

Kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell™ para el sistema ddSEQ™ de Bio-Rad® e Illumina®

Disfrute de la profundización en la expresión genética con una plataforma de secuenciación de próxima generación de alto rendimiento, sensible, flexible y rentable

Puntos destacados

- Caracterización sensible y sin sesgo de firmas de transcripción**
 Detección genética muy sensible y reproducible en células únicas
- Flujo de trabajo completo de secuenciación de ARN de células únicas**
 Flujo de trabajo totalmente compatible desarrollado en colaboración con innovadores tecnológicos
- Secuenciación de próxima generación de gran capacidad integrada con un sencillo análisis de datos**
 La reconocida secuenciación de Illumina combinada con un software de análisis optimizado y fácil de usar

Para hacer realidad la promesa de la biología de célula única, la solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina combina la innovadora tecnología Droplet Digital™ de Bio-Rad (3) con las tecnologías de análisis, secuenciación y preparación de bibliotecas de NGS de Illumina. Esta nueva plataforma le ofrece un flujo de trabajo completo y fácil de usar para la secuenciación de ARN de células únicas (figura 1), que permite realizar experimentos controlados con varias muestras, varias condiciones de tratamiento y en distintos momentos. Concebida y respaldada por el trabajo conjunto con diferentes líderes tecnológicos, la solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina permite analizar el transcriptoma de cientos a decenas de miles de células únicas en un solo experimento. Este método flexible y robusto de preparación de muestras de NGS de células únicas permite que un mayor número de investigadores apliquen la sensibilidad y la precisión de la secuenciación de ARN a cuestiones que solo pueden responderse estudiando células individuales.

Introducción

Los sistemas biológicos complejos están determinados por las funciones coordinadas de cada una de las células. Las tecnologías convencionales que proporcionan grandes volúmenes de datos de transcriptomas no logran revelar la heterogeneidad de transcripciones que rige esta complejidad (1). La secuenciación del ARN (RNA-Seq) de células únicas permite un análisis profundo de la expresión genética, que proporciona información detallada sobre el funcionamiento celular, la evolución de una enfermedad y la eficacia de un tratamiento (2). Sin embargo, la generación de miles de bibliotecas de secuenciación de próxima generación (NGS) de células únicas con un método asequible, de alto rendimiento y fácil de usar sigue siendo todo un desafío (2).

Aislamiento de células únicas ampliable y flexible

El aislador de células únicas (SCI) ddSEQ de Bio-Rad encapsula y divide las células únicas en nanogotas de subnanolitros en un cartucho desechable. Cada cartucho puede albergar varias muestras y pueden procesarse varios cartuchos en paralelo, lo que permite el aislamiento de cientos a decenas de miles de células al día. La lisis y la codificación celulares se producen dentro de nanogotas individuales, lo que permite realizar un seguimiento de cada una de las células durante todo el flujo de trabajo. Este método basado en nanogotas no se ve afectado por el tamaño de las células de los mamíferos, lo que se traduce en una determinación de perfiles sin sesgo de diferentes poblaciones celulares (figura 2). El aislador de células únicas (SCI) ddSEQ de Bio-Rad puede procesar muestras en menos de 5 minutos.

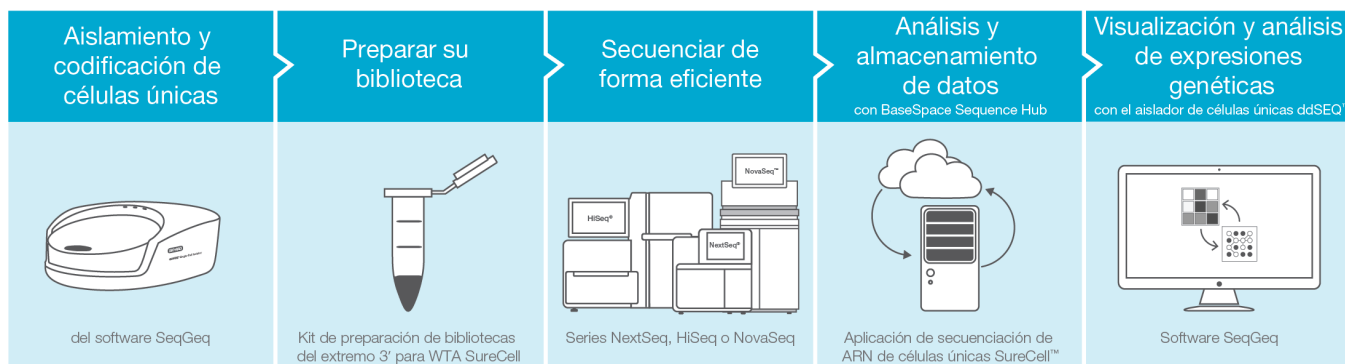


Fig. 1. Flujo de trabajo de secuenciación de ARN de células únicas. El flujo de trabajo integra el reconocido aislamiento de células con el aislador de células únicas (SCI) ddSEQ de Bio-Rad, seguido por la preparación de bibliotecas con el kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell dotado de la tecnología Nextera, la secuenciación de Illumina y el análisis de datos con BaseSpace Sequence Hub y el software de análisis SeqGeq de FlowJo, LLC.

Para uso exclusivo en investigación. Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.

Al eliminar los flujos de trabajo de experimentos prolongados que pueden alterar las firmas de transcripción, se pueden detectar las respuestas agudas de transcripción, así como controlarse en experimentos basados en tiempo.

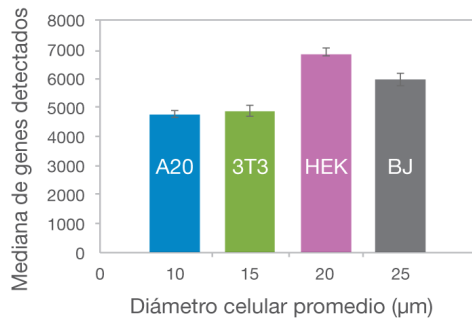


Fig. 2. Secuenciación de ARN independiente del tamaño celular y sin sesgo. Las estirpes celulares murinas (A20, NIH 3T3) y las estirpes celulares humanas (HEK, BJ) se procesaron con el kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell. Que la cantidad de genes detectados sea constantemente elevada implica que la recuperación de las transcripciones no está limitada por el tamaño celular.

Química de NGS avanzada para la preparación de bibliotecas

Una suspensión de células únicas se carga en un cartucho ddSEQ M y el aislador de células únicas ddSEQ encapsula y codifica estas células. La lisis y la codificación se producen en cada nanogota. Las nanogotas se rompen y el ADNc se agrupa para la síntesis de segunda cadena. Las bibliotecas se generan con una fragmentación y un etiquetado directo del ADNc mediante la tecnología Nextera® y sin necesidad de recorte ni de preamplificación (figura 3). La fragmentación y el etiquetado vienen seguidos de un enriquecimiento del extremo 3' y de un indexado de las muestras para preparar hasta 24 bibliotecas listas para secuenciación e indexadas con un tiempo de participación activa mínimo.

Células únicas aisladas, lisadas y codificadas

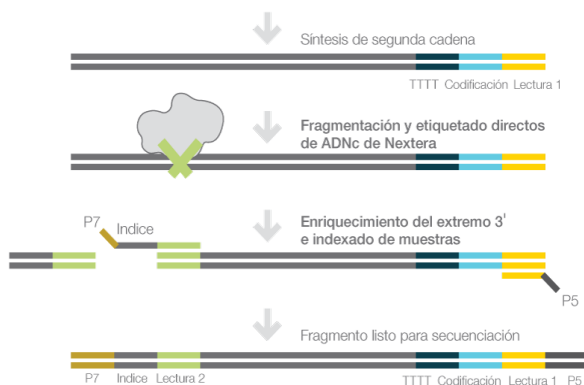


Fig. 3. Descripción general del kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell para el sistema ddSEQ. Después de que las células se hayan aislado, lisado y codificado, el ADNc se agrupa para la síntesis de la segunda cadena. Las bibliotecas se generan con la fragmentación y el etiquetado directo del ADNc seguidos por el enriquecimiento del extremo 3' y el indexado de las muestras.

Secuenciación fiable con los sistemas de NGS de Illumina

Las bibliotecas de células únicas preparadas se cargan directamente en un sistema de la serie MiSeq®, NextSeq® o HiSeq® o NovaSeq™ de Illumina para su secuenciación. Estos sistemas de secuenciación emplean la química de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina líder del sector, utilizada en más del 90 % de todas las NGS de todo el mundo.* Esta tecnología común ofrece coherencia y fiabilidad en los datos de secuenciación de todas las plataformas de NGS de Illumina. Las series MiSeq, NextSeq, HiSeq y NovaSeq de sistemas de secuenciación ofrecen flexibilidad en todo un abanico de aplicaciones, así como un rendimiento flexible que admite diferentes tamaños de estudio.

El software de control del instrumento fácil de usar guía a los investigadores en la carga de las muestras y en la configuración del experimento mediante unas interfaces de usuario intuitivas, al tiempo que permite una monitorización en tiempo real de los experimentos de secuenciación totalmente automatizados, ya sea en el propio instrumento o a distancia.

Análisis simplificado de datos en BaseSpace® Sequence Hub

Los datos de secuenciación de células únicas se pueden transferir inmediatamente, almacenar y analizar de forma segura en BaseSpace Sequence Hub, el entorno informático de genómica basado en la nube de Illumina. BaseSpace Sequence Hub ofrece un gran repertorio de aplicaciones de BaseSpace. Las herramientas comerciales y de código abierto satisfacen toda una variedad de necesidades en materia de análisis de datos comunes, tales como la alineación y la llamada de variantes, entre muchas otras más. Estas aplicaciones incluyen interfaces de usuario intuitivas que funcionan con solo pulsar un botón y se han diseñado para utilizarse sin necesidad de conocimientos bioinformáticos.

La aplicación de secuenciación de ARN de células únicas SureCell se ha concebido para permitir el análisis de datos de la solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina. La aplicación de secuenciación de ARN de células únicas SureCell permite un análisis de datos optimizado con hasta 96 muestras en diferentes experimentos de secuenciación, e incluye lo siguiente:

- Sencillos datos de control de la calidad (CC) de la secuenciación
- Fácil asignación de transcripciones únicas a células únicas
- Informes y matrices de expresión genética que se pueden exportar y descargar
- Varias opciones de análisis para identificar subpoblaciones y genes con expresiones diferenciales

*Cálculos de datos en archivo. Illumina, Inc. 2015.

Visualización avanzada de datos con el software SeqGeq



El software SeqGeq es una aplicación de escritorio para el análisis, la exploración y la visualización avanzadas de datos de información de la expresión genética de células únicas desarrollada por FlowJo, LLC para la solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina. El software SeqGeq ofrece herramientas potentes de reducción de datos y de identificación de poblaciones. La integración directa con BaseSpace Sequence Hub permite visualizar y analizar los datos de la expresión con asignación de colores estadística de cada célula, mapas de calor de resumen y editores de informes de arrastrar y soltar.

Datos de alta calidad

Con el fin de demostrar la gran calidad de los datos de la secuenciación de ARN de células únicas que ofrece la solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* con células combinadas de diferentes especies. Se mezclaron células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) y fibroblastos de embriones de ratón NIH 3T3 con una proporción 1:1 (a menos que se especifique lo contrario) y se cargaron en cuatro cámaras de muestras de un mismo cartucho ddSEQ M de Bio-Rad. El aislador de células únicas (SCI) ddSEQ encapsuló y codificó 1384 células únicas. Las transcripciones codificadas se procesaron para llevar a cabo una secuenciación de células únicas con el kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell para el sistema ddSEQ de Bio-Rad e Illumina, y se secuenciaron en el sistema NextSeq 550 de Illumina. Los resultados de la secuenciación se analizaron con la aplicación de secuenciación de ARN de células únicas SureCell de Illumina.

Detección genética segura en una población celular heterogénea

El análisis de datos y la generación de gráficos de las transcripciones únicas humanas (hg19) y murinas (mm10) detectadas en las muestras con combinación de especies revelan un bajo porcentaje de códigos de células (5,8 %) que contienen transcripciones asignadas a ambas especies, las cuales aparecen representadas como dobletes (figura 4A). Esto se traduce en un aislamiento de células únicas eficaz y con una pureza elevada (99 %). Al generar un gráfico de la fracción acumulativa de las transcripciones genéticas asignadas a los códigos celulares, el punto de inflexión (línea roja) se empleó para determinar el número de células codificadas detectadas (figura 4B). Esto indica que se asignó una alta fracción de transcripciones a las células únicas.

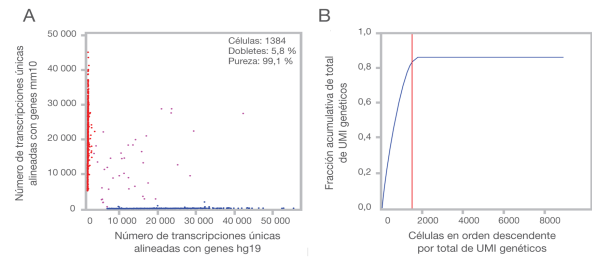


Fig. 4. Identificación segura de transcripciones de células únicas. A.

BaseSpace generó gráficos del número de identificadores moleculares únicos (UMI), esto es, transcripciones, que se asignaron a los genomas de ratón/mm10 (rojo) y a los genomas humanos/hg19 (azul) por cada código celular. Los dobletes celulares corresponden a la asignación de transcripciones únicas tanto a ratones como a humanos (morado). **B.** Fracción acumulada de transcripciones únicas asignadas a códigos celulares (escala lineal). El punto de inflexión (línea roja) determina el número de células codificadas detectadas en el experimento de secuenciación.

Identificación clara de subpoblaciones celulares en muestras mixtas

Se llevó a cabo un experimento de mezcla de especies *in vitro* en el que las células NIH 3T3 de ratón se combinaron con un pequeño número de células HEK 293 humanas. Mediante un análisis con el algoritmo de distribución t-SNE, las células humanas de esta combinación se identificaron como un grupo distinto que constituía el 7 % de la población celular total (figura 5A). Las células codificadas por colores por la expresión genética de la *RPL13* humana confirman la identidad de la subpoblación como una subpoblación de células humanas (figura 5B).

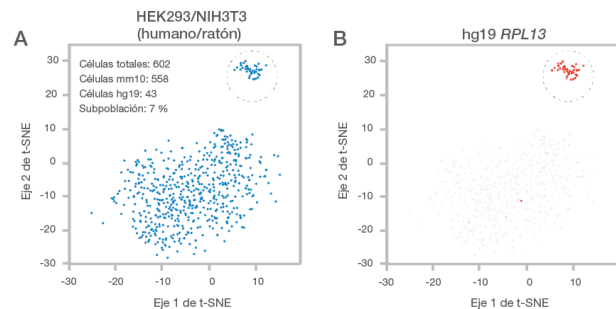


Fig. 5. Identificación segura de subpoblación celular. A. El análisis de la aplicación de secuenciación de ARN de células únicas SureCell con el algoritmo t-SNE de una mezcla de células NIH 3T3 y HEK 293 identifica una subpoblación de células diferente. **B.** Las células codificadas por colores por la expresión genética de la hg19 RPL 13 confirman la identidad de la subpoblación como una subpoblación de células humanas.

El análisis de células únicas revela la heterogeneidad de las fases del ciclo celular

Se llevó a cabo un experimento de mezcla de especies *in vitro* en el que se combinaron las células HEK 293 con células NIH 3T3 en una proporción de 1:1. El análisis de componentes principales (PCA) y la representación de la expresión genética con asignación de colores de la *RPL13* humana identifican las células humanas (figura 6A). El análisis t-SNE del subconjunto de células HEK 293 revela grupos distintos de células, que representan diferencias en los perfiles de expresión genética (figura 6B). Un análisis más pormenorizado de los marcadores asociados a las fases del ciclo celular permite analizar de forma precisa las células únicas de dicho ciclo. Este análisis se basa en los recuentos de transcripciones únicas de los genes relevantes, normalizados según el recuento total de cada célula y visualizados en un mapa de calor de resumen (figura 6C).

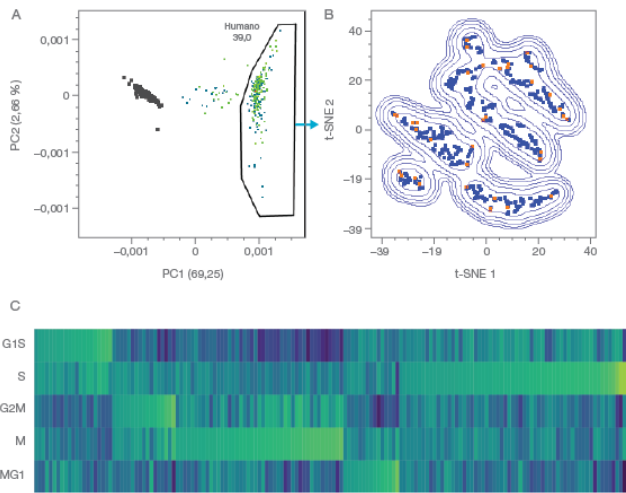


Fig. 6. El análisis pormenorizado de células únicas en el software SeqGeq indica homogeneidad en las células HEK293. PCA de mezcla con proporción 1:1 de células HEK293 y NIH3T3, representadas en un mapa de color por expresión del gen humano *RPL13* (A, células de ratón en gris). Análisis t-SNE del subconjunto de células humanas donde los distintos grupos de células representan diferencias en los perfiles de expresiones genéticas (B). El mapa de calor de células únicas revela el estado del ciclo celular basándose en los recuentos de transcripciones únicas de genes (C). Para la expresión se empleó la mediana como valor central y la desviación absoluta de la mediana como la escala en cada ciclo celular. El análisis se realizó utilizando BaseSpace Sequence Hub y el software SeqGeq.

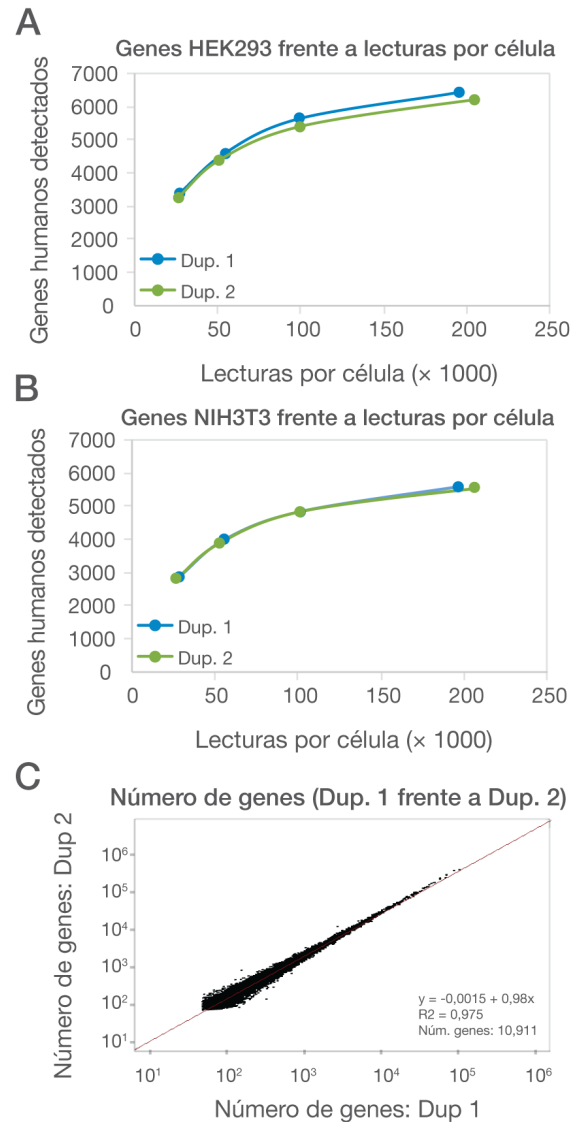


Fig. 7. Sensibilidad y reproducibilidad de la detección genética en estirpes celulares variadas. **A.** La mediana de los genes detectados por célula se muestra en un gráfico con unas profundidades de secuenciación que oscilan entre las 25 000 y las 200 000 lecturas por célula para las dos muestras duplicadas de las células HEK 293 humanas. **B.** Mediana de los genes detectados por célula de las dos muestras duplicadas de las células NIH 3T3 de ratón. **C.** Se representa la regresión lineal de la expresión genética de los genes que aparecen ≥ 50 veces, teniendo en cuenta la cifra de todas las células HEK 293 en las dos muestras duplicadas.

Resultados muy sensibles y reproducibles

Las muestras duplicadas de las células HEK 293 se procesaron y secuenciaron en un sistema NextSeq 550 como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron submuestras de las lecturas de secuenciación para varias lecturas por células que oscilaban entre las 25 000 y las 200 000 lecturas. La mediana de las lecturas detectadas por célula en cada profundidad de secuenciación muestra una detección genética muy sensible y reproducible en las muestras duplicadas de diferentes estirpes celulares (figura 7A y 7B). Para el recuento de cada gen humano se tiene en cuenta la suma de todas las células HEK 293. Un ajuste de regresión lineal de la cantidad de genes sumados entre las dos muestras duplicadas y procesadas en un solo cartucho ddSEQ M pone una vez más de manifiesto unos resultados muy reproducibles (figura 7C).

Resumen

Para avanzar en los conocimientos sobre la heterogeneidad de transcripción que rige los sistemas biológicos complejos, los investigadores necesitan un método flexible, de alto rendimiento y fácil de usar que les permita generar miles de bibliotecas de NGS de células únicas. La solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina constituye un flujo de trabajo integral desarrollado en colaboración con expertos del sector en materia de tecnologías de NGS y aislamiento celular basado en nanogotas. Esta solución revela nuevos tipos de datos de células únicas al ofrecer un análisis de varias muestras en paralelo, en diferentes condiciones de tratamiento y en diferentes momentos. Las simples a la par que sólidas opciones de análisis de datos de la aplicación de secuenciación de ARN de células únicas SureCell, combinadas con la reducción de datos y las herramientas de identificación de poblaciones del software SeqGeq, pueden determinar las poblaciones celulares heterogéneas e identificar subpoblaciones de interés utilizando las herramientas de visualización de datos y los perfiles de expresión genética. El análisis de los marcadores del ciclo celular permite analizar el ciclo celular de cada célula que compone un tejido complejo. La solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina permite una interrogación muy sensible y reproducible de los transcriptomas de cientos a decenas de miles de células únicas en un solo experimento.

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell (kit de 2 cartuchos)	20014279
Kit de preparación de bibliotecas del extremo 3' para WTA SureCell (kit de 6 cartuchos)	20014280

Información adicional

Para obtener más información sobre la solución de secuenciación de células únicas de Bio-Rad e Illumina, visite:

www.illumina.com/surecell

www.bio-rad.com/ddSEQ

www.flowjo.com/seqgeq

Referencias

- Kolodziejczyk, A. A.; Kim, J. K.; Svensson, V.; Marioni, J. C.; Teichmann, S. A. 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, B. J.; Ness, K. D.; Masquelier, D. A.; et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604–8610.