

マルチオミクス解析用試薬 **TotalSeq**TM

個々の細胞を特徴づけているものを解明しよう



マルチオミクス解析は、これまでにないレベルまでタンパク質と遺伝子を同時に解析することで、従来のシーケンス実験を変革しました。私たちBioLegendは、シーケンシングによるタンパク質検出を可能とするために、抗体やパネル製品、サンプルのマルチプレックス法に用いるcell hashing試薬など包括的な製品群をご提供します。ここでは、TotalSeq™製品でどのようなことができるのか確認してみましょう。また、個々の細胞を特徴づけるものは何かを明らかにするために、どのようにこれらの試薬が既存のワークフローに統合されるのか見てみましょう。

目次

1細胞レベルでのタンパク質とRNAの検出	3
マルチオミクスデータを同時に生成	3
1細胞レベルでのタンパク質とRNA解析に使う	抗体のフォーマット4
サンプルのマルチプレックス法とHashtag	4
	5
Nuclear Hashing(サンプルが核の場合)	5
抗体力クテル	6
Universal Cocktails	6
TBNK Cocktails	7
Bulk Epitope and Nucleic Acid Sequencing (B	3EN-seq)9
1細胞レベルでのタンパク質とDNAの検出	
抗体力クテル	10
参考資料	11
動画とウェビナー	11
ブログと記事	11
eBookとアプリケーションノート	11
プロトコル	11
注目の論文	

1細胞レベルでのタンパク質とRNAの検出

オリゴヌクレオチド標識抗体TotalSeq[™]を用いることで、CITE-seqやREAP-seqなどの核酸とタンパク質を同時に検出するアプリケーションにおいて、1細胞レベルでタンパク質の測定が可能となります。poly(dT)とmRNAのpoly(A)との間のハイブリダイゼーションを利用して捕捉する既存のsingle-cell RNA sequencingのワークフローや10x Genomics社のワークフローに円滑に統合することができます。

マルチオミクスデータを同時に生成

プロテオミクスとトランスクリプトームのデータを組み合わせることで、1細胞解析の能力を向上させます。

ドロップアウトが少ない: TotalSeq™由来の抗体タグは ドロップアウトが起こりにくいです。

細胞の分類と識別が向上:発現レベルの低いRNA分子やCD45RAやCD45ROなどのバリアントは、RNAレベルでの検出が困難です。TotalSeq™抗体を使うことでこれらの限界を補うことができ、細胞をさらに良く識別することができます。

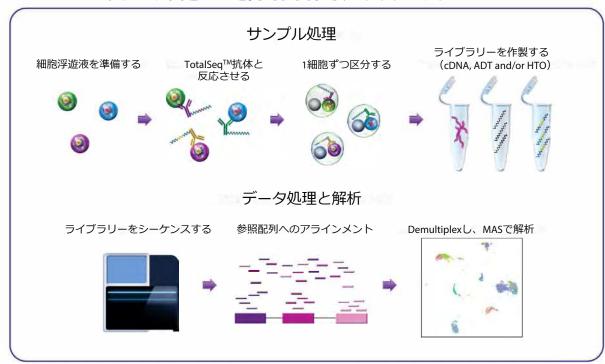
多くのタンパク質を検出できる:1回の実験で100種類以上の抗体を用いることで、非常に多くのタンパク質を同時に検出することができます。

効率の向上:Cell hashing用の抗体を使用し簡単に複数の サンプルを混合することができるので、ワークフローを 改善し実験コストの削減が可能です。 **多様な研究分野で使用可能:**マウスおよびヒトの 広範囲なターゲットに対するTotalSeq™抗体をご用意 しているので、次のような様々な研究分野でお使い いただけます。

- 個別化医療あるいは精密医療
- がん研究
- 幹細胞研究
- 基礎免疫学および応用免疫学
- バイオマーカーの探索
- 新規細胞または希少細胞の特性解析
- 神経免疫学
- ワクチンの研究

詳細はこちら: biolegend.com/ja-jp/totalseg/single-cell-rna

タンパク質とRNAを同時検出するためのワークフロー



biolegend.com

3

1細胞レベルでのタンパク質とRNA解析に使う抗体のフォーマット

BioLegendが有する、信頼性のある抗体クローンのポートフォリオを活用して、豊富な品揃えのオリゴヌクレオチド標識抗体をご提供します。複数のフォーマットの抗体をご用意していますので、お客様独自の研究目的に合わせて実験をデザインできます。

それぞれのTotalSeq™抗体には次の配列を含むユニークな オリゴヌクレオチドが標識されています。

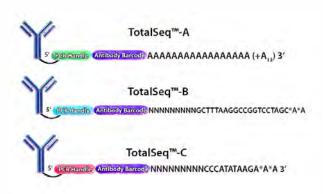
- 1. 捕捉配列
- 2. クローン特異的な抗体バーコード配列
- 3. イルミナ社のシーケンシング試薬および機器に対応しているPCRハンドル

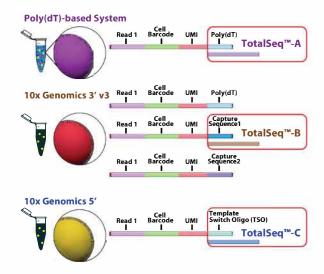
TotalSeq[™]抗体に標識されているオリゴヌクレオチド配列はアプリケーションや用途により、抗体由来タグ(antibody-derived tag, ADT)またはHashtagオリゴヌクレオチド(HTO)と呼ばれます。

TotalSeq[™]-A: mRNAの捕捉にpoly(dT)オリゴヌクレオチドを 用いるシーケンシングプラットフォームで使用できるよう に設計しています。TotalSeq[™]-A抗体のオリゴヌクレオチド 配列には、通常のmRNAを模倣するためのpoly(A)配列が 含まれています。

TotalSeq™-B:捕捉配列は10x Genomics社のFeature Barcode テクノロジーを使用したChromium Single Cell Gene Expression Solution (3'kit, v3以降) に対応しています。

TotalSeq™-C: 捕捉配列は10x Genomics社のChromium Single Cell Immune Profiling Solution (5' kit)に対応しています。 5' kitを使うことで、1細胞レベルの解像度でTCRおよびBCRレパトアを解析できます。





抗体フォーマットの比較

	TotalSeq™-A	TotalSeq™-B	TotalSeq™-C	
10xGenomics社製品との 互換性	Single Cell Gene Expression Solution (3', v2以降) などの poly(A)配列を捕捉に用いる システムであれば使用可能	Feature Barcodingテクノロジーを使用するSingle Cell Gene Expression Solution (3', v3以降)と10x Genomics社のデータ 解析ソフトウェア ¹ に互換性あり	Feature Barcodingテクノロジーを使用する Single Cell Immune Profiling Solution (5' kit)と 10x Genomics社のデータ解析ソフトウェア'に 互換性あり	
PCRハンドル	CCTTGGCACCCGAGAATTCCA	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNN	CGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNNNNN	
捕捉配列	Poly-A [(A)30*A*A³]	NNNNNNNNGCTTTAAGGCCGGTCCTAGC*A*A4	NNNNNNNNCCCATATAAGA*A*A4	
次世代シーケンサーの 互換性	イルミナ社の装置に 互換性あり	イルミナ社の装置に互換性あり	イルミナ社の装置に互換性あり	

注意事項:

- 10x Genomics社のデータ解析ソフトウェアは、 Cell Hashing解析には対応しておりません。
- Nは増幅バイアスを防ぐためのランダムな短い ヌクレオチド配列を表します。
- 3. アスタリスク(*) はヌクレアーゼによる分解を防ぐために付加されたホスホロチオエート結合を示します。
- 4. これらの配列はTotalSeq™-Bおよび-Cに特有のものであり、ニューヨークゲノムセンター(NYGC, CITE-seq.com)の研究グループが使用した試薬とは別に開発されました。
 TotalSeq™-B、-CおよびNYGCで使用された抗体はすべて10x Genomics社製品と互換性がありますが、異なるオリゴヌクレオチド配列を使用しています。そのため、プロトコルやプライマーなどの必要な試薬は抗体のフォーマットにより異なります。TotalSeq™製品を使用する場合は、当社のプロトコルを参照してください。

Customer Service: 858-768-5800

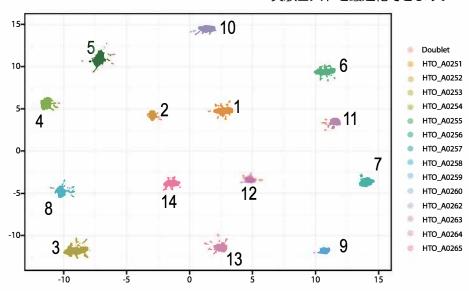
サンプルのマルチプレックス法とHashtag

Cell Hashing (サンプルが細胞の場合)

複数のサンプルを混合してから細胞区分用プラットフォームへ移すために、Hashtag試薬を試してみませんか。Hashtag試薬は普遍的に発現する2種類の細胞表面タンパク質に対する抗体の混合物で、すぐにお使いいただけます。それぞれのHashtag試薬には固有の抗体バーコード配列が付加されています。ヒトサンプル用のHashtag試薬はCD298とβ2-Microglobulinを認識します。マウスサンプル用のHashtag試薬はCD45とH-2 MHC Class Iを認識します。

Cell hashingを使用する利点

- マルチプレットを同定できます。
- 変動を最小限に抑え、バッチ効果を軽減させます。
- 細胞数の少ないサンプルをプールすることで 必要な細胞数を満たすことができます。
- 実験コストを最適化できます。



1名のドナーから採取したヒトPBMCを分注し、それぞれ異なるTotalSeq™-A Hashtag抗体(全部で14種類)で別々に染色後、1つのサンプルとして混合しました。
10x Genomics社のChromium Single Cell Expression (3' Kit, v3.1)で処理し、CITE-seqを行いました。UMAP座標はUMIカウントマトリックスをasinh変換して作成しました。
また、同じマトリックスをDemuxEMアルゴリズムによるdemultiplexに使用し、その結果を基にUMAPプロットの細胞集団クラスターを色分けしました。

Hashtagのフォーマットと考慮すべきこと

Hashtag試薬にはTotalSeq™-A, -B, -Cのフォーマットがあります。全フォーマットのHashtag試薬が同じように機能しますが、ワークフローと必要なプライマーが異なります。

TotalSeq™-A Hashtag Reagents:

- ヒトサンプル用は14種類、マウスサンプル用は 15種類のHashtag抗体をご用意しています。
- 抗体由来タグ(ADT)ライブラリーとHashtagオリゴ (HTO) ライブラリーはそれぞれ単独で作製 されます。そのため、さらなるシーケンシング 条件の最適化が可能です。

TotalSeq[™]-B and -C Hashtag Reagents:

- 各フォーマットにつき10種類のヒトサンプル用と 10種類のマウスサンプル用Hashtag抗体をご用意 しています。
- 抗体由来タグ(ADT)とHashtagオリゴ(HTO)の ライブラリーは、1つのライブラリーとして同時に 作製されます。
- シーケンス深度を最適化するために、事前にHashtag 抗体の使用濃度の条件検討を行い、最適な条件を 用いて抗体染色を行う必要があります。

Nuclear Hashing(サンプルが核の場合)

単一核RNA-seqを利用することで、細胞浮遊液を調製することが難しい組織における細胞の状態や生理機能を解析することができます。例えば、ニューロンや脂肪細胞、筋細胞などの特定の細胞が豊富な組織の場合が該当します。単一核RNA-seqは冷凍保存など組織の保存が必要なサンプルの解析にも有用です。これは、冷凍保存した組織から細胞浮遊液を調製することが難しいためです。

このような解析において、様々なサンプルから分離した核を混合しプールするために開発したのがNuclear Hashing試薬です。核用のHashtag抗体は核膜孔複合体タンパク質(nuclear pore complex proteins)を認識します。この抗体はヒト、マウス、ラット、アフリカツメガエルや酵母など、様々な真核生物に交差反応を示します。

5

抗体カクテル

最適化されたTotalSeq[™]凍結乾燥抗体カクテルを使って、1回の実験で100種類以上の細胞表面マーカーを 調べましょう。1本のチューブに1サンプル分のタイトレーション済み抗体が含まれているので、条件検討の 必要が無く、実験間のばらつきを最小限に抑えることができます。

TotalSeg™抗体カクテル製品を使用する利点

- 1サンプル分ずつ使い切りのチューブに入っているので便利です。
- 複数の抗体を個別に購入する場合と比べて コストを削減できます。
- 最適な性能となるよう、事前に条件検討済みです。
- 異なる実験や異なる研究室間の実験、長期的な研究の際に変動を最小限に抑えます。

Universal Cocktails

TotalSeq[™] Human Universal Cocktail(TotalSeq[™]-A, -Bまたは-Cフォーマット)を使用して、免疫系細胞に対する理解をもっと深めましょう。多くのタンパク質を検出するために、各抗体カクテルには125種類以上の抗体と関連するアイソタイプコントロールが含まれています。各抗体カクテルについて陽性細胞集団と陰性細胞集団を適切に区別するために、それぞれの抗体は次世代シーケンシングの結果を利用して個別にタイトレーションしています。

TotalSeg[™]-A Universal Cocktail v1.0

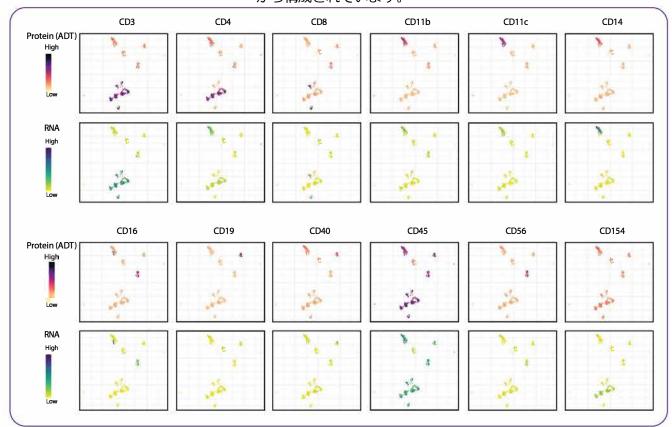
- mRNAの捕捉にpoly(dT)オリゴ ヌクレオチドを用いる細胞 区分用プラットフォームに 対応しています。
- 154種類の一次抗体と9種類の アイソタイプコントロール から構成されています。

TotalSeq[™]-B Universal Cocktail v1.0

- 10x Genomics社のFeature Barcodeテクノロジーを使用 するChromium Single Cell Gene Expression Kit for cell surface protein (v3, v3.1, v3.1 dual index) に対応しています。
- 134種類の一次抗体と6種類の アイソタイプコントロール から構成されています。

TotalSeq[™]-C Universal Cocktail v1.0

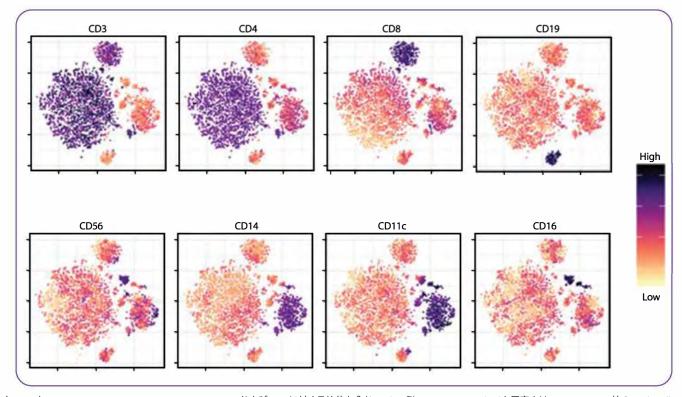
- 10x Genomics社のSingle Cell Immune Profiling Solution (v1, v2) に対応しています。細胞表面タンパク質の発現、転写産物、 完全長のBCRおよびTCR配列を 解析することができます。
- 130種類の一次抗体と7種類の アイソタイプコントロールから 構成されています。



ヒトPBMCをTotalSeq™-A Human Universal Cocktail v1.0 と反応させ、10x Genomics社のChromium Single Cell Gene Expression 3' kit v3.1を用いて処理し、イルミナ社のシーケンサーでデータを取得しました。タンパク質とRNAのカウントデータを変換し、タンパク質およびRNAの発現レベルを重ね合わせてUMAPで視覚化しました。クラスターはタンパク質発現のみに基づいて識別しました。

TBNK Cocktails

TBNK coctailはCD3、CD4、CD8、CD11c、CD14、CD16、CD19、CD45およびCD56の発現によって、T細胞、B細胞およびNK細胞を識別できるように設計されています。TBNK cocktailのフォーマットはTotalSeq™-A、-Bまたは-Cをご用意しています。



ヒトPBMCをCD3、CD4、CD8、CD19、CD56、CD14、CD11cおよびCD16に対する抗体を含むTotalSeq™ Human TBNK Cocktail と反応させ、10x Genomics社のSingle Cell Gene Expression (3' kit, v3 with Feature Barcoding technology)で処理し、イルミナ社のシーケンサーでデータを取得しました。タンパク質のカウントデータを変換し、カクテルの各抗体が検出したタンパク質の発現レベルを重ね合わせてUMAPで視覚化しました。クラスターはタンパク質発現のみに基づいて識別しました。

研究に必要なマーカーが抗体カクテルに含まれていないですか? 個別の抗体をカクテルに追加して、必要なマーカーを加えることができます。 当社の豊富な選択肢の中から、より多くのターゲットを見つけましょう。



biolegend.com

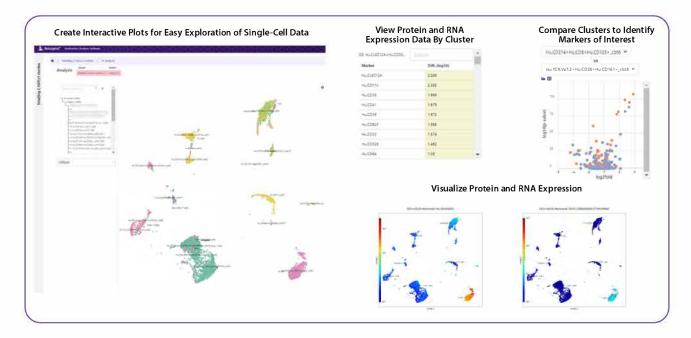
マルチオミクス解析用ソフトウェア (MAS)

1細胞マルチオミクスデータの解析には高度なツールと広範な専門知識が必要になります。データをうまく解析できるかどうかは、リソースを利用できるか、そして研究者の皆様がアプリケーションを快適に使うことができるかといった点が重要になります。データ解析を容易にするために、マルチオミクス解析用ソフトウェア(Multiomics Analysis Software, MAS)を開発しました。MASはクラウドベースのプログラムで無料でお使いいただけます。バイオインフォマティクスに関する詳細な知識が無くても、CITE-seqデータを素早く簡単に調べることができます。

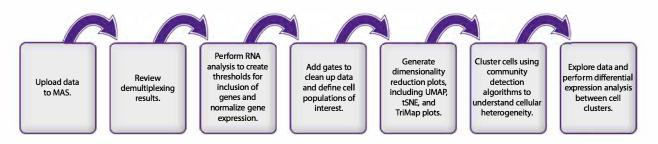
ソフトウェアの特長

- シンプルで使いやすいユーザーインターフェース
- 任意のWebブラウザから利用可能

- TotalSeq™抗体の染色結果に基づく、 フローサイトメトリーのような ゲーティングを使用可能
- UMAPやtSNE、TriMAPといった次元削減 プロットを作成可能



Recommended MAS Workflow



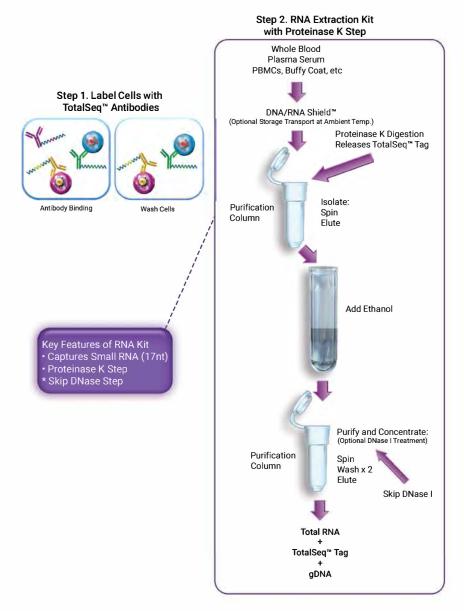
Learn more: biolegend.com/ja-jp/totalseg/mas

Customer Service: 858-768-5800

Bulk Epitope and Nucleic Acid Sequencing (BEN-seq)

一般的に、バルクRNAシーケンシングは不均一な細胞集団や組織サンプルのRNA発現を解析するために使用されます。従来、この方法ではタンパク質を同時に検出したり、1回の実験で複数のタンパク質を検出することはできませんでした。1細胞シーケンスのプロトコルはシーケンシングによるタンパク質検出ができるよう改変されてきましたが、細胞集団全体を使うバルクシーケンスに関しては、これまでそのような方法は開発されていませんでした。

BioLegendとイルミナ社が共同開発したBEN-seqワークフローでは、バルクRNAシーケンスの前に細胞とTotalSeq™-A抗体を反応させます。これにより、細胞表面タンパク質とRNAを同時に解析できます。



Step 3. Isolate TotalSeq™ ADTs and RNAs SAV-mag Beads Loaded with Complementary Oligos RNA + gDNA DNase I Treatment Step 4. Library Prep and Sequencing Purify and Concentrate: Purification Spin Column Elute Concentrated Total RNA (Including Small and Micro RNAs)

Find protocols and download an application note: biolegend.com/ja-jp/totalseq/ben-seq

biolegend.com 9

1細胞レベルでのタンパク質とDNAの検出

オリゴヌクレオチド標識抗体TotalSegTM-Dを用いて、1細胞レベルでの遺伝子解析とタンパク質発現解析を 組み合わせることで、遺伝子型から表現型までの複雑な問題を解決しましょう。1細胞シーケンシングは、 感度を高めて不均一なサンプル中の異なる遺伝子型を分析することが可能です。これは、がんなどの複雑な 疾患を理解するために重要です。

タンパク質発現の検出を加えることでさらに多くの情報を取得でき、次のようなことが可能となります。

- 免疫表現型を同時に解析することで、遺伝子型の 変異が特定の細胞の種類や状態に関連しているか どうかを調べることができます。
- 新規のターゲット発見にも活用できます。
- 一塩基変異 (SNV) や挿入・欠失変異 (Indel) コピー数変異(CNV)とタンパク質を同時に検出する ことで、遺伝子型と表現型を関連付けることが できます。

Mission Bio社のTapestriプラットフォームにBioLegendのTotalSeq™-D抗体を組み合わせて、不均一なサンプルに おける遺伝子変異を明らかにし、その変異とタンパク質発現の関連を調べましょう。

詳細はこちら: biolegend.com/ja-jp/totalseg/single-cell-dna

タンパク質とDNAを同時に検出するためのワークフロー

TotalSeq™-D抗体と 反応させる

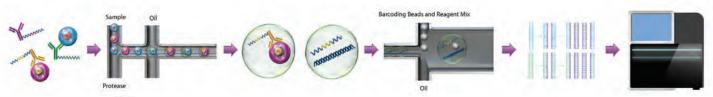
Mission Bio社のTapestri プラットフォームで 1細胞ずつ区分する

細胞を溶解しDNAを クロマチンから遊離 させる

細胞バーコードを 付加する

ターゲットを増幅し ・ ライブラリーを作製する 行い、解析する

シーケンシングを



抗体カクテル

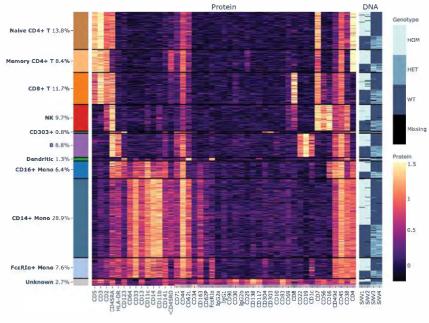
TotalSeq[™]-D抗体はMission Bio社のTapestriプラットフォームに使用できるよう設計されています。それぞれの 抗体は捕捉配列、クローン特異的な抗体バーコード配列、イルミナ社のシーケンシングプラットフォームに 互換性のあるPCRハンドルを含むオリゴヌクレオチドが標識されています。

TotalSeq[™]-D Heme Oncology Cocktail v1.0は42種類の一次抗体と3種類のアイソタイプコントロールから構成 されています。それぞれの抗体は最適な性能を発揮できるよう事前にタイトレーションしています。また、 抗体カクテルは1サンプル分ずつ使い切りのチューブに入っているので便利です。

TotalSeq[™]-D Heme Oncology Cocktail v1.0 Targets:

CD1c	CD10	CD22	CD45	CD64	CD138
CD2	CD11b	CD25	CD45RA	CD69	CD141
CD3	CD11c	CD30	CD45RO	CD71	CD163
CD4	CD13	CD33	CD49d	CD83	CD303
CD5	CD14	CD34	CD56	CD90	CD304
CD7	CD16	CD38	CD62L	CD117	FcεRlα
CD8	CD19	CD44	CD62P	CD123	HLA-DR

Protein Cluster Signature vs Analyte and Barcode, Subsorted by DNA



2名のドナー由来のPBMCを混合し、TotalSeq™-D抗体と反応 させた後、Mission Bio社のTapestriプラットフォームで処理 しました。ヒートマップで視覚化することにより、何千もの 細胞にわたって同一細胞から遺伝子型とタンパク質発現の データを同時に取得できることが分かります。

Customer Service: 858-768-5800

参考資料

動画とウェビナー

TotalSeq™製品についてもっと知りたい方、どのように研究に価値を付加することができるのか知りたい方は、紹介動画やウェビナー(録画)をご覧ください。

下記のような動画をご用意しています

- Simultaneous Proteomics and Transcriptomics Powered by TotalSeq™ Comprehensive Multiomics Solutions for T and B Cells
- · Multimodal Techniques for High Content and High Throughput Cellular Phenotyping
- · Getting a Grasp on Multimodal Single-Cell Omics Data
- · Single-Cell Biology of Barrier Tissues and COVID-19

詳細はこちら: biolegend.com/ja-jp/video-library

ブログと記事

抗体の条件検討のためのヒント、CITE-seqの基本、単一細胞分離法の概要など、1細胞マルチオミクスの詳細についてはブログをご覧ください。

詳細はこちら: biolegend.com/ja-jp/blog

eBookとアプリケーションノート

eBookとアプリケーションノートをダウンロードして、マルチオミクス実験におけるTotalSeq™試薬の有用性を 学びましょう。

- eBook: The Evolution and Future of Single-Cell Proteogenomics
- Correlated Expression of Protein and RNA Using Bulk and Single-Cell Proteogenomics
- Single-Cell Multiomics Reveals Novel Correlations Between Genomics Variants and Protein Expression in AML Patient Samples

ダウンロードはこちら: biolegend.com/ja-jp/literature

プロトコル

シーケンシングワークフローにおけるTotalSeq™製品の使用方法は、プロトコルで段階ごとにご説明しています。 詳細はこちら: biolegend.com/ja-jp/technical-protocols

注目の論文

Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift Between Mild and Moderate COVID-19

Su, Yapeng et al. Cell, 183:6, 1479 – 1495 (2020).

この研究では190種類以上のTotalSeq™抗体から構成されるパネルを用いてCITE-seqを行い、新規の免疫系細胞を同定しました。この細胞集団は中等度のCOVID-19患者で出現が確認され、重症になると増加しました。

A Conserved Dendritic Cell Regulatory Program Limits Antitumour Immunity

Maier, B. et al. Nature, 580, 257-262 (2020).

免疫チェックポイント阻害は、持続的な抗腫瘍反応を誘導する新しいがんの治療法です。この研究は、PD-L1の阻害によるネオアジュバント療法後に全身性の抗腫瘍T細胞免疫の増強が起こるメカニズムを理解することを目的としています。1細胞レベルでのプロテオゲノミクスを用いることで、抗腫瘍活性を制限しIL-4の発現によって誘導される、樹状細胞の調節プログラムが特定されました。

Buyer is solely responsible for determining whether Buyer has all intellectual property rights that are necessary for Buyer's intended uses of the BioLegend TotalSeq™ products. For example, for any technology platform Buyer uses with TotalSeq™, it is Buyer's sole responsibility to determine whether it has all necessary third party intellectual property rights to use that platform and TotalSeq™ with that platform.





輸入販売元

02-0025-01

BioLegend products are manufactured in an ISO 13485:2016-certified facility to ensure the highest quality standards.

858.768.5800 | biolegend.com

Digital Biology®

トミーデジタルバイオロジー株式会社 〒112-0002 東京都文京区小石川1-1-17日本生命春日駅前ビル 3階 email: info_ap@digital-biology.co.jp phone: 03-6240-0843