

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

**今号のポイント:** タカラバイオのイルミナ社NGS装置用ライブラリー調製キット「SMART-Seq® Stranded Kit」を使うことで、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)のシングルセル解析が可能になりました。

**【キーワード】** シングルセルRNA-Seq、セルソーター、TIL、EpCAM、CD45、腫瘍細胞、ストランド情報

## SMART-Seq® Stranded Kitを使用した腫瘍細胞のシングルセルRNA-Seq解析 (クロンテック取得データ)

### ■ 実験の背景

腫瘍に関連する細胞の機能や量を解析するために、最近ではシングルセルRNAシーケンス(scRNA-Seq)が使用されることが多く、細胞の不均一性を詳しく見ることが可能です。シングルセルなどの微量のRNAから生物学的情報を得るためには、超高感度で再現性の高いライブラリー調製方法が必要です。

タカラバイオのSMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (製品コード 634888ほか)は、mRNAの3'側だけではなく、全長の情報を取得できるため、非常に感度の高いscRNA-Seqライブラリーを調製することができます。ただし、この方法ではPolyA mRNAしか解析できません。そこで、non-PolyA RNAも解析できるようにSMART-Seqテクノロジーを改良し、オリゴdTプライミングではなく、ランダムプライミングを行うシングルセルRNA-Seqライブラリー調製キット SMART-Seq® Stranded Kitを開発しました。SMART-Seq® Stranded Kitは、RNAのPolyA状態に関わらずあらゆるRNAを解析することが可能で、ストランド情報も保持しているため、オーバーラップする遺伝子の区別が可能で、ロングノンコーディングRNA(lncRNA)のアノテーション情報の取得や定量も可能です。

本実験では、腫瘍細胞の不均一性解析を行う際にSMART-Seq® Stranded Kitが有効であることを示すため、ステージIVの卵巣がん(漿液性がん)患者の固形腫瘍から剥離したシングルセルを解析しました。細胞分離にはセルソーターを用いて、96ウェルプレートにCD45+白血球とEpCAM+腫瘍細胞を分取し、ライブラリー作製、シーケンス、情報解析を行いました。CD45+細胞で4,717個の遺伝子、EpCAM+細胞で8,039個の遺伝子が検出され、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)や卵巣がんに関連したマーカー遺伝子も同定することができました。

### ■ 使用製品: シングルセル or 10 pgのtotal RNAからストランド情報を保持したライブラリー調製が可能

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SMART-Seq® Stranded Kit	12回	634442	¥188,000

### ■ 実験ワークフロー ※実験ワークフローの詳細は、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。



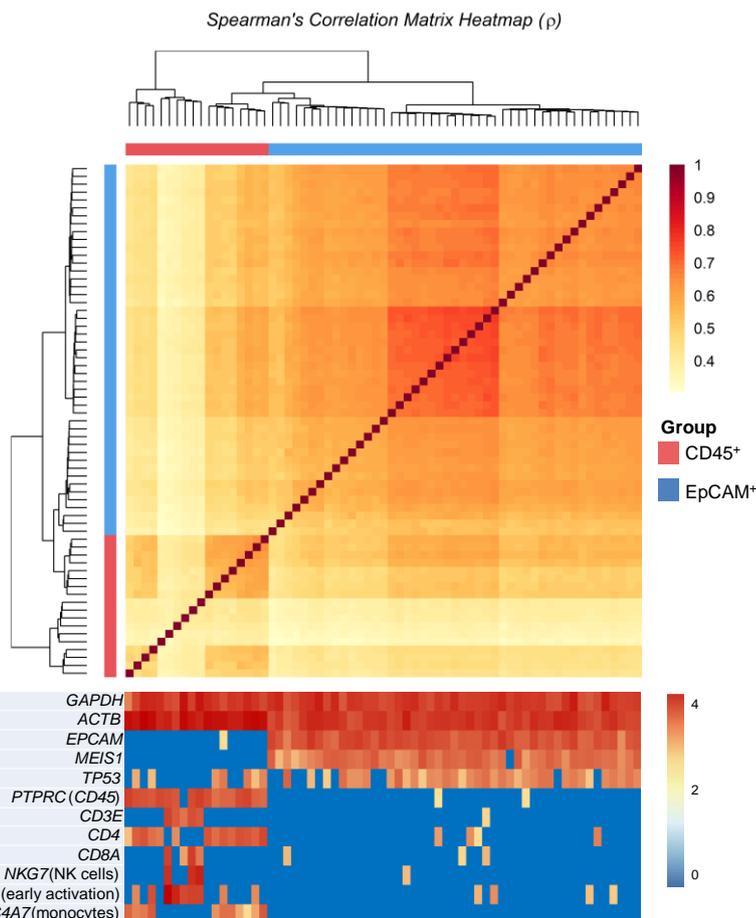
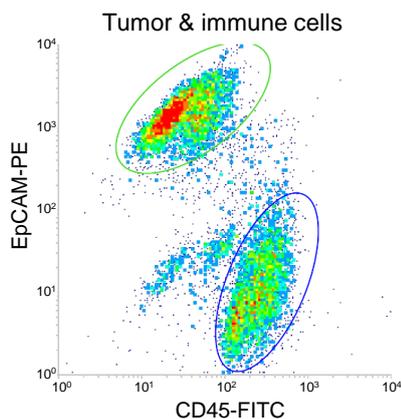
ここで

「SMART-Seq® Stranded」  
を使用



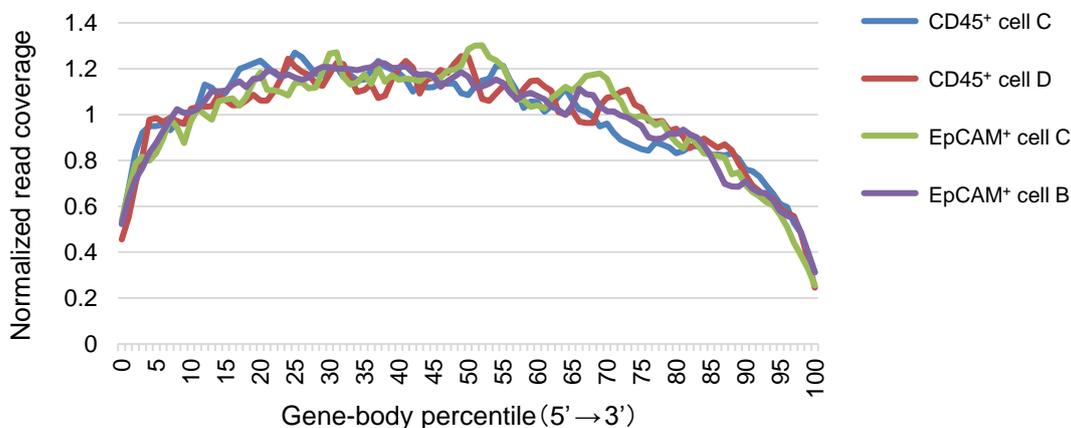
裏面につづく ➡

## CD45<sup>+</sup>細胞とEpCAM<sup>+</sup>細胞の遺伝子発現比較



腫瘍細胞からCD45<sup>+</sup>細胞とEpCAM<sup>+</sup>細胞をセルソーターを用いてシングルセル分離を行い(上図)、SMART-Seq<sup>®</sup> Stranded Kitを用いてライブラリーを作製し、シーケンス解析を行った。スピアマン相関係数を用いてクラスター解析を行い(右上図)、各遺伝子の発現量を確認した(右下図)。ハウスキーピング遺伝子(GAPDH、ACTB)、がん関連遺伝子(EpCAM、TP53)、卵巣がんで重要な遺伝子(MEIS1)、TILで濃縮される遺伝子(CD45以下の7種)が検出され、TILおよび卵巣がんと関係する遺伝子を同定することができた。

## Gene-body coverage



CD45<sup>+</sup>細胞、EpCAM<sup>+</sup>細胞からそれぞれ2細胞について、gene-body coverageの解析を行った。わずかに5'バイアスが検出されているが、抽出RNAと同様に(データ示さず)、シングルセル解析でも均一なgene-body coverageを示した。

・本チラシ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。  
 ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。  
 ・本チラシ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。  
 ・本チラシ記載の価格は2019年10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。

2019年10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

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店

