

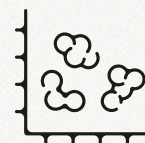
illumina Single Cell 3' RNA Prep

利用しやすく拡張性の高いscRNA-Seq

どんな経験値の方も完了できる、シンプルで手頃な価格の
ベンチトップワークフロー

より多くの遺伝子と転写産物を検出できる高いアッセイ感度

最大数十万個の細胞をコスト効率良く処理し、
希少な細胞タイプを解明



はじめに

シングルセルRNAシーケンス (scRNA-Seq) は、シングルセルキャプチャーとバーコーディングを次世代シーケンサー (NGS) と組み合わせることにより、複雑な組織に対して高解像度の見解を提供します。scRNA-Seqを使用することで、不均一な細胞集団を研究し、希少な細胞タイプを発見し、細胞レベルで疾患や発達のプロセスを解明することができます。しかし、特殊な装置への投資の必要性、試薬コストの高さ、限られた拡張性により、シングルセルシーケンスの幅広い導入には時間を要しています。これを変えるのがIllumina Single Cell 3' RNA Prepです。

Illumina Single Cell 3' RNA Prep^{*} は複雑なワークフローやマイクロフルイデクスなしで、シングルセルmRNAのキャプチャー、バーコード化、ライブラリー調製を行います。イルミナのシーケンスとインフォーマティクスソリューションとを組み合わせることで、Illumina Single Cell 3' RNA Prepは簡単に拡張性のあるワークフローを提供し (図1)、これにより多くのラボで高性能なscRNA-Seqを利用できるようになります。

アクセスしやすいワークフロー

Illumina Single Cell 3' RNA Prepワークフローは実装が簡単で、高価なマイクロフルイデクス装置や手間のかかるプロトコールは必要ありません。¹ 柔軟なストップポイントのあるシンプルな手作業のワークフローを使用して、ベンチトップでシングルセル研究を実施

* Illumina Single Cell 3' RNA Prepの旧名称はFluent PIPseq V 3' Single Cell RNA Kitです。

できます。本アッセイは、タイムコースで採取されたサンプルや輸送が必要なサンプルの場合、サンプル処理前のDSPメタノール固定法[†]に対応しているため、scRNA-Seq実験の有用性を拡大します。

アッセイの仕組み

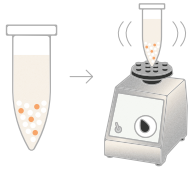
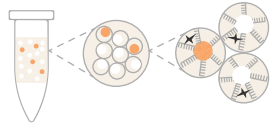
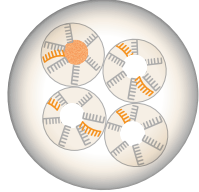
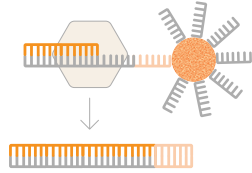
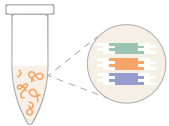


Illumina Single Cell 3' RNA Prepは新しいPIPseqTMケミストリーを使用し、シンプルで拡張性のあるシングルセルmRNAキャプチャーとバーコーディングを行います (図2)。¹ パーティクルテンプレートインスタントパーティション (PIP) は、ハイドロゲルビーズに結合したバーコード付きオリゴヌクレオチドを含むテンプレート粒子による乳化を利用しています。サンプル調製中に対象の細胞懸濁液をテンプレート粒子とオイルとともに混合し、ボルテックスすることでテンプレートエマルジョンに分離します。次に、エマルジョン内の細胞を溶解し、バーコード付きテンプレートでmRNAをキャプチャーします。エマルジョンを破壊し、キャプチャーされたmRNAから逆転写を介してcDNAを生成し、増幅して個々の細胞ごとのcDNAライブラリーを作成します。このシングルセルcDNAライブラリーは、標準的なライブラリー調製方法を使用してシーケンスライブラリーに処理し、NGSでシーケンスします。シーケンスデータは、DRAGENTM Single CellパイプラインとPartekTM Flowソフトウェアを使用して解析します。

† DSP: ジチオビス (スクシンイミジルプロピオナート)。

図1: Illumina Single Cell 3' RNAワークフロー



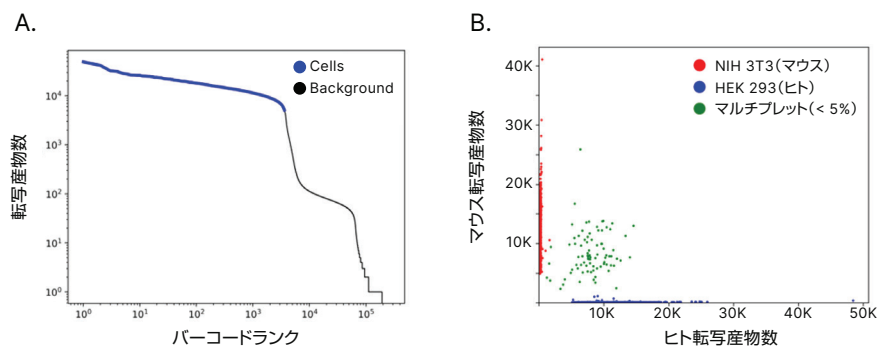
図2: PIPseqケミストリーによるシングルセルmRNAキャプチャーとバーコーディング

Illumina Single Cell 3' RNAによるキャプチャーとバーコーディング				イルミナシングルセルライブラリー調製
ステップ01 細胞懸濁液の調製 	ステップ02 PIPにおける細胞キャプチャー 	ステップ03 溶解とmRNAキャプチャー 	ステップ04 cDNA合成 	ステップ05 ライブラリー調製 
DRAGEN Single Cell Partek Flow		<p>サンプル調製では、対象の細胞懸濁液をテンプレート粒子とオイルとともに混合し、ボルテックスすることでエマルジョンに分離します。エマルジョン内の細胞を溶解し、テンプレート粒子に組み込まれたバーコードオリゴヌクレオチドによってmRNAをキャプチャーします。キャプチャーされたmRNAを逆転写し、限定サイクルPCR、断片化、アダプターライゲーション、増幅によってcDNAライブラリーを生成します。シーケンス後、データはDRAGEN Single CellパイプラインとPartek Flowソフトウェアを使用して解析します。解析ソフトウェアは、サマリーマトリクス、クラスタリングプロット、差次的発現遺伝子表、および標準的なフィーチャー・バーコードマトリクスを生成します。</p>		
ステップ06 シーケンス 	ステップ07 データ解析 			

高品質な性能

Illumina Single Cell 3' RNA Prepは、転写産物と遺伝子について高い感度を備えた高品質データを提供します(図3、図4、表1)。穏やかに分離する技術は、他の方法では見逃されがちな脆弱な細胞を検出するのに役立ちます。PIPseqケミストリーの最新バージョンは周囲のRNAバックグラウンドを低減し、特定の細胞タイプの遺伝子と転写産物の感度を30%向上²、シーケンスアーティファクトを削減し、より多くの使用可能なNGSデータを生成します。

図3: 高解像度scRNA-SeqはシングルセルからmRNAをキャプチャーします

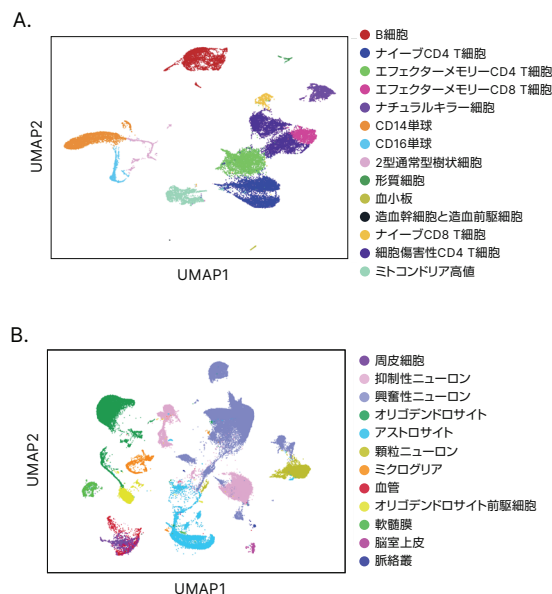


NIH3T3 (マウス) およびHEK 293 (ヒト) 細胞株の混合培養による (A) バーコードランクプロットと (B) パーンヤード散布図。Illumina Single Cell 3' RNA Prep T2キットを使用して、4,106個の細胞が検出され、捕捉率は80%、マルチプレット(同じ反応で2つ以上の細胞)は5%未満でした。

柔軟で拡張性のあるソリューション

Illumina Single Cell 3' RNA Prepのシンプルなボルテックスペースの方法は、コスト効率が良く、拡張性があります。細胞数が多い場合は、容量の大きいPIPチューブを使用します。¹ 数百から数十万の広範囲な細胞を処理できるため、パイロットプロジェクトや細胞多様性の低いプロジェクトから複雑な組織解析まで、研究アプリケーションのニーズに対応します。¹ 現在のキット構成では、サンプルあたり最大2,000細胞 (T2キット)、サンプルあたり最大1万細胞 (T10キット)、サンプルあたり最大2万細胞 (T20キット)、またはサンプルあたり最大10万細胞 (T100キット) をプロファイリングできます。本アッセイの細胞スループットの向上により、希少な細胞タイプをより正確に検出できるようになります (図5)。96個のユニークデュアルインデックスが利用可能で、サンプルのマルチプレックスにより、多数のサンプルのランを並列に実行できます (表2)。

図4: 実験規模とアプリケーションに適する高解像度scRNA-Seq



(A) 凍結保存されたヒト末梢血単核細胞 (PBMC) のUniform manifold approximation and projection (UMAP)。Illumina Single Cell 3' RNA Prep T20キットを使用して31,613個の細胞が検出され、捕捉率は79%でした。(B) 凍結組織からのマウス脳核のUMAP。Illumina Single Cell 3' RNA Prep T100キットを使用して155,000個の核が検出され、捕捉率は78%でした。

表1: イルミナシーケンスシステムにおけるIllumina Single Cell 3' RNA Prepの検証済み性能

細胞タイプ	キットサイズ	シーケンスシステム	サイズ	リード	細胞	細胞あたりのリード数
HEK/3T3	T2	NextSeq 2000システム	9.8 Gb	1.4億	3,611	38,633
HEK/3T3	T10	NextSeq 2000システム	23.6 Gb	3.33億	10,723	31,140
PBMC	T10	NovaSeq 6000システム	390 Gb	27億	14,307	190,526
PBMC	T20	NovaSeq X Plusシステム	81.3 Gb	6.74億	31,613	21,314
マウス肺核	T20	NextSeq 2000システム	8.9 Gb	1.31億	2,768	47,276
マウス脳核	T20	NextSeq 2000システム	10.4 Gb	1.55億	2,019	76,784
マウス脳核 (固定)	T20	NextSeq 2000システム	39.5 Gb	5.9億	34,596	17,041
マウス脳核	T100	NextSeq 2000システム	176.6 Gb	26億	155,000	17,068

シングルセルアプリケーション

Illumina Single Cell 3' RNA Prepの使いやすさ、精度、感度により、新たな研究と発見が可能になります。より多くの細胞を処理することで、正常状態と疾患状態の細胞アトラスプロジェクトが加速し、ゲノム規模の機能ゲノミクスのスクリーニングが強化されます。scRNA-Seqをより広く採用することで、がん、免疫学、神経科学、その他の複雑な疾患を研究するラボにとっては特に有益となります。³⁻⁹

神経科学のためのscRNA-Seq

神経組織は、生物の生涯を通じて継続的に再編成され再構築される多様な細胞タイプの複雑な組織で構成されています。scRNA-Seqは、転写感度から神経細胞集団の真の多様性を分類する貴重なツールであり、以下のような洞察を提供します。

- 神経発達疾患および神経変性疾患⁹
- これまで知られていなかった特定の神経細胞集団の役割⁹
- 神経免疫細胞が疾患と発達に与える影響¹⁰

がん研究のためのscRNA-Seq

がんは複雑な細胞集団が関与する動的かつ多様な疾患です。がんを引き起こす細胞の種類と変異を理解するには、高度な方法が必要です。scRNA-Seqは、以下の用途に対する重要なツールとなっています。

- 腫瘍微小環境の不均一性の詳細解明^{4,5,11,12}
- 新規がんバイオマーカーの同定^{13,14}
- 免疫療法と薬剤耐性のメカニズムの理解³

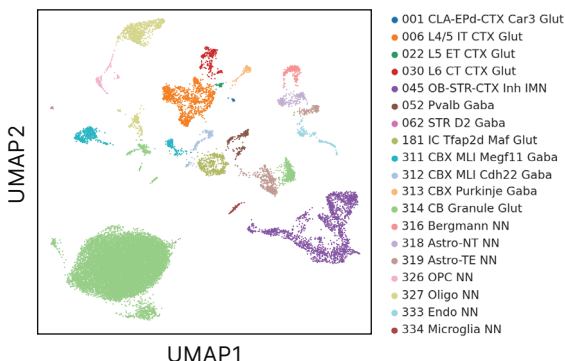
免疫学のためのscRNA-Seq

免疫系は、病原体を同定し、標的とし、排除するために協調して働く多様な細胞タイプの複雑な階層構造で構成されています。scRNA-Seqにより、次のことが可能になります。

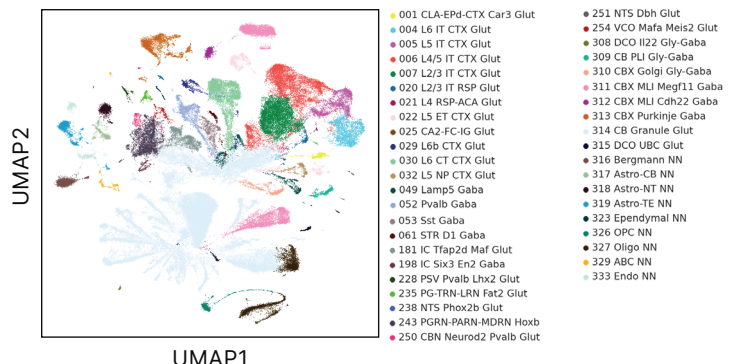
- 免疫細胞集団の発生と分化のパスウェイの理解¹⁵
- 免疫細胞集団の役割と機能の評価^{12,16}
- 病原体に対する免疫反応の研究⁶

図5: Illumina Single Cell 3' RNA Prepを用いた実験規模の拡大により、さらに多くの細胞タイプが明らかになります

A. マイクロフルイディクススペースのscRNA-Seq(2万細胞)



B. Illumina Single Cell 3' RNA Prep(> 12万細胞)



(A) 2万個の細胞に対するマイクロフルイディクススペースのscRNA-Seqにより、マウス脳核から19種類の異なる細胞タイプが同定されました。(B) 同じマウス脳核サンプル調製から採取した12万個以上の細胞に対するIllumina Single Cell 3' RNA Prepにより、42種類の異なる細胞タイプが同定されました。その内訳は、マイクロフルイディクススペースのscRNA-seqによって同定された19種類のうちの17種類と、さらに25種類の細胞タイプでした。

表2: Illumina Single Cell 3' RNA Prepのフローセルあたりのサンプルスループットの例^a

システム	NextSeq 550		NextSeq 1000/2000				NovaSeq 6000				NovaSeq X		
フローセル	Mid	High	P1	P2	P3 ^b	P4 ^b	SP	S1	S2	S4	15億	100億	250億
フローセルあたりの出力(リード数)	1.3億	4億	1億	4億	12億	18億	8億	16億	41億	100億	16億	100億	260億
キットサイズ	フローセルあたりのサンプル数												
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. インพุット細胞あたり2万リードを前提とした計算。T2では、サンプルあたり5,000個のインพุット細胞と1億リードが必要です。T10では、サンプルあたり1万7,000個のインพุット細胞と3.4億リードが必要です。T20では、サンプルあたり4万個のインพุット細胞と8億リードが必要です。T100では、サンプルあたり20万個のインพุット細胞と40億リードが必要です。

b. P3およびP4フローセルは、NextSeq 2000システムでのみ使用可能です。

c. Illumina Single Cell Unique Dual Indexesは、96サンプルに対して96のインデックスを提供します。個別のレーンにロードすることで、フローセルあたり96を超えるサンプルのランが可能で、NovaSeq 6000システムでの独立したレーンローディングには、NovaSeq 6000 Xpワークフローを使用します。

マルチオミクスアプリケーション

Illumina Single Cell 3' RNA Prepは、他のマルチオミクス測定に対応しています。^{1,17} 本アッセイは、キャプチャーされたmRNAをカスタムシングルセルアプリケーション用で再度調べることができます。逆転写中に生成されたcDNAはハイドロゲルビーズに結合したままであり、追加の濃縮または増幅反応に再利用できます。この実験的多様性により、他のシングルセルアプローチのような予算や技術的制約を受けることなく、より大規模で多様なマルチオミクス研究を実施できるようになります。

まとめ

シングルセルNGS解析は、がん研究、免疫学、神経科学などで新たな領域を発見する扉を開きます。Illumina Single Cell 3' RNA Prepは、利用しやすく拡張性の高いscRNA-Seqソリューションであり、初めての方でも経験豊富なシングルセル研究者でも、探索力を高めます。mRNAキャプチャー、バーコーディング、ライブラリー調製を含むシンプルな手作業ワークフローは、イルミナシーケンスシステムおよびデータ解析ソフトウェアとシームレスに統合します。Illumina Single Cell 3' RNA Prepは、高いパフォーマンスと使いやすさを提供し、scRNA-Seqの力をより多くのラボに提供します。

詳細はこちら →

[Illumina Single Cell 3' RNA Prep](#)

[シングルセルRNAシーケンス](#)

製品情報

製品	カタログ番号
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

参考文献

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

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

jp.illumina.com



www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2025 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. M-GL-03195 v1.0-JPN 10JAN2025

illumina®