

Illumina Single Cell 3' RNA Prep

Unkomplizierte, skalierbare scRNA-Seq

Einfacher, erschwinglicher und für Anwender
jeder Erfahrungsstufe geeigneter Tischworkflow

Hohe Assaysensitivität für den Nachweis von
mehr Genen und Transkripten

Kosteneffizienter Verarbeitungsumfang von bis
zu Hunderttausenden Zellen zur Bestimmung
seltener Zelltypen



Einleitung

Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq, Single-cell RNA Sequencing) vereint Einzelzell-Erfassung und -Barcoding mit Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) zu einer hochauflösenden Sicht komplexer Gewebe. Forscher können mit scRNA-Seq heterogene Zellpopulationen untersuchen, seltene Zelltypen nachweisen und Erkrankungs- sowie Entwicklungsprozesse auf Zellebene charakterisieren. Der Bedarf an Großgeräten, hohe Reagenzienkosten und begrenzte Skalierbarkeit haben die breite Anwendung der Einzelzell-Sequenzierung bislang jedoch beeinträchtigt. Illumina Single Cell 3' RNA Prep ändert das.

Illumina Single Cell 3' RNA Prep* ermöglicht die Erfassung von Einzelzell-mRNA sowie das entsprechende Barcoding und die Bibliotheksvorbereitung ganz ohne komplexe Workflows oder Mikrofluidik. In Kombination mit Sequenzierungs- und Informatiklösungen von Illumina bietet Illumina Single Cell 3' RNA Prep einen einfachen und skalierbaren Workflow ([Abbildung 1](#)), dank dem Labore von der hohen Performance der scRNA-Seq profitieren können.

Unkomplizierter Workflow

Der Illumina Single Cell 3' RNA Prep-Workflow lässt sich einfach einführen und erfordert weder teure Mikrofluidik-Geräte noch arbeitsaufwendige Protokolle.¹ Anwender können mit einem einfachen manuellen Workflow mit flexiblen Haltepunkten Einzelzell-Studien am Labortisch durchführen. Der Assay eignet sich bei Proben, die über einen bestimmten Zeitraum entnommen werden oder transportiert werden müssen, für die DSP-Methanol-Fixierung[†], was scRNA-Seq-Versuche noch ergiebiger macht.

Funktionsweise des Assays

Illumina Single Cell 3' RNA Prep verwendet die neuartige PIPseq™-Chemie für die einfache, skalierbare Erfassung und das entsprechende Barcoding von Einzelzell-mRNA ([Abbildung 2](#)).¹ Direktpartitionen mit Partikelmatrizen (PIPs, Particle-templated Instant Partitions) beruhen auf Emulgierung mit Matrizenpartikeln, die mit Barcode versehene Oligonukleotide enthalten, die an Hydrogel-Beads gebunden sind. Während der Probenvorbereitung wird die zu untersuchende Zellsuspension mit Matrizenpartikeln und Öl gemischt. Anschließend werden mit einem Vortexmischer Matrizenemulsionen abgeschieden. Zellen in den Emulsionen werden anschließend lysiert und die mRNA wird von den mit Barcode versehenen Matrizen erfasst. Die Emulsion wird gespalten und aus der erfassten mRNA wird durch reverse Transkription cDNA generiert und amplifiziert, sodass eine cDNA-Bibliothek für jede einzelne Zelle vorliegt.

* Illumina Single Cell 3' RNA Prep wurde bislang unter der Bezeichnung Fluent PIPseq V 3' Single Cell RNA Kit vertrieben.

† DSP, Dithiobis (Succinimidylpropionat).

Abbildung 1: Illumina Single Cell 3' RNA – Workflow

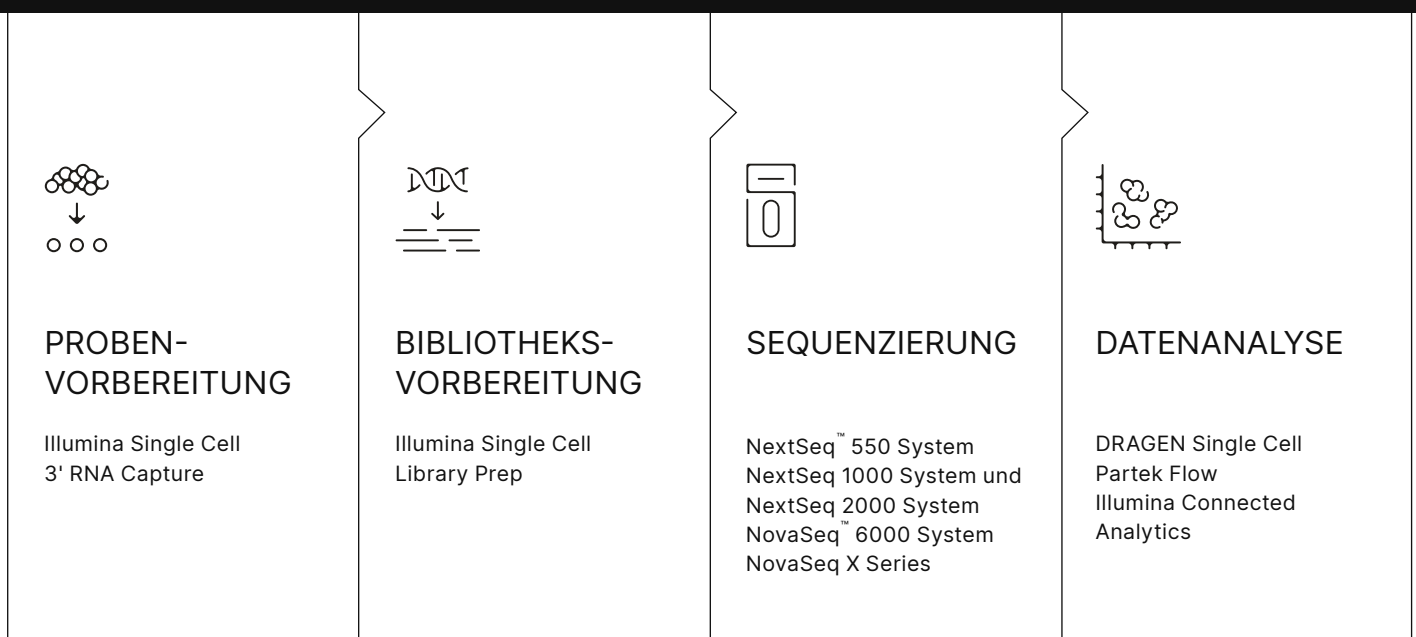
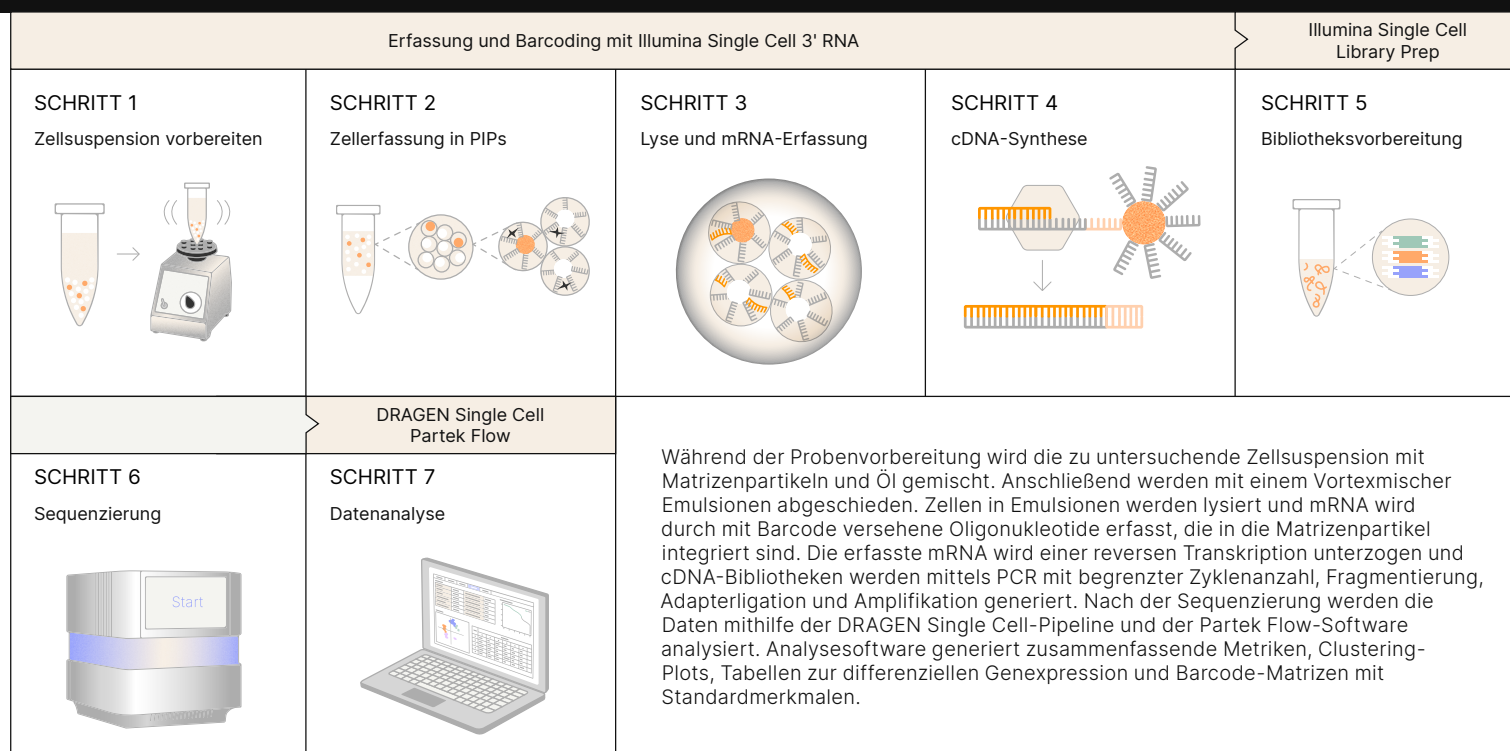


Abbildung 2: Erfassung von Einzelzell-mRNA und Barcoding mit PIPseq-Chemie

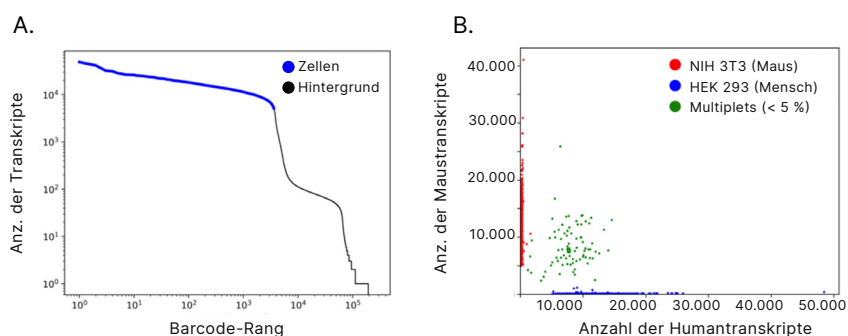


Anschließend werden die Einzelzell-cDNA-Bibliotheken einer herkömmlichen Bibliotheksvorbereitung unterzogen. Die resultierenden Sequenzierungs-bibliotheken werden mit NGS verarbeitet. Sequenzierungsdaten werden mithilfe der DRAGEN™ Single Cell-Pipeline und der Partek™ Flow-Software analysiert.

Performance mit hoher Qualität

Illumina Single Cell 3' RNA Prep liefert hochwertige Daten mit hoher Transkript- und Gensensitivität ([Abbildung 3](#), [Abbildung 4](#), [Tabelle 1](#)). Das schonende Isolierungsverfahren hilft bei der Bestimmung fragiler Zellen, die bei anderen Methoden häufig außer Acht gelassen werden.

Abbildung 3: Hochauflösende scRNA-Seq erfasst mRNA aus Einzelzellen



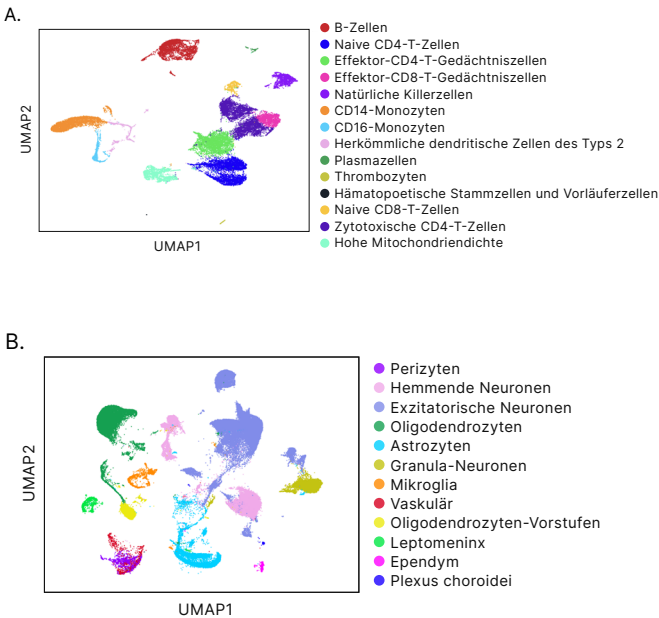
(A) Barcode-Rang-Plot und (B) Barnyard-Streu-Plot zu einer Mischkultur aus NIH3T3-Zelllinien (Maus) und HEK 293-Zelllinien (human), 4.106 nachgewiesene Zellen, eine Capture-Rate von 80 % und weniger als 5 % Multipliets (zwei oder mehr Zellen in derselben Reaktion) mit dem Illumina Single Cell 3' RNA Prep T2-Kit.

Die aktuelle Version der PIPseq-Chemie verringert den Anteil der Hintergrund-RNA aus der Umgebung, verbessert die Sensitivität in Bezug auf Gene und Transkripte bei bestimmten Zelltypen um 30 %² und reduziert Sequenzierungsartefakte, wodurch sich die NGS-Daten besser auswerten lassen.

Flexible, skalierbare Lösung

Das einfache Verfahren für Illumina Single Cell 3' RNA Prep auf Basis eines Vortexmischers ist ebenso kostengünstig wie skalierbar. Bei einer größeren Anzahl von Zellen können PIP-Röhrchen mit höherem Volumen verwendet werden.¹ Der breite Verarbeitungsumfang von Hunderten bis Hunderttausenden Zellen eignet sich für Forschungsanwendungen, Pilotprojekte und Projekte mit geringer Zellvielfalt sowie für komplexe Gewebeanalysen.¹ Die derzeitigen Kitkonfigurationen eignen sich für das Profiling von bis zu 2.000 Zellen pro Probe (T2-Kit), 10.000 Zellen pro Probe (T10-Kit), 20.000 Zellen pro Probe (T20-Kit) oder 100.000 Zellen pro Probe (T100-Kit). Mit der Fähigkeit des Assays, größere Zellmengen zu verarbeiten, lassen sich seltene Zelltypen besser bestimmen (Abbildung 5). Mit 96 verfügbaren eindeutigen doppelten Indizes ermöglicht das Proben-Multiplexing Anwendern die parallele Untersuchung zahlreicher Proben (Tabelle 2).

Abbildung 4: Hochauflösende scRNA-Seq für Versuche und Anwendungen



(A) Einheitliche Manifold-Approximation und -Projektion (UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection) von kryokonservierten humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells), 31.613 nachgewiesene Zellen und eine Capture-Rate von 79 % mit dem Illumina Single Cell 3' RNA Prep T20-Kit. (B) UMAP von Zellkernen (Maushirn) aus gefrorenem Gewebe, 155.000 nachgewiesene Zellkerne und eine Capture-Rate von 78 % mit dem Illumina Single Cell 3' RNA Prep T100-Kit.

Tabelle 1: Validierte Performance von Illumina Single Cell 3' RNA Prep auf Sequenziersystemen von Illumina

Zelltyp	Kit-Größe	Sequenziersystem	Größe	Reads	Zellen	Reads pro Zelle
HEK/3T3	T2	NextSeq 2000 System	9,8 Gb	140 Mio.	3.611	38.633
HEK/3T3	T10	NextSeq 2000 System	23,6 Gb	333 Mio.	10.723	31.140
PBMC	T10	NovaSeq 6000 System	390 Gb	2,7 Mrd.	14.307	190.526
PBMC	T20	NovaSeq X Plus System	81,3 Gb	674 Mio.	31.613	21.314
Zellkerne (Mauslunge)	T20	NextSeq 2000 System	8,9 Gb	131 Mio.	2.768	47.276
Zellkerne (Maushirn)	T20	NextSeq 2000 System	10,4 Gb	155 Mio.	2.019	76.784
Zellkerne (Maushirn, fixiert)	T20	NextSeq 2000 System	39,5 Gb	590 Mio.	34.596	17.041
Zellkerne (Maushirn)	T100	NextSeq 2000 System	176,6 Gb	2,6 Mrd.	155.000	17.068

Einzelzell-Anwendungen

Die Zugänglichkeit, Präzision und Sensitivität von Illumina Single Cell 3' RNA Prep ermöglichen neue Forschungsprojekte und Entdeckungen. Die Verarbeitung größerer Zellmengen verkürzt Zellatlasprojekte für Normal- sowie Erkrankungszustände und ermöglicht funktionelle Screenings des gesamten Genoms. Vom breiteren Einsatz von scRNA-Seq profitieren insbesondere Labore, die mit der Erforschung von Krebs und weiteren komplexen Erkrankungen sowie Immunologie und Neurowissenschaft befasst sind.³⁻⁹

scRNA-Seq für Neurowissenschaften

Neurales Gewebe besteht aus zahlreichen komplex organisierten Zelltypen, die im Verlauf des Lebens eines Organismus kontinuierlich reorganisiert und remodelliert werden. scRNA-Seq ist ein wertvolles Instrument für die Katalogisierung der wahren Vielfalt neuronaler Zellpopulationen mit sensibler Transkription und liefert Erkenntnisse in folgenden Bereichen:

- Neuroentwicklung und neurodegenerative Erkrankungen⁹
- Zuvor unbekannte Funktionen bestimmter neuronaler Populationen⁹
- Wirkung von Neuroimmunzellen auf Erkrankungen und Entwicklung¹⁰

scRNA-Seq für die Krebsforschung

Bei Krebs handelt es sich um eine dynamische und vielfältige Erkrankung mit komplexen Zellpopulationen. Die Untersuchung krebsauslösender Zelltypen und Mutationen erfordert ausgeklügelte Methoden. scRNA-Seq ist ein wichtiges Instrument für Folgendes:

- genaue Beschreibung der Heterogenität der Tumormikroumgebung^{4, 5, 11, 12}
- Ermittlung neuer Krebsbiomarker^{13, 14}
- Untersuchung der Mechanismen von Immuntherapie und Wirkstoffresistenz³

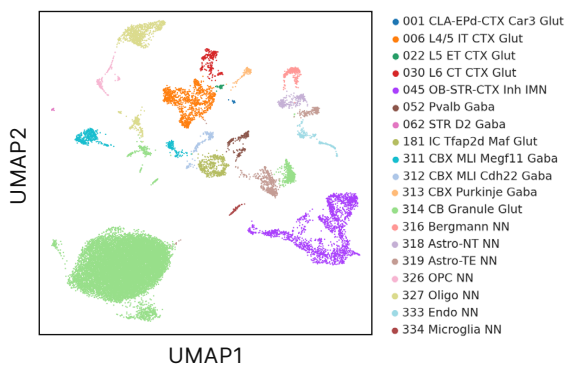
scRNA-Seq für Immunologie

Das Immunsystem umfasst eine komplexe Hierarchie unterschiedlicher Zelltypen, die gemeinsam Pathogene identifizieren, angreifen und eliminieren. scRNA-Seq ermöglicht Forschern Folgendes:

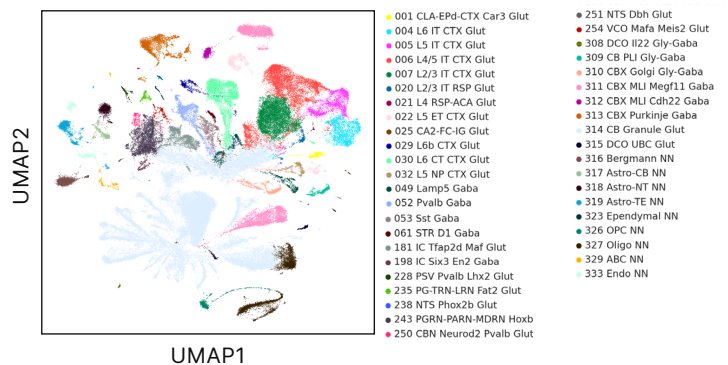
- Untersuchung der Entwicklungs- und Differenzierungswege in Immunzellpopulationen¹⁵
- Beurteilung der Rollen und Funktionen von Immunzellpopulationen^{12, 16}
- Untersuchung der Immunantwort auf Pathogene⁶

Abbildung 5: Erweiterter Versuchsrahmen mit Illumina Single Cell 3' RNA Prep bestimmt mehr Zelltypen

A. scRNA-Seq auf Basis von Mikrofluidik (20.000 Zellen)



B. Illumina Single Cell 3' RNA Prep (> 120.000 Zellen)



(A) scRNA-Seq von 20.000 Zellen auf Basis von Mikrofluidik bestimmte anhand von Maushirn-Zellkernen 19 verschiedene Zelltypen. (B) Illumina Single Cell 3' RNA Prep bestimmte bei > 120.000 Zellen aus derselben Probenvorbereitung von Maushirn-Zellkernen 42 verschiedene Zelltypen: 17 der 19 durch scRNA-seq auf Basis von Mikrofluidik bestimmten plus 25 zusätzliche Zelltypen.

Tabelle 2: Beispiel für den Probendurchsatz pro Fließzelle für Illumina Single Cell 3' RNA Prep^a

System	NextSeq 550		NextSeq 1000/2000				NovaSeq 6000				NovaSeq X		
Fließzelle	Mid	High	P1	P2	P3 ^b	P4 ^b	SP	S1	S2	S4	1.5B	10B	25B
Ausgabe pro Fließzelle (Reads)	130 Mio.	400 Mio.	100 Mio.	400 Mio.	1,2 Mrd.	1,8 Mrd.	800 Mio.	1,6 Mrd.	4,1 Mrd.	10 Mrd.	1,6 Mrd.	10 Mrd.	26 Mrd.
Kit-Größe	Anz. der Proben pro Fließzelle												
T2	1	4	1	4	12	18	8	16	41	100 ^c	16	100 ^c	260 ^c
T10	-	1	-	1	3	5	2	4	12	29	4	29	76
T20	-	-	-	-	1	2	1	2	5	12	2	12	32
T100	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	2	6

- a. Berechnungen basieren auf 20.000 Reads pro zugegebener Zelle. T2 erfordert eine Zugabe von 5.000 Zellen und 100 Mio. Reads pro Probe. T10 erfordert eine Zugabe von 17.000 Zellen und 340 Mio. Reads pro Probe. T20 erfordert eine Zugabe von 40.000 Zellen und 800 Mio. Reads pro Probe. T100 erfordert eine Zugabe von 200.000 Zellen und 4 Mrd. Reads pro Probe.
- b. P3- und P4-Fließzellen sind nur für das NextSeq 2000 System verfügbar.
- c. Illumina Single Cell Unique Dual Indexes bietet 96 Indizes für 96 Proben. Werden Lanes individuell beladen, sind mehr als 96 Proben pro Fließzelle möglich. Verwenden Sie den NovaSeq 6000 Xp-Workflow für das individuelle Beladen von Lanes auf dem NovaSeq 6000 System.

Multiomik-Anwendungen

Illumina Single Cell 3' RNA Prep lässt sich gemeinsam mit anderen Multiomik-Verfahren einsetzen.^{1,17} Der Assay ermöglicht die erneute Untersuchung der erfassten mRNA in spezifischen Einzelzell-Anwendungen. Während der reversen Transkription generierte cDNA bleibt an die Hydrogel-Beads gebunden und lässt sich in zusätzlichen Anreicherungs- oder Amplifikationsreaktionen wiederverwenden. Diese Vielseitigkeit der Einsatzmöglichkeiten im Rahmen von Versuchen ermöglicht Forschern die Durchführung größerer und vielfältigerer Multiomik-Studien ohne die Einschränkungen in Bezug auf Budget oder Technologie, die sich bei anderen Einzelzell-Anwendungen ergeben.

Zusammenfassung

Die Einzelzell-Analyse mit NGS eröffnet neue Möglichkeiten in der Krebsforschung, bei der Immunologie, in der Neurowissenschaft und in vielen weiteren Bereichen. Illumina Single Cell 3' RNA Prep ist eine unkomplizierte und hochgradig skalierbare scRNA-Seq-Lösung, die sowohl Einsteigern als auch erfahrenen Einzelzell-Forschern neue Entdeckungen ermöglicht. Der einfache manuelle Workflow umfasst mRNA-Erfassung, Barcoding und Bibliotheks-vorbereitung zur unmittelbaren Weiterverarbeitung mit Sequenziersystemen und Datenanalyse-software von Illumina. Illumina Single Cell 3' RNA Prep zeichnet sich durch hohe Performance und Anwenderfreundlichkeit aus. Damit können mehr Labore von scRNA-Seq profitieren.

WEITERE INFORMATIONEN →

- [Illumina Single Cell 3' RNA Prep](#)
- [Einzelzell-RNA-Sequenzierung](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T2 (8 samples, 2000 cells/sample)	20135689
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T10 (8 samples, 10,000 cells/sample)	20135691
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T20 (4 samples, 20,000 cells/sample)	20135692
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T100 (2 samples, 100,000 cells/sample)	20135693
Illumina Single Cell Unique Dual Indexes (96 indexes, 96 samples)	20132788
Illumina Single Cell Library Prep (8 reactions)	20132789
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T2 (8 samples, 2000 cells/sample)	20132790
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T10 (8 samples, 10,000 cells/sample)	20132791
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T20 (4 samples, 20,000 cells/sample)	20132792
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T100 (2 samples, 100,000 cells/sample)	20132793
Illumina Single Cell Nuclei Isolation Kit (4 samples)	20132795
Illumina Single Cell Supplemental Enrichment and Amplification Kit	20132794
Illumina Single Cell Prep Starter Equipment	20132796

Quellen

- Clark IC, Fontanez KM, Meltzer RH, et al. [Microfluidics-free single-cell genomics with templated emulsification](#). *Nat Biotechnol.* 2023;41(11):1557-1566. doi:10.1038/s41587-023-01685-z
- Fontanez KM, Agam Y, Bevans S, et al. [Intrinsic molecular identifiers enable robust molecular counting in single-cell sequencing](#). *bioRxiv.* 2024;2024.10.04.616561; doi:10.1101/2024.10.04.616561.
- Ali A, Manzoor S, Ali T, et al. [Innovative aspects and applications of single cell technology for different diseases](#). *Am J Cancer Res.* 2024;14(8):4028-4048. doi:10.62347/VUFU1836
- Tirosh I, Suva ML. [Cancer cell states: Lessons from ten years of single-cell RNA-sequencing of human tumors](#). *Cancer Cell.* 2024;42(9):1497-1506. doi:10.1016/j.ccell.2024.08.005
- Xiang L, Rao J, Yuan J, Xie T, Yan H. [Single-Cell RNA-Sequencing: Opening New Horizons for Breast Cancer Research](#). *Int J Mol Sci.* 2024;25(17):9482. doi:10.3390/ijms25179482
- Chang JT, Liu LB, Wang PG, An J. [Single-cell RNA sequencing to understand host-virus interactions](#). *Virol Sin.* 2024;39(1):1-8. doi:10.1016/j.virs.2023.11.009
- Hanna SJ, Tatovic D, Thayer TC, Dayan CM. [Insights From Single Cell RNA Sequencing Into the Immunology of Type 1 Diabetes- Cell Phenotypes and Antigen Specificity](#). *Front Immunol.* 2021;12:751701. doi:10.3389/fimmu.2021.751701
- Liu L, Davidorf B, Dong P, Peng A, Song Q, He Z. [Decoding the mosaic of inflammatory bowel disease: Illuminating insights with single-cell RNA technology](#). *Comput Struct Biotechnol J.* 2024;23:2911-2923. doi:10.1016/j.csbj.2024.07.011
- Yang B, Hu S, Jiang Y, Xu L, Shu S, Zhang H. [Advancements in Single-Cell RNA Sequencing Research for Neurological Diseases](#). *Mol Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-024-04126-3
- Maeda C, Tsuruta F. [Molecular Basis of Neuronal and Microglial States in the Aging Brain and Impact on Cerebral Blood Vessels](#). *Int J Mol Sci.* 2024;25(8):4443. doi:10.3390/ijms25084443
- Liang L, Zhang C, Han J, et al. [Heterogeneity of tumor microenvironment cell groups in inflammatory and adenomatous polyposis coli mutant colorectal cancer based on single cell sequencing](#). *Transl Cancer Res.* 2024;13(9):4813-4826. doi:10.21037/tcr-24-689

12. Zhang S, Zhang X, Xiahou Z, Zuo S, Xue J, Zhang Y. [Unraveling the ecological landscape of mast cells in esophageal cancer through single-cell RNA sequencing](#). *Front Immunol*. 2024;15:1470449. doi:10.3389/fimmu.2024.1470449
13. Yang F, Gan L, Pan J, Chen Y, Zhang H, Huang L. [Integrated Single-Cell RNA-Sequencing Analysis of Gastric Cancer Identifies FABP1 as a Novel Prognostic Biomarker](#). *J Oncol*. 2022;2022:4761403. doi:10.1155/2022/4761403
14. Chen M, Zhu X, Zhang L, Zhao D. [COL5A2 is a prognostic-related biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer based on transcriptomics and single-cell RNA sequencing](#). *BMC Med Genomics*. 2023;16(1):220. doi:10.1186/s12920-023-01659-9
15. Bukhari S, Henick BS, Winchester RJ, et al. [Single-cell RNA sequencing reveals distinct T cell populations in immune-related adverse events of checkpoint inhibitors](#). *Cell Rep Med*. 2023;4(1):100868. doi:10.1016/j.xcrm.2022.100868
16. Chen S, Zhu J, Hua C, et al. [Single-cell RNA Sequencing Reveals the Diversity of the Immunological Landscape Response to Genital Herpes](#). *Virology*. doi:10.1016/j.virus.2024.10.003
17. Peretz CAC, Kennedy VE, Walia A, et al. [Multiomic single cell sequencing identifies stemlike nature of mixed phenotype acute leukemia](#). *Nat Commun*. 2024;15(1):8191. doi:10.1038/s41467-024-52317-2



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-03195 DEU v1.0