

シングルセル/シングル核RNA-seq解析 & TCR/RNA-seq解析サービス

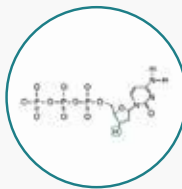
イムノジェネテクス社では、日本ベクトン・ディッキンソン (BD) 社のRhapsodyシステムと東京理科大学発の高感度cDNA増幅法 (TAS-Seq法^{*1}) をベースとし、さらに高感度に検出が可能なTAS-Seq2法^{(*)2}を組み合わせたシングルセルRNA-seq解析をご提供しております。従来の手法では検出できなかった遺伝子も検出可能であり、評価検体についてより正しい結果を得ることが可能です。

*1: 固相担体を用いた核酸増幅方法 (PCT/JP2020/027123) *2: 相補DNA鎖を増幅する方法 (特願2023-036275)

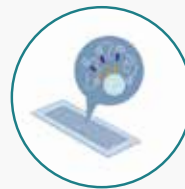
TAS-Seq2法 (Terminator-assisted solid-phase cDNA amplification and sequencing)



TdTを用い、DNAを高効率に2本鎖化



副反応抑制するため、ddCTPを一定量添加



マイクロウェル: 繊細な細胞にも適用可能



Template Switching法を追加
更に感度、汎用性向上

特長

- 既存のシングルセルRNA-seq解析に比べ、より多くの遺伝子数を検出 (図1)
- フローサイトメトリーとの相関が高く、正確な細胞組成データを取得可能 (図2)
- 一度に最大50,000細胞まで処理可能
- マイクロ流路に詰まるリスクがないため、サンプルのロスが少なく、臨床検体等の再取得困難なサンプルに最適
- Rhapsodyを用いることで、顕微鏡観察による解析細胞数の調節 (細胞ロード後の追加) が可能
- 必要細胞数が少ない (例: 50,000細胞解析の場合、最終必要細胞数は65,000細胞)

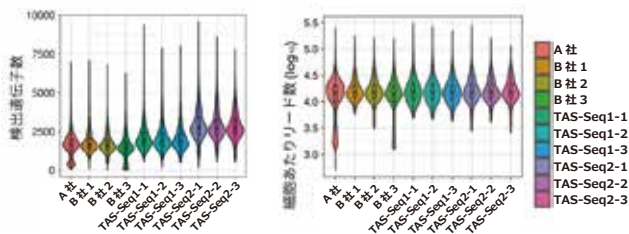


図1: TAS-Seq2を用いたマウス脾臓細胞の解析例
他社の手法に比べ1.5倍~2倍以上の遺伝子数を検出した。

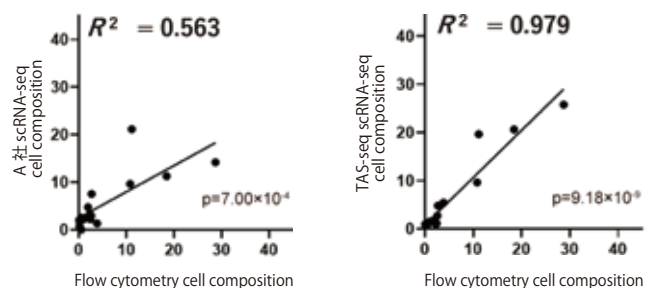


図2: マウス肺細胞におけるフローサイトメトリーと各種シングルセル解析手法の比較

シングルセル RNA-seq 解析における細胞組成の定量の精度を評価するために、シングルセル RNA-seq 解析とフローサイトメトリー分析によって得られた細胞組成データを比較した。

A社の手法 (左図) に比べ、TAS-seq (右図) によるデータは、フローサイトメトリー分析結果との相関が非常に高かった。



TAS-Seq2により、多くの遺伝子発現情報をシングルセルベースで的確に把握できます。

■ シングルセル RNA-seq 解析

—マウス肺組織の解析例—

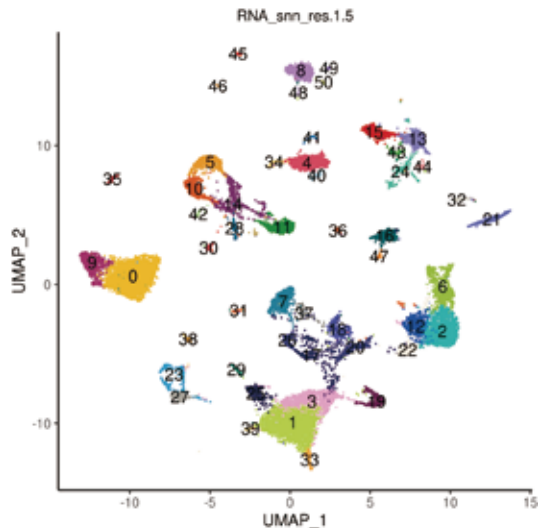


図3：Seurat クラスティングの視覚化（オプション）
UMAP プロットによる Seurat クラスティングの結果、50 個のクラスターが検出された。



本サービスを利用した論文等の詳細情報

記事 ID 検索 **45567**

コスモ・バイオ Web サイトのトップページ「記事 ID 検索」を使うと、ダイレクトにページに行くことができます。
記事IDで示された数字を検索窓に入力して検索してください。

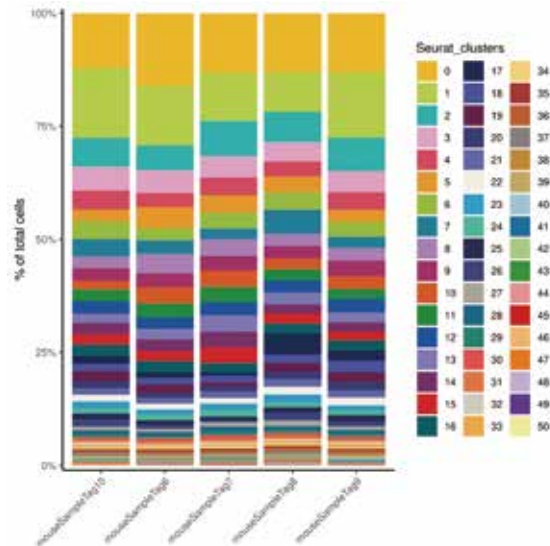


図4：各サンプルにおける細胞組成の解析（オプション）
各細胞クラスターの全細胞に対する割合を算出し、サンプルごとに積み上げ棒グラフで表示した。

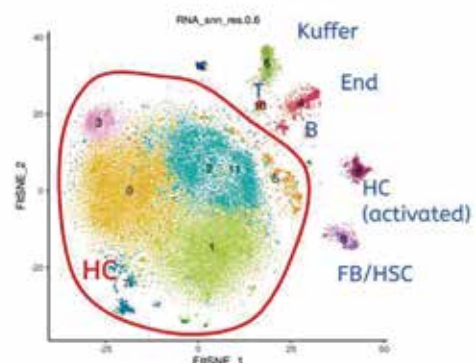
●解析実施サンプル例

マウス	肺、肝臓、腎臓、皮膚、大腸、小腸、脾臓、脾臓、心臓、白血球、舌、末梢血、好塩基球、腹腔浸潤細胞、腹膜、腫瘍、ミクログリア、脳間質細胞、胃粘膜上皮、リンパ節、骨髓細胞、脂肪間質細胞等
ヒト	末梢血好中球、PBMC、肺手術検体、胃がん生検検体、乳がんT細胞、肺がん、大腸がん等
培養細胞	ヒトiPS由来内皮細胞、ヒトiPS細胞、ヒト間葉系幹細胞、iPS由来軟骨オルガノイド、がん細胞株等
その他生物種	プラナリア、カニクイザル、ハムスター、ラット、アフリカツメガエル等

■ シングル核 RNA-seq 解析

—マウス肝臓検体由来細胞核解析例—

図5：TAS-Seq2 を用いたマウス肝臓検体由来細胞核解析
細胞調製時のロスにより解析が困難な肝細胞についても、肝臓を構成する各種細胞のクラスターの同定に成功した。



●解析実施サンプル例

マウス	肺、脳、鼻粘膜上皮、嗅球、肝細胞、腎臓細胞、副腎等
-----	---------------------------



受託解析フロー



受け入れ可能サンプル

■ シングルセルRNA-seq 解析

- ・指定のプロトコルにて合成したcDNA
- ・凍結細胞 (1×10^6 個、生存率>80%)
- ・凍結組織 (指定の凍結保存用液・プロトコルで保存)

■ シングル核RNA-seq 解析

- ・凍結組織 (10mg程度、液体窒素などを用いた急速凍結を推奨)
- ・指定のプロトコルにて固定した細胞

フレッシュな細胞での調製をご希望の場合は、装置の貸出やイムノジェネテクス社担当者による出張解析も可能です。まずはお気軽にお問い合わせください。

実施内容

■ サンプル調製およびシーケンス

- ・BD Rhapsodyによる細胞単離とcDNA合成
- ・TAS-Seqによる増幅、ライブラリ調製およびシーケンス
- ・その他: セルソート対応

■ 納品物

納品方法: ハードディスク(HDD)

- ・作業報告書
 - ・シーケンス生データ一式
 - ・マッピング結果ファイル
- (遺伝子発現テーブル並びにRNA velocity解析用発現テーブル、解析レポートファイル等)

■ データ解析

マッピング解析
(オプション) Seurat解析、sub-clustering解析、発現変動解析 (DEG)、Trajectory解析等
※細胞種同定・条件間で異なる細胞集団の同定のためのSeuratによるクラスター解析、特定細胞集団のより詳細な細分化を行うsub-clustering解析、分化過程を推定したい場合、RNA velocity解析やPseudotime解析などの解析も承ります。

■ 納期

サンプル受領から2.5ヶ月程度

シングルセルRNA-seqとTCRレパトア解析を統合し、個々のT細胞について遺伝子発現情報と、クローンの再構成に必要なTCR α/β ペアの配列を同時に解析できます。各クローンの性質と頻度に基づき、TCR遺伝子療法などに有望なクローンの絞り込みが可能です。



本サービスを利用した論文等の詳細情報

記事 ID 検索 **45577**

コスモ・バイオ Web サイトのトップページ「記事 ID 検索」を使うと、ダイレクトにページに行くことができます。
記事IDで示された数字を検索窓に入力して検索してください。

特長

- BD社 Immune Response Panelを用いたターゲットシーケンス解析、もしくは Whole Transcriptome Amplification(WTA)解析から選択可能
- 最大50,000細胞/解析が可能
- BD社 Abseq、BioLegend社 TotalSeqなどを用いたタンパク質との同時解析も可能

■ シングルセル TCR-seq (ターゲットシーケンス) 解析

—マウス腫瘍浸潤CD8⁺T細胞のscTCR/RNA-seq解析例—

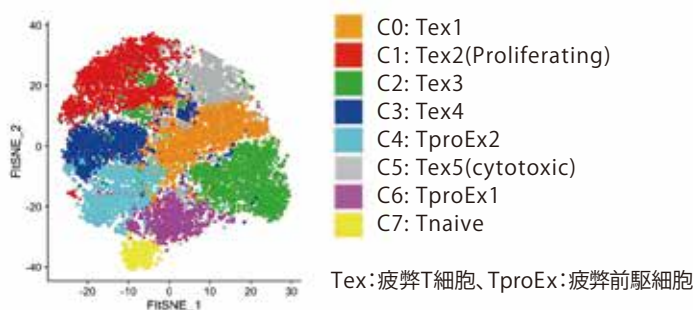


図6: scRNA-seqデータに基づくクラスタリング

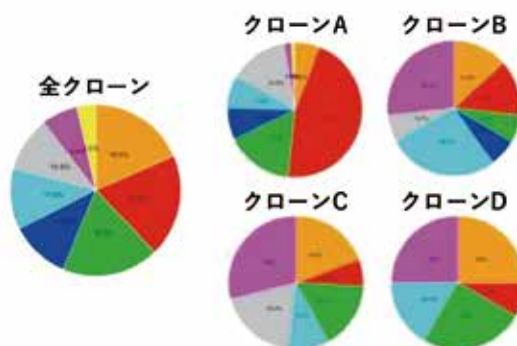


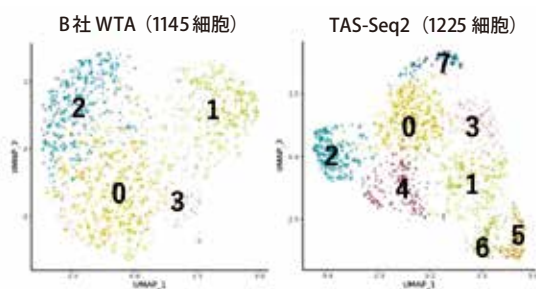
図7: クラスタ構成比率

各クローン毎の構成比率を報告します。

その他、TCR α およびTCR β のCDR3の核酸配列をもとにT細胞クローンを同定し、各クローンの総細胞数 (cell_count) と頻度 (freq) を計算します。

■ シングルセル TCR-seq (WTA) 解析

—anti-PD-L1処置時のマウス腫瘍浸潤CD8⁺T細胞の解析例—



約 50,000 reads/cell

図8: B16F10皮下移植腫瘍マウスモデルにおける anti-PD-L1 処置時の腫瘍浸潤CD8⁺T細胞の解析

B社のWTAと比較し、TAS-Seq2ではより多くのクラスター検出することができた。

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| 0: terminally exhausted | 4: exhausted progenitor-2 |
| 1: effector | 5: naïve-like |
| 2: proliferated | 6: stem-like |
| 3: exhausted progenitor-1 | 7: dying cell |

TAS-Seq2は、他社手法では同定困難なCD8⁺T細胞サブセットを同定でき、CD8⁺T細胞の機能制御に関わる遺伝子を、よりdrop-out率が低く明瞭に検出できる。

取扱店

お願い/注意事項

記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

使用範囲 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

— お問い合わせ先: 創薬・受託サービス部 —

本サービスの詳細につきましては、
当社 創薬・受託サービス部 までお問合せください。

TEL: 03-5632-9615

FAX: 03-5632-9614

E-mail: jutaku_gr@cosmobio.co.jp

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽2-2-20 東陽駅前ビル