

Soluzione di sequenziamento dell'RNA a singola cellula NextSeq™ 1000 e NextSeq 2000

Flusso di lavoro efficace in termini di costi e flessibile per la misurazione dell'espressione genica in singole cellule

- Protocolli affidabili per la generazione di dati a singola cellula utilizzando un ampio ecosistema di soluzioni di sequenziamento Illumina e di terze parti
- Processività di sequenziamento scalabile per supportare un'ampia gamma di esperimenti a singola cellula
- Analisi ad alta risoluzione per scoprire le differenze cellulari solitamente nascoste da metodi di campionamento in massa

illumina®

Introduzione

Il sequenziamento a singola cellula è un metodo di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) che esamina i trascrittomi delle singole cellule, fornendo una visualizzazione ad alta risoluzione della variazione da cellula a cellula. A differenza del tradizionale sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq), dove le popolazioni cellulari vengono campionate in massa, i metodi di sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNA-Seq, single-cell RNA sequencing) altamente sensibile consentono ai ricercatori di esplorare la biologia specifica delle singole cellule in tessuti complessi e comprendere le risposte della sottopopolazione cellulare ai segnali ambientali. Questi saggi migliorano lo studio della funzione cellulare e dell'eterogeneità nei processi che dipendono dal tempo, come la differenziazione, la proliferazione e la tumorigenesi.

L'scRNA-Seq offre diversi vantaggi rispetto ai metodi di campionamento in massa. Questi vantaggi consentono ai ricercatori di:

- Identificare i tipi di cellule e attribuire le attività trascrizionali a tipi di cellule specifici
- Scoprire nuovi tipi di cellule che possono servire nuove funzioni in sistemi complessi
- Rilevare modelli trascrizionali in tipi di cellule a bassa frequenza che verrebbero nascosti in metodi di campionamento in massa
- Risolvere le modifiche trascrizionali fino ai singoli tipi di cellule per informare i modelli meccanicistici e dei percorsi



Figura 1: NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sfruttano la chimica XLEAP-SBS per ottimizzare i flussi di lavoro di sequenziamento.

Soluzione flessibile di scRNA-Seq

Il NextSeq 1000 Sequencing System e il NextSeq 2000 Sequencing System (Figura 1) utilizzano la chimica XLEAP-SBS™ di sequenziamento mediante sintesi (SBS, sequencing by synthesis) di Illumina come parte di un flusso di lavoro scRNA-Seq completo. L'scRNA-Seq include la preparazione iniziale del tessuto, un'ampia gamma di opzioni di isolamento a singola cellula e preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi primaria, nonché la visualizzazione e l'interpretazione dei dati (Figura 2).

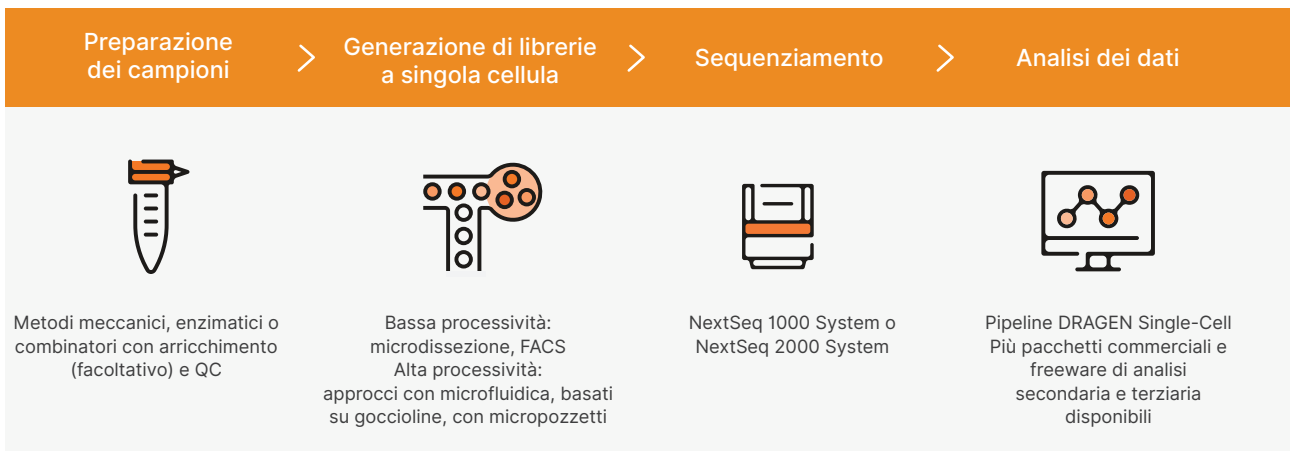


Figura 2: flusso di lavoro di scRNA-Seq di NextSeq 1000 e NextSeq 2000. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System fanno parte di un flusso di lavoro NGS integrato che procede dalla preparazione iniziale del tessuto all'isolamento di singole cellule, dalla preparazione delle librerie al sequenziamento e all'analisi primaria, dalla visualizzazione all'interpretazione dei dati.

Preparazione del tessuto e isolamento cellulare

I primi metodi per l'isolamento di singole cellule erano a bassa processività; infatti erano in grado di elaborare solo da dozzine a qualche migliaio di cellule per esperimento. La disponibilità di metodi basati sulla microfluidica ad alta processività per l'isolamento delle cellule consente ora ai ricercatori di esaminare da centinaia a decine di migliaia di cellule per esperimento in modo conveniente. I ricercatori possono scegliere tra un ampio ecosistema di fornitori per la preparazione del tessuto, l'isolamento di singole cellule e la preparazione delle librerie e consentono di adattare gli studi scRNA-Seq a un'ampia varietà di tessuti, specie, tipi di cellule e metodi ([Tabella 1](#)).

NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System

Il NextSeq 1000 System e il NextSeq 2000 System offrono la potenza e la flessibilità per soddisfare un'ampia gamma di esigenze di progetto, consentendo la regolazione delle cellule per campione, delle letture per cella e dei campioni per esperimento. Se i ricercatori desiderano eseguire un sequenziamento più a fondo per accedere a trascritti con abbondanza inferiore o sequenziare più cellule o campioni, il NextSeq 1000 System e il NextSeq 2000 System offrono una soluzione efficace in termini di costi per il sequenziamento e l'analisi primaria in un sistema di sequenziamento da banco. Con quattro tipi di celle a flusso disponibili, i ricercatori hanno la flessibilità di utilizzare diversi metodi di analisi NGS e di adattarsi a una varietà di progetti sperimentali. Se è necessaria una processività del campione ancora più elevata, gli studi possono essere scalati utilizzando la NovaSeq™ X Series ([Tabella 2](#)).

Tabella 1: esempio di progettazione dello studio per scRNA-Seq^a

Metodo	Esempio di metodo di isolamento cellulare	Esempio di metodo di preparazione delle librerie	Cellule per campione	Coppie di letture per cella	Analisi dei dati
RNA-Seq su tutta la lunghezza	FACS	Takara SMARTer cDNA Synthesis Kits	100	1 milione	DRAGEN Single-Cell RNA
Amplificazione del tag finale dell'mRNA (WTA 3' o WTA 5')	10x Genomics Chromium	10x Genomics Chromium Single Cell Gene Expression	5.000	20.000	10x Genomics Cell Ranger
					DRAGEN Single-Cell RNA
Acquisizione basata su sonda RNA	10x Genomics Chromium	10x Genomics Single Cell Gene Expression Flex	5.000	10.000	10x Genomics Cell Ranger DRAGEN Single-Cell RNA
Pannello target	BD Rhapsody Single-Cell Analysis System	BD Rhapsody Single-Cell Analysis	5.000	2.000	Seven Bridges Genomics
Amplificazione del tag finale dell'mRNA (cattura 3')	Dolomite Bio Nadia Instrument	Dolomite Bio RNAdia kit	6.000	25.000	dropSeqPipe
					Partek Flow

a. Il numero di cellule e letture dichiarato è solo a scopo illustrativo. I numeri di cellule, letture e campioni devono essere selezionati attentamente in base ai requisiti della progettazione dello studio. Per maggiori informazioni scaricare l'[eBook sul sequenziamento a singola cellula](#). WTA, amplificazione dell'intero trascrittoma; BD, Becton Dickinson; FACS, selezione cellulare attivata dalla fluorescenza.

Tabella 2: processività del campione RNA-Seq a singola cellula sui sistemi di sequenziamento Illumina

Sistema di sequenziamento	Reagenti per il sequenziamento	N. di campioni per cella a flusso ^a
NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System	P1 100 cycles	1 ^b
	P2 100 cycles	4
	P3 ^c 100 cycles	11-12
	P4 ^c 100 cycles	16-17
NovaSeq X Series ^d	1.5B 100 cycles	15
	10B 100 cycles	96
	25B 300 cycles	250

- a. Calcolato per 5.000 cellule per campione e 20.000 coppie di letture per cella; include 38 cicli aggiuntivi per supportare gli identificatori molecolari univoci (UMI, unique molecular identifier). Il numero di cellule per campione e le coppie di letture per cella dipendono dall'applicazione e dal tipo di campione desiderati.
- b. I reagenti P1 sono una buona soluzione per gli esperimenti di controllo qualità.
- c. I reagenti P3 e P4 sono disponibili solo per il NextSeq 2000 System.
- d. Il NovaSeq X Plus System può gestire corse a singola cella a flusso o a doppia cella a flusso. Il NovaSeq X System può gestire corse a singola cella a flusso.

Maggiori informazioni grazie alla chimica XLEAP-SBS

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sono basati sulla chimica XLEAP-SBS che è, ad oggi, la chimica SBS di Illumina più veloce e più efficace in grado di fornire la massima qualità. Basata sulle comprovate fondamenta della chimica SBS di Illumina standard, la chimica XLEAP-SBS offre una migliore stabilità dei reagenti con tempi di integrazione due volte più rapidi. Per scRNA-Seq, questo si traduce in stime di variazione più accurate e in una sensibilità superiore quando si rilevano geni, trascritti e codici a barre a singola cellula. Con il massimo output di lettura e il minimo prezzo per milione di letture di qualsiasi sistema di sequenziamento da banco Illumina, NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System consentono ai ricercatori di accedere a:

- Più letture per cella per acquisire informazioni sui trascritti con abbondanza inferiore
- Più cellule e campioni per potenziare i progetti sperimentali entro un determinato budget di ricerca
- Condizioni, punti temporali o metodi aggiuntivi per studiare sfaccettature più complesse della biologia

Flessibilità dell'utilizzo di applicazioni diverse

Oltre a scRNA-Seq, NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offrono un'ampia flessibilità di utilizzo di applicazioni diverse, consentendo ai ricercatori di passare facilmente da un progetto di sequenziamento all'altro. I sistemi sono compatibili con un'ampia gamma di kit di preparazione delle librerie di Illumina e di terze parti, consentendo un facile passaggio tra RNA-Seq in massa di Illumina, scRNA-Seq, sequenziamento dell'esoma e altre applicazioni. Le informazioni multiomiche sono più accessibili con l'output più elevato delle celle a flusso P4. Ad esempio, i ricercatori possono associare scRNA-Seq al sequenziamento dell'esoma su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System per valutare se le varianti codificanti influiscono sull'espressione del trascritto o eseguire ATAC-Seq^{*} per analizzare l'accessibilità della cromatina e caratterizzare meglio la regolazione funzionale.

Ottimizzazione dell'analisi dei dati a singola cellula

I dati di sequenziamento generati con NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System sono disponibili in formati standardizzati compatibili con un ampio ecosistema di strumenti software di sequenziamento a singola cellula commerciali e open-source, inclusi software commerciali come Cell Ranger (10x Genomics) e SeqGeq (FlowJo/BD Biosciences) e strumenti open-source come Seurat¹ e Monocle.²

L'analisi dei dati scRNA-Seq può essere eseguita utilizzando gli strumenti Illumina come l'analisi secondaria DRAGEN[†],[†] una suite di pipeline di analisi dei dati accurate, complete ed efficienti. NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System offrono la pipeline DRAGEN Single-Cell come pipeline di analisi dei dati integrata, in grado di accelerare l'analisi dei dati, migliorare l'accuratezza con la correzione degli errori e supportare vari progetti di codici a barre personalizzati per consentire nuovi metodi a singola cellula. La pipeline DRAGEN Single-Cell può anche essere lanciata sul cloud in BaseSpace™ Sequence Hub o Illumina Connected Analytics. Oltre a scRNA-Seq, Illumina offre un'ampia gamma di strumenti software di analisi dei dati commerciali e open-source per supportare ulteriori metodi necessari per completare un progetto di ricerca.

* ATAC-Seq, saggio per la cromatina accessibile alla trasposasi con sequenziamento.

† L'hardware DRAGEN è incluso nel NextSeq 1000 System e nel NextSeq 2000 System. Una licenza DRAGEN è inclusa nello strumento e non deve essere acquistata separatamente.

Assistenza tecnica completa di Illumina

Illumina mette a disposizione il suo team di assistenza di massimo livello composto da ricercatori esperti nella preparazione delle librerie, nel sequenziamento e nell'analisi. Questo team dedicato include tecnici dell'assistenza in loco (FSE, field service engineer) altamente qualificati, scienziati delle applicazioni tecniche (TAS, technical applications scientist), tecnici delle applicazioni in loco (FAS, field applications scientist), ingegneri per il supporto dei sistemi, bioinformatici ed esperti di reti IT, tutti formati in modo approfondito sulla tecnologia NGS e sulle applicazioni che i clienti di Illumina utilizzano in tutto il mondo. L'[assistenza tecnica](#) è disponibile telefonicamente cinque giorni la settimana oppure online 24/7 in tutto il mondo e in diverse lingue.

Grazie a questo eccezionale servizio di assistenza, Illumina aiuta gli utenti a massimizzare l'efficacia dei loro NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System, formare i nuovi dipendenti e apprendere le tecniche più recenti e le migliori pratiche.

Riepilogo

NextSeq 1000 Sequencing System e NextSeq 2000 Sequencing System offrono una soluzione flessibile per scRNA-Seq, fornendo una visualizzazione chiara e completa del trascrittoma su singola cellula e consentendo ai laboratori di espandere il set di strumenti a loro disposizione. Le diverse configurazioni delle celle a flusso consentono ai ricercatori di regolare le celle in base all'esperimento e le coppie di letture per cella in base alle loro esigenze. Combinando la potenza, la velocità e la flessibilità di NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System con un ampio ecosistema di soluzioni software e di preparazione delle librerie, l'scRNA-Seq su NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System consente ai ricercatori di accedere a una comprensione più approfondita del trascrittoma con la risoluzione a singola cellula.

Maggiori informazioni

[Sequenziamento di RNA di singole cellule](#)

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

[Analisi secondaria DRAGEN](#)

[Dati demo su BaseSpace Sequence Hub](#)

Bibliografia

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.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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. I kit di reagenti XLEAP-SBS per gli strumenti NextSeq 1000 e NextSeq 2000 vengono spediti e conservati alla stessa temperatura dei kit di reagenti SBS standard.

b. I reagenti XLEAP-SBS per le celle a flusso P1, P2 e P3 sono disponibili nel 2° trimestre del 2024.

c. Per l'analisi di controllo qualità (QC, quality control).



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-00478 ITA v3.0