

Einzelzell-RNA- Sequenzierungs- lösung für NextSeq™ 1000 und NextSeq 2000

Kostengünstiger, flexibler Workflow
zur Messung der Genexpression
in Einzelzellen

- Zuverlässige Protokolle zur Generierung von Einzelzell-Daten mithilfe eines großen Angebots an Sequenzierungslösungen von Illumina und Drittanbietern
- Skalierbarer Sequenzierungsdurchsatz zur Unterstützung einer Vielzahl von Einzelzell-Versuchen
- Hochauflösende Analyse zum Nachweis zellulärer Abweichungen, die normalerweise durch Methoden zur massenhaften Probennahme maskiert werden

illumina®

Einleitung

Bei der Einzelzell-Sequenzierung handelt es sich um ein Verfahren zur Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing), bei dem die Transkriptome einzelner Zellen untersucht werden und somit eine hochauflösende Sicht der Zelle-zu-Zelle-Variation geliefert wird. Im Gegensatz zur herkömmlichen RNA-Sequenzierung (RNA-Seq), bei der Zellpopulationen massenhaft entnommen werden, können Forscher anhand hochgradig sensitiver Verfahren zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq, single-cell RNA Sequencing) die spezifische Biologie einzelner Zellen in komplexen Geweben untersuchen und die Reaktionen zellulärer Subpopulationen auf Umweltfaktoren nachvollziehen. Diese Assays verbessern die Untersuchung der Zellfunktion und Heterogenität in zeitabhängigen Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Tumorgenese.

Die scRNA-Seq bietet mehrere Vorteile gegenüber Methoden zur massenhaften Probennahme. Forscher bieten sich folgende Vorteile:

- Identifizierung von Zelltypen und Zuordnung von Transkriptionsaktivitäten zu bestimmten Zelltypen
- Entdeckung neuer Zelltypen, die möglicherweise neuartige Funktionen in komplexen Systemen erfüllen
- Erkennung von Transkriptionsmustern in Zelltypen mit geringer Häufigkeit, die bei Methoden zur massenhaften Probennahme maskiert wären
- Auflösung von Transkriptionsänderungen bis zu einzelnen Zelltypen, um mechanistische und Signalwegmodelle zu bestimmen



Abbildung 1: NextSeq 1000 Sequencing System und NextSeq 2000 Sequencing System: Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System optimieren Sequenzierungsworkflows durch XLEAP-SBS-Chemie.

Eine flexible scRNA-Seq-Lösung

Das NextSeq 1000 Sequencing System und das NextSeq 2000 Sequencing System ([Abbildung 1](#)) nutzen die SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) XLEAP-SBS™ von Illumina als Teil eines umfassenden scRNA-Seq-Workflows. Die scRNA-Seq umfasst die anfängliche Gewebepreparation, zahlreiche Optionen zur Einzelzell-Isolation und Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung und die Primäranalyse sowie die Datenvisualisierung und -interpretation ([Abbildung 2](#)).



Abbildung 2: scRNA-Seq-Workflow für NextSeq 1000 und NextSeq 2000: Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System sind Teil eines integrierten NGS-Workflows, von der anfänglichen Gewebepreparation über die Einzelzell-Isolation und Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Primäranalyse bis hin zur Datenvisualisierung und -interpretation.

Gewebevorbereitung und Zellisolation

Frühe Methoden zur Einzelzell-Isolation wiesen einen geringen Durchsatz auf. Pro Versuch konnten maximal wenige Tausend Zellen verarbeitet werden. Die Verfügbarkeit von Methoden auf Basis von Mikrofluidik mit hohem Durchsatz für die Zellisolation ermöglicht es Forschern nun, Hunderte bis Zehntausende von Zellen pro Versuch kostengünstig zu untersuchen. Forschern steht ein großes Angebot von Anbietern für die Gewebevorbereitung, Einzelzell-Isolation und Bibliotheksvorbereitung zur Verfügung, sodass scRNA-Seq-Studien auf eine Vielzahl von Geweben, Spezies, Zelltypen und Methoden zugeschnitten werden können (Tabelle 1).

NextSeq 1000 Sequencing System und NextSeq 2000 Sequencing System

Die leistungsstarken und flexiblen Systeme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 erfüllen eine Vielzahl von Projektanforderungen und ermöglichen die Anpassung von Zellen pro Probe, Reads pro Zelle und Proben pro Versuch. Forscher erhalten mit dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System eine kostengünstige Lösung für die Sequenzierung und Primäranalyse in einem Tischsequenziersystem, unabhängig davon, ob eine tiefere Sequenzierung durchgeführt werden soll, um auf Transkripte mit geringerer Häufigkeit zuzugreifen, 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. Ist ein höherer Probendurchsatz erforderlich, können mit der NovaSeq™ X Series (Tabelle 2) Studien in größerem Maßstab durchgeführt werden.

Tabelle 1: Exemplarische Studiendesigns für die scRNA-Seq^a

Methode	Exemplarische Methode zur Zellisolation	Exemplarische Methode zur Bibliotheksvorbereitung	Zellen pro Probe	Read-Paare pro Zelle	Datenanalyse
RNA-Seq in voller Länge	FACS	Takara SMARTer cDNA Synthesis Kits	100	1 Mio.	DRAGEN Single-Cell RNA
mRNA-Endtag-Amplifikation (3'-WTA oder 5'-WTA)	10x Genomics Chromium	10x Genomics Chromium Single Cell Gene Expression	5.000	20.000	10x Genomics Cell Ranger DRAGEN Single-Cell RNA
Erfassung anhand von RNA-Sonden	10x Genomics Chromium	10x Genomics Single Cell Gene Expression Flex	5.000	10.000	10x Genomics Cell Ranger DRAGEN Single-Cell RNA
Gezieltes Panel	BD Rhapsody Single-Cell Analysis System	BD Rhapsody Single-Cell Analysis	5.000	2.000	Seven Bridges Genomics
mRNA-Endtag-Amplifikation (3'-Erfassung)	Dolomite Bio Nadia Instrument	Dolomite Bio RNAdia Kit	6.000	25.000	dropSeqPipe Partek Flow

a. Die angegebene Zellen- und Read-Anzahl dient jeweils nur zur Veranschaulichung. Die Zellen-, Read- und Proben-Anzahl müssen jeweils sorgfältig auf Grundlage der Anforderungen des Studiendesigns ausgewählt werden. Im [E-Book zur Einzelzell-Sequenzierung](#) finden Sie weitere Informationen. WTA: Whole-Transcriptome Amplification, Transkriptom-Amplifikation; BD: Becton Dickinson, FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting, Sortierung fluoreszenzmarkierter Zellen.

Tabelle 2: Probendurchsatz bei der Einzelzell-RNA-Seq auf Sequenziersystemen von Illumina

Sequenziersystem	Sequenzierungsreagenzien	Anzahl der Proben pro Fließzelle ^a
NextSeq 1000 System und NextSeq 2000 System	P1 – 100 Zyklen	1 ^b
	P2 – 100 Zyklen	4
	P3 ^c – 100 Zyklen	11–12
	P4 ^c – 100 Zyklen	16–17
NovaSeq X Series ^d	1.5B – 100 Zyklen	15
	10B – 100 Zyklen	96
	25B – 300 Zyklen	250

- a. Berechnet für 5.000 Zellen pro Probe und 20.000 Read-Paare pro Zelle; umfasst 38 zusätzliche Zyklen zur Unterstützung von UMIs (Unique Molecular Identifiers, eindeutige molekulare Identifikatoren). Die Anzahl der Zellen pro Probe und Read-Paare pro Zelle hängt von der gewünschten Anwendung und dem jeweiligen Probentyp ab.
- b. P1-Reagenzien eignen sich bestens für Versuche zur Qualitätskontrolle.
- c. P3- und P4-Reagenzien sind nur für das NextSeq 2000 System erhältlich.
- d. Das NovaSeq X Plus System ist für Läufe mit einer oder zwei Fließzellen geeignet. Das NovaSeq X System ist für Läufe mit einer Fließzelle geeignet.

Mehr Erkenntnisse mit XLEAP-SBS-Chemie

Beim NextSeq 1000 System und beim NextSeq 2000 System kommt XLEAP-SBS-Chemie zum Einsatz, die bislang schnellste, hochwertigste und robusteste SBS-Chemie von Illumina. Die XLEAP-SBS-Chemie auf Basis der bewährten standardmäßigen SBS-Chemie von Illumina bietet eine verbesserte Reagenzienstabilität mit einer zweifach schnelleren Integration. Bei der scRNA-Seq führt dies zu genaueren Fold-Change-Schätzungen und einer überragenden Sensitivität beim Nachweis von Genen, Transkripten und Einzell-Barcodes. Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System verfügen über die höchste Read-Ausgabe sowie den günstigsten Preis pro Millionen Reads aller Illumina-Tischsequenziersysteme und bieten in der Forschung folgende Vorteile:

- Mehr Reads pro Zelle zur Erfassung von Daten über Transkripte mit geringerer Häufigkeit
- Mehr Zellen und Proben für Versuchsdesigns innerhalb eines bestimmten Forschungsbudgets
- Weitere Bedingungen, Zeitpunkte oder Methoden zur Untersuchung komplexerer Aspekte der Biologie

Anwendungsübergreifende Flexibilität

Das NextSeq 1000 System und das NextSeq 2000 System zeichnen sich neben der scRNA-Seq durch umfassende anwendungsübergreifende Flexibilität aus und ermöglichen den einfachen Wechsel zwischen Sequenzierungsprojekten. Die Systeme eignen sich für eine Vielzahl von Bibliotheksvorbereitungskits von Illumina und Drittanbietern und ermöglichen einen einfachen Wechsel zwischen Bulk-RNA-Seq, scRNA-Seq, Exomsequenzierung und anderen Anwendungen. Mit der höheren Ausgabe von P4-Fließzellen sind Multiomik-Erkenntnisse zugänglicher. So lassen sich auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System beispielsweise die scRNA-Seq und die Exomsequenzierung koppeln, um zu beurteilen, ob codierende Varianten die Transkriptexpression beeinflussen. Die ATAC-Seq^{*} zur Analyse der Chromatin-Zugänglichkeit und die genauere Bestimmung der funktionellen Regulation sind ebenfalls möglich.

Optimierte Einzelzell-Datenanalyse

Mit dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System generierte Sequenzierungsdaten sind in standardisierten Formaten verfügbar, die mit einem umfassenden Angebot an kostenpflichtiger und Open-Source-Einzelzell-Sequenzierungssoftware kompatibel sind, einschließlich kostenpflichtiger Software wie Cell Ranger (10x Genomics) und SeqGeq (FlowJo/BD Biosciences) sowie Open-Source-Tools wie Seurat¹ und Monocle².

Die Analyse der scRNA-Seq-Daten kann mithilfe der Illumina DRAGEN™-Sekundäranalysetools[†] durchgeführt werden, einer Reihe genauer, umfassender und effizienter Datenanalyse-Pipelines. Beim NextSeq 1000 System und beim NextSeq 2000 System ist die DRAGEN Single-Cell-Pipeline auf dem Gerät verfügbar. Diese Datenanalysepipeline beschleunigt die Datenanalyse, verbessert die Genauigkeit mit Fehlerkorrektur und unterstützt verschiedene benutzerdefinierte Barcode-Designs für neue Einzell-Methoden. Die DRAGEN Single-Cell-Pipeline kann auch in der Cloud in BaseSpace™ Sequence Hub oder Illumina Connected Analytics gestartet werden. Neben der scRNA-Seq bietet Illumina eine umfassende Auswahl an kostenpflichtiger und Open-Source-Datenanalysesoftware zur Unterstützung weiterer Methoden, die für die Durchführung eines Forschungsprojekts erforderlich sind.

* ATAC-Seq, Assay for Transposase Accessible Chromatin with Sequencing (Assay für transposasezugängliches Chromatin mit Sequenzierung).

† Die DRAGEN-Hardware ist im NextSeq 1000 System und im NextSeq 2000 System integriert. Eine DRAGEN-Lizenz ist im Lieferumfang des Geräts enthalten und muss daher nicht separat erworben werden.

Umfassender technischer Support von Illumina

Illumina bietet erstklassigen Support mit einem Team aus Experten für Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Analyse. Dieses engagierte Team besteht aus hochqualifizierten Servicetechnikern, Technical Applications Scientists (TAS), Field Application Scientists (FAS), Systemsupporttechnikern, Bioinformatikern und IT-Netzwerkexperten, die alle bestens mit der NGS und den Anwendungen der Illumina-Kunden weltweit vertraut sind. Den [technischen Support](#) erreichen Sie telefonisch an fünf Tagen in der Woche. Der Onlinesupport steht weltweit rund um die Uhr in zahlreichen Sprachen zur Verfügung.

Mit diesem Service und Support unterstützt Illumina die Anwender bei der effizienten und optimalen Verwendung des NextSeq 1000 System und des NextSeq 2000 System, der Schulung neuer Mitarbeiter und dem Erlernen neuester Techniken und Best Practices.

Zusammenfassung

Das NextSeq 1000 Sequencing System und das NextSeq 2000 Sequencing System bieten eine flexible Lösung für die scRNA-Seq mit einer klaren, umfassenden Sicht auf das Einzelzell-Transkriptom und ermöglichen Laboren, die verfügbaren Tools zu erweitern. Dank verschiedener Fließzellenkonfigurationen können Forscher Zellen pro Versuch und Read-Paare pro Zelle an die jeweiligen Anforderungen anzupassen. Durch die Kombination von Leistung, Geschwindigkeit und Flexibilität des NextSeq 1000 System und des NextSeq 2000 System mit einem umfassenden Angebot an Bibliotheksvorbereitungs- und Softwarelösungen ermöglicht die scRNA-Seq auf dem NextSeq 1000 System und dem NextSeq 2000 System ein tieferes Verständnis des Transkriptoms auf Ebene einzelner Zellen.

Weitere Informationen

[Einzelzell-RNA-Sequenzierung](#)

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

[DRAGEN-Sekundäranalyse](#)

[Demodaten in BaseSpace Sequence Hub](#)

Quellen

1. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. [Spatial reconstruction of single-cell gene expression](#). *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):495-502. doi:10.1038/nbt.3192
2. Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, et al. [The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells](#). *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):361-386. doi:10.1038/nbt.2859

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
NextSeq 2000 Sequencing System	20038897
NextSeq 1000 Sequencing System	20038898
NextSeq 1000 to NextSeq 2000 upgrade	20047256
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a, b, c}	20100983
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a, b}	20100982
NextSeq 1000/2000 P1 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a, b}	20100981
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a, b}	20100987
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a, b}	20100986
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a, b}	20100985
NextSeq 1000/2000 P2 XLEAP-SBS Reagent Kit (600 cycles) ^{a, b}	20100984

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^{a, b}	20100990
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^{a, b}	20100989
NextSeq 2000 P3 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^{a, b}	20100988
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (50 cycles) ^a	20100995
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (100 cycles) ^a	20100994
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (200 cycles) ^a	20100993
NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS Reagent Kit (300 cycles) ^a	20100992
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read and Index Primers ^a	20112856
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Index Primer Kit ^a	20112858
NextSeq 1000/2000 XLEAP-SBS Read Primer Kit ^a	20112859

- a. XLEAP-SBS-Reagenzien-Kits für die Geräte NextSeq 1000 und NextSeq 2000 werden bei der gleichen Temperatur versandt und gelagert wie standardmäßige SBS-Reagenzien-Kits.
- b. XLEAP-SBS-Reagenzien für P1-, P2- und P3-Fließzellen sind ab dem 2. Quartal 2024 erhältlich.
- c. Für die Qualitätssicherung der Analyse.



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-00478 DEU v3.0