

Sequenciamento de lâmina única e espacial em lâminas de fluxo NextSeq™ 1000 e NextSeq 2000 XLEAP-SBS™

Genômica de alta resolução
em um sistema de bancada
líder de mercado

Introdução

Sistemas biológicos complexos são determinados pelas funções coordenadas de lâminas individuais em tecidos organizados. Métodos convencionais que analisam amostras dissociadas em massa podem mascarar a heterogeneidade celular e as relações espaciais que proporcionam essa complexidade. O sequenciamento espacial e de lâmina única são métodos de sequenciamento de última geração (NGS) que fornecem uma visão de alta resolução da variação e organização de cada lâmina.

A 10x Genomics, parceira da Illumina, comercializou várias soluções de biologia espacial e de lâmina única. Esses produtos de preparação e análise de bibliotecas amplamente adotados dependem da precisão e simplicidade dos sistemas de sequenciamento da Illumina. O NextSeq 1000 System e o NextSeq 2000 System, com química XLEAP-SBS, são os sistemas de bancada ideais para estudos de lâmina única e espaciais, oferecendo flexibilidade, escalabilidade e alta qualidade de dados para corresponder à sensibilidade desses ensaios.

Sequenciamento de RNA de lâmina única e espacial

A determinação do perfil da expressão gênica no nível de lâmina única ou com contexto espacial preservado aumenta o poder de descoberta, ajudando a entender os mecanismos de desenvolvimento e doenças de forma mais profunda e precisa.

O sequenciamento de RNA de lâmina única (scRNA-Seq) usa o particionamento de lâminas e códigos de barras de oligonucleotídeos para examinar os transcriptomas de centenas a dezenas de milhares de lâminas individuais. Ao fornecer uma visão detalhada da variação de cada célula, o scRNA-Seq facilita a identificação de novos biomarcadores e tipos de células raras que, de outra forma, seriam perdidos com RNA-Seq em massa.^{1,2}

A transcriptômica espacial combina tecnologias de imagem e sequenciamento de alto rendimento para exibir a expressão de mRNA no nível celular em tecidos estruturalmente preservados. A visualização da morfologia do tecido sobreposta à atividade gênica pode ajudar os pesquisadores no entendimento da relação espacial entre as lâminas dentro dos tecidos normais e doentes.

As abordagens de sequenciamento espacial e de lâmina única podem ser aplicadas a modalidades além do RNA, incluindo DNA, epigenoma ou proteína. Por exemplo, a 10x Genomics oferece soluções multiômicas que combinam o scRNA-Seq com ensaios para acessibilidade à cromatina ou à expressão de proteínas. As soluções espaciais também podem medir a expressão de RNA e de proteínas conjuntamente.

NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System

O NextSeq 1000 System e o NextSeq 2000 System utilizam a química XLEAP-SBS, que é o processo químico de sequenciamento por síntese (SBS) mais rápido, da mais alta qualidade e mais completo da Illumina até o momento. Desenvolvida sobre a base comprovada do processo químico de SBS padrão Illumina, a química XLEAP-SBS oferece estabilidade aprimorada do reagente com tempos de incorporação duas vezes mais rápidos.³

O NextSeq 1000 System e o NextSeq 2000 System oferecem escalabilidade para acomodar uma ampla variedade de necessidades do projeto de lâmina única ou espacial, permitindo o ajuste de lâminas por amostra, leituras por lâmina e amostras por experimento ([Tabela 1](#), [Tabela 2](#)).^{*} Caso os pesquisadores queiram sequenciar mais profundamente para acessar transcrições de menor abundância ou sequenciar mais lâminas ou amostras, o NextSeq 1000 System e o NextSeq 2000 System oferecem uma solução acessível para sequenciamento e análise primária em um sistema de bancada. Com quatro tipos de lâminas de fluxo disponíveis, os pesquisadores têm flexibilidade para usar vários métodos de análise de NGS e acomodar vários desenhos experimentais.

Esta nota técnica demonstra a sinergia de uso do NextSeq 1000 System e do NextSeq 2000 System para soluções de lâmina única e espaciais da 10x Genomics, em vários tipos de bibliotecas e produção de lâminas de fluxo. Também comparamos o desempenho da química XLEAP-SBS com a química de SBS padrão e fornecemos orientação sobre a configuração de corrida, o desempenho esperado do sequenciamento e métricas de análise de exemplo.

Métodos

Ensaio scRNA-Seq

Os ensaios Chromium Single Cell Gene Expression da 10x Genomics oferecem uma solução simplificada para scRNA-Seq. A tecnologia GEM-X melhora o desempenho e aumenta a eficiência do fluxo de trabalho dos ensaios Chromium, ao mesmo tempo em que fornece uma expressão gênica de transcriptoma 3' de lâmina única e recursos multiômicos. O ensaio Chromium Gene Expression Flex permite a determinação do perfil de expressão gênica de milhares de centenas de milhares de lâminas fixas ou núcleos com um método sensível baseado em sonda. Um experimento típico de scRNA-Seq com ensaios de lâmina única Chromium segue um fluxo de trabalho de preparação de amostras, particionamento e codificação por código de barras de células, preparação de bibliotecas, sequenciamento e análise ([Figura 1](#)).

^{*} Para ensaios de biologia espacial, os projetos são medidos em relação a pontos de tecido e áreas de captura em vez de lâminas.

Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

As amostras para scRNA-Seq foram preparadas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas criopreservadas. As bibliotecas de lâmina única foram preparadas através dos kits de reagentes Chromium GEM-X Single Cell 3' v4 (10x Genomics, n.º de catálogo PN-1000691) seguindo o protocolo no guia do usuário (10x Genomics, Documento n.º CG000731, Rev A).⁴ O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com kits de reagentes NextSeq 2000 XLEAP-SBS P4 (100 cycles) (Illumina, n.º de catálogo 20100994). Para comparação, as mesmas bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 2000 System com NextSeq 2000 P3 standard SBS reagent kit (100 cycles) (Illumina, n.º do catálogo 20040559). As configurações de corrida foram definidas de acordo com os parâmetros fornecidos pela 10x Genomics: leitura 1 de 28 ciclos, leituras de índice i7 e i5 de 10 ciclos e leitura 2 de 90 ciclos. A concentração de carga para reagentes XLEAP-SBS e SBS padrão foi de 650 pM e 1% de PhiX foi adicionado. A análise de dados foi realizada usando pipeline Cell Ranger v8.0.0 (10x Genomics).

Chromium Single Cell Gene Expression Flex

As amostras foram preparadas a partir de PBMCs humanas criopreservadas. As células foram fixadas através do Chromium Next GEM Single Cell Fixed RNA Sample Preparation Kit (10x Genomics, n.º de catálogo PN-1000414) seguindo o protocolo demonstrado (10x Genomics, Documento n.º CG000478, Rev D).⁵ As bibliotecas foram preparadas com o Chromium Fixed RNA Kit, Human Transcriptome (10x Genomics, n.º de catálogo PN-1000476) seguindo o protocolo no guia do usuário (10x Genomics, Documento CG000527 Rev F).⁶ O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com química XLEAP-SBS em lâminas de fluxo P4 de 100 ciclos e química de SBS padrão em lâminas de fluxo P3 de 100 ciclos com a seguinte duração: leitura 1 de 28 ciclos, leituras de índice i7 e i5 de 10 ciclos e leitura 2 de 90 ciclos. A concentração de carga foi de 650 pM e 5% de PhiX foi adicionado. A análise de dados foi realizada através do pipeline Cell Ranger v7.1.0 (10x Genomics).

Tabela 1: exemplo de rendimento de amostra para ensaios de lâmina única Chromium no NextSeq 1000 System e no NextSeq 2000 System

Produto	Pares mínimos de leitura por célula ^a	Lâminas por amostra	N.º de amostras por corrida ^b para as lâminas de fluxo NextSeq 1000 e NextSeq 2000			
			P1 ^c	P2	P3 ^d	P4 ^d
Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4	20 mil	5 mil	1	4	12	18
Chromium Single Cell Gene Expression Flex – Multiplex	10 mil	5 mil	2	8	24	36

- a. Recomendações mínimas de leitura fornecidas como cortesia pela 10x Genomics. Ajuste a profundidade do sequenciamento para o desempenho ou aplicação necessária. A métrica e a curva de saturação do sequenciamento no resumo da corrida do Cell Ranger podem ser usadas para otimizar a profundidade do sequenciamento em tipos específicos de amostras.
- b. O número de amostras de lâmina única por corrida de sequenciamento se baseia na biblioteca de controle Illumina PhiX em densidades de cluster e concentração de carregamento compatíveis. Os parâmetros reais de desempenho podem variar com base no tipo de amostra, na qualidade da amostra e nos clusters que passam pelo filtro.
- c. As lâminas de fluxo P1 são uma boa opção para experimentos de controle de qualidade de lâmina única.
- d. As lâminas de fluxo P3 e P4 somente estão disponíveis no NextSeq 2000 System.



Figura 1: fluxo de trabalho do Chromium Single Cell Gene Expression - Experimentos típicos de scRNA-Seq seguem um fluxo de trabalho de preparação de amostras, particionamento de células e código de barras, preparação de bibliotecas, sequenciamento e análise de dados.

Ensaio Spatial RNA-Seq

Os ensaios Visium Spatial Gene Expression da 10x Genomics mapeiam todo o transcriptoma com contexto morfológico em tecidos fixados em formalina, embebidos em parafina (FFPE) e tecidos congelados a fresco. As áreas de captura de lâminas de tecido Visium v1 e v2 têm um array de aproximadamente 5.000 pontos com código de barras, 55 µm de diâmetro, com espaçamento de 100 µm. Por outro lado, as áreas de captura Visium HD de alta definição contêm uma grade contínua de quadrados com código de barras de área 2 × 2 µm, aproximadamente 11,2 milhões no total. Um experimento espacial típico de RNA-Seq com ensaios Visium Spatial segue um fluxo de trabalho de preparação de amostras de tecido, imagem, preparação de bibliotecas, sequenciamento e análise (Figura 2).

Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

Um bloco de FFPE cerebral de camundongo foi seccionado conforme descrito no protocolo demonstrado de preparação de tecido Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE (Genomics 10x, Documento n.º CG000518, RevD).⁷ A desparafinização, a coloração H&E, a geração de imagem e a reversão de reticulação seguiram esse protocolo demonstrado (10x Genomics, Documento n.º CG000520, Rev C)⁸ e o tecido foi transferido para uma lâmina Visium CytAssist Spatial Gene Expression através do instrumento CytAssist. As bibliotecas foram preparadas com o Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE (10x Genomics, Catálogo n.º PN-1000521) seguindo o protocolo no guia do usuário (10x Genomics, Documento n.º CG000495, Rev F).⁹ O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com tecnologia XLEAP-SBS

Tabela 2: exemplo de rendimento de amostras para ensaios espaciais Visium no NextSeq 1000 System e no NextSeq 2000 System

Produto	Tipo de amostra	Pares de leitura por ponto de tecido ^c	Leituras por seção de tecido ^c	N.º de áreas de captura por corrida ^{a,b} para lâminas de fluxo NextSeq 1000 e NextSeq 2000		
				P2	P3 ^d	P4 ^d
Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2 ^a	Tecido FFPE	25 mil	125 milhões	3	9	14
	Tecido congelado a fresco	50 mil	250 milhões	1	4	7
Visium HD Spatial Gene Expression ^b	Tecido FFPE	–	275 milhões	1	4	6
	Tecido congelado a fresco	–	700 milhões	–	1	2

- a. Recomendações mínimas de leitura fornecidas como cortesia pela 10x Genomics. Rendimento da amostra calculado com base nos pares de leitura recomendados por ponto de tecido, 5.000 pontos de tecido por área de captura e média de 50% de cobertura da área de captura por seção de tecido. As lâminas Visium Spatial Gene Expression para tecido congelado a fresco têm quatro áreas de captura para corrida de até quatro seções de tecido por lâmina. As lâminas Visium Spatial Gene Expression para tecido FFPE têm duas áreas de captura para corrida com até duas seções de tecido por lâmina.
- b. Rendimento da amostra calculado com base em 275 milhões de leituras (para tecidos FFPE) ou 700 milhões de leituras (para tecidos congelados a fresco) por área de captura totalmente coberta por seção de tecido (ou em proporção à área de captura coberta pela seção de tecido). As lâminas Visium HD Spatial Gene Expression contêm uma grade contínua de quadrados com área de 2 × 2 µm com código de barras.
- c. Recomendações mínimas de leitura fornecidas como cortesia pela 10x Genomics. A orientação de profundidade de leitura do Visium HD para tecido congelado a fresco é usada apenas para referência e ainda não foi validada no NextSeq 2000 System com química XLEAP-SBS.
- d. As lâminas de fluxo P3 e P4 somente estão disponíveis no NextSeq 2000 System.



Figura 2: fluxo de trabalho do Visium Spatial Gene Expression - Experimentos espaciais típicos de RNA-Seq seguem um fluxo de trabalho de preparação de amostras de tecido, geração de imagens, preparação de bibliotecas, sequenciamento e análise de dados.

em lâminas de fluxo P4 de 100 ciclos e química de SBS padrão em lâminas de fluxo P3 de 100 ciclos com a seguinte duração: leitura 1 de 28 ciclos, leituras de índice i7 e i5 de 10 ciclos e leitura 2 de 90 ciclos. A concentração de carga foi de 650 pM e 1% de PhiX foi adicionado. A análise de dados foi realizada através do Space Ranger pipeline v2.0 (10x Genomics).

Visium HD Spatial Gene Expression

Um bloco de FFPE embrionário de camundongo foi seccionado, desparafinado, tingido com a coloração H&E e sua imagem foi gerada conforme o manual de preparação de tecido Visium HD FFPE (10x Genomics, Documento n.º CG000684, Rev A). A hibridização de sondas, a ligação de sondas, a preparação de lâminas, a liberação de sondas, a extensão e a construção de bibliotecas foram feitas com o Visium HD Reagent Kit (10x Genomics, n.º de catálogo PN-1000668) seguindo o protocolo no guia do usuário (10x Genomics, Documento n.º CG000685, Rev A).¹⁰ O sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 System com química XLEAP-SBS em lâminas de fluxo P4 de 100 ciclos e química de SBS padrão em lâminas de fluxo P3 de 100 ciclos com a seguinte duração: leitura 1 de 43 ciclos, leituras de índice i7 e i5 de 10 ciclos e leitura 2 de 50 ciclos. A concentração de carga foi de 650 pM e 1% de PhiX foi adicionado. A análise de dados foi realizada com o Space Ranger pipeline v3.0 (10x Genomics).

Resultados

O sequenciamento de bibliotecas Chromium de lâmina única ou bibliotecas espaciais Visium com química XLEAP-SBS de alto desempenho no NextSeq 1000 System e no NextSeq 2000 System forneceu resultados comparáveis ao química de SBS padrão, permitindo uma maior saída de dados e tempos de corrida mais rápidos (Tabela 3).

Ensaio scRNA-Seq

Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

Os resultados demonstram alta concordância de dados entre a química XLEAP-SBS e a química de SBS padrão para bibliotecas Chromium scRNA-Seq. Para métricas primárias, há uma melhora de aproximadamente 2% no percentual no filtro de passagem de clusters (% PF) e nas pontuações Q30 (Tabela 4). Em relação a métricas de sequenciamento, há uma melhora de 2% nas bases de Q30 sobre leituras de código de barras e RNA e uma melhora de 4% nas bases de Q30 sobre identificadores moleculares exclusivos (UMI) (Tabela 5). A visualização da classificação do tipo de célula por gráfico t-SNE mostra resultados comparáveis para ambos os conjuntos de dados (Figura 3A).

Tabela 3: orientação de carregamento e resultado esperado das métricas de corrida para as lâminas de fluxo NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS em comparação com as lâminas de fluxo SBS padrão NextSeq 2000 P3

Produto	Configuração de sequenciamento (R1, i7, i5, R2)	Concentração de carregamento da biblioteca	Percentual de entrada de PhiX	Percentual de PhiX alinhado ^a	Percentual de cluster PF P4 XLEAP-SBS ^b	Percentual de cluster SBS padrão PF P3 ^b
Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4	28, 10, 10, 90	650 pM	1%	0,4%	77,4%	75,8%
Chromium Single Cell Gene Expression Flex – Multiplex	28, 10, 10, 90	650 pM	5%	2,7%	88,9%	84,4%
Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2	28, 10, 10, 90	650 pM	1%	0,9%	87,8%	78,3%
Visium HD Spatial Gene Expression	43, 10, 10, 50	650 pM	1%	0,5%	89,2%	72,2%

a. Valores percentuais de PhiX alinhados mostrados para as lâminas de fluxo NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS. Consulte as Tabelas 4, 6, 8 e 10 para obter valores de lâmina de fluxo SBS padrão NextSeq 2000 P3 em relação à porcentagem alinhada de PhiX. A variação no percentual alinhado de PhiX está dentro da variação normal de cada corrida.
 b. % PF, percentual de clusters que passam pelo filtro.

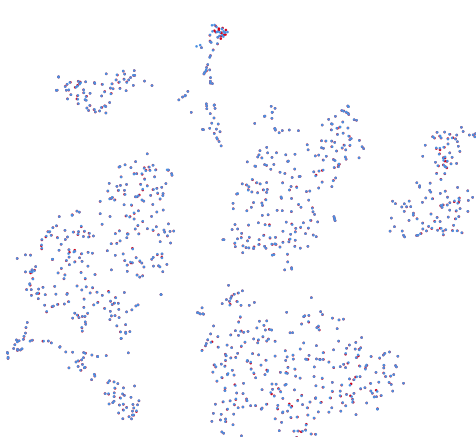
Tabela 4: métricas primárias para o Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Configuração da corrida	28, 10, 10, 90	28, 10, 10, 90
Rendimento	244,89 Gb	172,07 Gb
Concentração de carga	650 pM	650 pM
% PF	77,4%	75,8%
Percentual alinhado de PhiX	0,4%	1,9%
Leitura 1 bases ≥ Q30	96,3%	93,7%
Leitura 2 bases ≥ Q30	94,2%	92,3%
Taxa de erro de leitura 1	0,07%	0,07%
Taxa de erro de leitura 2	0,16%	0,16%
N.º estimado de lâminas por amostra	1.077	1.072
N.º de genes detectados	26.825	26.312
Contagens médias de UMI por lâmina	22.683	21.174

Tabela 5: métricas da corrida de sequenciamento para o Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Códigos de barras válidos	95,7%	95,7%
Leituras mapeadas com alto nível de confiança para regiões exônicas	57,2%	57,0%
Leituras mapeadas com alto nível de confiança para transcriptomas	70,7%	70,6%
Leituras de fração em lâminas	96,9%	96,9%
Bases de Q30 em código de barras	96,2%	93,9%
Bases de Q30 em leituras de RNA	95,8%	93,6%
Bases de Q30 em UMI	96,9%	93,0%

A. Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4



B. Chromium Single Cell Gene Expression Flex

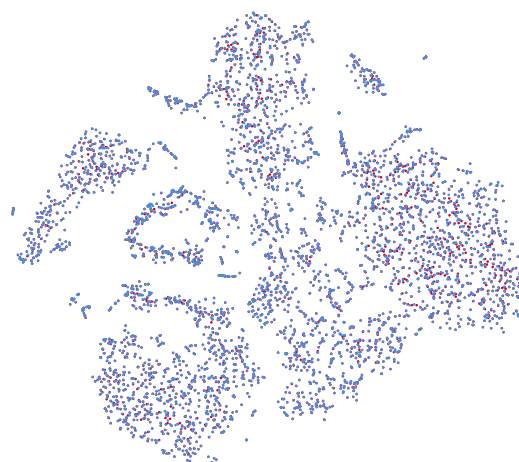


Figura 3: chromium Single Cell Gene Expression no NextSeq 2000 System - Visualização da classificação do tipo de lâmina com gráficos de incorporação estocástica de vizinhança t-distribuída (t-SNE) para (A) Chromium GEM-X Single Cell 3' Gene Expression v4 e (B) Chromium Single Cell Gene Expression Flex, sequenciados no NextSeq 2000 System com a lâmina de fluxo NextSeq 2000 P4 e tecnologia XLEAP-SBS (azul) e lâmina de fluxo NextSeq 2000 P3 com química de SBS padrão (laranja). Observe que os pontos azuis e laranja podem ser difíceis de distinguir devido à sobreposição de dados.

Chromium Single Cell Gene Expression Flex

Os resultados demonstram alta concordância de dados entre a química XLEAP-SBS e a química de SBS padrão para bibliotecas Chromium Flex scRNA-Seq. Em relação a métricas primárias, há uma melhora de aproximadamente 5% no percentual de PF (Tabela 6). O aumento no percentual de PF significa que um número maior de bases passou pelo filtro, aumentando assim a saída da lâmina de fluxo. As métricas de sequenciamento e os gráficos t-SNE mostram resultados comparáveis entre os conjuntos de dados (Tabela 7, Figura 3B).

Ensaio Spatial RNA-Seq

Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

Os resultados demonstram alta concordância de dados entre a química XLEAP-SBS e a química de SBS padrão para bibliotecas Visium Spatial RNA-Seq. Em relação a métricas primárias, há uma melhora de aproximadamente 12% no percentual de PF (Tabela 8). As métricas de sequenciamento e a visualização da expressão gênica espacial mostram resultados comparáveis entre conjuntos de dados (Tabela 9, Figura 4).

Visium HD Spatial Gene Expression

Os resultados demonstram alta concordância de dados entre a química XLEAP-SBS e a química de SBS padrão para bibliotecas Visium HD Spatial RNA-Seq. Em relação a métricas primárias, há uma melhora de aproximadamente 23% no percentual de PF (Tabela 10). Em relação a métricas de sequenciamento, há uma melhora de 2% nas bases de Q30 sobre leitura de código de barras e RNA e nas bases de Q30 sobre UMI (Tabela 11). A visualização da expressão gênica espacial apresentou contagens de UMI mais altas para dados gerados com a química XLEAP-SBS (Figura 5).

Tabela 6: métricas primárias para o Chromium Single Cell Gene Expression Flex

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Configuração da corrida	28, 10, 10, 90	28, 10, 10, 90
Rendimento	281,25 Gb	191,85 Gb
Concentração de carga	650 pM	650 pM
% PF	88,9%	84,4%
Percentual alinhado de PhiX	2,7%	1,8%
Leitura 1 bases ≥ Q30	97,3%	95,9%
Leitura 2 bases ≥ Q30	73,8%	74,5%
Taxa de erro de leitura 1	0,06%	0,05%
Taxa de erro de leitura 2	12,02%	12,24%
N.º estimado de lâminas por amostra	4.033	4.015
N.º de genes detectados	13.717	13.686
Contagens médias de UMI por lâmina	5.809	5.472

Tabela 7: métricas de corrida do sequenciamento para o Chromium Single Cell Gene Expression Flex

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Códigos de barras válidos	97,0%	95,3%
Leituras mapeadas com alto nível de confiança em lâminas	96,3%	96,2%
Leituras de fração mapeadas com alto nível de confiança para o conjunto de sondas filtradas	94,9%	94,9%
Bases de Q30 em código de barras	95,7%	94,8%
Bases de Q30 na leitura da sonda	91,9%	92,0%
Bases de Q30 em UMI	98,0%	96,4%

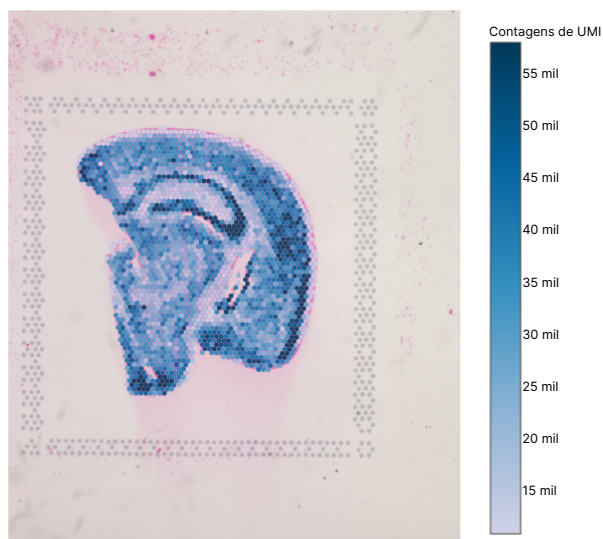
Tabela 8: métricas primárias para o Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Configuração da corrida	28, 10, 10, 90	28, 10, 10, 90
Rendimento	277,89 Gb	177,56 Gb
Concentração de carga	650 pM	650 pM
% PF	87,8%	78,3%
Percentual alinhado de PhiX	0,9%	1,4%
Leitura 1 bases ≥ Q30	97,2%	96,3%
Leitura 2 bases ≥ Q30	75,0%	70,1%
Taxa de erro de leitura 1	0,06%	0,04%
Taxa de erro de leitura 2	3,99%	11,72%
N.º de genes detectados	19.358	19.354
Contagens medianas de UMI por ponto	180.374	119.010

Tabela 9: métricas de corrida do sequenciamento para o Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Códigos de barras válidos	99,1%	99,1%
UMIs válidos	99,5%	100,0%
Leituras de fração em pontos sob o tecido	91,4%	91,4%
Leituras de fração mapeadas com alto nível de confiança para o conjunto de sondas filtradas	92,8%	92,6%
Bases de Q30 em código de barras	97,3%	96,5%
Bases de Q30 em leituras de RNA	97,3%	94,6%
Bases de Q30 em UMI	97,7%	96,6%

A. Lâmina de fluxo NextSeq 2000 P4 com tecnologia XLEAP-SBS



B. Lâmina de fluxo NextSeq 2000 P3 com tecnologia SBS padrão

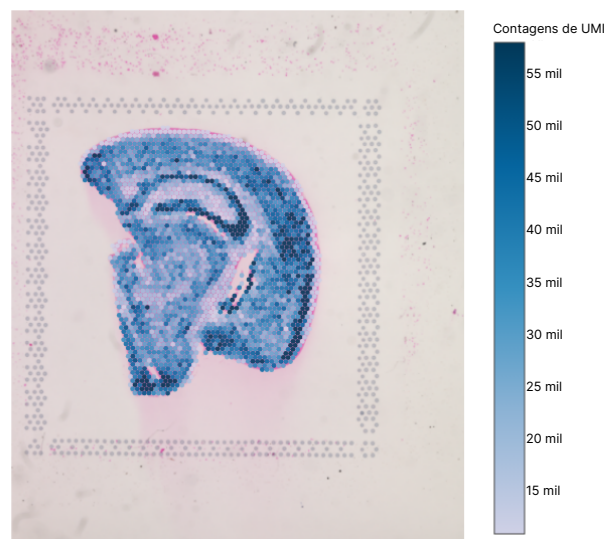


Figura 4: visium Spatial Gene Expression for FFPE no NextSeq 2000 System - Visualização da expressão gênica no contexto da arquitetura de tecido para seções de tecido FFPE do cérebro de camundongo através do Visium CytAssist Spatial Gene Expression v2, sequenciadas no NextSeq 2000 System com (A) lâmina de fluxo NextSeq 2000 P4 com tecnologia XLEAP-SBS e (B) lâmina de fluxo NextSeq 2000 P3 com química de SBS padrão. Os gráficos de tecido são coloridos por contagem de UMI. A lâmina de fluxo P4 e a tecnologia XLEAP-SBS permitem a comparação de dados com contagens de UMI mais altas.

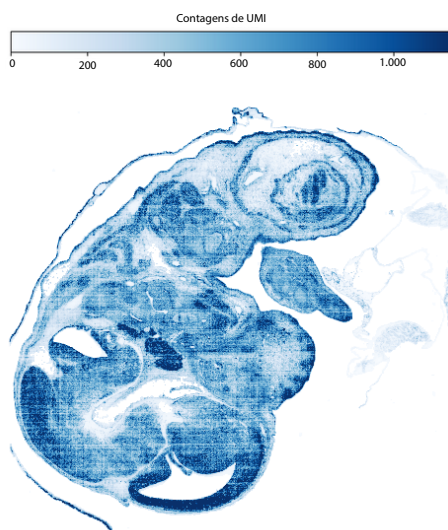
Tabela 10: métricas primárias para o Visium HD Spatial Gene Expression

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Configuração da corrida	43, 10, 10, 50	43, 10, 10, 50
Rendimento	228,07 Gbp	133,24 Gbp
Concentração de carga	650 pM	650 pM
% PF	89,2%	72,2%
Percentual alinhado de PhiX	0,5%	1,9%
Leitura 1 bases ≥ Q30	97,3%	95,6%
Leitura 2 bases ≥ Q30	96,7%	94,4%
Taxa de erro de leitura 1	0,09%	0,06%
Taxa de erro de leitura 2	0,10%	0,14%
N.º de genes detectados	19.038	19.036
Contagens medianas de UMI por recipiente de 8 µm	522,4	424,4

Tabela 11: métricas de corrida do sequenciamento para o Visium HD Spatial Gene Expression

	Química XLEAP-SBS P4	Química SBS padrão P3
Códigos de barras válidos	92,8%	93,3%
UMIs válidos	100,0%	99,7%
Leituras de fração mapeadas com alto nível de confiança para o conjunto de sondas filtradas	98,9%	98,7%
Bases de Q30 em código de barras	97,6%	95,5%
Bases de Q30 em leituras de RNA	97,1%	94,9%
Bases de Q30 em UMI	97,6%	95,9%

A. Lâmina de fluxo NextSeq 2000 P4 com tecnologia XLEAP-SBS



B. Lâmina de fluxo NextSeq 2000 P3 com tecnologia SBS padrão

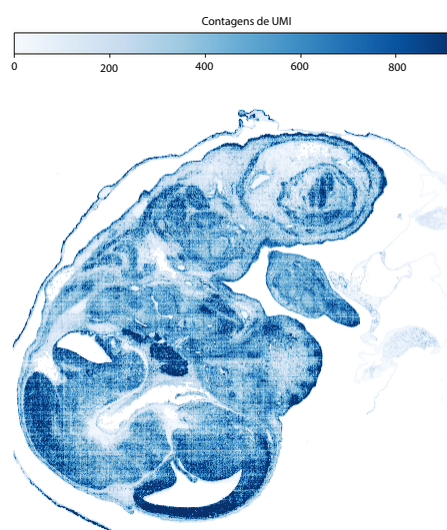


Figura 5: visium HD Spatial Gene Expression no NextSeq 2000 System - Visualização da expressão gênica no contexto da arquitetura do tecido para seções de tecido FFPE do embrião de camundongo através do Visium HD Spatial Gene Expression, sequenciadas no NextSeq 2000 System com (A) lâmina de fluxo NextSeq 2000 P4 com tecnologia XLEAP-SBS e (B) lâmina de fluxo NextSeq 2000 P3 com química de SBS padrão. Os gráficos de tecido são coloridos por contagem de UMI. A lâmina de fluxo P4 e a tecnologia XLEAP-SBS permitem a comparação de dados com contagens de UMI mais altas.

Resumo

Métodos de sequenciamento espacial e de lâmina única podem ajudar os pesquisadores na compreensão mais profunda de populações e tecidos celulares complexos. O NextSeq 1000 System e o NextSeq 2000 System, em sinergia com soluções de análise e preparação de biblioteca espacial e de lâmina única 10x Genomics, tornam esses métodos de NGS de alta resolução acessíveis para mais laboratórios. A química XLEAP-SBS de alto desempenho no NextSeq 1000 System e no NextSeq 2000 System oferece resultados comparáveis à química de SBS padrão, permitindo maior saída de dados e tempos de corrida mais rápidos para ensaios de expressão gênica de lâmina única e espaciais.

Saiba mais

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

[Chromium Single Cell Gene Expression](#)

[Visium Spatial Gene Expression](#)

Referências

1. Wang Y, Mashock M, Tong Z, et al. [Changing Technologies of RNA Sequencing and Their Applications in Clinical Oncology](#). *Front Oncol*. 2020;10:447. doi:10.3389/fonc.2020.00447
2. Ke M, Elshenawy B, Sheldon H, Arora A, Buffa FM. [Single cell RNA-sequencing: A powerful yet still challenging technology to study cellular heterogeneity](#). *Bioessays*. 2022;44(11):e2200084. doi:10.1002/bies.202200084
3. Illumina. [NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems](#). [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008.pdf](#). Publicado em 2020. Atualizado em 2024. Acessado em 4 de novembro de 2024.
4. 10x Genomics. [Chromium GEM-X Single Cell 3' Reagent Kits v4 User Guide, CG000731, Rev A](#). [10xgenomics.com/support/single-cell-gene-expression/documentation/steps/library-prep/chromium-gem-x-single-cell-3-v4-gene-expression-user-guide](#). Acessado em 26 de agosto de 2024.
5. 10x Genomics. [Fixation of Cells & Nuclei for Chromium Fixed RNA Profiling, CG000478, Rev D](#). [10xgenomics.com/support/single-cell-gene-expression-flex/documentation/steps/sample-prep/fixation-of-cells-and-nuclei-for-chromium-single-cell-gene-expression-flex](#). Acessado em 19 de setembro de 2024.
6. 10x Genomics. [Chromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits for Multiplexed Samples User Guide, CG000527, Rev F](#). [10xgenomics.com/support/single-cell-gene-expression-flex/documentation/steps/library-prep/chromium-single-cell-gene-expression-flex-reagent-kits-for-multiplexed-samples](#). Acessado em 26 de agosto de 2024.
7. 10x Genomics. [Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE – Tissue Preparation Guide Demonstrated Protocol, CG000518, Rev D](#). [10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/tissue-prep/visium-cyt-assist-spatial-gene-expression-for-ffpe-tissue-preparation-guide](#). Acessado em 26 de agosto de 2024.
8. 10x Genomics. [Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE – Deparaffinization, H&E Staining, Imaging & Decrosslinking Demonstrated Protocol, CG000520, Rev C](#). [10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/tissue-staining/visium-cyt-assist-spatial-gene-expression-for-ffpe-deparaffinization-hand-e-staining-imaging-and-decrosslinking](#). Acessado em 26 de agosto de 2024.
9. 10x Genomics. [Visium CytAssist Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide, CG000495, Rev F](#). [10xgenomics.com/support/cytassist-spatial-gene-expression/documentation/steps/library-construction/visium-cyt-assist-spatial-gene-expression-reagent-kits-for-ffpe](#). Acessado em 26 de agosto de 2024.
10. 10x Genomics. [Visium HD Spatial Gene Expression Reagent Kits User Guide, CG000685, Rev A](#). [10xgenomics.com/support/spatial-gene-expression-hd/documentation/steps/library-construction/visium-hd-spatial-gene-expression-reagent-kits-user-guide](#). Acessado em 26 de agosto de 2024.



+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-03053 PTB v1.0