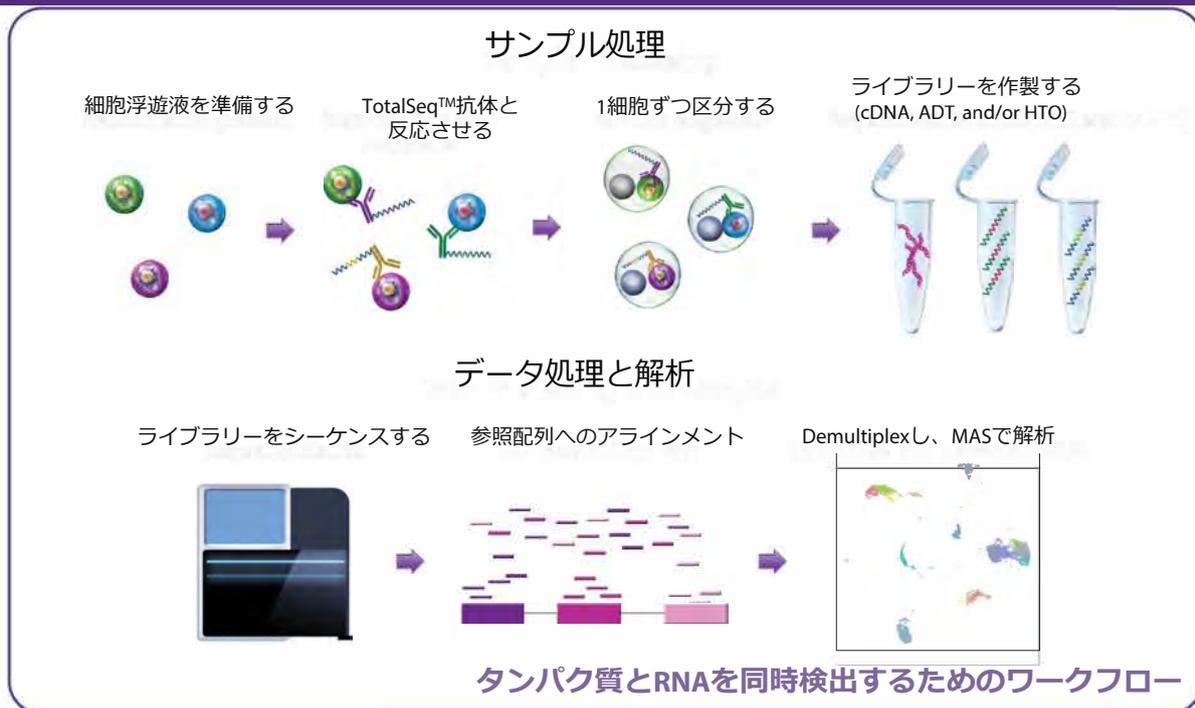


マルチオミクス解析用試薬 TotalSeq™

何が個々の細胞を特徴づけるのか解明するための包括的なソリューション



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。

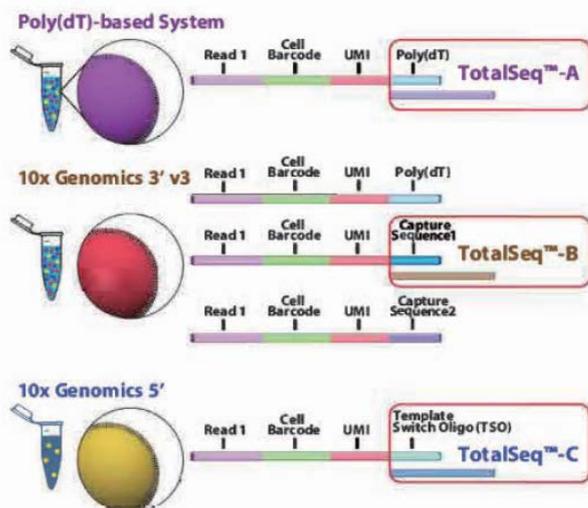
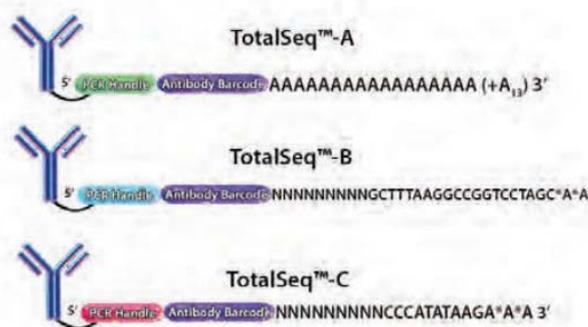
1. 捕捉配列
2. クローン特異的な抗体バーコード配列
3. イルミナ社のシーケンシング試薬および機器に互換性のあるPCRハンドル

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シングルセル遺伝子発現ソリューション (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シングルセル免疫プロファイリングソリューション (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T細胞受容体およびB細胞受容体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
10x Genomics社製品との互換性	シングルセル遺伝子発現ソリューション (3' kit, 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シングルセル遺伝子発現ソリューション (3' kit, 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シングルセル免疫プロファイリングソリューション (5' kit) と10x Genomics社のデータ解析ソフトウェア ¹ に互換性あり
PCR ハンドル	CCTTGGCACCCGAGAATTCGA	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTNNNNNNNNNN ²	CGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNNNNN
捕捉配列	Poly-A [(A) ₃₀ *A ³]	NNNNNNNNNGCTTTAAGGCCGGTCTAGC*A*A ⁴	NNNNNNNNNCCCATATAAGA*A*A ⁴
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解析には対応していません。
- 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。
- 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チオエート結合を示します。
- 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。

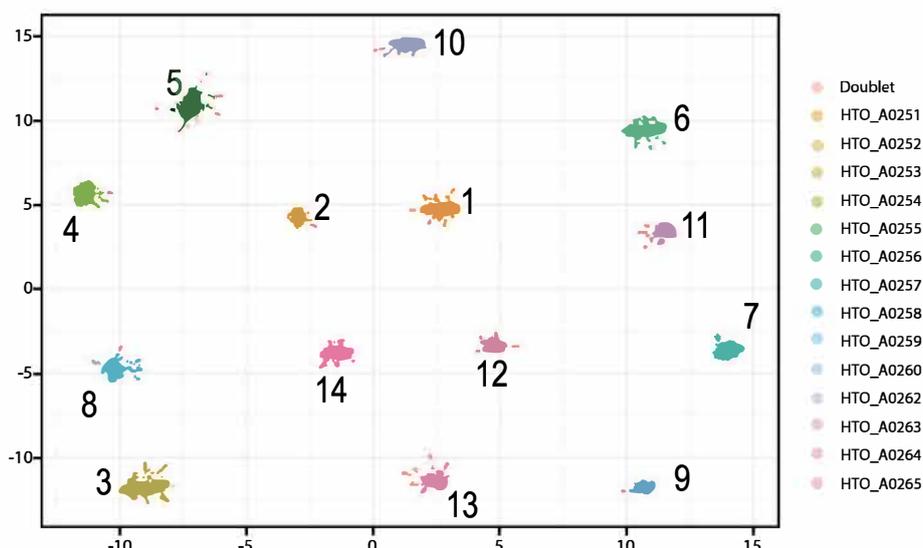
サンプルのマルチプレックス法とHashtag

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します。



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シングルセル遺伝子発現ソリューション 3' kit, v3.1で処理後、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抗体をご用意しております。
- 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Hashtag抗体と10種類のマウスサンプル用Hashtag抗体をご用意しております。
- 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、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。

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。

TotalSeq™抗体カクテル製品を使用する利点

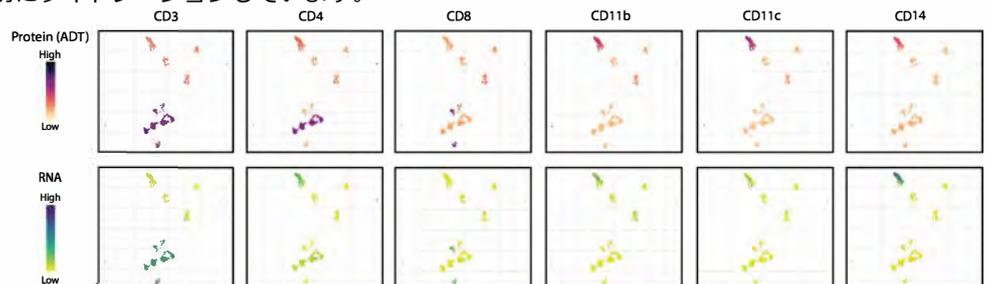
- 便利な使い捨てチューブ入りです。
- 異なる実験や異なる研究室間の実験、長期的な研究の際に、変動を最小限に抑えます。
- 複数の抗体を個別に購入する場合に比べ、コストを削減できます。
- 最適な性能となるよう、事前に条件検討済みです。

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。

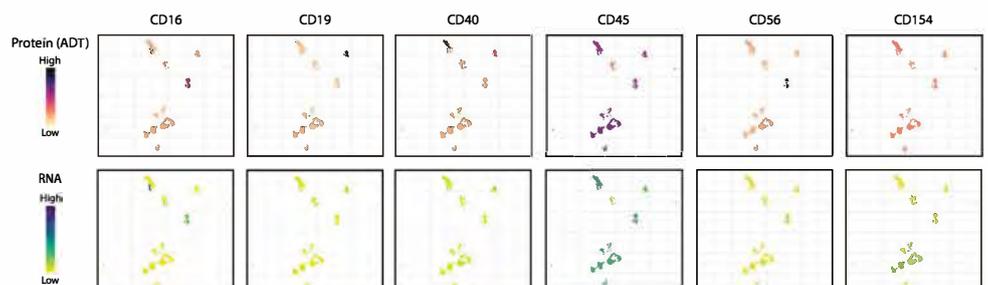
TotalSeq™-A Universal Cocktail v1.0

- mRNAの捕捉にpoly(dT)オリゴヌクレオチドを用いる単一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™-C Universal Cocktail v1.0

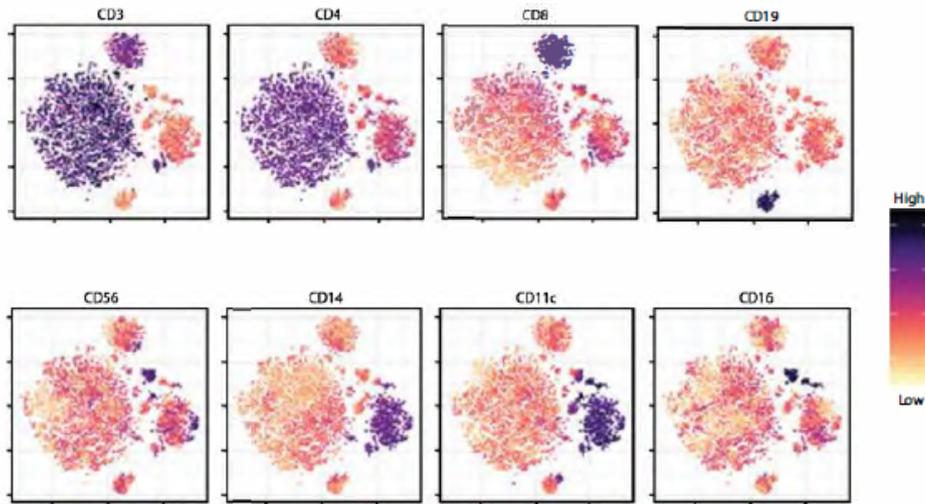
- 10x Genomics社のシングルセル免疫プロファイリングソリューションv1およびv2に対応しています。細胞表面タンパク質の発現、転写産物、完全長のBCRおよびTCR配列を解析することができます。
- 130種類の一次抗体と7種類のアイソタイプコントロールから構成されています。



ヒトPBMCをTotalSeq™-A Human Universal Cocktail v1.0と反応させ、10x Genomics社のシングルセル遺伝子発現ソリューション（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 cocktail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社のシングルセル遺伝子発現ソリューション（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。

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TotalSeq™-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。

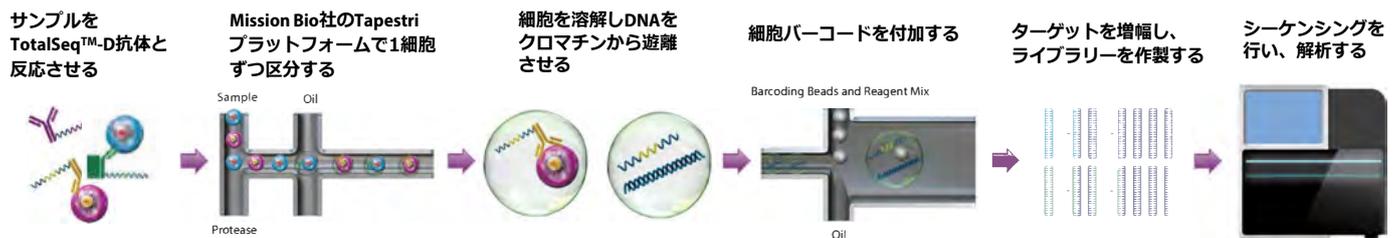
タンパク質発現の検出を加えることでさらに多くの情報を取得でき、次のようなことが可能となります。

- 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抗体を組み合わせることで、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。

Learn more: biolegend.com/ja-jp/totalseq/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



抗体カクテル

TotalSeq™-D抗体はMission Bio社のTapestriプラットフォームで使用できるように設計されています。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、抗体カクテルは便利な使い捨てチューブ入りです。

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	CD168
CD4	CD13	CD33	CD49d	CD83	CD308
CD5	CD14	CD34	CD56	CD90	CD304
CD7	CD16	CD38	CD62L	CD117	FcεR1a
CD8	CD19	CD44	CD62P	CD123	HLA-DR