

# 단일세포 유전자 발현 및 크로마틴 접근성 데이터의 통합

- 10x Genomics사의 Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression을 활용하여 동일한 단일 세포로부터 다양한 오믹스 데이터를 측정 가능
- NovaSeq™ 6000, NextSeq™ 2000, NextSeq 1000, NextSeq 550 시스템에서 페어링된 ATAC-Seq Library과 3' Gene Expression Library의 시퀀싱
- 유전자 조절에 대한 총체적 접근을 위해 정확한 단일세포 전사체와 후성유전체 분석 결과의 연계 지원

illumina®

## 소개

단일세포(single-cell) 분석은 복잡한 세포군 내 이질성을 확인하여 세포 유형을 구분하고 동적인 세포 상태를 파악하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) 기술은 혁신적인 assay를 통해 수백에서 수만 개의 세포로부터 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 후성유전체(epigenome), 단백질체(proteome)를 단일세포 해상도로 연구할 수 있도록 해 줍니다. 연구자는 이러한 상보적인 매트릭스(metrics)를 멀티오믹스(multiomics) 데이터 세트에 통합하여 세포 표현형(phenotype)에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있습니다.

대다수의 멀티오믹스 데이터 분석 방법은 정교한 알고리즘을 사용하고 다양한 데이터 표현 형식(modality) 간의 상관 관계를 추론함으로써 여러 실험으로부터 얻은 데이터를 연계합니다.<sup>1</sup> 반면에 새로운 단일세포 시퀀싱 워크플로우는 동일한 세포에서 세포의 몇 가지 특징을 파악한 후 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 바코드를 사용하여 분석 결과를 연계하는 방식을 적용해 멀티오믹스 데이터 세트를 assay 내에 구축합니다.

본 Technical Note는 단일 세포로부터 전사체(3' Gene Expression 이용) 및 후성유전체(ATAC-Seq(assay for transposase-accessible chromatin with sequencing) 이용)를 동시에 프로파일링하는 프로토콜을 소개합니다. 연구자는 동일한 세포에서 단일세포의 유전자 발현(gene expression)과 크로마틴 접근성(chromatin accessibility) 데이터를 정밀하게 연계함으로써 어떻게 유전자가 다양한 세포 유형에 걸쳐 발현되고 조절되는지를 밝혀낼 수 있습니다.

## 프로토콜의 개요

아래의 단일세포 멀티오믹스 실험은 라이브러리 준비, 시퀀싱, 분석의 단계로 구성된 직관적인 워크플로우를 통해 진행됩니다(그림 1). 이 프로토콜에는 10x Genomics사의 Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression과 Illumina의 입증된 시퀀싱 기술이 적용되었습니다. 핵 현탁액(nuclei suspension)을 분리한 후, Chromium Controller와 시약을 이용하여 시퀀싱에 바로 사용할 수 있는 바코드화된 2개의 "Multiome" Library(Single-cell ATAC-Seq Library 1개와 Single-cell Gene Expression Library 1개)를 생성합니다.<sup>2</sup> 이렇게 페어링된 Multiome Library를 NovaSeq 6000, NextSeq 2000, NextSeq 1000, NextSeq 550 시스템과 같은 프로덕션 규모의 Illumina 시퀀싱 시스템으로 시퀀싱합니다. Cell Ranger ARC 파이프라인을 이용한 데이터 분석은 개별 세포에 대한 ATAC-Seq 분석 결과와 Gene Expression 분석 결과를 해당 세포의 바코드를 이용해 연계합니다. Loupe Browser 소프트웨어는 쉽게 단일세포 멀티오믹스 데이터를 시각화하고 탐색할 수 있도록 해 줍니다.

## 샘플 준비

샘플 준비 단계는 세포 배양체(culture), 1차 세포 또는 신선한 조직이나 냉동된 조직에서 핵 현탁액을 분리하는 작업으로 시작됩니다. 본 assay는 다양한 세포주(cell line), 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 신선한 또는 냉동된 마우스 배아의 뇌, 냉동된 인간의 뇌, 냉동된 림프절 종양 샘플이 사용된 실험을 통해 검증되었으며, 다른 유형의 샘플에도 적용이 가능합니다.<sup>3</sup>

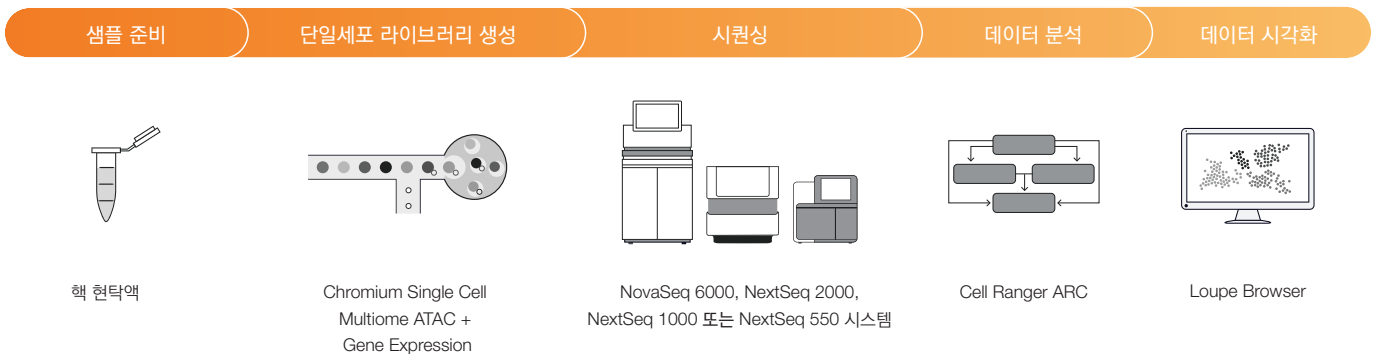


그림 1: 단일세포 멀티오믹스 실험 워크플로우 — 핵 현탁액 분리 후 Chromium Controller로 미세유체 기반의 단일세포 분할과 바코드화 진행. 이렇게 생성된 2개의 Multiome Library(Single-cell ATAC-Seq Library 1개와 Single-cell Gene Expression Library 1개)를 Illumina 기기로 시퀀싱한 후, Cell Ranger ARC와 Loupe Browser 소프트웨어로 각각 데이터 분석과 시각화 수행.

최적의 결과를 얻기 위해서는 양질의 핵을 사용하는 것이 매우 중요합니다. 10x Genomics사의 Support 웹사이트는 다양한 유형의 샘플을 통해 입증된 핵 분리 프로토콜을 제공하고 있습니다.<sup>4</sup> 10x Genomics 사의 입증된 프로토콜은 세포 현탁액 및 조직의 냉동 방법, DNase 처리와 같은 클린업 방법, 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS)를 통한 과립구(granulocyte) 세포 제거 방법, FACS를 통한 핵 분류 방법을 안내합니다.<sup>3</sup>

## 단일세포 라이브러리 생성

핵이 분리가 되면, Chromium NextGEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Kit(그림 2)를 이용하여 라이브러리를 만들 준비가 된 것입니다.<sup>4</sup> 과활성 트랜스포사제 효소(hyperactive transposase enzyme)로 대량의 핵을 처리하여 노출된 DNA를 절단하고 시퀀싱 어댑터를 삽입합니다.<sup>5</sup> 전위된 핵을 미세유체 칩(microfluidic chip)에 넣고 10x Genomics사의 Chromium Controller를 실행합니다. Chromium Controller가 각각의 핵을 고유의 바코드가 부여된 1개의 겔 비드를 가진 액적(droplet)으로 분할합니다. 이러한 액적을 GEM(Gel bead-in-emulsion)이라 합니다. 이제 동일한 핵에서 얻은 mRNA와 전위된 DNA 분절에 바코드를 부착하기 위해 GEM을 배양합니다. 이 단계에서 ATAC-Seq 결과와 Gene Expression 결과가 연계됩니다.

배양이 끝나면 GEM을 부수어 풀린된 조각을 회수하고 정제합니다. 정제된 조각은 갭(gap)을 채우고 바코드화된 전위 DNA와 cDNA 분절을 최대한 회수하기 위해 전 증폭(pre-amplification) 중합효소

연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 과정을 거치게 됩니다. 그 다음 전 증폭 산물은 Gene Expression Library 구축 시 cDNA 증폭, 그리고 ATAC-Seq Library 구축에 사용됩니다.<sup>3</sup>

마지막으로 바코드화된 Single-cell Multiome Gene Expression Library와 ATAC-Seq Library를 Illumina의 NGS 시퀀싱 시스템으로 시퀀싱하면 됩니다.

## Illumina 기기를 통한 시퀀싱

페어링된 Multiome Library는 해당 애플리케이션에 요구되는 시퀀싱 아웃풋을 충족하는 NovaSeq 6000, NextSeq 2000, NextSeq 1000 또는 NextSeq 550 시스템으로 시퀀싱하는 것을 권장합니다(표 1). 리드의 구성은 사용된 라이브러리의 종류에 따라 차이가 있습니다(표 2).

\* NextSeq 1000 시스템과 NextSeq 2000 시스템이 생성한 시퀀싱 데이터는 Cell Ranger ARC에서 BCL 파일을 이용해 분석해야 합니다. NextSeq 1000 시스템과 NextSeq 2000 시스템에 내장된 Control Software v1.2.0 또는 이전 버전에서 생성한 FASTQ 파일로 분석을 실행할 경우 Cell Ranger ARC(v1.0.1)와 호환이 되지 않습니다. 지원 요청이나 Cell Ranger ARC와의 호환성에 대한 최신 정보는 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다.

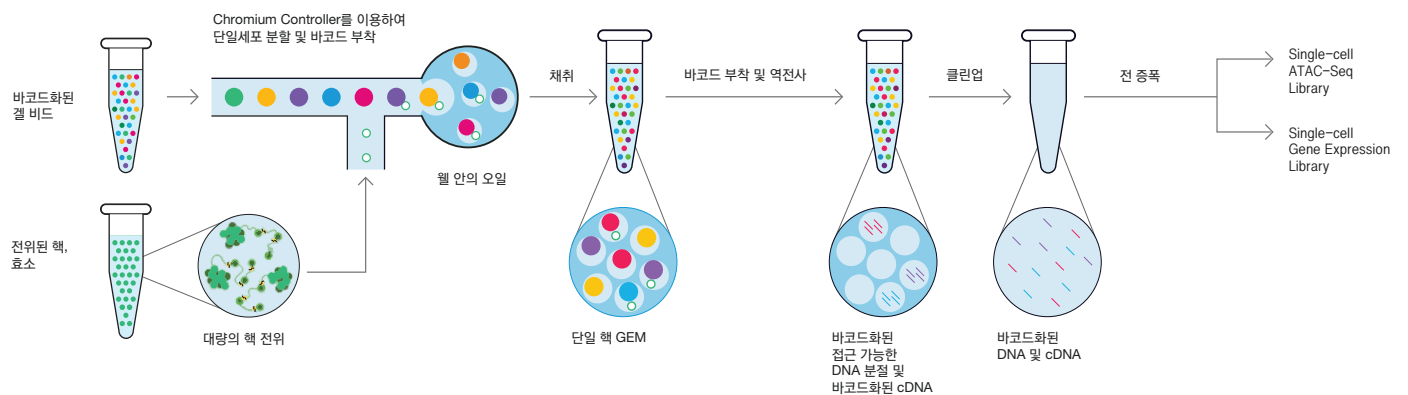


그림 2: 동일한 세포로 3' Gene Expression Library 및 ATAC-Seq Library 생성 — 단일 핵 현탁액 분리 후 대량의 핵을 전위하여 DNA 분절과 mRNA의 3' 말단이 바코드화되는 GEM 안에 각각의 핵을 포획함. 이후 GEM은 분리 및 풀링, 클린업, 전 증폭 그리고 라이브러리 구축 단계를 거치며, 이 과정을 통해 유전자 발현 프로파일과 열린 크로마틴 프로ファイルを 동일한 세포와 확실히 연계하기 위해 각 샘플로부터 2개의 상보적인 라이브러리를 생성함.<sup>2</sup>

표 1: Illumina 시퀀싱 시스템으로 Chromium Single Cell Multiome Assay 수행 시 샘플 처리량 예시

라이브러리 유형	최소 리드 페어의 수/핵 <sup>a</sup>	핵의 수/샘플	샘플의 수/런				
			NextSeq 550		NextSeq 2000		NovaSeq 6000
			High Output	P2 <sup>d</sup>	P3	SP	S1
Multiome 3' Gene Expression	20,000 <sup>b</sup>	5,000	4	4	11	8	16
Multiome ATAC-Seq	25,000 <sup>b, c</sup>	5,000	3	3	8	6	12

- a. 최소 권장 리드(read) 수(10x Genomics사 제공).<sup>6</sup>
- b. 요구되는 성능이나 애플리케이션에 따라 시퀀싱 깊이(depth) 조정 필요. Cell Ranger ARC 런 요약 내용중 시퀀싱 포화(saturation) 지표와 곡선을 참고하여 특정 유형의 샘플에 맞게 시퀀싱 깊이 최적화 가능.
- c. 개별 리드 수: 50,000(Read 1: 25,000, Read 2: 25,000).
- d. 동일한 샘플 처리량을 지원하는 P2 Flow Cell은 NextSeq 1000 시스템에서도 이용 가능.

표 2: Chromium Single Cell Multiome Library의 권장 리드 구성

	Multiome 3' Gene Expression Library				Multiome ATAC-Seq Library			
	Read 1	i7 Index	i5 Index	Read 2	Read 1	i7 Index	i5 Index	Read 2
용도	세포 바코드 및 UMI	샘플 인덱스	샘플 인덱스	cDNA insert	전위 DNA	샘플 인덱스	샘플 인덱스	전위 DNA
길이 <sup>a</sup>	28 bp	10 bp	10 bp	90 bp	50 bp <sup>b</sup>	8 bp	24 bp <sup>c</sup>	49 bp <sup>b</sup>

- a. 전사물 리드가 짧을수록 전사체 정렬(alignment) 비율도 감소할 가능성이 있음. 세포 바코드, 고유한 분자 식별자(unique molecular identifier, UMI), 샘플 인덱스 리드는 절대로 명시된 길이보다 짧아서는 안 되며, 상기 표에 권장된 길이보다 긴 리드는 사용이 가능함. Cell Ranger ARC는 세포 바코드 또는 UMI 리드에 추가적인 염기가 존재할 경우 자동으로 배제됨.
- b. 시퀀싱 길이는 시퀀싱 키트에 따라 조정 가능하나 30 bp 미만은 허용되지 않음.
- c. NextSeq 550 시스템과 같이 24-bp i5 Index Read를 지원하지 않는 시퀀싱 시스템에는 커스텀 레시피가 필요함.<sup>9</sup>

Multiome ATAC-Seq Library에는 1% PhiX spike-in이 권장됩니다. Spike-in은 시퀀싱의 다양성을 적절히 보장하여 양질의 시퀀싱 결과를 얻을 수 있도록 해 줍니다.<sup>6</sup> Single-cell Gene Expression Library<sup>7</sup>와 Single-cell Multiome ATAC-Seq Library<sup>8</sup>에 대한 예상되는 시퀀싱 매트릭스는 10x Genomics사의 Support 웹사이트에서 확인하실 수 있습니다.

NextSeq 550 시스템의 커스텀 레시피 지원 요건

NextSeq 550 시스템†(NextSeq Control Software v4.0.2 또는 이전 버전)에 사용되는 디폴트 레시피는 20 bp를 초과하는 i5 Index 길이는 지원하지 않습니다. 따라서 NextSeq 550 시스템에서 Multiome ATAC-Seq Library로 성공적인 런을 수행하려면 커스텀 레시피가 필요합니다. Illumina는 통상적으로 커스텀 레시피의 사용을 지원하지 않지만, 고객분들이 본 커스텀 레시피로도 수월하게 해당 assay 런을 수행하실 수 있도록 10x Genomics사와 함께 기술 지원을 제공하고 있습니다.<sup>9</sup> 10x Genomics 또는 Illumina의 담당 지원팀을 통해 해당 assay에 적합하게 NextSeq 550 시스템을 설정하는 방법에 관한 최신 정보를 얻으실 수 있습니다.

† NextSeq 500 시스템과 NextSeq 550Dx 시스템(RUO Mode)을 사용하는 경우에도 적용되는 권장 사항.

## 데이터 분석 및 시각화

시퀀싱이 끝나면 10x Genomics사의 Cell Ranger ARC 분석 파이프라인이 단일 세포 내 열린 크로마틴 영역을 식별함과 동시에 전사물(transcript)의 수와 피크 접근성을 측정합니다. 동일한 세포에서 ATAC-Seq 및 전사체 측정이 이루어지므로 크로마틴 접근성과 유전자 발현의 판독 결과를 바로 연계시킬 수 있습니다.

Cell Ranger ARC 소프트웨어는 프로필이 유사한 세포 클러스터도 식별합니다. 분석 파이프라인은 10x Genomics사의 Loupe Browser 시각화 소프트웨어나 R 또는 Python과 같은 타사 도구를 활용한 추가 분석에도 사용이 가능한 파일과 QC(quality control, 품질 관리) 정보<sup>10</sup>를 생성합니다.

### 주요 데이터

전사체학적 분석과 후성유전체학적 분석을 연계하면 세포 유형과 상태의 특징을 심층적으로 이해할 수 있습니다. 예를 들어, 동일한 세포 유형 내에서 전사 인자(transcription factor) 발현과 모티프(motif) 접근성을 비교함으로써 유전자의 차등 발현(differential expression)을 유도하는 인자(driver)를 식별하고 더 정교한 유전자 조절 네트워크(gene regulatory network)를 구축할 수 있습니다(그림 3).<sup>2</sup> 뿐만 아니라 Loupe Browser를 활용하면 인접한 유전자 발현과 관련된 열린 크로마틴 피크 간의 연관성도 시각화할 수 있습니다(그림 4).<sup>2</sup>

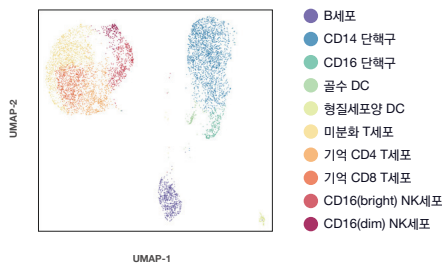
## 전문가 지원

Illumina와 10x Genomics의 기술지원팀은 Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Library의 시퀀싱 워크플로우 전반에 걸쳐 고객분들을 지원하기 위해 최선을 다하고 있습니다. Assay 및 분석 관련 문의는 10x Genomics의 기술지원팀(support@10xgenomics.com)으로, 시퀀싱 관련 문의는 Illumina의 기술지원팀(techsupport@illumina.com)으로 보내주시기 바랍니다. 또한 Illumina와 10x Genomics의 기술지원팀은 복잡한 문제를 해결하는 데에도 도움을 드릴 수 있습니다.

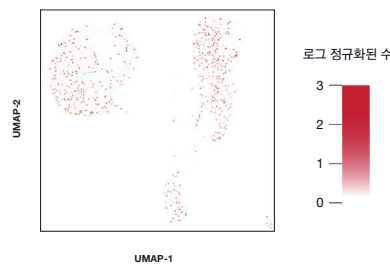
## 요약

본 단일세포 멀티오믹스 프로토콜은 단일 세포의 유전자 발현과 크로마틴 접근성을 동시에 프로파일링하는 데 적합한 프로토콜입니다. 통합된 데이터 세트는 질병 유무에 따른 유전자 발현의 차이를 비롯한 유전자 조절을 유도하는 세포 기전을 밝혀내는 데 유용합니다.

A. PBMC 유전자 투영 데이터



B. NFE2L2 유전자 발현



C. NFE2L2 모티프 접근성

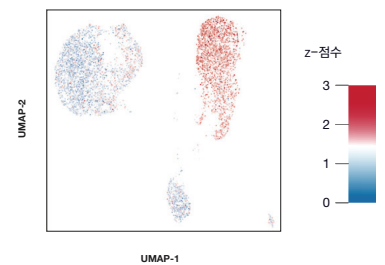


그림 3: 유전자 발현 및 크로마틴 상태에 대한 상보적인 단일세포 데이터 — 건강한 PBMC에서 추출한 핵을 Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression으로 처리 후 NovaSeq 6000 시스템으로 라이브러리의 시퀀싱을 수행함. (A) 유전자 발현 데이터를 이용해 7,273개의 핵에 대한 클러스터 분석을 수행한 결과, 세포군의 주석은 기존의 표지 유전자(marker gene)에 기반함. (B) 전사 인자 NFE2L2의 발현은 모든 세포 유형에 걸쳐 관찰됨. (C) 단, 동일한 세포로부터 얻은 ATAC-Seq 데이터로 측정된 NFE2L2 모티프 접근성은 단핵구군에 국한됨.<sup>2</sup>

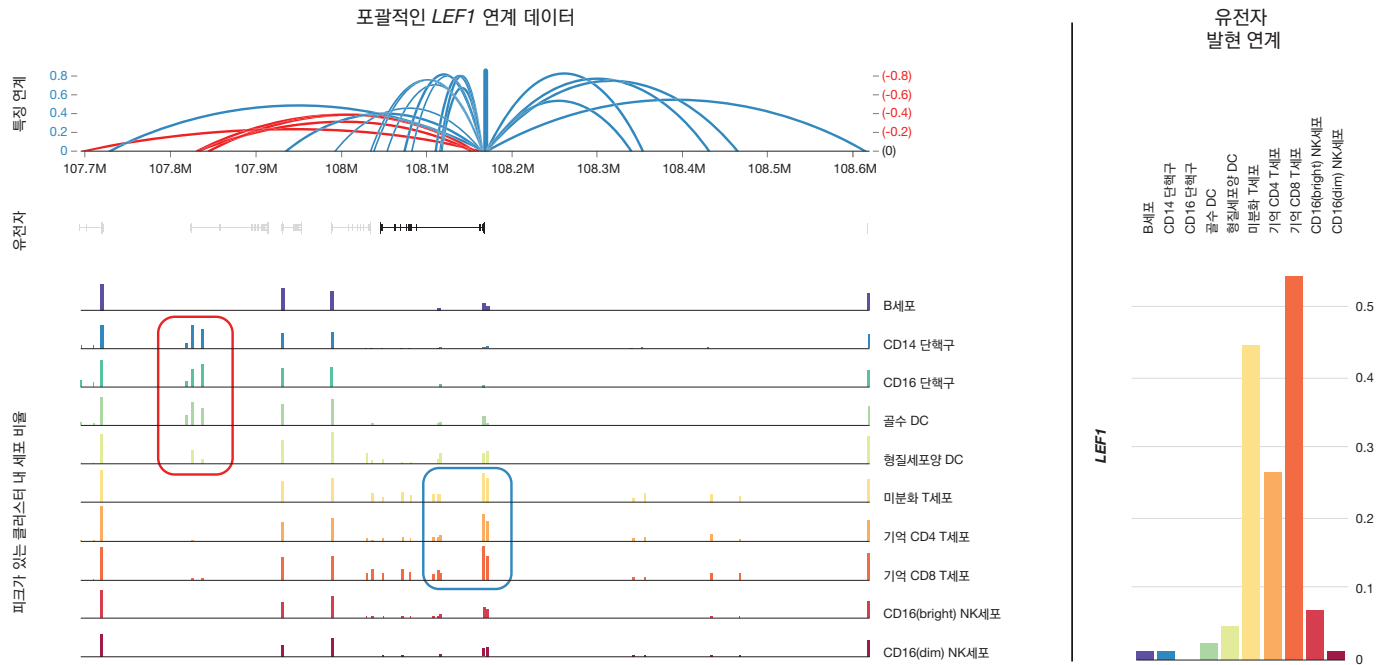


그림 4: 관심 유전자와 직접 연계된 추정 조절 요소의 식별 — 포괄적인 *LEF1* 연계 데이터는 앞서 그림 3에서 분석한 PBMC 핵 7,273개의 1 Mb 영역 전반에 대해 *LEF1* 유전자 발현과 양의 상관관계가 있는 열린 크로마틴 피크(파란색 곡선)와 음의 상관관계가 있는 열린 크로마틴 피크(빨간색 곡선)를 나타냄. *LEF1* 발현 수준과 열린 크로마틴 피크는 세포 유형에 따라 색으로 구분됨. *LEF1*의 세포 유형 특이적인 발현은 특히 미분화 T세포와 기억 T세포(파란색 상자)에서 농축(enrichment)된 *LEF1* 촉진자(promoter) 근처에 있는 연계된 열린 크로마틴 영역과 상관관계를 보임. 단핵구나 골수계 수지상 세포와 같이 *LEF1* 발현량이 적은 세포의 열린 크로마틴 영역은 각각 최소 수백 Kb의 거리에 존재하며 발현이 억제되어 있을 가능성이 있음(빨간색 상자).<sup>2</sup>

## 상세 정보

[illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/ultra-low-input-single-cell-rna-seq.html](https://illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/ultra-low-input-single-cell-rna-seq.html)에서 Illumina의 시퀀싱 플랫폼을 이용한 자세한 단일세포 시퀀싱 방법을 확인하고 단일세포 시퀀싱 ebook을 다운로드하실 수 있습니다.

Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression 제품에 관한 자세한 정보는 [10xgenomics.com/products/single-cell-multiome-atac-plus-gene-expression](https://10xgenomics.com/products/single-cell-multiome-atac-plus-gene-expression)에서 확인하시기 바랍니다.

## 참고 문헌

1. Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. [Comprehensive Integration of Single-Cell Data](#). *Cell*. 2019;177(7):1888-1902.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.05.031
2. 10x Genomics. [Simultaneous profiling of the transcriptome and epigenome from the same cell](#). Accessed February 25, 2021.
3. 10x Genomics. Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Support. Accessed February 25, 2021. [support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex](https://support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex).
4. 10x Genomics. Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Sample Prep Demonstrated Protocols. Accessed February 25, 2021. [support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex/sample-prep](https://support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex/sample-prep).
5. Buenrostro J, Wu B, Chang H, Greenleaf W. [ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide](#). *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;109:21.29.1-21.29-9. doi:10.1002/0471142727.mb2129s109
6. 10x Genomics. [Sequencing Requirements for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression](#). Accessed February 25, 2021.
7. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell 3' v3.1 Dual Index Libraries](#). Accessed February 25, 2021.
8. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell Multiome ATAC Libraries](#). Accessed February 25, 2021.
9. 10x Genomics. [Why do I need a custom recipe when sequencing Multiome ATAC libraries on the NextSeq?](#) Accessed February 25, 2021.
10. 10x Genomics. [Interpreting Cell Ranger ARC Web Summary Files for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Assay](#). Accessed February 25, 2021.

# illumina®

무료 전화 (한국) | 080-234-5300

techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved. 모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다. 특정 상표 정보는 [www.illumina.com/company/legal.html](https://www.illumina.com/company/legal.html)을 참조하십시오.  
M-AMR-00006 KOR