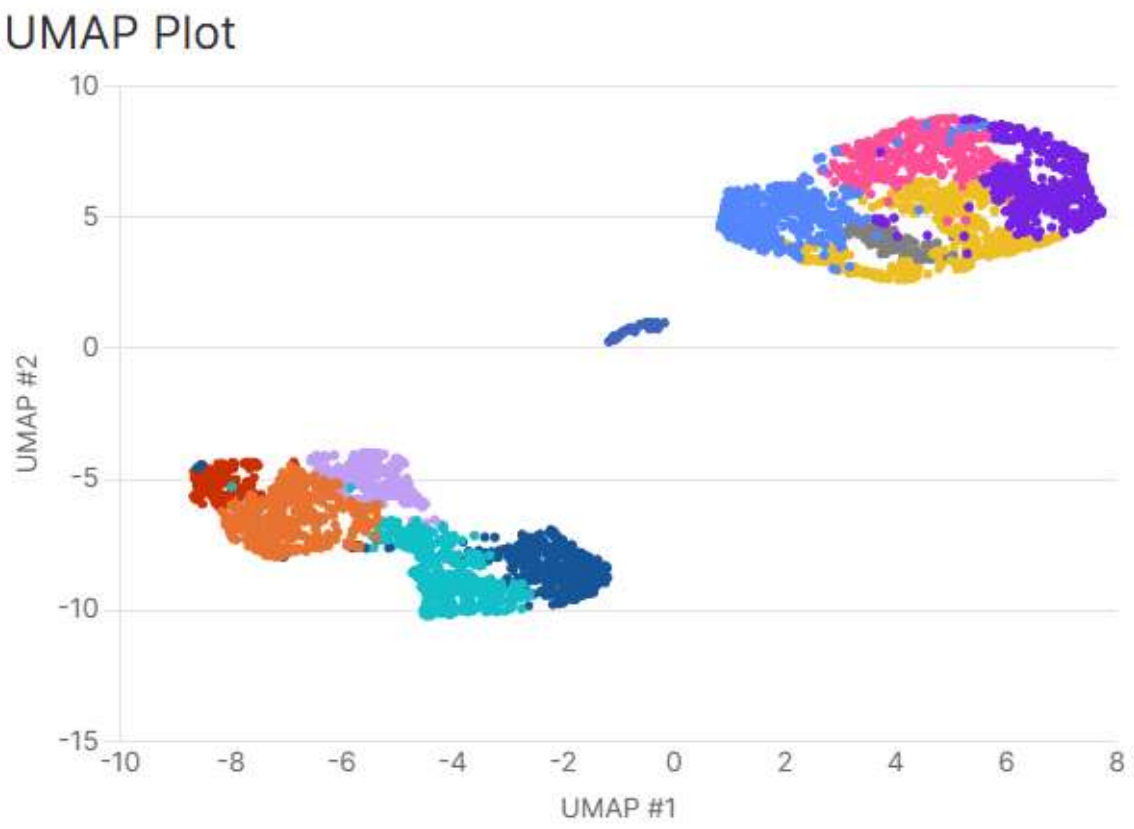
Barcode Summary Metrics

Download CSV

Cell Type	Total Reads	Total Barcodes	Molecules	Gene Reads	Mitochondrial Reads	Genes
PASS	107,553,496	3,812	52,719,122	79,449,433	4,465,036	16,232,885
LOW	16,251,777	254,656	8,308,957	11,848,141	701,795	7,033,724

項目	定義	解釈・目安 ※下記の目安はあくまで一例であり、細胞の種類や実験ハンドリングに依存するため、必ずしも以下の範囲内が最良というわけではないことに注意
Cell Type	バーコードの分類	PASS：Thresholdを超えたバーコード（実際の細胞と判定） LOW：Threshold未満（ノイズや細胞外RNA、死細胞由来）
Total Reads	各Cell Typeに分類されたリード総数	サンプル全体のリード数を把握。PASSに多くのリードが集中していることが望ましい（通常70%以上）。
Total Barcodes	該当セルタイプに分類されたバーコード数	PASS数 = 実際に解析対象となる細胞数。キットに依存。
Molecules	一意な分子数	細胞ごとのユニーク分子数を合計。PASSで多いほどライブラリ多様性が高い。LOW側に多すぎる場合はノイズ混入を疑う。
Gene Reads	遺伝子にマッピングされたリード数	発現解析に有効なリード。PASSで多いことが望ましい。LOWに多い場合は死細胞RNAが混入している可能性。
Mitochondrial Reads	ミトコンドリア由来のリード数	高すぎると細胞ストレスや死細胞由来のシグナルを反映。一般的に全リードの10～15%以下であること望ましい。
Genes	各バーコード（細胞）で、少なくとも 1 分子が観測された遺伝子数を数え、その数をすべてのバーコードについて合計した値	PASSで高い値を示すことが望ましい。LOWに多い場合は背景RNA由来。通常は1細胞あたり数千遺伝子（集計値としては数百万～数千万があり得る）。

UMAP Plot



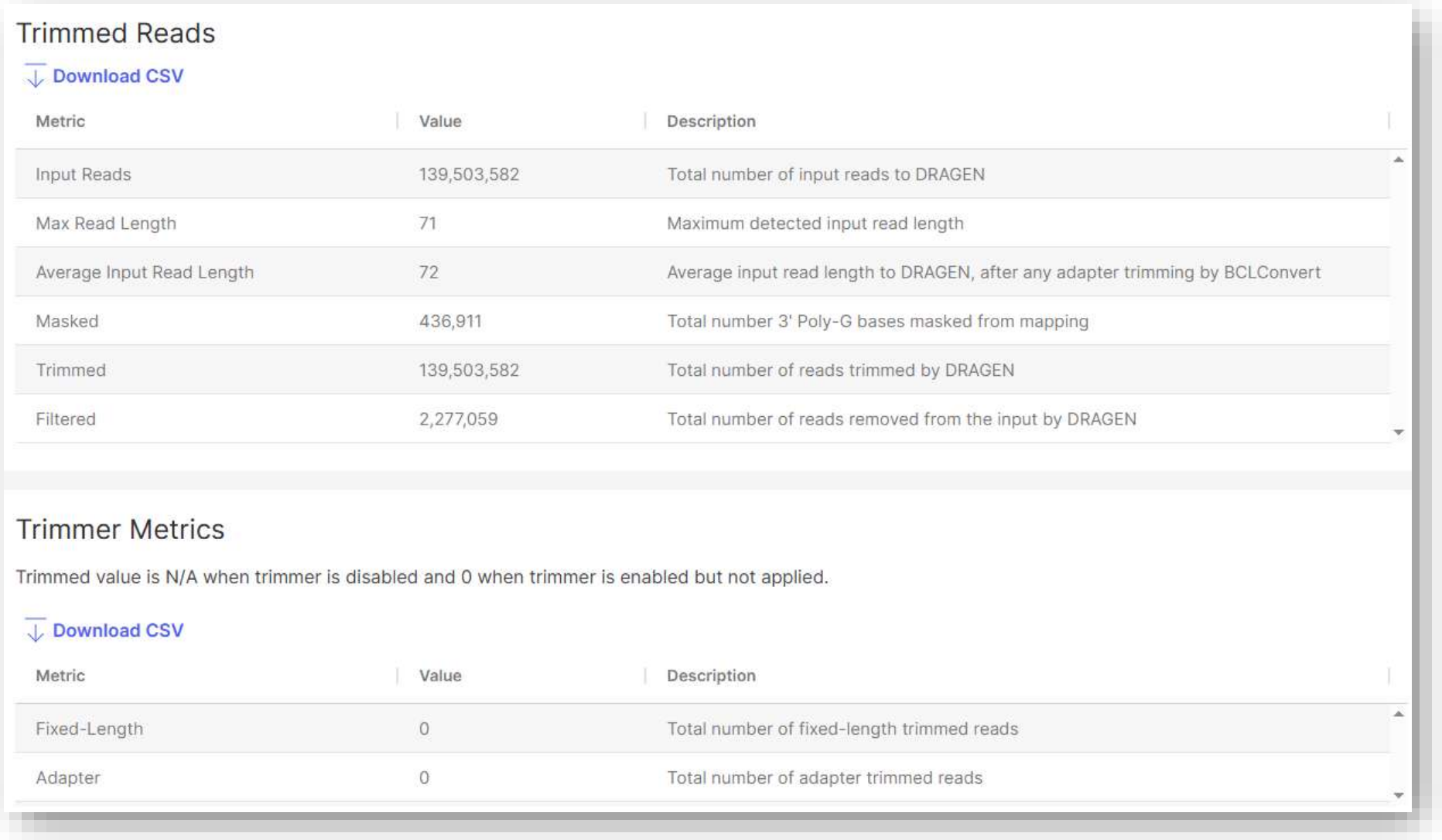
DRAGEN Single Cell RNAアプリのUMAP Plotは、Barcode Rank Plotによる閾値設定で選ばれた「Passing Cells」だけを入力として、PCA → k-NN → UMAP の次元削減処理を行い、細胞間の遺伝子発現の関係性を視覚化

UMAP Plotで着目すべき主要ポイント

1. **クラスター構造**
   - 分離の明瞭さ（はっきり区切れるか、連続か）
   - クラスターの大きさ（主要集団と希少集団のバランス）
   - クラスター間の距離（近接＝類似、遠い＝異なる細胞群）
2. **QC視点**
   - 小クラスターや外れ点が低品質細胞でないか（ミトコンドリア比率・分子数で確認）
   - クラスターごとのデータ品質をチェック
3. **生物学的解釈**
   - 既知の細胞型やサンプル特性と対応しているか
   - 新規・希少集団が見えていないか

*PCA: Principal Component Analysis
*k-NN: k-Nearest Neighbors

Trimmer Report



Trimmed Reads

Download CSV

Metric	Value	Description
Input Reads	139,503,582	Total number of input reads to DRAGEN
Max Read Length	71	Maximum detected input read length
Average Input Read Length	72	Average input read length to DRAGEN, after any adapter trimming by BCLConvert
Masked	436,911	Total number 3' Poly-G bases masked from mapping
Trimmed	139,503,582	Total number of reads trimmed by DRAGEN
Filtered	2,277,059	Total number of reads removed from the input by DRAGEN

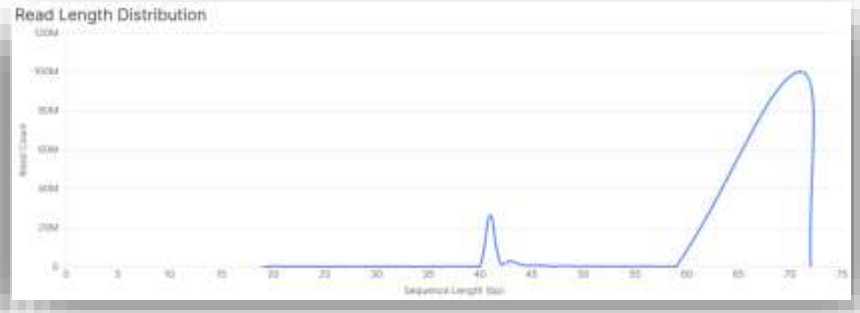
Trimmer Metrics

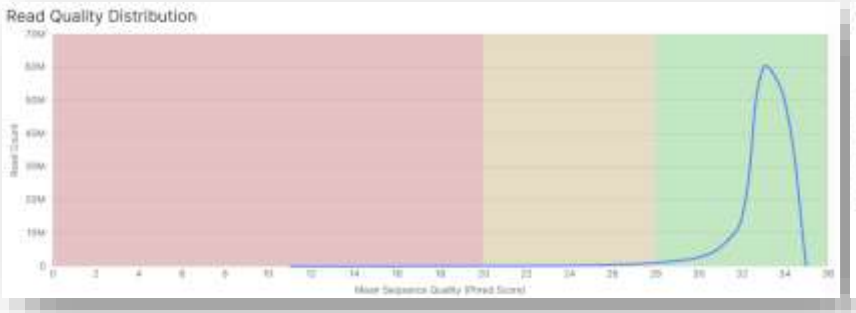
Trimmed value is N/A when trimmer is disabled and 0 when trimmer is enabled but not applied.

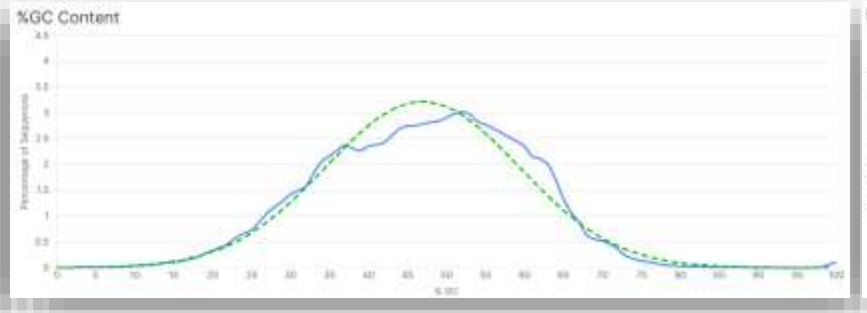
Download CSV

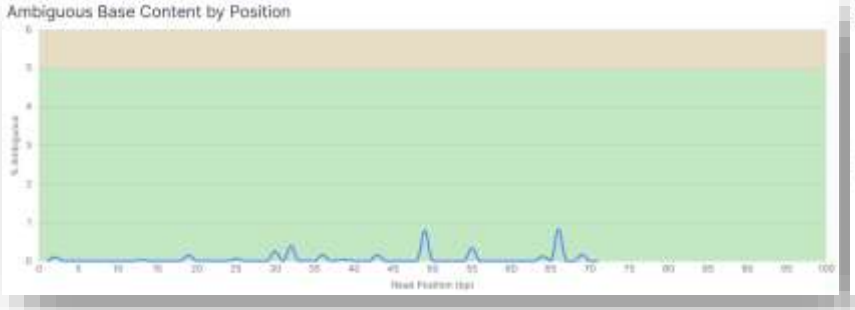
Metric	Value	Description
Fixed-Length	0	Total number of fixed-length trimmed reads
Adapter	0	Total number of adapter trimmed reads

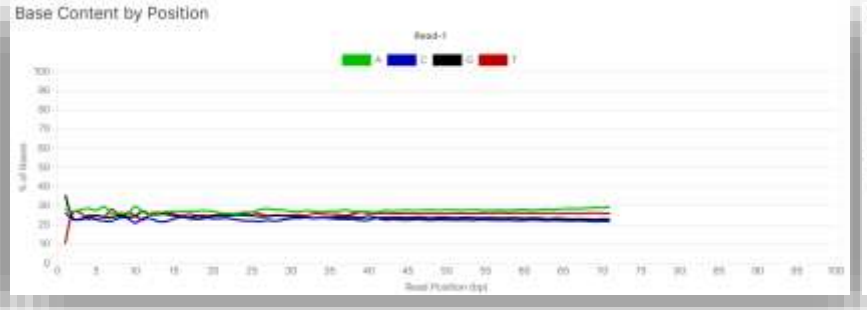
DRAGEN-FastQC Report

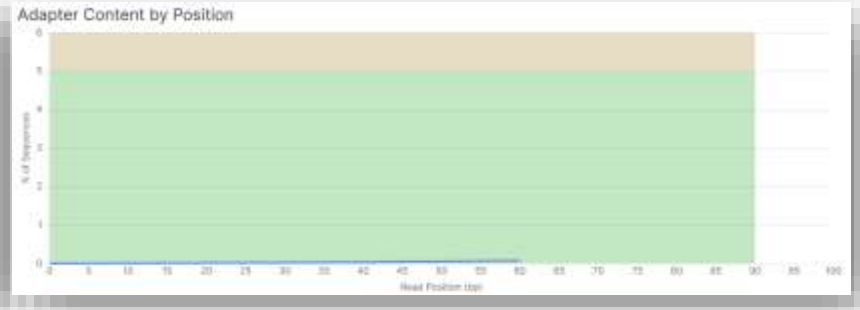












Mapping Report

Read-Level Metrics

Download CSV

Metric	Value	Description
Total input reads	137,226,523	Total number of input reads
QC-failed reads	2,277,059	Total number of reads failing one or more quality checks
% QC-failed	1.66%	Percentage of reads failing one or more quality checks
Unique reads	137 M	Total number of unique reads
% Unique	100%	Percentage of reads that are unique

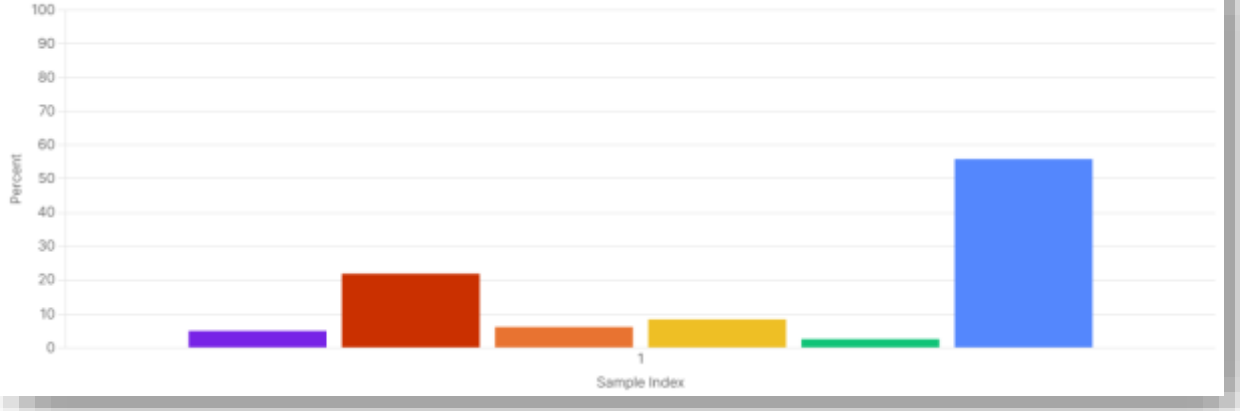
Base-Level Metrics

Download CSV

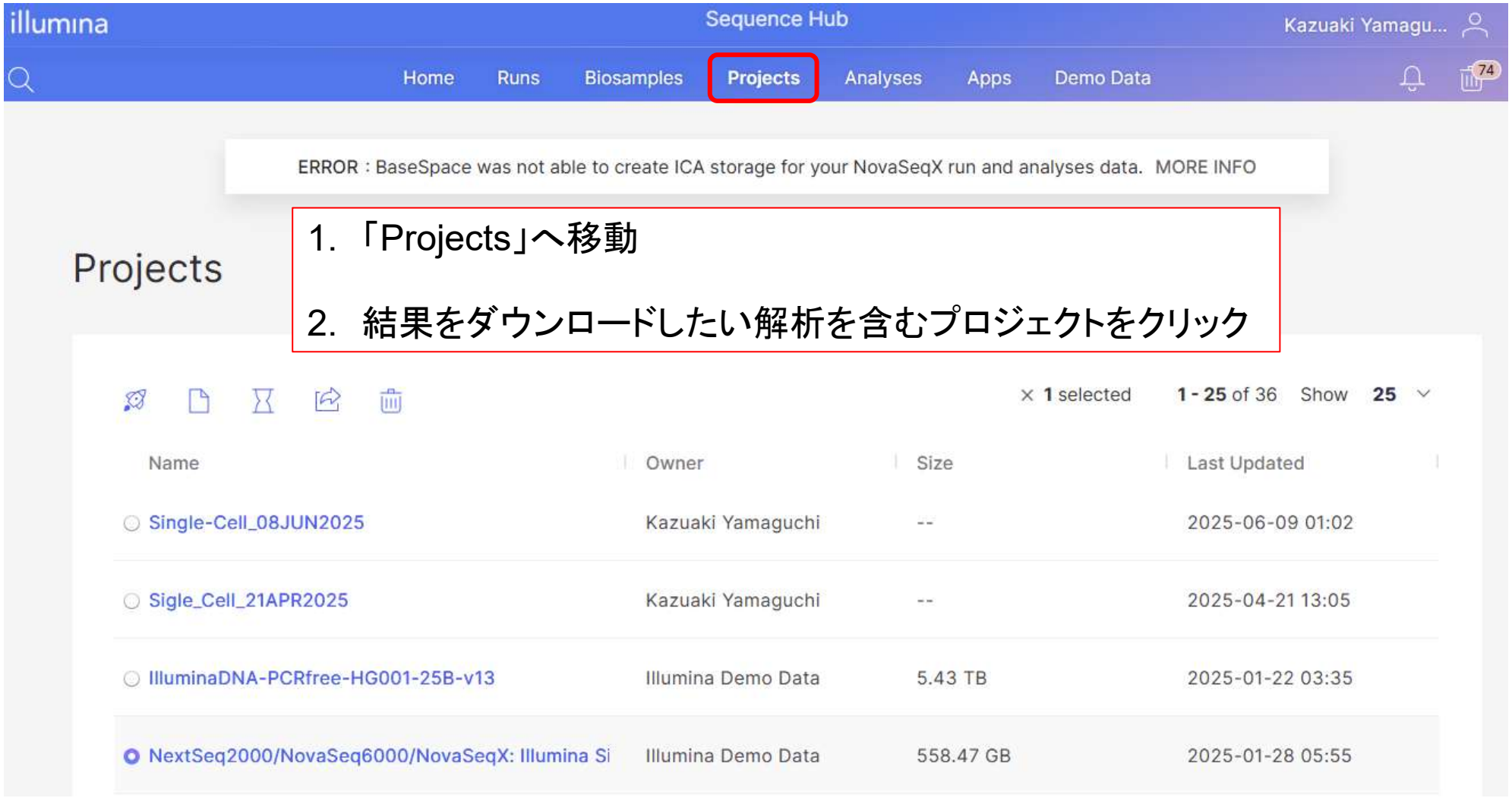
Metric	Value	Description
Total bases	8.654 M	Total number of input bases
Mapped R1	8.315 M	Total number of mapped bases on R1
% Mapped R1	96.09%	Percentage of R1 bases mapped
% Q30 R1	92.16%	Percentage of R1 bases with phred quality score >= 30

Deduplication

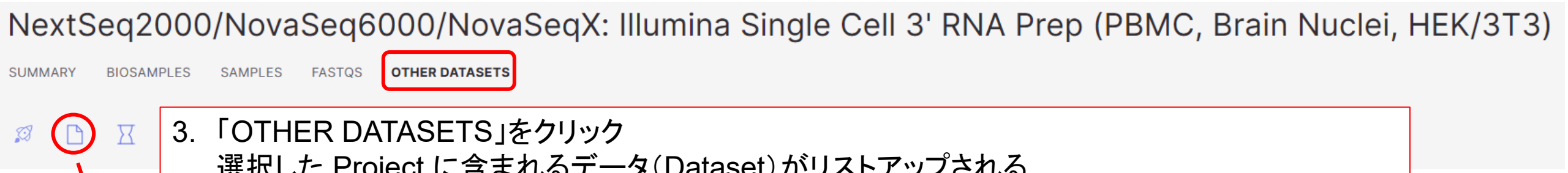
Read MAPQs



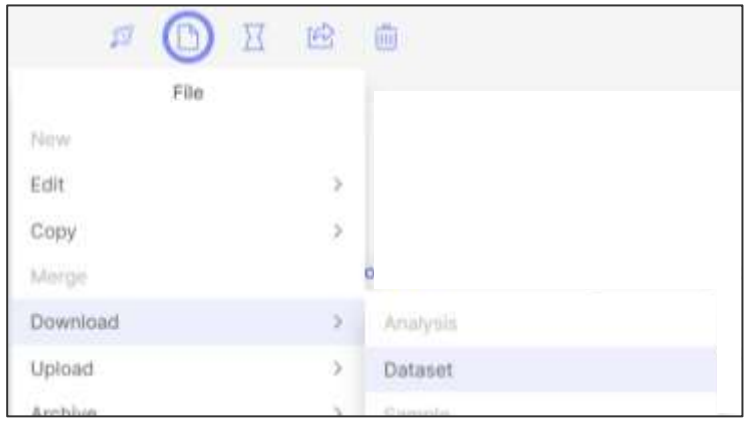
出力データのダウンロード (1/3)

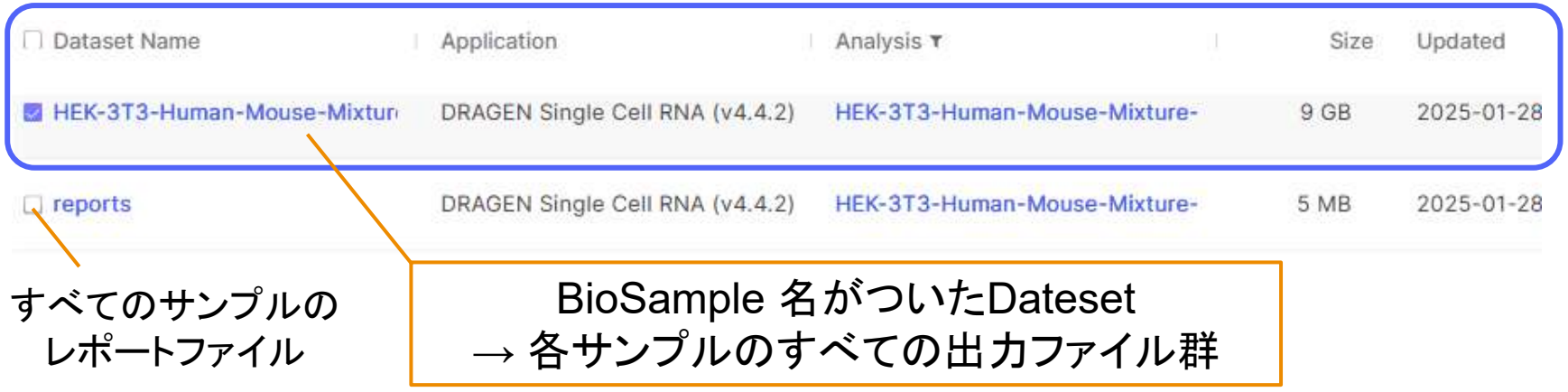


出力データのダウンロード (2/3)



3. 「OTHER DATASETS」をクリック
   選択した Project に含まれるデータ（Dataset）がリストアップされる
4. Application・Analysis・Updated (日付) を確認しつつ、ダウンロードしたい DataSet をチェック ☑



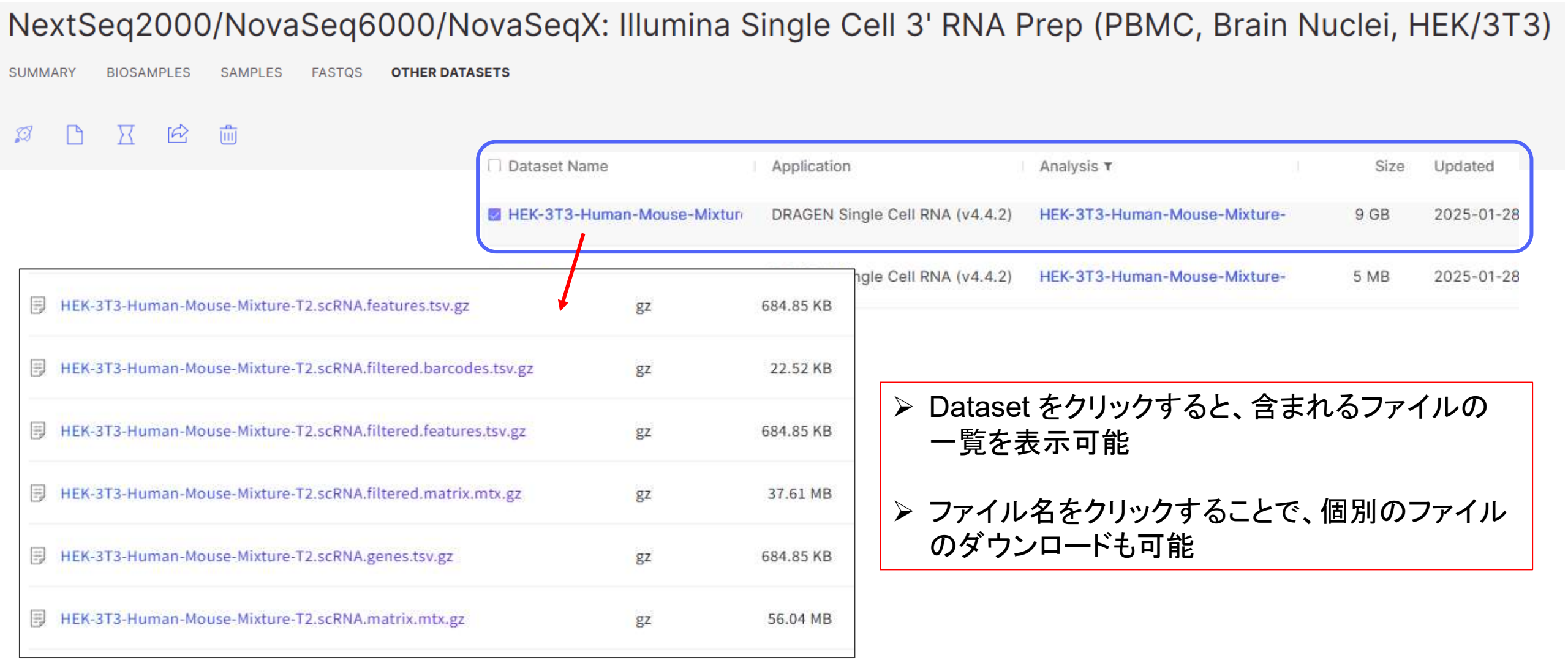


すべてのサンプルの
レポートファイル

BioSample 名がついたDateset
→ 各サンプルのすべての出力ファイル群

5. 「File」アイコンをクリック
6. Download > Dataset と進んで、チェックを入れたファイル群をまとめてダウンロード

出力データのダウンロード (3/3)



- Dataset をクリックすると、含まれるファイルの一覧を表示可能
- ファイル名をクリックすることで、個別のファイルのダウンロードも可能

シングルセル解析で出力されるマトリックスファイル (1/2)

DRAGEN Single Cell RNAアプリでは、シングルセル解析で重要となるマトリックスファイル：**生マトリックスファイル (Raw Feature-barcode Matrix File)** と **フィルタ後マトリックスファイル (Filtered Feature-barcode Matrix File)** が出力される

生マトリックスファイル：

- <prefix>.scRNA.**matrix.mtx.gz**
  スパースマトリックス形式での各細胞/遺伝子ペアのユニークMolecular Identifierのカウント
- <prefix>.scRNA.**barcodes.tsv.gz**
  マトリックスからの各細胞のセルバーコードシーケンス。すべてのセルバーコードを含む
- <prefix>.scRNA.**features.tsv.gz**
  マトリックス内の各遺伝子およびフィーチャーの遺伝子名、ID、およびフィーチャータイプ

フィルタ後マトリックスファイル（閾値を適用して細胞をPASS細胞とLOW非細胞バーコードに分けた後のデータ）：

- <prefix>.scRNA.filtered.**matrix.mtx.gz**
  スパースマトリックス形式での各PASS細胞/遺伝子ペアのユニークMolecular Identifierのカウント
- <prefix>.scRNA.filtered.**barcodes.tsv.gz**
  マトリックスからの各PASS細胞のセルバーコードシーケンス
- <prefix>.scRNA.filtered.**features.tsv.gz**
  マトリックス内の各遺伝子およびフィーチャーの遺伝子名、ID、フィーチャータイプ（<prefix>.scRNA.features.tsv.gzと同一）

シングルセル解析で出力されるマトリックスファイル (2/2)

- **matrix.mtx.gz**、**barcodes.tsv.gz**、**features.tsv.gz**の3つのファイルを組み合わせて、Partek FlowやSeuratといった三次解析にインプットすることでより詳細な解析が可能
- matrix.mtx.gzで得られたカウントデータをbarcodes.tsv.gzとfeatures.tsv.gzで対応する細胞と遺伝子にマッピングし、遺伝子発現解析を行うことが可能
- barcodeSummaryファイル（<prefix>.scRNA.barcodeSummary.txt）には、PASSおよびLOW非細胞の完全なリストと、各バーコードに対するリード、分子、遺伝子の数が含まれる
- シングルセルRNAメトリックスファイル（ <prefix>.scRNA_metrics.csv）には、リードバーコード、トランスクリプトとフィーチャー、分子数、細胞数に関する要約メトリックが含まれる。また、PASS細胞の呼び出しに使用された閾値も含む

出力ファイルの詳細な説明については、「Other scRNA Prep | DRAGEN」に記載

＊PIPseqモードの場合は、DRAGENレポートから追加の出力ファイルと図が生成される場合がある

その他のメトリックス・QCファイル

メトリックスファイル

- <prefix>.scRNA.barcodeSummary.tsv
- <prefix>.scRNA.barcodeCounts.txt
- <prefix>.scRNA.metrics.csv

QCファイル

- <prefix>.scRNA.fastqc_metrics.csv
- <prefix>.scRNA.mapping_metrics.csv
- <prefix>.scRNA.trimmer_metrics.csv

三次解析:
Partek Flow のご紹介

5

～Illuminaまたはサードパーティ製
ソフトウェアでの下流解析に関する補足～

Partek Flow (1/6)

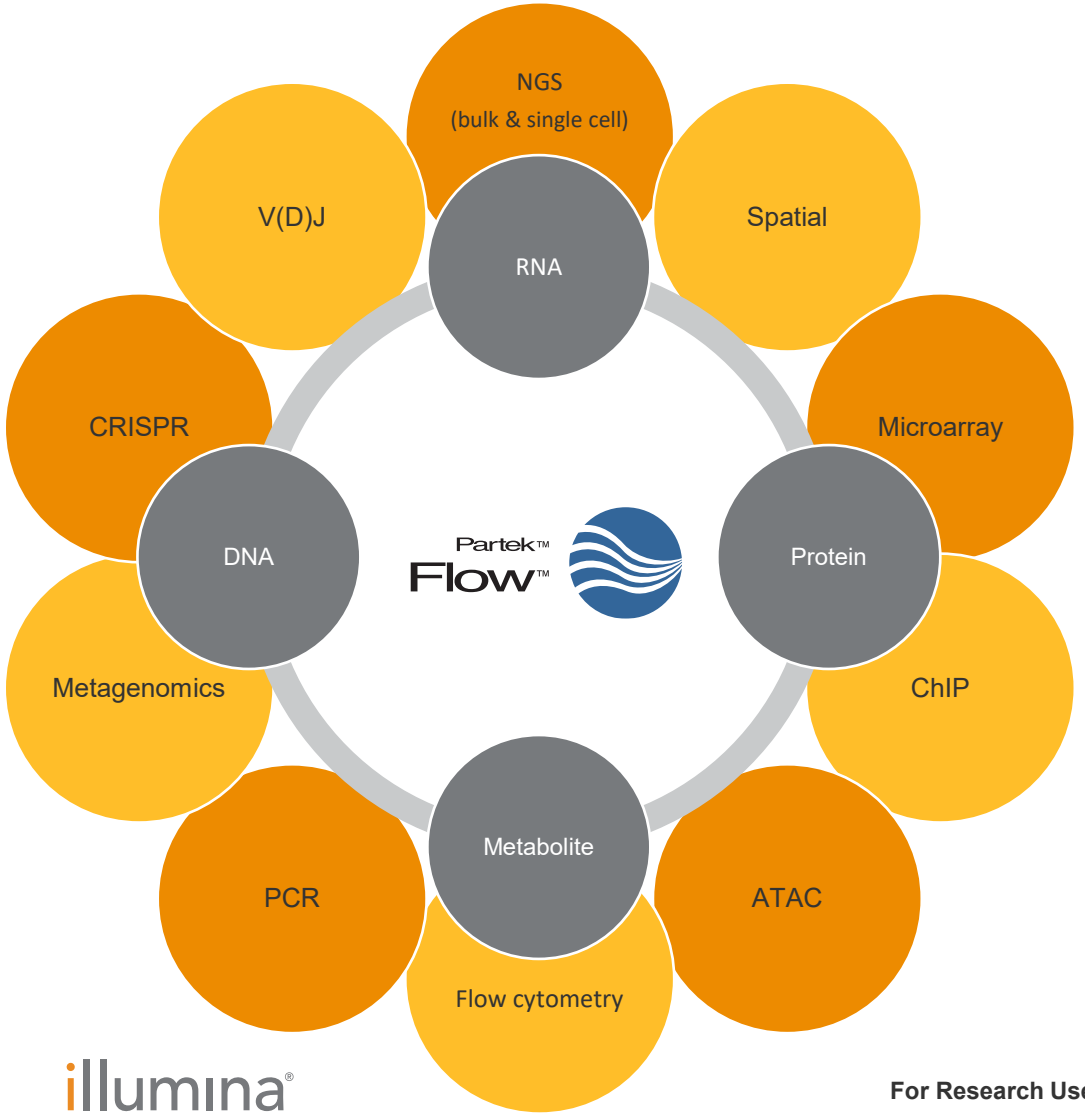
直感的で、強力で、インタラクティブなバイオインフォマティクスツール

次世代シーケンシングと大規模マルチオミクスに関する簡略化された三次元解析

- グラフィカルユーザー体験
- 業界をリードする可視化技術
- ゴールドスタンダードの統計分析

Partek Flow (2/6)

包括的なアプリケーションサポートを備えた単一のプラットフォーム



アプリケーション	統計解析
ノーマライゼーションとスケーリング	RPKM、TMM、scTransform、Scranデコンボリューション、TF-IDF正規化など
次元削減	PCA、t-SNE、UMAP、SVD
バッチ効果の除去	一般線形モデル、Harmony、Seurat3積分
クラスタリング	K平均法、グラフベース、階層的クラスタリング分析
発現差解析	DESeq2、GSA、ハードルモデル、LIMMAトレンド、LIMMA-voom、負の二項回帰、ポアソン回帰、一元配置分散分析、ノンパラメトリック分散分析（Kruskal-Wallis検定およびDunn検定）、ウェルチの分散分析、多因子分散分析、およびalt-splicing分散分析
その他	生存解析（カプランマイヤー回帰とコックス回帰）、相関分析、バイオマーカー計算、記述統計

*CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, RPKM: Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads, TMM: Trimmed Mean of M values, TF-IDF: Term Frequency–Inverse Document Frequency, t-SNE: t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, SVD: Singular Value Decomposition, GSA: Gene Set Analysis, LIMMA: LInear Models for Microarray data

Partek Flow (3/6)

シングルセルの計数から結果出力まで ー ベストプラクティスとツールを活用したガイド

QA/QC*：死細胞とマルチプレットを除外

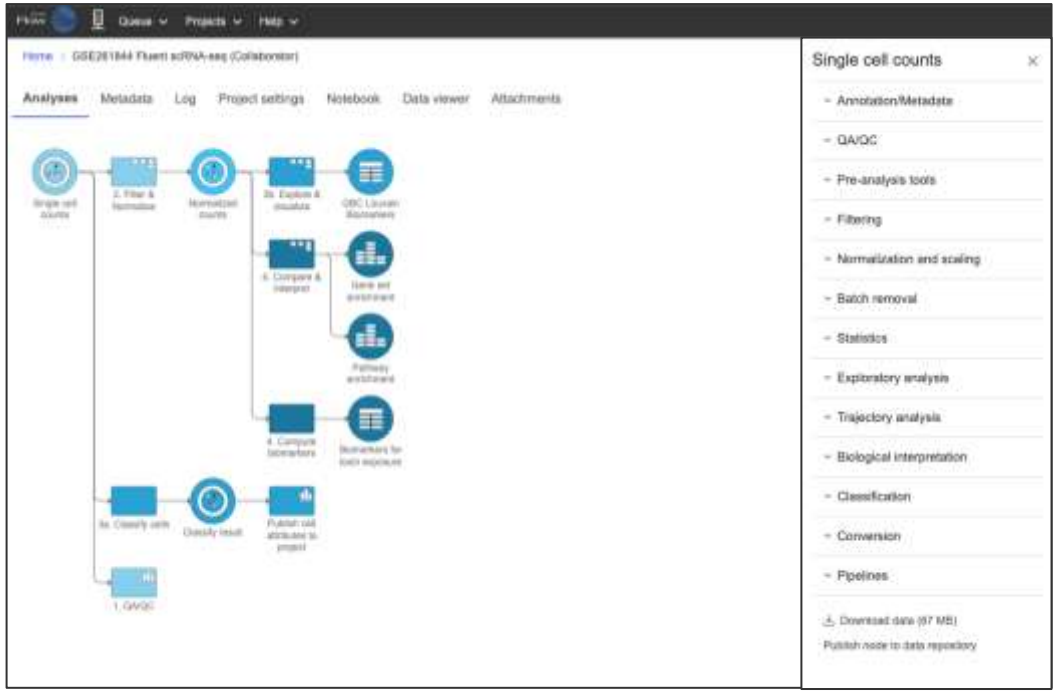
Filter*：データ内のノイズを除去し、データを正規化

データ探索と可視化：次元削減、主成分分析（PCA）、UMAP、およびt-SNE

バイオマーカー計算：グラフベースのクラスタリングとバイオマーカーを用いた細胞タイプの同定

比較と解析：複数のグループおよび組み合わせにおける発現量差解析

生物学的解釈：GSEA、GO、およびパスウェイエンリッチメント解析



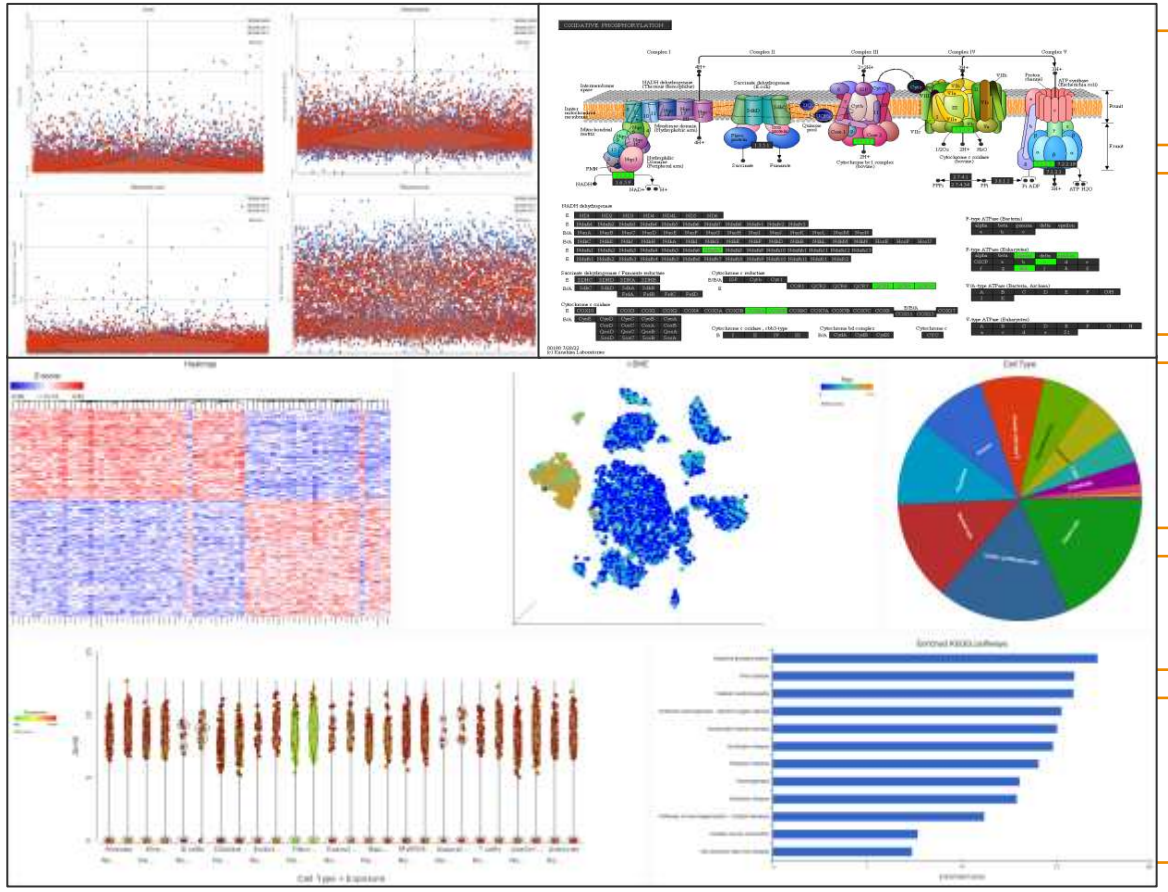
DRAGEN

*速度と精度を重視する場合、DRAGENを使用して品質管理（QA/QC）とフィルタリングを実施

*QA: Quality Assurance
GSEA: Gene Set Enrichment Analysis
GO: Gene Ontology

Partek Flow (4/6)

結果の可視化



scQAQC plot

PCA, UMAP, t-SNE, and biomarkers table

Dot plot, volcano plot, heat map, and bubble map

Pie chart and bar chart

GSEA, GO bar graph, and KEGG pathway map

Partek Flow (5/6)

グラフの作成・設定

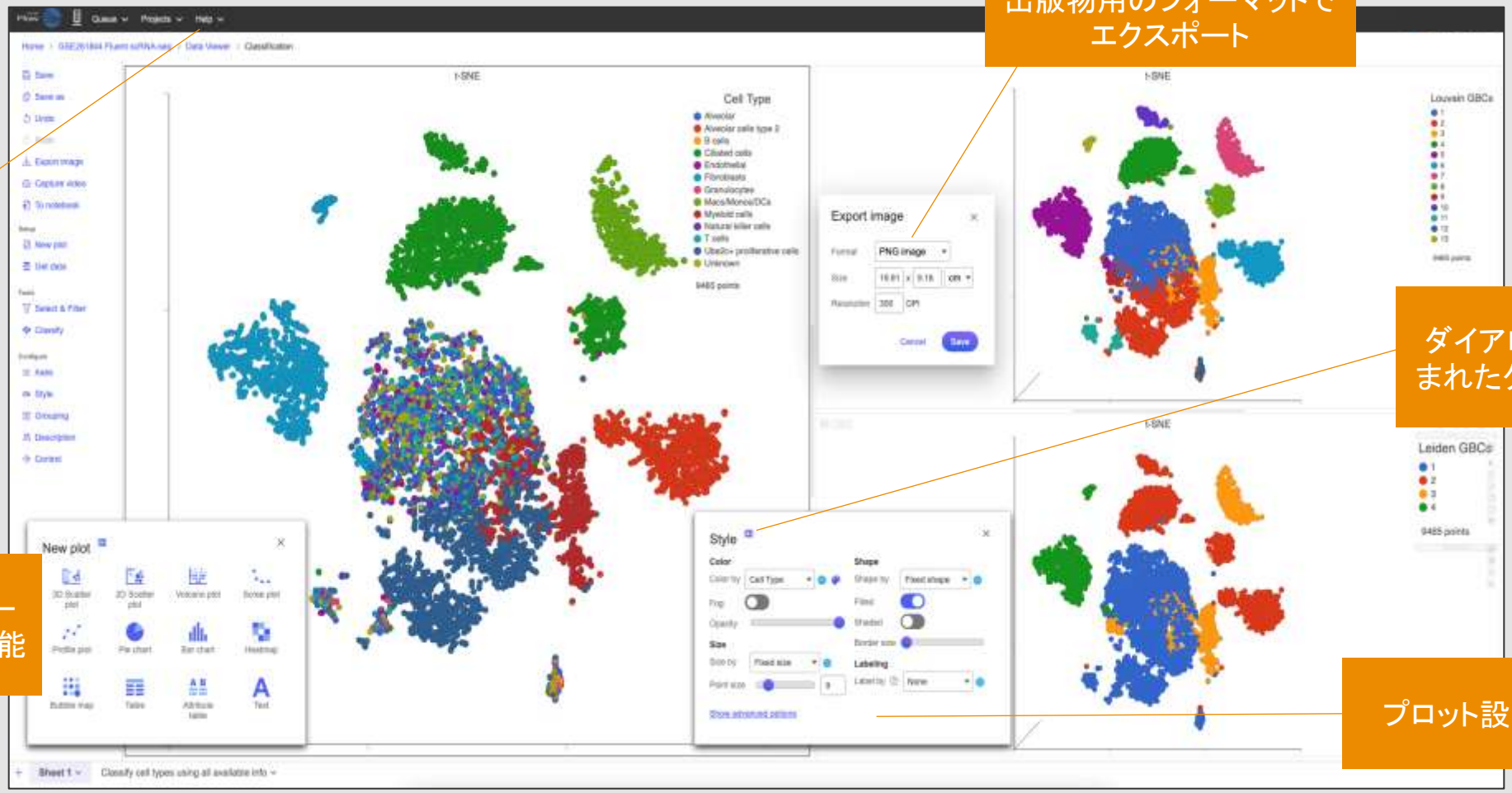
動画、FAQ、ドキュメント、およびサポート連絡先

出版物用のフォーマットでエクスポート

ダイアログ内に埋め込まれたクイック操作動画

多様なストーリー展開から選択可能

プロット設定のオプション



Partek Flow (6/6)

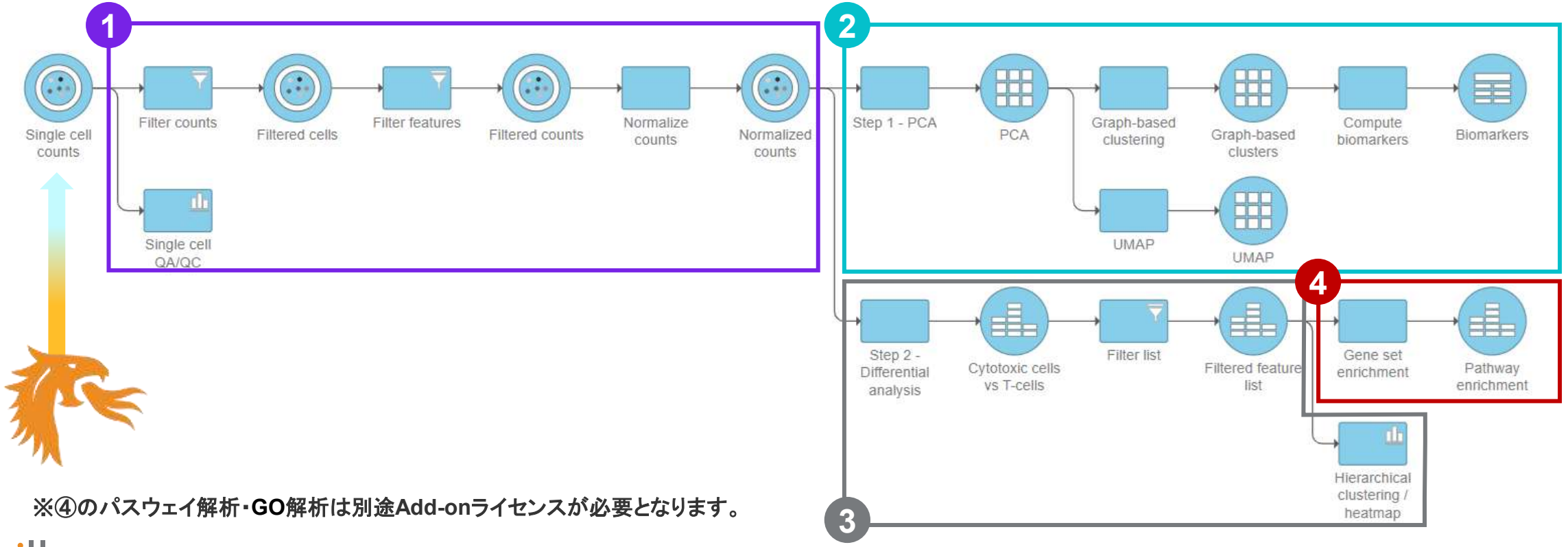
シングルセル解析フロー例

1 **前処理**
QA/QC
遺伝子フィルタリング
正規化

2 **細胞タイプの同定**
次元削減
クラスタリング分類

3 **差分分析**
比較
可視化

4 **生物学的解釈**
パスウェイ解析
遺伝子エンリッチメント解析



※④のパスウェイ解析・GO解析は別途Add-onライセンスが必要となります。

サードパーティ製ソフトウェアを使用した三次解析

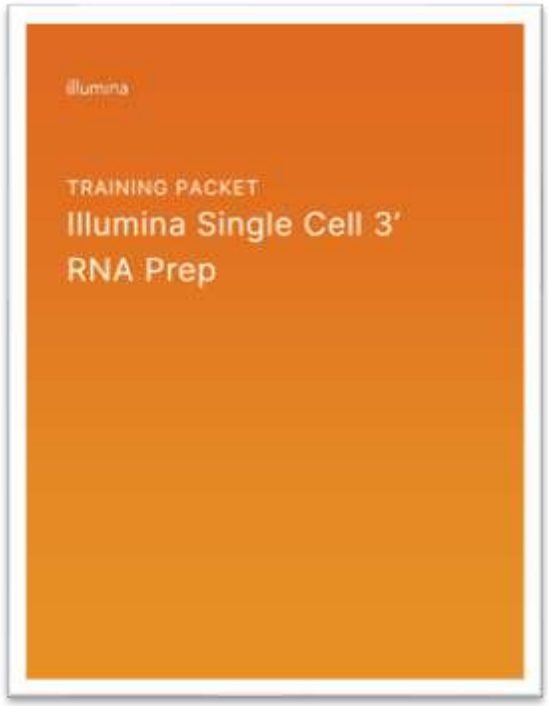
1. **Seurat との互換性**
   - DRAGEN Single Cell RNAアプリの出力は**matrix.mtx.gz, barcodes.tsv.gz, features.tsv.gz** 形式の**Feature-barcode Matrix**
   - これは **10x Genomics Cell Ranger** と同じ形式（MTX + TSV）なので、Read10X() → CreateSeuratObject() でそのまま読み込み利用可能

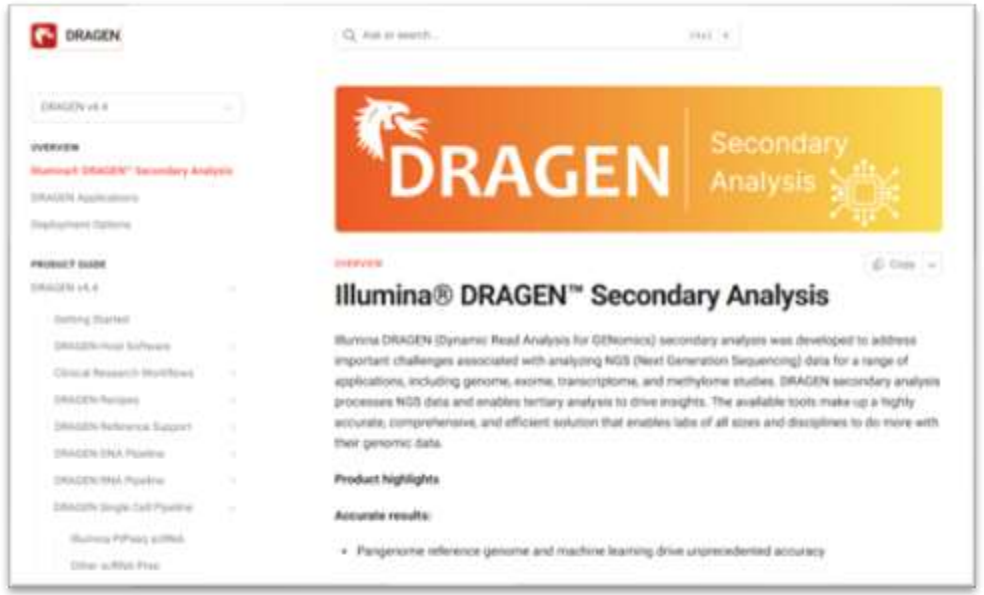
2. **その他**
   - BSSH上にあるデモデータを利用した事前テストを推奨

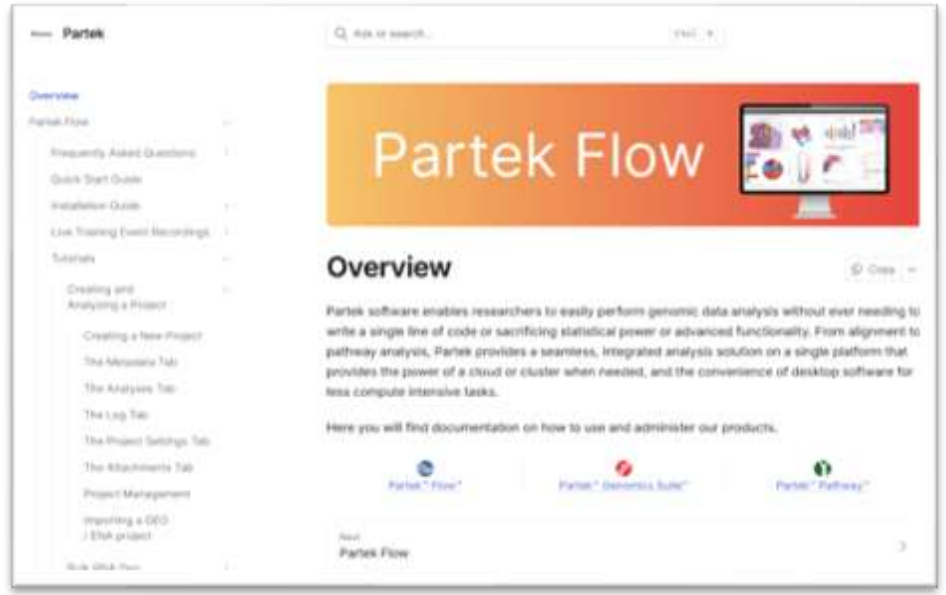
※BSSHへのご登録後、アクセスいただけます。

Seuratを含むサードパーティ製ソフトウェアはIlluminaのサポート対象外であり、
動作および弊社でのお問い合わせへの対応は保証できません。

Learn More: 本日ご紹介した資料の詳細







TRAINING PACKET

Illumina DRAGEN Secondary Analysis

Partek Flow

Thank you

Kazuaki Yamaguchi

jp.illumina.com | techsupport@illumina.com

illumina®

Appendix

ウェビナーのご紹介

日時
2025/04/24
03:00 PM

Location
Japan
Asia

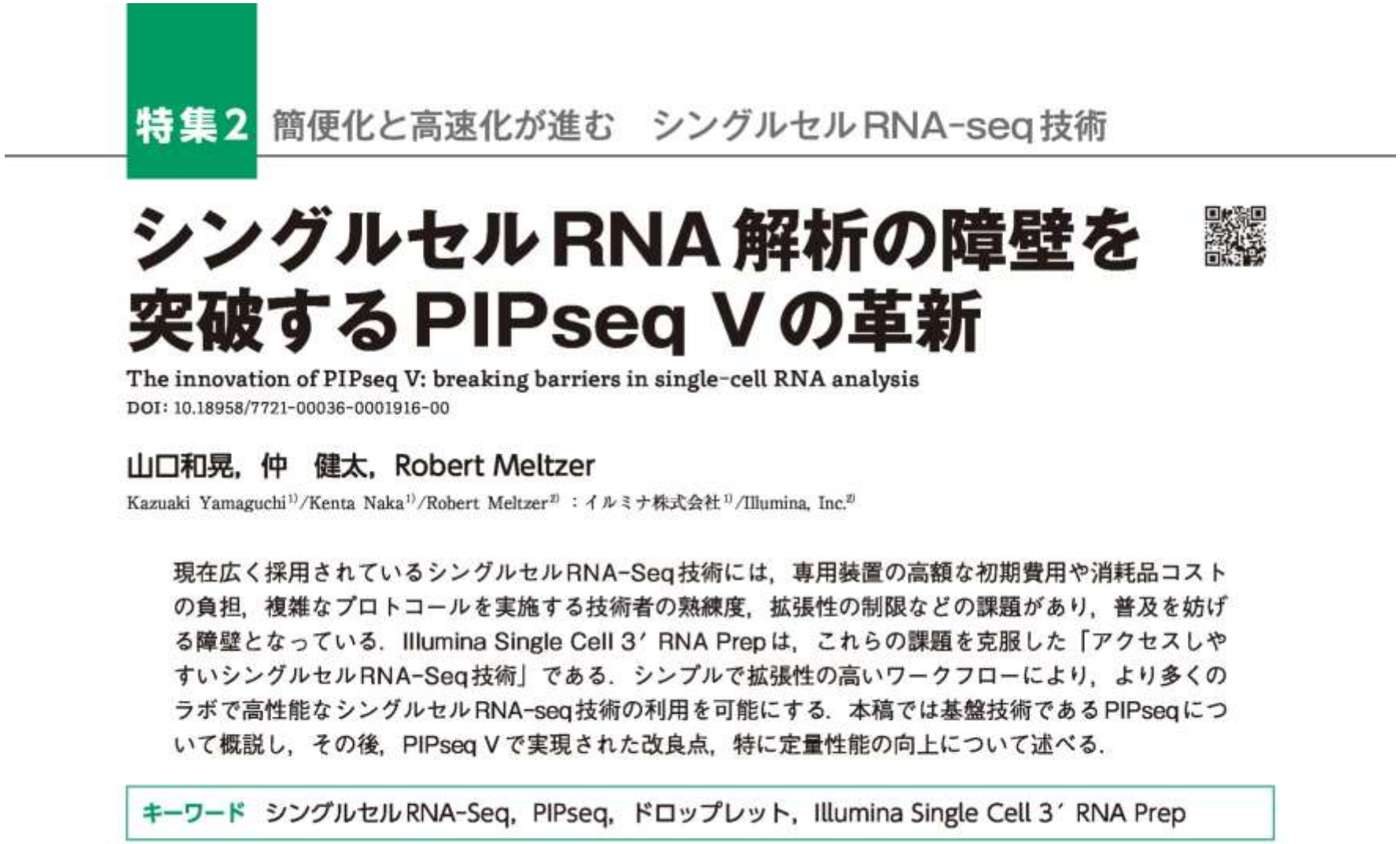
Presenter
イルミナ株式会社
プロダクトマーケティングマネージャー
藤原 鈴子

Topic
Cellular & molecular biology, Neuroscience

ウェビナーを見る

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

実験科学（羊土社様）内の特集記事



特集2 簡便化と高速化が進む　シングルセルRNA-seq技術

シングルセルRNA解析の障壁を突破するPIPseq Vの革新

The innovation of PIPseq V: breaking barriers in single-cell RNA analysis

DOI: 10.18958/7721-00036-0001916-00

山口和晃，仲　健太，Robert Meltzer

Kazuaki Yamaguchi[1]/Kenta Naka[1]/Robert Meltzer[2]：イルミナ株式会社[1]/Illumina, Inc.[2]

現在広く採用されているシングルセルRNA-Seq技術には，専用装置の高額な初期費用や消耗品コストの負担，複雑なプロトコールを実施する技術者の熟練度，拡張性の制限などの課題があり，普及を妨げる障壁となっている．Illumina Single Cell 3′ RNA Prepは，これらの課題を克服した「アクセスしやすいシングルセルRNA-Seq技術」である．シンプルで拡張性の高いワークフローにより，より多くのラボで高性能なシングルセルRNA-seq技術の利用を可能にする．本稿では基盤技術であるPIPseqについて概説し，その後，PIPseq Vで実現された改良点，特に定量性能の向上について述べる．

キーワード　シングルセルRNA-Seq，PIPseq，ドロップレット，Illumina Single Cell 3′ RNA Prep

[シングルセルRNA解析の障壁を突破するPIPseq Vの革新 実験医学online：羊土社]

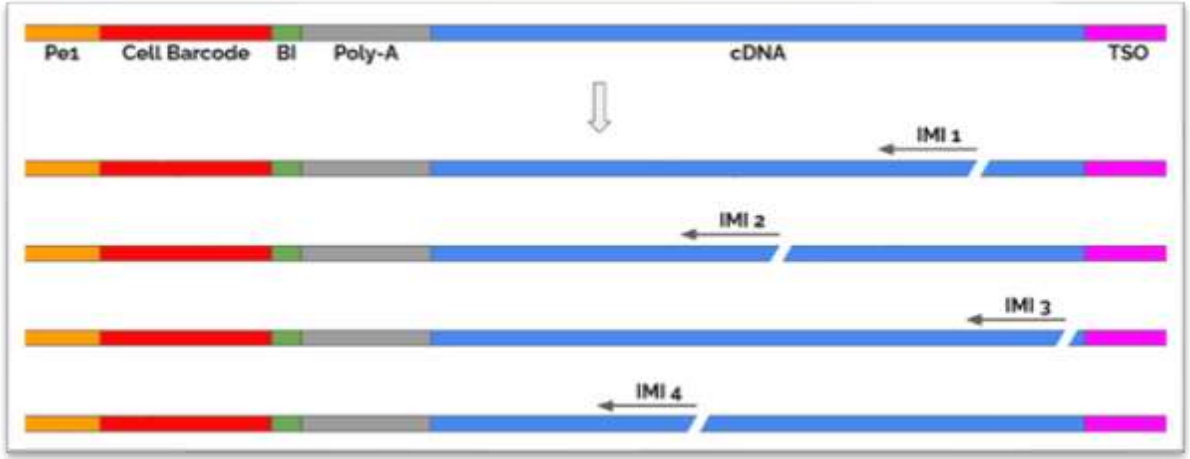
PIPseq Vケミストリーが採用する分子カウンティング手法の補足説明

illumina®

分子カウンティングの基本概念

IMIとは？

- Illumina Single Cell 3′ RNA Prepのライブラリーにおいては、Read 1には各粒子（PIP）由来の**セルバーコード配列**と3塩基の**Binning Index (BI)** 配列が含まれる
- Read 2には、キャプチャーされたmRNAから作成・シーケンスされたcDNAが含まれる。さらに**Intrinsic Molecular Identifier (IMI)** として機能するランダムな切断部位が含まれており、分子カウントに利用される



- **Intrinsic Molecular Identifier (IMI)** ：5サイクルの全トランスクリプトーム増幅とその後のランダム断片化により、1つのキャプチャー分子から最大で**15種類**（=（2 $^{5\ cycle\ -\ 1}$）-1）**の異なる切断部位**が生成される。各断片はゲノム上の異なるマッピング位置を持つため、これらの**切断位置情報**をもとに同一分子由来のリードを統合し、分子カウントに利用できる。

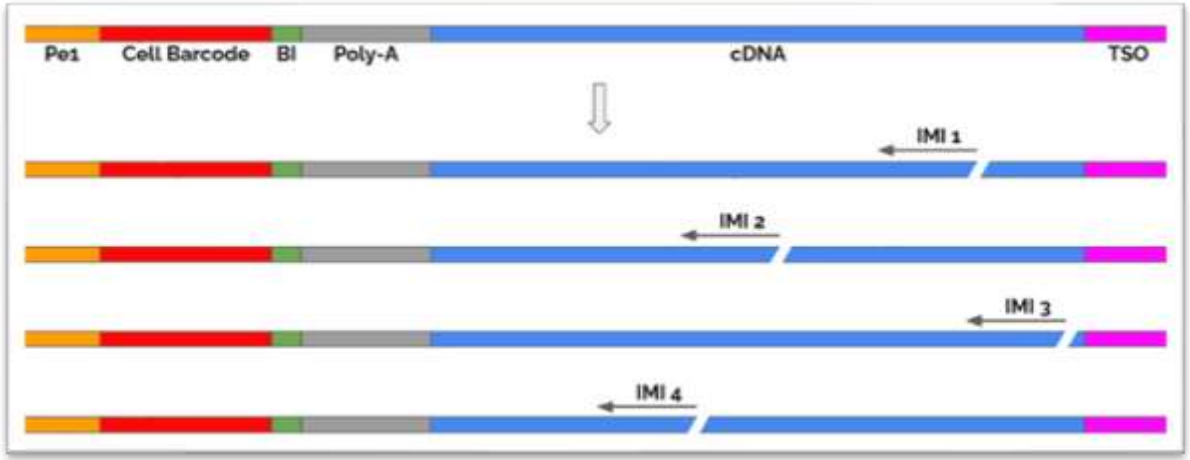
～従来のUMIに依存せず、正確な分子カウントを可能にする～

- PCR産物のランダムな断片化によって生成され、シーケンスデータから特定された断片位置情報を基に、分子を一意に識別してカウントする
- UMIとは異なり、IMIは外来配列を使用しないため、内因性（Intrinsic）と称される
- 断片位置情報を基に特定のmRNA分子を識別するため、従来の外部タグ（UMI）を使用せずに高精度なカウントを実現

分子カウンティングの基本概念

BIとは？

- **Binning Index (BI)** は3塩基の配列であり、Illumina Single Cell 3′ RNA Prep（PIPseq V）において、同一セルバーコード内でキャプチャーされた分子を64通りのサブパーティション（bin）に分類するための識別子として機能する。
- 各セルバーコード×遺伝子ごとにリードは64種類のbinに割り当てられ、各bin内で同一IMIを持つリードはPCR重複として統合される。
- BI分布は64種類のbinからランダムサンプリングされると仮定し、Coupon Collectorモデルを用いてユニークbin数とIMI数から真の分子数を確率的に推定する。



- この仕組みにより、PCR重複や断片化ノイズを低減し、特に分子数が少ない遺伝子でも安定した分子カウントが可能。

特に分子数が少ない場合でも、ユニークbin数を利用することで確率的に
安定した分子識別が可能となり、シングルセル解析における定量精度を向上させる。

従来法のUMIとIlluminaが採用した新しい方式

UMI（従来法）

- ランダム配列のため、高発現遺伝子や高深度条件では、異なる分子に同一UMIが偶然付与されるUMI衝突（Collision）が発生
- UMI配列中のチミンリッチな部分がPoly-A tailに相補的に結合しやすく、逆転写効率やアライメントに偏り（Poly-Tバイアス）が生じる
- 配列自体にはエラー訂正機構がなく、解析でハミング距離などを使って誤UMIを統合するが、誤マージ／誤分離のリスクが残る

IMI＋BI（Illumina方式）

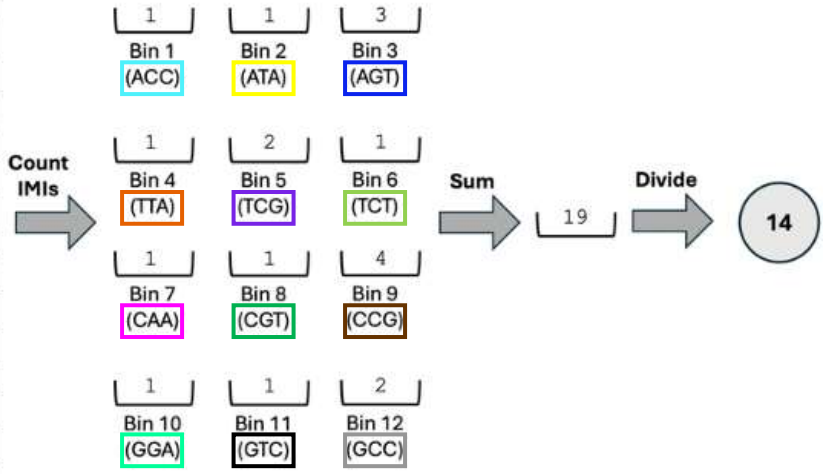
- 物理的な断片開始位置（IMI）を利用して分子を識別するため、人工的ランダム衝突がほぼ解消
- さらに3塩基のBinning Index（BI）により64分割され、確率的分子識別精度が向上
- 内因的断片化部位を利用するため、Poly-Tバイアスが発生しない
- DRAGEN Single Cell RNAアプリでは、ユニークBI数とIMI分布から推定される補正係数（IMIs per molecule, IPM）を用いて、1分子あたりの断片化効率を補正

→ より正確な分子カウントを実現

分子カウンティングの基本概念
計算例

補正係数1.35を用いた分子カウントを示す

Barcode	Gene	BI	IMI	Reads	
				Raw	Unique
CCACCTCT TATTGG AAGCTC AATGTATG	CD14	ACC	140,633,101	12	1
		ATA	140,633,107	3	1
		AGT	140,631,790	1	1
			140,632,057	4	1
			140,632,995	10	1
		TTA	140,631,790	7	1
		TCG	140,633,098	3	1
			140,633,101	1	1
		TCT	140,633,108	1	1
		CAA	140,633,109	3	1
		CGT	140,633,455	9	1
		CCG	140,632,099	5	1
			140,632,125	16	1
			140,632,128	20	1
			140,632,675	1	1
		GGA	140,633,106	8	1
		GTC	140,632,098	4	1
		GCC	140,632,057	1	1
			140,632,126	2	1



計算プロセス:

1. **Cell Barcode と Geneごとにリードをグループ化**:各リードはまず、どの細胞由来か(Cell Barcode)と、どの遺伝子にマッピングされたか(Gene ID)で分類される
2. **64通りのBIによるサブ分割**:各 Barcode + Gene グループ内で、リードは 3塩基のBI配列 により、64種類のbinのいずれかに割り当てられる。同じbin内のリードは、同じ分子由来である可能性が高いと仮定される
3. **同一IMIのcollapse(PCR重複除去)**:各bin内で、同一のを持つリードは、同一断片由来のPCR重複と見なし、1カウントにまとめる。IMIはライブラリー断片*物理的な開始位置(ゲノム座標)に基づいて定義される。
4. **ユニークなbinの数を算出**:各 Barcode + Gene の組み合わせで、少なくとも1つのリードが存在するBIの数＝ユニークbin数を求める。このユニークbin数は、真の分子数の確率的推定値として利用される。
5. **ユニークIMI数の合計を計算**:collapse済みのすべてのbinからユニークなIMIを合計し、そのBarcode + Geneにおける総IMI数を求める
6. **補正係数(IPM)を適用して分子数を推定**:データセット全体で推定された IMIs per molecule (IPM) を用いて、推定分子数 (= 総IMI数 / IPM) を求める。ただし、ユニークBI数が10以下の場合は補正を行わず、ユニークBI数自体を分子数とする。ユニークBI数が11以上の場合のみIPM補正を適用
   左の例では、IPM = 1.35
   19個のユニークなIMI ÷ 1.35 ≒ 14分子 と推定

補正係数の推定プロセス

1. **断片化コピーの分布の推定**：単一の分子は、5回の増幅サイクル中に1～15個の断片化されたコピーを生成する。この断片化コピーの分布はデータセットに依存し、サンプルタイプやシークエンス深度によって異なる。補正係数は、この断片化コピーの分布の平均（サンプルごとの平均IMI数）として推定される
2. **ユニークBIと分子数の関係**：同じ親分子から生成されたすべてのIMIは同じBIを共有する。したがって、特定のバーコードと遺伝子の組み合わせ内で観察されるユニークなBIの数は、その組み合わせの分子数によって決まる。BIの数は分子数の推定において重要な指標となる
3. **クーポン収集問題（CCP）を使用したモデル化**：ユニークなBIの数と分子数の関係は、クーポン収集問題（CCP）としてモデル化できる。CCPは、サンプル中でユニークなBIを得るために必要な分子数を確率的に推定する。このモデルを基に、補正係数を推定する
4. **IMI数から分子あたりのIMI数（IPM）の推定**：補正係数を推定するために、ユニークBI数が5～32のBarcode + Geneを抽出し、CCPで期待される分子数（ユニークBI数に対する期待値）でIMI総数を割った値を、その組み合わせの ‘IMI per molecule’ とみなし、その平均をサンプルのIPMとする
5. **補正後のカウントの計算**：推定したIPMを基に、各Barcodeと遺伝子の組み合わせにおける分子カウントを補正。IMI数をIPMで割り、その結果を切り捨てて補正後の分子カウントを求める

- 補正の適用条件として、補正はユニークなBIが10個以上のバーコードと遺伝子の組み合わせに適用される。これらの組み合わせについては、推定したIPMを使用して補正を行い、より正確な分子カウントを算出。
- ユニークなBIが10未満の場合は、補正を適用せず、カウントはそのままユニークなBIの数に等しくなる。つまり、少数の分子の場合、IMI数のばらつきが大きくなるため、補正を行わず、BI数を分子カウントとして使用する。

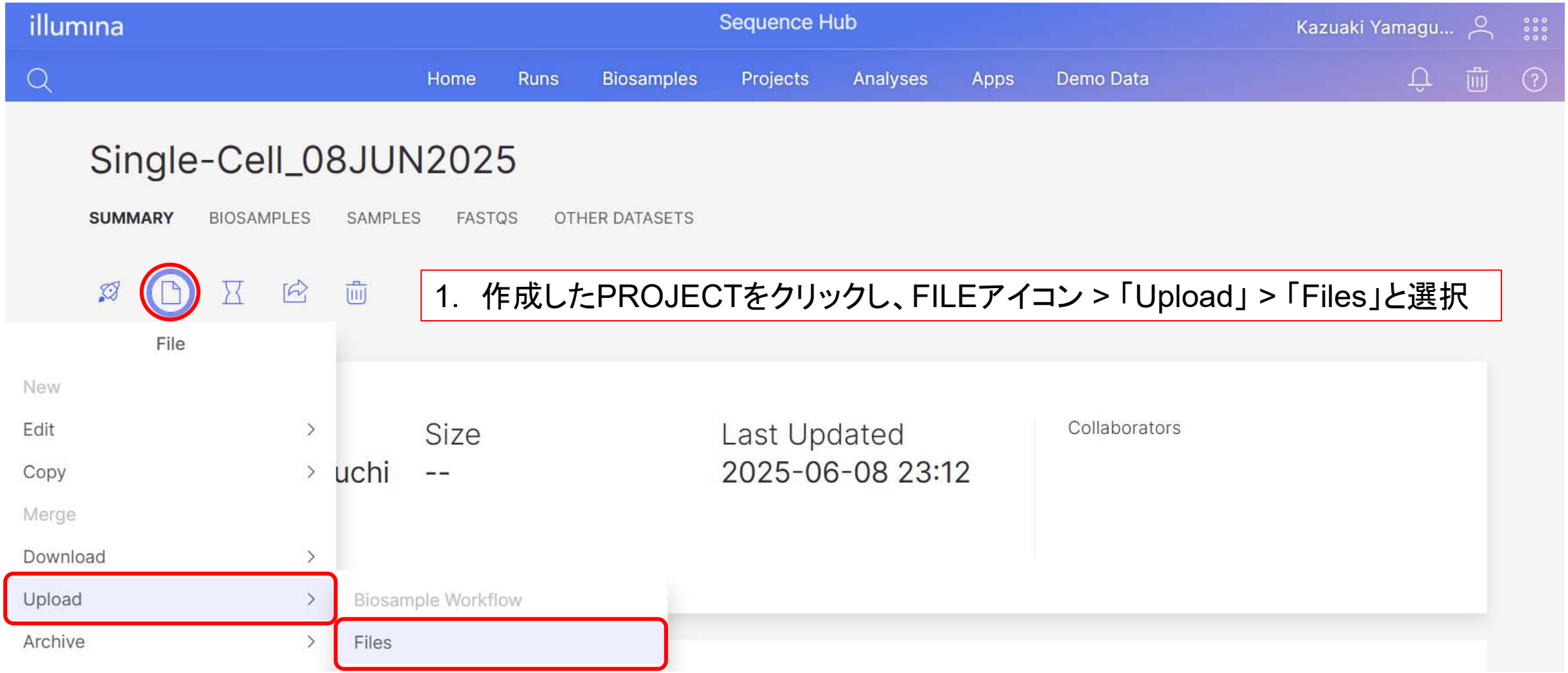
従来UMI vs Illumina PIPseq Vケミストリー：要点比較

項目	従来UMI	Illumina (PIPseq Vケミストリー)
分子認識	ランダムUMI（外因性）	IMI = ランダム切断位置（内因性）
ビン分配	-	BI = 3塩基（64ビン）の各ビンにIMIを分配し、 同一分子由来と推定されるIMIをまとめる
PCRとの関係	PCR前にUMIを付加し、コピーを追跡	PCR後のランダム断片化によりIMIを生成。 PCRサイクル制御が重要
衝突率 (collision)	高深度・高発現で起きやすい	物理開始位置ベース＋64 ビン化で 実効衝突の発生可能性が極めて低い
選択バイアス	Poly-TバイアスによりUMIの配列多様性が 制限されることで、分子識別の精度が低下	選択バイアスなし
エラー訂正/補正	ハミング距離等で類似UMIを統合	ユニークBI数とIMI分布から IPMを推定し分子数を補正

ウェブブラウザ経由でのBSSHへのFASTQアップロード

illumina®

ウェブブラウザ経由でのBSSHへのFASTQアップロード (1/3)



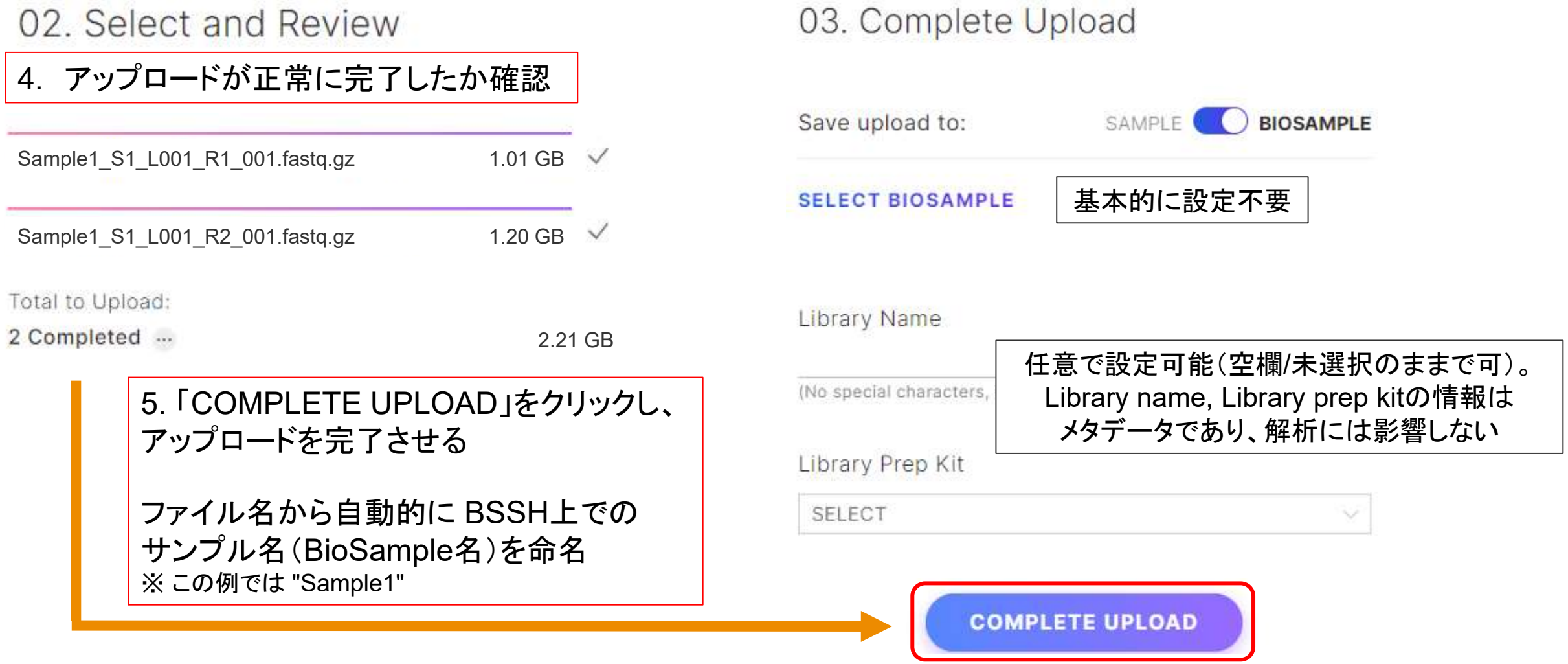
ウェブブラウザ経由でのBSSHへのFASTQアップロード (2/3)

01. Choose File Type　　02. Select and Review　　03. Complete Upload

2. アップロードするファイルの種類を選択。ここでは「FASTQ」を選択

3. アップロードするFASTQファイルをドラッグ & ドロップ
※ 1度に1サンプルのデータしか、アップロードできない
※ ペアエンドのデータの場合、R1とR2 両方のファイルをドラッグ &ドロップする

ウェブブラウザ経由でのBSSHへのFASTQアップロード (3/3)



シングルセル解析で出力されるカウントマトリックスファイル

- <prefix>.scRNA.matrix.mtx.gz
- <prefix>.scRNA.barcodes.tsv.gz
- <prefix>.scRNA.features.tsv.gz

<prefix>.scRNA.matrix.mtx.gzとは

シングルセルRNA-seqデータにおける**「遺伝子 × 細胞」のカウントマトリックス（行列）**を保持するファイル

- 各細胞（バーコードごと）で、各遺伝子が何分子カウントされたかを表す
- IMI / BIに基づきPCR重複除去や補正を行った後の「分子数」が格納される
- 形式は**Sparse Matrix（疎行列：成分のほとんどがゼロである行列）**：発現していない（カウントがゼロの）遺伝子が大半なので、0以外の要素だけを「行番号・列番号・カウント」の形で保存する
  - セルAに対して「遺伝子Xのカウント = 0」なら何も記述されない。実際の解析の際には、このマトリックスは遺伝子数 × 細胞数のフルサイズに展開され、ゼロの部分が自動的に埋められる
- このマトリックスの行は遺伝子（features.tsv.gz と対応）、列はセルバーコード（barcodes.tsv.gz と対応）する

```
%%MatrixMarket matrix coordinate integer general
% rows columns entries
32738 5000 152736
1 1 3
2 1 1
5 1 7
10 2 1
…
```

1行目：ヘッダー
2行目以降：行数（遺伝子数）、列数（Cell 数）、非ゼロエントリー数
その後：「行番号 列番号 カウント」の組（座標形式）
例：1 1 3 は「遺伝子1 が 、細胞1 で 、分子カウント3」という意味

<prefix>.scRNA.barcodes.tsv.gzとは

各セルを一意に識別するための「**セルバーコード**」を格納したファイル

- <prefix>.scRNA.matrix.mtx.gzの**列番号**と対応 → 「**この列はどの細胞のデータか**」を決定する
- 各行が1つのセル（バーコード）に対応
- <prefix>.scRNA.matrix.mtx.gzの列番号 = <prefix>.scRNA.barcodes.tsv.gzの行番号
- PIPseqでは**Read 1の先頭部分**にセルバーコードが埋め込まれており、DRAGEN Single Cell RNAアプリが誤り訂正と重複排除を行い、標準的な4階層（tiered）からなるバーコード形式（16塩基）に変換して出力する

```
AAACCCAAGAAACTAG-1
AAACCCACATCCTTGT-1
AAACCCAGTGACGGGT-1
...
```

各行が「1つのセル（バーコード）」に対応
行番号は matrix.mtx.gz の列番号 と一致
-1 は単に同一バーコードの重複回避やレプリケートを区別するための慣例

<prefix>.scRNA.features.tsv.gzとは

<prefix>.scRNA.matrix.mtx.gzのマトリックスファイルの **行（row index）にラベルを与えるファイル**

- 「この行はどの遺伝子（あるいはタグ）に対応するか」を記録している
- 各行は <prefix>.scRNA.matrix.mtx.gzの行番号と対応し、<prefix>.scRNA.barcodes.tsv.gz（列番号）と組み合わせて「遺伝子 × 細胞」マトリックスを構成する
- このファイルに出力される **遺伝子ID（第1列）** は、データ解析時に**入力した GTFファイルに記載されているgene_id** がそのまま反映される
- 遺伝子以外にも、もし解析に **SNT（Synthetic Nucleotide Tags）** や **HTO（HashTag Oligo）** が含まれている場合、それらの情報も、このファイルに含まれる

```
ENSG00000121410        TSPAN6          Gene Expression
ENSG00000175899        TNMD            Gene Expression
ENSG00000168297        DPM1            Gene Expression
ENSG00000160087        SCYL3           Gene Expression
...
```

第1列: 遺伝子 ID（GTFのgene_idフィールド、例: Ensembl ID）

第2列: 遺伝子シンボル（GTFのgene_nameフィールド、例: TSPAN6, TNMD, CD14, GAPDH など）

第3列: フィーチャーの種類

・通常は "Gene Expression"

・タグ解析を行った場合は "Antibody Capture" や "CRISPR Guide" が入る

DRAGEN Single Cell RNAアプリに関する補足事項

DRAGEN Single Cell RNAとPIPSeekerにおける Mapping Metricsの違い

DRAGEN：v4.4.2のバージョンにおいては、mapping_metrics.csvファイルに記述されるMapping rateには、Mapperに渡された情報がすべて含まれている。つまり、以下の計算式で算出されている

$$Mapping\ rate = \frac{Mapped\ Reads}{Total\ Input\ Reads}$$

これには、antisense、ambiguously matching、non-matching readsなどが含まれており、一見するとMapping rateが非常に高い値を示す

PIPSeeker：Mapping rateは以下の計算式で算出される

$$Mapping\ rate = \frac{Unique\ Exon\ Matching\ Reads\ +\ Unique\ Intron\ Matching\ Reads\ +\ Mitocondrial\ Reads}{Total\ Input\ Reads}$$

今後、DRAGEN Single Cell RNAでのMapping rateは、PIPSeeker準拠に修正される予定（時期未定）

BSSH DRAGEN Single Cell RNAアプリで使用するリファレンスゲノム

- Illumina Single Cell 3′ RNA Prepの二次解析コストはキットに含まれているため、DRAGEN Single Cell RNAアプリv4.4.2以上での解析は無償
  - ➢ BaseSpace Sequence HubのBasicアカウントを使用可能
- カスタムリファレンスゲノムを使用したい場合、別途DRAGEN Reference Builder（有償）で、Hash Tableフォーマットのカスタムリファレンスを作成する必要がある
  - BSSH Free Trialアカウントにて、30日間のトライアル期間中にカスタムリファレンスを作成する、もしくはProfessionalアカウント（年間サブスクリプション契約）にてカスタムリファレンスを作成する
- DRAGEN Single Cell RNAアプリの各バージョンに対応するハッシュテーブルのバージョンが異なるので、互換性に注意して作成する

DRAGEN Single Cell RNA アプリバージョン	Analysis Set-Up	Hash Table Version	Reference Builder Version
v4.4.2	Run Planning	10	Reference Builder (Instruments) v3.0.0
v4.4.2	Manual App Launch	10	DRAGEN Reference Builder v4.3.6
v4.4.4	Manual App Launch	11	DRAGEN Reference Builder v4.4.4001

Partek Flow補足事項

Partek Flowサブスクリプション オプション

※Partek Flowは契約プランとAdd-onライセンスにより解析可能な内容が異なります。ご契約時に実施したい解析が含まれているか、必ずご確認ください。

Features	Input file format	Lab Edition	Enterprise
RNA-Seq	BAM、BCL、CBCL、カウントマトリクス（CSV、TSV、TXT）、FASTA、FASTA.GZ、FASTQ、FASTQ.GZ、SAM、SRA	✅	✅
ChIP-Seq/ATAC-Seq	BAM、CBCL、カウントマトリクス（CSV、TSV、TXT）、FASTA、FASTA.GZ、FASTQ、FASTQ.GZ、SAM、SRA	✅	✅
DNA-Seq	BAM、BCF、BCL、CBCL、FASTA、 FASTA.GZ、FASTQ、FASTQ.GZ、SAM、SRA、VCF、VCF.GZ	✅	✅
Metagenomics	CBCL、FASTA、FASTA.GZ、FASTQ、FASTQ.GZ、SRA	✅	✅
Microarray	CEL、シグナル強度マトリクス（CSV、TSV、TXT）	✅	✅
Proteomics	Olink（TXT）、SomaLogic（ADAT）、Akoya（CSV、TXT）	✅	✅
Single cell & spatial analysis	カウントマトリクス（CSV、TSV、TXT）、H5、H5AD、スパースマトリクス（MTX）、Seuratオブジェクト（RDS、QS）、BED、10x Space Ranger、NanoString CosMx	Add on	Add on
Pathway analysis		Add on	Add on
Included data storage		1 TB (Illumina hosted)	1 TB (Illumina hosted)
Illumina hosted		✅	✅
Customer hosted		✅	✅
Registered users		One per seat	Unlimited
Concurrent users		No	Based on number of seats purchase (i.e. 1 for a single seat license)
Administrative account		No	✅
User data partition		No	✅
Project collaboration features		No	✅
Task queue control		No	✅

シングルセル解析でPartek Flowを使用する場合の価格

1ユーザー、1年契約、同時アクセス不可の場合 (Lab edition)	
Commercial 希望販売価格	¥3,219,200
Academic 希望販売価格	¥1,223,296
複数ユーザー、1年契約、同時アクセス不可の場合 (Enterprise edition)	
Commercial 希望販売価格	¥4,965,600
Academic 希望販売価格	¥1,886,928

※ 2026年1月時点での希望販売価格(税抜き)となります。
※ 上記はLab／Enterprise editionの基本ライセンスに加え、Single Cell & SpatialのAdd-onライセンス料金を含みます。
※ 価格はユーザー数 (Lab:一人 /Enterprise:複数)、契約年数、同時アクセスのニーズ (seats)、により変動します。
※ 複数ユーザーを想定し、同時アクセスのニーズがある場合は別途ご相談ください。
※ Pathway解析も希望する場合は別途Pathway Add-onのライセンス費用が発生いたします。

30日間のトライアルがあります。また、デモについても承っております。

Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

Partek Flowで得ることができる情報の一例を以下に示す。

QA/QC Plots
- Read Couts
- Mitochondrial Counts
- Ribosomal Counts
- Detected Features

Scatter plots
- PCA
- t-SNE
- UMAP

Pie Chart
Violin Plot
Profile Plot
Biomarker Table
Chi-Square Plot
Stacked Violin Plot

3D Scatter Plot
Violin Dot Plot
Heatmap
Bar Chart
Volcano Plot
Bubble Map

KEGG Pathway Map
Gene Set Enrichment
Enrichment Profile

*KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

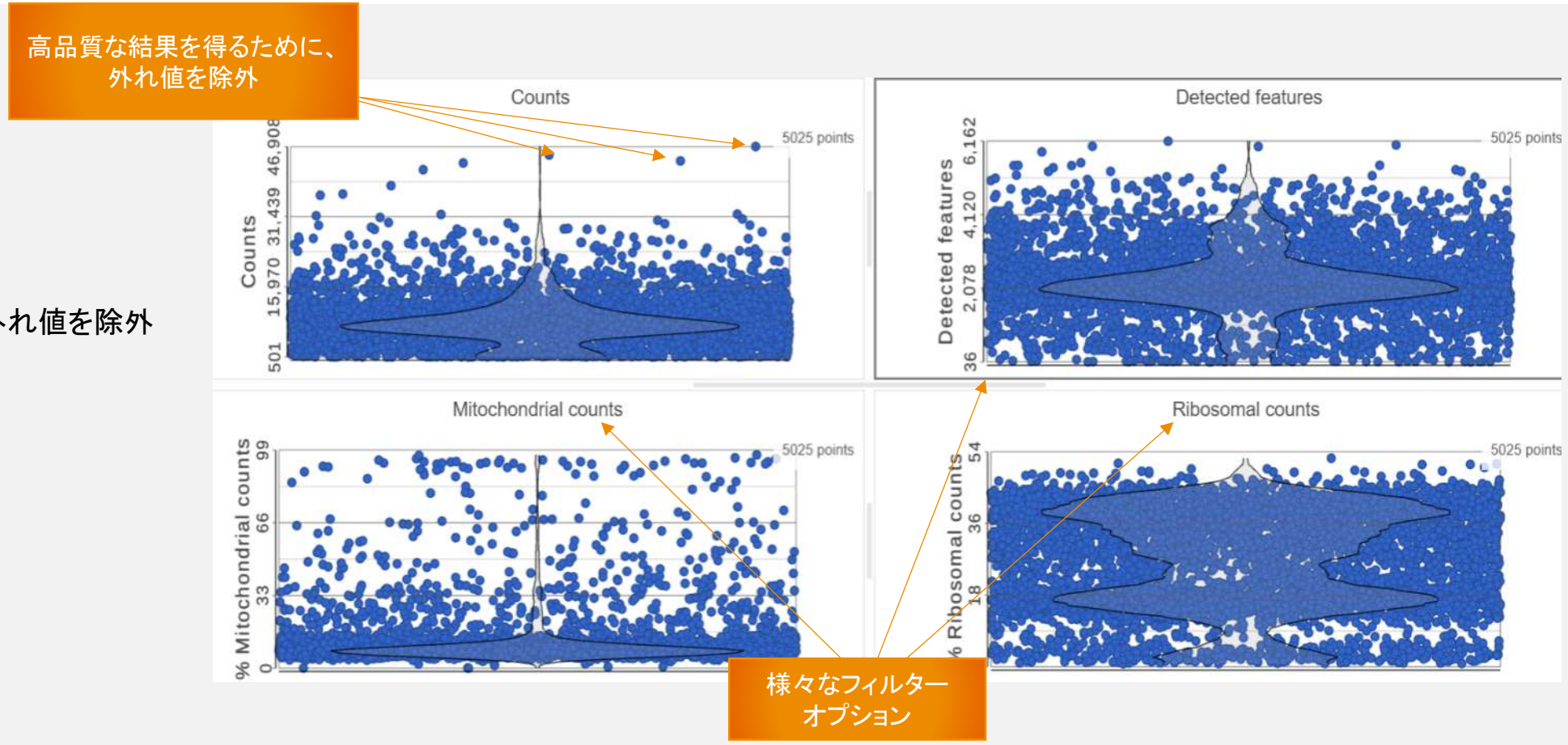
QA/QC

前処理

極端にリード数が上振れしているものはマルチプレット、極端にリード数が少ないものは死細胞や低品質細胞であると推測ができ、どの細胞をデータとして採用するかを視覚的に判断可能

QA/QC グラフ

- 視覚的な細胞のQC
- インタラクティブな図で外れ値を除外



Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

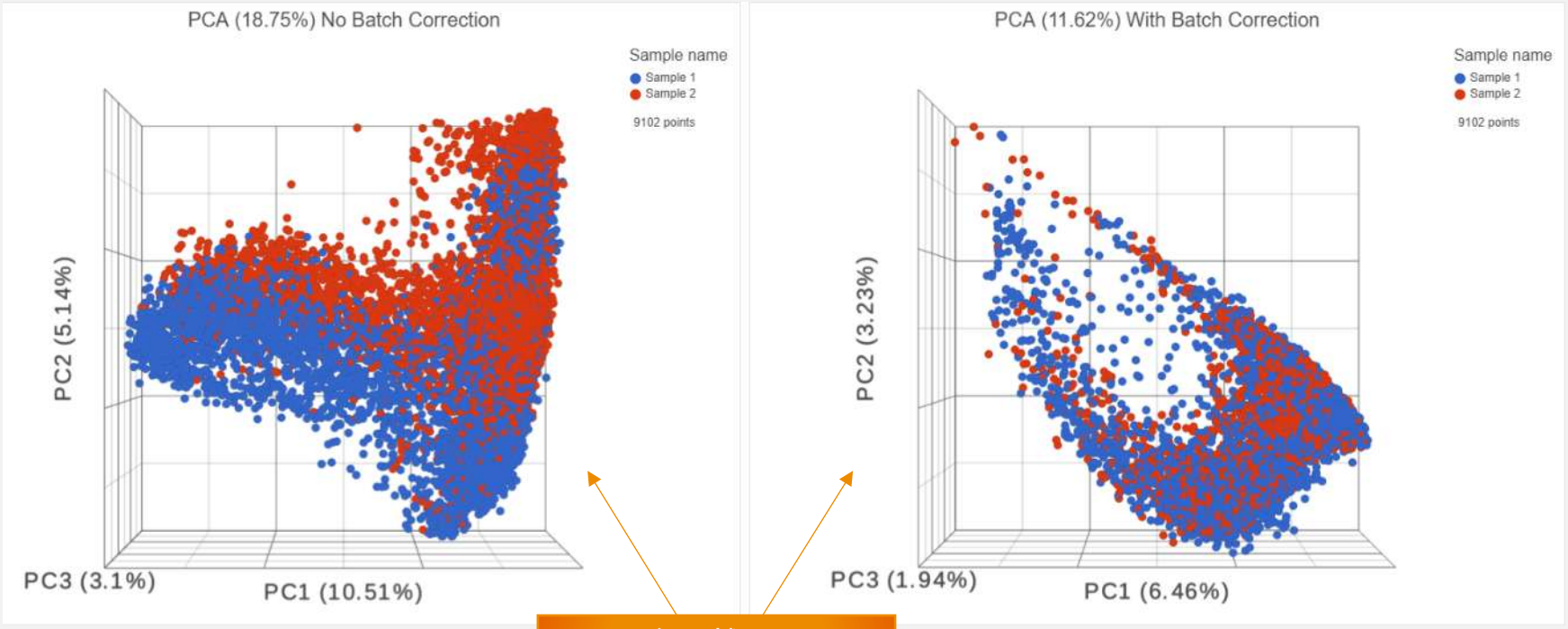
次元削減

前処理 | 細胞タイプの識別

サンプルや実験のバッチ補正前とANOVAベースもしくはEmpirical Bayesベースのでバッチ補正後のPCAプロットを得ることも可能

PCA

PCA プロットを用いて、サンプル間の類似性を調べ、外れ値を検出し、バッチ効果の補正を可視化



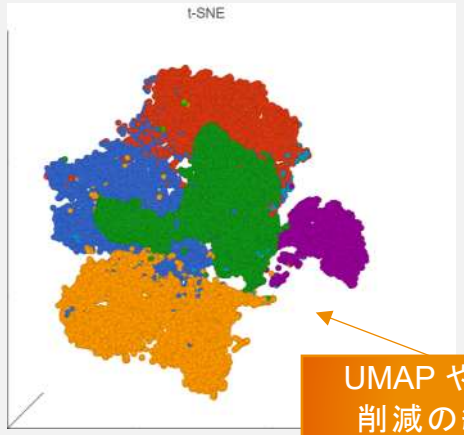
*ANOVA: Analysis of Variance

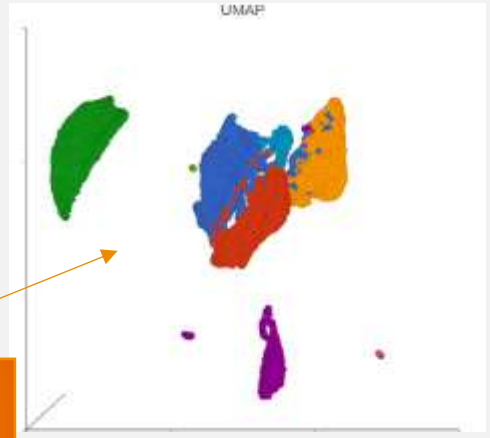
Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

次元削減とクラスタリング

前処理 | 細胞タイプの識別

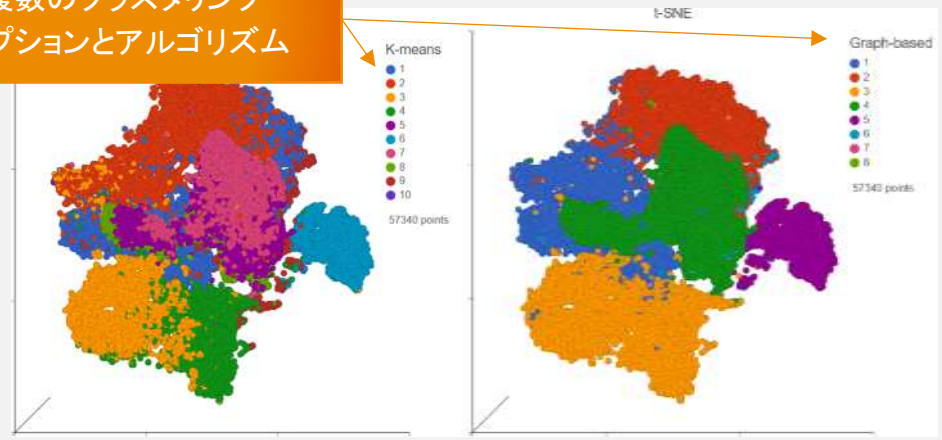
次元圧縮では、t-SNEとUMAPの代表的なシングルセル解析における次元圧縮プロットを利用でき、グラフベースとk-meansによるクラスタリングの様子を比較することも可能





UMAP や t-SNE による次元削減の結果は、2D、3Dやビデオ形式で可視化

複数のクラスタリングオプションとアルゴリズム



t-SNE

- クラスタ間の関係性を保持

UMAP

- クラスタの全体的な構造を保持

クラスタリング

グラフベース
- 統計に基づくクラスタリング
  事前の仮定は無し

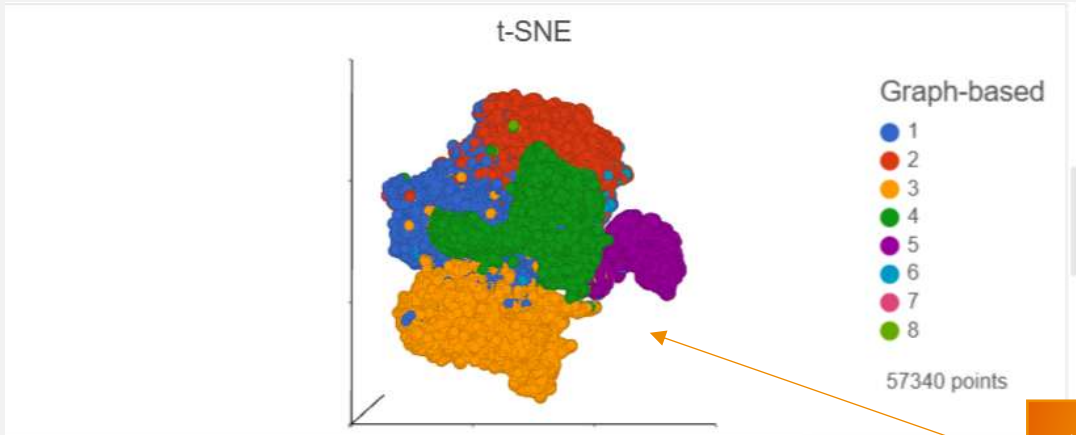
K-means
- あらかじめ指定したクラスタ数を使用

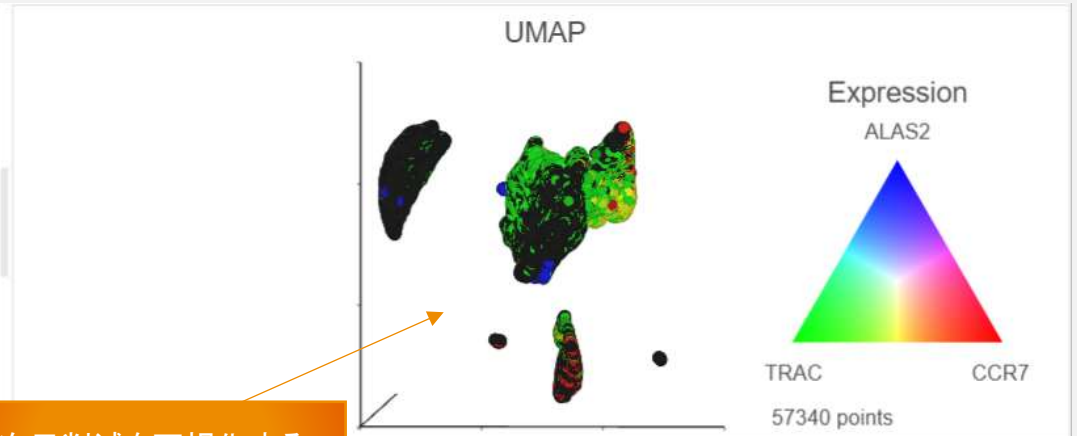
Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

探索的細胞分類 (1/4)

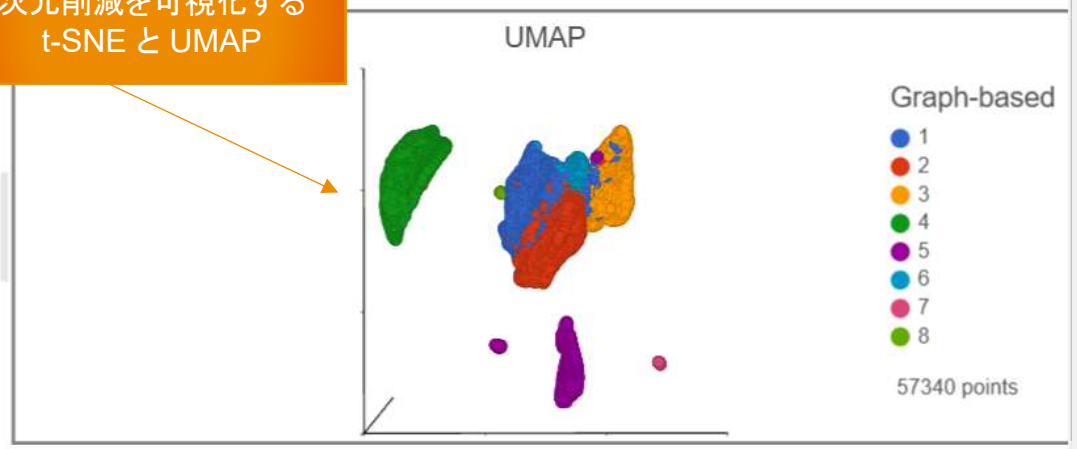
前処理 → 細胞タイプの識別

クラスタリングされた8つのクラスターの発現量が多い遺伝子を確認（左図）。特定の3つの遺伝子をセレクトして、その発現を三角カラーマップで可視化することも可能（右上図）





次元削減を可視化する
t-SNE と UMAP



バイオマーカーの一覧

Graph-based - CT1

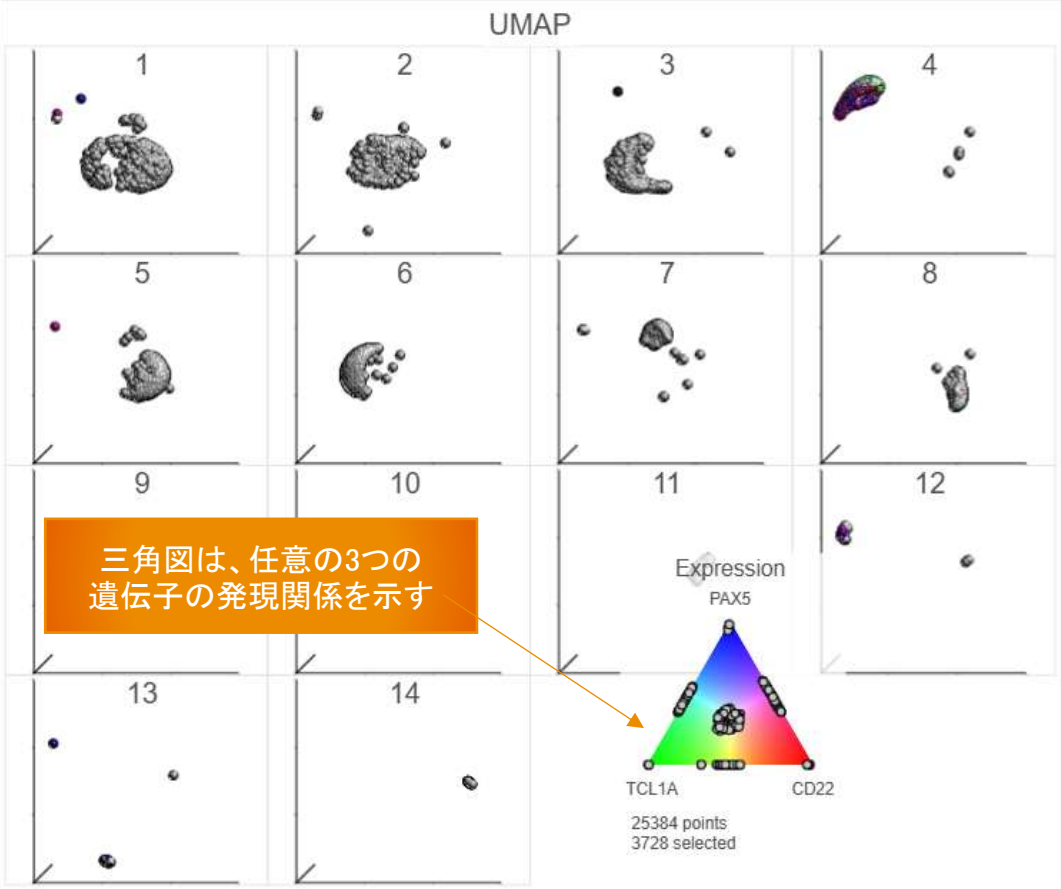
Top features	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6
1	TRAC	S100A9	NKG7	IGHD	C1orf56	PTCRA
2	LDHB	S100A8	GNLY	IGKC	ALAS2	TMEM40
3	CD3D	LYZ	KLRD1	CD79A	AHSP	CLEC1B
4	IL7R	VCAN	PRF1	LINC00926	LRRC75A	HRAT92
5	CD3E	S100A12	CST7	VPREB3	HBD	GP9
6	CCR7	CSTA	GZMA	MS4A1	SLC4A1	CMTM5
7	LTB	FCN1	HOPX	FCRLA	CA1	C19orf33
8	GIMAP7	CLEC12A	CTSW	FCER2	HBM	ESAM

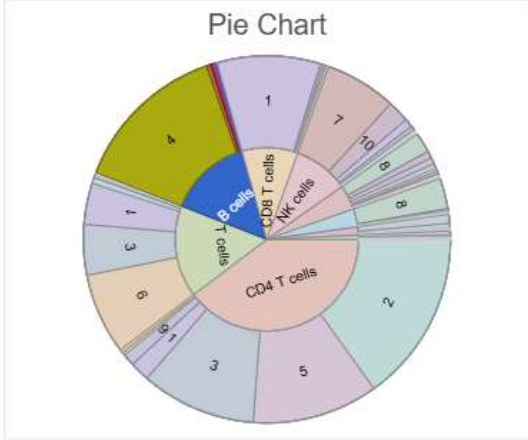
Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

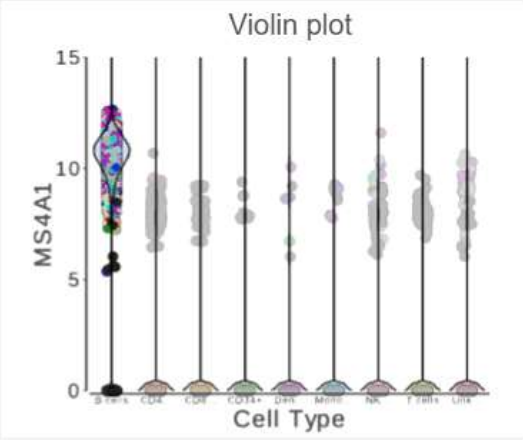
探索的細胞分類 (2/4)

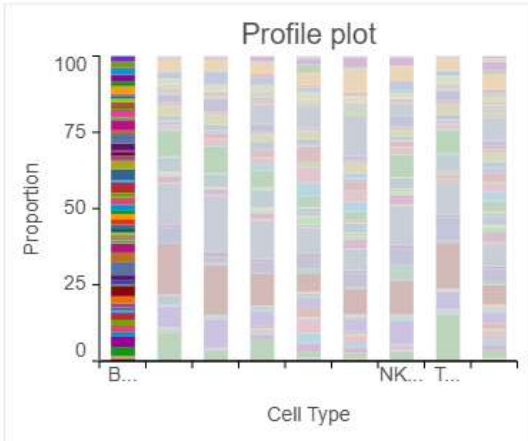
前処理 → 細胞タイプの識別

クラスターごとに、UMAPをプロットを分割し、その上でマーカー遺伝子の発現量を三角カラーマップで可視化可能（左図）
その他、細胞タイプの割合や細胞タイプごとの遺伝子発現量を確認可能









Biomarker table

Top features	B cells	CD4 T cells	CD8 T cells	CD34+
1	TCL1A	AQP3	GZMH	CHN2
2	CD22	IL7R	FGFBP2	TYMP
3	PAX5	KLRB1	ADGRG1	AOAH
4	LINC00926	TRAT1	CD8A	ARHGAP26
5	FCRL1	CD28	CCL4	GAS7
6	MS4A1	TNFRSF25	CD8B	RBM47
7	OSBPL10	ANK3	CX3CR1	S100A9
8	NIBAN3	INPP4B	NKG7	RBFOX1
9	BANK1	GZMK	TRGC2	CPPED1
10	CD79A	IL32	KLRD1	PLXDC2

Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

探索的細胞分類 (3/4)

前処理 → 細胞タイプの識別

特定の細胞タイプの遺伝子スコアに基づいて、ユーザーはスライダーを上下することで、細胞分類をより正確に判断可能

遺伝子スコアのパターンを可視化し、特徴リストを使って集団を選択

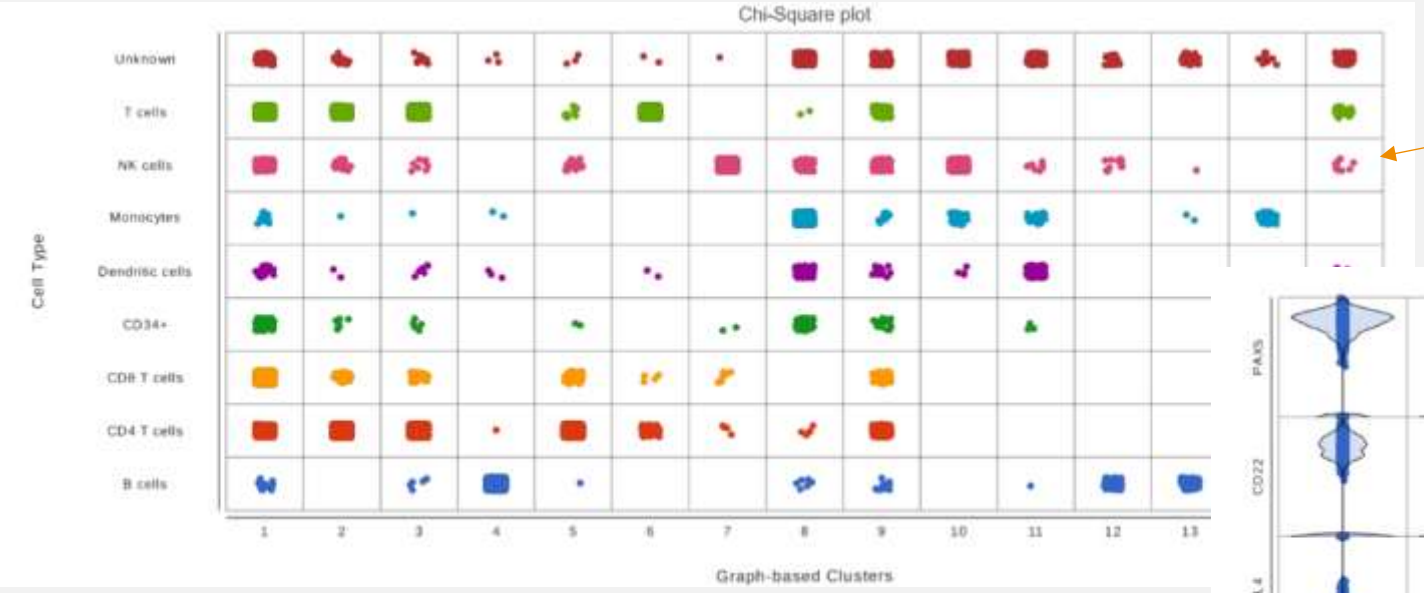
Graph-based

Top features	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5
1	GZMH	AQP3	MAL	TCL1A	**TRDC**
2	CD8A	CD4	CHRM3-AS2	CD22	**KLRB1**
3	CD8B	GPR183	LEF1	PAX5	**GZMK**
4	**TRGC2**	INPP4B	CCR7	LINC00926	**ZBTB16**
5	**CCL5**	CD28	FHIT	MS4A1	**DUSP2**
6	**NKG7**	ITGB1	PLCL1	FCRL1	**SYTL2**
7	**CST7**	GATA3	IL6ST	NIBAN3	**KLRG1**
8	CCL4	S100A11	TRABD2A	OSBPL10	**LINC01871**
9	FGFBP2	ATP8B2	ACTN1	BANK1	**PLCB1**
10	MIAT	RCAN3	PRKCQ-AS1	CD79A	**TRGC2**

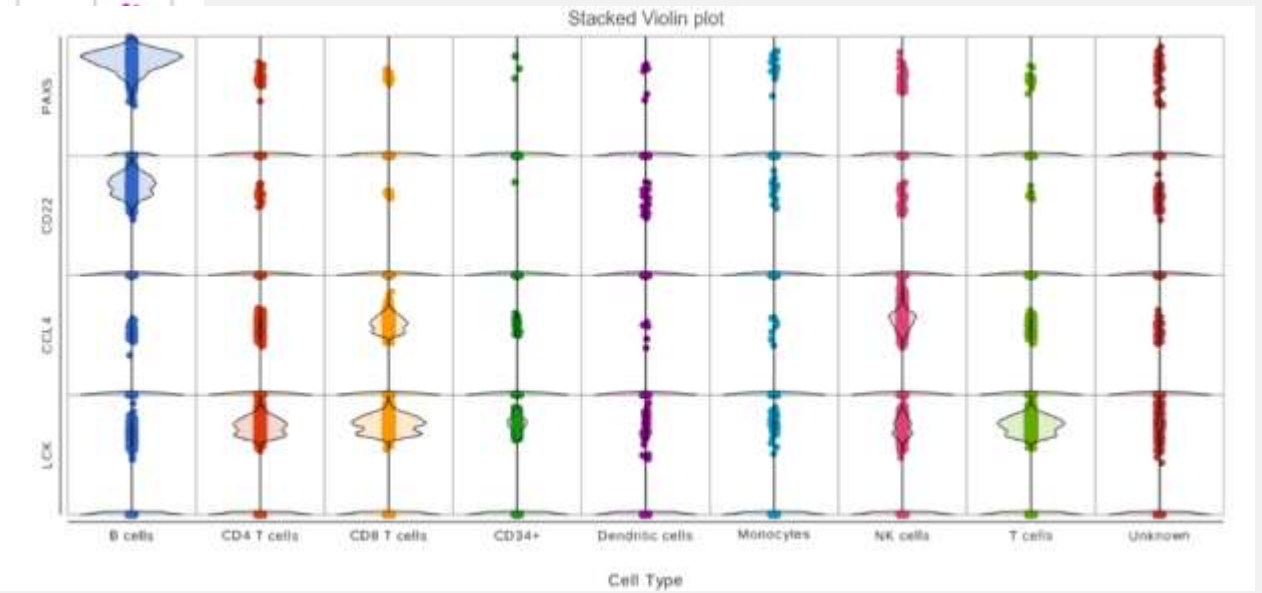
Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

探索的細胞分類 (4/4)

前処理 | 細胞タイプの識別



カイ二乗分布やバイオリンプロットなど、さまざまなプロット形式を使ってデータのパターンを可視化



Chi-Square Plotでは、あるクラスターが、どの細胞タイプに強く対応しているかを一目で確認可能

Stacked Violin Plotでは、各Cell Typeごとの遺伝子発現分布をViolin Plotで比較可能

Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

結果の可視化

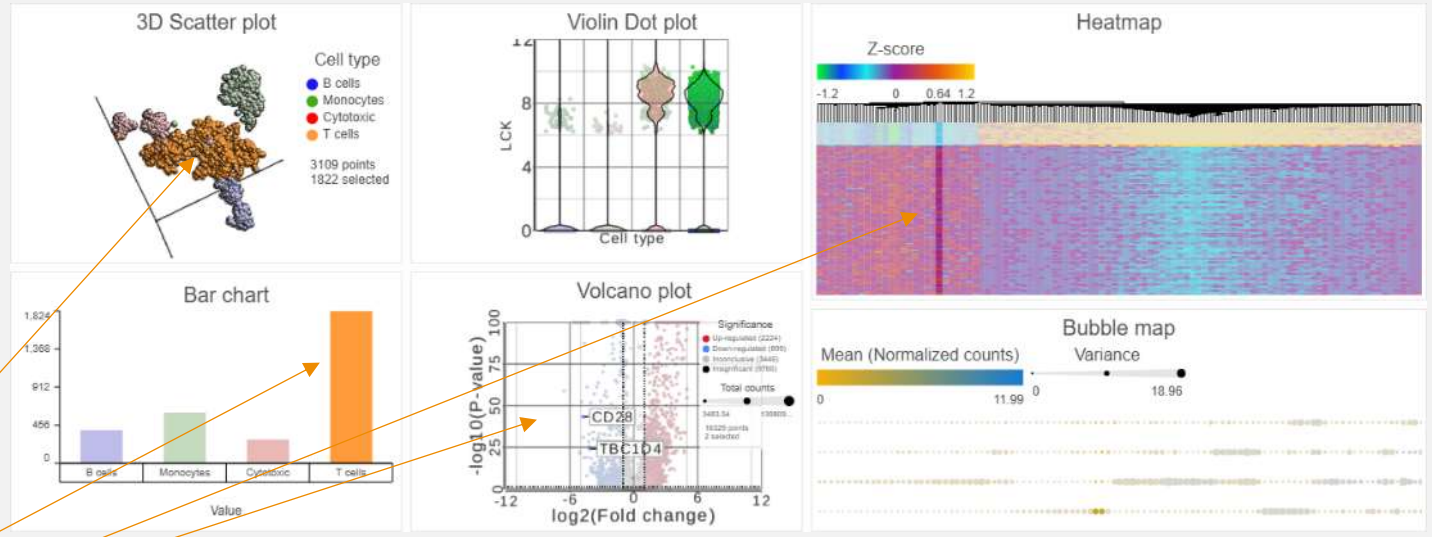
前処理 → 細胞タイプの識別 → **発現差異解析**

発現差異解析の結果をVolcano PlotやHeat Mapなど複数のプロットで可視化

Volcano Plot
- 発現差異解析レポート上部にアイコンが存在
- 各比較に対し、ボルケーノプロットを作成

Heat MapとBubble Map
- フィルター後の遺伝子リストから作成

Dot Plot
- 発現差異解析レポート上部にアイコンが存在



1つの図表でデータを選択すると、
全ての図表で同じデータが
ハイライトされる

Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

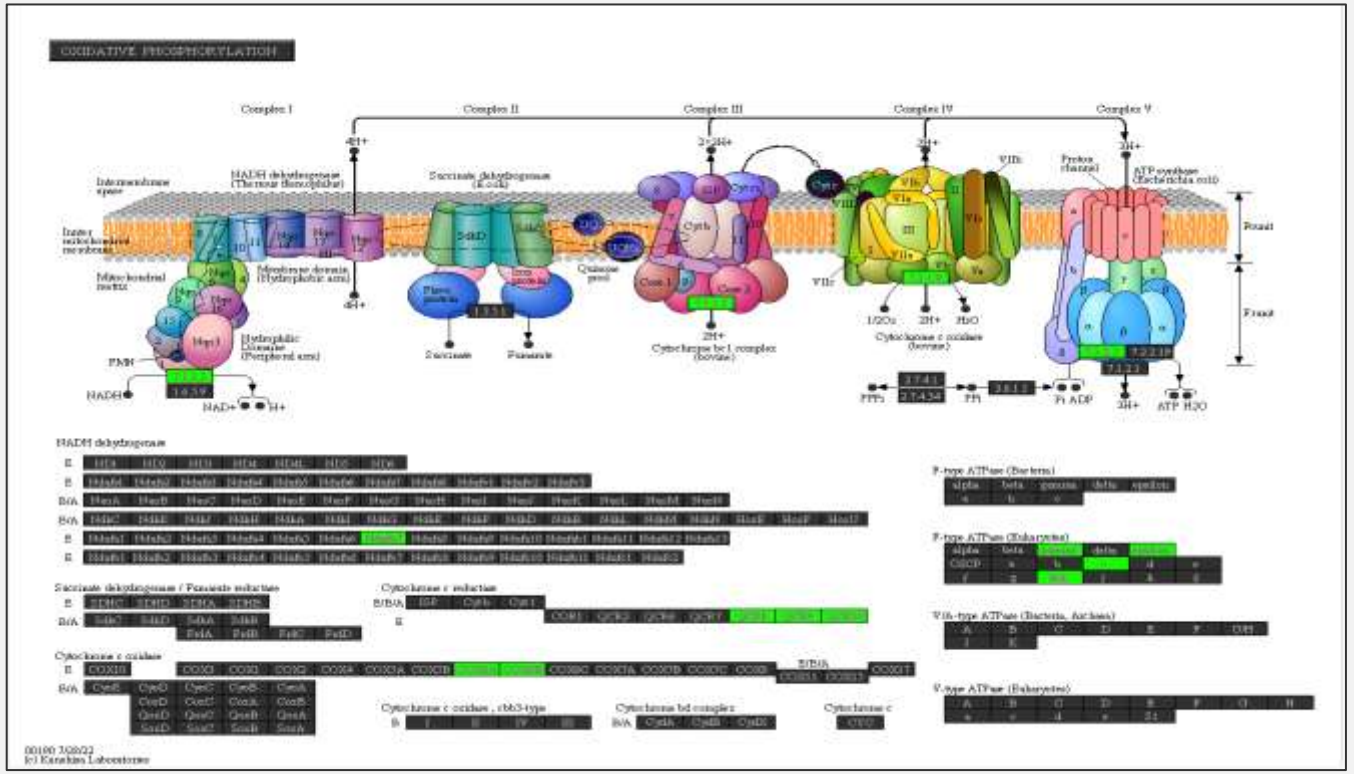
遺伝子セットと経路エンリッチメント分析

前処理 | 細胞タイプの識別 | 発現差異解析 | **生物学的解釈**

KEGG 経路エンリッチメント分析
- KEGG データベースの活用

GO gene ontology
- GO データベースの活用

KEGG 経路解析を使用し、
データ内の生物学的関係を特定



発現差異解析で得られた遺伝子リストに基づいたKEGGやGO解析

Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

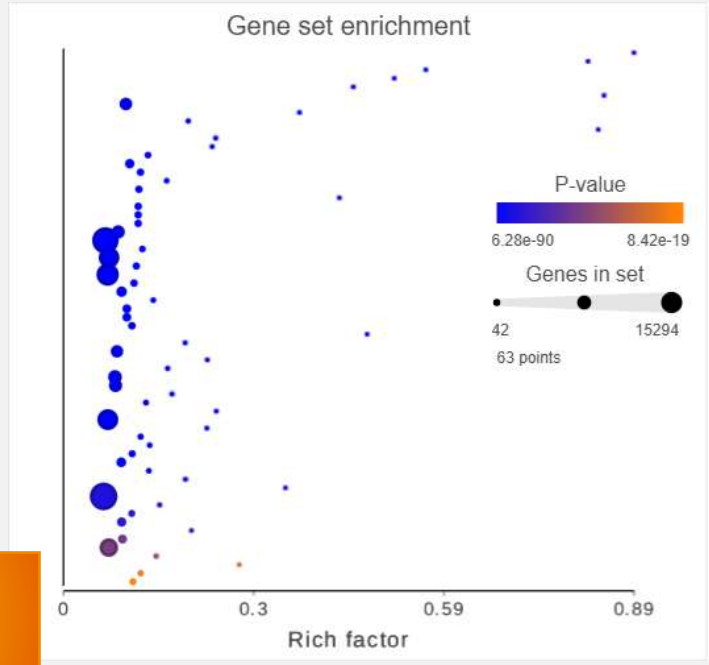
その他の生物学的解釈ツール

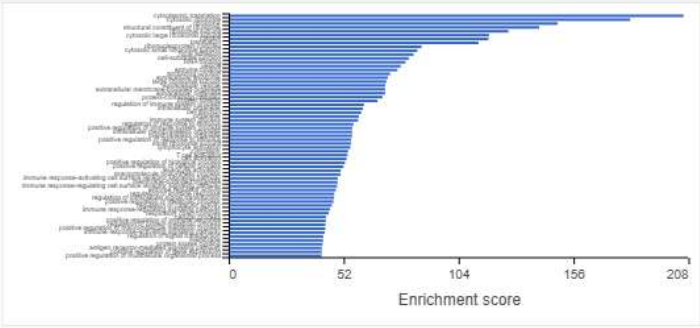
前処理 | 細胞タイプの識別 | 発現差異解析 | **生物学的解釈**

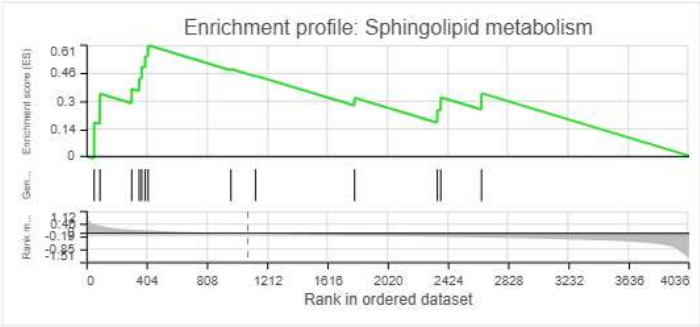
遺伝子セットエンリッチメント分析（GSEA）
- カスタマイズされた遺伝子セットの使用

GSEAと遺伝子セット ANOVA
- 個々の遺伝子ではなく、遺伝子セットの発現差異を検出

個々の遺伝子と
遺伝子セットの探索

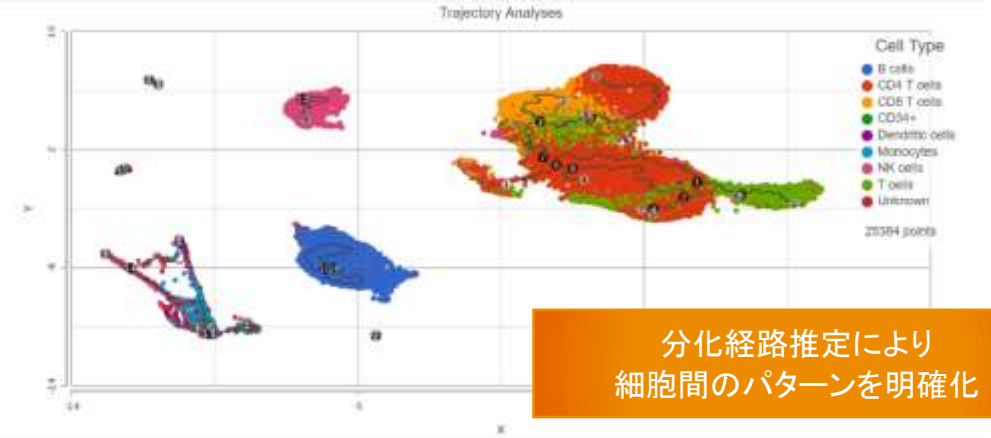




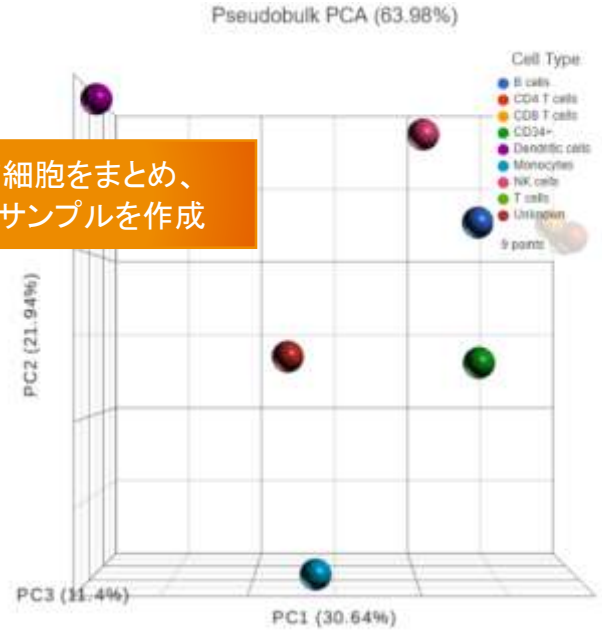


Partek Flowによるシングルセル解析で得られる情報

多様な生物学的解釈を広げるツールを提供

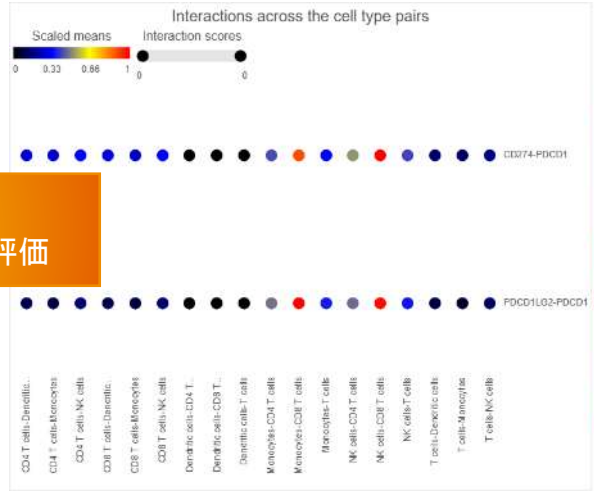


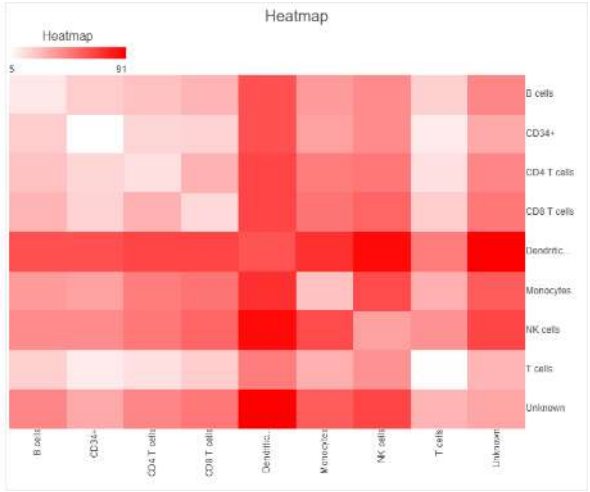
分化経路推定により
細胞間のパターンを明確化



属性に基づいて細胞をまとめ、
疑似的にバルクサンプルを作成

CellPhone DB は異なる
細胞タイプ間の相互作用を評価





参考文献・参考資料

- 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.
- Illumina DRAGEN Secondary Analysis - Illumina PIPseq scRNA, https://help.dragen.illumina.com/product-guide/dragen-v4.4/dragen-single-cell-pipeline/dragen-scrna-pipseq
- TRAINING PACKET Illumina Single Cell 3’ RNA Prep, https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/illumina-single-cell-3-rna-prep-training-packet/illumina-single-cell-3-rna-prep-training-packet-200065159-00.pdf
- Illumina Knowledge - Illumina Single Cell RNA Prep, https://knowledge.illumina.com/library-preparation/illumina-single-cell-rna-prep
- PIPseeker User Guide (PDF) - Illumina Single Cell RNA Prep, https://www.fluentbio.com/resources/pipseeker-user-guide/

Illumina Single Cell 3′ RNA Prepライブラリー調製キット

製品名	型番	細胞数/サンプル	希望販売価格(円)
Illumina Single Cell 3′ RNA Prep, T2 (8 samples, 2,000 cells/sample)	20135689	2,000	348,200
Illumina Single Cell 3′ RNA Prep, T10 (8 samples, 10,000 cells/sample)	20135691	10,000	663,300
Illumina Single Cell 3′ RNA Prep, T20 (4 samples, 20,000 cells/sample)	20135692	20,000	442,200
Illumina Single Cell 3′ RNA Prep, T100 (2 samples, 100,000 cells/sample)	20135693	100,000	928,500

製品名	型番	希望販売価格(円)	備考
Illumina Single Cell Prep Starter Equipment	20132796	483,600	専用のボルテックス、ドライバス、ラックを含む
Illumina Single Cell Supplemental Enrichment and Amplification Kit	20132794	116,000	カスタムシングルセルアプリケーション用オプション試薬
Illumina Single Cell Nuclei Isolation Kit (4 samples)	20132795	58,100	核インプットのオプション。細胞核分離、洗浄、再懸濁試薬を含む
Illumina Single Cell Unique Dual Indexes (96 indexes, 96 samples)	20132788	66,400	キットに含まれるインデックスを超えるマルチプレックスを行う際に必要なオプション

※2026年1月時点での販売希望価格(税抜き)となります
※細胞捕捉とcDNAまでの工程を実施するためのCaptureキットとライブラリー調製工程を実施するためのLibrary Prepキットの販売もございます