

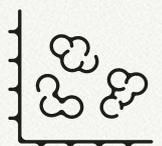
# illumina Single Cell 3' RNA Prep

ScRNA-Seq accessibile e scalabile

Flusso di lavoro da banco semplice e conveniente,  
che può essere completato da utenti di qualsiasi  
livello di esperienza

Elevata sensibilità del saggio per rilevare più geni  
e trascritti

Intervallo di elaborazione economicamente  
efficiente fino a centinaia di migliaia di cellule  
per rilevare anche tipi di cellule rare



## Introduzione

Il sequenziamento dell'RNA di singole cellule (scRNA-Seq, Single-cell RNA sequencing) associa la cattura di singole cellule e la codifica con codice a barre al sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) per fornire una visione ad alta risoluzione dei tessuti complessi. I ricercatori possono utilizzare l'scRNA-Seq per studiare popolazioni cellulari eterogenee, scoprire tipi di cellule rare e caratterizzare i processi patologici e dello sviluppo a livello cellulare. Tuttavia, la necessità di un'eccellente strumentazione specifica, gli elevati costi dei reagenti e la scalabilità limitata hanno rallentato l'adozione generalizzata del sequenziamento di singole cellule. Illumina Single Cell 3' RNA Prep rivoluziona questo panorama.

Illumina Single Cell 3' RNA Prep\* consente la cattura di RNA messaggero (mRNA, messenger RNA) di singole cellule, la codifica con codice a barre e la preparazione delle librerie senza flussi di lavoro complessi o microfluidica. Abbinato alle soluzioni informatiche e al sequenziamento Illumina, Illumina Single Cell 3' RNA Prep fornisce un flusso di lavoro semplice e scalabile (Figura 1) che rende l'scRNA-Seq ad alte prestazioni accessibile a molti più laboratori.

## Flusso di lavoro accessibile

Il flusso di lavoro di Illumina Single Cell 3' RNA Prep è facile da implementare e non richiede costose apparecchiature microfluidiche o protocolli laboriosi.<sup>1</sup> Gli utenti possono condurre studi su singole cellule direttamente dalla propria postazione utilizzando un flusso di lavoro manuale semplice con punti di arresto flessibili. Per campioni raccolti nel corso del tempo o che richiedono il trasporto, il saggio è compatibile con la fissazione con DSP-metanolo<sup>†</sup> prima dell'elaborazione dei campioni, ampliando così l'utilità degli esperimenti scRNA-Seq.

## Come funziona il saggio

Illumina Single Cell 3' RNA Prep utilizza la nuova chimica PIPseq™ per la cattura semplice e scalabile dell'mRNA di singole cellule e la codifica con codice a barre (Figura 2).<sup>1</sup> Le partizioni istantanee a modello di particelle (PIP, particle-templated instant partition) utilizzano l'emulsificazione con modellazione di particelle che includono oligonucleotidi con codice a barre legati a microsferi in idrogel. Durante la preparazione dei campioni, la sospensione cellulare di interesse viene miscelata con particelle modello e olio e separata in emulsioni con modellazione mediante vortex. Le cellule nelle emulsioni vengono quindi lisate e l'mRNA viene catturato dai modelli con codice a barre.

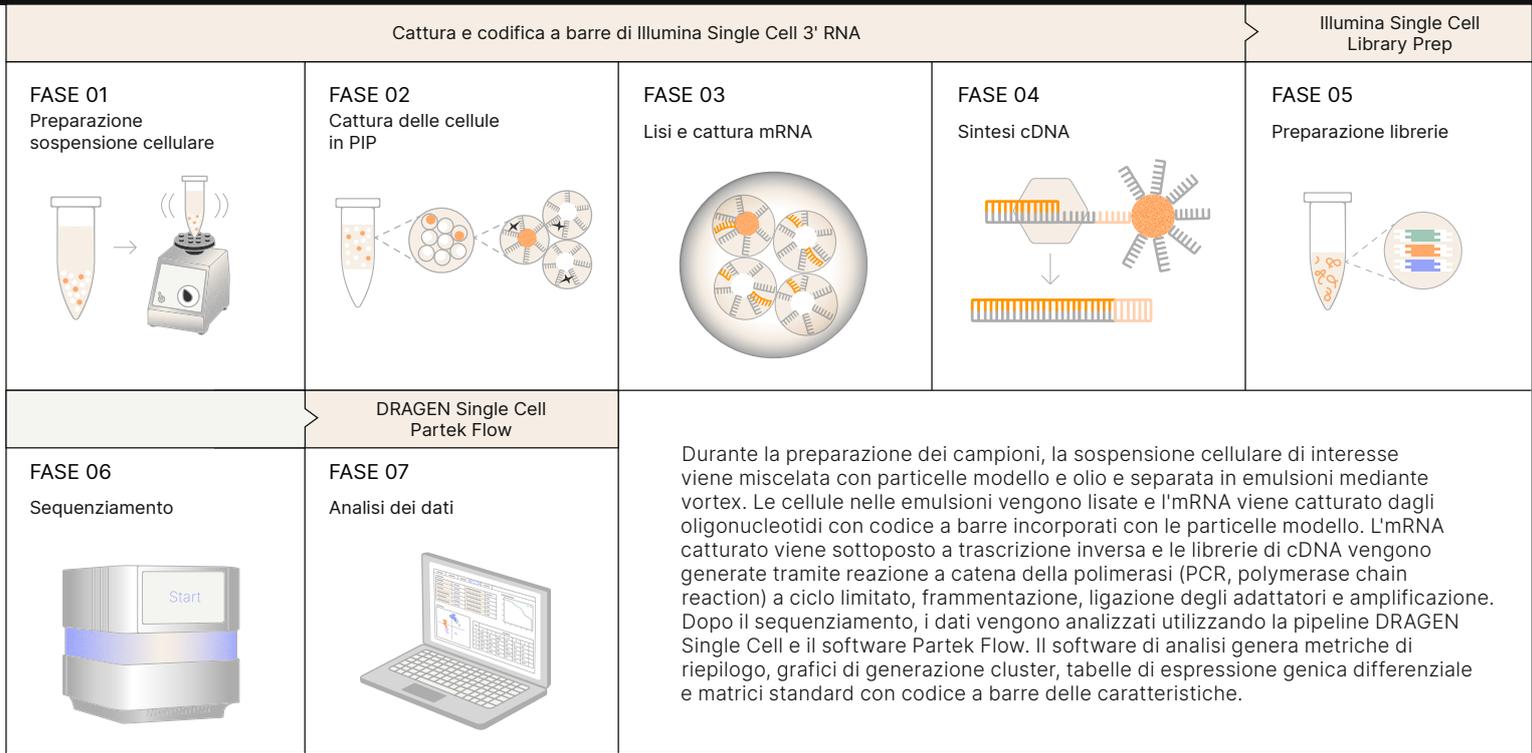
\* In precedenza Illumina Single Cell 3' RNA Prep era chiamato Fluent PIPseq V 3' Single Cell RNA Kit.

† DSP, ditiobis (succinimidil propionato).

Figura 1: flusso di lavoro Illumina Single Cell 3' RNA Prep



Figura 2: cattura di mRNA di singole cellule e codifica con codice a barre con chimica PIPseq

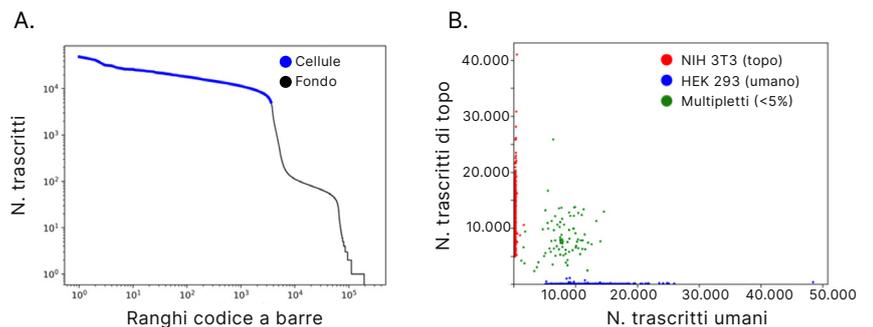


L'emulsione viene rotta e il DNA complementare (cDNA, complementary DNA) viene generato dall'mRNA catturato mediante trascrizione inversa e amplificato al fine di creare una libreria di cDNA per ogni singola cellula. Le librerie di cDNA a singola cellula vengono quindi elaborate in librerie di sequenziamento utilizzando metodi di preparazione delle librerie standard seguiti da NGS. I dati di sequenziamento vengono analizzati utilizzando la pipeline DRAGEN™ Single Cell e il software Partek™ Flow.

### Prestazioni di alta qualità

Illumina Single Cell 3' RNA Prep offre dati di alta qualità con elevata sensibilità per trascritti e geni (Figura 3, Figura 4, Tabella 1). La tecnica di isolamento delicato consente il rilevamento di cellule fragili spesso non rilevate con altri metodi.

Figura 3: l'scrRNA-Seq ad alta risoluzione cattura l'mRNA da singole cellule



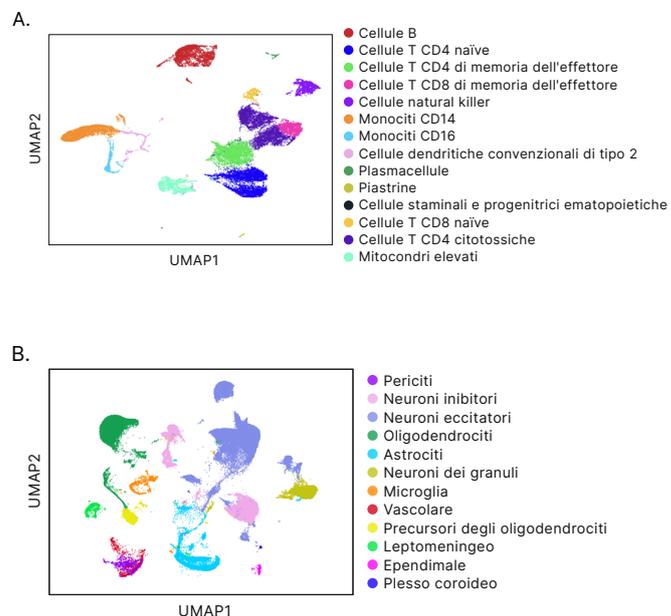
(A) Grafico a ranghi per codici a barre e (B) grafico a dispersione per gruppo con coltura mista di linee cellulari NIH3T3 (topo) e HEK 293 (umano), 4.106 cellule rilevate, tasso di cattura dell'80% e meno del 5% di multipli (due o più cellule nella stessa reazione) con kit Illumina Single Cell 3-RNA Prep T2.

La versione più recente della chimica PIPseq riduce l'RNA ambientale di fondo, migliorando la sensibilità del 30% per geni e trascritti in determinati tipi di cellule<sup>2</sup> e riducendo gli artefatti del sequenziamento per dati NGS più utilizzabili.

## Soluzione flessibile e scalabile

Grazie al semplice metodo basato su vortex, Illumina Single Cell 3' RNA Prep offre una scalabilità economicamente efficiente. Per grandi volumi di cellule, utilizzare provette PIP con volume maggiore.<sup>1</sup> L'ampio intervallo di elaborazione, da centinaia a centinaia di migliaia di cellule, supporta le esigenze correlate alle applicazioni di ricerca, da progetti pilota e a bassa diversità cellulare all'analisi tissutale complessa.<sup>1</sup> Le configurazioni attuali del kit consentono la profilazione fino a 2.000 cellule per campione (kit T2), 10.000 cellule per campione (kit T10), 20.000 cellule per campione (kit T20) o 100.000 cellule per campione (kit T100). La capacità del saggio di aumentare la processività cellulare consente una migliore individuazione di tipi di cellule rare (Figura 5). Grazie ai 96 indici doppi univoci disponibili, il multiplex campioni consente agli utenti l'analisi parallela di un numero elevato di campioni (Tabella 2).

Figura 4: scRNA-Seq ad alta risoluzione per adattarsi alla scala e all'applicazione sperimentale



(A) Approssimazione e proiezione uniformi del collettore (UMAP, uniform manifold approximation and projection) di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) umano crioconservate, 31.613 cellule rilevate e tasso di cattura del 79% con kit Illumina Single Cell 3' RNA Prep T20. (B) UMAP di nuclei di cervello di topo da tessuto congelato, 155.000 nuclei rilevati e tasso di cattura del 78% con kit Illumina Single Cell 3' RNA Prep T100.

Tabella 1: prestazioni convalidate di Illumina Single Cell 3' RNA Prep su sistemi di sequenziamento Illumina

Tipo di cellula	Dimensione del kit	Sistema di sequenziamento	Dimensioni	Letture	Cellule	Letture per cellula
HEK/3T3	T2	NextSeq 2000 System	9,8 Gb	140 milioni	3.611	38.633
HEK/3T3	T10	NextSeq 2000 System	23,6 Gb	333 milioni	10.723	31.140
PBMC	T10	NovaSeq 6000 System	390 Gb	2,7 miliardi	14.307	190.526
PBMC	T20	NovaSeq X Plus System	81,3 Gb	674 milioni	31.613	21.314
Nuclei di polmone di topo	T20	NextSeq 2000 System	8,9 Gb	131 milioni	2.768	47.276
Nuclei di cervello di topo	T20	NextSeq 2000 System	10,4 Gb	155 milioni	2.019	76.784
Nuclei di cervello di topo (fissi)	T20	NextSeq 2000 System	39,5 Gb	590 milioni	34.596	17.041
Nuclei di cervello di topo	T100	NextSeq 2000 System	176,6 Gb	2,6 miliardi	155.000	17.068

## Applicazioni per singola cellula

L'accessibilità, la precisione e la sensibilità di Illumina Single Cell 3' RNA Prep consentono nuove ricerche e nuove scoperte. L'elaborazione di un numero elevato di cellule accelererà i progetti dell'atlante cellulare per gli stati normali e patologici e consente gli screening genomici funzionali su scala genomica. Un'adozione più ampia di scRNA-Seq risulta particolarmente vantaggiosa per i laboratori che studiano il cancro, l'immunologia, le neuroscienze e altre patologie complesse.<sup>3-9</sup>

### scRNA-Seq per le neuroscienze

I tessuti neuronali comprendono una complessa organizzazione di diversi tipi di cellule che si riorganizzano e rimodellano continuamente per tutta la vita di un organismo. scRNA-Seq è uno strumento prezioso per catalogare la reale diversità delle popolazioni di cellule neuronali con sensibilità trascrizionale, fornendo informazioni su:

- Malattie neuroevolutive e neurodegenerative<sup>9</sup>
- Ruoli precedentemente sconosciuti di specifiche popolazioni neuronali<sup>9</sup>
- Effetto delle cellule neuroimmuni sulla patologia e sullo sviluppo<sup>10</sup>

### scRNA-Seq per la ricerca sul cancro

Il cancro è una malattia dinamica e diversificata che coinvolge popolazioni cellulari complesse. La comprensione dei tipi di cellule e delle mutazioni che coinvolgono il cancro richiede metodi sofisticati. scRNA-Seq è uno strumento fondamentale per:

- Dettagliare l'eterogeneità del microambiente tumorale<sup>4,5,11,12</sup>
- Identificare nuovi biomarcatori tumorali<sup>13,14</sup>
- Comprendere i meccanismi dell'immunoterapia e della resistenza ai farmaci<sup>3</sup>

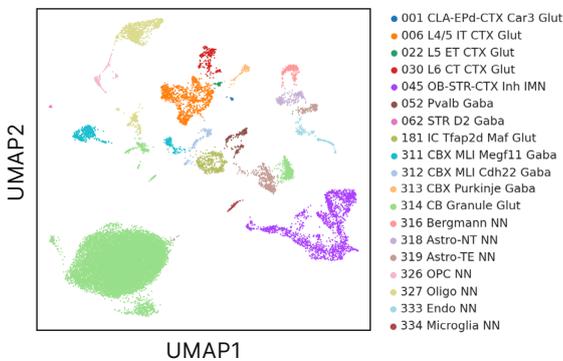
### scRNA-Seq per l'immunologia

Il sistema immunitario è composto da una complessa gerarchia di diversi tipi di cellule che operano in sinergia per identificare, individuare ed eliminare i patogeni. Grazie a scRNA-Seq i ricercatori sono in grado di:

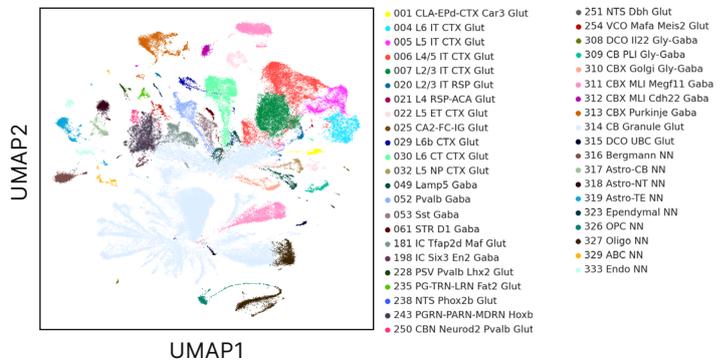
- Comprendere i percorsi di sviluppo e differenziazione nelle popolazioni di cellule immunitarie<sup>15</sup>
- Valutare i ruoli e le funzioni delle popolazioni di cellule immunitarie<sup>12,16</sup>
- Studiare la risposta immunitaria ai patogeni<sup>6</sup>

Figura 5: l'aumento della scala sperimentale con Illumina Single Cell 3' RNA Prep rivela più tipi di cellule

A. scRNA-Seq basato sulla microfluidica (20.000 cellule)



B. Illumina Single Cell 3' RNA Prep (più di 120.000 cellule)



(A) L'scRNA-Seq basato sulla microfluidica su 20.000 cellule ha identificato 19 tipi di cellule distinte dai nuclei di cervello di topo. (B) Illumina Single Cell 3' RNA Prep utilizzato su più di 120.000 cellule della stessa preparazione del campione dei nuclei di cervello di topo ha identificato 42 tipi di cellule distinte: 17 dei 19 sono stati identificati mediante scRNA-seq basato sulla microfluidica più 25 tipi di cellule aggiuntivi.

Tabella 2: esempio di processività del campione per cella a flusso per Illumina Single Cell 3' RNA Prep<sup>a</sup>

Sistema	NextSeq 550		NextSeq 1000/2000				NovaSeq 6000				NovaSeq X		
Cella a flusso	Media	Alta	P1	P2	P3 <sup>b</sup>	P4 <sup>b</sup>	SP	S1	S2	S4	1.5B	10B	25B
Output per cella a flusso (letture)	130 milioni	400 milioni	100 milioni	400 milioni	1,2 miliardi	1,8 miliardi	800 milioni	1,6 miliardi	4,1 miliardi	10 miliardi	1,6 miliardi	10 miliardi	26 miliardi
Dimensione del kit	N. di campioni per cella a flusso												
T2	1	4	1	4	12	18	8	16	41	100 <sup>c</sup>	16	100 <sup>c</sup>	260 <sup>c</sup>
T10	-	1	-	1	3	5	2	4	12	29	4	29	76
T20	-	-	-	-	1	2	1	2	5	12	2	12	32
T100	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	2	6

a. Calcoli basati su 20.000 letture per cella di input. T2 richiede 5.000 celle di input e 100 milioni di letture per campione. T10 richiede 17.000 celle di input e 340 milioni di letture per campione. T20 richiede 40.000 celle di input e 800 milioni di letture per campione. T100 richiede 200.000 celle di input e 4 miliardi di letture per campione.

b. Le celle a flusso P3 e P4 sono disponibili solo su NextSeq 2000 System.

c. Illumina Single Cell Unique Dual Indexes offre 96 indici per 96 campioni. Con il caricamento di singole corsie è possibile analizzare oltre 96 campioni per cella a flusso. Utilizzare il flusso di lavoro NovaSeq 6000 Xp per il caricamento di singole corsie su NovaSeq 6000 System.

## Applicazioni multiomiche

Illumina Single Cell 3' RNA Prep è compatibile con altre misurazioni multiomiche.<sup>1,17</sup> Il saggio consente la reinterrogazione dell'mRNA catturato per applicazioni personalizzate per singola cellula. Il cDNA generato durante la trascrizione inversa rimane legato alle microsfere di idrogel consentendo il riutilizzo per ulteriori reazioni di arricchimento o amplificazione. Questa versatilità sperimentale consente ai ricercatori l'esecuzione di studi multiomici più ampi e diversificati senza i vincoli tecnologici o di budget legati ad altri approcci a singola cellula.

## Riepilogo

L'analisi NGS di singole cellule consente nuove opportunità di scoperta nella ricerca sul cancro, nell'immunologia, nelle neuroscienze e in molti altri campi. Illumina Single Cell 3' RNA Prep è una soluzione scRNA-Seq accessibile e altamente scalabile che consente ai ricercatori che si occupano di singole cellule, che siano neofiti o esperti, di ampliare le proprie capacità di scoperta. Il flusso di lavoro manuale semplificato include la cattura di mRNA, la codifica con codice a barre e la preparazione delle librerie che si integrano perfettamente con i sistemi di sequenziamento e il software di analisi dei dati di Illumina. Illumina Single Cell 3' RNA Prep offre prestazioni elevate e facilità d'uso per consentire a molti più laboratori di sfruttare le capacità dell'scrRNA-Seq.

### MAGGIORI INFORMAZIONI →

[Illumina Single Cell 3' RNA Prep](#)

[Sequenziamento dell'RNA di singole cellule](#)

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T2 (8 samples, 2000 cells/sample)	20135689
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T10 (8 samples, 10,000 cells/sample)	20135691
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T20 (4 samples, 20,000 cells/sample)	20135692
Illumina Single Cell 3' RNA Prep, T100 (2 samples, 100,000 cells/sample)	20135693
Illumina Single Cell Unique Dual Indexes (96 indexes, 96 samples)	20132788
Illumina Single Cell Library Prep (8 reactions)	20132789
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T2 (8 samples, 2000 cells/sample)	20132790
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T10 (8 samples, 10,000 cells/sample)	20132791
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T20 (4 samples, 20,000 cells/sample)	20132792
Illumina Single Cell 3' RNA Capture, T100 (2 samples, 100,000 cells/sample)	20132793
Illumina Single Cell Nuclei Isolation Kit (4 samples)	20132795
Illumina Single Cell Supplemental Enrichment and Amplification Kit	20132794
Illumina Single Cell Prep Starter Equipment	20132796

## Bibliografia

- Clark IC, Fontanez KM, Meltzer RH, et al. [Microfluidics-free single-cell genomics with templated emulsification](#). *Nat Biotechnol.* 2023;41(11):1557-1566. doi:10.1038/s41587-023-01685-z.
- Fontanez KM, Agam Y, Bevans S, et al. [Intrinsic molecular identifiers enable robust molecular counting in single-cell sequencing](#). *bioRxiv.* 2024;2024.10.04.616561; doi:10.1101/2024.10.04.616561.
- Ali A, Manzoor S, Ali T, et al. [Innovative aspects and applications of single cell technology for different diseases](#). *Am J Cancer Res.* 2024;14(8):4028-4048. doi:10.62347/VUFU1836.
- Tirosh I, Suva ML. [Cancer cell states: Lessons from ten years of single-cell RNA-sequencing of human tumors](#). *Cancer Cell.* 2024;42(9):1497-1506. doi:10.1016/j.ccell.2024.08.005.
- Xiang L, Rao J, Yuan J, Xie T, Yan H. [Single-Cell RNA-Sequencing: Opening New Horizons for Breast Cancer Research](#). *Int J Mol Sci.* 2024;25(17):9482. doi:10.3390/ijms25179482.
- Chang JT, Liu LB, Wang PG, An J. [Single-cell RNA sequencing to understand host-virus interactions](#). *Viral Sin.* 2024;39(1):1-8. doi:10.1016/j.virs.2023.11.009.
- Hanna SJ, Tatovic D, Thayer TC, Dayan CM. [Insights From Single Cell RNA Sequencing Into the Immunology of Type 1 Diabetes- Cell Phenotypes and Antigen Specificity](#). *Front Immunol.* 2021;12:751701. doi:10.3389/fimmu.2021.751701.
- Liu L, Davidorf B, Dong P, Peng A, Song Q, He Z. [Decoding the mosaic of inflammatory bowel disease: Illuminating insights with single-cell RNA technology](#). *Comput Struct Biotechnol J.* 2024;23:2911-2923. doi:10.1016/j.csbj.2024.07.011.
- Yang B, Hu S, Jiang Y, Xu L, Shu S, Zhang H. [Advancements in Single-Cell RNA Sequencing Research for Neurological Diseases](#). *Mol Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-024-04126-3.
- Maeda C, Tsuruta F. [Molecular Basis of Neuronal and Microglial States in the Aging Brain and Impact on Cerebral Blood Vessels](#). *Int J Mol Sci.* 2024;25(8):4443. doi:10.3390/ijms25084443.
- Liang L, Zhang C, Han J, et al. [Heterogeneity of tumor microenvironment cell groups in inflammatory and adenomatous polyposis coli mutant colorectal cancer based on single cell sequencing](#). *Transl Cancer Res.* 2024;13(9):4813-4826. doi:10.21037/tcr-24-689.

12. Zhang S, Zhang X, Xiahou Z, Zuo S, Xue J, Zhang Y. [Unraveling the ecological landscape of mast cells in esophageal cancer through single-cell RNA sequencing](#). *Front Immunol*. 2024;15:1470449. doi:10.3389/fimmu.2024.1470449.
13. Yang F, Gan L, Pan J, Chen Y, Zhang H, Huang L. [Integrated Single-Cell RNA-Sequencing Analysis of Gastric Cancer Identifies FABP1 as a Novel Prognostic Biomarker](#). *J Oncol*. 2022;2022:4761403. doi:10.1155/2022/4761403.
14. Chen M, Zhu X, Zhang L, Zhao D. [COL5A2 is a prognostic-related biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer based on transcriptomics and single-cell RNA sequencing](#). *BMC Med Genomics*. 2023;16(1):220. doi:10.1186/s12920-023-01659-9.
15. Bukhari S, Henick BS, Winchester RJ, et al. [Single-cell RNA sequencing reveals distinct T cell populations in immune-related adverse events of checkpoint inhibitors](#). *Cell Rep Med*. 2023;4(1):100868. doi:10.1016/j.xcrm.2022.100868.
16. Chen S, Zhu J, Hua C, et al. [Single-cell RNA Sequencing Reveals the Diversity of the Immunological Landscape Response to Genital Herpes](#). *Virology*. doi:10.1016/j.virus.2024.10.003.
17. Peretz CAC, Kennedy VE, Walia A, et al. [Multiomic single cell sequencing identifies stemlike nature of mixed phenotype acute leukemia](#). *Nat Commun*. 2024;15(1):8191. doi:10.1038/s41467-024-52317-2.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-03195 ITA v1.0