

Nanopore 시퀀싱 플랫폼에서 타겟화된 단일 세포 시퀀싱

Long-read 시퀀싱을 위한 Agilent SureSelect 기술 사용

저자

Gento Fujii, Masahide Seki,
Junko Zenko, Ayako Suzuki,
및 Yutaka Suzuki
University of Tokyo
Kashiwa-shi, Chiba, Japan

Satoshi Namai, Rumiko Saito,
및 Fumiko Yoshizki
Agilent Technologies, Inc.
Hachioji-shi, Tokyo, Japan

개요

Long-read, 단일세포 RNA 시퀀싱은 단일세포 수준에서 전사체 분석을 가능하게 하며, 아이소폼이나 융합 전사체와 같은 보다 정확한 전사체 정보를 유지할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 Oxford Nanopore 시퀀싱을 위한 Agilent SureSelect 기술을 사용하여 10x Genomics Chromium 단일 세포 라이브러리의 타겟 선별을 수행하는 분석법을 소개합니다. 이 분석법은 단일 세포 분석에 사용할 수 있는 유효 리드 수를 늘리고 관심 유전자에 대한 분석을 더욱 효율적으로 제공합니다. 또한, 이 분석법을 Visium spatial 분석에 적용할 수 있다는 점도 보여줍니다.

소개

단일 세포 RNA-Seq(scRNA-Seq)는 최근 몇 년 동안 단일 세포 분해능으로 유전자 발현을 분석하는 방법으로 널리 사용되고 있습니다. 기존의 대량 분석에서는 개별 세포의 전사체를 모아 전체 평균 데이터를 얻는 반면, 단일 세포 분석에서는 각 세포에 대한 독립적인 데이터를 얻고 분석합니다. 따라서 scRNA-Seq는 세포 이질성을 밝혀내고 다양한 생물학적 사건을 이해하는 데 필요한 더 깊은 통찰력을 제공할 수 있습니다. 다양한 유형의 인간 세포에서 얻은 단일 세포 데이터는 Human Cell Atlas(HCA) 컨소시엄에 따라 수집되어 인간의 건강과 질병을 이해하는 목적으로 이용됩니다. 암 연구에서는 단일 세포 기술을 사용하여 종양 이질성, 종양 미세환경 및 클론성을 연구합니다.

10x Genomics Chromium은 단일 세포 라이브러리를 생성하는데 널리 사용되는 플랫폼입니다. 이 플랫폼을 사용하면 세포 하나와 세포 바코드(CB)가 있는 비드 하나가 하나의 액적(droplet)에 담겨집니다. 이를 통해 각 세포에서 유래된 분자에 고유한 바코드를 붙일 수 있습니다.

기존의 scRNA-Seq는 Short-read 시퀀싱을 사용하여 수행되지만, Long-read 시퀀싱 기술은 3'-5'-편향을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 스플라이싱 이성질체와 융합 전사체를 보다 정확하게 검출할 수 있습니다. 그러나 Long-read 시퀀싱은 비용이 많이 들고 처리량이 낮습니다. 따라서 long-read scRNA-Seq를 사용할 때는 효율적인 유전자 분석이 중요합니다. Agilent SureSelect 시약 키트는 Long-read 시퀀싱(LRS) 라이브러리의 농축에 사용할 수 있는 hybridization capture 기반 타겟 선별 제품입니다.¹ 더욱이 이러한 키트는 long-read scRNA-Seq에도 적용할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 Chromium 시스템과 Agilent SureSelect 시약 키트를 사용하여 long-read scRNA-Seq 라이브러리를 캡처한 다음 Oxford Nanopore 플랫폼에서 시퀀싱하는 방법을 보여줍니다. 또한, 동일한 전략을 활용하여 10x Genomics Visium 플랫폼으로 제작된 spatial 라이브러리에 대한 타겟 선별 예시를 소개합니다.

실험

그림 1에 워크플로를 요약했으며, 이 응용 자료에 사용된 재료는 표 1에 나타내었습니다. 표 2에는 이 연구에 필요한 프라이머와 차단제가 나와 있습니다.

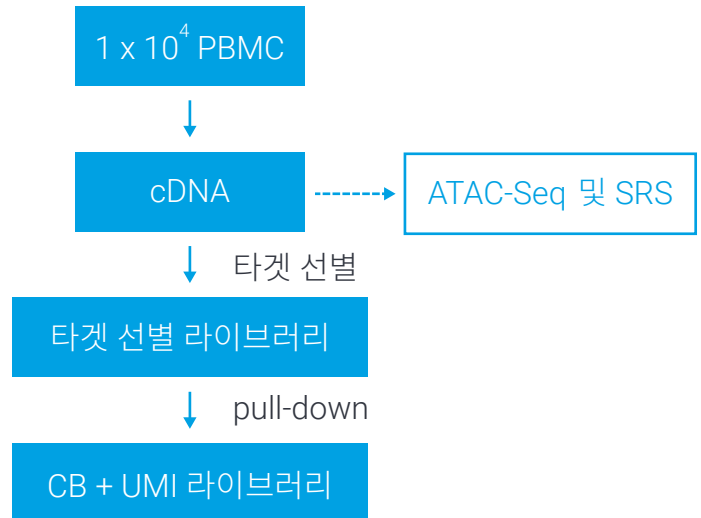


그림 1. 워크플로 개요. 이 응용 자료에 설명된 단계는 파란색으로 강조 표시되어 있으며, 여기에는 말초혈액 단핵구(PBMC)에서 cDNA를 생성하고, 타겟을 선별하며, 세포 바코드(CB)와 고유 분자 식별자(UMI)를 포함하는 라이브러리를 생성하는 단계가 포함됩니다. ATAC-Seq(Assays for transposase-accessible chromatin sequencing) 및 Short-read 시퀀싱(SRS)에 대한 분석은 포함되지 않습니다. ATAC-Seq는 선택 사항인 반면, SRS는 단일 세포 Long-read(SiCeLoRe) 데이터 처리를 수행하기 위한 데이터를 수집하는 데 필요합니다.²

표 1. 이 응용 자료에 사용된 재료.

재료	공급업체/부품 번호	코멘트
Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression	10x Genomics, 100285(4 reactions)	Single Cell 3' Kit도 사용 가능
SureSelect XT HS 시약 키트	Agilent, G9702A(16 reactions)	SureSelect XT HS2 DNA(부품 번호 G9982A, 16 reactions)도 사용할 수 있습니다. 애질런트 담당자에게 문의하세요
SureSelect Cancer CGP Capture Probe	Agilent, 5280-6990	관심 있는 모든 HS 프로브 사용 가능
KOD FX Neo DNA Polymerase	Toyobo, KFX-201 (200 U)	긴 조각을 증폭하기 위해 적절한 DNA 중합효소를 선택해야 합니다
AMPure XP Beads	Beckman Coulter Genomics, A63880(5mL)	
SPRIselect Beads	Beckman Coulter Genomics, B23317(5mL)	
Dynabeads M-270 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, 65305(2mL)	hybridization capture 및 세척에 사용
Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, 60210(2mL)	pull-down 단계에 사용
Ligation Sequencing Kit	Oxford Nanopore Technologies, SQK-LSK114	해당 플로우 셀에 적합한 다른 ligation 기반 시퀀싱 키트를 사용할 수 있습니다
10 N NaOH	자격을 갖춘 모든 공급업체	
1 M Tris-HCl(pH 7.5)	자격을 갖춘 모든 공급업체	
1 M Tris-HCl(pH 8.0)	자격을 갖춘 모든 공급업체	
5 M NaCl 용액	자격을 갖춘 모든 공급업체	
0.5M EDTA(pH 8.0)	자격을 갖춘 모든 공급업체	
TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape	애질런트	적절한 자동화 전기영동 시스템 및 기기를 선택해야 합니다(예: Agilent Fragment Analyzer 시스템의 경우 Agilent HS Large Fragment 키트, Agilent Bioanalyzer 시스템의 경우 Agilent High Sensitivity DNA 키트)
High Sensitivity D5000 Reagents	애질런트	

표 2. 프라이머와 차단제 필요.

Name	Sequence(5' to 3')
Illumina Read 1 Primer	CTACACGACGCTCTCCGATCT
Template Switch Oligo (TSO) Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACAT
Biotin-Illumina Read 1 Primer	Biotin-CTACACGACGCTCTCCGATCT
TSO Blocker	CCCATGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTT
10x Blocker	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT*

T*: inverted dT

전장 cDNA 합성

건강한 기증자로부터 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 얻었습니다. 제조업체의 입증된 프로토콜에 따라 1×10^4 PBMC의 핵을 분리했습니다.³

전이(transposition)이후, 제조업체의 지침에 따라 Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Reagent Bundle을 사용하여 GEM(Gel Beads-in-Emulsion) 생성, 바코딩 및 SPRI(Solid-phase Reversible Immobilization) 정제를 수행했습니다.⁴ cDNA는 60 μ L의 SPRIselect 시약(Beckman Coulter Genomics)을 사용하여 정제했습니다. 시료를 실온에서 5분간 인큐베이션하였습니다. 비드를 80% 에탄올 200 μ L로 두 번 세척했습니다. 잔류 에탄올을 제거한 후, 시료를 실온에서 2분간 건조하고 완충액 EB(Qiagen) 40 μ L에 용출했습니다. 그런 다음 시료를 두 부분으로 나누었습니다. 하나는 Short-read 시퀀싱용이고 다른 하나는 Long-read 시퀀싱용입니다.

cDNA 증폭

PBMC에서 유래한 바코딩된 cDNA를 PCR로 증폭시켰습니다. PCR 반응 혼합물(50 μ L를 25 μ L reactions 2개로 나눔)에는 템플릿 cDNA(10ng) 13 μ L, KOD FX Neo용 2x PCR 완충액 25 μ L, 2mM dNTP 10 μ L, KOD FX Neo 1 U(모두 TOYOBO 제품), 100 μ M Illumina read 1 프라이머와 TSO 프라이머 각각 0.5 μ L가 들어 있습니다. Cycling 조건은 다음과 같습니다. 94°C에서 2분간, 그 다음 94°C에서 15초, 63°C에서 30초, 68°C에서 15분을 8번 반복했습니다. 이어서 68°C에서 15분간 최종 연장을 실시했습니다.

각 cDNA 생성물은 20 μ L의 AMPure XP(Beckman Coulter Genomics)를 사용하여 정제했고, 시료를 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였습니다. 그런 다음 비드를 70% 에탄올 200 μ L로 두 번 세척했습니다. 잔류 에탄올을 제거한 후, 시료를 37°C에서 5분간 건조한 다음 뉴클레아제가 없는 물 17 μ L에 용출시켰습니다. 두 시료를 합치고 Eppendorf Concentrator plus를 사용하여 실온에서 45분 동안 농축했습니다. 다음으로, 합쳐진 시료를 뉴클레아제가 없는 물 10.5 μ L에 재현탁되었습니다.

Agilent High Sensitivity D5000 ScreenTape와 Agilent 4200 TapeStation 시스템의 시약을 사용하여 정제 및 증폭된 cDNA의 품질을 평가했습니다. precapture(농축되지 않은) 라이브러리의 일부를 Long-read 시퀀싱에 사용했습니다.

타겟 선별

증폭된 cDNA(500ng)는 Agilent SureSelect Cancer CGP DNA 분석 캡처 라이브러리(타겟 크기: 2.671Mb, 679 유전자)와 Agilent SureSelect XT HS 시약 키트를 사용하여 하이브리드화했습니다.

간략히 설명하면, 증폭된 cDNA 500ng을 9 μ L로 조정된 다음, 100 μ M 10x 차단제 1.5 μ L, 100 μ M TSO 차단제 1.5 μ L, Agilent SureSelect XT HS 차단제 혼합물 5 μ L를 첨가했습니다. 그런 다음 cDNA를 95°C에서 30초 동안 변성시키고 65°C에서 10분 동안 인큐베이션하였습니다.

시료를 65°C로 유지하면서 각 차단제가 포함된 cDNA를 2 μ L의 25% Agilent SureSelect RNase 블록 혼합물, 2 μ L의 SureSelect Cancer CGP DNA 분석 캡처 라이브러리, 6 μ L의 Agilent SureSelect Fast Hybridization 완충액 및 3 μ L의 뉴클레아제가 없는 물과 혼합했습니다. cDNA는 65°C에서 1분, 37°C에서 3초를 60번 반복하여 하이브리드화했습니다. 이어서 65°C에서 10분, 그리고 21°C에서 최대 16시간 동안 최종 인큐베이션하였습니다.

캡처 프로세스는 Agilent SureSelect XT HS2 타겟 선별 시스템을 사용한 Long-read 시퀀싱 라이브러리 준비 방법에 따라 수행했습니다.¹ 간단히 말해서, 캡처 프로세스는 Dynabeads M-270 Streptavidin(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 수행했습니다. 비드를 세 번 세척하고 Agilent SureSelect 결합 완충액 200 μ L에 재현탁되었습니다. 그런 다음 현탁된 비드를 68°C로 10분간 가열한 후 시료와 혼합했습니다. 시료 세척을 위해 DNA 결합 비드를 200 μ L의 SureSelect Wash Buffer 1에 재현탁시킨 다음, 500 μ L의 SureSelect Wash Buffer 2(70°C로 예열)를 첨가하고 70°C에서 5분 동안 인큐베이션하였습니다. 총 3번의 세척을 수행했습니다. 새로 준비한 0.1 N NaOH 18 μ L로 시료를 용출한 후 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였습니다. 그런 다음 200mM Tris-HCl (pH 8.0) 18 μ L를 첨가했습니다.

pull-down(템플릿 스위치 올리고 아티팩트 제거)

pull-down 단계는 PCR 아티팩트를 제거하고 시퀀싱 효율성을 개선하기 위해 Oxford Nanopore Technologies(ONT)에서 공개한 프로토콜을 따랐습니다.⁵

캡처한 cDNA 라이브러리를 사전 pull-down PCR을 통해 증폭하고 바이오틴 태그를 부착했습니다. 증폭을 위해 PCR 반응 혼합물(200μL를 100μL reactions 2개로 나눔)에는 템플릿 cDNA 36μL, KOD FX Neo용 2x PCR 완충액 100μL, 2mM dNTP 40μL, KOD FX Neo 4 U, 100μM biotin-Illumina read 1 프라이머와 TSO 프라이머 각각 2μL, 뉴클레아제가 없는 물 16μL를 포함시켰습니다. Cycling 조건은 다음과 같습니다. 94°C에서 2분간, 그 다음 94°C에서 15초, 63°C에서 30초, 68°C에서 15분을 12번 반복했습니다. 이어서 68°C에서 15분간 최종 연장을 실시했습니다.

증폭된 cDNA 생성물을 합치고 160μL의 AMPure XP(Beckman Coulter Genomics)를 사용하여 정제했습니다. 시료를 실온에서 5분간 인큐베이션하였습니다. 비드를 70% 에탄올 200μL로 두 번 세척했습니다. 잔류 에탄올을 제거한 후, 시료를 37°C에서 5분간 건조한 다음 뉴클레아제가 없는 물 42μL에 용출시켰습니다. High Sensitivity D5000 ScreenTape와 4200 TapeStation 시스템의 시약을 사용하여 정제 및 증폭된 라이브러리의 품질을 평가했습니다.

pull-down을 위해 pull-down 세척 완충액(PWB)과 캡처 비드를 준비했습니다. 2x PWB에 대한 레시피는 표 3에 설명되어 있습니다. 뉴클레아제가 없는 물로 2x PWB를 두 번 희석하여 총 7mL의 1x PWB를 준비했습니다. pull-down 비드는 5μL의 M-280 스트렙타비딘 비드(10μg/μL)(Thermo Fisher Scientific)를 1,000μL의 1x PWB로 3번 세척한 다음 마지막으로 10μL의 2x PWB로 희석하여 준비했습니다.

표 3. 2x pull-down 세척 버퍼(PWB)의 조성.

Reagent	Volume
1 M Tris-HCl(pH 7.5)	40μL
5 M NaCl	1,600μL
0.5M EDTA(pH 8.0)	8μL
Nuclease-Free Water	2,352μL
Total	4,000μL

다음으로, 100ng의 증폭된 cDNA를 함유한 10μL의 시료를 10μL의 준비된 pull-down 비드와 혼합했습니다. 비드 현탁액과 혼합한 후, 시료를 회전기를 사용하여 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였습니다. 세척을 위해 1x PWB 1,000μL를 첨가하고 5초간 볼텍싱했습니다. 총 3회의 세척을 수행한 후, 10mM Tris-HCl(pH 7.5) 200μL를 첨가하고 5초간 볼텍싱했습니다. 그 후, 비드 결합 시료에 뉴클레아제가 없는 물 13μL를 첨가했습니다.

pull-down 후 증폭의 경우, PCR reaction 혼합물(50μL)에는 비드 결합 pull-down 시료 13μL, KOD FX Neo용 2x PCR 완충액 25μL, 2mM dNTP 10μL, KOD FX Neo 1 U, 100μM Illumina read 1 프라이머와 TSO 프라이머 각각 0.5μL가 포함되었습니다. Cycling 조건은 다음과 같습니다. 94°C에서 2분간, 그 다음 94°C에서 15초, 63°C에서 30초, 68°C에서 15분을 4번 반복했습니다. 이어서 68°C에서 15분간 최종 연장을 실시했습니다.

30μL의 AMPure XP를 사용하여 50μL의 pull-down 후 생성물을 정제했습니다. 시료를 실온에서 5분간 인큐베이션하였습니다. 비드를 70% 에탄올 200μL로 두 번 세척했습니다. 잔류 에탄올을 제거한 후, 시료를 37°C에서 5분간 건조한 다음 뉴클레아제가 없는 물 17μL에 용출시켰습니다. High Sensitivity D5000 ScreenTape와 4200 TapeStation 시스템의 시약을 사용하여 정제 및 증폭된 라이브러리의 품질을 평가했습니다.

시퀀싱 및 분석

40ng(53fmol)의 준비된 시료를 사용하여, 제조업체의 지침에 따라 Ligation Sequencing Kit(Oxford Nanopore Technologies)로 PromethION(Oxford Nanopore Technologies)용 라이브러리를 준비했습니다. 라이브러리는 플로우 셀(부품 번호 FLO-PRO114M)을 사용하여 PromethION에 로드했습니다. 시퀀싱 데이터는 Guppy 6.5.7을 사용하여 염기서열 분석했습니다.

FeatureCounts 지표는 Minimap2(v2.24-r1122), featureCounts(v2.0.3) 및 Picard RNASeqMetrics(v3.1.1)를 사용하여 분석했습니다.

결과 및 토의

10x Genomics cDNA 라이브러리 캡처를 위한 프로토콜 수정

cDNA 라이브러리를 캡처하는 절차는 주로 Long-read 시퀀싱 캡처에 대한 응용 자료에 설명된 프로토콜을 기반으로 했습니다.¹ cDNA 라이브러리에는 더 짧은 조각이 포함되어 있으므로 크기 선택 절차는 건너뛰었습니다.

10x Genomics Chromium 단일 세포(및 Visium spatial) 라이브러리에는 TSO 아티팩트가 포함되어 있는데, 이는 양쪽 끝에서 TSO 시퀀싱을 포함하고 바코드와 UMI가 없습니다. 이러한 아티팩트는 분석에 사용할 수 있는 리드 수를 줄입니다(그림 2). 하이브리드화와 캡처 후에 pull-down 단계가 추가되었습니다. 이 단계에서는 CB와 UMI를 포함하는 조각을 바이오틴화된 Illumina read 1 프라이머를 사용하여 PCR로 표지했습니다. 그런 다음, 타겟 조각을 스트렙타비딘 비드를 사용하여 pull-down하고 TSO 아티팩트는 세척하여 제거했습니다. 캡처 전(비농축 라이브러리)과 캡처 및 pull-down 후(타겟 라이브러리)의 라이브러리 길이 분포는 유의미한 차이를 보이지 않습니다(그림 3).

전장 cDNA 라이브러리



그림 2. 10x Genomics 단일 세포 라이브러리의 구조. 삽입부(회색)는 템플릿 스위칭 올리고(TSO, 녹색), polyA(연한 파란색), 고유 분자 식별자(UMI, 주황색), 세포 바코드(CB, 파란색) 및 Read 1(검은색)을 포함한 시퀀싱 및 분석 요소로 둘러싸여 있습니다. Visium에서 얻은 10x Genomics spatial 라이브러리는 동일한 구조를 가지며 동일한 분석 전략으로 사용하여 처리됩니다.

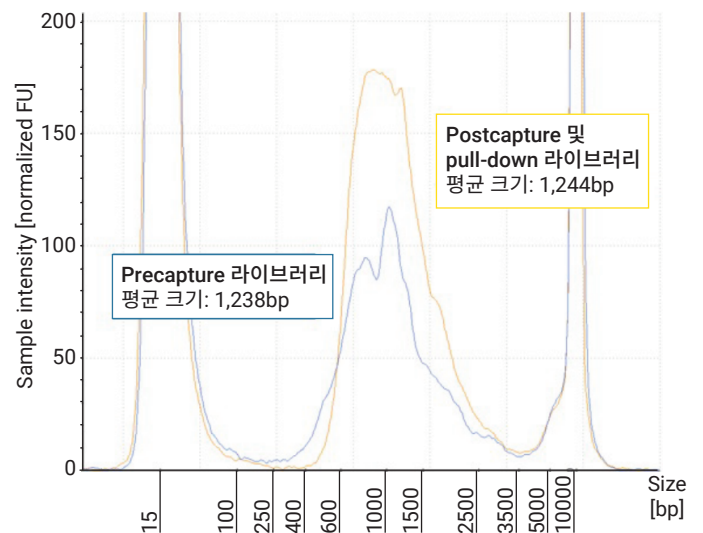


그림 3. 라이브러리의 전기영동도 예. Agilent TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape 분석법과 Agilent 4200 TapeStation 시스템을 사용하여 얻은, precapture cDNA 라이브러리(파란색)와 Postcapture pull-down 라이브러리(주황색)의 전기영동도입니다.

시퀀싱 결과

Ligation Sequencing Kit(Oxford Nanopore Technologies)를 사용하여 ONT 시퀀싱을 위한 라이브러리를 준비한 다음 시퀀싱했습니다. 결과는 SiCeLoRe 도구 모음을 사용하여 처리했습니다. 이러한 도구 덕분에 농축되지 않은 scRNA-Seq 라이브러리의 Short-read 시퀀싱 데이터를 사용하여 ONT 시퀀싱 오류를 쉽게 수정할 수 있었습니다.² 시퀀싱 및 분석 결과는 표 4에 요약했습니다.

표 4. 시퀀스 및 분석 결과 요약.

Object	Description	Unenriched Library	Targeted Library
Total Reads	No. of reads	97,607,035	107604305
	Total bp	80,368,537,295	98718514096
	N50	882	938
	1D 최대 길이(bp)	1,540,991	1366182
	1D 평균 길이(bp)	823	917
	1D 중간 길이(bp)	750	821
	평균 Q 점수	14.2	14.2
1D Pass Reads (mean_Q score ≥ 10)	리드 수	88,548,773	97605413
	최대 길이	466.281	127922
	평균 길이	828	918
	평균 Q 점수	15.0	15.0
1D Pass and CB + UMI Reads (SiCeLoRe를 사용하여 처리됨)	No. of reads	21,932,370 (24.7% of 1D pass reads)	63,603,994 (65.1% of 1D pass reads)
	Assigned (to transcript)	14,908,626	56727993
	Unassigned (no features)	4,809,450	676466
	Unassigned (ambiguity)	2,214,294	6199535
	Unassigned (unmapped)	0	0
On-Target Reads	No. of reads (panel-related)	322,093 (0.36% of 1D pass reads)	34,931,913 (35.70% of 1D pass reads)
	No. of unique UMIs	245,779	480981
	Average no. of reads/UMI	1.31	72.6
	Read length (average)	838.0bp	918.9bp
	Read length (min)	200bp	200bp
	Read length (max)	99,719bp	99,898bp
	> 5,000 bp of > 5,000 bp reads	24	1328

비농축 라이브러리에서는 단일 세포 분석에 유효한 CB와 UMI가 포함된 리드 비율이 24.7%로 낮습니다. 이와 대조적으로, 캡처된 (타겟) 라이브러리에서는 유효 리드 비율이 65.1%로 2.6배 더 높습니다(그림 4). 타겟 라이브러리에서 할당된 리드 비율이 3.3배 더 높은데, 이는 pull-down을 통해 유효한 리드 수가 크게 향상되고 더 효율적인 데이터 수집이 가능함을 나타냅니다.

비농축 라이브러리에서는 전체 리드의 0.36%만이 타겟 유전자에 매핑된 반면, 타겟 라이브러리에서는 리드의 35.7%가 매핑되어 약 100배 증가했습니다(그림 4). 게다가 대부분의 타겟 유전자는 양의 배수 변화를 보이는 반면, 오프타겟 유전자는 강한 음의 배수 변화를 보이는데, 이는 타겟 유전자가 효율적으로 농축되었음을 나타냅니다(그림 5A). 일부 유전자는 변화가 나타나지 않는데, 이는 처음에 발현 수준이 낮았거나 cDNA 길이의 영향 때문인 것으로 생각됩니다.

그림 5B에서 볼 수 있듯이, CB당 검출된 유전자 수의 상관 관계는 비농축 라이브러리와 타겟 라이브러리 사이에서도 높습니다 ($R = 0.94$). 이는 캡처 및 pull-down 과정에서 편이가 발생하지 않았음을 시사합니다. 비농축 라이브러리와 타겟 라이브러리를 비교했을 때 UMI의 수는 두 배만 다릅니다(표 4). 그러나 타겟 라이브러리에서는 UMI당 리드수가 더 많기 때문에 시퀀스 정확도를 향상시키는 데 기여하는 것으로 판단됩니다.

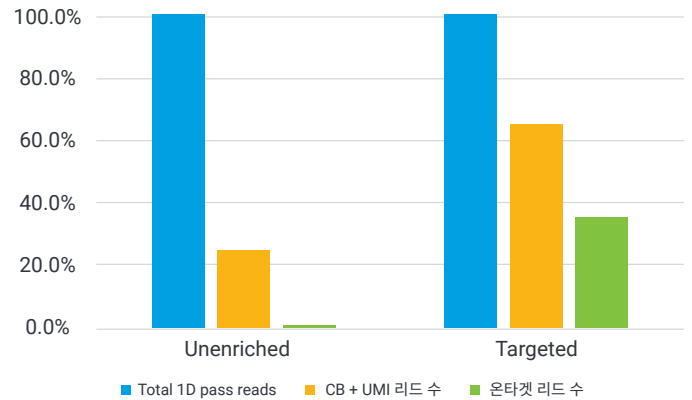


그림 4. 단일 세포 및 타겟 시퀀싱 분석에 사용 가능한 리드 비율(표 4에서 요약).

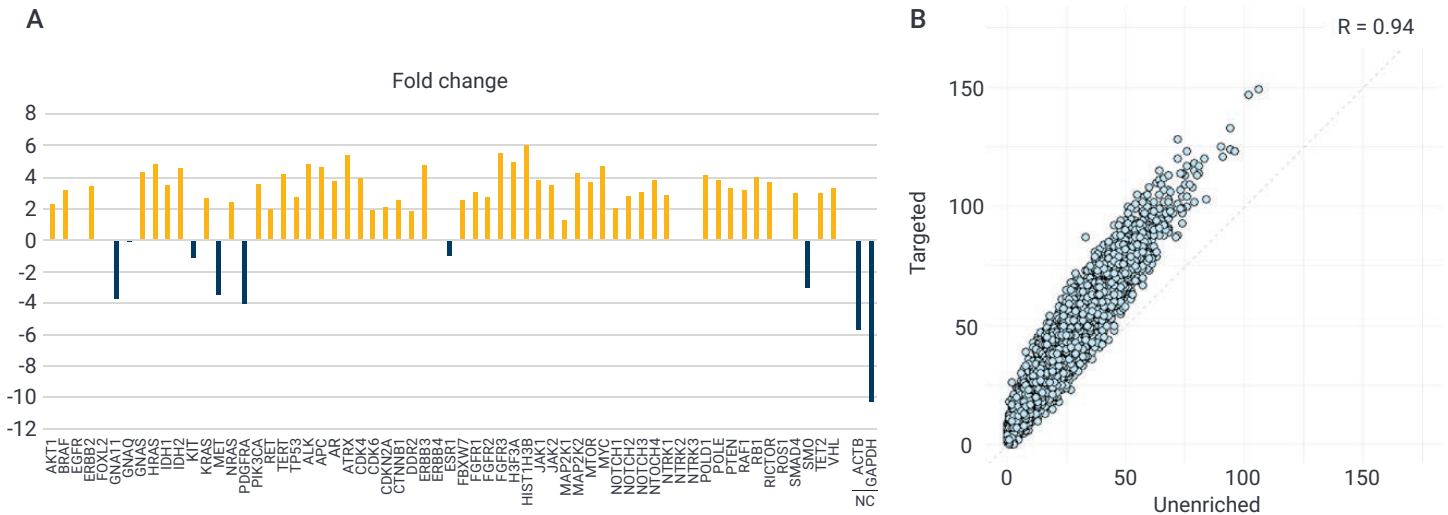


그림 5. 타겟 및 비농축 단일 세포 Long-read 시퀀싱 간의 농축 효율 및 상관성 분석. A) 선택된 타겟 유전자의 Log2 폴드 변화. ACTB와 GAPDH는 비타겟 전사체의 예입니다 (주황색: 양의 폴드 변화, 파란색: 음의 폴드 변화). (B) 비농축 라이브러리와 타겟 라이브러리 간 CB당 감지된 타겟 유전자 수 상관 관계.

Long-read scRNA-Seq 데이터의 특성

평균 리드 길이는 크게 다르지 않았으며, 비농축 라이브러리에서는 평균 838bp, 타겟 라이브러리에서는 평균 919bp였습니다. 그러나 타겟 라이브러리에서 5,000bp 이상의 리드 수가 상당히 증가했습니다(표 4). 이는 더 긴 cDNA가 효율적으로 분석된다는 것을 시사합니다. 그림 6은 더 긴 타겟 영역(JAK1 및 TET2)의 예를 보여주며, 더 긴 전사체가 단일 리드로 커버되고 리드가 이러한 타겟 영역에서 효율적으로 농축된다는 것을 보여줍니다.

비농축 라이브러리의 적용 범위는 3' 말단에 편향되어 있어 미성숙한 cDNA 전사체가 포함되어 있음을 나타냅니다. 캡처된 (타겟) 라이브러리에서는 편향이 개선되었으며, 균일한 cDNA 범위가 확보되었습니다(그림 7).

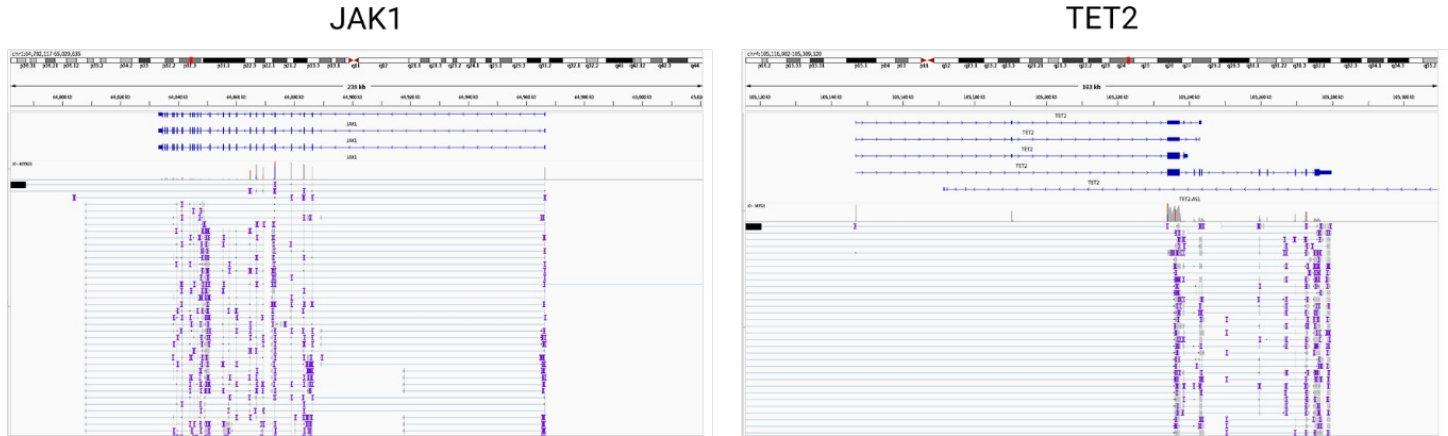


그림 6. 긴 타겟 전사체의 예. JAK1(5092 nt: ENST00000342505.5) 및 TET2(9589 nt: ENST00000380013.9)의 통합 유전체학 뷰어(IGV) 디스플레이는 성공적으로 포착된 긴 전사체의 예로 표시됩니다.

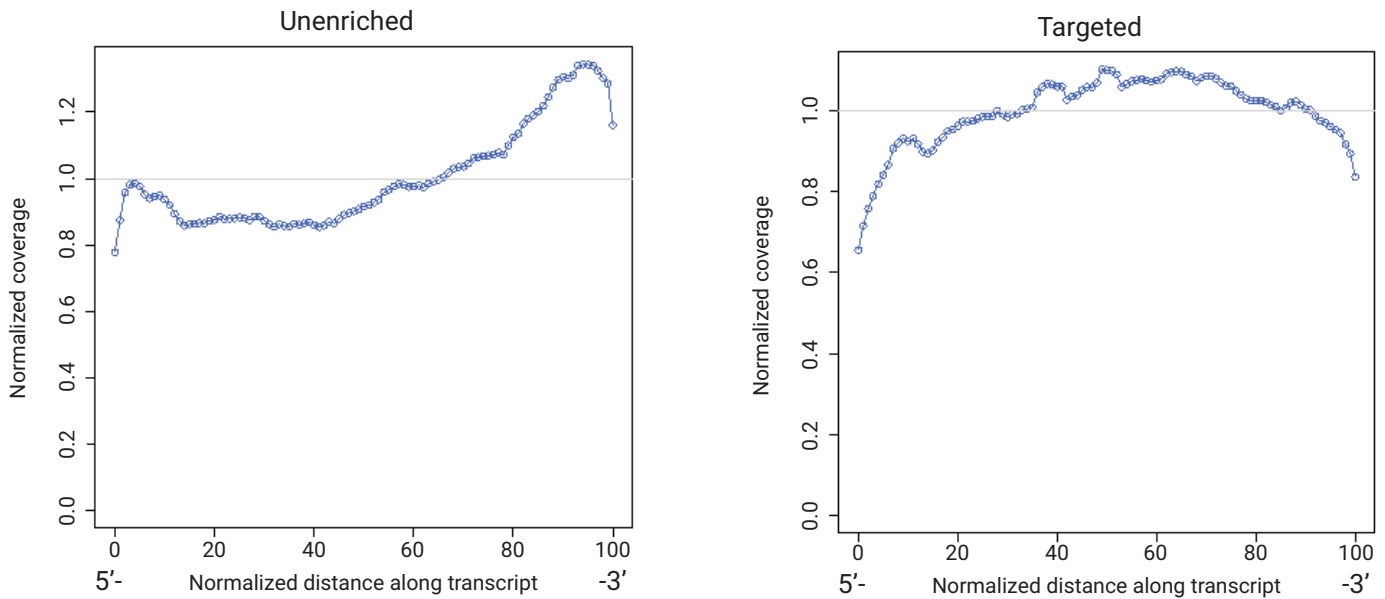


그림 7. 전사체 길이에 따라 정규화된, 비농축 및 타겟 라이브러리의 적용 범위 분포입니다.

10x Genomics Visium은 Chromium과 동일한 라이브러리 구조를 갖춘 spatial 전사체 분석용 플랫폼입니다(그림 2). 따라서 이 응용 자료에 설명된 방법을 사용하면 Chromium spatial 라이브러리의 타겟 선별이 이론적으로 가능합니다. 기술검증 절차의 일환으로, 이 프로토콜의 이전 버전을 사용하여 Visium spatial Long-read 라이브러리의 타겟 선별이 수행되었습니다.

Visium 분석을 위한 실험 조건에는 pull-down 단계를 건너뛰는 것을 포함하여 여러 가지 차이가 있지만, 이 응용 자료에 설명된 최신 방법을 사용하면 더 효율적인 spatial 분석을 수행할 수 있습니다.

TTGTACTTCGTTTCAGTTATATATTGCTAACGAGTGGTATCAACATAGGTGCATGGGATTTTCAGCCATCAGATTAT
 TTTCAGTGCACACACATCAACAAATGTCCTTTGCTTTAAAGTAATTTTGATCCCAAGTGAGAAAGTTAAAGA
 GTTACCTGCTCGCT**ATCAAG****|**ACATCTCGGAAGGCCACAGGAAATCTTCGATGAATACACAGTGTATGGCCAGGTG
 GGACAAACCCCAAGTGTGGCGCTCGTGGGATCATCGCTCACTCCACCCGTGCAGCTCATACGSGACTCTATCGGCTCATGGC
 TTTCCGCTGCTCTCTGGACTATGTCGGGAAGCAAGGACAAATATTGGCTCCGCTGACTCTGCTACGATCTGGTGTGCA
 GATCTATAAAGGGCATGAATCTACTGGAGGACCGTCCGTTGGTGACCCGCACTGAGCAGCCAGGAAGAACTATCGG
 TGAGAAACACCCGAGCATGTCAAGATCAGACAGATTTTGGGCTGGCCAACTGCTGGGTGGAGAAAGAAATACC
 ATGCAGGAAGGAGCAAAAGTGCCATCAAGTGGATGGCATTTGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACACAGA
 GTGATGCTCTGGAGTCACTGGGAGCTGGTTTGGGGTGTGATGACCTTTGGATCCAGGCACTGCCAAACGGAATCCCC
 TGCATCATGAGATCTCTCTCCATCTCTGGGAAGAAAGAGCAGCGCTCCCTCCGACCCCATATGTACCATCTGATGT
 CTACATGATCATGTCAAGTCTCGATGATGGGCGCAGATAGTGCGCCAAAGTTCCTGTGAGTTGATCTTCAGAT
 TCTCCAAATGGGCGGACGCCGCGCTACCTTTGTCAATCAGGGGGAGTGAAGAAATGCATTTGCCAAGCTCTTA
 CAGACTCCAACTTTACCTGCGCTTGATGATGAAGAAGACATGGACAGGTTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCA
 TCCAGCGGGGGGCTTTTCAACGGCCCTCTTCATCAAGTCCCAACCCGGACTCCCATCGAGGCTCTCTCTTGAGTCA
 ACCAACCAACATTTCCACCTGGCTTGCATTGATGAAGATGGGCTGCAAGGCTGTCCCATCAAGGAAGACAGCTGC
 TTGCAGCGATACAACCTCAGACCCCGCAGGCGCCTTGACTGAGGACAGCATAGACGACACCTTCGCTCCCAGTGCC
 TGAATACACCAAAACAGCTCCGTTGCCCAAGCTGGAAAC**AAAAAAAAAAAAAAAAAATCATGAAGCGGCGCACAC**
TCTAGACATATAGATCAGGAATAAAATTTGTAGACATACG

SB: ATATGTCTAGAGCGTG
UMI: CCGCTTTCATGA

[illegible]

결론

본 응용 자료에서는 Agilent SureSelect 타겟 선별 시스템이 10x Genomics Chromium 시스템을 사용하여 준비되고 Oxford Nanopore Technology Long-read 시퀀싱으로 서열 처리된 단일 세포 라이브러리에 적용 가능성을 보였습니다. 이 방법은 유효 리드 비율과 관심 유전자의 적용 범위를 높여 효율적인 단일 세포 Long-read 분석을 가능하게 합니다.

또한, 이 방법은 높은 적용 범위를 통해 시퀀싱 정확도를 향상시키고, 전장 cDNA 리드를 효율적으로 확보하며, 동일한 라이브러리 구조를 가진 10x Genomics Visium spatial 라이브러리에도 적용할 수 있습니다.

참고 자료

1. Namai, S.; Ishii, Y.; Yoshizaki, F.; Seki, M.; Suzuki, Y. Targeted Capture Long-Read Sequencing Using the Agilent SureSelect XT HS2 Target Enrichment System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7612EN, **2024**.
2. Lebrigand, K.; Magnone, V.; Barbry, P.; Waldmann, R. High throughput error corrected Nanopore single cell transcriptome sequencing. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4025. DOI: 10.1038/s41467-020-17800-6.
3. Demonstrated Protocol Nuclei Isolation for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Sequencing; *10x Genomics*, publication number CG000365 Rev C, **2022**.
4. User Guide: Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression; *10x Genomics*, publication number CG000338 Rev F, **2022**.
5. Single-cell transcriptomics with cDNA prepared using 10X Genomics; *Oxford Nanopore Technologies*, publication number SST_v9148_v111_revB_12Jan2022, **2022**.
6. Takano, Y.; Suzuki, J.; Nomura, K.; Fujii, G.; Zenkoh, J.; Kawai, H.; Kuze, Y.; Kashima, Y.; Nagasawa, S.; Nakamura, Y.; et al. Spatially resolved gene expression profiling of tumor microenvironment reveals key steps of lung adenocarcinoma development. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 10637. DOI: 10.1038/s41467-024-54671-7.

www.agilent.com

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.
PR7001-4615

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
2025년 7월 5일, 한국에서 발행
5994-8490KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DF타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com