

Illumina Single Cell 3' RNA Prep

scRNA-Seq acessível e escalável

Fluxo de trabalho de bancada simples e acessível
que pode ser concluído por usuários de qualquer
nível de experiência

Alta sensibilidade do ensaio para detectar mais
genes e transcrições

Faixa de processamento econômica de até
centenas de milhares de células para revelar
tipos raros de células



Introdução

O sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-Seq) combina captura de célula única e codificação por código de barras com sequenciamento de última geração (NGS) para fornecer uma visão de alta resolução de tecidos complexos. Os pesquisadores podem usar o scRNA-Seq para estudar populações de células heterogêneas, descobrir tipos de células raras e caracterizar processos de doença e desenvolvimento no nível celular. No entanto, a necessidade de equipamentos de capital especializados, os custos elevados dos reagentes e a escalabilidade limitada desaceleraram a adoção generalizada do sequenciamento de célula única. Essa situação muda com o Illumina Single Cell 3' RNA Prep.

O Illumina Single Cell 3' RNA Prep* permite captura de mRNA de célula única, codificação por código de barras e preparação de bibliotecas sem fluxos de trabalho complexos ou microfluídica. Combinado com as soluções de sequenciamento e informática da Illumina, o Illumina Single Cell 3' RNA Prep fornece um fluxo de trabalho fácil e escalável (Figura 1) que torna o scRNA-Seq de alto desempenho acessível para mais laboratórios.

Fluxo de trabalho acessível

O fluxo de trabalho do Illumina Single Cell 3' RNA Prep é fácil de implementar e não requer equipamentos microfluídicos caros nem protocolos complexos.¹ Os usuários podem realizar estudos de célula única em sua bancada usando um fluxo de trabalho manual simples com pontos de interrupção flexíveis. Para amostras coletadas durante um período de tempo ou que exigem transporte, o ensaio é compatível com a fixação de DSP-metanol† antes do processamento da amostra, o que expande a utilidade dos experimentos de scRNA-Seq.

Como funciona o ensaio

O Illumina Single Cell 3' RNA Prep usa a nova química PIPseq™ para captura e codificação por código de barras simples e escalável de mRNA de célula única (Figura 2).¹ As partições instantâneas predefinidas (PIPs) usam emulsificação com partículas predefinidas que incluem oligonucleotídeos com código de barras ligados a beads de hidrogel. Durante a preparação da amostra, a suspensão celular de interesse é misturada com partículas predefinidas e óleo e segregada em emulsões predefinidas por agitação. As células nas emulsões são então lisadas e o mRNA é capturado pelos modelos com código de barras. A emulsão é quebrada e o cDNA é gerado a partir do mRNA capturado por transcrição reversa e amplificado para criar uma biblioteca de cDNA para cada célula individual.

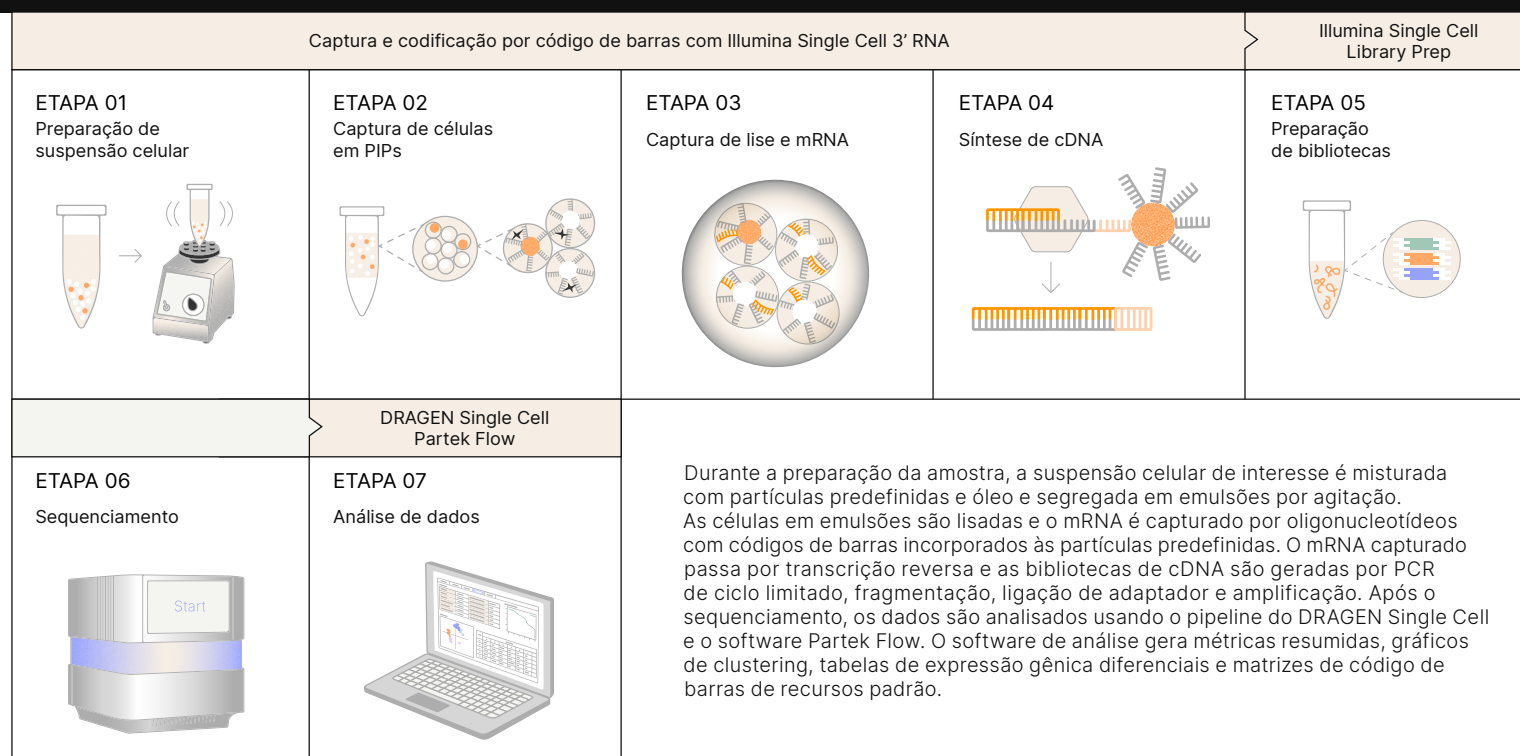
* O Illumina Single Cell 3' RNA Prep é o novo nome do Fluent PIPseq V 3' Single Cell RNA Kit.

† DSP, ditiobis (propionato de succinimidil).

Figura 1: Fluxo de trabalho do Illumina Single Cell 3' RNA



Figura 2: Captura de mRNA de célula única e codificação por código de barras com química PIPseq

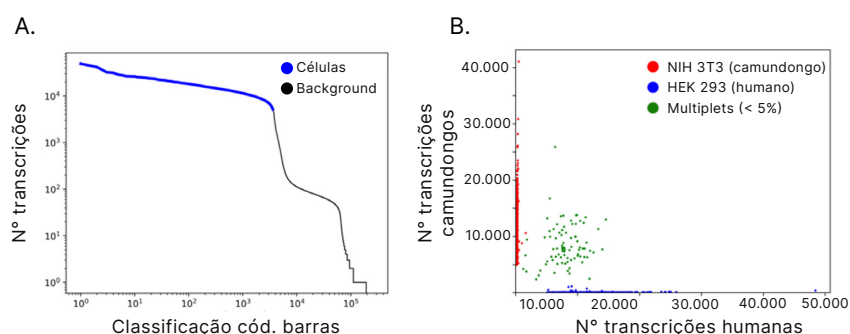


As bibliotecas de cDNA de célula única são então processadas em bibliotecas de sequenciamento usando métodos de preparação de bibliotecas padrão seguidos por NGS. Os dados de sequenciamento são analisados usando o pipeline do DRAGEN™ Single Cell e o software Partek™ Flow.

Desempenho de alta qualidade

O Illumina Single Cell 3' RNA Prep oferece dados de alta qualidade com alta sensibilidade a transcrições e genes (Figura 3, Figura 4, Tabela 1). A técnica de isolamento suave ajuda a detectar células frágeis que muitas vezes não são detectadas por outros métodos.

Figura 3: O scRNA-Seq de alta resolução captura o mRNA de células únicas



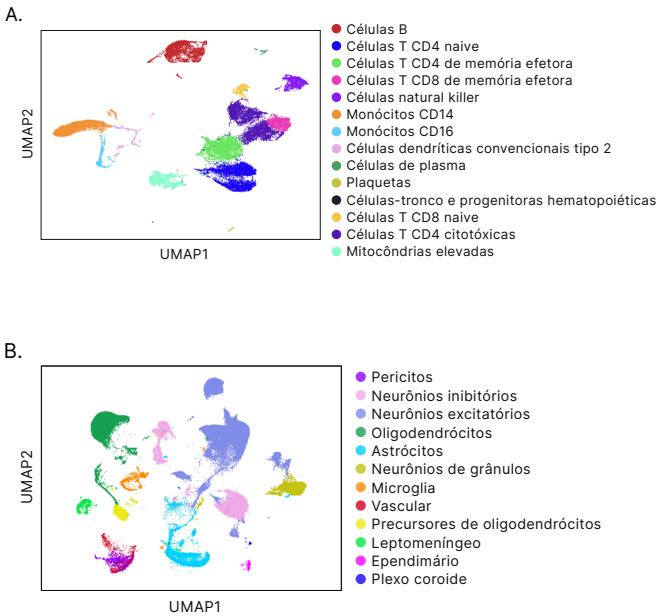
(A) Gráfico de classificação de código de barras e (B) gráfico de dispersão tipo curral com cultura mista de linhagens celulares NIH3T3 (camundongo) e HEK 293 (humano), 4.106 células detectadas, taxa de captura de 80% e menos de 5% de multiplets (duas ou mais células na mesma reação) com o kit Illumina Single Cell 3' RNA Prep T2.

A versão mais recente da química do PIPseq reduz a base do RNA ambiente, melhorando a sensibilidade em 30% para genes e transcrições em certos tipos de células² e reduzindo artefatos de sequenciamento para dados de NGS com maior aproveitamento.

Solução flexível e escalável

O método simples baseado em agitador vórtex para o Illumina Single Cell 3' RNA Prep oferece escalabilidade com boa relação custo-benefício. Para números de células maiores, use tubos PIP de volume maior.¹ A ampla faixa de processamento de centenas a centenas de milhares de células suporta necessidades de aplicação de pesquisa, desde projetos piloto e de baixa diversidade de células até análise complexa de tecidos.¹ As configurações atuais do kit podem identificar até 2.000 células por amostra (kit T2), 10.000 células por amostra (kit T10), 20.000 células por amostra (kit T20) ou 100.000 células por amostra (kit T100). A capacidade do ensaio de aumentar o rendimento celular pode revelar melhor tipos de células raras (Figura 5). Com 96 indexes duplos exclusivos disponíveis, a multiplexação de amostras permite a corrida simultânea de muitas amostras (Tabela 2).

Figura 4: scRNA-Seq de alta resolução para se ajustar à escala experimental e à aplicação



(A) Aproximação e projeção uniformes do coletor (UMAP) de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas criopreservadas, 31.613 células detectadas e taxa de captura de 79% com o kit Illumina Single Cell 3' RNA Prep T20. (B) UMAP de núcleos cerebrais de camundongos de tecido congelado, 155.000 núcleos detectados e taxa de captura de 78% com o kit Illumina Single Cell 3' RNA Prep T100.

Tabela 1: Desempenho validado do Illumina Single Cell 3' RNA Prep em sistemas de sequenciamento da Illumina

Tipo de célula	Tamanho do kit	Sistema de sequenciamento	Tamanho	Leituras	células	Leituras por célula
HEK/3T3	T2	NextSeq 2000 System	9,8 Gb	140 milhões	3.611	38.633
HEK/3T3	T10	NextSeq 2000 System	23,6 Gb	333 milhões	10.723	31.140
PBMC	T10	NovaSeq 6000 System	390 Gb	2,7 bilhões	14.307	190.526
PBMC	T20	NovaSeq X Plus System	81,3 Gb	674 milhões	31.613	21.314
Núcleos pulmonares de camundongos	T20	NextSeq 2000 System	8,9 Gb	131 milhões	2.768	47.276
Núcleos cerebrais de camundongos	T20	NextSeq 2000 System	10,4 Gb	155 milhões	2.019	76.784
Núcleos cerebrais de camundongos (fixos)	T20	NextSeq 2000 System	39,5 Gb	590 milhões	34.596	17.041
Núcleos cerebrais de camundongos	T100	NextSeq 2000 System	176,6 Gb	2,6 bilhões	155.000	17.068

Aplicações de célula única

A acessibilidade, a precisão e a sensibilidade do Illumina Single Cell 3' RNA Prep permitem novas pesquisas e descobertas. O processamento de números de células mais altos acelerará os projetos de atlas celulares para estados normais e de doenças e potencializará as telas genômicas funcionais em escala genômica. A adoção mais ampla de scRNA-Seq beneficiará especialmente laboratórios que estudam câncer, imunologia, neurociência e outras doenças complexas.³⁻⁹

scRNA-Seq para neurociência

Os tecidos neuronais compreendem uma organização complexa de diversos tipos de células que se reorganizam e se remodelam continuamente ao longo da vida de um organismo. O scRNA-Seq é uma ferramenta valiosa para catalogar a verdadeira diversidade de populações de células neuronais com sensibilidade transcricional, fornecendo informações sobre:

- Doenças neurodesenvolvimentais e neurodegenerativas⁹
- Funções anteriormente desconhecidas de populações neuronais específicas⁹
- O efeito das células neuroimunes na doença e no desenvolvimento¹⁰

scRNA-Seq para pesquisa de câncer

O câncer é uma doença dinâmica e diversificada que envolve populações celulares complexas. Compreender os tipos de células e mutações que impulsionam o câncer requer métodos sofisticados. O scRNA-Seq tem sido uma ferramenta vital para:

- Detalhar a heterogeneidade do microambiente tumoral^{4,5,11,12}
- Identificar novos biomarcadores de câncer^{13,14}
- Entender os mecanismos da imunoterapia e da resistência ao medicamento³

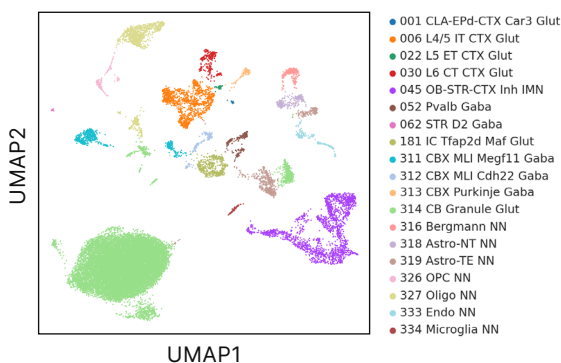
scRNA-Seq para imunologia

O sistema imunológico é composto por uma hierarquia complexa de diversos tipos de células que funcionam em conjunto para identificar, mirar e eliminar patógenos. O scRNA-Seq permite aos pesquisadores:

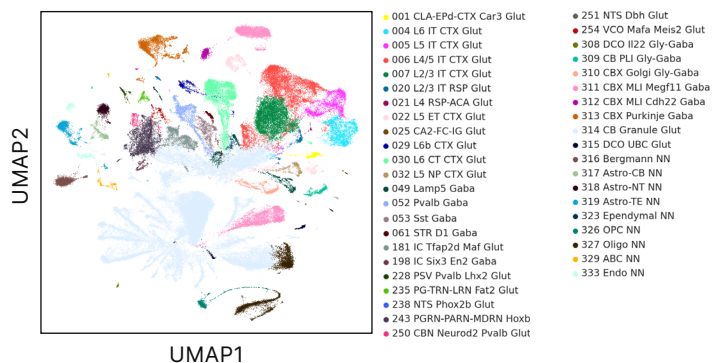
- Entender as vias de desenvolvimento e diferenciação em populações de células imunes¹⁵
- Avaliar as funções das populações de células imunes^{12,16}
- Estudar a resposta imunológica a patógenos⁶

Figura 5: Maior escala experimental com o Illumina Single Cell 3' RNA Prep revela mais tipos de células

A. Microfluidics-based scRNA-Seq (20K cells)



B. Illumina Single Cell 3' RNA Prep (> 120K cells)



(A) O scRNA-Seq baseado em microfluídica em 20.000 células identificou 19 tipos distintos de células de núcleos cerebrais de camundongos.
 (B) O Illumina Single Cell 3' RNA Prep em > 120.000 células da mesma preparação de amostras de núcleos cerebrais de camundongos identificou 42 tipos de células distintas: 17 dos 19 identificados por scRNA-seq baseado em microfluídica mais 25 tipos de células adicionais.

Tabela 2: Exemplo de rendimento de amostra por lâmina de fluxo para o Illumina Single Cell 3' RNA Prep^a

Sistema	NextSeq 550		NextSeq 1000/2000				NovaSeq 6000				NovaSeq X		
Lâmina de fluxo	Média	Alta	P1	P2	P3 ^b	P4 ^b	SP	S1	S2	S4	1,5 bilhão	10 bilhões	25 bilhões
Saída por lâmina de fluxo (leituras)	130 milhões	400 milhões	100 milhões	400 milhões	1,2 bilhão	1,8 bilhão	800 milhões	1,6 bilhão	4,1 bilhões	10 bilhões	1,6 bilhão	10 bilhões	26 bilhões
Tamanho do kit	Nº amostras por lâmina de fluxo												
T2	1	4	1	4	12	18	8	16	41	100 ^c	16	100 ^c	260 ^c
T10	-	1	-	1	3	5	2	4	12	29	4	29	76
T20	-	-	-	-	1	2	1	2	5	12	2	12	32
T100	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	2	6

a. Cálculos baseados em 20.000 leituras por célula de entrada. O T2 requer 5.000 células de entrada e 100 milhões de leituras por amostra. A T10 requer 17.000 células de entrada e 340 milhões de leituras por amostra. O T20 requer 40.000 células de entrada e 800 milhões de leituras por amostra. O T100 requer 200.000 células de entrada e 4 bilhões de leituras por amostra.

b. Lâminas de fluxo P3 e P4 disponíveis apenas no NextSeq 2000 System.

c. O Illumina Single Cell Unique Dual Indexes oferece 96 índices para 96 amostras. A corrida de 96 amostras por lâmina de fluxo é possível com o carregamento de cavidades individuais. Use o fluxo de trabalho do NovaSeq 6000 Xp para carregamento de cavidades individuais no NovaSeq 6000 System.

Aplicações multiômicas

O Illumina Single Cell 3' RNA Prep é compatível com outras medições multiômicas.^{1,17} O ensaio permite a reinterrogação do mRNA capturado para aplicações personalizadas de célula única. O cDNA gerado durante a transcrição reversa permanece ligado às beads de hidrogel, permitindo a reutilização para reações de enriquecimento ou amplificação suplementares. Essa versatilidade experimental pode ajudar os pesquisadores a realizar estudos multiômicos maiores e mais variados sem as restrições de orçamento ou tecnologia de outras abordagens de célula única.

Resumo

A análise de NGS de célula única abre portas para novas áreas de descoberta em pesquisa de câncer, imunologia, neurociência e muito mais. O Illumina Single Cell 3' RNA Prep é uma solução de scRNA-Seq acessível e altamente escalável que expandirá o poder de descoberta para pesquisadores de célula única novos e experientes. O fluxo de trabalho manual simples inclui captura de mRNA, codificação por código de barras e preparação de bibliotecas que se integra perfeitamente aos sistemas de sequenciamento da Illumina e ao seu software de análise de dados. O Illumina Single Cell 3' RNA Prep oferece alto desempenho e facilidade de uso para levar recursos de scRNA-Seq a mais laboratórios.

SAIBA MAIS →

- Illumina Single Cell 3' RNA Prep
- Sequenciamento de RNA de célula única

Informações para pedido

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

Referências

1. Clark IC, Fontanez KM, Meltzer RH, et al. [Microfluidics-free single-cell genomics with templated emulsification](#). *Nat Biotechnol*. 2023;41(11):1557-1566. doi:10.1038/s41587-023-01685-z

2. Fontanez KM, Agam Y, Bevans S, et al. [Intrinsic molecular identifiers enable robust molecular counting in single-cell sequencing](#). *bioRxiv*. 2024;2024.10.04.616561; doi:10.1101/2024.10.04.616561.

3. Ali A, Manzoor S, Ali T, et al. [Innovative aspects and applications of single cell technology for different diseases](#). *Am J Cancer Res*. 2024;14(8):4028-4048. doi:10.62347/VUFU1836

4. Tirosh I, Suva ML. [Cancer cell states: Lessons from ten years of single-cell RNA-sequencing of human tumors](#). *Cancer Cell*. 2024;42(9):1497-1506. doi:10.1016/j.ccell.2024.08.005

5. Xiang L, Rao J, Yuan J, Xie T, Yan H. [Single-Cell RNA-Sequencing: Opening New Horizons for Breast Cancer Research](#). *Int J Mol Sci*. 2024;25(17):9482. doi:10.3390/ijms25179482

6. Chang JT, Liu LB, Wang PG, An J. [Single-cell RNA sequencing to understand host-virus interactions](#). *Virol Sin*. 2024;39(1):1-8. doi:10.1016/j.virs.2023.11.009

7. Hanna SJ, Tatovic D, Thayer TC, Dayan CM. [Insights From Single Cell RNA Sequencing Into the Immunology of Type 1 Diabetes- Cell Phenotypes and Antigen Specificity](#). *Front Immunol*. 2021;12:751701. doi:10.3389/fimmu.2021.751701

8. Liu L, Davidorf B, Dong P, Peng A, Song Q, He Z. [Decoding the mosaic of inflammatory bowel disease: Illuminating insights with single-cell RNA technology](#). *Comput Struct Biotechnol J*. 2024;23:2911-2923. doi:10.1016/j.csbj.2024.07.011

9. Yang B, Hu S, Jiang Y, Xu L, Shu S, Zhang H. [Advancements in Single-Cell RNA Sequencing Research for Neurological Diseases](#). *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-024-04126-3

10. Maeda C, Tsuruta F. [Molecular Basis of Neuronal and Microglial States in the Aging Brain and Impact on Cerebral Blood Vessels](#). *Int J Mol Sci*. 2024;25(8):4443. doi:10.3390/ijms25084443

11. Liang L, Zhang C, Han J, et al. [Heterogeneity of tumor microenvironment cell groups in inflammatory and adenomatous polyposis coli mutant colorectal cancer based on single cell sequencing](#). *Transl Cancer Res*. 2024;13(9):4813-4826. doi:10.21037/tcr-24-689

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



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03195 PTB v1.0