

TotalSeq ご使用時の事前確認事項

ご使用システムの確認

- Chromium (10x Genomics) →TotalSeq-A, B, C すべて使用可能
- その他 →TotalSeq-A のみ使用可能

Chromium 使用の場合の試薬適合性

- Single Cell Gene Expression Solution (3', v3)試薬使用 →TotalSeq-A or B 使用可能
- Single Cell Immune Profiling Solution (5')試薬用 →TotalSeq-C のみ使用可能

TotalSeq フォーマットの違い

- TotalSeq-A をご使用の場合、cDNA ライブラリのためのプライマーや試薬を別途ご自身でご用意いただく必要がございます。

Chromium 試薬には同梱されておりませんので、BioLegend 社のプロトコルを事前にご確認ください。

<https://www.biolegend.com/en-us/technical-protocols>

- TotalSeq-A をご使用の方は最終面に注意点の記載がございます。ご確認ください。

| | TotalSeq™-A | TotalSeq™-B | TotalSeq™-C |
|--------------------|--|--|---|
| RNA-seq 用システムとの互換性 | Single Cell Gene Expression Solution (3', v3) と、 poly-A テールを使うシステム全般 (=Chromium 以外) にも適合 | 10x Genomics の Single Cell Gene Expression Solution (3', v3) に完全に適合 | 10x Genomics の Single Cell Immune Profiling Solution (5') に完全に適合 |
| ご使用上の注意 | ・ライブラリ調整のためのプライマーや試薬が別途必要 (*Chromium 試薬以外に) | 10x Genomics 試薬の追加購入 | 10x Genomics 試薬の追加購入 |
| ラインナップ | ◎ | △ | ○ |
| 次世代シーケンサー互換性 | ILLUMINA® シーケンサー | | |

抗体パネルについて

- 適切な抗体を選択しているか（CD45, CD3 など）
 - CITE-seq データには、FCM 実験とは異なり、FSC, SSC, 生死判定, ダブルレット除去がありません。
 - CD45, CD3, CD19 などを基本的なマーカー分子の染色をご検討ください。

- アイソタイプコントロール抗体の検討
 - FCM データよりも陽性と陰性の数値の差が小さい傾向がございます。
 - 非特異的な抗体の結合や吸着によるバックグラウンドの目安になりますので、アイソタイプコントロールの添加をぜひご検討ください。
 - 同アイソタイプの抗体が複数ある場合には、アイソタイプコントロール抗体の抗体量は、一番多い抗体に合わせてください。
 - アイソタイプコントロールの使用例

| Totalseq 抗体 | アイソタイプコントロール | 添加量 |
|------------------------|----------------------|----------|
| TotalSeq -A antibody 1 | Armenian Hamster IgG | 1 ug |
| TotalSeq -A antibody 2 | Armenian Hamster IgG | 0.5 ug |
| TotalSeq -A antibody 3 | Armenian Hamster IgG | 0.025 ug |
| TotalSeq -A antibody 4 | Armenian Hamster IgG | 0.5 ug |
| TotalSeq -A antibody 5 | Armenian Hamster IgG | 0.5 ug |
| TotalSeq -A antibody 6 | Armenian Hamster IgG | 0.025 ug |
| TotalSeq -A antibody 7 | Armenian Hamster IgG | 0.5 ug |
| TotalSeq -A antibody 8 | Armenian Hamster IgG | 0.5 ug |
| TotalSeq -A antibody 9 | Armenian Hamster IgG | 0.05 ug |



TotalSeq™-A0241 Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl

1 ug 添加

抗体の適正濃度確認のための事前検討

同クローン抗体を使った、FCMでのタイトレーション実験を行い、適正な抗体量を事前に確認していただくことを推奨しています。

□ タイトレーション実験

<Protocol 概要>

多くの抗体の適正レンジは、<1 ug/mL-0.031 ug/mLの範囲内>

* 抗体希釈液を 1ug/50 uLの 2 倍希釈を順次作成し、50 uL 添加すると、 1×10^6 cells/100 uL に上記抗体量が入るように希釈しておく。

それぞれ 1×10^6 cell/50 uL の細胞懸濁液を用意

↓

Fc Block を 5 uL 添加して 10 min, 4°C

↓

抗体希釈液を各 50 uL 添加

↓

30 min, 4°C

↓

wash など行い、FCM で測定

□ Stain Index(SI)による適正濃度の検討

- タイトレーション実験後は、各濃度のデータから Stain Index(SI)を算出してください。
SI が一番高い時の濃度が適正濃度になります。
- $\text{Stain Index (SI)} = \{ (\text{陽性分画の MFI}) - (\text{陰性分画の MFI}) \} / 2 \times (\text{陰性分画の SD})$

TotalSeq 染色時のご注意 (TotalSeq-A, B, C 共通)

□ Wash の厳格化

浮遊抗体を除去するためにしっかりと Wash を行ってください (推奨 3 回)

□ 凝集抗体の除去

抗体カクテル作成後に、 $14,000 \times g$ at $2 - 8^\circ\text{C}$ for 10 min で遠心し、上清を回収して細胞へ添加するようにしてください。

TotalSeq-A ご使用時の注意点

- 常に下記より最新のプロトコルをご確認ください。

<https://www.biolegend.com/en-us/technical-protocols>

- **クリーンナップおよびライブラリ作成用プライマーおよび試薬を事前にご自身でご準備ください。**

(配列はプロトコルに記載、ご自身でご用意いただく必要あり)

| ステップ | 表面抗原 TotalSeq 用 | ハッシュタグ TotalSeq 用 |
|--|--------------------------------|-------------------------------|
| II)cDNA 調整 | ADT Additive primer | HTO Additive primer |
| III)ライブラリ調整 | SI PCR primer | |
| ライブラリのシーケンシング * 10xGenomics サンプルレーンごとに異なるプライマーが必要 | Illumina Small RNA RPI1 primer | Illumina TruSeq D701_s primer |

- シーケンス時の混ぜる割合 (mRNA:ADT:HTO)の確認

| cDNA | 必要リード数 |
|-------------------------|----------------------------------|
| HTO (ハッシュタグ抗体 TotalSeq) | 500 read/cell |
| ADT (表面抗原 TotalSeq) | 5,000 read/cell |
| mRNA | 標準 50,000 read/cell (お客様によって異なる) |

ご不明な点がございましたら、下記にお問い合わせください。

トミーデジタルバイオロジー株式会社

TEL 03-6240-0451

Email info@digital-biology.co.jp