

ナノポアシーケンシングプラットフォームによる ターゲットシングルセルシーケンシング

Agilent SureSelect テクノロジーを用いた ターゲットエンリッチメント

著者

藤井元人, 関真秀,
善光純子, 鈴木絢子,
鈴木穰
東京大学大学院
新領域創成科学研究科

生井聡史, 齋藤るみ子, 吉崎史子
アジレント・テクノロジー株式会社
診断・ゲノミクス部門

概要

ロングリードによるシングルセル RNA シーケンシングは、アイソフォームや融合トランスクリプトなどのより正確なトランスクリプトの情報を維持したまま、シングルセル分解能で解析を行うことができます。このアプリケーションノートでは、Agilent SureSelect テクノロジーを用いて、10x Genomics Chromium シングルセルライブラリのターゲットエンリッチメントを Oxford Nanopore Technologies シーケンシング用に行う方法を紹介합니다。この方法により、シングルセル解析に利用できる有効なリードの数が増加し、目的の遺伝子の解析効率が向上します。さらに、この手法が Visium による空間的遺伝子発現解析にも適用できることも示します。

はじめに

シングルセル RNA-Seq (scRNA-Seq) は、シングルセルレベルでの解像度で遺伝子発現を解析する方法として近年広く利用されています。従来のバルク解析では、個々の細胞由来のトランスクリプトはプールされた状態で全体の平均データを得るのに対し、シングルセル解析では細胞ごとに独立したデータを取得・解析することが可能です。したがって、scRNA-Seq は細胞の不均一性を明らかにし、さまざまな生物学的現象の理解を深めるための有力な手段となっています。Human Cell Atlas (HCA) コンソーシアムでは、さまざまな種類のヒト細胞からシングルセルデータを収集し、ヒトの健康と疾患の理解を目指しています。また、がん研究では、腫瘍の不均一性、腫瘍微小環境、およびクローン性の研究にシングルセルテクノロジーが活用されています。

10x Genomics Chromium は、シングルセルライブラリを作製するために広く使用されているプラットフォームです。このプラットフォームでは、1 つの細胞と 1 つの Cell Barcode 付きビーズが 1 つの液滴に封入されます。これにより、各細胞に由来する分子に固有のバーコードを付与することができます。

従来の scRNA-Seq はショートリードシーケンシングを使用しますが、ロングリードシーケンシングを用いることで、3'-5' バイアスを改善し、スプライシングアイソフォームと融合トランスクリプトをより正確に検出することができます。ただし、ロングリードシーケンシングの場合、コストが高くなり、スループットは低くなります。したがって、ロングリード scRNA-Seq 解析を行う場合は、効率化が重要なポイントとなります。Agilent SureSelect 試薬キットは、ロングリードシーケンシング (LRS) ライブラリのエンリッチメントにも使用できるハイブリダイゼーションキャプチャベースのターゲットエンリッチメント製品です¹。さらに、この試薬キットはロングリード scRNA-Seq にも適用可能です。

このアプリケーションノートでは、Chromium システムと Agilent SureSelect 試薬キットを使用してロングリード scRNA-Seq ライブラリをキャプチャし、シーケンシングする方法を示します。さらに、同じ手法を用いて、10x Genomics Visium プラットフォームで調製された空間的遺伝子発現解析ライブラリのターゲットエンリッチメントの例を紹介します。

材料と方法

図 1 にワークフローの概要を示します。表 1 に本アプリケーションノートで使用した材料を、表 2 に使用したプライマーとブロッカーを示します。

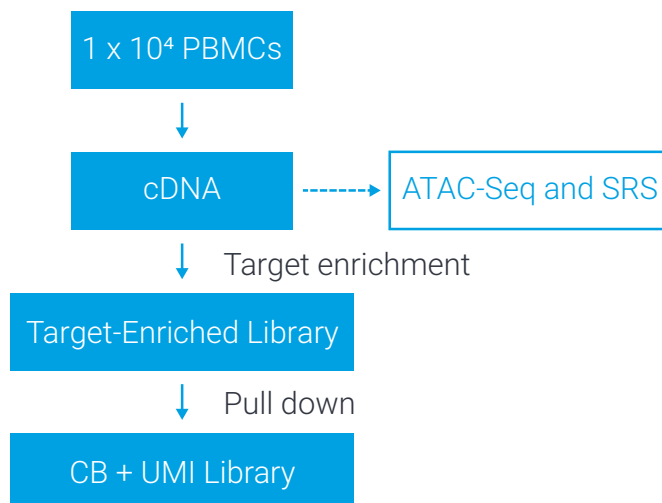


図 1. ワークフローの概要 本アプリケーションノートで説明されている手順を青色で示しています。末梢血単核細胞 (PBMC) からの cDNA の合成、ターゲットエンリッチメント、Cell barcode (CB) と Unique Molecular Identifier (UMI) を付加したライブラリの作製が含まれています。Assays for transposase-accessible chromatin sequencing (ATAC-Seq) およびショートリードシーケンシング (SRS) のプロセスは本アプリケーションノートには含まれていません。ATAC-Seq はオプションですが、SRS はシングルセルロングリード (SiCeLoRe) データ処理に使用します²。

表 1. このアプリケーションノートで使した試薬

試薬	ベンダー / 型番	コメント
Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression	10x Genomics、100285 (4 反応)	Single Cell 3' キットも使用可能
SureSelect XT HS Reagent Kit	Agilent、G9702A (16 反応)	SureSelect XT HS2 DNA (型番 G9982A、16 反応用) も使用可能。 アジレントの担当者にお問い合わせください
SureSelect Cancer CGP Capture Probe	Agilent、5280-6990	すべての HS プローブが使用可能
KOD FX Neo DNA Polymerase	TOYOBO、KFX-201 (200 U)	長いフラグメントの増幅に適した DNA ポリメラーゼを選択する必要あり
AMPure XP Beads	Beckman Coulter Genomics、A63880 (5 mL)	
SPRIselect Beads	Beckman Coulter Genomics、B23317 (5 mL)	
Dynabeads M-270 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific、65305 (2 mL)	ハイブリダイゼーションキャプチャおよび洗浄に使用
Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific、60210 (2 mL)	ブルダウンステップに使用
Ligation Sequencing Kit	Oxford Nanopore Technologies、SQK-LSK114	お使いのフローセルに適したその他のいずれかのライゲーションベースのシーケンシングキットが使用可能
10 N NaOH	Any qualified vendor	
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	Any qualified vendor	
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	Any qualified vendor	
5 M NaCl 溶液	Any qualified vendor	
0.5 M EDTA (pH 8.0)	Any qualified vendor	
TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape	Agilent	適切な自動電気泳動システムおよび機器を選択 (例えば、Agilent Fragment Analyzer システムには Agilent HS Large Fragment キット、Agilent Bioanalyzer システムには Agilent High Sensitivity DNA キットなど)。
High Sensitivity D5000 Reagents	Agilent	

表 2. 必要なプライマーとブロッカー

名称	配列 (5' ~ 3')
Illumina Read 1 Primer	CTACACGACGCTCTTCCGATCT
Template Switch Oligo (TSO) Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACAT
Biotin-Illumina Read 1 Primer	Biotin-CTACACGACGCTCTTCCGATCT
TSO Blocker	CCCATGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTT
10x Blocker	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT*

T*: inverted dT

完全長 cDNA 合成

本アプリケーションノートでは、健康人ドナー由来の末梢血単核球 (PBMC) を使用しました。 1×10^4 の PBMC から、プロトコルに従って核を単離しました³。

核の単離後、Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Reagent Bundle を使用し、プロトコルに従って Gel Beads-in-emulsion (GEM) の生成、バーコード付加、および SPRI ビーズ精製を行いました⁴。cDNA は、60 μ L の SPRIselect 試薬 (Beckman Coulter Genomics) を使用して精製しました。サンプルとビーズを混合し、室温で 5 分間インキュベートした後、ビーズを、200 μ L の 80 % エタノールで 2 回洗浄しました。残存エタノールを除去した後、サンプルを室温で 2 分間乾燥させ、40 μ L の Buffer EB (Qiagen) で溶出しました。その後、サンプルを、ショートリードシーケンシング用と、ロングリードシーケンシング用に分割しました。

cDNA 増幅

PBMC 由来でバーコード付加された cDNA を PCR で増幅しました。反応液の組成は次の通りです：13 μ L のテンプレート cDNA (10 ng)、25 μ L の KOD FX Neo 用 2x PCR Buffer、10 μ L の 2 mM dNTP、1 U の KOD FX Neo (すべて TOYOBO)、100 μ M の Illumina Read 1 Primer と TSO Primer を各 0.5 μ L。トータル 50 μ L の反応液を 25 μ L ずつに分割して増幅を行いました。サイクル条件は次のとおりです。94 °C 2 分 - (94 °C 15 秒 - 63 °C 30 秒 - 68 °C 15 分) $\times$ 8 サイクル - 68 °C 15 分。

各 cDNA 産物を 20 μ L の AMPure XP (Beckman Coulter Genomics) を使用して精製しました。サンプルとビーズを混合し、室温で 5 分間インキュベートした後、ビーズを、200 μ L の 70% エタノールで 2 回洗浄しました。残存エタノールを除去した後、サンプルを 37 °C で 5 分間乾燥させ、17 μ L の Nuclease-free Water で溶出しました。2 つのサンプルを 1 チューブにまとめて、Eppendorf Concentrator plus を使用して室温で 45 分間濃縮しました。次に、濃縮したサンプルを 10.5 μ L の Nuclease-free Water に再懸濁しました。

精製および増幅された cDNA の品質は、Agilent High Sensitivity D5000 ScreenTape および試薬と Agilent 4200 TapeStation システムを使用して評価しました。キャプチャ前 (unenriched) ライブラリの一部は、ロングリードシーケンシングに使用しました。

ターゲットエンリッチメント

増幅された cDNA (500 ng) は、Agilent SureSelect Cancer CGP DNA Assay キャプチャライブラリ (ターゲットサイズ：2.671 Mb、679 遺伝子) および Agilent SureSelect XT HS 試薬キットを使用してハイブリダイズしました。

500 ng の増幅された cDNA 9 μ L に 1.5 μ L の 100 μ M 10x Blocker、1.5 μ L の 100 μ M TSO Blocker、および 5 μ L の Agilent SureSelect XT HS Blocker Mix を加え、cDNA を 95 °C で 30 秒間変性させ、65 °C で 10 分間インキュベートしました。

各ブロッカーを含む cDNA サンプルを 65 °C に維持しながら、13 μ L の ハイブリダイゼーションミックス (2 μ L 25% Agilent SureSelect RNase Block、2 μ L SureSelect Cancer CGP DNA assay キャプチャライブラリ、6 μ L Agilent SureSelect Fast Hybridization Buffer、3 μ L Nuclease-free Water) と混合し、65 °C 1 分 - 37 °C 3 秒 $\times$ 60 サイクルでハイブリダイゼーションしました。その後、65 °C で 10 分間インキュベートしました。キャプチャを行うまでサンプルは 21 °C で最大 16 時間保存しました。

キャプチャは、引用文献 1 に従って実施しました。Dynabeads M-270 Streptavidin (Thermo Fisher Scientific) を使用してキャプチャを行いました。使用前にビーズを Agilent SureSelect Binding Buffer で 3 回洗浄し、同一の Buffer 200 μ L に再懸濁しました。次に、懸濁したビーズを 68 °C に 10 分間加熱し、サンプルと混合し、68 °C で 5 分間インキュベートしました。マグネットでビーズを集め、上清を除去しました。サンプル洗浄のために、DNA 結合ビーズを 200 μ L の SureSelect Wash Buffer 1 に再懸濁し、続いて 500 μ L の SureSelect Wash Buffer 2 (70 °C に予熱) を加え、70 °C での 5 分間インキュベーション・上清除去を繰り返し、合計 3 回洗浄しました。DNA 結合ビーズを用事調製した 0.1 N NaOH 18 μ L で懸濁し、室温で 10 分間インキュベートして溶出しました。その後、18 μ L の 200 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加えました。

ブルダウン（Template Switch Oligo アーチファクトの除去）

ブルダウンステップは、PCR アーチファクトを除去し、シーケンシング効率を向上させるために、Oxford Nanopore Technologies（ONT）によって公開されたプロトコルに基づいて行いました⁵。

ブルダウン前 PCR を行い、キャプチャされた cDNA ライブラリを増幅し、ビオチンタグを付加しました。反応液の組成は次の通りです：テンプレート cDNA 36 μL、KOD FX Neo 2x PCR Buffer 100 μL、2 mM dNTP 40 μL、KOD FX Neo 4 U、100 μM Biotin-Illumina Read 1 Primer と TSO Primer 各 2 μL、Nuclease-free Water 16 μL。反応液を 100 μL に分割して PCR を行いました。サイクル条件は次のとおりです：94 °C 2 分 – (94 °C 15秒 - 63 °C 30秒 - 68 °C 15分) x 12 サイクル - 68 °C 15 分。

次に、増幅された cDNA 産物を 2 チューブ分あわせて 200 μL とし、160 μL の AMPure XP（Beckman Coulter Genomic）を使用して精製しました。サンプルとビーズを混合し、室温で 5 分間インキュベートした後、マグネットでビーズを集め、上清を除去し、ビーズを 200 μL の 70 % エタノールで 2 回洗浄しました。残存エタノールを除去した後、サンプルを 37 °C で 5 分間乾燥させ、42 μL の Nuclease-free Water で溶出しました。精製および増幅されたライブラリの品質は、High Sensitivity D5000 ScreenTape および試薬と 4200 TapeStation システムで評価しました。

ブルダウン用に、Pull-down Wash Buffer（PWB）とキャプチャビーズを調製しました。2x PWB の組成を表 3 に示します。Nuclease-free Water で 2 x PWB を 2 倍に希釈することにより、合計 7 mL の 1 x PWB を調製しました。ブルダウンビーズは、5 μL の M-280 Streptavidin Beads（10 μg/μL）（Thermo Fisher Scientific）を 1,000 μL の 1 x PWB で 3 回洗浄し、最後に 10 μL の 2 x PWB で懸濁して調製しました。

表 3. 2x pull-down wash buffer（PWB）の組成

試薬	容量
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	40 μL
5 M NaCl	1,600 μL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8 μL
Nuclease-free Water	2,352 μL
合計	4,000 μL

次に、100 ng の増幅された cDNA を含む 10 μL のサンプルを、調製したブルダウンビーズ 10 μL と混合しました。ビーズ懸濁液と混合した後、ローテーターを使用してサンプルを室温で 20 分間インキュベートしました。洗浄には、1,000 μL の 1 x PWB を加え、5 秒間ボルテックスしました。合計 3 回洗浄した後、200 μL の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) を添加して、5 秒間ボルテックスしました。その後、ビーズ結合したサンプルに 13 μL の Nuclease-free Water を添加しました。

ブルダウン後に PCR 増幅を行いました。反応液の組成は次の通りです：ビーズ結合 Pull-down サンプル 13 μL、KOD FX Neo 2x PCR Buffer 25 μL、2 mM dNTP 10 μL、KOD FX Neo 1 U、100 μM Illumina Read 1 Primer と TSO Primer 各 0.5 μL。サイクル条件は次のとおりです：94 °C 2 分 – (94 °C 15 秒 - 63 °C 30 秒 - 68 °C 15 分) x 4 サイクル - 68 °C 15 分。

30 μL の AMPure XP を使用して、50 μL のブルダウン後生成物の精製を行いました。サンプルとビーズを混合し、室温で 5 分間インキュベートした後、マグネットでビーズを集め、上清を除去し、ビーズを 200 μL の 70 % エタノールで 2 回洗浄しました。残存エタノールを除去した後、サンプルを 37 °C で 5 分間乾燥させ、17 μL の Nuclease-free Water で溶出しました。精製および増幅されたライブラリの品質は、High Sensitivity D5000 ScreenTape および試薬と 4200 TapeStation システムで評価しました。

シーケンシングと解析

調製した 40 ng (53 fmol) のサンプルを使用して、PromethION (Oxford Nanopore Technologies) のライブラリを、プロトコルに従って Ligation Sequencing Kit（Oxford Nanopore Technologies）で調製しました。ライブラリは PromethION フローセル（型番 FLO-PRO114M）にロードしました。シーケンシングデータは、Guppy 6.5.7 を使用してベースコールしました。

FeatureCounts メトリクスは、Minimap2 (v2.24-r1122)、featureCounts (v2.0.3)、および Picard RNASeqMetrics (v3.1.1) を使用して解析しました。

結果と考察

10x Genomics cDNA ライブラリキャプチャのための プロトコルの改変

cDNA ライブラリをキャプチャする手順は、主にロングリードシーケンシングキャプチャのアプリケーションノートに記載されているプロトコルに基づいていますが¹、cDNA ライブラリには短いフラグメントが含まれているため、サイズセレクションのステップは行いませんでした。

10x Genomics Chromium シングルセル（および Visium 空間解析）ライブラリには、両端に TSO 配列を持った、バーコードと UMI がない TSO アーチファクトが含まれています。これらのアーチファクトにより、分析に使用できるリードの数が減少します（図 2）。そのため、プルダウンステップを、ハイブリダイゼーションとキャプチャの工程後に追加しました。このステップでは、CB および UMI を含むフラグメントを、ビオチン化した Illumina Read 1 Primer を使用して PCR でタグ付けします。次に、ストレプトアビジンビーズを使用してターゲットフラグメントをプルダウンし、ビオチン化タグを持たない TSO アーチファクトは洗い流しました。キャプチャ前（Unenrichedライブラリ）とキャプチャおよびプルダウン後（Targetedライブラリ）のライブラリ長分布に有意な差はありませんでした（図 3）。

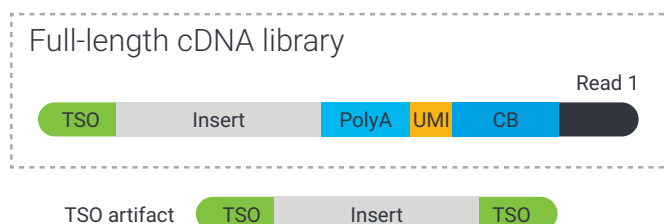


図 2. 10x Genomics シングルセルライブラリの構造。 インサート（灰色）の両端には、Template switching oligo (TSO、緑)、polyA（水色）、Unique Molecular Identifier (UMI、オレンジ)、Cell Barcode (CB、青)、Read 1（黒）が付与されます。Visium から得られる 10x Genomics 空間ライブラリも同一の構造を持ちます。

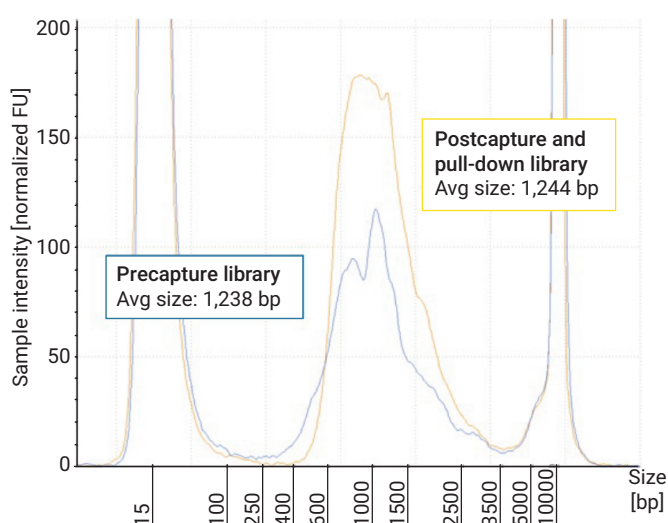


図 3. ライブラリの電気泳動例 Agilent TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape アッセイおよび Agilent 4200 TapeStation システムを使用して取得した、プレキャプチャー cDNA ライブラリ（青）およびポストキャプチャ、プルダウン後のライブラリ（オレンジ）のエレクトロフェログラム

シーケンシング結果

ライブラリは、Ligation Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies) を使用して ONT シーケンシング用に調製し、シーケンシングしました。結果は、Unenriched scRNA-Seq ライブラリからのショートリードシーケンシングデータを使用して、ONT シーケンシングのエラー修正を行う SiCeLoRe ツールを使用して処理しました²。シーケンシングと解析の結果を表 4 にまとめます。

表 4. シーケンシング解析結果

評価項目	詳細	Unenriched Library	Targeted Library
Total Reads	No. of reads	97,607,035	107,604,305
	Total bp	80,368,537,295	98,718,514,096
	N50	882	938
	1D max length (bp)	1,540,991	1,366,182
	1D average length (bp)	823	917
	1D median length (bp)	750	821
	Average Q score	14.2	14.2
1D Pass Reads (mean_Q score ≥ 10)	No. of reads	88,548,773	97,605,413
	Max length	466,281	127,922
	Average length	828	918
	Average Q score	15.0	15.0
1D Pass and CB + UMI Reads (Processed Using SiCeLoRe)	No. of reads	21,932,370 (24.7% of 1D pass reads)	63,603,994 (65.1% of 1D pass reads)
	Assigned (to transcript)	14,908,626	56,727,993
	Unassigned (no features)	4,809,450	676,466
	Unassigned (ambiguity)	2,214,294	6,199,535
	Unassigned (unmapped)	0	0
On-Target Reads	No. of reads (panel-related)	322,093 (0.36% of 1D pass reads)	34,931,913 (35.70% of 1D pass reads)
	No. of unique UMIs	245,779	480,981
	Average no. of reads/UMI	1.31	72.6
	Read length (average)	838.0 bp	918.9 bp
	Read length (min)	200 bp	200 bp
	Read length (max)	99,719 bp	99,898 bp
	No. of > 5,000 bp reads	24	1,328

Unenriched ライブラリでは、CB と UMI を持つリードのうち、シングルセル解析に有効なリードの割合は 24.7 % と低く、対照的に、Targeted ライブラリでは、有効なリードの割合は 2.6 倍高く、65.1 % となりました（図 4）。Targeted ライブラリでは、トランスクリプトにアサインされたリードの割合が 3.3 倍高く、ブルダウンによって有効なリード数が大幅に増加し、より効率的なデータ取得が可能になることを示しています。

Unenriched ライブラリでは、全リードのわずか 0.36 % のみがターゲット遺伝子にマッピングされましたが、Targeted ライブラリでは約 100 倍高く、35.7 % でした（図 4）。さらに、ターゲット遺伝子の大部分は正のフォールド変化を示しますが、オフターゲット遺伝子では強い負のフォールド変化を示し、ターゲット遺伝子が効率的に濃縮されていることを示しています（図 5A）。一部の遺伝子は変化を示しませんでした、これはももとの発現レベルが低いか、cDNA 長の影響によると考えています。

図 5B に示すように CB ごとに検出される遺伝子の数は、Unenriched ライブラリと Targeted ライブラリの間で高い相関を示しました（ $R = 0.94$ ）。これは、キャプチャとブルダウンのプロセスによってバイアスが生じなかったことを示唆しています。UMI の数は、Unenriched ライブラリと Targeted ライブラリを比較した場合、2 倍の差にとどまりましたが（表 4）ターゲットライブラリ内の UMI あたりのリード数の増加により、シーケンシング精度の向上に寄与すると考えられます。

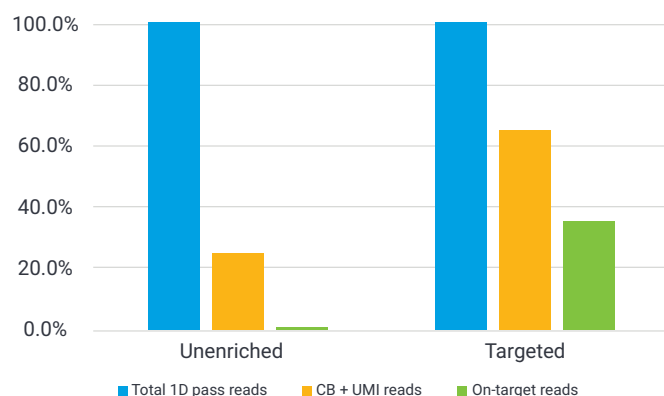
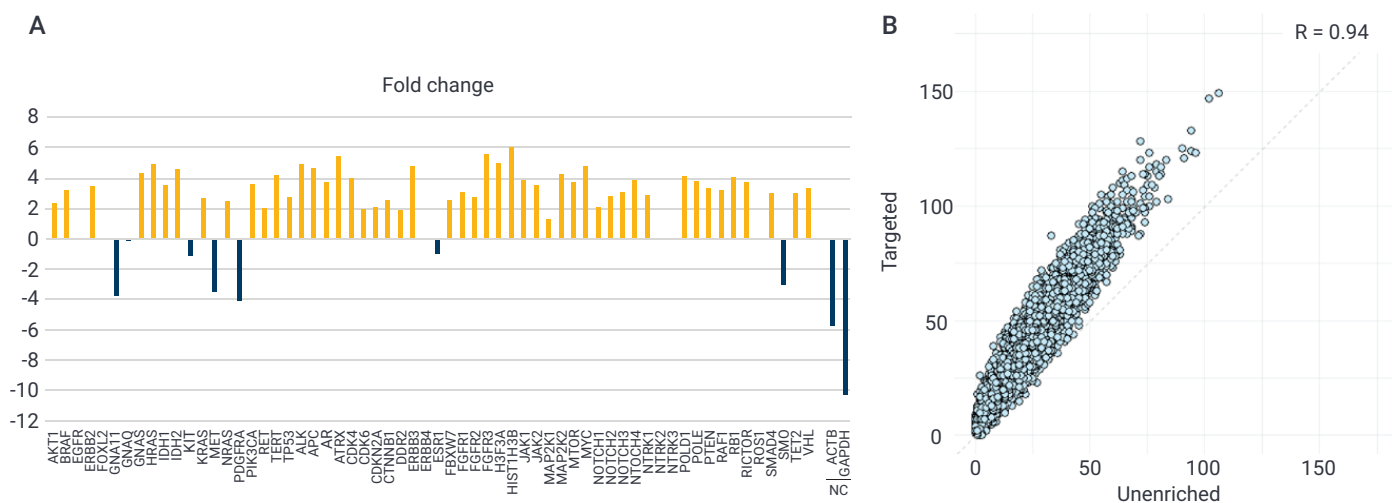


図 4. シングルセル解析に使用可能なリード数の割合（表 4 から抜粋）



ロングリード scRNA-Seq データの特性

平均リード長は Unenriched ライブラリで平均 838 bp、Targeted ライブラリで 919 bp と大きな差はありませんでした。しかし、Targeted ライブラリでは >5,000 bp のリードの数が大幅に増加しており（表 4）、より長い cDNA が効率的に解析できることを示唆しています。図 6 は、長めの標的領域（JAK1 および TET2）の例を示しており、より長いトランスクリプトが 1 つのリードでカバーされ、リードがこれらのターゲット領域でも効率的にキャプチャされていることを示しています。

Unenriched ライブラリのカバレッジは 3' 末端に偏っており、これは不完全な cDNA が含まれていることを示していますが、Targeted ライブラリでこのバイアスが改善されており、より均一な cDNA カバレッジが得られていることを示唆しています（図 7）。

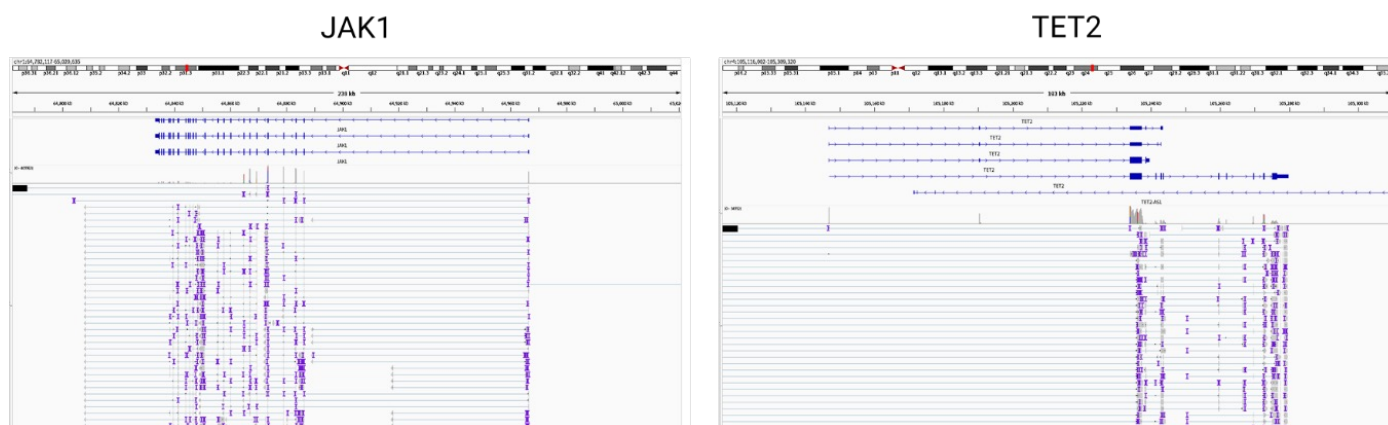


図 6. 長いターゲットトランスクリプトの例 ターゲットトランスクリプトとして JAK1 (5092 nt: ENST00000342505.5) と TET2 (9589 nt: ENST00000380013.9) の結果を Integrative Genomics Viewer (IGV) で表示した例

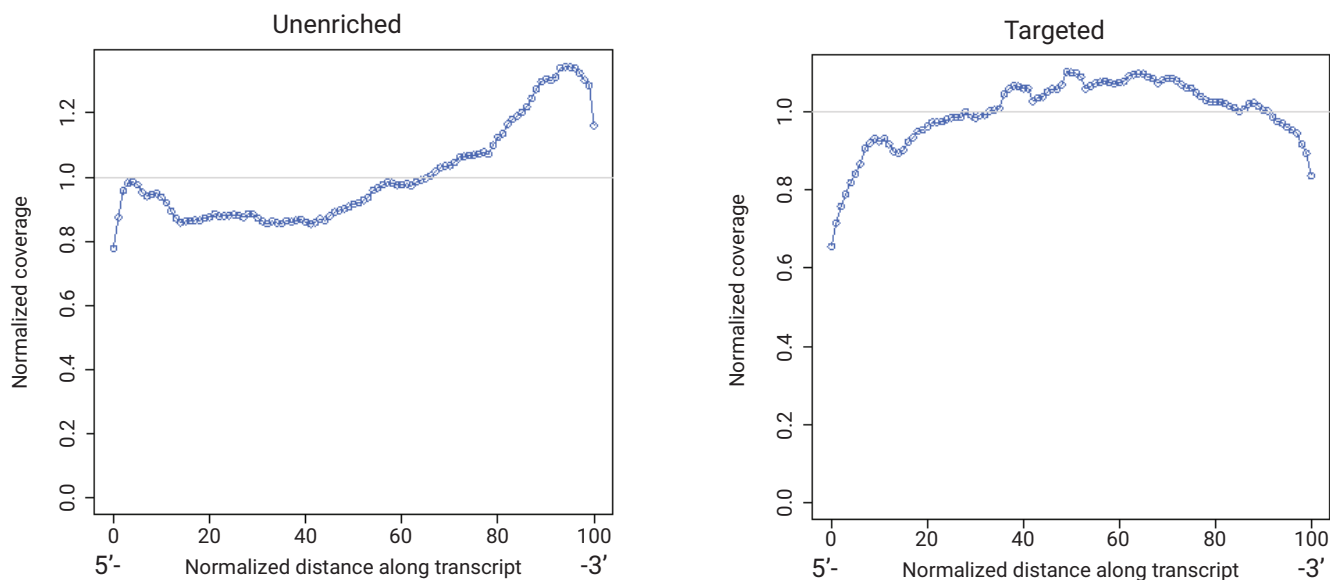


図 7. トランスクリプト長で標準化後のカバレッジ分布

Visium 空間的遺伝子発現解析ライブラリの
ターゲットエンリッチメント

10x Genomics Visium は、Chromium と同一のライブラリ構造を持つ空間トランスクリプトーム解析のプラットフォームです (図 2)。したがって、Visium 空間的遺伝子発現解析ライブラリのターゲットエンリッチメントも、このアプリケーションノートで紹介した方法を使用して実施することが理論上可能です。概念実証として、Visium 空間解析ロングリードライブラリのターゲットエンリッチメントの結果を示します。

一般的な Visium 空間解析は 3' 末端のショートリードシーケンシングで行われるため、3' 末端から離れた位置の変異を検出することはできません。図 8 は、ロングリード Visium 空間解析の例を示しています⁶。この方法を使用して、完全長の cDNA 配列を空間バーコードで解析し、3' 末端から 1,000 bp を超える位置にある欠失を位置情報とあわせて検出しました。ブルダウンステップがはいっていないなど、Visium 空間解析ライブラリのターゲットエンリッチメントを行った際の実験条件にはいくつかの違いがありますが、このアプリケーションノートで説明されている最新の方法を使用することで、より効率的な空間解析を実行できると考えています。

An example of the mutant reads

0f25fb7d-0114-477d-bab0-d777d58e0f18
TTGTACTTCGTTACAGTATTGCTAAGCAGTGGTATCAACATAGGTGCATGGGATTTTCAGCCTACAGTTAT
GTTACAGTCACACACATACAAATGTTCCCTTTTAAAGTAATTTTCTCCCAAGTGAGAAAGTTAAGA
ATTCACGTCGCTATCAAG | ACATCTCCGAAAGCCAACAGGAAATCCTCGATGAAATACACGTCGATGGCCAGCGT
GGACAAACCCACGTCGTGCCGCTGCTGGGCATCTGCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCAGCAGCTCATGCCCC
TTCGGCTGCTCCTGGACTATGTCGGGAACACAAAGACAATATGGCTCCCGGTACCTGCTCACTGGTGCA
GATCATAAAGGGCATGAACACTTTGGAGGACCGTTCGCTTGGTGACCGGACCTGAGCAGCCAGGAACGACTGG
TGAGAAACCCGACGATGTCAAGATCAGATTTTGGGCTGGCCAAATGCTGGGTGGAAGAAAGAAATACC
ATGCAGAGGAGGCAAGTGCTTATCAAGTGGATGGCATTGAATCAATTTTACACAGAATCTATACCCACAGA
GTGATGTCCTGGAGCTACTGGGAGCTGGTTGGGGTTGATGACCTTTGGATCCAAAGCATGCCAAACGGAAATCCC
TGCAACTGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGAGGAGCAGCGCTCCCTCAGCCACCCATATGTACCATCGATGT
CTACATGATCATGGTCAAGTGTGGATGATGGGCGCAGATAGTCGCCAAAGTTCCTGAGTTGATCATCCAGAT
TCTCCAAATGGCCGAGACCCAGCGCTACCTTGTCTTACAGGGGGATGAAGAAATGCAATTTGCCAAGTCCTA
CAGACTCCAACCTTCTACCGTGCCCTGATGGATGAAGAAGACATGGACGCTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCA
TCCAGCGGGGGCTTCTTCAACGGCCCTCCCTACACGTCCCAACCGGACTCCCACTCAGGCTCTCTCTGAGTGCA
ACCAACAACAATTCACCGTGGCTTGATTTGATAGAAATGGGCTGCAAGCTGTCCCATCAAGGAAGACAATTC
TTGACGCGATACAACTCAGACCCCGCAGGCGCTTGACTGAGGACAGCATAGACGACACCTTCGCTCCGAGTGC
TGAATACACCAACAGCTCGCTCCCAAGACCTGGAACACAAAAAATATCATGAAAGCGGCACAC
TCTAGACATATAGATCAGGAATAAATTTGTAGAGCAATACG

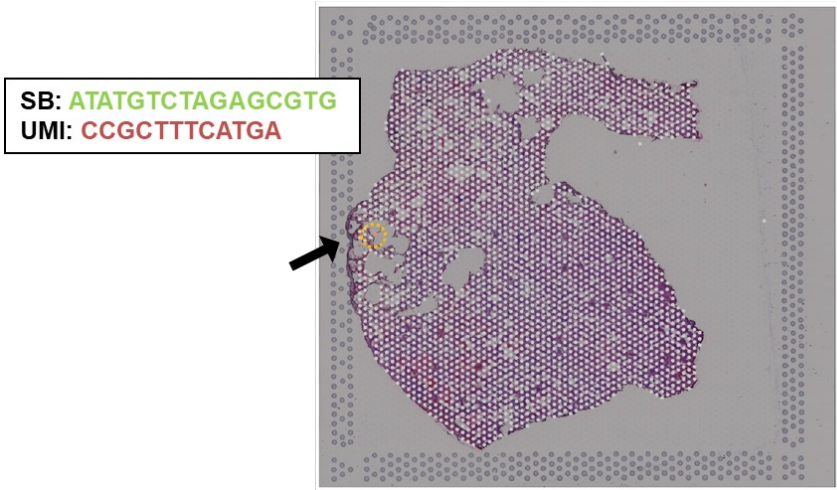


図 8. 空間ライブラリのターゲットエンリッチメント例。3' 末端から離れた位置の変異が位置情報とともに検出されました。

No.1

Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR), transcript variant 1, mRNA.					
Sequence ID: NM_005228.6 Length: 9905 Number of Matches: 2					
Range 1: 2465 to 3558 GenBank Graphics					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1552 bits(1720)	0.0	1030/1118(92%)	49/1118(4%)	Plus/Plus	
Query 136	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	180		
Subject 2465	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	180		
Query 181	GCCACACA-GGAAATCCGATGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	238		
Subject 2524	GCCACACAGGAAATCCGATGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2582		
Query 239	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	298		
Subject 2583	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2642		
Query 299	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	358		
Subject 2643	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2702		
Query 359	GTCACAGTGTGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	416		
Subject 2703	GTCACAGTGTGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2762		
Query 417	GTCACAGTGTGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	476		
Subject 2763	GTCACAGTGTGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2820		
Query 477	ACGATTTTGGGTCGACAACTCTGCTGGT--GGAAAGAAAGATACATGAGAGG	-----ACATCTCCGAA	534		
Subject 2821	ACGATTTTGGGTCGACAACTCTGCTGGT--GGAAAGAAAGATACATGAGAGG	-----ACATCTCCGAA	2879		
Query 535	AGGAAAGTGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	594		
Subject 2880	AGGAAAGTGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2939		
Query 595	CCAGATGATGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	653		
Subject 2940	CCAGATGATGTGAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	2999		
Query 654	GCCATGCAAGGAAATCCCTGCACTGAGATCTCTCATCTGAGAGAGAGAGCA	-----ACATCTCCGAA	713		
Subject 3000	GCCATGCAAGGAAATCCCTGCACTGAGATCTCTCATCTGAGAGAGAGAGCA	-----ACATCTCCGAA	3054		
Query 714	CCCTCTCCCTCAGCACCACATATAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	773		
Subject 3055	CCCTCTCCCTCAGCACCACATATAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	3113		
Query 774	GATGATGAGGACGAGATAGTCCGCAAGTCTCTGAGTGTGATCATGCA-ATTCTCCAAA	-----ACATCTCCGAA	833		
Subject 3114	GATGATGAGGACGAGATAGTCCGCAAGTCTCTGAGTGTGATCATGCA-ATTCTCCAAA	-----ACATCTCCGAA	3172		
Query 834	TGGCCGAGA-CCCAAGCTCTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	892		
Subject 3173	TGGCCGAGA-CCCAAGCTCTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	952		
Query 893	AGTCTCAGACCTCCAACTCTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	952		
Subject 3232	AGTCTCAGACCTCCAACTCTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	3291		
Query 953	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	1010		
Subject 3292	GTGAGAAATTAAGATACACGTCCTCTACAG	-----ACATCTCCGAA	3348		
Query 1011	TCCACCCGAGTCCCACTGAGGTCCTCTGAGTGTGATCATGCA-ATTCTCCAAA	-----ACATCTCCGAA	1070		
Subject 3349	TCCACCCGAGTCCCACTGAGGTCCTCTGAGTGTGATCATGCA-ATTCTCCAAA	-----ACATCTCCGAA	3402		
Query 1071	GCTTGTGATGAGAAATGAGGTCGAACTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	1130		
Subject 3403	GCTTGTGATGAGAAATGAGGTCGAACTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	3462		
Query 1131	CGATACAGTGTGAGAGGTCGAACTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	1190		
Subject 3463	CGATACAGTGTGAGAGGTCGAACTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	3521		
Query 1191	CCAGTGTGATGAGAAATGAGGTCGAACTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	1228		
Subject 3522	CCAGTGTGATGAGAAATGAGGTCGAACTCTGATCAGAGGGGATGAGAGATGATTCGCA	-----ACATCTCCGAA	3558		

ATCAAG-----ACATCT
|||||
ATCAAGGAATTAAGAGAAGCAATCT

15-base deletion

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムが、10x Genomics Chromium システムを用いて調製されたシングルセルライブラリーに適用可能で、Oxford Nanopore Technology によるロングリードシーケンシングと組み合わせて使用できることを示しました。この方法により、解析に有効なリードの割合と、目的遺伝子のカバレッジが向上し、効率的なシングルセルロングリード解析が可能になります。

さらに、この方法は、高いカバレッジによってシーケンシング精度を向上させ、完全長の cDNA リードを効率的に取得することが可能で、同じライブラリ構造を持つ 10x Genomics Visium 空間的発現解析ライブラリにも適用できることを示しました。

参考文献

- 1 Namai, S.; Ishii, Y.; Yoshizaki, F.; Seki, M.; Suzuki, Y. SureSelect XT HS2 ターゲットエンリッチメントシステムを用いた効率的なロングリードシーケンス解析 Agilent Technologies application note, publication number 5994-7365JAJ, **2024**.
- 2 Lebrigand, K.; Magnone, V.; Barbry, P.; Waldmann, R. High throughput error corrected Nanopore single cell transcriptome sequencing. Nat. Commun. **2020**, 11, 4025. DOI: 10.1038/s41467-020-17800-6.
- 3 Demonstrated Protocol Nuclei Isolation for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Sequencing; 10x Genomics, publication number CG000365 Rev C, **2022**.
- 4 User Guide: Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression; 10x Genomics, publication number CG000338 Rev F, **2022**.
- 5 Single-cell transcriptomics with cDNA prepared using 10X Genomics; Oxford Nanopore Technologies, publication number SST_v9148_v111_revB_12Jan2022, **2022**.
- 6 Takano, Y.; Suzuki, J.; Nomura, K.; Fujii, G.; Zenkoh, J.; Kawai, H.; Kuze, Y.; Kashima, Y.; Nagasawa, S.; Nakamura, Y.; et al. Spatially resolved gene expression profiling of tumor microenvironment reveals key steps of lung adenocarcinoma development. Nat. Commun. **2024**, 15, 10637. DOI: 10.1038/s41467-024-54671-7.

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail: email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

PR7001-4615

www.agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2025

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, July 5, 2025

5994-8490JAJ