

シングルセル 解像度を用いた トランスクリプトーム 探索

- 10x GenomicsのChromium Single Cell Gene Expressionを使用して、数万のシングルセルの遺伝子発現を測定
- NovaSeq™ 6000システム、NextSeq™ 2000システム、NextSeq 1000システムまたはNextSeq 550システムを使用して3'遺伝子発現ライブラリーをシーケンス
- 使いやすいソフトウェアを使用して、細胞の不均一性が複雑な生物学的システムにどのように寄与しているかを解析

連携企業



illumina®

はじめに

シングルセルシーケンスは、個々の細胞のトランスクリプトームを調査する次世代シーケンス (NGS) 法であり、細胞間のバリエーションを高解像度で提供します。従来のRNAシーケンス (RNA-Seq) では、組織を一括でサンプリングし、細胞集団全体の平均的なリードアウトを提供します。対照的に、シングルセルRNAシーケンス (scRNA-Seq) 法を使用することで、複雑なサンプル内の細胞の不均一性を解き明かすことができます。シングルセルデータは、研究者が新しい細胞集団を発見し、新しい制御パスウェイを同定し、系統関係を再構築して、組織の発達、機能、疾患状態に寄与する要因の理解に役立てることができます。^{1, 2}

このテクニカルノートでは、イルミナのプラットフォーム上で10x GenomicsのChromium Single Cell Gene Expressionを使用するscRNA-Seqに対応したプロトコルの概要を説明します。この方法ではオリゴヌクレオチドバーコードを使用し、数百から数万の細胞に対してシングルセルレベルで3'遺伝子発現を直接測定します。

プロトコルの概要

このscRNA-Seq実験は、サンプル調製、シングルセル分画化、ライブラリー調製、シーケンス、解析からなるワークフロー (図1) に沿って行います。このプロトコルは10x GenomicsのChromiumプラットフォームとNext GEMテクノロジー、および実証済みのイルミナシーケンステクノロジーを活用します。Chromium装置と試薬は、シングルセルまたはシングル核の懸濁液から始め、バーコード付きゲルビーズを含むドロップレット内にシングルセルを分離します。

逆転写と増幅により、バーコードが付加されたシーケンス用シングルセル遺伝子発現ライブラリーが生成されます。ライブラリーは、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システム、NextSeq 550システムなどのイルミナのハイスループットのシーケンスプラットフォームでシーケンスします。Cell Rangerパイプライン (10x Genomics) を使用したデータ解析では、ゲルビーズのバーコードを利用して、遺伝子発現結果を個々の細胞にマッピングします。Loupe Browserソフトウェア (10x Genomics) を使用すると、シングルセルの遺伝子発現データを簡単に視覚化して探索し、サンプルの不均一性を特徴付けることができます。シングルセルシーケンスデータは、クラウド上またはNextSeq 1000システムおよびNextSeq 2000システムのローカル上にあるBaseSpace™ Sequence Hubで利用可能な、イルミナのDRAGEN™ Single-Cellアプリを使用して解析することもできます。

サンプル調製

Chromium Single Cell Gene Expressionのサンプル入力は、過剰な細胞破片を含まないシングルセル (またはシングル核) 懸濁液でなければなりません。このアッセイは、ヒトおよびマウスのさまざまな組織の種類、サルおよびラットの細胞の種類で検証されています。³ 研究者らは他の種との互換性も実証しています。^{4, 5} 適切なサンプルの取り扱いと調製技術は細胞膜の完全性を維持し、高品質なシングルセルデータを生成するためには非常に重要です。³

 細胞調製ガイド:
[10x Genomicsサポートウェブサイト](#)

 実証済みのプロトコール:
[10x Genomicsサポートウェブサイト](#)



図1: シングルセル遺伝子発現実験のワークフロー: シングルセルまたはシングル核の懸濁液から開始し、次にChromium装置によるマイクロ流体のシングルセル分画化とバーコード付加が続きます。得られたシングルセル遺伝子発現ライブラリーをイルミナシステムでシーケンスします。Cell RangerおよびLoupe Browserソフトウェア、またはDRAGEN Single-Cellパイプラインを使用してデータを解析し視覚化します。

シングルセルライブラリーの生成

調製したシングルセル懸濁液は、Chromium Next GEM Single Cell Gene Expressionキットを使用するライブラリー調製に使うことができます(図2)。ロースルーブットのパイロット研究(100~1,000細胞)にはLTキット、80,000個以下の細胞数には標準キット、ハイスルーブット研究(最大320,000細胞)にはHTキットを使用します。⁶⁻⁸ 細胞懸濁液はマイクロ流体チップにロードし、Chromium装置上でランを行います。これにより、固有のバーコードを含む単一のゲルビーズが含まれる各ドロップレット中に個々の細胞が分画化されます。

各ドロップレット、つまり「GEM」(ゲルビーズインエマルジョン)内では、ゲルビーズが細胞のmRNAの3'ポリAテールを捉え、逆転写酵素が一本鎖cDNAにバーコードを付加します。逆転写後、GEMは壊され、プールの画分を回収し精製します。ライブラリー構築ステップによりバーコードが付いたシングルセル遺伝子発現ライブラリーが生成され、イルミナのシーケンスシステムでシーケンスできる状態になります。

イルミナ装置を用いたシーケンス

このアプリケーションに必要なシーケンス出力に対応するには、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システム、またはNextSeq 550システムでscRNA-Seqライブラリーをシーケンスすることが推奨されています(表1)。iSeq™ 100システムなどの小規模な装置は実験デザインの最適化に使用することができます。⁹

* Chromium Single Cell Gene Expression標準キットには、少なくとも500個の細胞が必要であり、HTキットには少なくとも2,000個の細胞が必要です。

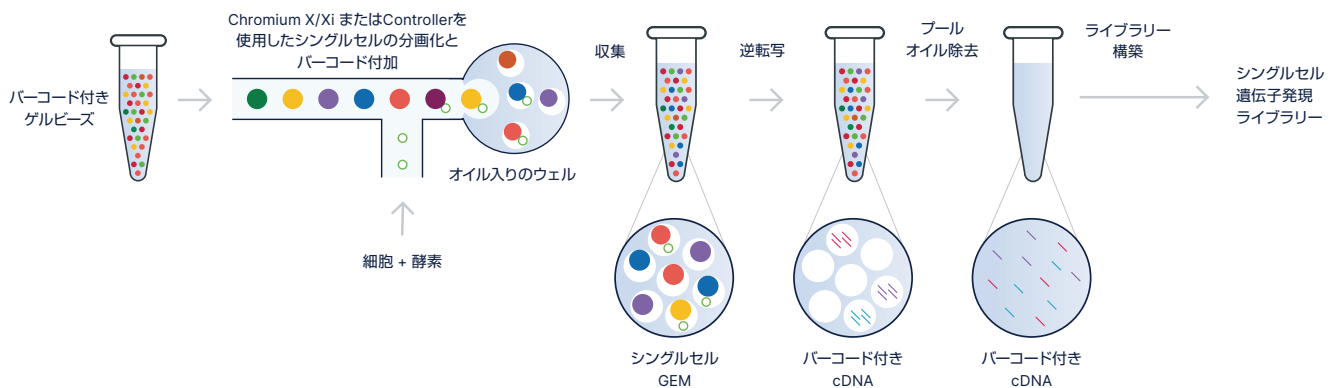


図2: 個々の細胞から3'遺伝子発現ライブラリーを生成: シングルセルはGEM内に捕捉され、mRNAの3'端にバーコードが付加されます。GEMを破壊、プールの後に、クリーンアップ、cDNA増幅、およびライブラリー構築が行われます。これにより、各サンプルからライブラリーが生成され、遺伝子発現が個々の細胞に関連付けられます。

NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、およびNextSeq 1000システムは、コスト効率の高いscRNA-Seq実験のための追加の機能があります。¹⁰ 100サイクル試薬キット (NextSeq 1000/2000 P2、NextSeq 2000 P3、およびNovaSeq SP、S1、およびS2フローセルで利用可能) は、Chromium Single Cell Gene Expressionライブラリーと互換性があります。また、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、およびNextSeq 1000システムは、BaseSpace Sequence Hub上にRun Plannerを搭載しており、セットアップの簡略化とランのデマルチプレックスが行えます。

 シングルセルRNA製品の互換性:
イルミナサポートウェブサイト

Chromium Single Cell Gene Expressionデュアルインデックスライブラリーは、デマルチプレックスに使用されるi5およびi7インデックスが隣接する標準的なイルミナのペアエンド構造を有していません(表2、図3)。ペアエンドシーケンスランを使用してシングルセル遺伝子発現ライブラリーをシーケンスします。

10x GenomicsはChromium Single Cell Gene Expressionアッセイには、細胞あたり少なくとも20,000リードペアを推奨しています(表1)。必要なパフォーマンスまたはアプリケーションに合わせてシーケンス深度を調整します。10x Genomicsはシーケンスランセットアップには、少なくとも1%のPhiXライブラリー添加を推奨しています。PhiXはランのコントロールとして機能し、エラー率メトリクスに関する情報を提供します。シングルセル遺伝子発現ライブラリーのシーケンスメトリクスの例は、10x Genomicsサポートウェブサイト¹¹ およびIllumina BaseSpace Sequence Hubのデモデータページ¹² で入手できます。

表1: イルミナシーケンスシステム上のChromium Single Cell Gene Expressionのサンプルスループットの例

Chromium Single Cell Gene Expressionのライブラリーの種類	細胞あたりの最小リードペア数 ^b	ライブラリーあたりのサポートされる最大細胞数 ^c	ランあたりのサンプル数 ^a							
			NextSeq 550システム	NextSeq 2000システム			NovaSeq 6000システム			
				高出力	P1 ^d	P2 ^d	P3	SP	S1	S2
ロースループット	20,000	1,000	20	5	20	60	32	65	165 ^e	384 ^e
標準	20,000	10,000	2	-	2	6	3	6	16	40
ハイスループット	20,000	20,000	1	-	1	3	1	3	8	20

- a. シーケンスランあたりのシングルセルのサンプル数は、サポートされているクラスター密度とローディング濃度でのイルミナPhiXコントロールライブラリーに基づいて算出されています。実際のパフォーマンスパラメーターは、サンプルの種類、サンプルの品質、パスフィルタークラスターに依存します。詳細については、各シーケンスシステムのスペックシートを参照してください。
- b. 最小のリード推奨は、10x Genomicsから提供されています。細胞あたり20,000リードペア、または40,000個別リード、リード1から20,000リード、リード2から20,000リード。必要なパフォーマンスまたはアプリケーションに応じてシーケンス深度を調整します。Cell Rangerのランサマリーのシーケンス飽和メトリクスと曲線を使用して特異的なサンプルの種類についてシーケンス深度の最適化が行えます。
- c. ライブラリーごとにサポートされる最大細胞数は、Chromiumワークフロー中にサンプルのマルチプレックスを実行しないことを前提としています。10x Genomicsの3' CellPlex製品を使用するサンプルのマルチプレックスにより、ライブラリーあたりの細胞スループットをスケールアップすることができます。
- d. 同一サンプルスループットのP1およびP2フローセルは、NextSeq 1000システムでも使用可能です。
- e. NovaSeq XPワークフローのみを用いる場合、NovaSeqフローセルへの個々のレーンのローディングが可能になります。最大384個のユニークデュアルインデックスが使用可能です。

表2: Chromium Single Cell Gen Expressionライブラリーの推奨シーケンスリード長

ライブラリーの種類	リード1	i7インデックス	i5インデックス	リード2
目的	細胞バーコードおよびUMI	サンプルインデックス	サンプルインデックス	cDNAインサート
デュアルインデックス ^a 3'遺伝子発現ライブラリー	28 bp	10 bp	10 bp	90 bp
シングルインデックス3'遺伝子発現ライブラリー	28 bp ^b	8 bp	0 bp	91 bp ^b

- a. 新規ユーザーには、インデックスホッピングを軽減するためにデュアルインデックス構成をお勧めします。
- b. 転写産物のリードが短いと、トランスクリプトームのアライメント率の低下につながる可能性があります。細胞バーコード、固有分子識別子 (UMI)、およびサンプルインデックスリードは、指定された長さよりも短くしてはなりません。リードは推奨値よりも長くても構いません。Cell Rangerは、細胞のバーコードまたはUMIリード内の追加の塩基を自動的に無視します。

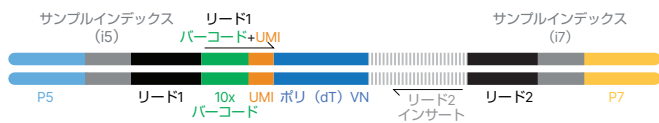


図3: シーケンス用のシングルセルデュアルインデックス遺伝子発現ライブラリーの構成: リード1プライマーは、28 bpの細胞バーコードと固有分子識別子 (UMI) のシーケンスに使用します。リード2プライマーは、cDNAインサートのシーケンスに使用します。

力を集約し、同じシーケンス深度にノーマライズし、結合されたデータを再解析することもできます。Cell Rangerの主な出力はカウントマトリクスであり、各細胞のバーコードの列と、トランスクリプトーム解析のための遺伝子などのすべての測定された特性を表す行で構成されます。解析パイプラインの出力には、品質管理情報¹³とLoupe Browser視覚化ソフトウェアまたはサードパーティのRツールまたはPythonツールでさらに解析するために出力できるファイルが含まれます。

データの解析および視覚化

シーケンス後、Cell Ranger解析パイプラインはリードをアライメントし、バーコードとUMIを計測して、シングルセル中の転写産物をマッピングします。Cell Rangerソフトウェアは、同様の遺伝子発現プロファイルを持つ細胞のクラスターを同定し、生のシーケンスデータを結果に変換します。また、Cell Rangerは、複数の実験からの出

イルミナのDRAGEN Bio-IT Platform (クラウド、オンプレミスサーバー、またはNextSeq 1000システムおよび NextSeq2000システムのオンボードで利用可能) は、scRNA-Seqデータ解析用のツールも提供します。DRAGEN Single-Cellパイプラインは、品質管理メトリクスと、Scanpy、AnnData、Seuratなどの定評のあるシングルセル解析ツールと互換性のある細胞ごとの遺伝子発現マトリクスを出力します。

データの特長

シングルセルトランスクリプトーム解析により、ロースループット (図4) またはハイスループット (図5) で細胞の種類と状態の詳細な特性評価が可能になります。

 サンプルデータセットとラン出力:
[BaseSpace Sequence Hub公開データページ](#)

専門家のサポートにアクセス

Chromium Single Cell Gene Expressionライブラリーのシーケンスについては、Illuminaチームと10x Genomicsチームが協力して、ワークフロー全体にわたる完全なサポートが保証されています。アッセイおよび解析に関する質問については10x Genomicsサポート (support@10xgenomics.com)、シーケンスに関する質問についてはイルミナサポート (techsupport@illumina.com) にお問い合わせください。これらのチームは、より複雑な問題にも協力して対応する態勢が整っています。

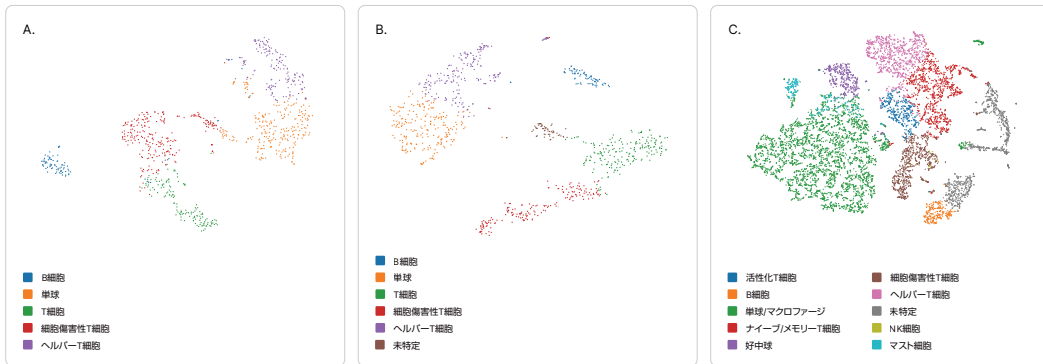


図4: PBMCのシングルセル遺伝子発現データの特徴: (A) Chromium Single Cell Gene Expression LTアッセイ (約900細胞)、(B) 標準的なChromium Single Cell Gene Expressionアッセイ (約900細胞)、および (C) 標準アッセイ (約8,500細胞) を用いてプロファイルしたヒト末梢単核球細胞 (PBMC) 由来の遺伝子発現データの教師なしクラスタリングと手動アノテーション。細胞は全トランスクリプトームプロファイルに基づいてクラスター化され、一般的な遺伝子発現マーカーを使用して手動でアノテーションが付けられています。LTアッセイと標準アッセイは、同等の細胞負荷で同等のデータ分解能を生成します。標準キットを使用してプロファイリングされる細胞の数をスケールアップすると、細胞の種類と状態をより詳細にプロファイリングできます。^{6,7}

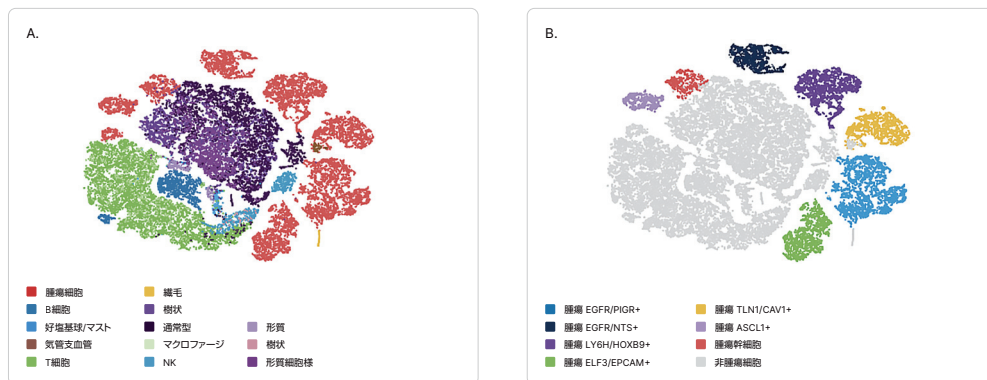


図5: 腫瘍細胞におけるハイスループットのシングルセル遺伝子発現データの特徴: Chromium Single Cell Gene Expression HTアッセイ (約12,600個の腫瘍細胞と約25,800個の非腫瘍細胞) を使用した、分離したヒト非小細胞性肺がん腫瘍サンプルからの遺伝子発現データの教師なしクラスタリングと手動アノテーション。(A) 細胞は全トランスクリプトームプロファイルに基づいてクラスター化され、一般的な遺伝子発現マーカーを使用して手動でアノテーションが付けられています。(B) 腫瘍細胞は、特異的ながん遺伝子マーカーに基づいてより詳細に分類されます。シングルセル遺伝子発現HTアッセイは、超希少細胞の発見、ハイスループットのCRISPRおよび薬物スクリーニング、または微小残存病変 (MRD) 検出など、より高いレベルのスループットを必要とする実験向けに設計されています。⁸

まとめ

このシングルセル遺伝子発現プロトコールにより、シングルセル分解能で分離したサンプルのトランスクリプトーム解析が可能になり、生物学的不均一性についての洞察が得られます。細胞の種類を区別し、動的な細胞の状態を明らかにする能力を用いることで、研究者は細胞の表現型と複雑なシステムについてより深い理解を得ることができるようになります。

詳細はこちら

シングルセルシーケンス : jp.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/ultra-low-input-single-cell-rna-seq.html

NovaSeq 6000システム : jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム : jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000.html

NextSeq 550システム : jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq.html

Chromium Single Cell Gene Expression : 10xgenomics.com/products/single-cell-gene-expression

参考文献

1. Park JE, Botting RA, Domínguez Conde C, et al. [A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation.](#) *Science*. 2020;367(6480):eaay3224. doi:10.1126/science.aay3224
2. Wang R, Dang M, Harada K, et al. [Single-cell dissection of intratumoral heterogeneity and lineage diversity in metastatic gastric adenocarcinoma.](#) *Nat Med*. 2021;27(1):141-151. doi:10.1038/s41591-020-1125-8
3. 10x Genomics. Single cell gene expression support. support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression. Accessed January 11, 2022.
4. Li YR, Lai HW, Huang HH, Chen HC, Fugmann SD, Yang SY. [Trajectory mapping of the early *Drosophila* germline reveals controls of zygotic activation and sex differentiation.](#) *Genome Res*. 2021;31(6):1011-1023. doi:10.1101/gr.271148.120
5. Pelligia J, Münch D, Meneses-Giles P, et al. [Adaptive cell invasion maintains lateral line organ homeostasis in response to environmental changes.](#) *Dev Cell*. 2021;56(9):1296-1312.e7. doi:10.1016/j.devcel.2021.03.027
6. 10x Genomics. Chart your own course with a low-throughput kit for pilot & optimization studies. pages.10xgenomics.com/rs/446-PBO-704/images/10x_LIT000120_Product_Sheet_LT_Kit_Letter_Digital.pdf. Accessed January 3, 2022.
7. 10x Genomics. Explore cellular diversity, cell by cell. pages.10xgenomics.com/rs/446-PBO-704/images/10x_LIT093_Product_Sheet_Explore-Cellular-Diversity_Letter_digital.pdf. Accessed January 3, 2022.
8. 10x Genomics. Unlock the power of scale with high-throughput multiomic single cell profiling. pages.10xgenomics.com/rs/446-PBO-704/images/10x_LIT000126_Product_Sheet_Single_Cell_GE_HT_Kit.pdf. Accessed January 3, 2022.
9. Illumina. QC and rebalancing of single-cell gene expression libraries using the iSeq 100 System. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/systems/iseq/single-cell-library-qc-app-note-770-2019-029.PDF. Accessed January 3, 2022.
10. Illumina. NextSeq 1000 and NextSeq 2000 single-cell RNA sequencing solution. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-1000-2000-single-cell-app-note-m-gl-00478/nextseq-1000-2000-single-cell-app-note-m-gl-00478.pdf. Accessed February 1, 2022.
11. 10x Genomics. Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell 3' v3.1 Dual Index Libraries. support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/sequencing/doc/technical-note-sequencing-metrics-and-base-composition-of-single-cell-3-v31-dual-index-libraries. Accessed January 3, 2022.
12. Illumina. BaseSpace Sequence Hub Demo Data. basespace.illumina.com/datacentral. Accessed January 4, 2022.
13. 10x Genomics. Interpreting Cell Ranger Web Summary Files for Single Cell Gene Expression Assays. support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/sequencing/doc/technical-note-interpreting-cell-ranger-web-summary-files-for-single-cell-gene-expression-assays. Accessed January 3, 2022.

製品情報

製品	カタログ番号
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028401
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028319
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028316
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (200 cycles)	20028313
NextSeq 1000/2000 P2 Reagents v3 (100 cycles)	20046811
NextSeq 2000 P3 Reagents (100 cycles)	20040559
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles)	20024904
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles)	20024907

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.
すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。
商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。