

Sequenziamento a singola cellula e spaziale sulle celle a flusso NextSeq™ 1000 e NextSeq 2000 XLEAP-SBS™

Genomica ad alta risoluzione
su un sistema da banco
leader del mercato

Introduzione

I sistemi biologici complessi sono determinati dalle funzioni coordinate delle singole cellule in tessuti organizzati. I metodi tradizionali che esaminano i campioni dissociati in massa possono mascherare l'eterogeneità cellulare e le relazioni spaziali responsabili della complessità dei sistemi. Il sequenziamento a singola cellula e spaziale è un metodo di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) che offre una visione ad alta risoluzione della variazione e dell'organizzazione da cellula a cellula.

10x Genomics, partner di Illumina, commercializza varie soluzioni per biologia a singola cellula e spaziale. Si tratta di prodotti per la preparazione e l'analisi delle librerie ampiamente utilizzati, che si basano sull'accuratezza e sulla semplicità dei sistemi di sequenziamento Illumina. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System con chimica XLEAP-SBS sono i sistemi da banco ideali per gli studi a singola cellula e spaziali, grazie alle caratteristiche di flessibilità, scalabilità e alta qualità dei dati che li rendono adatti a supportare la sensibilità di questi saggi.

Sequenziamento dell'RNA a singola cellula e spaziale

La profilazione dell'espressione genica a livello di singola cellula o con un contesto spaziale preservato aumenta le capacità di individuazione per comprendere in modo più profondo e preciso i meccanismi dello sviluppo e della malattia.

Il sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNA-Seq, single-cell RNA Sequencing) utilizza la partizione cellulare e i codici a barre degli oligonucleotidi per esaminare i trascrittomi di singole cellule, siano esse centinaia o decine di migliaia. Fornendo una visione dettagliata della variazione da cellula a cellula, l'scRNA-Seq facilita l'identificazione di nuovi biomarcatori e tipi rari di cellule che con l'RNA-Seq in massa non verrebbero colti.^{1,2}

La trascrittomica spaziale combina tecnologie di imaging e sequenziamento a elevata processività per mostrare l'espressione dell'mRNA a livello cellulare nei tessuti strutturalmente preservati. La visualizzazione della morfologia tissutale sovrapposta all'attività genica può aiutare i ricercatori a comprendere la relazione spaziale tra le cellule all'interno di tessuti normali e malati.

Sia gli approcci di sequenziamento a singola cellula sia quelli spaziali possono essere applicati a modalità che vanno oltre l'RNA, inclusi DNA, epigenoma o proteina. Ad esempio, 10x Genomics offre soluzioni multiomiche che abbinano l'scRNA-Seq a saggi per l'accessibilità alla cromatina o l'espressione proteica. Le soluzioni spaziali possono anche misurare l'RNA e l'espressione proteica insieme.

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sono basati sulla chimica XLEAP-SBS che è, a oggi, la chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing by Synthesis) più veloce, più efficace e della più alta qualità offerta da Illumina. Retta dalla solida base della chimica SBS standard di Illumina, la chimica XLEAP-SBS offre maggiore stabilità dei reagenti con tempi di integrazione dimezzati.³

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offrono la scalabilità necessaria per far fronte a svariate esigenze di progetto a singola cellula o spaziale, consentendo l'impostazione delle cellule per campione, delle letture per cellula e dei campioni per esperimento (Tabella 1, Tabella 2).^{*} Sia che i ricercatori desiderino eseguire un sequenziamento più approfondito per accedere a trascritti con abbondanza inferiore sia che vogliano sequenziare più cellule o campioni, NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System rappresentano soluzioni accessibili per il sequenziamento e l'analisi primaria su sistemi da banco. Con quattro tipi di celle a flusso disponibili, i ricercatori sono liberi di utilizzare diversi metodi di analisi NGS e di scegliere la soluzione più adatta a seconda del progetto sperimentale.

Questa nota tecnica dimostra la sinergia dell'utilizzo di NextSeq 1000 e NextSeq 2000 per le soluzioni 10x Genomics a singola cellula e spaziali con più tipi di librerie e output di cella a flusso. Vengono inoltre confrontate le prestazioni della chimica XLEAP-SBS con quelle della chimica SBS standard e fornite indicazioni sulla configurazione della corsa, sulle prestazioni di sequenziamento previste e sulle metriche di analisi di esempio.

Metodi

Saggi scRNA-Seq

I saggi Chromium Single Cell Gene Expression di 10x Genomics sono soluzioni ottimizzate per l'scRNA-Seq. La tecnologia GEM-X migliora le prestazioni e aumenta l'efficienza del flusso di lavoro dei saggi Chromium, fornendo al contempo l'espressione genica del trascrittoma 3' a singola cellula nonché funzionalità multiomiche. Il saggio Chromium Gene Expression Flex consente l'elaborazione del profilo dell'espressione genica per cellule o nuclei fissi nell'ordine delle migliaia o delle centinaia di migliaia, utilizzando un metodo sensibile basato su sonda. Un tipico esperimento di scRNA-Seq con saggi a singola cellula Chromium segue un flusso di lavoro che prevede preparazione dei campioni, partizione cellulare e assegnazione di codici a barre, preparazione delle librerie, sequenziamento e analisi (Figura 1).

^{*} Per i saggi di biologia spaziale, i progetti vengono misurati in termini di regioni di tessuto e aree di cattura anziché di cellule.

Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

I campioni per l'scrRNA-Seq sono stati preparati a partire da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) umano crioconservate. Le librerie a singola cellula sono state preparate utilizzando Chromium GEM-X Single Cell 3' Reagent Kit v4 (10x Genomics, n. di catalogo PN-1000691) seguendo il protocollo riportato nella guida per l'utente (10x Genomics, n. documento CG000731, Rev A).⁴ Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con i kit di reagenti NextSeq 2000 XLEAP-SBS P4 (100 cicli) (Illumina, n. di catalogo 20100994). Per il confronto, le stesse librerie sono state sequenziate anche su NextSeq 2000 System con il kit di reagenti NextSeq 2000 P3 SBS standard (100 cicli) (Illumina, n. di catalogo 20040559). Le configurazioni della corsa sono state effettuate in base ai parametri forniti da 10x Genomics: lettura 1 a 28 cicli, letture indici i7 e i5 a 10 cicli e lettura 2 a 90 cicli. La concentrazione di carico sia per i reagenti XLEAP-SBS sia per i reagenti SBS standard era di 650 pM, con aggiunta dell'1% di PhiX. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la pipeline Cell Ranger v8.0.0 (10x Genomics).

Chromium Single Cell Gene Expression Flex

I campioni sono stati preparati a partire da PBMC umane crioconservate. Le cellule sono state fissate con Chromium Next GEM Single Cell Fixed RNA Sample Preparation Kit (10x Genomics, n. di catalogo PN-1000414) seguendo il protocollo dimostrato (10x Genomics, documento n. CG000478, Rev D).⁵ Le librerie sono state preparate con Chromium Fixed RNA Kit, Human Transcriptome (10x Genomics, n. di catalogo PN-1000476) seguendo il protocollo riportato nella guida per l'utente (10x Genomics, documento CG000527 Rev F).⁶ Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con la chimica XLEAP-SBS su celle a flusso P4 a 100 cicli e con la chimica SBS standard su celle a flusso P3 a 100 cicli con la seguente lunghezza di lettura: lettura 1 a 28 cicli, letture indici i7 e i5 a 10 cicli e lettura 2 a 90 cicli. La concentrazione di carico era di 650 pM, con aggiunta del 5% di PhiX. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la pipeline Cell Ranger v7.1.0 (10x Genomics).

Tabella 1: esempio di processività del campione per i saggi a singola cellula Chromium su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System

Prodotto	Coppie di letture minime per cella ^a	Cellule per campione	N. di campioni per corsa ^b per le celle a flusso NextSeq 1000 e NextSeq 2000			
			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. Raccomandazioni relative alle letture minime fornite per gentile concessione di 10x Genomics. Regolare la profondità di sequenziamento in base alle esigenze di prestazioni o applicazione. La metrica e la curva di saturazione del sequenziamento nel riepilogo corsa di Cell Ranger possono essere utilizzate per ottimizzare la profondità del sequenziamento per specifici tipi di campioni.
- b. Il numero di campioni a singola cellula per corsa di sequenziamento si basa su una libreria di controllo Illumina PhiX alle densità dei cluster e alla concentrazione di carico supportate. Gli attuali parametri delle prestazioni possono variare in base al tipo di campione, alla qualità del campione e al cluster che attraversano il filtro.
- c. Le celle a flusso P1 sono una buona soluzione per gli esperimenti di controllo qualità di singola cellula.
- d. Le celle a flusso P3 e P4 sono disponibili solo su NextSeq 2000 System.



Figura 1: flusso di lavoro di Chromium Single Cell Gene Expression. Un tipico esperimento di scRNA-Seq segue un flusso di lavoro che prevede preparazione dei campioni, partizione delle cellule e assegnazione di codici a barre, preparazione delle librerie, sequenziamento e analisi dei dati.

Saggi di RNA-Seq spaziale

I saggi Visium Spatial Gene Expression di 10x Genomics mappano l'intero trascrittoma con il contesto morfologico in tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) e congelati freschi. Le aree di cattura dei vetrini tissutali Visium v1 e v2 presentano un array di circa 5.000 regioni con codice a barre dal diametro di 55 µm e disposte a una distanza di 100 µm le une dalle altre. Le aree di cattura ad alta definizione di Visium HD, invece, presentano una griglia continua costituita da circa 11,2 milioni di quadrati di 2 × 2 µm con codice a barre. Un tipico esperimento di RNA-Seq spaziale con i saggi spaziali Visium segue un flusso di lavoro che prevede la preparazione dei campioni di tessuto, l'imaging, la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi (Figura 2).

Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

È stato sezionato un blocchetto FFPE con tessuto cerebrale di topo come descritto nel protocollo dimostrato per la preparazione di tessuti FFPE per Visium CytAssist Spatial Gene Expression (10x Genomics, documento n. CG000518, Rev D).⁷ A seguire, in base al relativo protocollo dimostrato (10x Genomics, documento n. CG000520, Rev C)⁸, sono stati eseguiti deparaffinizzazione, colorazione H&E, imaging e decrosslinking e il tessuto è stato trasferito su un vetrino Visium CytAssist Spatial Gene Expression con lo strumento CytAssist. Le librerie sono state preparate utilizzando Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE (10x Genomics, n. di catalogo PN-1000521) seguendo il protocollo riportato nella guida per l'utente (10x Genomics, n. documento CG000495, Rev F).⁹

Tabella 2: esempio di processività del campione per i saggi spaziali Visium su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System

Prodotto	Tipo di campione	Coppie di letture per regione di tessuto ^c	Letture per sezione di tessuto ^c	N. di aree di cattura per corsa ^{a,b} per le celle a flusso NextSeq 1000 e NextSeq 2000		
				P2	P3 ^d	P4 ^d
Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2 ^a	Tessuto FFPE	25.000	125 milioni	3	9	14
	Tessuto congelato fresco	50.000	250 milioni	1	4	7
Visium HD Spatial Gene Expression ^b	Tessuto FFPE	–	275 milioni	1	4	6
	Tessuto congelato fresco	–	700 milioni	–	1	2

- a. Raccomandazioni relative alle letture minime fornite per gentile concessione di 10x Genomics. La processività del campione è calcolata in base alle coppie di letture raccomandate per regione di tessuto, a 5.000 regioni di tessuto per area di cattura e a un'area di cattura media del 50% coperta dalla sezione di tessuto. I vetrini Visium Spatial Gene Expression per tessuto congelato fresco presentano quattro aree di cattura per l'esecuzione di un massimo di quattro sezioni di tessuto per vetrino. I vetrini Visium Spatial Gene Expression per tessuto FFPE hanno due aree di cattura per l'esecuzione di un massimo di due sezioni di tessuto per vetrino.
- b. La processività del campione è stata calcolata in base a 275 milioni di letture (per il tessuto FFPE) o 700 milioni di letture (per il tessuto congelato fresco) per area di cattura completamente coperta dalla sezione di tessuto (o in proporzione all'area di cattura coperta dalla sezione di tessuto). I vetrini Visium HD Spatial Gene Expression contengono una griglia continua di quadrati di 2 × 2 µm con codice a barre.
- c. Raccomandazioni relative alle letture minime fornite per gentile concessione di 10x Genomics. La guida alla profondità di lettura per Visium HD relativamente al tessuto congelato fresco è fornita solo come riferimento e non è ancora stata convalidata su NextSeq 2000 System con la chimica XLEAP-SBS.
- d. Le celle a flusso P3 e P4 sono disponibili solo su NextSeq 2000 System.



Figura 2: flusso di lavoro di Visium Spatial Gene Expression. Un tipico esperimento di RNA-Seq spaziale segue un flusso di lavoro che prevede preparazione dei campioni di tessuto, imaging, preparazione delle librerie, sequenziamento e analisi dei dati.

Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con la chimica XLEAP-SBS su celle a flusso P4 a 100 cicli e con la chimica SBS standard su celle a flusso P3 a 100 cicli con la seguente lunghezza di lettura: lettura 1 a 28 cicli, letture indici i7 e i5 a 10 cicli e lettura 2 a 90 cicli. La concentrazione di carico era di 650 pM, con aggiunta dell'1% di PhiX. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la pipeline Space Ranger v2.0 (10x Genomics).

Visium HD Spatial Gene Expression

È stato sezionato un blocchetto FFPE con tessuto embrionale di topo, quindi lo stesso è stato deparaffinizzato, marcato con H&E e sottoposto a imaging seguendo il manuale di preparazione dei tessuti FFPE per Visium HD (10x Genomics, documento n. CG000684, Rev A). L'ibridazione della sonda, la legatura della sonda, la preparazione dei vetrini, il rilascio della sonda, l'estensione e la costruzione delle librerie sono stati effettuati utilizzando Visium HD Reagent Kit (10x Genomics, n. di catalogo PN-1000668) seguendo il protocollo riportato nella guida per l'utente (10x Genomics, documento n. CG000685, Rev A).¹⁰ Il sequenziamento è stato eseguito su NextSeq 2000 System con la chimica XLEAP-SBS su celle a flusso P4 a 100 cicli e con la chimica SBS standard su celle a flusso P3 a 100 cicli con la seguente lunghezza di lettura: lettura 1 a 43 cicli, letture indici i7 e i5 a 10 cicli e lettura 2 a 50 cicli. La concentrazione di carico era di 650 pM, con aggiunta dell'1% di PhiX. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la pipeline Space Ranger v3.0 (10x Genomics).

Risultati

Il sequenziamento delle librerie a singola cellula Chromium o delle librerie spaziali Visium con la chimica XLEAP-SBS ad alte prestazioni su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System ha fornito risultati paragonabili a quelli ottenuti con la chimica SBS standard, consentendo al contempo un output di dati più elevato e tempi di esecuzione più rapidi (Tabella 3).

Saggi scRNA-Seq

Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

I risultati dimostrano un'elevata concordanza dei dati tra la chimica XLEAP-SBS e la chimica SBS standard per le librerie Chromium scRNA-Seq. Per le metriche primarie, si osserva un miglioramento del 2% circa nella percentuale di cluster che attraversano il filtro (% PF) e nei punteggi Q30 (Tabella 4). Per quanto riguarda le metriche di sequenziamento, si rileva un miglioramento del 2% per le basi Q30 nelle letture dei codici a barre e dell'RNA e del 4% per le basi Q30 negli identificatori molecolari univoci (UMI, Unique Molecular Identifier) (Tabella 5). La visualizzazione della classificazione del tipo di cellula mediante il grafico t-SNE mostra risultati comparabili per entrambi i set di dati (Figura 3A).

Tabella 3: guida al caricamento e risultato previsto delle metriche della corsa per le celle a flusso NextSeq 2000 XLEAP-SBS P4 rispetto alle celle a flusso NextSeq 2000 SBS standard P3

Prodotto	Configurazione del sequenziamento (R1, i7, i5, R2)	Concentrazione di carico della libreria	Percentuale input PhiX	Percentuale PhiX allineata ^a	% cluster PF XLEAP-SBS P4 ^b	% cluster PF SBS standard P3 ^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. Le percentuali PhiX allineate sono relative alle celle a flusso NextSeq 2000 XLEAP-SBS P4. Vedere le Tabelle 4, 6, 8 e 10 per i valori relativi alle celle a flusso NextSeq 2000 SBS standard P3 per la percentuale PhiX allineata. La variazione della percentuale PhiX allineata rientra nella normale variazione da corsa a corsa.

b. % PF, percentuale di cluster che attraversano il filtro.

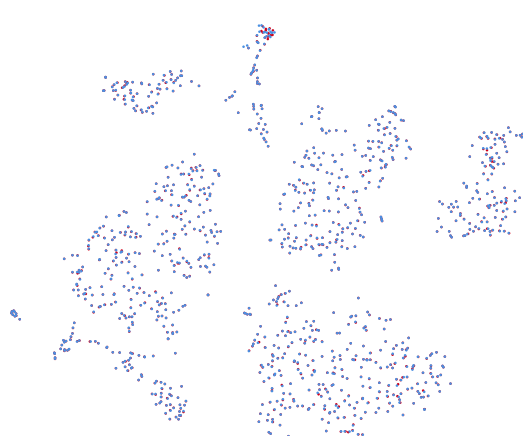
Tabella 4: metriche principali per Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Configurazione della corsa	28, 10, 10, 90	28, 10, 10, 90
Resa	244,89 Gb	172,07 Gb
Concentrazione di carico	650 pM	650 pM
% PF	77,4%	75,8%
% PhiX allineata	0,4%	1,9%
Basi lettura 1 \geq Q30	96,3%	93,7%
Basi lettura 2 \geq Q30	94,2%	92,3%
Tasso di errore lettura 1	0,07%	0,07%
Tasso di errore lettura 2	0,16%	0,16%
N. stimato di cellule per campione	1.077	1.072
N. di geni rilevati	26.825	26.312
Conteggi UMI mediani per cellula	22.683	21.174

Tabella 5: metriche della corsa di sequenziamento per Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Codici a barre validi	95,7%	95,7%
Lecture mappate con sicurezza sulle regioni esoniche	57,2%	57,0%
Lecture mappate con sicurezza sul trascrittoma	70,7%	70,6%
Frazione di lecture nelle celle	96,9%	96,9%
Basi Q30 nel codice a barre	96,2%	93,9%
Basi Q30 nella lettura dell'RNA	95,8%	93,6%
Basi Q30 negli UMI	96,9%	93,0%

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



B. Chromium Single Cell Gene Expression Flex

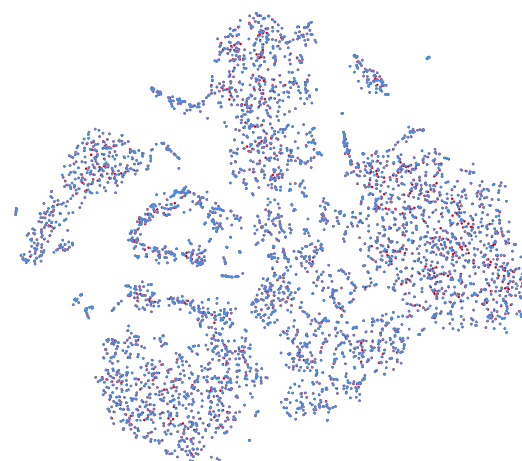


Figura 3: Chromium Single Cell Gene Expression su NextSeq 2000 System. Visualizzazione della classificazione del tipo di cellula con i grafici di analisi stocastica della distribuzione t integrata con valori simili (t-SNE, t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) per (A) Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4 e (B) Chromium Single Cell Gene Expression Flex, con sequenziamento su NextSeq 2000 System utilizzando la cella a flusso NextSeq 2000 P4 con chimica XLEAP-SBS (blu) e la cella a flusso NextSeq 2000 P3 con chimica SBS standard (arancione). Tenere presente che i punti blu e arancioni possono essere difficili da distinguere a causa della sovrapposizione dei dati.

Chromium Single Cell Gene Expression Flex

I risultati dimostrano un'elevata concordanza dei dati tra la chimica XLEAP-SBS e la chimica SBS standard per le librerie Chromium Flex scRNA-Seq. Per le metriche primarie, si osserva un miglioramento del 5% circa nella percentuale di PF (Tabella 6). L'aumento della percentuale di PF indica che un numero maggiore di basi ha superato il filtro, con conseguente incremento dell'output della cella a flusso. Le metriche di sequenziamento e i grafici t-SNE mostrano risultati comparabili tra i set di dati (Tabella 7, Figura 3B).

Saggi di RNA-Seq spaziale

Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

I risultati dimostrano un'elevata concordanza dei dati tra la chimica XLEAP-SBS e la chimica SBS standard per le librerie Visium Spatial RNA-Seq. Per le metriche primarie, si osserva un miglioramento del 12% circa nella percentuale di PF (Tabella 8). Le metriche di sequenziamento e la visualizzazione dell'espressione genica spaziale mostrano risultati comparabili tra i set di dati (Tabella 9, Figura 4).

Visium HD Spatial Gene Expression

I risultati dimostrano un'elevata concordanza dei dati tra la chimica XLEAP-SBS e la chimica SBS standard per le librerie Visium HD Spatial RNA-Seq. Per le metriche primarie, si osserva un miglioramento del 23% circa nella percentuale di PF (Tabella 10). Per quanto riguarda le metriche di sequenziamento, si rileva un miglioramento del 2% per le basi Q30 nelle letture dei codici a barre e dell'RNA e per le basi Q30 negli UMI (Tabella 11). La visualizzazione dell'espressione genica spaziale mostra conteggi UMI più elevati per i dati generati con la chimica XLEAP-SBS (Figura 5).

Tabella 6: metriche principali per Chromium Single Cell Gene Expression Flex

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Configurazione della corsa	28, 10, 10, 90	28, 10, 10, 90
Resa	281,25 Gb	191,85 Gb
Concentrazione di carico	650 pM	650 pM
% PF	88,9%	84,4%
% PhiX allineata	2,7%	1,8%
Basi lettura 1 ≥ Q30	97,3%	95,9%
Basi lettura 2 ≥ Q30	73,8%	74,5%
Tasso di errore lettura 1	0,06%	0,05%
Tasso di errore lettura 2	12,02%	12,24%
N. stimato di cellule per campione	4.033	4.015
N. di geni rilevati	13.717	13.686
Conteggi UMI mediani per cellula	5.809	5.472

Tabella 7: metriche della corsa di sequenziamento per Chromium Single Cell Gene Expression Flex

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Codici a barre validi	97,0%	95,3%
Letture mappate con sicurezza nelle celle	96,3%	96,2%
Frazione di letture mappate con sicurezza sul set di sonde filtrate	94,9%	94,9%
Basi Q30 nel codice a barre	95,7%	94,8%
Basi Q30 nella lettura della sonda	91,9%	92,0%
Basi Q30 negli UMI	98,0%	96,4%

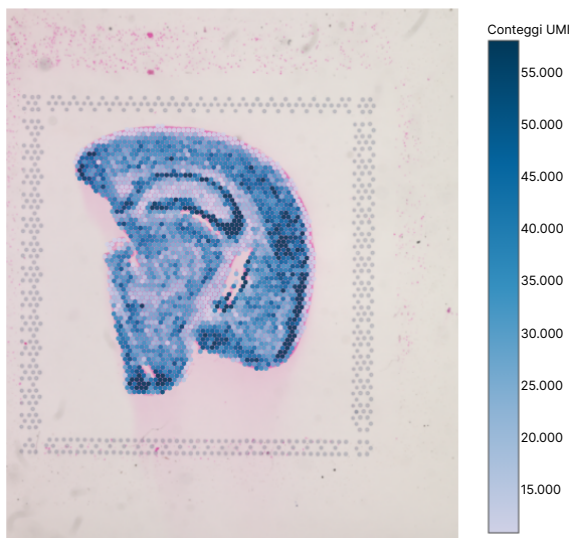
Tabella 8: metriche principali per Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Configurazione della corsa	28, 10, 10, 90	28, 10, 10, 90
Resa	277,89 Gb	177,56 Gb
Concentrazione di carico	650 pM	650 pM
% PF	87,8%	78,3%
% PhiX allineata	0,9%	1,4%
Basi lettura 1 \geq Q30	97,2%	96,3%
Basi lettura 2 \geq Q30	75,0%	70,1%
Tasso di errore lettura 1	0,06%	0,04%
Tasso di errore lettura 2	3,99%	11,72%
N. di geni rilevati	19.358	19.354
Conteggi UMI mediani per regione	180.374	119.010

Tabella 9: metriche della corsa di sequenziamento per Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Codici a barre validi	99,1%	99,1%
UMI validi	99,5%	100,0%
Frazione di letture nelle regioni sotto il tessuto	91,4%	91,4%
Frazione di letture mappate con sicurezza sul set di sonde filtrate	92,8%	92,6%
Basi Q30 nel codice a barre	97,3%	96,5%
Basi Q30 nella lettura dell'RNA	97,3%	94,6%
Basi Q30 negli UMI	97,7%	96,6%

A. Cella a flusso NextSeq 2000 P4 con chimica XLEAP-SBS



B. Cella a flusso NextSeq 2000 P3 con chimica SBS standard

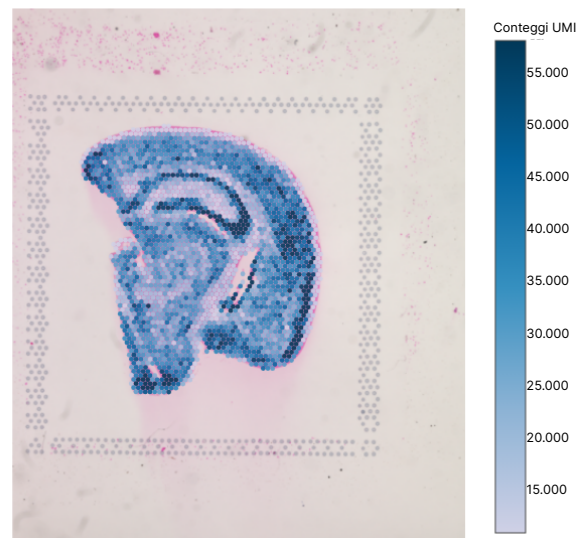


Figura 4: Visium Spatial Gene Expression per FFPE su NextSeq 2000 System. Visualizzazione dell'espressione genica nel contesto dell'architettura tissutale per le sezioni di tessuto cerebrale di topo FFPE mediante Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2, con sequenziamento su NextSeq 2000 System utilizzando (A) la cella a flusso NextSeq 2000 P4 con chimica XLEAP-SBS e (B) la cella a flusso NextSeq 2000 P3 con chimica SBS standard. I grafici dei tessuti sono colorati in base al conteggio UMI. La cella a flusso P4 e la chimica XLEAP-SBS consentono dati comparabili con conteggi UMI più elevati.

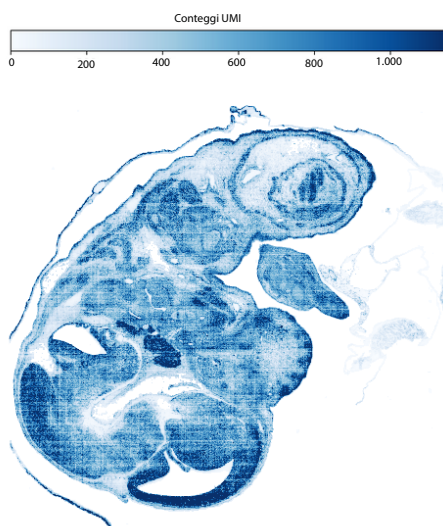
Tabella 10: metriche principali per Visium HD Spatial Gene Expression

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Configurazione della corsa	43, 10, 10, 50	43, 10, 10, 50
Resa	228,07 Gbp	133,24 Gbp
Concentrazione di carico	650 pM	650 pM
% PF	89,2%	72,2%
% PhiX allineata	0,5%	1,9%
Basi lettura 1 \geq Q30	97,3%	95,6%
Basi lettura 2 \geq Q30	96,7%	94,4%
Tasso di errore lettura 1	0,09%	0,06%
Tasso di errore lettura 2	0,10%	0,14%
N. di geni rilevati	19.038	19.036
Conteggi UMI mediani per contenitore da 8 μ m	522,4	424,4

Tabella 11: metriche della corsa di sequenziamento per Visium HD Spatial Gene Expression

	Chimica XLEAP-SBS P4	Chimica SBS standard P3
Codici a barre validi	92,8%	93,3%
UMI validi	100,0%	99,7%
Frazione di letture mappate con sicurezza sul set di sonde filtrate	98,9%	98,7%
Basi Q30 nel codice a barre	97,6%	95,5%
Basi Q30 nella lettura dell'RNA	97,1%	94,9%
Basi Q30 negli UMI	97,6%	95,9%

A. Cella a flusso NextSeq 2000 P4 con chimica XLEAP-SBS



B. Cella a flusso NextSeq 2000 P3 con chimica SBS standard

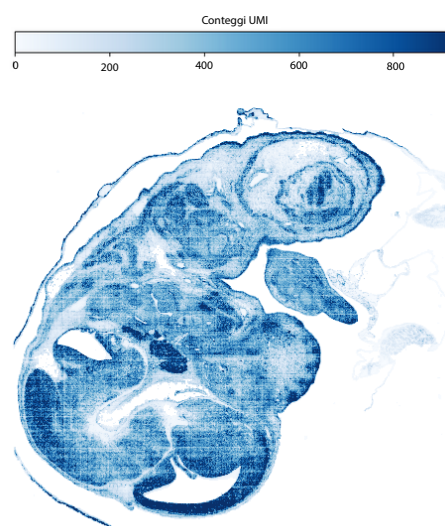


Figura 5: Visium HD Spatial Gene Expression su NextSeq 2000 System. Visualizzazione dell'espressione genica nel contesto dell'architettura tissutale per le sezioni di tessuto embrionale di topo FFPE mediante Visium HD Spatial Gene Expression, con sequenziamento su NextSeq 2000 System utilizzando (A) la cella a flusso NextSeq 2000 P4 con chimica XLEAP-SBS e la (B) cella a flusso NextSeq 2000 P3 con chimica SBS standard. I grafici dei tessuti sono colorati in base al conteggio UMI. La cella a flusso P4 e la chimica XLEAP-SBS consentono dati comparabili con conteggi UMI più elevati.

Riepilogo

I metodi di sequenziamento a singola cellula e spaziale possono aiutare i ricercatori a ottenere informazioni più approfondite su popolazioni e tessuti cellulari complessi. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System, in sinergia con le soluzioni 10x Genomics spaziali e a singola cellula per l'analisi e la preparazione delle librerie, rendono questi metodi NGS ad alta risoluzione accessibili a un maggior numero di laboratori. La chimica XLEAP-SBS ad alte prestazioni su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offre risultati paragonabili alla chimica SBS standard, consentendo al contempo un output di dati più elevato e tempi di esecuzione più rapidi per i saggi di espressione genica a singola cellula e spaziale.

Maggiori informazioni

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

[Chromium Single Cell Gene Expression](#)

[Visium Spatial Gene Expression](#)

Bibliografia

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](#). Pubblicato nel 2020. Aggiornato nel 2024. Consultato il 4 novembre 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](#). Consultato il 26 agosto 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](#). Consultato il 19 settembre 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](#). Consultato il 26 agosto 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](#). Consultato il 26 agosto 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](#). Consultato il 26 agosto 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](#). Consultato il 26 agosto 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](#). Consultato il 26 agosto 2024.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-03053 ITA v1.0