

# ILLUMINA® Bio-Rad® SureCell™ WTA 3' Library Prep Kit for the ddSEQ™ System

感度、拡張性、経済性に優れた高スループット次世代シーケンスプラットフォームで遺伝子発現にかつてない洞察を。

## 特長

- **高感度にバイアスなく転写シグネチャーの特性を把握**  
高感度かつ高い再現性でシングルセルの遺伝子を検出
- **シングルセルRNAシーケンスの包括的なワークフロー**  
テクノロジーイノベーターとの共同開発による完全にサポートされたワークフロー
- **シンプルなデータ解析と一体化した強力な次世代シーケンス**  
能率的で使いやすい解析ソフトウェアと組み合わせた定評あるイルミナシーケンス

## はじめに

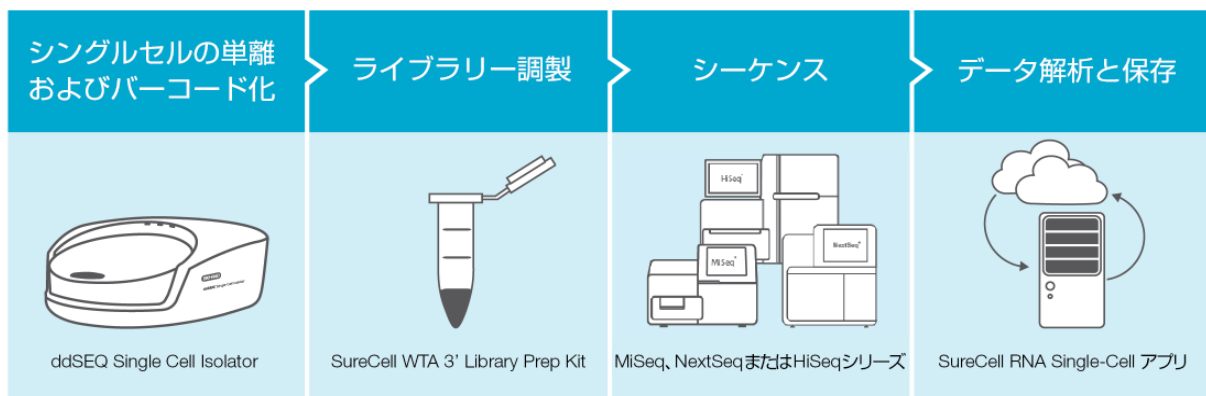
生体システムの複雑さは細胞個々の協調的な働きによりもたらされます。大量のトランスクリプトームデータを得る従来の技術では、複雑さをもたらす転写産物の多様性を明らかにすることはできませんでした (1)。シングルセルRNAシーケンス (RNA-Seq) なら細胞機能、疾患の進行および治療効果への洞察をもたらす遺伝子発現の詳細な解析ができます (2)。しかし、高スループットで使いやすいシングルセル次世代シーケンス (NGS) ライブラリーを手ごろな価格で何千も作製することが難しいということに変わりはありません (2)。

シングルセル生物学を加速するために、Illumina Bio-Rad Single-Cell Sequencing Solutionでは革新的なバイオ・ラッドのDroplet Digital™ テクノロジー (3) とイルミナNGSライブラリー調製、シーケンスおよび解析テクノロジーを組み合わせています。新しいプラットフォームでは、複数のサンプルや処理条件、タイムポイントによる対照実験が可能なシングルセルRNA-Seqのための包括的で使いやすいワークフロー (図1) を提供します。共同で開発およびサポートしているIllumina Bio-Rad

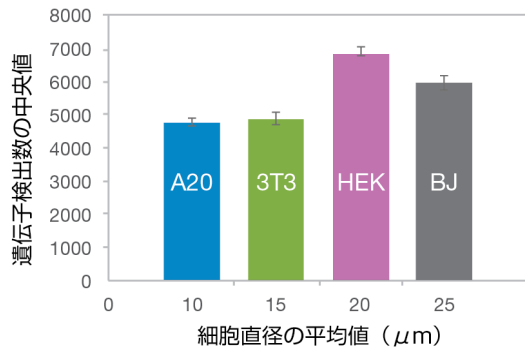
Single-Cell Sequencing Solutionでは、1回の実験で何万、何十万というシングルセルのトランスクリプトーム解析を行うことができます。拡張性に優れ、安定したシングルセルNGS解析ソリューションを採用すると、個々の細胞レベルでの課題を、RNA-Seqの感度と精度で解決できるようになります。

## 拡張性と柔軟性に優れたシングルセルの単離

Bio-Rad ddSEQ Single-Cell Isolator (SCI) では、シングルセルをディスポーザルカートリッジ上でナノリットル以下の液滴にカプセル化して単離します。各カートリッジに複数のサンプルを乗せることができる上、複数のカートリッジを順次処理することができるため、1日に何百〜何万という細胞の単離が可能です。個々の液滴内で細胞溶解や細胞のバーコード化が起るため、ワークフローを通して個々の細胞を追跡することが可能になります。この液滴をカプセル化して単離する手法では、哺乳類の細胞の大きさに関わらず、多様な細胞集団のバイアスのないプロファイルを得ることができます (図2)。Bio-Rad ddSEQ SCIは5分以下でサンプルを処理することができます。転写シグネチャーが変化するような長い実験ワークフローを省くことにより、急な転写応答の検出や追跡も継続的に行うことができます。



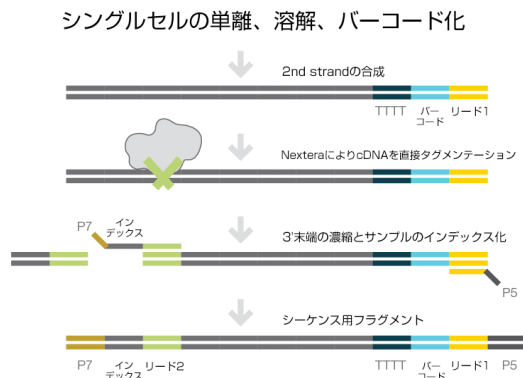
**図1：シングルセルRNA-Seqワークフロー** このワークフローでは、定評のあるBio-Rad ddSEQ SCIで細胞を単離し、Nexteraテクノロジーを活用したSureCell WTA 3' Library Prep Kitにてライブラリー調製を行い、イルミナ次世代シーケンサーでのシーケンス、さらにBaseSpaceデータ解析を包括して行います。



**図2：バイアスなく細胞サイズにとられないRNA-Seq** マウス細胞株 (A20、NIH3T3) およびヒト細胞株 (HEK、BJ) をSureCell WTA 3' Library Prep Kitを用いて処理しました。一貫して遺伝子検出数が多く、細胞の大きさに制限されず転写産物が検出されていることを示します。

## ライブラリー調製におけるNGSケミストリーの進歩

シングルセル懸濁液をddSEQ Mカートリッジにロードすると、ddSEQ Single-Cell Isolatorにより細胞はカプセル化およびバーコード化されます。溶解およびバーコード化は液滴ごとに行われます。液滴をこわし、2nd strand合成のためcDNAはまとめてプールされます。Nextera<sup>®</sup>テクノロジーを活用して直接cDNAをタグメンテーションしライブラリー調製を行うので、断片化や増幅の必要がありません (図3)。タグメンテーションに続いて、3'末端の濃縮とサンプルのインデックス化を行い、わずかなハンズオン時間で最大24種類までインデックス化し、シーケンス可能なライブラリーを調製します。



**図3：SureCell™ WTA 3' Library Prep Kit for the ddSEQ™ Systemの概要** 細胞を単離、溶解、バーコード化した後、cDNAを2nd strand合成のためにまとめてプールします。直接cDNAをタグメンテーションした後、3'末端の濃縮およびサンプルのインデックス化を行いライブラリーを調製します。

## イルミナNGSシステムによる確かなシーケンス

調製したシングルセルライブラリーは、イルミナのNextSeq<sup>®</sup>、HiSeq<sup>®</sup>シリーズに直接ロードしてシーケンスします。これらシーケンサーシステムでは、業界をリードする一塩基合成 (SBS) ケミストリーを利用しており、イルミナシーケンサーは、世界中のNGS全体の90%以上で使用され、2万6千本以上の学術論文で引用されています。この技術により、すべてのイルミ

ナNGSプラットフォームにおいて一貫した確かなシーケンスデータが得られます。NextSeq、HiSeqシリーズは、幅広いアプリケーションに対応する柔軟性と、あらゆる研究規模に対応する拡張性あるスループットを備えています。

装置制御ソフトウェアは使いやすく、直感的なユーザーインターフェースによりサンプルローディングからランセットアップに至るまでを誘導し、完全に自動化されたシーケンスランを装置上でもリモートからでもリアルタイムにモニタリングすることが可能です。

## シンプルでありながら強力なデータ解析

シングルセルシーケンスデータは、イルミナのクラウド型ゲノミクスコンピューティング環境であるBaseSpace Sequence Hubに瞬時に転送、保存され安全に解析していただくことができます。BaseSpace Sequence Hubでは多数のBaseSpaceアプリをご利用いただけます。どなたでもご利用いただけるオープンソースツールにより、アライメント、バリエーションなどよく使われるデータ解析ニーズに広く対応しています。これらアプリは、バイオインフォマティクスの専門知識がなくても操作できるように設計された直感的なタッチパネルによるユーザーインターフェースを備えています。

SureCell RNA Single-Cell AppはIllumina Bio-Rad Single-Cell Sequencing Solutionのデータ解析に対応するように設計されています。SureCell RNA Single-Cell Appは、最大96サンプルの複数シーケンスランのデータ解析を可能にするほか、次のような機能も備えています：

- シーケンスの品質管理 (QC) に役立つパラメーター
- 固有転写産物のシングルセルへの簡単な割当て
- 出力およびダウンロード可能な遺伝子発現マトリクスおよびレポート
- 亜集団および発現差のある遺伝子を同定するためのさまざまな解析オプション

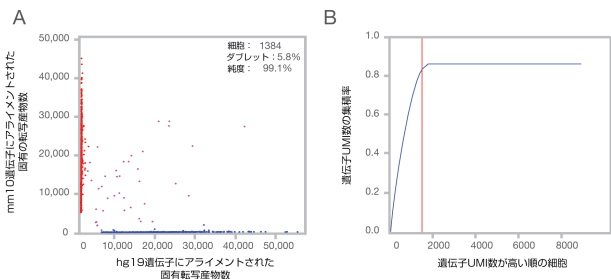
## 高品質データ

異なる生物種の混合細胞を用いた*in vitro*実験を行い、Illumina Bio-Rad Single-Cell Sequencing Solutionから得られるシングルセルRNA-Seqデータの品質について検証しました。ヒト胎児腎臓 293 (HEK293) 細胞およびNIH3T3マウス胚性線維芽細胞を (特記しない限り) 1 : 1の比率で混合し、シングルBio-Rad ddSEQカートリッジの4つのサンプルチャンバーにロードします。ddSEQ SCIで1,384個のシングルセルをカプセル化およびバーコード化します。バーコード化された転写産物はIllumina SureCell WTA 3' Library Prep Kit for the ddSEQ Systemで処理した後、NextSeq 550システムでシーケンスを行います。シーケンス結果はIllumina SureCell RNA Single-Cell Appを用いて解析しました。

\*ファイル上で算出されたデータIllumina, Inc. 2015.

### 異種細胞集団からの確かな遺伝子検出

異種混合サンプルから検出されたヒト (hg19) およびマウス (mm10) の固有転写産物のデータ解析を行いプロットすると、両種にマッピングされている転写産物を含む細胞のバーコードの割合が低いことがわかります (5.8%) (図4A)。これは、シングルセルを高純度 (99%) で効率よく単離したことを示しています。細胞のバーコードに割り当てた遺伝子転写産物の集積率をグラフ化すると、変曲点 (赤線) を利用してバーコード化した細胞の検出数を測定することができます (図4B)。これにより、転写産物が高い割合でシングルセルに割り当てられていることがわかります。

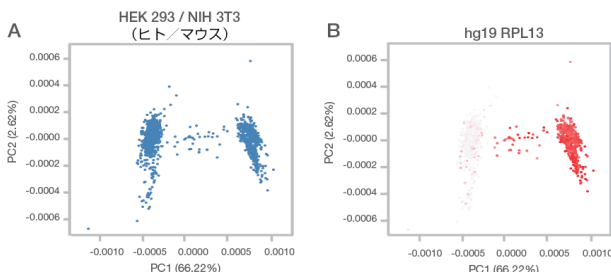


**図4：確かなシングルセル転写産物の同定** **A.** BaseSpaceにより固有分子識別子 (UMI) 数をプロット。つまり、各細胞のバーコードに対してマウス/mm10 (赤) およびヒト/hg19 (青) ゲノムに割り当てられた転写産物数。マウスおよびヒトの両方にマッピングされている固有転写産物 (紫) はダブルレット細胞を示しています。**B.** 細胞のバーコードに割り当てられた固有転写産物の集積率 (均等目盛)。変曲点 (赤線) からシーケンスランにおけるバーコード化した細胞の検出数が特定できます。

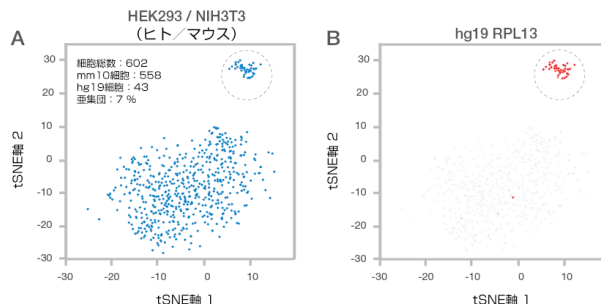
### 混合サンプルから細胞亜集団を確実に同定

主成分解析 (PCA) によりHEK293 / NIH3T3混合物からシーケンスしたシングルセルをクラスタリングすると、2つの異なる細胞集団が示されています (図5A)。ヒトリボソームタンパク質 L13 (hg19 RPL13) の遺伝子発現によって色分けされた細胞はヒトとマウスの細胞で明らかに区別できます (図5B)。

さらにマウスNIH3T3細胞を少量のヒトHEK293細胞でスパイクして、*in vitro*における異種混合実験を行いました。t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) 解析を行ったところ、この混合物から得られたヒト細胞は全細胞集団の7%を示す明確なクラスターとして同定されました (図6A)。ヒト RPL13の遺伝子発現により色分けされた細胞がヒト細胞の亜集団であることが確認できます (図6B)。



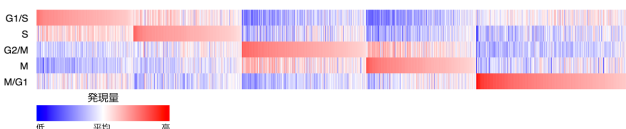
**図5：細胞集団の確かな同定** **A.** HEK293およびNIH3T3細胞の1：1の混合物から選別した1,384個のシングル細胞をシーケンス、SureCell RNA Single-Cell AppによりPCAを行ったもの。**B.** ヒト (hg19) RPL13遺伝子の発現に基づく細胞集団クラスタ。



**図6：細胞亜集団の確かな同定** **A.** NIH3T3およびHEK293細胞の混合物をt-SNEアルゴリズムによりSureCell RNA Single-Cell Appで解析したところ、異なる細胞亜集団が確認できます。**B.** hg19 RPL13の遺伝子発現により色分けされた細胞がヒト細胞の亜集団であることが確認できます。

### シングルセル解析で細胞周期相の特定が可能に

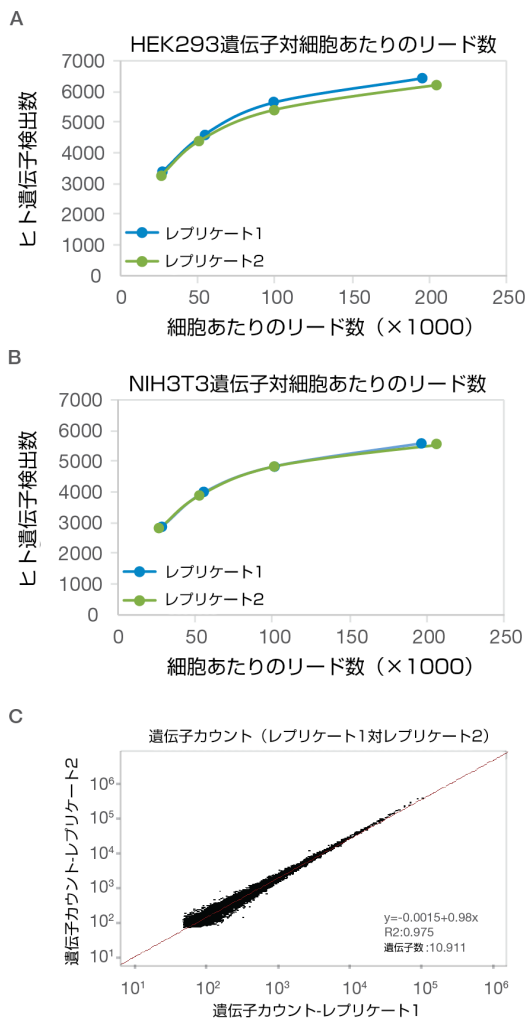
細胞周期の各主要相と関連のあるマーカーの遺伝子発現を解析することで細胞周期の正確な解析が可能になります。増殖期のHEK293細胞を前述同様にソーティング、調製してシーケンスを行います。細胞周期の各相は、SureCell RNA Single-Cell Appでヒートマップを作成し可視化することができます (図7)。



**図7：RNA-Seqによるシングルセルの細胞周期解析** SureCell RNA Single-Cell Appを用いた細胞周期状態の解析は、細胞周期の各相に関連する遺伝子の固有転写産物数に基づくもので、各細胞の合計数により正規化します。発現量は中央値で中心化し、各細胞周期の中央値の絶対偏差によりスケールを調整しています。

### 高感度かつ再現性のある結果

HEK293細胞のレプリケートサンプルを前述同様に処理し、NextSeq 550システムでシーケンスを行いました。シーケンスリードから2.5万~20万リードの範囲で細胞ごとにあらゆるリードのサブサンプルを調製します。各シーケンス深度で細胞あたりに検出されたリード数の中央値から、異なる細胞株でのレプリケートにおいても高感度で再現性よく遺伝子が検出されていることがわかります (図8)。各ヒト遺伝子あたりの全遺伝子カウントをすべてのHEK293細胞で合計します。ddSEQカートリッジで処理した2レプリケート間で全遺伝子カウントの直線回帰が一致していることから再現性の高さは実証されています (図8C)。



**図8：多様な細胞株における遺伝子検出の感度および再現性** **A.** ヒトHEK293細胞の2レプリケートにおいて細胞あたりに検出された遺伝子数の中央値を、細胞あたり2.5万~20万リードまでのシーケンス深度につきプロットした。**B.** マウスNIH3T3細胞における2レプリケートの細胞あたりに検出された遺伝子数の中央値。**C.** 2レプリケートサンプルのうちすべてのHEK293細胞において全遺伝子カウントが50カウント以上のものについてプロットした遺伝子発現の直線回帰。

## まとめ

複雑な生体システムをもたらす転写産物の多様性について理解を深めるには、何千ものシングルセルNGSライブラリーを調製する拡張性に優れた、高スループットで使いやすいメソッドが不可欠です。Illumina Bio-Rad Single-Cell Sequencing Solutionは、ドロップレットによる細胞単離テクノロジーとNGSテクノロジーを活用して共同開発した包括的なワークフローです。これにより、複数のサンプルを複数の処理条件やタイムポイントで並列解析できるようになり、これまでになかったシングルセルの知見が明らかになります。SureCell RNA Single-Cell Appのシンプルでありながらも強力なデータ解析オプションにより、遺伝子発現プロファイルやデータの可視化ツールを使った多様な細胞集団の細分化や対象亜集団の特定が可能になります。細胞周期マーカーを解析すれば、複合組織中の各細胞の細胞周期の解析も可能です。また、Illumina Bio-Rad Single-Cell Sequencing Solutionがあれば、1回の実験で何百~何万という細胞のシングルセルトランスクリプトームを高感度かつ高精度に調べることができます。

## 製品情報

製品名	カタログ番号
SureCell WTA 3' Library Prep Kit(2 cartridge kit)	20014279
SureCell WTA 3' Library Prep Kit(6 cartridge kit)	20014280

## 詳細について

Illumina Bio-Rad Single-Cell Sequencing Solutionについての詳細は、

[www.illumina.com/surecell](http://www.illumina.com/surecell)をご覧ください。

## 参考文献

- Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, Marioni JC, Teichmann SA. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*. 2015;58(4):610-620.
- Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14(9):618-630.
- Hindson BJ, Ness, KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604-8610.

## 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](http://jp.illumina.com)

[www.facebook.com/illuminakk](https://www.facebook.com/illuminakk)

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。販売条件：[jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSeqPro, DASL, Design Studio, GAlIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Innium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NovaSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。

その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。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。

Pub.No. 1070-2016-014-A-16MAR2017-JPN

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。

illumina®