

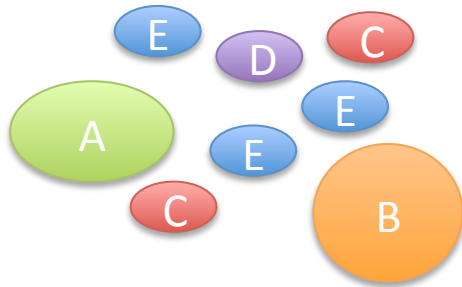
1細胞Quartz-Seq法誕生までの 開発の道のりと今後の展開

2013/09/04 NGS現場の会スポンサーセッション(株式会社日本ジェネティクス)

理化学研究所情報基盤センター
バイオインフォマティクス研究開発ユニット
笹川 洋平

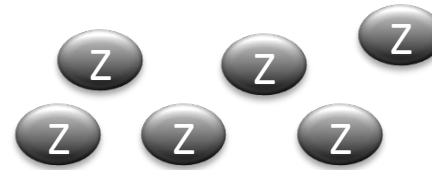
細胞集団の不均一性

分化状態の差

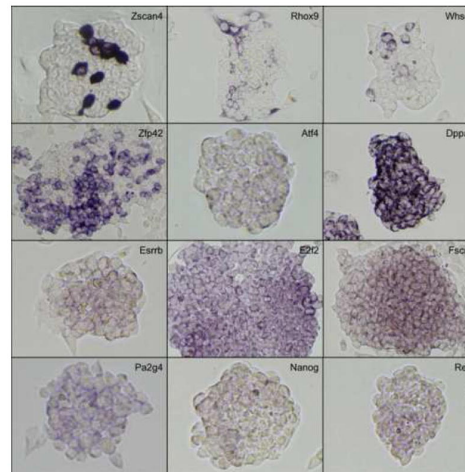


Organs, some culturing cells

同じ分化状態での差、遺伝子発現のばらつき

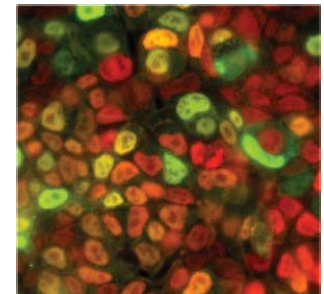


RNA level (ES cell)



Protein level (ES cell)

NANOG, OCT4



NATURE|Vol 467|9 September 2010

Carter et al. 2008
An in situ hybridization-based screen
for heterogeneously expressed genes
In mouse ES cells

METHOD

Open Access

Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity

Yohei Sasagawa^{1,7†}, Itoshi Nikaido^{1,7†}, Tetsutaro Hayashi², Hiroki Danno³, Kenichiro D Uno¹, Takeshi Imai^{4,5} and Hiroki R Ueda^{1,3,6*}



Itoshi Nikaido

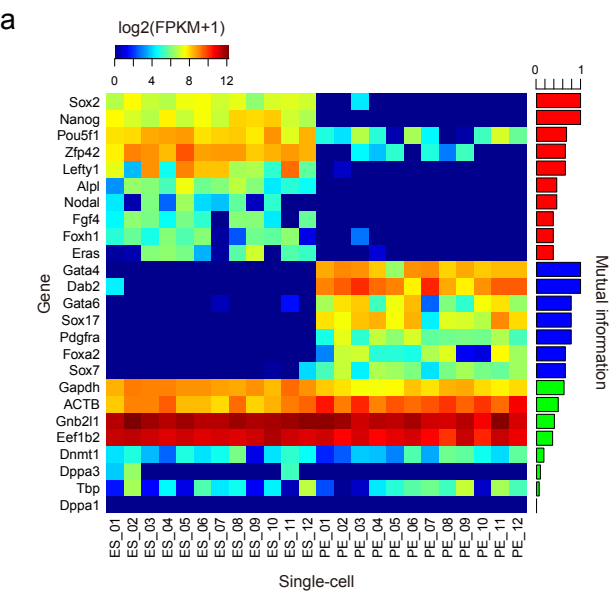


Yohei Sasagawa

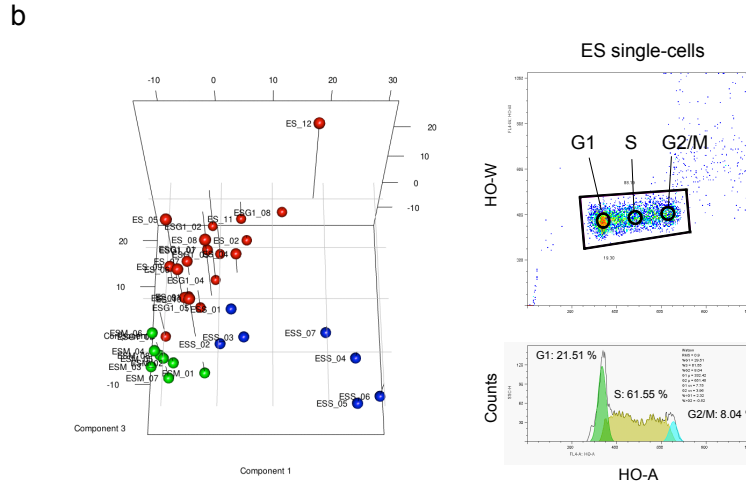


Hiroki Danno

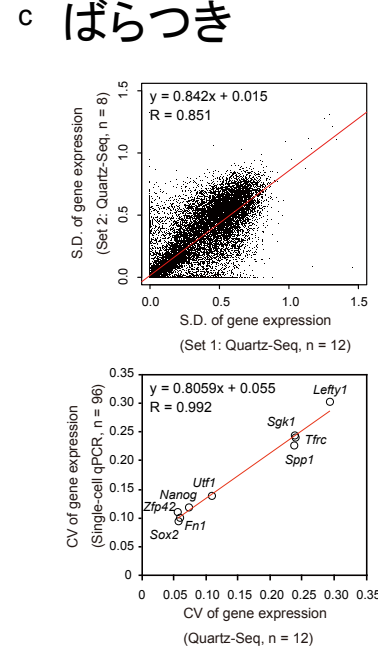
分化状態の違い



細胞周期の違い



遺伝子発現のばらつき



これから1細胞RNA-seqを始める方へ
～Quartz-Seqの内容紹介・導入～

1細胞RNA-seqを行うにあたって

1. 1細胞でやる意義・評価系・検証系(実験デザイン)
2. 1細胞実験の環境コントロール
3. 1細胞RNA-seq法(Quartz-Seq)の導入
4. 1細胞採取方法の導入
5. アップデート

1細胞RNA-seqを行うにあたって

1. 1細胞でやる意義・評価系・検証系(実験デザイン)
2. 1細胞実験の環境コントロール
3. 1細胞RNA-seq法(Quartz-Seq)の導入
4. 1細胞採取方法の導入
5. アップデート

実験デザイン

Hacking is believing 「だったらいいな」で終わらせない

検索

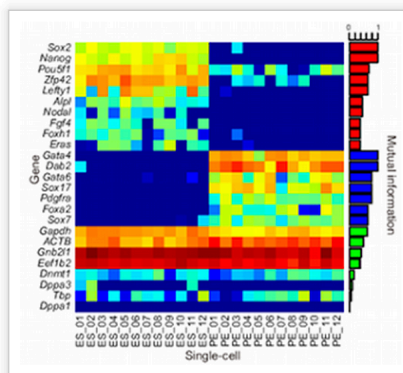
MAY

23

Quartz-Seqで1細胞/微量RNA-Seqを始めたい方へ

はじめに

新しい高精度な1細胞RNA-Seq, Quartz-Seq論文を出してから、各方面から多く相談を受けています。



1細胞RNA-seqが威力を発揮する分野
評価系の概要、検証系の導入のススメ
Quartz-Seqの導入の流れ

Sasagawa Y and Nikaido I, et. al. [Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene expression heterogeneity](#). Genome Biology. 14. 2013

そこで、新しく1細胞RNA-Seqを始める方へ、僕達が理想だと考えている技術導入の手順を紹介したいと思います。また我々の方法は1細胞(6-14 pg Total RNA)だけでなく pg-ng オーダーの少量RNAからシーケンスが可能です。そのような方も以下の手順が参考になるとと思います。

0. 1細胞/微量RNA-Seqが本当に必要なのか検討する

1細胞/微量RNA-Seqでは、現時点でQuartz-Seqが世界最高の性能を持っている訳ですが、十分なサンプルを用意し、通常のRNA-Seqしたほうが、より精度の高いデータが得られます。なので、基本的には、サンプルをたくさん集める方法をしっかり検討すべきです。まずは、戦略面と技術面で1細胞/微量RNA-Seqが本当に必要かを検討する基準について書きます。

1細胞RNA-seqを行うにあたって

1. 1細胞でやる意義・評価系・検証系(実験デザイン)
2. 1細胞実験の環境コントロール
3. 1細胞RNA-seq法(Quartz-Seq)の導入
4. 1細胞採取方法の導入
5. アップデート

一般的なRNAの取り扱い注意10項目



The screenshot shows the BitesizeBio website interface. At the top, there is a navigation bar with links for HOME, MEMBERS ONLY, CHANNELS, ARTICLES, QUESTIONS, WEB SEMINARS, PRODUCTS, T-SHIRTS, and LOGIN. Below the navigation bar, there is a search bar and a list of article categories. The main content area features an article titled "10 Ways to Work RNase Free" by Nick Oswald, dated April 01, 2012. The article includes a photograph of two glass bottles labeled "Sterile RNase" and "DTT @ 100mM". Below the photograph, there is a list of 10 tips for working with RNA, including cleaning everything, treating solutions, designating a workspace, using barrier tips, wearing gloves and a lab coat, and being paranoid. The article also includes a sidebar with a Genlantis advertisement for the CoolCLAVE Laboratory Bench Top Sterilizer and a section for tweets related to the article.

10 Things Every Molecular Biologist Should Know

Grab your Free membership to Bitesize Bio and get access to our latest Ebooks and more!

- Free ebooks and audiobooks on the topics that matter to you
- Access to Member's-only articles and Videos
- Advance notice of new webinars and eBooks
- Access to make comments and ask questions on BaB

Enter your email address

get more info

HOME MEMBERS ONLY CHANNELS ARTICLES QUESTIONS WEB SEMINARS PRODUCTS T-SHIRTS LOGIN

BROWSE ARTICLES: [by date](#) [by popularity](#) [random](#) [categories](#) [tags](#) [authors](#)

10 Ways to Work RNase Free
April 01, 2012 by Nick Oswald in [Molecular Biology](#), [Tech Tips](#)
From the [Bitesize Bio](#) channel

Genlantis
CoolCLAVE™ Laboratory Bench Top Sterilizer

- > Rapid deodorizing and sterilization
- > Safe to use
- > Kills bacteria, fungus, and viruses

[>> See it in action](#)

Working with RNA? What fun! Those little, nearly indestructible RNases are everywhere – on your skin and mucous membranes, in the water and (some of the) enzymes you use, on lab surfaces, even in airborne microbes! Here are 10 ways to keep the RNases at bay, and keep your precious samples safe:

1. **Clean everything**; bench surfaces, pipettes, electrophoresis equipment and anything else you can think of with an RNase cleaning product, such as **RNaseZap from Ambion** (or 0.5% SDS followed by 3% H₂O₂). Establish a regular cleaning routine; a quick daily clean and a deeper weekly or monthly clean... and stick to it.
2. **Treat your solutions**. Good old DEPC is a fine way to keep your solutions RNase free. Use 0.5 mL DEPC/L, incubate for 2 hr, autoclave for 45 minutes minimum. DMPC can also be used and may be safer than DEPC, which is a known carcinogen. Alternatively, many vendors offer certified nuclease-free water, which may be worth the investment. Note that **ultrafiltered water is already RNase free** so does not need DEPC treatment. Also, don't use DEPC/DMPC on tris-based solutions.
3. **Designate a workspace**, and a set of pipettes, if possible, that are dedicated to RNase-free work.
4. **Use barrier tips**. Barrier tips stop cross-contamination of your reagents and samples by preventing aerosols reaching the barrel of your pipette. They are a must-have for RNA work.
5. **Wear gloves and a lab coat**. The obvious ones are the best. Gloves and a lab coat will stop you from contaminating your samples with your own RNases. Change both frequently (maybe once per week for lab coats). Also, when you have your gloves on don't touch anything that is not decontaminated – door handles, taps, yourself... or other people (!).

To receive information about any of our new channels click on the button below.
[subscribe to the channel newsletter »](#)

Tweets

Bitesize Bio @BitesizeBio 18h
New article: How to properly analyze and troubleshoot DNA sequencing results [goo.gl/GA7aBa](#)
Expand

Bitesize Bio @BitesizeBio 1 Aug
New Article: Galaxy: A Free NGS Workflow Management System [goo.gl/VsxAy8](#)

Bitesize Bio @BitesizeBio 21 Jul

1. Clean everything
2. Treat your solution
3. Designate a workspace
4. Use barrier tips
5. Wear gloves and a lab coat
6. Bake your glasswear
7. Isolate RNA using a method that eliminates endogenous RNase
8. Use RNase-free enzymes
9. Use an RNase inhibitor
10. Store RNA in ethanol
11. Be completely paranoid, work as far away from your colleagues as possible, and shower in RNaseZAP five times per day

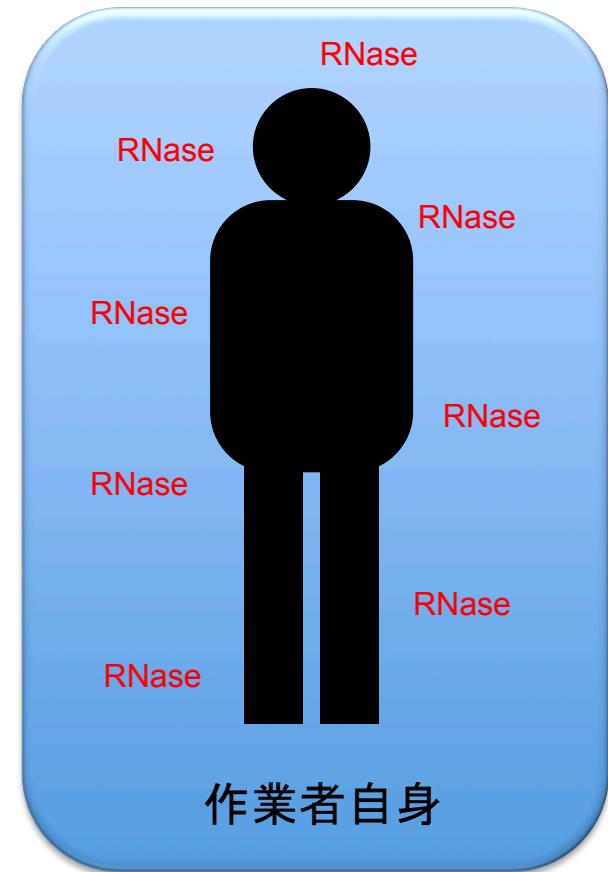
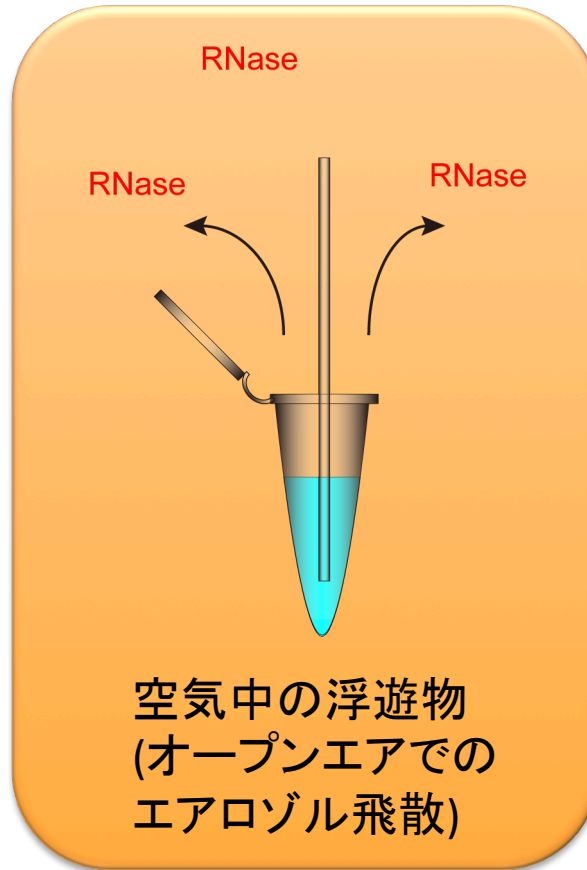
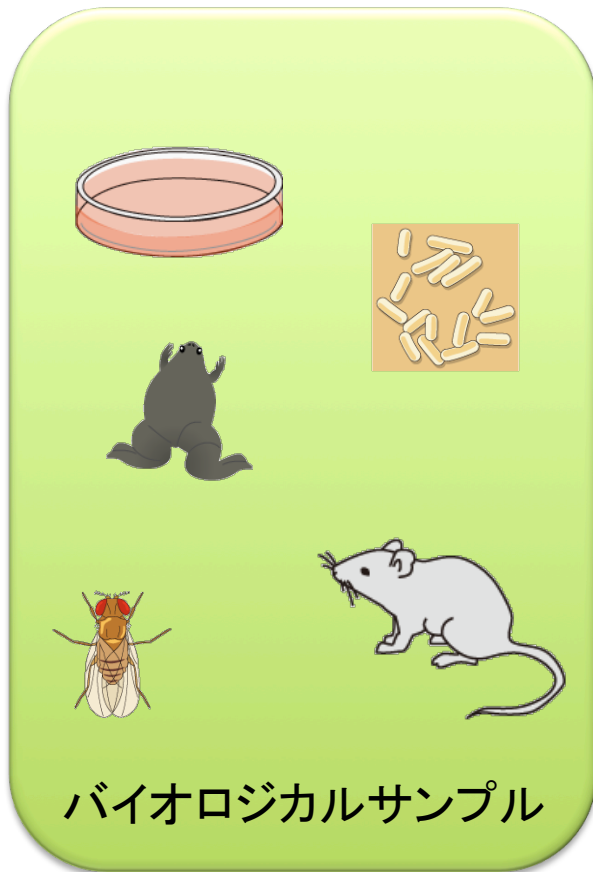
1細胞レベルのRNAの取り扱いで 気をつけていた点

試薬ストック・反応液・使用する消耗品に
RNaseや意図しない核酸をコンタミネーションさせないこと

独立して、6/6導入に成功

だって相手は10 pg total RNA

主なRNaseの汚染源



RNaseコンタミ 事例1

～PCRチューブにコンタミしていた例～

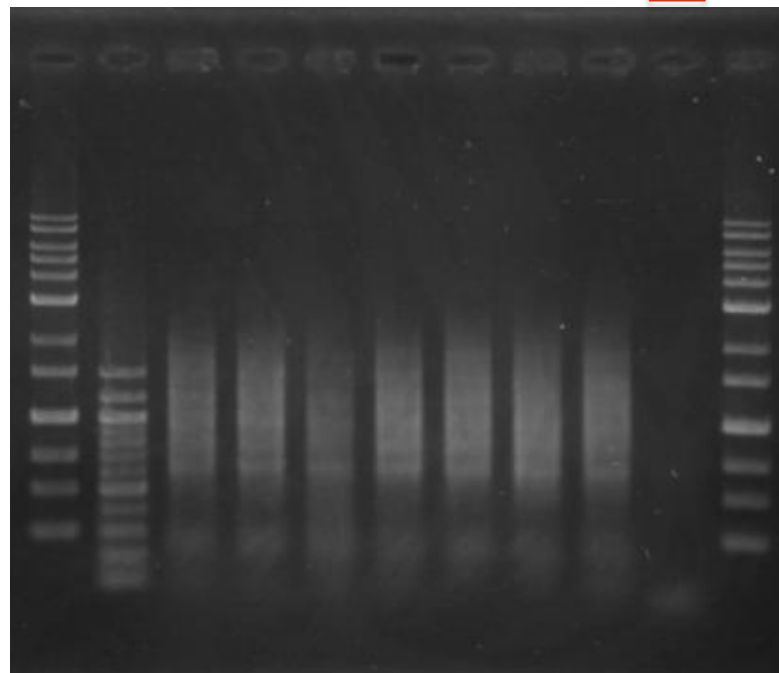


A: RNase除去スペースで管理していた PCRチューブ (適正管理)

B: RNase除去スペース以外で管理していた PCRチューブ (不適正管理)

A		B		A		B	
Tube A-1	Tube A-2	Tube B-1	Tube B-2	Tube A-3	Tube A-4	Tube B-3	Tube B-4

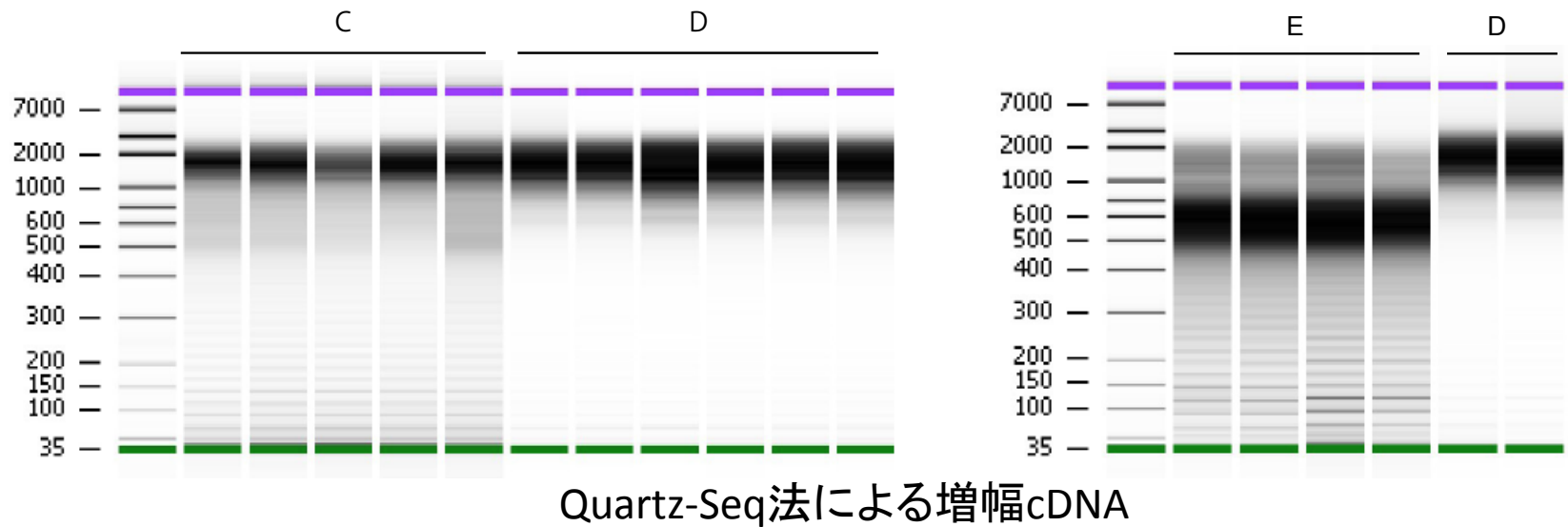
3,000 bp
2,000 bp
1,000 bp
500 bp
300 bp
100 bp



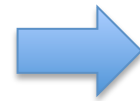
プロトタイプ法による増幅cDNA

RNaseコンタミ 事例2

～試薬にコンタミさせていた例～



C: マスター試薬にコンタミ (不適正管理)



この試薬セットはもう二度と使えない

D: ポジコン試薬 (適正管理), ポジコンcDNA

E: RNaseのコンタミ (不適正手技)

実験環境・試薬等の適正管理



実験手技

→ 失敗リスクを低減

実験環境・試薬等の適正管理

実験空間

クールドサンプルと物理的に区切られたベンチを推奨。RNase 除去試薬で十分に除去する。部屋の用意が難しい場合は局所的にクリーンブースを用意することを推奨。

実験機器

全ての実験機器をRNase除去試薬で処理。
他の実験特にnucleaseを扱う実験とは分けたほうが良い。専用にするのがベスト。

試薬・消耗品の管理空間

RNase 除去試薬で十分に除去した閉鎖空間に保存する。

実験への配慮の伝達

実験中に実験者の周りでマスク無しでの会話を禁止。
RNase除去空間(実験空間および試薬・消耗品の管理空間)へのグローブ無しでの非接触。
実験者が積極的にラボメンに伝えることはもちろん、ラボ(PI)の支援・配慮が必要。

実験環境・セットアップの適正管理

実験空間

クルードサンプルと物理的に区切られたベンチを推奨。RNase 除去試薬で十分に除去する。部屋の用意が難しい場合は局所的にクリーンブースを用意することを推奨。

実験機器



実験環境・試薬等の適正管理

実験空間

クールドサンプルと物理的に区切られたベンチを推奨。RNase 除去試薬で十分に除去する。部屋の用意が難しい場合は局所的にクリーンブースを用意することを推奨。

実験機器

全ての実験機器をRNase除去試薬で処理。

他の実験特にnucleaseを扱う実験とは分けたほうが良い。専用にするのがベスト。

試薬・消耗品の管理空間

RNase 除去試薬で十分に除去した閉鎖空間に保存する。

RNA用

RNA・DNA用

RNA・DNA・バイオサンプル用



実験環境・試薬等の適正管理

実験空間

冷凍サンプルと物理的に区切られたベンチを共用する実験室の部屋の用意が難しい場合は局所的にクリーンベンチを

酵素・試薬など

実験機器

全ての実験機器をRNase除去試薬で処理。
他の実験特にnucleaseを扱う実験とは分けたほう

試薬・消耗品の管理空間

RNase 除去試薬で十分に除去した閉鎖空間に保存する。

冷凍庫



冷凍保存容器



プラスチック収納箱



ガラス戸付き実験棚



キャビネットワゴン



実験への配慮

実験中に実験者の周り
RNase除去空間(実験室)

チップ・PCRチューブ
小機器など

実験環境・試薬等の適正管理

実験空間

クールドサンプルと物理的に区切られたベンチを推奨。RNase 除去試薬で十分に除去する。
部屋の用意が難しい場合は局所的にクリーンブースを用意することを推奨。

実験機器

全ての実験機器をRNase処理。
他の実験特にnucaseを扱う実験とは分けたほうが良い。ベスト。

試薬・消耗品の管理空間

RNase 除去試薬で十分に除去した閉鎖空間に保存する。

コンタミ対策

承知

実験への配慮の伝達

実験中に実験者の周りでマスク無しでの会話を禁止。

RNase除去空間(実験空間および試薬・消耗品の管理空間)へのグローブ無しでの非接触。

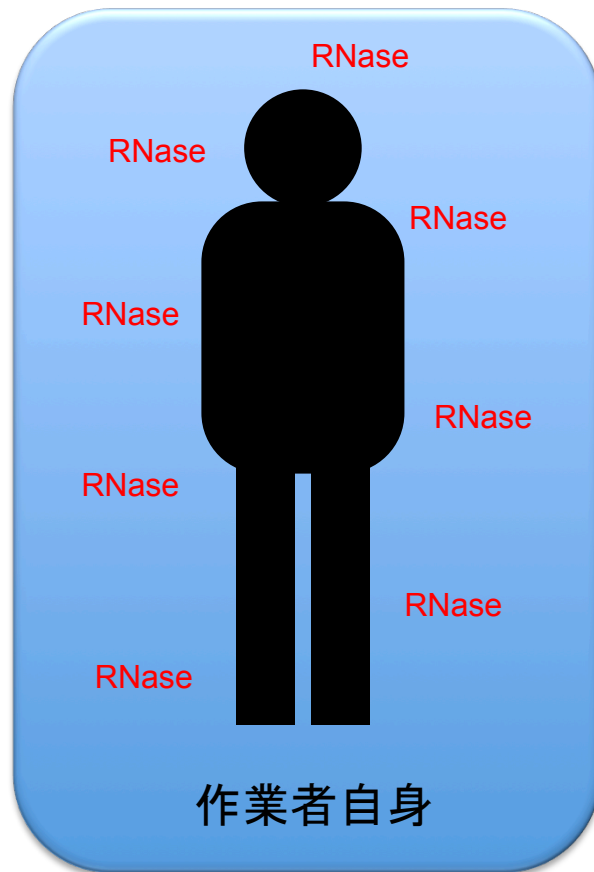
実験者が積極的にラボメンに伝えることはもちろん、ラボ(PI)の支援・配慮が必要。

実験手技

ロボット



<http://www.nikkyo-tec.co.jp/>



マスク



グローブ



キャップオープナー

実験手技

実験者装備

マスク・手袋必須。

手袋のリユースはまったくおすすぬめない。

袖口がだぶついて、実験台などに接触するような服を避ける。



口・手が
RNaseコンタミの
最大のリスク源。

実験手技

実験者装備

マスク・手袋必須。

手袋のリユースはまったくおすすしめない。

袖口がだぶついて、実験台などに接触するような服を避ける。



袖口も注意。
気が付かないうちに
実験台につき
RNaseを広げないように注意。

対策としては腕をまくって、
長めのグローブを使うのもいい。

1細胞レベルのRNAの取り扱いで 気をつけていた点

試薬ストック・反応液・使用する消耗品に
RNaseや意図しない核酸をコンタミネーションさせないこと

1細胞RNA-seqを行うにあたって

1. 1細胞でやる意義・評価系・検証系(実験デザイン)
2. 1細胞実験の環境コントロール
3. 1細胞RNA-seq法(Quartz-Seq)の導入
4. 1細胞採取方法の導入
5. アップデート

Quartz-Seqプロトコルダウンロードできます。

ACCC, BiT, Protocolsでググるとでできます。

Protocols <http://bit.accc.riken.jp/protocols/>

Single-Cell RNA-seq (6-13 pg Total RNA)



- [Whole-transcript amplification for single-cell Quartz-Seq \(PDF\)](#)
- [LIMprep for Quartz-Seq \(PDF\)](#)
- [A magnetic stand for ultra-low sample \(YouTube\)](#)
- Reference and Data
 - [Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene expression heterogeneity](#)
 - [All FPKM Matrix Data](#) (tab separated text file, zip archive)
 - [Additional file 1 \(PDF\)](#)
 - [Quartz-Seq.org: A database for single-cell Quartz-Seq with Embryonic stem cell](#)

RNA-Seq for low amount RNA (100 pg - 1 ng)



- [Whole-transcript amplification for cell-population Quartz-Seq \(Cell Direct Version\)](#)
- [Whole-transcript amplification for cell-population Quartz-Seq \(Purified RNA Version\)](#)

Library Preparation for illumina HiSeq

- [LIMPrep's Protocol](#)
- Blog entry: [LIMprep: a highly-sensitive multiplex library preparation method for low amount DNA](#)
- [LIMprep Technical Note \(PDF\)](#)

Whole-transcript amplification for single-cell Quartz-Seq (Original)

2013/05/01 Yohei SASAGAWA sasagawayohei@gmail.com

Step0: Experimental environment

- To reduce the risk of RNase and DNA contamination, the workbench environment and all experimental equipment are cleaned using the RNase removal reagent RNase Out.
- You should wear mask and glove. Do not reuse glove.

Step1: Cell collection & lysis

- Prepare Single-cell lysis buffer (on a 0 °C aluminum PCR rack)

Single-cell lysis buffer (0.5% NP-40)	
<input type="checkbox"/> 10% NP-40	10 μ l
<input type="checkbox"/> H ₂ O (RNase-free)	190 μ l
<input type="checkbox"/> Total volume	200 μ l

Alternative Option* Single-cell lysis buffer (0.5% NP-40)	
<input type="checkbox"/> 10% NP-40	10 μ l
<input type="checkbox"/> RNasin Plus	5 μ l
<input type="checkbox"/> H ₂ O (RNase-free)	185 μ l
<input type="checkbox"/> Total volume	200 μ l

*You can use alternative single-cell lysis buffer.
*RNase inhibitor may reduce the risk of RNA degradation.

Lysis sample	
<input type="checkbox"/> Single-cell lysis buffer	0.4 μ l
<input type="checkbox"/> single-cell	1 cell
<input type="checkbox"/> Total volume	0.4 μ l

- Add 0.4 μ l single-cell lysis buffer to PCR tube (on a 0 °C aluminum PCR rack)
- Add bubble to single-cell lysis buffer (on a 0 °C aluminum PCR rack)
- Single-cell is collected into lysis buffer by using FACS or manual picking (on a 0 °C IsoFreeze rack)
- Mix at 2000-2500 rpm for 15 sec at 4 °C (with Mixmate)
- Immediately centrifuge at 3000 x g centrifugation for 10 sec at 4 °C

You can mix the samples by pipetting instead of mixer (such as Mixmate).