

次世代シーケンスを行うすべての方へ もはやシングルセル解析は特別なメソッドではありません！ 次世代シーケンス(NGS)による シングルセルRNA-Seq解析のススメ

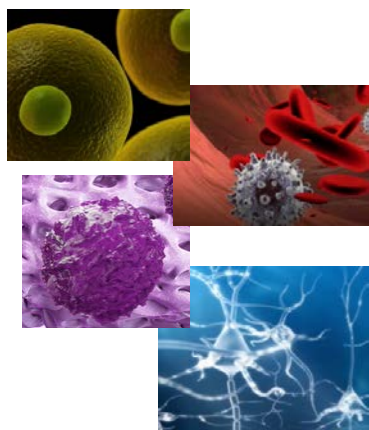
同じように見える細胞集団でも、一つひとつの細胞で挙動(遺伝子発現パターン)が異なることが明らかになってきました。その細胞が集まって組織、器官、そして個体が構成されていることを考えると、1細胞レベルでの遺伝子発現解析は本質的な個体の理解に不可欠です。

NGS装置や専用試薬の技術発展に伴ってシングルセルの確実なRNA-Seq解析が可能になり、例えば数百種類の細胞から構成されるヒトにおいても網羅的な解析を行うことができ、新たな知見が得られるケースが増えています。

集団解析では見えないことを明らかにする、それがシングルセル解析です！

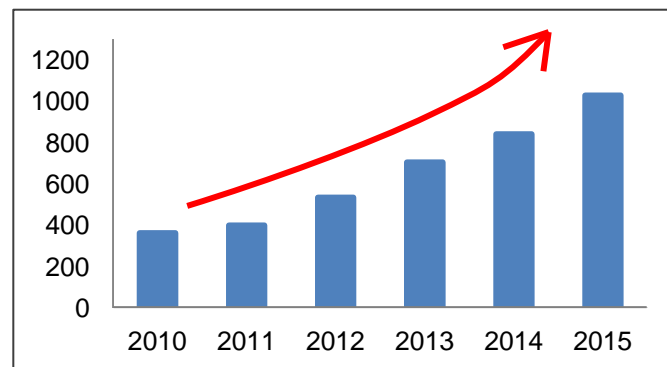
▼ 今、私たちがシングルセル解析をおススメする3つの理由 ▼

理由① 注目の分野で盛んに行われており、その数も年々増えています！



- 再生医療
- 免疫
- がん
- 幹細胞
- 神経

“Single Cell” & “NGS”の論文キーワード検索結果



★シングルセル解析を行った論文を裏表紙でご紹介しています。

理由② シングルセルからcDNA調製を行う試薬の性能が大幅にUp！

クロンテックのSMART-Seq v4テクノロジーベースのcDNA調製キットなら、シングルセルからでも高品質なcDNAを調製でき、確実なRNA-Seq解析が可能です。本パンフレット2ページでその特長を紹介しています。

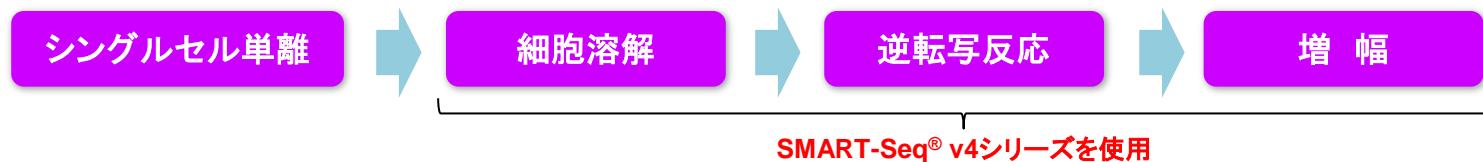
理由③ シングルセル単離方法の選択肢が拡充！

顕鏡下での採取(マイクロマニピュレーション)、セルソーティング、マイクロフルイディクスなど様々な方法があります。各方法の特徴は本パンフレット3ページをご覧ください。

「トレンド」「試薬」「単離方法」
3つの環境が整った今こそ、
シングルセル解析にチャレンジする時です！



シングルセルRNA-Seq解析のワークフロー



■ シングルセルからcDNA調製が可能なSMART-Seq® v4シリーズ

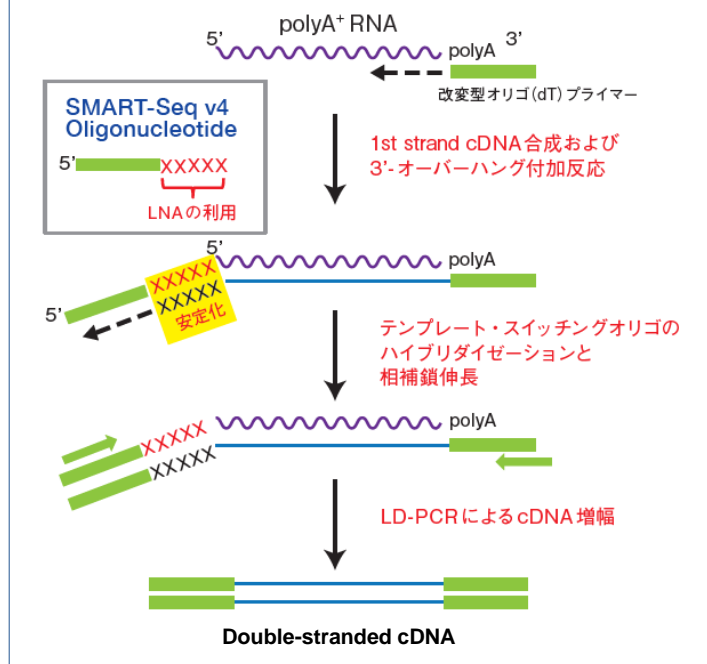
SMART-Seq® v4 シリーズの基本性能

- ✓ 1細胞またはtotal RNA 10 pgなどの超微量サンプルからもcDNA調製が可能
- ✓ GCリッチに強いPCR酵素「SeqAmp™ DNA Polymerase」の採用で配列バイアスの少ない解析が可能
- ✓ SMART-Seq2技術の導入により、従来キットに比べて遺伝子検出数が約30%アップ

SMART-Seq2技術とは？

SMART法に使用するプライマー SMART Oligonucleotideに LNA (Locked Nucleic Acid) を用いた技術です。LNAを含むオリゴヌクレオチドは、相補的なDNAやRNAに対する熱安定性が上昇し、極めて高い結合親和性と配列特異性を示します。その結果、テンプレートとの特異性が大幅にアップし、さらに高感度な遺伝子発現解析が可能となりました。

SMART法の概要 ※



※ SMART-Seq v4 3' DE Kitのフローは少し異なります。詳しくはウェブカタログの製品ページをご覧ください。

< SMART-Seq® v4 シリーズ各製品の特長 >

製品名	SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing	SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for the Fluidigm® C1™ System	SMART-Seq® v4 3' DE Kit
発現解析	○	○	○
アイソフォーム検出	○	○	×
スプライシングバリエント検出	○	○	×
全長の転写産物情報	○	○	×
方向性情報	×	×	○
シングルセル単離方法	原則選ばず	Fluidigm C1 System専用	原則選ばず
推奨するライブラリー調製キット	<ul style="list-style-type: none"> • Low Input Library Prep Kit v2 (製品コード 634899: Illumina用) • Nextera XT DNA Sample Prep Kit (イルミナ社) • Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nextera XT DNA Sample Prep Kit (イルミナ社) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nextera XT DNA Sample Prep Kit (イルミナ社)
NGS解析プラットフォーム	Illumina / Ion Torrent	Illumina	Illumina

ライブラリー調製

シーケンス

情報解析

■ SMART-Seq® v4との組み合わせで実績のあるシングルセル単離方法

マイクロマニピュレーション

少数細胞を顕微鏡下で確認して、マイクロピペットを用いて目的細胞を単離。シングルセル単離に時間を要するため、たくさんのシングルセルを採取するには不向きである。

セルソーティング

細胞表面マーカーを指標に、目的細胞群をセルソーターを用いて、ウェルプレートなどに分取。マイクロリットルの反応系のため試薬コストが高い。

マイクロフルイディクス (Fluidigm® C1™ System)

フリューダ임社独自の集積流体回路(IFC: Integrated Fluidic Circuit)内の独立した反応チャンバーでシングルセルを単離。単離された細胞は顕微鏡下で確認可能。細胞の大きさによってIFCを選択する必要がある。(フリューダ임社Webより)



Fluidigm C1 System

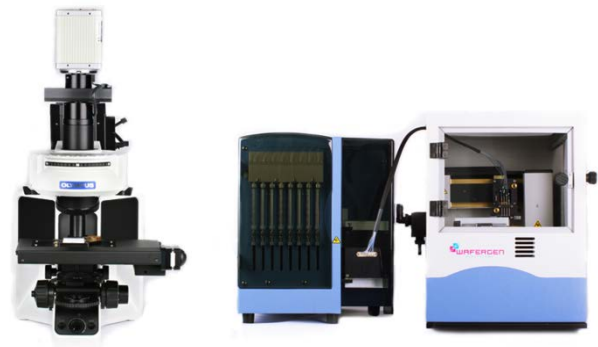
■ 今後SMART-Seq® v4での実績が期待されるシングルセル単離方法

ドロップレット

マイクロフルイディクス流路中で、水系とオイル系の流路を交差させることで微小液滴を形成させる。水系流路に細胞懸濁液が流れ、精密に制御された流路によって、微小液滴中に1細胞が含まれる。短時間で多くの微小液滴が形成されるが、細胞の生死判別が不可能。

ナノディスペンシング (WaferGen社 ICELL8™ Single-Cell System)

WaferGen社独自のSmartChip(約5,000個の微小ウェルを搭載)上に数10ナノリットルスケールで精密に分注を行い、シングルセルを単離する。最大1,800個程度のシングルセルを取得可能。自動で生死判別が可能であり、確実なシングルセルのみを選択できる。



WaferGen社 ICELL8 Single-Cell System

<各単離方法の特徴>

方法名	専用装置	1度に単離可能な シングルセル数の 目安	サンプル	細胞の選択方法	所要時間	反応容量
マイクロマニピュレーション	顕微鏡 マニピュレーター など	少数	組織、細胞	形態・蛍光マーカー	時間を要する	マイクロリットル
セルソーティング	セルソーター	数百細胞	懸濁細胞	大きさ・ 蛍光マーカー	早い	マイクロリットル
マイクロフルイディクス	Fluidigm C1 System	数百細胞	懸濁細胞	細胞を選択する 方法(機能)はなし。 細胞を選択したい 場合は、予めセル ソーターでの分取 が必要	早い	ナノリットル
ドロップレット	ドロップレット 対応装置	数万細胞	懸濁細胞		早い	ナノリットル
ナノディスペンシング	WaferGen社 ICELL8 Single- Cell System	1,000 - 1,800 細胞	懸濁細胞		早い	ナノリットル

各単離方法の詳細は下記文献をご確認ください

Kolodziejczyk AA, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*. 2015 May 21; 58(4): 610-620

■ SMART(er) シリーズを使用したシングルセル解析論文を紹介

- Camp JG, *et al.* Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *PNAS*. 2015 Dec 22; **112**(51):15672–15677.
- Burns JC, *et al.* Single-cell RNA-Seq resolves cellular complexity in sensory organs from the neonatal inner ear. *Nat Commun*. 2015 Oct,15; **6**:8557.
- Patel AP, *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014 Jun 20; **344**(6190):1396–1401.
- Brennecke P, *et al.* Accounting for technical noise in single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods*. 2013 Nov; **10**(11):1093–1095.
- Shalek AK, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature*. 2013 Jun 13; **498**(7453):236–240.
- Ramsköld D, *et al.* Full-length mRNA-Seq from single cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*. 2012 Aug; **30**(8):777–782.
- Qiu S, *et al.* Single-neuron RNA-seq: technical feasibility and reproducibility. *Front Genet*. 2012 Jul 6; **3**:124. Erratum in *Front Genet*. 2013; **4**: 23, 69.
- Cann GM, *et al.* mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS ONE*. 2012; **7**(11):e49144.

【価格表】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SMART-Seq[®] v4 Ultra[®] Low Input RNA Kit for Sequencing	12回	634888	¥267,800
	24回	634889	¥494,400
	48回	634890	¥803,400
	96回	634891	¥1,236,000
	192回	634892	¥2,060,000
	480回	634893	¥4,923,400
	960回	634894	¥5,500,000
SMART-Seq[®] v4 Ultra[®] Low Input RNA Kit for the Fluidigm[®] C1[™] System, 4 IFCs	4 chips	635025	¥265,000
SMART-Seq[®] v4 Ultra[®] Low Input RNA Kit for the Fluidigm[®] C1[™] System, 10 IFCs	10 chips	635026	¥530,000
SMART-Seq[®] v4 3' DE Kit	96回	635040	¥680,000
	192回	635041	¥1,200,000

- 本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- 本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
- ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
- 本パンフレット記載の価格は2016年8月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2016年8月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
 テクニカルサポートライン、受託窓口
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
 ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>
 Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店