

新格元单细胞产品适配DNBSEQ测序平台赋能多组学研究

GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒在华大智造MGISEQ-2000测序仪上的实测数据展示

新格元基于自有技术开发的GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒可在单细胞层面同时实现免疫图谱分析和全转录组分析。新格元基于此试剂盒制备了V(D)J文库（TCR、BCR文库）和RNA转录组文库并分别在华大智造MGISEQ-2000测序仪和Vendor X测序仪上完成了测序工作。后续的综合性能比较分析表明，此试剂盒可完美适配华大智造DNBSEQ测序平台且与Vendor X性能相当。

推荐应用：V(D)J转录本和全mRNA图谱分析

推荐机型：MGISEQ-2000RS

• 多组学方案赋能全方位图谱分析

相关试剂盒可在单细胞层面上同时检测T细胞或B细胞受体可变区(CDR3)和转录组的表达水平。

• 多方面性能表现优越

相关试剂盒有着高捕获效率，高特异性以及高配对率等优势。

• 与DNBSEQ测序平台完美适配

MGIEasy通用文库转换试剂盒可使相关试剂盒与华大智造DNBSEQ测序平台完美适配。

• 高质量的测序数据

DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率、低标签跳跃率等重要特性。



背景介绍

在疾病研究的过程中，为了鉴定特定的T细胞或者B细胞是否在扩增，T细胞受体（T cell receptor, TCR）和B细胞受体（T cell receptor, BCR）测序被广泛应用。此测序可以特异地针对疾病相关的靶点，所以常被用于肿瘤研究，从中获得的深度免疫学图谱信息也可应用于其他的疾病类型。新格元生物科技是一家提供单细胞测序技术的公司且被业内高度认可，其开发的有关RNA转录组分析以及V(D)J文库的试剂盒被广泛用于临床诊断、药物开发以及健康管理领域。

对于单细胞或者单核RNA的文库制备过程，新格元GEXSCOPE® 试剂盒提供了一个简易的流程。GEXSCOPE® 试剂盒的流程始于从组织中制备单细胞或者单核悬浮液，随后单细胞或者单核悬浮液被加载到新格元开发的一种便携式的微流控芯片——SCOPE-chip®上。SCOPE-chip®上面有许多的微孔，微孔上可以进行多个反应，如单细胞分离，细胞裂解以及单细胞mRNA捕获（图1）。以上这些操作过程可以手工进行也可以利用新格元Matrix®仪器实现自动化操作，Matrix®仪器可以同时运行两张芯片，从细胞悬液的加载到收集RNA包被的磁珠仅需要30分钟。

GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒是新格元GEXSCOPE®试剂盒产品之一，其可以检测TCR以及BCR中的CDR3序列，同时可以在单细胞水平上检测全转录组的表达情况。GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒含有RNA捕获磁珠，磁珠上特异设计的探针用于捕获TCR或BCR的恒定区，进而构建了V(D)J文库，磁珠上的poly-dT用于捕获同一个细胞全部的mRNA以构建全转录组文库。

华大智造基于DNBSEQ技术推出的测序平台拥有高准确度和灵敏度、超低重复率、低标签跳跃率等优势。而有关新格元文库在华大智造DNBSEQ测序平台上测序的报道较少。本研究选取新格元开发的GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒构建RNA 转录组以及 V(D)J 文库在华大智造MGISEQ-2000以及Vendor X测序仪上进行测序，并对这两个平台上产生的测序数据进行了综合性的性能评估比较。

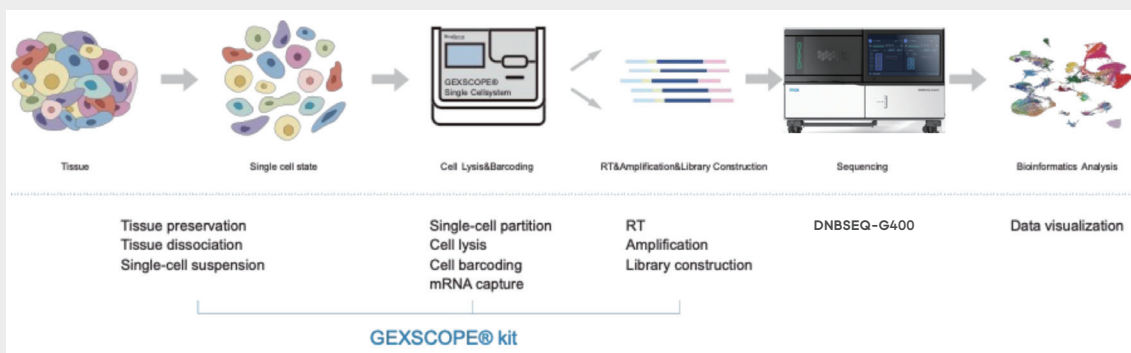


图1. 基于华大智造DNBSEQ测序平台开展新格元GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒性能评估实验的建库、测序以及生信分析流程示意图。

实验方法

样本采集

本研究以人外周血单核细胞（human peripheral blood mononuclear cell, PBMC）作为样本。

文库制备与测序

本研究利用Matrix®自动化单细胞处理系统制备单细胞RNA文库以及V(D)J文库，该仪器可以将悬浮的单个细胞分装到SCOPE®微孔芯片中，并在30分钟内自动完成细胞分离、细胞裂解和mRNA捕获步骤，其间使用了新格元GEXSCOPE® Single Cell V(D)J试剂盒，具体实验流程可参照相关说明书。对于在Vendor X上测序的文库，这些文库采用PE 150+8的测序策略严格按照使用说明书直接进行测序即可。至于在华大智造DNBSEQ测序平台上而言，构建好的文库需要先使用MGIEasy 通用文库转换试剂盒（App-A）完成文库的转化工作后，

利用高通量双末端测序引物试剂盒（App-A）或者高通量测序引物试剂盒(App-D)在MGISEQ-2000测序仪上应用PE150+8的测序策略完成测序工作。由于文库中的序列比较单一固定，测序前需将文库与20%-40%的华大智造标准文库混合以提高文库多样性。

生物信息学分析

两个平台产生的双端FASTQ文件数据都利用CeleScope软件进行分析，CeleScope软件分析新格元单细胞RNA转录组数据和V(D)J测序数据，进而输出基因表达矩阵信息和克隆型信息。利用Empty-Drops的方法鉴定细胞（可以访问Github以获得更多的信息：<https://github.com/singleron-RD/CeleScope>），以上过程使用默认参数进行。差异基因表达检测以及数据降维都是通过R语言中的Seurat 软件包来分析。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
收集人外周血单核细胞（human peripheral blood mononuclear cell, PBMC）作为样本	 GEXSCOPE® Single Cell Human V(D)J Kit  MGIEasy 通用文库转换试剂盒（App-A）  MGISEQ-2000基因测序仪	CeleScope 软件, Seurat 软件包	新格元试剂盒在DNBSEQ测序平台和Vendor X平台上的综合评估

结果

RNA文库的基础测序指标的比较

构建好的文库测序后从Vendor X和 华大智造MGISEQ-2000测序仪分别得到了124M和837M双端测序(PE)reads。其中，MGISEQ-2000测序仪上的测序数据的平均Q30值为88.2%，测序所获FASTQ文件被截取至124M PE reads以匹配Vendor X的测序数据量。随后利用CeleScope生信分析流程进行barcode提取，接头剪切，与参考基因组做比对以及特征计算过程。通过比较两个平台发现二者大部分的性能指标都表现接近，但是在Base Pairs Quality Trimmed以及Reads Too Short这两个参数

上，DNBSEQ™表现更好(图2)。

比对率 (Mapping rate) 代表着测序reads比对到参考基因组的百分数，是测序质量的重要评估参数，Uniquely Mapped reads显示相较于Vendor X, MGISEQ-2000测序仪有更多的测序reads可以特异地比对到参考基因组上，有限的测序reads内可以获得更多有用的信息。此外，MGISEQ-2000测序仪在每个细胞中也发现了更多的UMI，意味着从每个细胞中获得了更多的数据，所以利用MGISEQ-2000测序仪可以检测到更多的基因(图3b)。

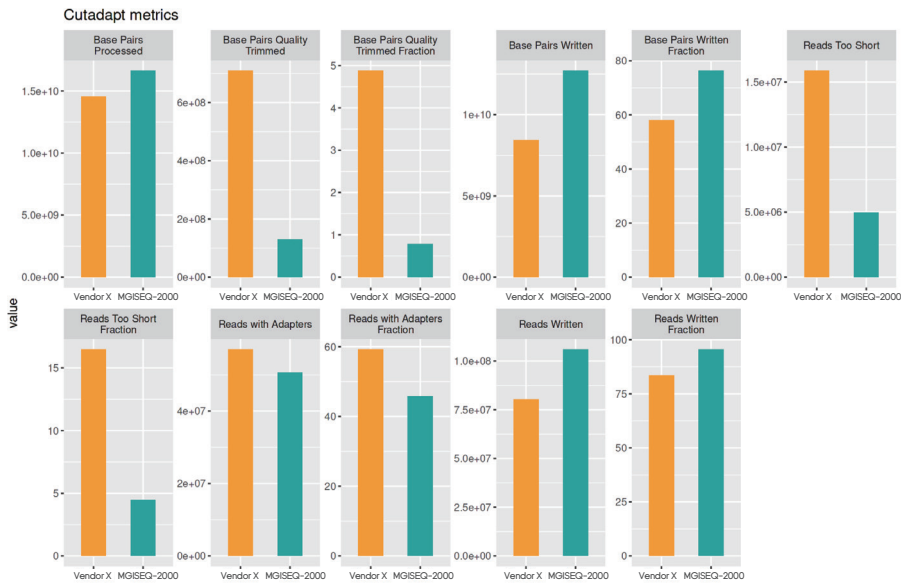


图2 基本QC参数

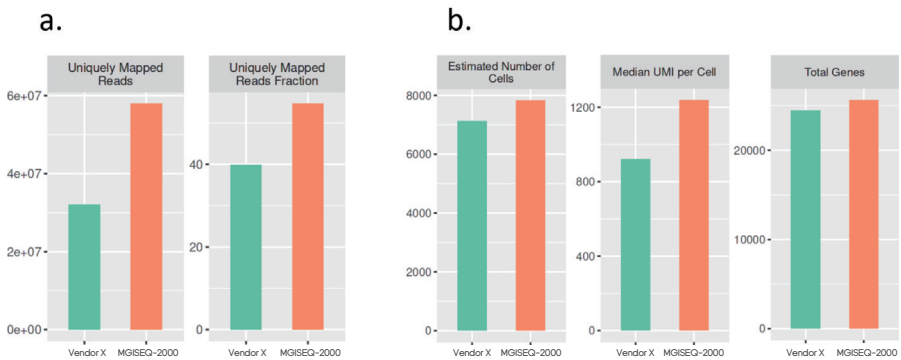


图3 参考基因组比对和UMI分析。a)特异比对reads数计算。b)基于UMI数目计算的细胞数目和检测的基因数目。

RNA文库的性能指标的比较

在单细胞研究中，特征的选择，关键基因的鉴定都很重要。在本研究中，计算了被检测基因的特征分布以及RNA检测数量，发现两个平台检测基因的特征分布类似，但是DNBSEQ测序平台可检测出有更多RNA和feature count的细胞，这些结果可能都归结于MGISEQ-2000测序仪检测到了更多的细胞数目，产生了更多有用的数据(图4a)。随后，本研究利用UMAP软件分析了Vendor X和

MGISEQ-2000测序数据集群，发现两个平台有着相似的基因表达谱(图4b)。为了进一步评估这两个平台对于细胞类型检测的能力，利用循环人类免疫系统的公共多模型参考“atlas”分析细胞类型的组成¹，同时利用SingleR进行标注，发现两个平台的结果大致相同(图4c)，通过比较细胞类型标志基因的表达也可以评估两个平台的差异和相似之处，结果显示它们细胞类型标志基因表达谱也相似(图4d)。

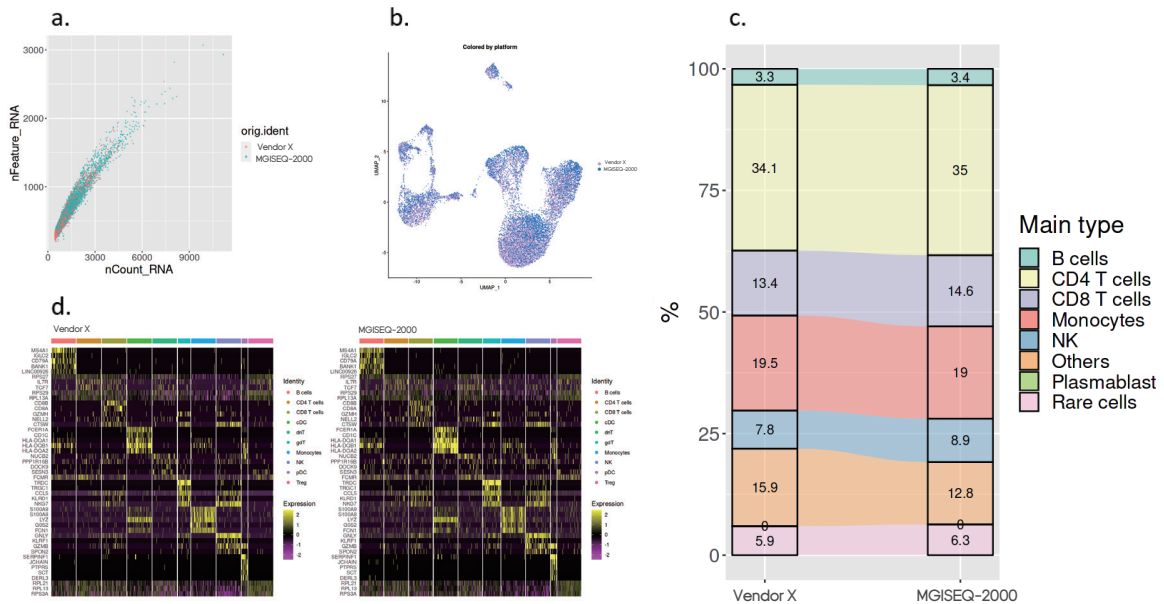


图4. 二级分析参数的比较。a) 被检测基因的特征分布以及RNA分子数量。b) 两平台的UMAP分析。c) 利用公共参考数据库以及SingleR对细胞类型的组成进行标注。稀有细胞包括MAIT, ILC, HSPC, ASDC, Doublet, 血小板和红细胞。d) 细胞类型标志基因表达谱。

V(D)J文库测序结果的比较

本研究随后也对V(D)J文库测序结果做了进一步的分析。在分析比较之前，二者的测序数据都被截取至10M PE reads。BCR和TCR的CDR3区域是重

链的高度易变区，通常被用于鉴定B细胞以及T细胞克隆。在本研究中，MGISEQ-2000测序仪鉴定出了更多的B细胞克隆数和B细胞克隆类型数，T细胞克隆数以及T细胞克隆类型数在两个平台上类似(图5)。

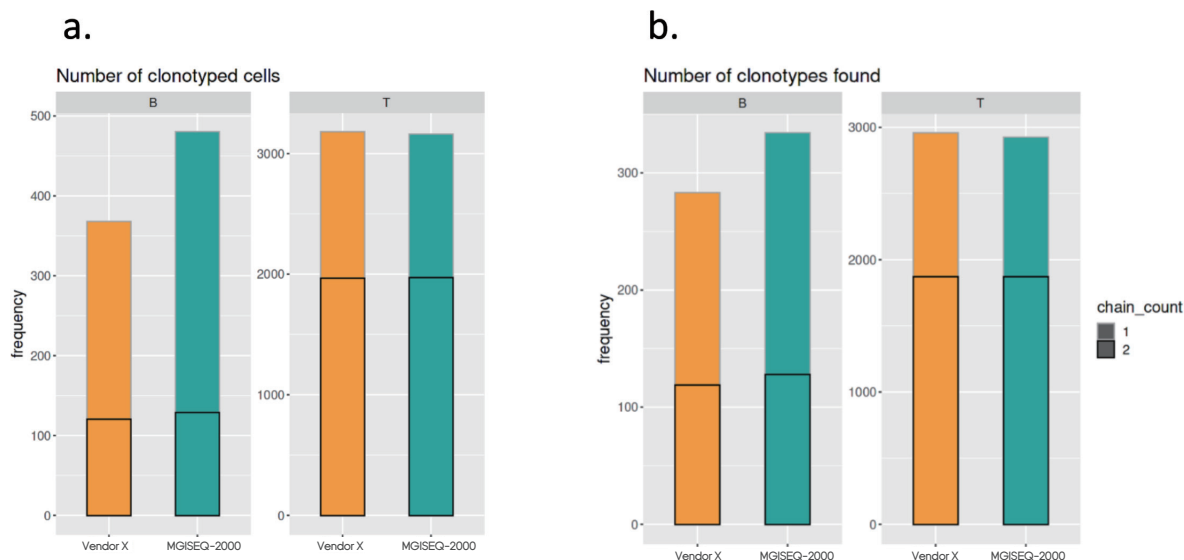


图5. V(D)J文库的测序结果比较。所有的测序结果在分析前都被精确地截取至10M reads。a)细胞克隆数。b)克隆类型数目。灰色框:只有1条链被检测到的细胞数。黑色框:2条链都被检测到的细胞数。

总结

本研究利用人类PBMCs样本制备RNA和V(D)J 文库后在华大智造DNBSEQTM 和Vendor X测序平台上进行测序，测序结果表明两平台的性能相当，但是DNBSEQ测序平台的某些特定参数：如有效数据的范围、比对率, UMI数以及 RNA count number上表现更加优异。同时也说明新格元的GEXSCOPE® Single Cell V(D)J 试剂盒与DNBSEQ测序平台可完美适配，这为研究者们提供了更加便捷的解决方案，保证更高质量数据的同时也节约了成本。

华大智造自主研发的MGISEQ-2000测序平台基于独有的DNBSEQTM技术开发，具有高准确性、低重复序列率、低标签跳跃的优势。其能够灵活支持多种不同的测序模式，能够在较短时间内完成完整的测序流程，带给使用者更加精简流畅的测序体验。



基因测序仪MGISEQ-2000

致谢

- 1.感谢Jonathan Scolnick, 新格元生物科技以及 MGI-Tech APAC为本文提供的材料、支持和宝贵的意见。
2. 基于DNBSEQ的测序实验在新加坡NSG BioLabs的 MGI-Tech Training&Demo实验室进行。

参考文献

1. Hao, Yuhan et al. “Integrated analysis of multi-modal single-cell data.” Cell vol. 184,13 (2021): 3573-3587.e29. doi:10.1016/j.cell.2021.04.0481.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	Matrix Single Cell Preparation Instrument	MT1001001*
软件	MegaBOLT生信分析加速器(工作站式服务器)	970-000085-00
	CeleScope® Software	https://github.com/singleron-RD/CeleScope
建库试剂	MGIEasy 通用文库转换试剂盒 (App-A) (16RXN)	1000004155
	GEXSCOPE® Single Cell Human V(D)J Kit	5183121*
	gDNA标准文库 V3 (26 ng/EA)	1000005033
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150)	1000012555
	高通量双末端测序引物试剂盒 (App-A)	1000020832
	高通量测序引物试剂盒 (App-D)	1000028550

*相关产品可登录新格元 (<https://singleron.bio/>) 官网进行查阅订购。

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2023年5月版

撰稿：张含菲

责任编辑：王其伟

审稿：江遥