

# 10× Genomics建库方案搭配DNBSEQ平台赋能单细胞免疫研究

10× Genomics Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2在MGISEQ-2000和Brand A基因测序仪上的性能评估

10× Genomics开发的Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2可同时分析V(D)J、细胞表面蛋白和基因表达(gene expression, GEX)的数据。在本研究中，技术人员制备了5'基因表达文库(GEX)、抗体捕获文库和V(D)J文库，随后在华大智造MGISEQ-2000和Brand A基因测序仪上进行测序。综合的性能比较表明，MGISEQ-2000与该试剂盒完美适配，且其性能与Brand A基因测序仪相当。

推荐应用：单细胞基因组学

推荐机型：MGISEQ-2000RS、DNBSEQ-G99ARS、DNBSEQ-T7RS

## • 单细胞免疫分析的绝佳解决方案

10× Genomics开发的相关试剂盒可对单个细胞的适应性免疫组库和细胞环境进行高分辨率分析

## • 完美适配DNBSEQ测序平台

MGI Easy通用文库转换试剂盒使10× Genomics的Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2完美适配DNBSEQ测序平台

## • 高质量的数据输出

DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率、低标签跳跃等重要特性，保证高质量的数据输出



## 背景介绍

V(D)J重组是淋巴细胞成熟过程中的一个重要过程<sup>1</sup>，其中V(variable)、D(diversity)和J(joining)基因片段以近乎随机的方式重新排列，从而使得B细胞受体(BCR)和T细胞受体(TCR)的多样性增加<sup>2</sup>。而研究这一过程对于解析适应性免疫系统具有重要意义，同时也为临床诊断、药物研发和健康管理提供了新思路<sup>2</sup>。

10× Genomics是单细胞测序领域的知名企业，其单细胞RNA分析试剂盒已广泛应用于临床诊断、药物研发和健康管理领域，尤其是该公司的V(D)J文库制备试剂盒为众多免疫分析研究人员所青睐。

华大智造开发的DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率、低标签跳跃等重要特性<sup>3</sup>，基于此测序技术，华大智造开发出了一系列的基因测序仪如MGISEQ-2000、DNBSEQ-T7和DNBSEQ-G99，可满足生命科学研究和临床应用中的多种高通量测序需求。

而10× Genomics建库方案与DNBSEQ测序平台的兼容性尚未可知。本研究利用MGISEQ-2000和Brand A基因测序仪对10× Genomics单细胞免疫文库进行测序，文库包含基因表达文库(GEX)、抗体捕获文库(FB)以及V(D)J文库，以综合评估Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2在MGISEQ-2000上的性能表现。

## 材料与amp;方法

### 样本获取

本研究采用来自临床患者的两类人类外周血单核细胞(PBMCs)作为样本，分别命名为D01和D02，用于评估Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2与DNBSEQ测序平台的兼容性。

### 文库制备与测序

将单细胞悬液装入Chromium 芯片后，在每个单细胞液滴中加入适量的GEM磁珠。5'基因表达文库(GEX)、特征条形码文库(Feature barcode, FB,

包括细胞表面蛋白、抗体/抗原或CRISPR文库，本研究仅包括抗体捕获文库)和V(D)J文库均在同一液滴中制备。

文库制备过程使用了Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 (Dual Index)，每个样本由三种不同的文库组成：基因表达、V(D)J和抗体捕获。建库详细步骤请参考用户手册(CG000330\_ChromiumNextGEMSingleCell5\_v2\_CellSurfaceProtein\_UserGuide\_RevF，第16~21页)。

随后使用MGIEasy通用文库转换试剂盒(App-A)将双链DNA(dsDNA)文库转化为单链环状DNA

(ssCirDNA)文库，在AC-PCR的转化阶段，使用50 ng的dsDNA进行5轮PCR循环。GEX文库和V(D)J文库按照标准步骤处理即可，而抗体捕获文库的AC-PCR产物输入量则需要增加至约3 pmol，以便进行环化反应。环化后的单链DNA文库用于制备DNA纳米球(DNB)。按照Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 (Dual Index)用户手册的步骤，基因表达(GEX)、V(D)J和抗体捕获文库的DNB按照4:1:1的比例混合。由于抗体捕获文库的插入片段较短，在环化后的纯化阶段，磁珠的比例需增加到4倍，即便有双标签，也只能对文库的index i7进行测序。

测序时，建议使用MGISEQ-2000(ECR6.0)，以及MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装(PE150) V3.1和高通量双末端测序引物试剂盒(App-A)，测序策略为PE150+10。如果MGISEQ-2000的ECR版本低于5.2，可使用MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装(PE150) V3.1和高通量测序引物试剂盒(App-D)，并掺入20%-40%的华大智造标准文库试剂V3或其他平衡文库以提高测序质量。同时，本研究使用Brand A的测序仪对上述文库进行测序，以全面评估MGISEQ-2000的性能。

## 生物信息学分析

本研究通过10× Genomics Cellranger Multi Pipeline对FASTQ数据进行分析。在10× Genomics文库中，barcode和唯一分子标识符(Unique Molecular Identifier, UMI)都位于read 1起始的26个碱基对(bp)中，因此为了提高分析效率，在分析过程中排除且不考虑read2中超过26bp的任何序列，Cellranger Multi Pipeline采用CSV配置，其中包含来自cellranger mkfastq的FASTQ文件路径，可用于分析来自单个GEM孔的5'基因表达(GEX)、特征条形码(Feature barcode, FB)和V(D)J的任意组合文库，它能对GEX文库和/或FB文库进行比对、过滤、条形码计数和UMI计数，还能对V(D)J文库进行序列组装和配对克隆型识别。并且选择性地选取V(D)J文库和5' GEX文库数据中都能检测到的细胞进而得到更加准确的结果。FASTQ文件输入完成后会生成计数矩阵(count matrix)，此计数矩阵可作为诸多下游分析工具如Seuratpackages的输入项。以上生信分析流程细节可参阅10× Genomics官网：<https://support.10xgenomics.com/single-cell-vdj/software/pipelines/latest/using/multi>。

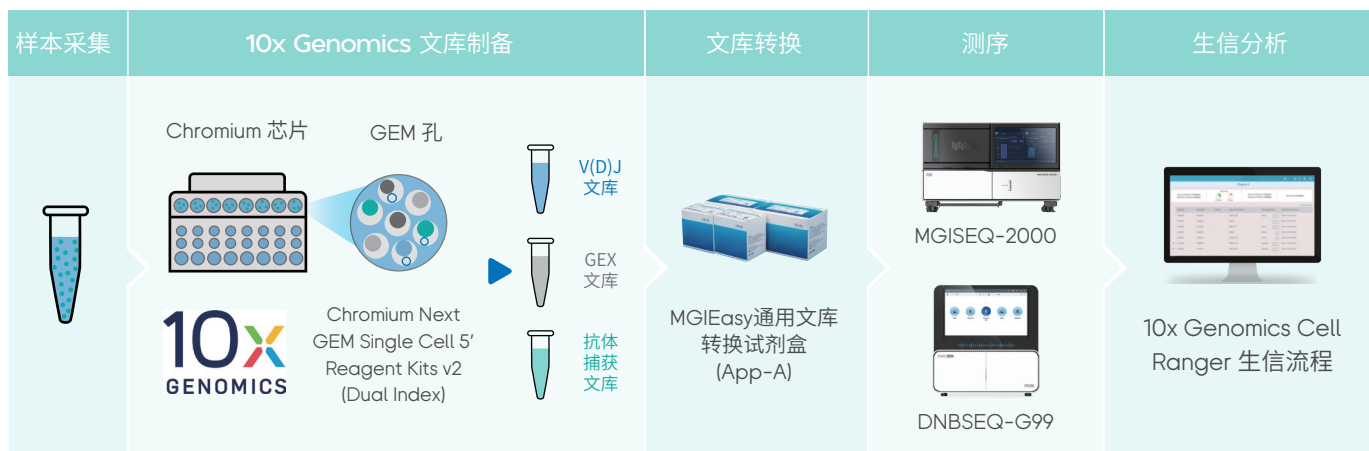


图1. 10× Genomics文库制备和华大智造测序工作流程

## 结果

### 10× Genomics建库试剂盒搭配MGISEQ-2000可产生高质量的测序数据

将来自MGISEQ-2000和Brand A平台同类型的文库数据截取至相同的数据量用于比较分析。最终发现无论是D01还是D02样本，GEX文库较其他类型的文库reads数都更多，结果符合预期，并且所有类型的文库都有着较多的Estimated number of cells，极高比例的Valid UMIs (>99%)和Valid barcodes (>92%)(表1)，确保后续得到可靠的分析结果。且MGISEQ-2000与Brand A测序平台的质控参数数值不相上下。

为了进一步评估测序质量，研究者分析了不同类型文库的RNA reads、UMIs和Barcodes的Q30值。结果显示，MGISEQ-2000和Brand A产生的测序数据Q30值均超过了85%，超过了公认的标准，并且UMI和barcode的Q30均在95%左右，足以得到可靠的细胞检测和计数结果(图2A和B)。同样，两个测序平台的基因表达(GEX)文库也呈现出了相似的测序饱和度(图2C)，饱和度终点约为80%，符合单细胞研究的标准。基因数目饱和度也呈现类似趋势(图2D)。比起两组细胞样本(D01 vs D02)之间的差异，两个平台之间的测序饱和度(sequencing saturation)和基因中位数(median genes per cell)差异更小。

样本名称	文库类型	Reads数目	测序仪	Estimated number of cells	Valid UMIs	Valid barcodes
D01	基因表达(GEX)	274,429,144	Brand A	8,307	99.78%	93.03%
			MGISEQ-2000	8,344	99.65%	92.98%
	抗体捕获	32,852,214	Brand A	8,307	100.00%	98.24%
			MGISEQ-2000	8,344	100.00%	98.13%
	V(D)J	53,617,427	Brand A	6,808	--	96.34%
			MGISEQ-2000	6,816	--	96.08%
D02	基因表达 (GEX)	255,343,816	Brand A	9,792	99.64%	90.81%
			MGISEQ-2000	9,852	99.57%	90.81%
	抗体捕获	34,404,200	Brand A	9,792	99.99%	98.19%
			MGISEQ-2000	9,852	100.00%	98.08%
	V(D)J	48,448,059	Brand A	7,672	--	94.15%
			MGISEQ-2000	7,672	--	94.16%

表1.MGISEQ-2000和Brand A的初级测序指标比较

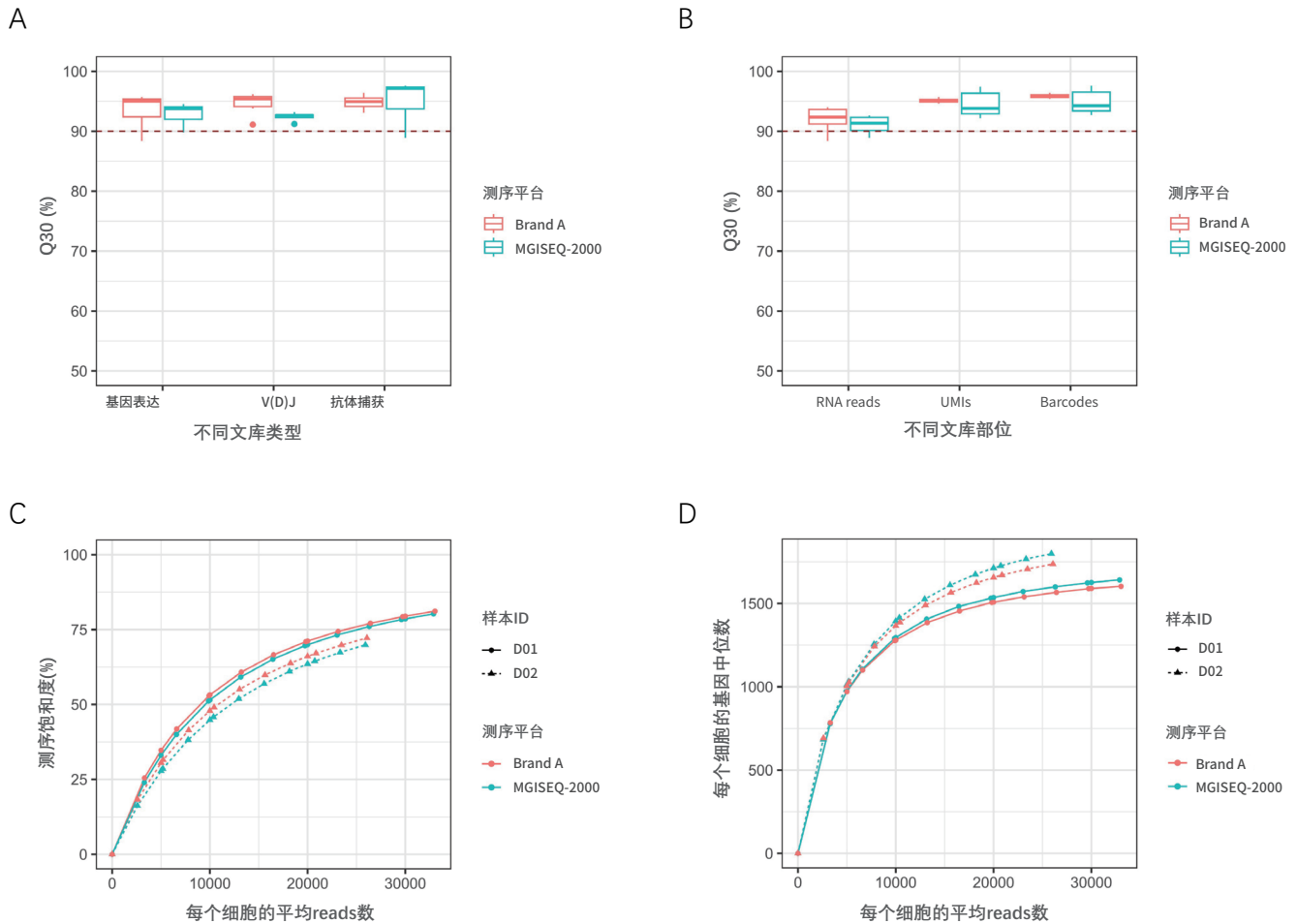


图2. MGISEQ-2000和Brand A的质控参数比较。A)不同文库类型的Q30值，红色虚线代表90%。B)不同测序部位的Q30值，红色虚线表示90%。C)D01和D02样本的测序饱和度(sequencing saturation)。测序饱和度是衡量文库复杂性的指标，当所有被转化的mRNA转录本(或固定RNA文库中的连接产物)均被测序时，测序饱和度接近1.0(100%)。D)D01和D02样本中每个细胞的基因中位数(median genes per cell)。该图显示了每个细胞的基因中位数与截取的测序深度之间的函数关系(以每个细胞的平均reads数表示)。

## MGISEQ-2000与Brand A在基因表达文库和抗体捕获文库的测序中结果相当

为了评估Feature选择的能力，本研究对Feature VS RNA数的分布进行了评估，发现MGISEQ-2000测序仪和Brand A的结果高度相似，这表明MGISEQ-2000对单细胞文库进行测序可以得到稳定而准确的结果

(图3A和图3B)。此外，UMAP分析表明，对于转录组和抗体捕获文库，Brand A和MGISEQ-2000几乎产生了相同的聚类结果(图3C和图3D)。这些结果都表明，DNBSEQ平台与10× Genomics建库方案完美适配，且与Brand A的性能不相上下，10× Genomics建库方案搭配DNBSEQ平台可以可靠地应用于单细胞研究。

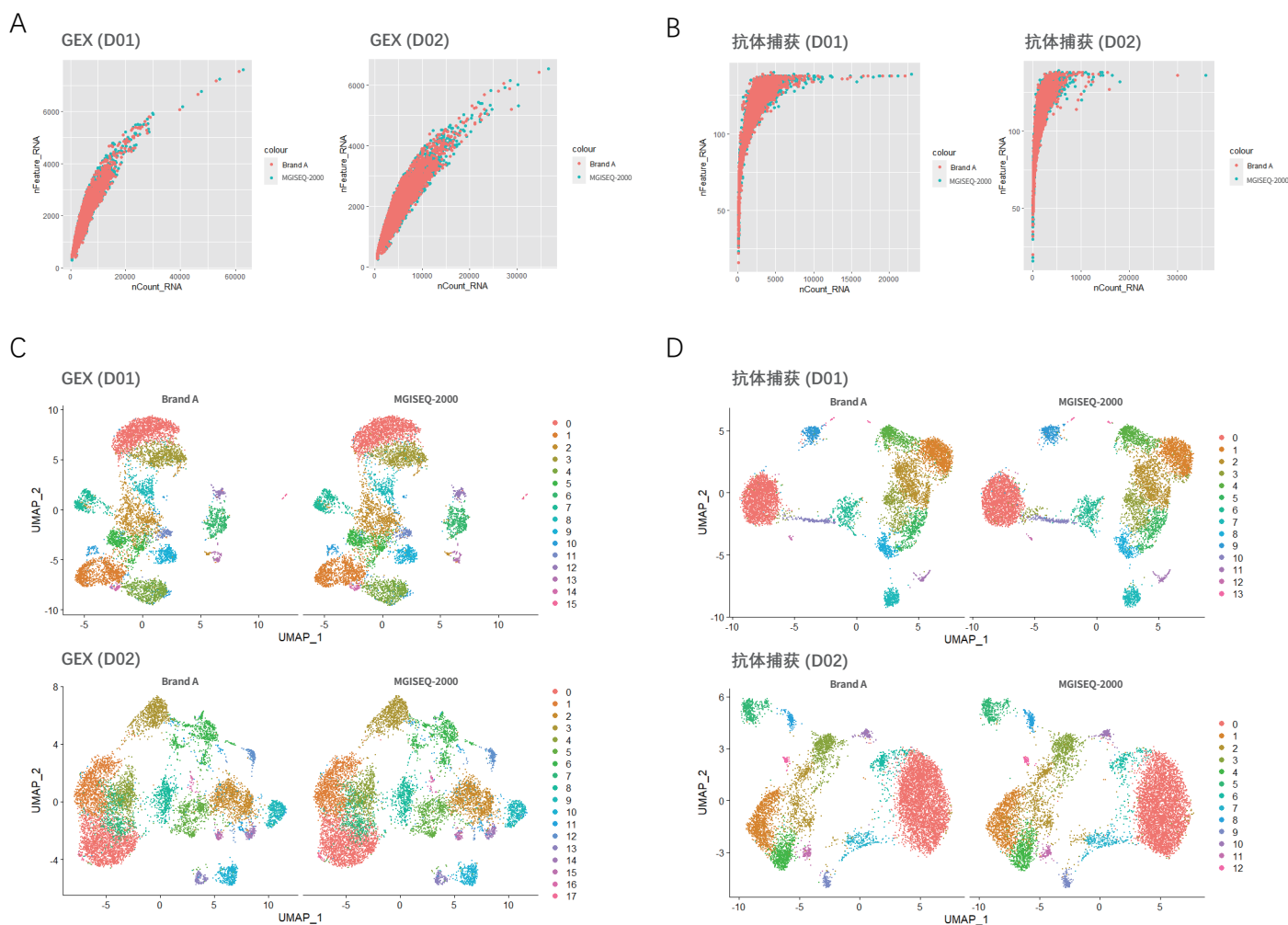


图3. 基因表达文库(GEX)和抗体捕获文库在MGISEQ-2000和Brand A上的测序参数指标比较。A)来自MGISEQ-2000和Brand A平台的GEX文库Feature VS RNA count分布情况。B)来自MGISEQ-2000和Brand A平台的抗体捕获文库Feature VS RNA count分布。C)来自MGISEQ-2000和Brand A平台的GEX文库数据UMAP分析。D)来自MGISEQ-2000和Brand A平台的抗体捕获文库数据UMAP分析。

## MGISEQ-2000在V(D)J文库测序中具有与Brand A相当的克隆型检测能力

为了进一步分析T细胞和B细胞的克隆型检测情况，本研究计算了两个样本的克隆型分布比例。在分析之前，去除少于3个reads的克隆型以提高分析效率。本研究对MGISEQ-2000与Brand A两个平台的细胞克隆型比例进行了相关性分析。结果

表明，在D01样本中，MGISEQ-2000与Brand A相关性分析的 $R^2$ 为0.9901(图4A)，D02样本中的 $R^2$ 稍低，但仍在预期范围内( $R^2=0.9105$ )(图4B)，由于 $R^2$ 都接近1，表明MGISEQ-2000与Brand A检测到的克隆型比例分布基本一致，MGISEQ-2000的克隆型检测能力与Brand A相当。此外，本研究还对前10种克隆型分布进行了具体的评估，结果显示D01中两平台结果的一致性略高于D02(图5C、

D), 这可能是由于测序策略不同造成的。当D01样本在MGISEQ-2000中测序时, GEX、抗体捕获和V(D)J文库是在同一个测序芯片中一起测序的。而在D02样本中, 它们是单独测序的。这些结果

表明, 为了获得高质量、高精度的测序结果, 三个文库最好在同一批次中进行测序。以上这些结果表明, MGISEQ-2000可以准确可靠地用于BCR/TCR研究, 且其性能与Brand A相当。

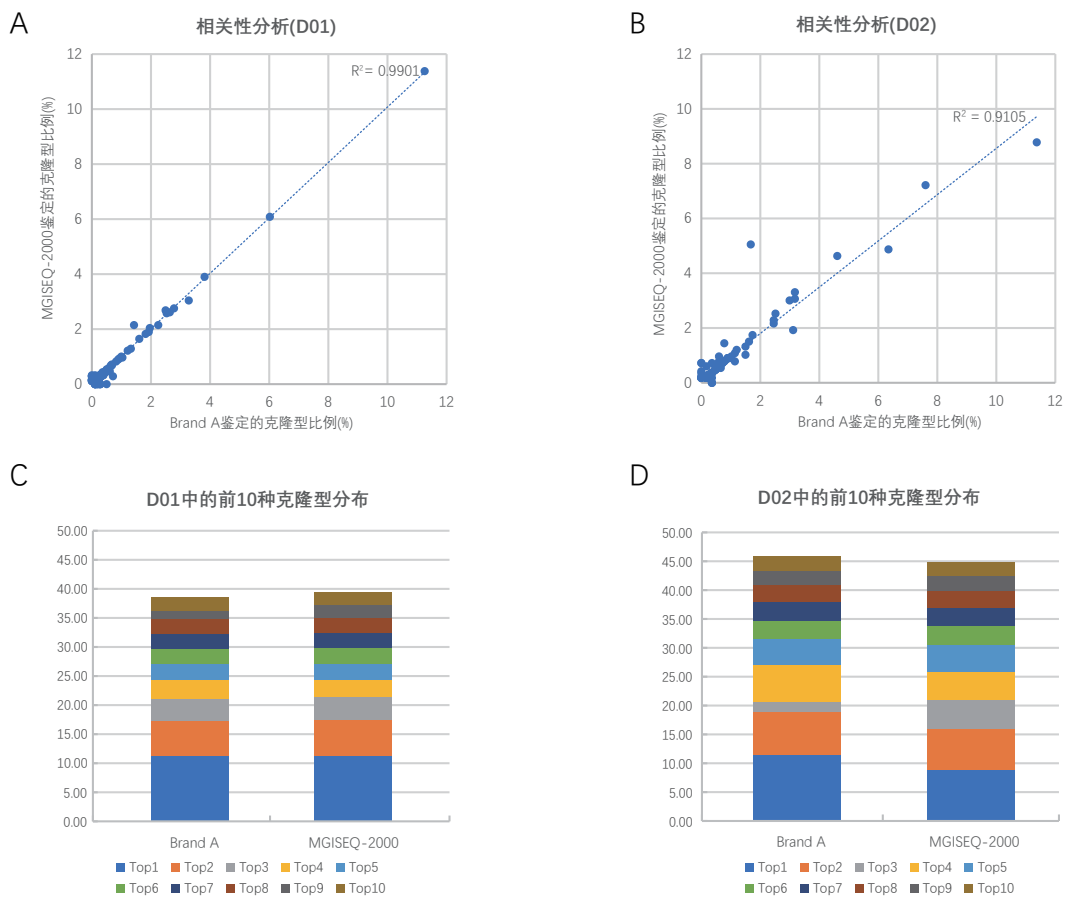


图4. V(D)J文库在MGISEQ-2000和Brand A上的测序参数指标比较, 分析前剔除了少于3个reads的克隆型。A,B)MGISEQ-2000和Brand A平台检测到的克隆型比例相关性分析。Proportion:检测到此细胞克隆型barcode的比例。C,D)前十种细胞克隆型的比例分布。克隆型分布图的x轴代表不同平台检测到的前十种克隆型, y轴代表前十种克隆型中每种克隆型在整个文库中的比例。

## 总结

Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2在MGISEQ-2000及Brand A平台上的实测结果表明，10× Genomics单细胞建库方案适配DNBSEQ测序平台，基因表达文库、V(D)J和抗体捕获文库均能得到优质而可靠的结果，并且MGISEQ-2000与Brand A平台性能相当。

MGISEQ-2000通量灵活，每次运行支持1~2张载片同时上机，支持不同规格的载片(FCS小载片、FCL大载片)独立运行，满负荷PE150测序仅需56小时。

10× Genomics建库方案搭配华大智造DNBSEQ测序平台，可为肿瘤学、自身免疫性疾病、传染病、器官移植等领域研究提供高质量的数据支撑，极大地降低研究成本。

## 参考文献

1. Bassing, C. H., Swat, W. & Alt, F. W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109**, S45-S55, doi:10.1016/S0092-8674(02)00675-X (2002).
2. Lieber, M. R. Transposons to V(D)J Recombination: Evolution of the RAG Reaction. *Trends Immunol* **40**, 668-670, doi:10.1016/j.it.2019.06.007 (2019).
3. Porreca, G. J. Genome sequencing on nanoballs. *Nature Biotechnology* **28**, 43-44, doi:10.1038/nbt.0110-43 (2010).



基因测序仪MGISEQ-2000



## 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
软件	cellranger multi	<a href="https://support.10xgenomics.com/single-cell-vdj/software/downloads/latest">https://support.10xgenomics.com/single-cell-vdj/software/downloads/latest</a> *
文库制备试剂	Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2 (16 rxn)	1000263*
	MGIEasy通用文库转换试剂盒 (App-A) (16 rxn)	1000004155
	标准文库试剂V3	1000005033 <sup>a</sup>
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150) V3.1	1000016952 <sup>b</sup>
	高通量双末端测序引物试剂盒 (App-A)	1000020832 <sup>c</sup>
	高通量测序引物试剂盒 (App-D)	1000028550 <sup>d</sup>

\*相关产品可在10× Genomics官网上订购。

\*\*b+c或b+d+a可视具体情况选择。

## 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](http://www.mgi-tech.com)

✉ [MGI-service@mgi-tech.com](mailto: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9月版

撰稿：张含菲

责任编辑：王其伟

审稿：江遥