

Einzelzell- und räumliche Sequenzierung auf XLEAP-SBS™ - Fließzellen für die Systeme NextSeq™ 1000 und NextSeq 2000

Genomik mit hoher Auflösung
auf einem marktführenden
Tischsystem

Einleitung

Komplexe biologische Systeme werden durch die koordinierten Funktionen einzelner Zellen in organisiertem Gewebe bestimmt. Bei herkömmlichen Verfahren, bei denen große Mengen kontextfreier Proben untersucht werden, gehen die Zellheterogenität sowie die räumlichen Beziehungen verloren, die dieser Komplexität zugrunde liegen. Einzelzell- und räumliche Sequenzierung sind NGS-Sequenzierungsverfahren (Next Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation), die eine hochauflösende Sicht der Variation und Organisation zwischen Zellen ermöglichen.

10x Genomics, ein Illumina-Partner, bietet zahlreiche Lösungen für die Einzelzell- und die räumliche Biologie. Diese weitverbreiteten Produkte zur Vorbereitung und Analyse von Bibliotheken nutzen die genauen und unkomplizierten Sequenziersysteme von Illumina. Mit der Flexibilität, Skalierbarkeit und hohen Datenqualität passend zur Sensitivität dieser Assays sind das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System mit XLEAP-SBS-Chemie die perfekten Tischsysteme für Einzelzell- und räumliche Studien.

Einzelzell- und räumliche RNA-Sequenzierung

Das Genexpressions-Profilierung auf Einzelzellebene oder mit erhaltenem räumlichen Kontext erhöht die Analyseperformance, wodurch sich ein tieferes und genaueres Verständnis von Entwicklungs- und Erkrankungsmechanismen gewinnen lässt.

Bei der scRNA-Seq (single-cell RNA sequencing, Einzelzell-RNA-Sequenzierung) werden mithilfe von Zellpartitionierung und Oligonukleotid-Barcodes Transkriptome von Hunderten bis Zehntausenden einzelner Zellen untersucht. Anhand der detaillierten Sicht der Variation zwischen Zellen vereinfacht die scRNA-Seq die Bestimmung neuartiger Biomarker und seltener Zelltypen, die bei der Bulk-RNA-Seq nicht erfasst werden.^{1,2}

Die räumliche Transkriptomik deckt anhand einer Kombination von Hochdurchsatztechnologien für Bildgebung und Sequenzierung die mRNA-Expression auf Zellebene in erhaltenen Gewebestrukturen auf. Die Visualisierung der Gewebemorphologie gemeinsam mit der Genaktivität ermöglicht Forschern das Verständnis der räumlichen Beziehung zwischen Zellen innerhalb von normalem und erkranktem Gewebe.

Sowohl Verfahren für die Einzelzell- als auch die räumliche Sequenzierung können auf andere Modalitäten als RNA angewendet werden, darunter DNA, das Epigenom und Proteine. Beispielsweise bietet 10x Genomics Multiomiklösungen, die die scRNA-Seq mit Assays für die Chromatin-Zugänglichkeit oder Proteinexpression verknüpfen. Mit räumlichen Lösungen lassen sich die RNA- und Proteinexpression auch gemeinsam erfassen.

NextSeq 1000 System und NextSeq 2000 System

Beim NextSeq 1000 System und beim NextSeq 2000 System kommt XLEAP-SBS-Chemie zum Einsatz, die bislang schnellste, hochwertigste und robusteste SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) von Illumina. Die XLEAP-SBS-Chemie auf Basis der bewährten standardmäßigen SBS-Chemie von Illumina bietet eine verbesserte Reagenzienstabilität mit einer zweifach schnelleren Integration.³

Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System bieten Skalierbarkeit für unterschiedlichste Einzelzell- sowie räumliche Projekte und ermöglichen die Anpassung der Zellen je Probe, der Reads pro Zelle und der Proben pro Versuch (Tabelle 1, Tabelle 2).^{*} Forscher erhalten mit dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System eine zugängliche Lösung für die Sequenzierung und Primäranalyse auf einem Tischsystem, unabhängig davon, ob eine tiefere Sequenzierung durchgeführt werden soll, um auf Transkripte mit geringerer Häufigkeit zu untersuchen, oder mehr Zellen oder Proben sequenziert werden. Bei vier verfügbaren Fließzellentypen können Forscher flexibel mehrere Methoden der NGS-Analyse verwenden und eine Vielzahl von Versuchsdesigns berücksichtigen.

Dieser technische Hinweis zeigt Synergien beim Einsatz des NextSeq 1000 System und des NextSeq 2000 System für Einzelzell- und räumliche Lösungen von 10x Genomics über mehrere Bibliothekstypen und Fließzellen-Ausgabevolumen hinweg. Außerdem wird die Performance der XLEAP-SBS-Chemie mit der von Standard-SBS-Chemie verglichen. Des Weiteren erfolgen Hinweise zur Laufeinrichtung und zur zu erwartenden Sequenzierungsperformance sowie zu Beispielanalysemetriken.

Methoden

scRNA-Seq-Assays

Chromium Single Cell Gene Expression-Assays von 10x Genomics bieten eine optimierte Lösung für die scRNA-Seq. GEM-X-Technologie verbessert die Performance und steigert die Workflow-Effizienz von Chromium-Assays. Zugleich bietet sie Funktionen für Einzelzelltranskriptom-3'-Genexpression und Multiomik. Der Chromium Gene Expression Flex-Assay ermöglicht mithilfe eines sensitiven sondenbasierten Verfahrens das Profiling der Genexpression für Tausende bis Hunderttausende fixierter Zellen bzw. Zellkerne. Der Workflow eines typischen scRNA-Seq-Versuchs mit Chromium-Einzelzell-Assays umfasst die Probenvorbereitung, die Zellpartitionierung und das Barcoding sowie die Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Analyse (Abbildung 1).

^{*} Bei Assays für räumliche Biologie werden Projekte anhand von Tissue Spots und Erfassungsbereichen anstelle von Zellen untersucht.

Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

Proben für die scRNA-Seq wurden aus kryokonservierten humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells) vorbereitet. Einzelzellbibliotheken wurden mit den Chromium GEM-X Single Cell 3' Reagent Kits v4 (10x Genomics, Katalog-Nr. PN-1000691) gemäß dem im Benutzerhandbuch (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000731, Rev. A) angegebenen Protokoll vorbereitet.⁴ Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit NextSeq 2000 XLEAP-SBS P4-Reagenzienkits (100 Zyklen) (Illumina, Katalog-Nr. 20100994). Zum Vergleich wurden die gleichen Bibliotheken auch auf dem NextSeq 2000 System mit dem NextSeq 2000 P3-Standard-SBS-Reagenzienkit (100 Zyklen) (Illumina, Katalog-Nr. 20040559) sequenziert. Laufkonfigurationen wurden gemäß den von 10x Genomics bereitgestellten Parametern eingerichtet: 28 Zyklen für Read 1, 10 Zyklen für i7- und i5-Index-Reads und 90 Zyklen für Read 2. Die Ladekonzentration betrug sowohl für XLEAP-SBS- als auch für Standard-SBS-Reagenzien 650 pM, mit einem Spike-in von 1 % PhiX. Die Datenanalyse erfolgte mit der Cell Ranger Pipeline v8.0.0 (10x Genomics).

Chromium Single Cell Gene Expression Flex

Proben wurden aus kryokonservierten humanen PBMCs vorbereitet. Die Zellen wurden mit dem Chromium Next GEM Single Cell Fixed RNA Sample Preparation Kit (10x Genomics, Katalog-Nr. PN-1000414) gemäß dem angegebenen Protokoll (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000478, Rev D) fixiert.⁵ Die Bibliotheken wurden mit dem Chromium Fixed RNA Kit, Human Transcriptome (10x Genomics, Katalog-Nr. PN-1000476) gemäß dem im Benutzerhandbuch (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000527 Rev F) angegebenen Protokoll vorbereitet.⁶ Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit XLEAP-SBS-Chemie auf P4-Fließzellen mit 100 Zyklen und Standard-SBS-Chemie auf P3-Fließzellen mit 100 Zyklen und folgender Read-Länge: 28 Zyklen für Read 1, 10 Zyklen für i7- und i5-Index-Reads und 90 Zyklen für Read 2. Die Ladekonzentration betrug 650 pM, mit einem Spike-in von 5 % PhiX. Die Datenanalyse erfolgte mit der Cell Ranger Pipeline v7.1.0 (10x Genomics).

Tabelle 1: Beispiel-Probendurchsatz für Chromium-Einzelzell-Assays auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System

| Produkt | Minimale Read-Paare pro Zelle ^a | Zellen pro Probe | Anzahl der Proben pro Lauf ^b für NextSeq 1000- und NextSeq 2000-Fließzellen | | | |
|---|--|------------------|--|----|-----------------|-----------------|
| | | | P1 ^c | P2 | P3 ^d | P4 ^d |
| Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4 | 20.000 | 5.000 | 1 | 4 | 12 | 18 |
| Chromium Single Cell Gene Expression Flex – Multiplex | 10.000 | 5.000 | 2 | 8 | 24 | 36 |

- a. Empfehlungen bezüglich minimaler Read-Anzahl mit freundlicher Genehmigung von 10x Genomics. Stimmen Sie die Sequenzierungstiefe auf die erforderliche Performance oder Anwendung ab. Anhand der Sequenzierungssättigungsmetrik und der Kurve in der Cell Ranger-Lauf-Zusammenfassung lässt sich die Sequenzierungstiefe für bestimmte Probentypen optimieren.
- b. Die Anzahl der Einzelzellproben je Sequenzierungslauf wird anhand einer Illumina PhiX-Kontrollbibliothek bei geeigneten Clusterdichten und Ladekonzentration bestimmt. Die aktuellen Performanceparameter können je nach Probentyp, Probenqualität und Cluster nach Filterung variieren.
- c. P1-Fließzellen sind eine gute Wahl für Einzelzell-Qualitätssicherungsversuche.
- d. P3- und P4-Fließzellen sind nur für das NextSeq 2000 System verfügbar.



Abbildung 1: Workflow von Chromium Single Cell Gene Expression: Der Workflow typischer scRNA-Seq-Versuche umfasst die Probenvorbereitung, die Zellpartitionierung und das Barcoding sowie die Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung und die Datenanalyse.

Räumliche RNA-Seq-Assays

Die Visium Spatial Gene Expression-Assays von 10x Genomics bilden das gesamte Transkriptom einschließlich des morphologischen Kontexts in formalinfixierten, in Paraffin eingebettetem (FFPE) und frisch gefrorenem Gewebe ab. Die Erfassungsbereiche der Visium v1- und v2-Gewebeobjektträger weisen ein Array mit ca. 5.000 Barcode-Spots mit einem Durchmesser von 55 µm und einem Abstand von 100 µm auf. Im Gegensatz dazu enthalten die hochauflösenden Visium HD-Erfassungsbereiche ein kontinuierliches Raster mit 2 × 2 µm großen Barcode-Quadraten (insgesamt ca. 11,2 Millionen). Der Workflow eines typischen räumlichen RNA-Seq-Versuchs mit räumlichen Visium-Assays umfasst Gewebeprobenvorbereitung, Bildgebung, Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Analyse ([Abbildung 2](#)).

Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

Ein Mäusehirn-FFPE-Block wurde gemäß dem im Gewebepreparationsleitfaden für Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000518, RevD) angegebenen Protokoll geschnitten.⁷ Deparaffinierung, H&E-Färbung, Bildgebung und Decrosslinking erfolgten nach dem bereitgestellten Protokoll (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000520, Rev C)⁸ und Gewebe wurde mit dem CytAssist-Instrument auf einen Visium CytAssist Spatial Gene Expression-Objektträger aufgebracht. Die Bibliotheken wurden mit Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE (10x Genomics, Katalog-Nr. PN-1000521) gemäß dem im Benutzerhandbuch (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000495, Rev F) angegebenen Protokoll vorbereitet.⁹ Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit XLEAP-

Tabelle 2: Beispiel-Probendurchsatz für räumliche Visium-Assays auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System

| Produkt | Probenotyp | Read-Paare je Tissue Spot ^c | Reads je Gewebeschnitt ^c | Anzahl der Erfassungsbereiche pro Lauf ^{a, b} für NextSeq 1000- und NextSeq 2000-Fließzellen | | |
|--|--------------------------|--|-------------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | | P2 | P3 ^d | P4 ^d |
| Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2 ^a | FFPE-Gewebe | 25.000 | 125 Mio. | 3 | 9 | 14 |
| | Frisch gefrorenes Gewebe | 50.000 | 250 Mio. | 1 | 4 | 7 |
| Visium HD Spatial Gene Expression ^b | FFPE-Gewebe | – | 275 Mio. | 1 | 4 | 6 |
| | Frisch gefrorenes Gewebe | – | 700 Mio. | – | 1 | 2 |

- a. Empfehlungen bezüglich minimaler Read-Anzahl mit freundlicher Genehmigung von 10x Genomics. Der Probendurchsatz wurde anhand empfohlener Read-Paare pro Tissue Spot, 5.000 Tissue Spots pro Erfassungsbereich und durchschnittlich 50%iger Abdeckung des Erfassungsbereich durch den Gewebeschnitt berechnet. Visium Spatial Gene Expression-Objektträger für frisch gefrorenes Gewebe verfügen über vier Erfassungsbereiche für bis zu vier Gewebeschnitte pro Objektträger. Visium Spatial Gene Expression-Objektträger für FFPE-Gewebe verfügen über zwei Erfassungsbereiche für bis zu zwei Gewebeschnitte pro Objektträger.
- b. Der Probendurchsatz wurde auf Basis von 275 Mio. Reads (für FFPE-Gewebe) oder 700 Mio. Reads (für frisch gefrorenes Gewebe) für jeden vollständig durch den Gewebeschnitt abgedeckten Erfassungsbereich berechnet (oder im Verhältnis zum durch den Gewebeschnitt abgedeckten Erfassungsbereich). Visium HD Spatial Gene Expression-Objektträger enthalten ein kontinuierliches Raster mit Barcode-Quadraten von jeweils 2 × 2 µm.
- c. Empfehlungen bezüglich minimaler Read-Anzahl mit freundlicher Genehmigung von 10x Genomics. Die angegebene Read-Tiefe für Visium HD für frisch gefrorenes Gewebe dient lediglich zu Referenzzwecken. Die Validierung des NextSeq 2000 System mit XLEAP-SBS-Chemie steht noch aus.
- d. P3- und P4-Fließzellen sind nur für das NextSeq 2000 System verfügbar.



Abbildung 2: Workflow von Visium Spatial Gene Expression: Der Workflow typischer räumlicher RNA-Seq-Versuche umfasst die Vorbereitung von Gewebeprobenvorbereitung sowie die Bildgebung, Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Datenanalyse.

SBS-Chemie auf P4-Fließzellen mit 100 Zyklen und Standard-SBS-Chemie auf P3-Fließzellen mit 100 Zyklen sowie folgender Read-Länge: 28 Zyklen für Read 1, 10 Zyklen für i7- und i5-Index-Reads und 90 Zyklen für Read 2. Die Ladekonzentration betrug 650 pM, mit einem Spike-in von 1 % PhiX. Die Datenanalyse erfolgte mit der Space Ranger Pipeline v2.0 (10x Genomics).

Visium HD Spatial Gene Expression

Schnitt, Deparaffinierung, H&E-Färbung und Bildgebung eines Mäuseembryo-FFPE-Blocks wurden gemäß dem Handbuch zur Gewebepreparation für Visium HD FFPE (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000684, Rev. A) vorgenommen. Sondenhybridisierung, Sondenligatur, Objektträgerzubereitung, Sondenfreigabe, Erweiterung und Bibliothekskonstruktion erfolgten mit dem Visium HD Reagent Kit (10x Genomics, Katalog-Nr. PN-1000668) gemäß dem im Benutzerhandbuch (10x Genomics, Dokument-Nr. CG000685, Rev A) angegebenen Protokoll.¹⁰ Die Sequenzierung erfolgte auf dem NextSeq 2000 System mit XLEAP-SBS-Chemie auf P4-Fließzellen mit 100 Zyklen und Standard-SBS-Chemie auf P3-Fließzellen mit 100 Zyklen und folgender Read-Länge: 43 Zyklen für Read 1, 10 Zyklen für i7- und i5-Index-Reads und 50 Zyklen für Read 2. Die Ladekonzentration betrug 650 pM, mit einem Spike-in von 1 % PhiX. Die Datenanalyse erfolgte mit der Space Ranger Pipeline v3.0 (10x Genomics).

Ergebnisse

Die Sequenzierung von Chromium-Einzelzellbibliotheken oder räumlichen Visium-Bibliotheken unter Verwendung der XLEAP-SBS-Hochleistungsschemie auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System lieferte Ergebnisse, die mit denen der Standard-SBS-Chemie vergleichbar sind, ermöglichen jedoch eine höhere Datenausgabe und kürzere Laufzeiten ([Tabelle 3](#)).

scRNA-Seq-Assays

Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

Die Ergebnisse zeigen für Chromium-scRNA-Seq-Bibliotheken eine hohe Übereinstimmung der Daten zwischen XLEAP-SBS-Chemie und Standard-SBS-Chemie. Bei den Primärmetriken zeigt sich eine Verbesserung um ca. 2 % bei den Clustern nach Filterung (% PF) sowie den Q30-Scores ([Tabelle 4](#)). Bei den Sequenzierungsmetriken zeigt sich eine Verbesserung der Q30-Basen bei Barcode- und RNA-Reads um 2 % und eine Verbesserung der Q30-Basen bei Unique Molecular Identifiers (UMI) um 4 % ([Tabelle 5](#)). Die Visualisierung der Zelltypklassifizierung anhand des t-SNE-Plots zeigt für beide Datensätze vergleichbare Ergebnisse ([Abbildung 3A](#)).

Tabelle 3: Ladehinweis und erwartetes Ergebnis der Laufmetriken für NextSeq 2000 P4-XLEAP-SBS-Fließzellen im Vergleich zu NextSeq 2000 P3-Standard-SBS-Fließzellen

| Produkt | Sequenzierungs-konfiguration (R1, i7, i5, R2) | Bibliothekslade-konzentration | PhiX-Zugabe in Prozent | Prozent PhiX aligniert ^a | Cluster % PF, P4-XLEAP-SBS ^b | Cluster % PF, P3-Standard-SBS ^b |
|---|---|-------------------------------|------------------------|-------------------------------------|---|--|
| Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4 | 28, 10, 10, 90 | 650 pM | 1 % | 0,4 % | 77,4 % | 75,8 % |
| Chromium Single Cell Gene Expression Flex – Multiplex | 28, 10, 10, 90 | 650 pM | 5 % | 2,7 % | 88,9 % | 84,4 % |
| Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2 | 28, 10, 10, 90 | 650 pM | 1 % | 0,9 % | 87,8 % | 78,3 % |
| Visium HD Spatial Gene Expression | 43, 10, 10, 50 | 650 pM | 1 % | 0,5 % | 89,2 % | 72,2 % |

a. Werte für den Prozentsatz alignierter PhiX werden für NextSeq 2000 P4-XLEAP-SBS-Fließzellen angegeben. Werte zu NextSeq 2000 P3-Standard-SBS-Fließzellen für den Prozentsatz alignierter PhiX sind den Tabellen 4, 6, 8 und 10 zu entnehmen. Die Varianz des Prozentsatzes alignierter PhiX liegt innerhalb der normalen Varianz zwischen Läufen.

b. % PF, Prozentsatz der Cluster nach Filterung.

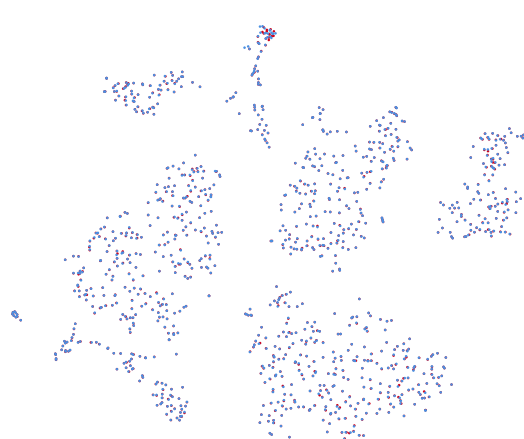
Tabelle 4: Primäre Metriken für Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
| Laufkonfiguration | 28, 10, 10, 90 | 28, 10, 10, 90 |
| Ergebnis | 244,89 Gb | 172,07 Gb |
| Ladekonzentration | 650 pM | 650 pM |
| % PF | 77,4 % | 75,8 % |
| % PhiX aligniert | 0,4 % | 1,9 % |
| Basen Read 1 ≥ Q30 | 96,3 % | 93,7 % |
| Basen Read 2 ≥ Q30 | 94,2 % | 92,3 % |
| Fehlerrate Read 1 | 0,07 % | 0,07 % |
| Fehlerrate Read 2 | 0,16 % | 0,16 % |
| Geschätzte Anzahl der Zellen je Probe | 1.077 | 1.072 |
| Anzahl erkannter Gene | 26.825 | 26.312 |
| UMI-Anzahl pro Zelle (Median) | 22.683 | 21.174 |

Tabelle 5: Sequenzierungslaufmetriken für Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|---|---------------------|------------------------|
| Gültige Barcodes | 95,7 % | 95,7 % |
| Zuverlässig auf exonische Regionen gemappte Reads | 57,2 % | 57,0 % |
| Zuverlässig auf das Transkriptom gemappte Reads | 70,7 % | 70,6 % |
| Anteil der Reads in Zellen | 96,9 % | 96,9 % |
| Q30-Basen im Barcode | 96,2 % | 93,9 % |
| Q30-Basen im RNA-Read | 95,8 % | 93,6 % |
| Q30-Basen im UMI | 96,9 % | 93,0 % |

A. Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4



B. Chromium Single Cell Gene Expression Flex

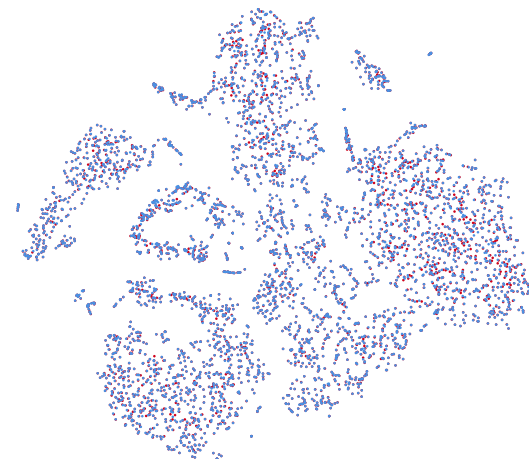


Abbildung 3: Chromium Single Cell Gene Expression auf dem NextSeq 2000 System: Visualisierung der Zelltypklassifizierung mithilfe von t-SNE-Plots (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) für (A) Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4 und (B) Chromium Single Cell Gene Expression Flex, sequenziert auf dem NextSeq 2000 System mit der NextSeq 2000 P4-Fließzelle mit XLEAP-SBS-Chemie (blau) und der NextSeq 2000 P3-Fließzelle mit Standard-SBS-Chemie (orange). Beachten Sie, dass sich blaue und orangefarbene Punkte aufgrund der Datenüberschneidung nur schwer unterscheiden lassen.

Chromium Single Cell Gene Expression Flex

Die Ergebnisse zeigen für Chromium Flex-scRNA-Seq-Bibliotheken eine hohe Übereinstimmung der Daten zwischen XLEAP-SBS-Chemie und Standard-SBS-Chemie. Bei den primären Metriken zeigt sich eine Verbesserung von ca. 5 % bei % PF (Tabelle 6). Der Anstieg bei % PF bedeutet, dass nach der Filterung eine höhere Anzahl von Basen vorhanden ist, wodurch sich die Ausgabe der Fließzelle erhöht. Sequenzierungsmetriken und t-SNE-Plots zeigen vergleichbare Ergebnisse für die unterschiedlichen Datensätze (Tabelle 7, Abbildung 3B).

Räumliche RNA-Seq-Assays

Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

Die Ergebnisse zeigen für Visium Spatial RNA-Seq-Bibliotheken eine hohe Übereinstimmung der Daten zwischen XLEAP-SBS-Chemie und Standard-SBS-Chemie. Bei den primären Metriken zeigt sich eine Verbesserung von ca. 12 % bei % PF (Tabelle 8). Die Sequenzierungsmetriken und die räumliche Visualisierung der Genexpression zeigen vergleichbare Ergebnisse zwischen den Datensätzen (Tabelle 9, Abbildung 4).

Visium HD Spatial Gene Expression

Die Ergebnisse zeigen für Visium HD Spatial-RNA-Seq-Bibliotheken eine hohe Übereinstimmung der Daten zwischen XLEAP-SBS-Chemie und Standard-SBS-Chemie. Bei den primären Metriken zeigt sich eine Verbesserung von ca. 23 % bei % PF (Tabelle 10). Bei den Sequenzierungsmetriken zeigt sich eine Verbesserung der Q30-Basen bei Barcode- und RNA-Reads und der Q30-Basen bei UMI um 2 % (Tabelle 11). Die räumlich aufgelöste Visualisierung der Genexpression zeigt höhere UMI-Werte für Daten, die mit XLEAP-SBS-Chemie generiert wurden (Abbildung 5).

Tabelle 6: Primäre Metriken für Chromium Single Cell Gene Expression Flex

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
| Laufkonfiguration | 28, 10, 10, 90 | 28, 10, 10, 90 |
| Ergebnis | 281,25 Gb | 191,85 Gb |
| Ladekonzentration | 650 pM | 650 pM |
| % PF | 88,9 % | 84,4 % |
| % PhiX aligniert | 2,7 % | 1,8 % |
| Basen Read 1 ≥ Q30 | 97,3 % | 95,9 % |
| Basen Read 2 ≥ Q30 | 73,8 % | 74,5 % |
| Fehlerrate Read 1 | 0,06 % | 0,05 % |
| Fehlerrate Read 2 | 12,02 % | 12,24 % |
| Geschätzte Anzahl der Zellen je Probe | 4.033 | 4.015 |
| Anzahl erkannter Gene | 13.717 | 13.686 |
| UMI-Anzahl pro Zelle (Median) | 5.809 | 5.472 |

Tabelle 7: Sequenzierungslaufmetriken für Chromium Single Cell Gene Expression Flex

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|---|---------------------|------------------------|
| Gültige Barcodes | 97,0 % | 95,3 % |
| Zuverlässig gemappte Reads in Zellen | 96,3 % | 96,2 % |
| Anteil der zuverlässig auf den gefilterten Sondenansatz gemappten Reads | 94,9 % | 94,9 % |
| Q30-Basen im Barcode | 95,7 % | 94,8 % |
| Q30-Basen im Sonden-Read | 91,9 % | 92,0 % |
| Q30-Basen im UMI | 98,0 % | 96,4 % |

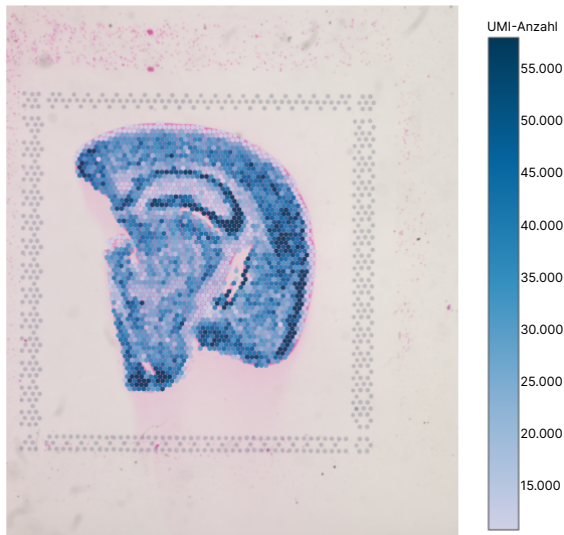
Tabelle 8: Primäre Metriken für Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|-----------------------------|---------------------|------------------------|
| Laufkonfiguration | 28, 10, 10, 90 | 28, 10, 10, 90 |
| Ergebnis | 277,89 Gb | 177,56 Gb |
| Ladekonzentration | 650 pM | 650 pM |
| % PF | 87,8 % | 78,3 % |
| % PhiX aligniert | 0,9 % | 1,4 % |
| Basen Read 1 ≥ Q30 | 97,2 % | 96,3 % |
| Basen Read 2 ≥ Q30 | 75,0 % | 70,1 % |
| Fehlerrate Read 1 | 0,06 % | 0,04 % |
| Fehlerrate Read 2 | 3,99 % | 11,72 % |
| Anzahl erkannter Gene | 19.358 | 19.354 |
| UMI-Anzahl je Spot (Median) | 180.374 | 119.010 |

Tabelle 9: Sequenzierungslaufmetriken für Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|---|---------------------|------------------------|
| Gültige Barcodes | 99,1 % | 99,1 % |
| Gültige UMI | 99,5 % | 100,0 % |
| Anteil der Reads in Spots unter Gewebe | 91,4 % | 91,4 % |
| Anteil der zuverlässig auf den gefilterten Sondensatz gemappten Reads | 92,8 % | 92,6 % |
| Q30-Basen im Barcode | 97,3 % | 96,5 % |
| Q30-Basen im RNA-Read | 97,3 % | 94,6 % |
| Q30-Basen im UMI | 97,7 % | 96,6 % |

A. NextSeq 2000 P4-Fließzelle mit XLEAP-SBS-Chemie



B. NextSeq 2000 P3-Fließzelle mit Standard-SBS-Chemie

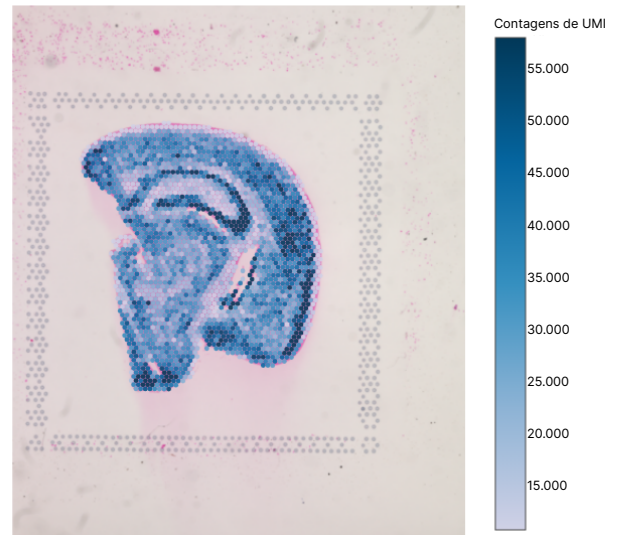


Abbildung 4: Visium Spatial Gene Expression für FFPE auf dem NextSeq 2000 System: Visualisierung der Genexpression im Kontext der Gewebearchitektur für Mäusehirn-FFPE-Gewebschnitte mit Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2, sequenziert auf dem NextSeq 2000 System mit (A) der NextSeq 2000 P4-Fließzelle mit XLEAP-SBS-Chemie und (B) der NextSeq 2000 P3-Fließzelle mit Standard-SBS-Chemie. Gewebeplots sind nach UMI-Zählung in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die P4-Fließzelle und die XLEAP-SBS-Chemie ermöglichen vergleichbare Daten mit höheren UMI-Werten.

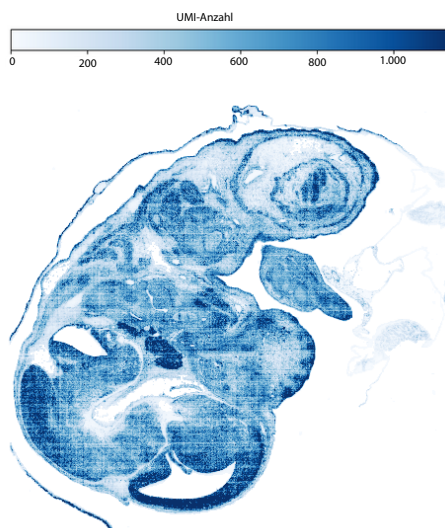
Tabelle 10: Primäre Metriken für Visium HD Spatial Gene Expression

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|----------------------------------|---------------------|------------------------|
| Laufkonfiguration | 43, 10, 10, 50 | 43, 10, 10, 50 |
| Ergebnis | 228,07 Gbp | 133,24 Gbp |
| Ladekonzentration | 650 pM | 650 pM |
| % PF | 89,2 % | 72,2 % |
| % PhiX aligniert | 0,5 % | 1,9 % |
| Basen Read 1 ≥ Q30 | 97,3 % | 95,6 % |
| Basen Read 2 ≥ Q30 | 96,7 % | 94,4 % |
| Fehlerrate Read 1 | 0,09 % | 0,06 % |
| Fehlerrate Read 2 | 0,10 % | 0,14 % |
| Anzahl erkannter Gene | 19.038 | 19.036 |
| UMI-Anzahl (Median) pro 8 µm-Bin | 522,4 | 424,4 |

Tabelle 11: Sequenzierungslaufmetriken für Visium HD Spatial Gene Expression

| | P4-XLEAP-SBS-Chemie | P3-Standard-SBS-Chemie |
|---|---------------------|------------------------|
| Gültige Barcodes | 92,8 % | 93,3 % |
| Gültige UMI | 100,0 % | 99,7 % |
| Anteil der zuverlässig auf den gefilterten Sondensatz gemappten Reads | 98,9 % | 98,7 % |
| Q30-Basen im Barcode | 97,6 % | 95,5 % |
| Q30-Basen im RNA-Read | 97,1 % | 94,9 % |
| Q30-Basen im UMI | 97,6 % | 95,9 % |

A. NextSeq 2000 P4-Fließzelle mit XLEAP-SBS-Chemie



B. NextSeq 2000 P3-Fließzelle mit Standard-SBS-Chemie

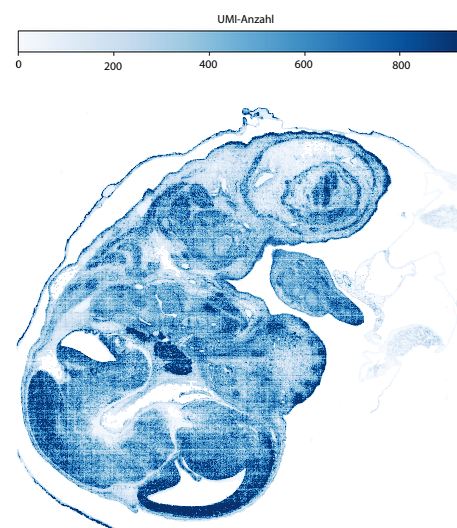


Abbildung 5: Visium HD Spatial Gene Expression auf dem NextSeq 2000 System: Visualisierung der Genexpression im Kontext der Gewebearchitektur für Mäuseembryo-FFPE-Gewebschnitte mit Visium HD Spatial Gene Expression, sequenziert auf dem NextSeq 2000 System mit (A) der NextSeq 2000 P4-Fließzelle mit XLEAP-SBS-Chemie und (B) der NextSeq 2000 P3-Fließzelle mit Standard-SBS-Chemie. Gewebeplots sind nach UMI-Zählung in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die P4-Fließzelle und die XLEAP-SBS-Chemie ermöglichen vergleichbare Daten mit höheren UMI-Werten.

Zusammenfassung

Verfahren für Einzelzell- und räumliche Sequenzierung können Forschern ein tieferes Verständnis komplexer Zellpopulationen und Gewebe ermöglichen. Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System machen gemeinsam mit den Lösungen von 10x Genomics für die Bibliotheksvorbereitung und Analyse bei der Einzelzell- und räumlichen Analyse diese hochauflösenden NGS-Verfahren für mehr Labore zugänglich. Die leistungsstarke XLEAP-SBS-Chemie auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System liefert mit denen von Standard-SBS-Chemie vergleichbare Ergebnisse und ermöglicht zugleich eine höhere Datenausgabe sowie kürzere Laufzeiten für Assays für die Einzelzell- und räumliche Genexpressionsanalyse.

Weitere Informationen

[NextSeq 1000 System und NextSeq 2000 System](#)

[Chromium Single Cell Gene Expression](#)

[Visium Spatial Gene Expression](#)

Quellen

1. Wang Y, Mashock M, Tong Z, et al. [Changing Technologies of RNA Sequencing and Their Applications in Clinical Oncology](#). *Front Oncol*. 2020;10:447. doi:10.3389/fonc.2020.00447
2. Ke M, Elshenawy B, Sheldon H, Arora A, Buffa FM. [Single cell RNA-sequencing: A powerful yet still challenging technology to study cellular heterogeneity](#). *Bioessays*. 2022;44(11):e2200084. doi:10.1002/bies.202200084
3. Illumina. NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008.pdf](#). Veröffentlicht 2020. Aktualisiert 2024. Aufgerufen am 4. November 2024.
4. 10x Genomics. Chromium GEM-X Single Cell 3' Reagent Kits v4 User Guide, CG000731, Rev A. [10xgenomics.com/support/single-cell-gene-expression/documentation/steps/library-prep/chromium-gem-x-single-cell-3-v4-gene-expression-user-guide](#). Aufgerufen am 26. August 2024.
5. 10x Genomics. Fixation of Cells & Nuclei for Chromium Fixed RNA Profiling, CG000478, Rev D. [10xgenomics.com/support/single-cell-gene-expression-flex/documentation/steps/sample-prep/fixation-of-cells-and-nuclei-for-chromium-single-cell-gene-expression-flex](#). Aufgerufen am 19. September 2024.
6. 10x Genomics. Chromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits for Multiplexed Samples User Guide, CG000527, Rev F. [10xgenomics.com/support/single-cell-gene-expression-flex/documentation/steps/library-prep/chromium-single-cell-gene-expression-flex-reagent-kits-for-multiplexed-samples](#). Aufgerufen am 26. August 2024.
7. 10x Genomics. Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE – Tissue Preparation Guide Demonstrated Protocol, CG000518, Rev D. [10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/tissue-prep/visium-cyt-assist-spatial-gene-expression-for-ffpe-tissue-preparation-guide](#). Aufgerufen am 26. August 2024.
8. 10x Genomics. Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE – Deparaffinization, H&E Staining, Imaging & Decrosslinking Demonstrated Protocol, CG000520, Rev C. [10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/tissue-staining/visium-cyt-assist-spatial-gene-expression-for-ffpe-deparaffinization-hand-e-staining-imaging-and-decrosslinking](#). Aufgerufen am 26. August 2024.
9. 10x Genomics. Visium CytAssist Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide, CG000495, Rev F. [10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/library-construction/visium-cyt-assist-spatial-gene-expression-reagent-kits-for-ffpe](#). Aufgerufen am 26. August 2024.
10. 10x Genomics. Visium HD Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide, CG000685, Rev A. [10xgenomics.com/support/spatial-gene-expression-hd/documentation/steps/library-construction/visium-hd-spatial-gene-expression-reagent-kits-user-guide](#). Aufgerufen am 26. August 2024.



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-03053 DEU v1.0