ver. 202106

SMARTer® RNA-seq for NGS

that's GOOD science!™

- High quality 샘플을 위한
  full-length RNA-seq kit
- Low quality 샘플도 적용 가능한
  Stranded RNA-seq kit
- 면역세포 레퍼토리 분석을 위한
  Immune profiling kit

TaKaRa

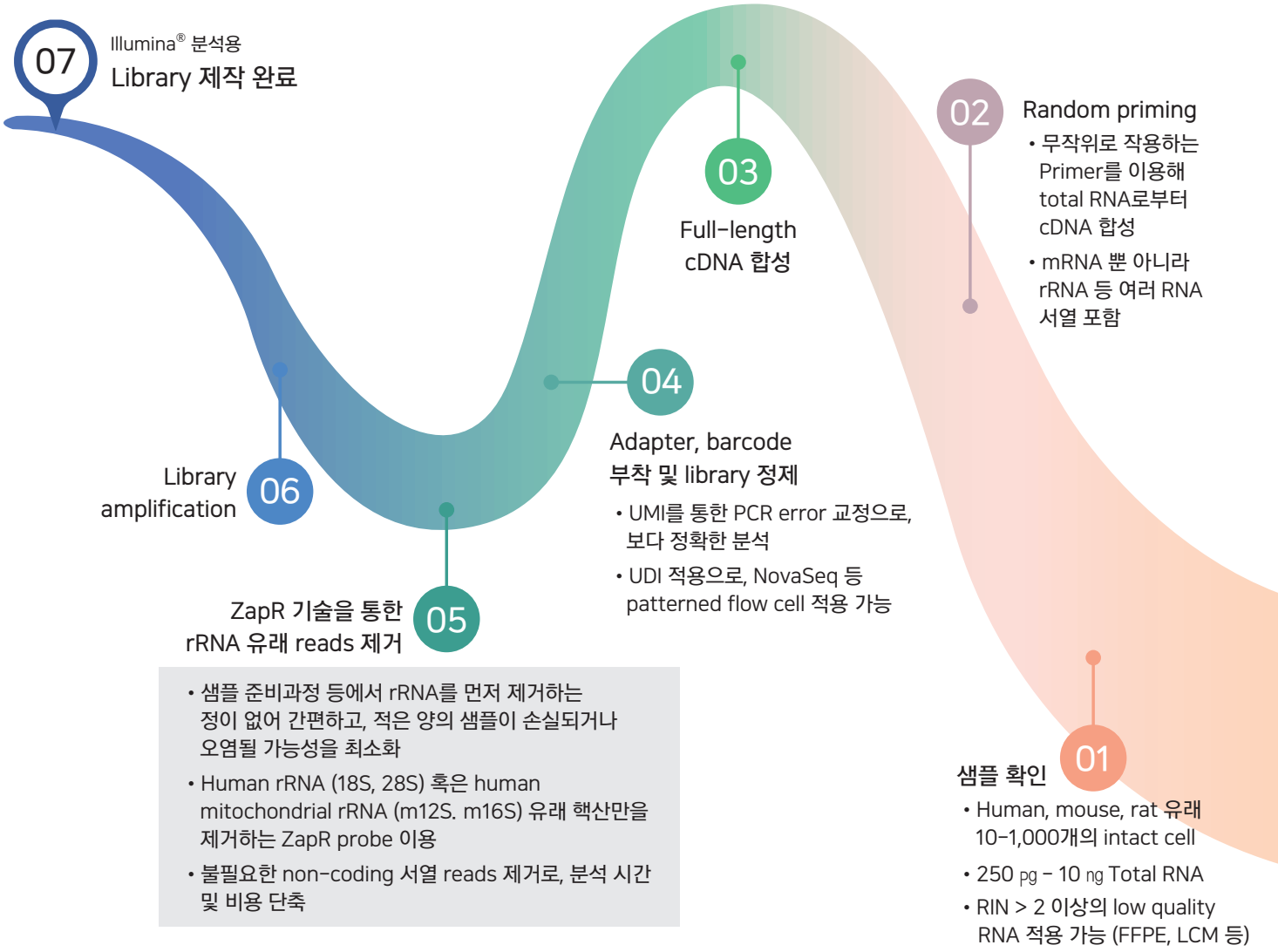
SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v3 – Pico Input Mammalian (Pico v3)

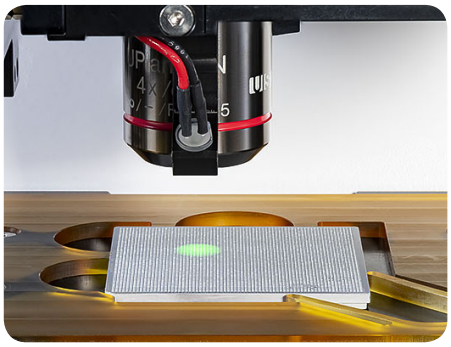
(Code 634485)

Pico v3는 human, rat, mouse 유래의 total RNA (250 pg ~ 10 ng) 혹은 intact cell (10 – 1,000 개)로부터 strand-specific Illumina® NGS library를 효율적으로 제작할 수 있는 제품으로, 약 7.5 시간 내 실험 과정이 완료된다. 이 제품은 high quality RNA 뿐 아니라 FFPE, LCM 샘플과 같이 RNA integrity가 현저히 낮은 샘플에도 적용할 수 있으며, 최종 산물 library는 strand 정보를 포함하고 있어 Read 2 분석을 통해 sense 서열만을 확인할 수 있다.

cDNA 합성 과정에서는 random priming을 이용하며, cDNA 합성 후 ZapR 기술로 rRNA 유래 reads를 제거한 다음 남아있는 reads를 amplification 하여 분석을 진행한다.

본 제품은 library 제작 과정 내에 unique molecular identifiers (UMIs)를 추가 도입함으로써 PCR 과정이나 sequencing에서 발생하는 error를 교정할 수 있어 높은 효율과 정확도를 가지며, UDI를 포함하고 있어 flow patterned cell에서도 index hopping 없이 sequencing을 진행할 수 있다.





ICELL8® cx Single-Cell System (Code 640188)

사이즈에 구애 받지 않고 single cell을 5,184-nanowell SmartChip의 각 well에 분리하고, 이미지 장비를 통해 single cell을 포함하는 well에서만 cDNA 합성 등 후속실험에 필요한 solution을 분주한다. 따라서, Single cell이 있는 well에서만 분석을 진행하기에 신뢰도 높은 결과와 시약 비용이나 분석 시간을 절감할 수 있다.

내장되어 있는 CELLSTUDIO 프로그램을 통해 high-throughput NGS 혹은 nanoliter scale의 단일세포 분석 등 다양하게 활용할 수 있다.

Why we have to analyze full-length RNA?

질병이나 유전 형질을 확인하기 위해 염기서열을 분석하는 연구들이 다수 진행되고 있으며, NGS (Next Generation Sequencing) 기술이 발달하면서 기존의 방법보다 빠르고 간편하게 서열을 확인할 수 있어 연구가 가속화 되고 있다. 분석 초기에는 Whole exome sequencing (WES)이 주로 진행되었으며, 근래에는 droplet 방식을 통한 3', 5' 각 말단에서의 유전자 발현을 통해 세포를 분류하거나 희귀 변이, 유전자를 발굴하고자 하는 연구들도 다수 진행되고 있다.

하지만, 이 방식의 경우 분석되지 않은 부위에 존재하는 유전 형질이나 변이 등을 확인하기 어렵다는 한계가 있어, full-length RNA를 이용한 전장 유전체 서열 분석 (WGS; Whole Genome Sequencing)의 중요성이 대두되고 있다. 이를 이용하면 높은 coverage와 매핑 효율로써 샘플 내에서 발현하는 유전자 정보를 더 많이 확인할 수 있고, 저빈도로 존재하는 유전 변이나 isoform, allele-specific한 정보를 통해 세포를 보다 세분화할 수 있다는 장점이 있다.

다카라바이오는 독자적인 SMART-seq® 기술을 통해 full-length RNA-seq library를 제작할 수 있는 다양한 제품을 제공하고 있다. 매뉴얼 방식으로 진행되는 SMART-seq2과는 달리 buffer 준비, SMART oligonucleotide 합성 등이 불필요하고, 별도의 최적화 과정 없이 실험을 간편하게 진행할 수 있다. Library 제작 제품은 분석하고자 하는 샘플의 양과 제작 원리에 따라 선택할 수 있으며, 특히 단일 세포에서 mRNA를 분석하는 경우 ½, ¼ 조성으로 진행되는 프로토콜을 제공하고 있어 분석 비용도 절감할 수 있다.

SMARTer® 기술을 이용한
Full-length cDNA 합성

03

02 Oligo dT priming

- mRNA의 3' end에서 보이는 poly A$^+$ tail을 타겟으로 cDNA 합성
- High quality RNA를 이용하여 mRNA 서열만을 분석하고자 할 때 사용하는 cDNA primer

다양한
NGS 플랫폼
적용 가능

샘플 ~ cDNA 합성까지

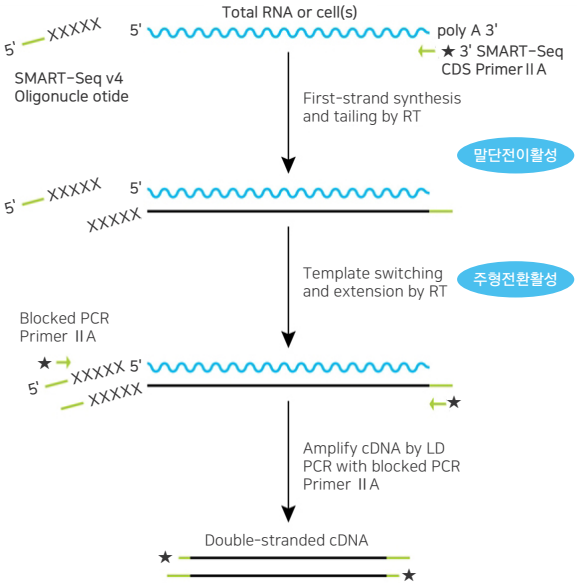
01 샘플 선택

Single cell	Isolated single cell (2~ 10 pg 수준의 RNA)	SMART-Seq® Single Cell Kit (Code 634470)
Ultra low input	1,000 개 이하의 intact cell 10 pg - 10 ng high quality RNA	SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (Code 634888)
For automation	100 개 이하의 intact cell 10 pg - 10 ng high quality RNA	SMART-Seq® HT Kit (Code 634455)

What is SMARTer® technology?

MMLV RTase를 이용해 cDNA를 합성할 때, RNA 5' 말단까지 합성이 이르게 되면 무작위로 non-templated nucleotides가 부가되게 된다. 이를 말단전이활성 (terminal transferase activity)라고 하며, SMARTer® 기술은 이 활성을 이용해 추가된 서열과 반응하는 SMARTer® switching oligonucleotide를 첨가하여 cDNA 5' 말단에 인식서열을 편리하게 부가한다. 이후 RTase는 부가된 oligonucleotide를 주형으로 하여 추가적으로 cDNA를 합성하는데 이를 주형전환활성 (template switching activity)라 한다.

이 두 활성을 이용하는 SMARTer® 기술은 양 말단에 원하는 서열을 ligation 없이 부가할 수 있으며 이 서열을 이용해 PCR은 물론 RACE, NGS library 제작 등에 활용할 수 있다. 또한, 5' 말단까지 모두 합성된 cDNA가 최종산물로 full-length RNA 서열을 분석할 수 있다.



04 Enzymatic fragmentation

- cDNA의 fragment에 최적화된 enzyme 활용

05 Library prep.

- Single tube에서 2시간 내에 cDNA를 library로 제작할 수 있어 시간 절약 및 샘플 오염, 오류 최소화
- Library Prep. 중간의 정제 과정이 없어, 실험 과정이 매우 간단하고 이로 인한 샘플 손실, 오염이 발생하지 않음.
- Stem-loop adapter를 이용하기에, adapter로 인한 library 제작 효율 저하 및 background 발생 방지

06 Illumina® 분석용 Library 제작 완료

샘플 ~ Library 제작까지

- SMART-Seq® Single Cell PLUS Kit (SSsc PLUS)* (Code R400750)
- SMART-Seq® v4 PLUS Kit (SSv4 PLUS)* (Code R400752)
- SMART-Seq® HT PLUS Kit (SSv4-HT PLUS) (Code R400748)

* Miniature protocol 제공 (1/2, 1/4)

SMARTer® TCR/BCR profiling kit

T cell과 B cell은 림프구 중 하나인 면역 세포로, 표면에 항원을 인식하는 receptor인 TCR, BCR을 각각 발현하면서 종양이나 바이러스 등에 특이적으로 결합, 면역 반응의 시작 및 활성화 하는 역할을 한다. TCR과 BCR은 유전자 재배열이나 체세포 돌연변이를 통해 다양한 항원을 인식할 수 있도록 가변성을 가지며 이를 TCR/BCR 레퍼토리 (repertoire)라고 일컫는다.

백혈병이나 악성 림프종, 혹은 악성 병변 등이 발생하게 되면 T cell과 B cell은 비정상적으로 증식하기 때문에 TCR/BCR 레퍼토리 분석을 통해 면역 반응을 확인함으로써 질병을 진단하고 치료 효과를 확인하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 특히 NGS를 이용하여 TCR/BCR 레퍼토리를 분석함으로써 면역학적 다양성을 효과적으로 확인할 수 있어, 바이러스나 세균 감염 뿐 아니라 진단, 장기 이식 후의 면역 기작 등을 확인할 수 있다.

다카라바이오는 human, mouse 각각의 TCR, BCR 분석을 위한 immune profiling kit를 제공하고 있으며, 특히 UMI, UDI가 적용되어 있는 제품은 분석을 위한 소프트웨어도 무상으로 지원하고 있다.

Takara Immune profiling kit

Human			Mouse	
TCR	Single TCR	BCR IgG/M	TCR	BCR IgG
• 백혈구 10 ng - 1 µg • T cell 유래 total RNA 1 - 100 ng • Purified T cell 1,000 - 10,000 개	• Single T cell	• PBMCs 유래 total RNA 10 ng - 1 µg • B cell 유래 total RNA 1 - 100 ng	• Spleen, thymus, PBMCs 유래 total RNA 10 - 500 ng • Purified T cell 1,000 - 10,000 개	• Spleen, lymph node, PBMCs, hybridoma 유래 total RNA 10 ng - 3 µg

- Human B cell receptor (BCR)의 V(D)J 가변영역을 민감도 높게 증폭하여 IgG, IgM 레퍼토리 분석
- Heavy chain (H), Light chain (Kappa chain (κ), Lamda chain (λ))의 동시, 각각 분석 가능
- UMI를 통해 PCR 혹은 sequencing error 교정으로 신뢰도 높은 clonotype 판별 (전용 소프트웨어 Cogent 무상 제공)

- 목적에 따라 Human T cell receptor의 V(D)J 가변 영역이나 CDR3 영역을 선택하여 분석 가능
- Single tube workflow로 샘플 오염 및 소실, handling error 최소화
- Beads clean up 및 size selection이 단 1회만 필요하여, 실험 과정 간소화 및 편리성 증진
- High yield library 생산으로 NovaSeq과 같은 high throughput sequencer 적용 가능 (분석 영역에 따른 sequencer 적용 차이 有)
- UDI 도입을 통한 동시 분석 샘플 수 증가 및 분석 정확도 향상, patterned flow cell에서 분석 가능
- UMI를 통해 PCR 혹은 sequencing error 교정으로 신뢰도 높은 clonotype 판별 (전용 소프트웨어 Cogent 무상 제공)

Cogent NGS Software

- UMI가 적용된 library의 PCR error 교정을 위한 software 무상 제공
- 영리 기관에서도 라이선스 없이 무상으로 사용 가능

→ For immune profiling, Cogent NGS Immune Profiler Software

→ For Pico v3 / ICELL8®, Cogent NGS Analysis Pipeline & Cogent NGS Discovery Software

SMARTer® RNA-seq 제품 선택 가이드

Whole genome sequencing

Oligo dT priming (w. high quality RNA)

~ cDNA 합성

다양한 NGS platform에 적용 가능

적용 샘플	Code	제품명	용량
Single cell	634470	SMART-Seq® Single Cell Kit (SSsc)	12 회
Ultra low input	634888	SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (SSv4)	12 회
Automation	634455	SMART-Seq® HT Kit (SSv4-HT)	12 회

~ Library 제작

Illumina® platform 전용

적용 샘플	Code	제품명	용량
Single cell	R400750	SMART-Seq® Single Cell PLUS Kit (SSsc PLUS)	48 회
Ultra low input	R400752	SMART-Seq® v4 PLUS Kit (SSv4 PLUS)	48 회
Automation	R400748	SMART-Seq® HT PLUS Kit (SSv4-HT PLUS)	48 회

Random priming (w. RIN >2 RNA)

~ Library 제작

적용 샘플	Code	제품명	용량
Single cell	634442	SMART-Seq® Stranded Kit	12 회
Ultra low input (total RNA, FFPE, LCM 등)	634485	SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v3 - Pico Input Mammalian (Pico v3)	24 회

면역세포 Full-length 분석 시 추천
UMI 분석 소프트웨어 제공

Targeted sequencing

Immune profiling을 통한 면역세포 레파토리 분석

Human

적용 샘플	Code	제품명	용량
T cell, 혈액, 말초혈액 백혈구	634478	SMARTer® Human TCR a/b Profiling Kit v2	12 회
Single T cell	634431	SMARTer® Human scTCR a/b Profiling Kit	96 회
B cell, 혈액, 말초혈액 백혈구	634466	SMARTer® Human BCR IgG IgM H/K/L Profiling Kit	12 회

UMI 분석 소프트웨어 제공

Mouse

적용 샘플	Code	제품명	용량
T cell, 혈액, 말초혈액 백혈구	634402	SMARTer® Mouse TCR a/b Profiling Kit	12 회
B cell, 혈액, 말초혈액 백혈구	634422	SMARTer® Mouse BCR IgG H/K/L Profiling Kit	12 회

SMARTer® smRNA-Seq Kit for Illumina®
(Code 635029)

- 3시간 내 15 - 150 nt 길이의 small RNA로부터 Illumina® 분석용 library 제작 완료
- SMARTer® 기술을 이용해, 별도의 adapter ligation 과정 불필요
- 적용 샘플 종류: total RNA 혹은 enriched smRNA (miRNA, siRNA, piRNA, sno RNA 등)
- 적용 샘플 양: 1 ng - 2 μg

hiPSC의 Single cell 분석을 위한

Cellartis® iPSC Single-Cell Cloning DEF-CS™ Culture Media Kit (Code Y30021)

- Single cell cloning을 위한 all-in-one system
- 기존 colony 배양법 혹은 타사 배지와 비교했을 때, single cell로부터 높은 homogeneous clone 형성 효율 확인

◀ DEF-CS™의 single cell cloning 성능 데이터 확인

다카라코리아바이오메디칼 (주)

고객지원 02-2081-2510
(제품문의) support@takara.co.kr