

Bibliotheksvorbereitungs-Kit von SureCell™ WTA 3' für das ddSEQ™-System von Illumina® Bio-Rad®

Gewinnen Sie Erkenntnisse zur Genexpression mithilfe einer empfindlichen, skalierbaren und kosteneffizienten Plattform mit hohem Durchsatz für die Sequenzierung der nächsten Generation

Vorteile

- **Empfindliche und unverfälschte Charakterisierung transkriptionaler Signaturen**
Höchst empfindliche und reproduzierbare Generkennung in einzelnen Zellen
- **Umfassender Workflow für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen**
Vollständig unterstützter Workflow, der in Zusammenarbeit mit Technologie-Innovatoren entwickelt wurde
- **Leistungsstarke Sequenzierung der nächsten Generation integriert mit einfacher Datenanalyse**
Bewährte Illumina-Sequenzierung in Verbindung mit optimierter, benutzerfreundlicher Analysesoftware

Um die Erwartungen der Zellbiologie zu erfüllen, werden bei der Lösung für die Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad die höchst innovative Bio-Rad Droplet Digital™-Technologie(3) und die Illumina-Technologien für die NGS-Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Analyse kombiniert. Diese neue Plattform bietet einen umfassenden, benutzerfreundlichen Workflow für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen (Abbildung 1), der kontrollierte Experimente mit mehreren Proben, unter unterschiedlichen Behandlungsbedingungen und zu verschiedenen Zeiten ermöglicht. Die in Zusammenarbeit mit Technologieführern entwickelte und unterstützte Lösung für die Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad ermöglicht die Transkriptom-Analyse von Hunderten bis Zehntausenden einzelnen Zellen in einem Experiment. Diese skalierbare, zuverlässige NGS-Probenzubereitungsmethode für einzelne Zellen ermöglicht es mehr Forschern, die Empfindlichkeit und Präzision der RNA-Sequenzierung für Fragestellungen anzuwenden, die nur durch die Untersuchung einzelner Zellen gelöst werden können.

Einleitung

Komplexe biologische Systeme werden durch die koordinierten Funktionen einzelner Zellen bestimmt. Konventionelle Technologien, die Massendaten zu Transkriptomen liefern, sind nicht in der Lage, die transkriptionelle Heterogenität aufzuzeigen, die hinter dieser Komplexität steht.(1) Die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) einzelner Zellen ermöglicht eine genaue Genexpressionsanalyse und liefert Erkenntnisse zur Zellfunktion, zum Krankheitsverlauf und zur therapeutischen Wirksamkeit.(2) Die erschwingliche, benutzerfreundliche Generierung von Tausenden von NGS-Bibliotheken (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) einzelner Zellen mit hohem Durchsatz stellt jedoch weiterhin eine Herausforderung dar.(2)

Skalierbare, flexible Isolation einzelner Zellen

Der Bio-Rad ddSEQ Single-Cell Isolator (SCI) kapselt einzelne Zellen ein und trennt sie in Sub-Nanoliter-Tröpfchen auf Einwegkartuschen ab. Jede Kartusche fasst mehrere Proben und mehrere Kartuschen können gleichzeitig verarbeitet werden, wodurch Hunderte bis Zehntausende von Zellen am Tag isoliert werden können. Die Zelllysis und das Versehen von Zellen mit Barcodes erfolgen für einzelne Tröpfchen, wodurch das Verfolgen einzelner Zellen durch den gesamten Workflow möglich ist.

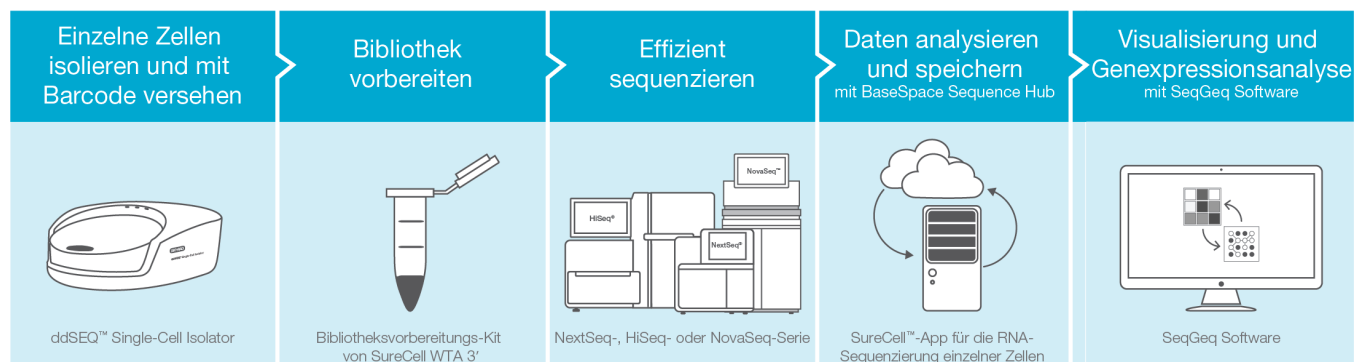


Abb. 1. Workflow der RNA-Sequenzierung einzelner Zellen. Der Workflow integriert die bewährte Zellisolation durch den Bio-Rad ddSEQ Single-Cell Isolator, gefolgt von der Bibliotheksvorbereitung durch das Bibliotheksvorbereitungs-Kit von SureCell WTA 3' mit der Nextera-Technologie, der Illumina-Sequenzierung und der Datenanalyse mit BaseSpace Sequence Hub sowie der SeqGeq Analysis Software von FlowJo, LLC.

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.

Diese tröpfchenbasierte Methode ist von der Größe der Säugetierzelle unabhängig, wodurch die unverfälschte Profilierung verschiedener Zellpopulationen ermöglicht wird (Abbildung 2). Der Bio-Rad ddSEQ SCI kann Proben in weniger als fünf Minuten verarbeiten. Durch das Beseitigen langer experimenteller Workflows, die die transkriptionelle Signatur ändern können, können akute transkriptionelle Antworten in Zeitreihenexperimenten erkannt und verfolgt werden.

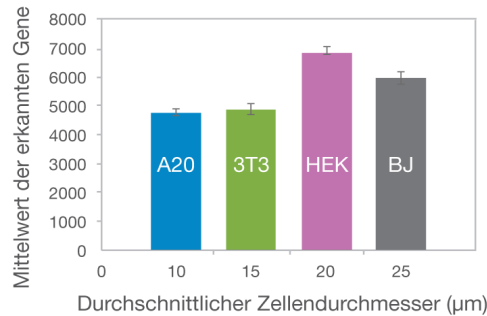


Abb. 2. Unverfälschte, zellgrößenunabhängige RNA-Sequenzierung. Zelllinien von Mäusen (A20, NIH 3T3) und Zelllinien von Menschen (HEK, BJ) wurden mithilfe des Bibliotheksvorbereitungs-Kits von SureCell WTA 3' verarbeitet. Die durchweg hohe Anzahl erkannter Gene zeigt, dass die Gewinnung von Transkripten nicht auf die Zellgröße beschränkt ist.

Fortschrittliche NGS-Chemie für die Bibliotheksvorbereitung

Eine einzelne Zellsuspension wird in eine ddSEQ-M-Kartusche geladen und Zellen werden durch den ddSEQ Single-Cell Isolator eingekapselt und mit Barcode versehen. Die Lysis und das Versehen mit Barcodes werden in jedem Tröpfchen durchgeführt. Die Tröpfchen werden getrennt und cDNA wird für die Zweitstrangsynthese zusammengefasst. Bibliotheken werden über die direkte cDNA-Tagmentierung mithilfe der Nextera®-Technologie generiert. Das Schneiden oder die Voramplifikation ist nicht notwendig (Abbildung 3). Auf die Tagmentierung folgt die Anreicherung und Probenindexierung durch 3', um bis zu 24 indexierte und sequenzierungsfähige Bibliotheken mit minimalem manuellem Aufwand vorzubereiten.

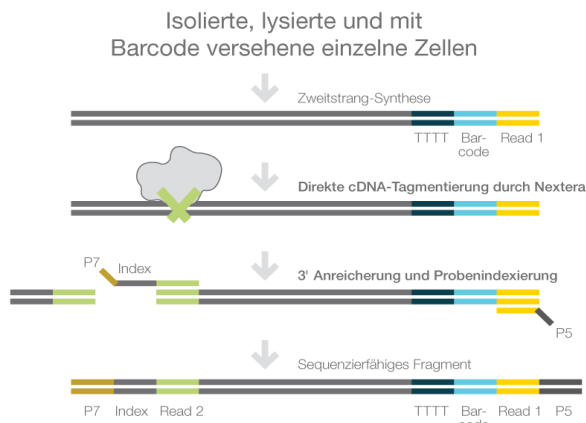


Abb. 3. Übersicht über das Bibliotheksvorbereitungs-Kit von SureCell WTA 3' für das ddSEQ-System. Nach dem Isolieren, der Lysis und dem Versehen der Zellen mit Barcodes wird cDNA für eine Zweitstrangsynthese zusammengefasst. Bibliotheken werden über die direkte cDNA-Tagmentierung generiert. Danach erfolgt die Anreicherung und Probenindexierung durch 3'.

Zuverlässige Sequenzierung mit den NGS-Systemen von Illumina

Vorbereitete Bibliotheken mit einzelnen Zellen werden direkt in ein Illumina-System der MiSeq®, NextSeq®, HiSeq®- oder NovaSeq™-Serie zur Sequenzierung geladen. Diese Sequenzierungssysteme nutzen die branchenführende Chemie zur Sequenzierung durch Synthese (Sequencing by Synthesis – SBS) von Illumina, die bei mehr als 90 % der NGS weltweit verwendet wird.* Diese gängige Technik bietet Konsistenz und Verlässlichkeit bei Sequenzierungsdaten über alle Illumina-NGS-Plattformen hinweg. Die MiSeq-, NextSeq-, HiSeq- und NovaSeq-Serien der Sequenzierungssysteme bieten viel Flexibilität für eine breite Palette an Anwendungen und einen skalierbaren Durchsatz, um verschiedene Studienumfänge zu unterstützen.

Die Gerätekontrollsoftware ist einfach zu verwenden und lotst die Forscher durch das Laden der Proben und die Laufkonfiguration über intuitive Benutzungsschnittstellen. Außerdem ermöglicht sie die Echtzeitüberwachung vollständig automatisierter Sequenzierungsläufe auf dem Gerät oder remote.

Vereinfachte Datenanalyse in BaseSpace® Sequence Hub

Die Sequenzierungsdaten einzelner Zellen können sofort und sicher in BaseSpace Sequence Hub, der cloudbasierten Genomik-Computing-Umgebung von Illumina, übermittelt, gespeichert und analysiert werden. In BaseSpace Sequence Hub ist eine große Sammlung von BaseSpace-Apps vorhanden. Die kommerziellen und Open-Source-Tools unterstützen eine Reihe allgemeiner Anforderungen an die Datenanalyse, wie Alignment, Varianten-Calling und viele mehr. Diese Apps haben intuitive, „auf Knopfdruck“ funktionierende Benutzerschnittstellen, die so entwickelt wurden, dass keine Bioinformatik-Fachkenntnisse erforderlich sind.

Die SureCell-App für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen wurde so entwickelt, dass die Datenanalyse für die Lösung für die Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad unterstützt wird. Die SureCell-App für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen ermöglicht eine optimierte Datenanalyse für bis zu 96 Proben über mehrere Sequenzierungsläufe und umfasst:

- praktische Kennzahlen zur Qualitätskontrolle (QC) der Sequenzierung
- einfache Zuordnung eindeutiger Transkripte zu einzelnen Zellen
- Matrizen und Berichte zur Genexpression, die exportiert und heruntergeladen werden können
- zahlreiche Analyseoptionen für die Identifikation von Unterpopulationen und differentiell exprimierten Genen

*Archivierte Datenberechnungen. Illumina, Inc. 2015.

Erweiterte Datenvisualisierung mit SeqGeq Software



SeqGeq Software ist eine Desktop-Anwendung zur erweiterten Datenanalyse, Interpretation und Visualisierung von Genexpressionsdaten einzelner Zellen entwickelt von FlowJo, LLC für die Lösung zur Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad. SeqGeq Software bietet leistungsfähige Tools zur Datenreduzierung und Identifikation von Populationen. SeqGeq Software lässt sich direkt in BaseSpace Sequence Hub integrieren und ermöglicht die Visualisierung und Analyse von Expressionsdaten mit statistischer Farbuordnung von einzelnen Zellen, zusammenfassenden Heatmaps sowie Berichtseditoren mit Drag-and-Drop-Funktion.

Qualitativ hochwertige Daten

Um die hohe Qualität der aus der RNA-Sequenzierung einzelner Zellen mit der Lösung für die Sequenzierung von einzelnen Zellen von Illumina Bio-Rad gewonnenen Daten zu veranschaulichen, wurden *In-vitro*-Experimente mit unterschiedlichen Zellen von verschiedenen Spezies durchgeführt. HEK-293-Zellen (Human Embryonic Kidney, menschliche embryonale Nierenzellen) und embryonale NIH-3T3-Fibroblasten von Mäusen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt (außer anders gekennzeichnet) und in vier Probenkammern einer einzelnen Bio-Rad-ddSEQ-Kartusche verteilt. Der ddSEQ Single-Cell Isolator hat 1.384 einzelne Zellen eingekapselt und mit Barcodes versehen. Mit Barcode versehene Transkripte wurden für die Sequenzierung einzelner Zellen mithilfe des Bibliotheksvorbereitungs-Kits von SureCell WTA 3' für das ddSEQ-System von Illumina Bio-Rad verarbeitet und auf dem Illumina NextSeq 550-System sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mithilfe der SureCell-App von Illumina für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen analysiert.

Zuverlässige Generkennung in einer heterogenen Zellenpopulation

Die Datenanalyse und Darstellung von eindeutigen Transkripten eines Menschen (hg19) und einer Maus (mm10), die bei den Proben mit gemischten Spezies erkannt wurden, zeigen einen niedrigen Prozentsatz (5,8 %) an Zellen-Barcodes, die Transkripte enthalten, die beiden Spezies zugeordnet sind. Diese stellen Zellendubletten dar (Abbildung 4A). Dies zeigt, dass das Isolieren einzelner Zellen effizient ist und eine hohe Reinheit aufweist (99 %). Bei der grafischen Darstellung der kumulativen Bruchteile genetischer Transkripte, die Zellen-Barcodes zugeordnet sind, wird der Wendepunkt (rote Linie) verwendet, um die Anzahl an entdeckten, mit Barcode versehenen Zellen zu bestimmen (Abbildung 4B). Dies zeigt, dass ein großer Bruchteil der Transkripte einzelnen Zellen zugeordnet ist.

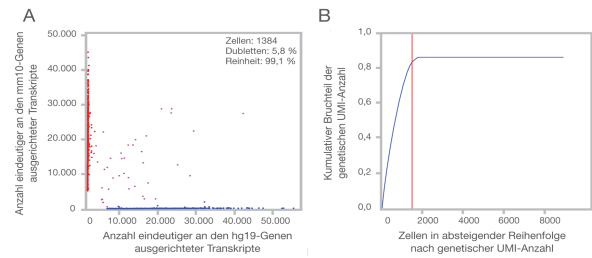


Abb. 4. Zuverlässige Transkript-Identifikation einzelner Zellen. **A.** Von BaseSpace für jeden Zellen-Barcode generierte Darstellungen der Anzahl an UMIs (Unique Molecular Identifiers, eindeutige molekulare Identifikatoren), d. h. Transkripte, die den Genomen der Maus/mm10 (rot) und des Menschen/hg19 (blau) zugeordnet sind. Eindeutige Transkripte, die der Maus und dem Menschen zugeordnet sind (lila), stellen Zellendubletten dar. **B.** Kumulativer Bruchteil eindeutiger Transkripte, die Zellen-Barcodes zugeordnet sind (lineare Skala). Der Wendepunkt (rote Linie) bestimmt die Anzahl an mit Barcode versehenen Zellen, die im Sequenzierungslauf erkannt wurden.

Klare Identifikation von Zellunterpopulationen in gemischten Proben

Ein weiteres *In-vitro*-Experiment mit gemischten Spezies wurde durchgeführt, bei dem NIH-3T3-Zellen einer Maus mit einer kleinen Anzahl menschlicher HEK-293-Zellen bespickt wurden. Mithilfe der t-SNE-Analyse (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) wurden die menschlichen Zellen aus dieser Mischung als eindeutiges Cluster identifiziert und stellten 7 % der gesamten Zellpopulation dar (Abbildung 5A). Durch die Genexpression des menschlichen ribosomalen Proteins *RPL 13* farb-kodierte Zellen bestätigen die Identität der Unterpopulation als menschliche Zellen (Abbildung 5B).

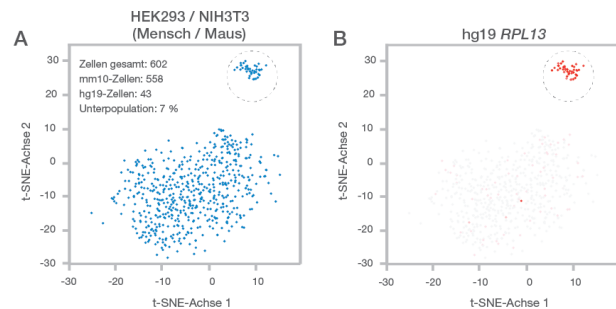


Abb. 5. Zuverlässige Identifikation von Zellunterpopulationen. **A.** Die Analyse einer Mischung von NIH3T3- und HEK293-Zellen in der SureCell-App für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen mithilfe des t-SNE-Algorithmus kennzeichnet eindeutig unterschiedliche Unterpopulationen von Zellen. **B.** Durch die Genexpression von hg19 RPL 13 farb-kodierte Zellen bestätigen die Identität der Unterpopulation als menschlich.

Die Analyse von einzelnen Zellen zeigt die Heterogenität von Zellzyklusphasen

Ein *In-vitro*-Experiment mit gemischten Spezies wurde durchgeführt, bei dem HEK-293-Zellen im Verhältnis 1:1 mit NIH-3T3-Zellen vermischt wurden. Der PCA-Plot (Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse) und der farblich zugeordnete Genexpressions-Plot des menschlichen ribosomalen Proteins *RPL13* kennzeichnen menschliche Zellen (Abbildung 6A). Die t-SNE-Analyse der Teilmenge der HEK-293-Zellen zeigt eindeutige Zellcluster, die Unterschiede in Genexpressionsprofilen darstellen (Abbildung 6B). Eine gründlichere Analyse der Marker, die den Zellzyklusphasen zugeordnet sind, ermöglicht eine genaue Analyse des Zellzyklus einzelner Zellen. Diese Analyse basiert auf eindeutigen Transkriptzählungen relevanter Gene. Dies wird durch die Gesamtzahl für jede Zelle normalisiert und als zusammenfassende Heatmap visualisiert (Abbildung 6C).

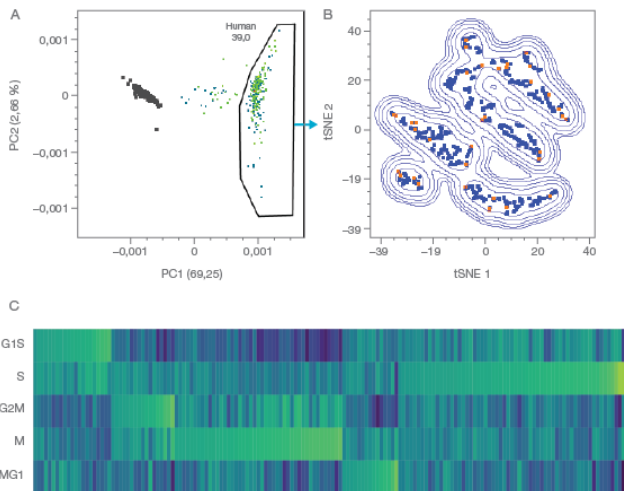


Abb. 6. Die gründliche Analyse einzelner Zellen in SeqGeq Software zeigt die Homogenität in HEK-293-Zellen. PCA-Mischung von HEK-293- und NIH-3T3-Zellen im Verhältnis 1:1, farblich zugeordnet durch Expression des menschlichen *RPL13*-Gens (A, Mauszellen in grau). t-SNE-Analyse der Teilmenge menschlicher Zellen, in denen eindeutige Cluster Unterschiede in Genexpressionsprofilen (B) darstellen. Eine Heatmap einer einzelnen Zelle zeigt den Zellzyklusstatus basierend auf eindeutigen Transkriptzählungen von Genen (C). Die Expression wird vom Mittelwert zentriert und von der absoluten Abweichung für jeden Zellzyklus skaliert. Die Analyse wurde mithilfe von BaseSpace Sequence Hub und SeqGeq Software durchgeführt.

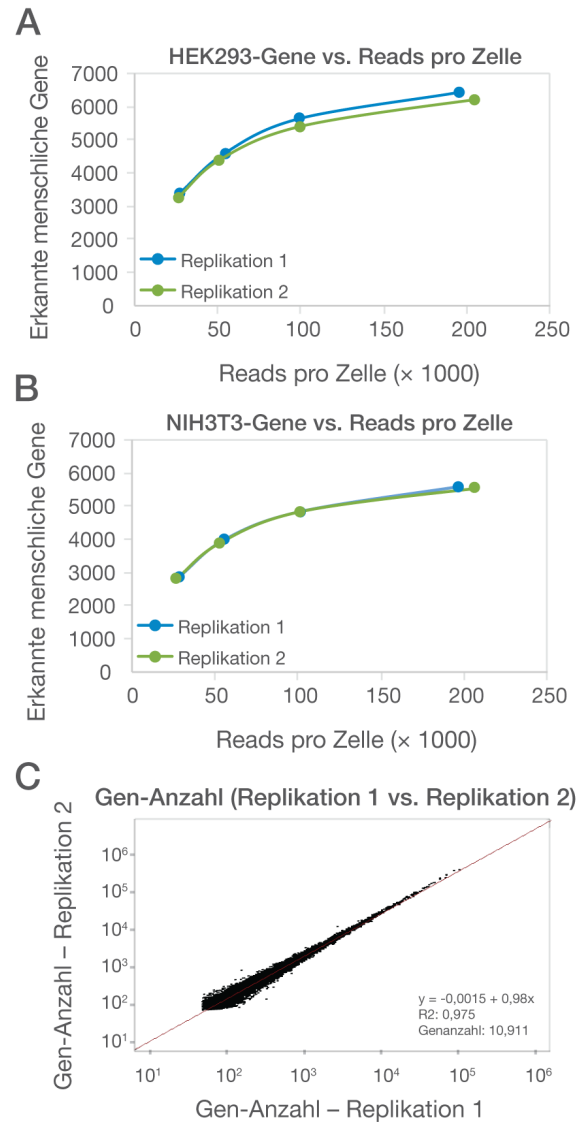


Abb. 7. Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Generkennung für verschiedene Zelllinien. **A.** Die mittlere Anzahl an Genen, die je Zelle erkannt werden, wird bei einer Sequenzierungstiefe von 25.000 bis 200.000 Reads pro Zelle für zwei Replikate von menschlichen HEK293-Zellen dargestellt. **B.** Die mittlere Anzahl an Genen, die je Zelle für zwei Replikate von NIH3T3-Zellen einer Maus erkannt werden. **C.** Eine lineare Regression der Genexpression ist für Gene mit ≥ 50 Zählungen dargestellt, summiert für alle HEK293-Zellen in zwei Replikatproben.

Höchst empfindliche und reproduzierbare Ergebnisse

Replikatproben von HEK-293-Zellen wurden, wie oben beschrieben, verarbeitet und auf einem NextSeq 550-System sequenziert. Für die Sequenzierungs-Reads wurden Teilproben für verschiedene Reads pro Zelle von 25.000 bis 200.000 Reads erstellt. Die mittlere Anzahl an Reads, die je Zelle bei jeder Sequenzierungstiefe erkannt wurden, zeigt eine höchst empfindliche und reproduzierbare Generkennung über die Replikate verschiedener Zelllinien hinweg (Abbildungen 7A und 7B). Die Gesamtgenzählungen für jedes menschliche Gen wurden für alle HEK-293-Zellen summiert. Die Passung der linearen Regression der summierten Genzählungen zwischen zwei Replikaten, die auf einer ddSEQ-M-Kartusche verarbeitet wurden, zeigt noch einmal, dass die Ergebnisse höchst reproduzierbar sind (Abbildung 7C).

Zusammenfassung

Um das Verständnis der transkriptionellen Heterogenität zu verbessern, die komplexe biologische Systeme antreibt, brauchen Forscher eine skalierbare und benutzerfreundliche Methode mit hohem Durchsatz für die Generierung von Tausenden von NGS-Bibliotheken für einzelne Zellen. Die Lösung für die Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad stellt einen umfassenden Workflow dar, der in Zusammenarbeit mit branchenführenden Experten mit tröpfchenbasierter Zellisolation und NGS-Technologien entwickelt wurde. Er zeigt zwei neue Arten der Informationen für einzelne Zellen auf, indem die Analyse mehrerer Proben gleichzeitig, bei verschiedenen Behandlungsbedingungen und zu verschiedenen Zeiten genutzt wird. Die einfachen, jedoch leistungsstarken Datenanalyseoptionen in der SureCell-App für die RNA-Sequenzierung einzelner Zellen, kombiniert mit Tools zur Datenreduzierung und Identifikation von Populationen, können heterogene Zellpopulationen auflösen und gesuchte Unterpopulationen mithilfe von Genexpressionsprofilen und Tools zur Datenvisualisierung identifizieren. Die Analyse von Zellzyklusmarkern ermöglicht die Zellzyklusanalyse einzelner Zellen in komplexen Geweben. Die Lösung für die Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad ermöglicht eine höchst empfindliche und reproduzierbare Untersuchung von Transkriptomen mit einzelnen Zellen für Hunderte bis Zehntausende von einzelnen Zellen in einem Experiment.

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Bibliotheksvorbereitungs-Kit von SureCell WTA 3' (2-Kartuschen-Kit)	20014279
Bibliotheksvorbereitungs-Kit von SureCell WTA 3' (6-Kartuschen-Kit)	20014280

Weitere Informationen

Wenn Sie mehr über die Lösung für die Sequenzierung einzelner Zellen von Illumina Bio-Rad erfahren möchten, besuchen Sie:

www.illumina.com/surecell.

www.bio-rad.com/ddSEQ

www.flowjo.com/seqgeq

Quellen

1. 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.
2. Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14(9):618–630.
3. 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.