

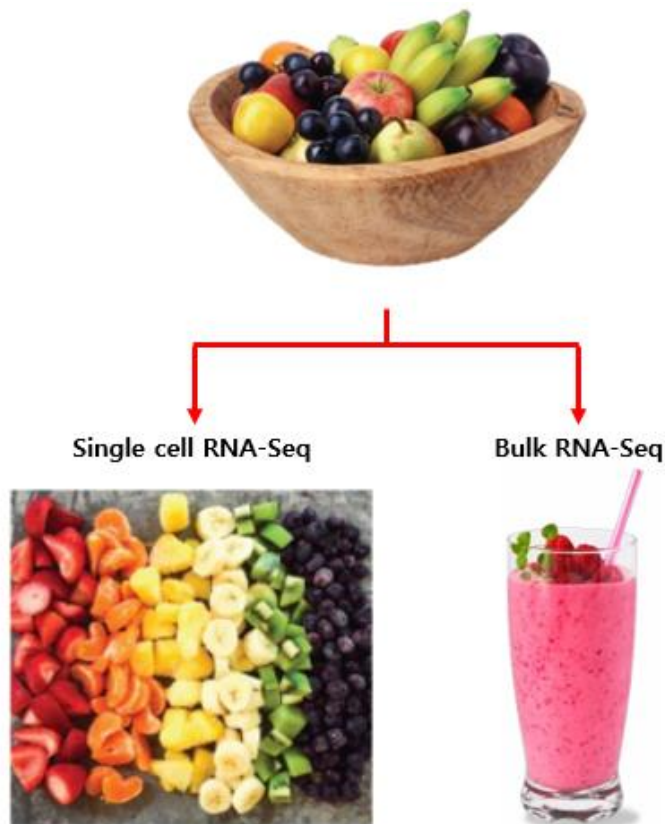
## Single cell RNA Sequencing 분석 기술

### < Single Cell RNA-Seq vs Bulk-Seq >

Bulk RNA-Seq 분석 방법과는 달리 single cell RNA-Seq 분석법은 생명체의 모든 정보를 한 번에 읽어 들이고 통합적으로 분석할 수 있다는 장점 때문에 조직의 발생 및 줄기세포의 분화와 종양의 이질성(heterogeneity)등을 분석하기 위한 목적으로 최근 많이 사용되고 있다. Single cell RNA-Seq 방식이 도입된 이후 시간이 지남에 따라 한 번에 sequencing 할 수 있는 세포의 개수가 비약적으로 증가했다[1].

현재 발표된 Single cell RNA-Seq Sequencing 기술의 종류는 수십 가지에 이르지만, 그 근본 원리는 기존의 RNA-Seq 기술과 크게 다르지 않다. 가장 활발하게 사용되는 droplet based sequencing 방식은 세포와 oligo-dT primer로 코팅된 bead가 각각 한 개씩 들어간 GEM를 만들어 그 안에서 poly(A) tail이 달린 mRNA를 붙잡는 방법이다[2,3]. Single Cell RNA-Seq 분석의 기본 단위는 하나의 세포이지만, 여러 개의 세포에서 얻어진 정보들을 잘 분류해서 유사한 세포끼리 모아 준 뒤, 비슷한 세포들의 군집을 하나의 단위로 묶어서 분석하는 것이 일반적이다.

하지만 중요한 차이점은 아래와 같이 bulk RNA-Seq은 시료 내의 모든 세포의 평균값을 분석하는 것이라면, single cell RNA-Seq은 시료 내의 세포 각각을 개략적으로 들여다보고 몇 종류의 다른 세포 타입이 존재하는지 파악한 뒤 각각의 세포 타입에 대한 평균값을 따로 만들어 분석한다는 점이다[4].



### Single cell RNA-Seq

### Bulk RNA-Seq

<b>Goal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Measure the gene expression of individual cells in a sample</li> <li>• To identify differences between <b>cell types/states</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Measure the average gene expression across the population of cells in a sample</li> <li>• To identify differences between <b>sample conditions</b></li> </ul>
<b>Feature</b>	<b>Separate Populations</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Define heterogeneity</li> <li>• Identify rare cell populations</li> <li>• Cell population dynamics</li> </ul>	<b>Average expression level</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparative transcriptomics</li> <li>• Disease biomarker</li> <li>• Homogenous systems</li> </ul>

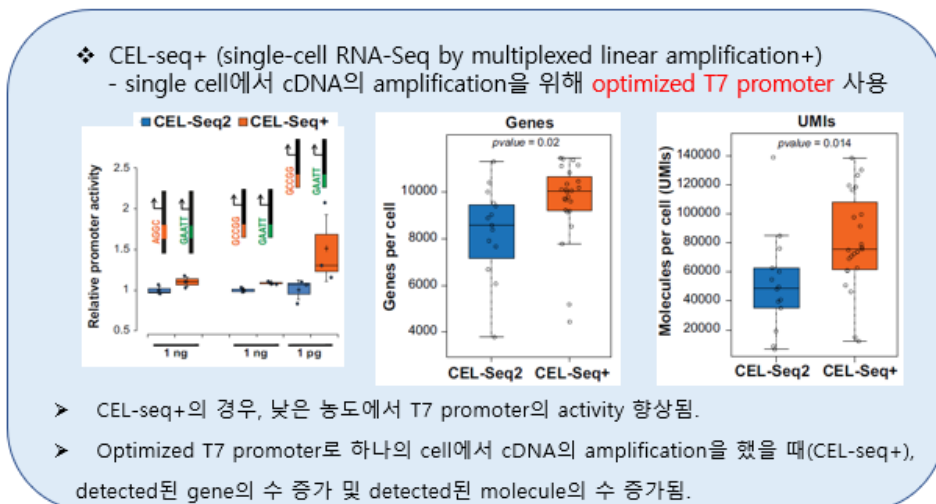
Chaudhry et al. *scRNA-seq of the Cardiovascular System* (2019)

### < LUTHOR 3'mRNA-Seq Service >

Single cell RNA-Seq 실험에서 가장 중요한 것은 viability 높은 single cell로 분리해 내는 준비 단계로, 이 과정에서 세포가 많이 죽거나 일부 세포만 선별적으로 분리되거나 세포 자체의 성질이 변하는 문제가 생길 수 있다. 만약 위와 같은 샘플 준비 과정의 문제로 충분히 많은 수의 세포를 얻을 수 없거나 시료의 특성상 (cell size >30µm 이상) droplet based 방식의 single cell RNA-Seq 방식을 적용할 수 없을 때에는 어떻게 해야 할까?

Single cell RNA-Seq을 이용한 첫 번째 논문은 쥐의 난자(oocyte)를 분석한 것으로[5], 난자는 일반 세포보다 크기가 크고 한번에 많은 수의 세포를 얻을 수 없다는 한계가 있다. 이러한 경우 위에서 언급한 droplet based 방식보다는 plate based 방식의 single cell RNA-Seq이 용이하다. Plate based sequencing은 FACS를 이용해서 세포를 multi-well plate에 하나씩 넣어주고, 각각의 well에서 cDNA library를 제작하는 방식이다. 이 때 well별로 다른 바코드 sequence가 달린 primer를 사용해서 단일 세포에서 나온 RNA에 독자적인 바코드를 달게 된다. 단일 세포는 pg의 RNA를 가지고 있는데, 이 정도의 양으로는 NGS 기기에서 측정할 수 없기 때문에 amplification method를 이용하게 되는데, 효율적인 cDNA 제작을 위해 SMART-Seq이나 CEL-Seq등의 low-input high-sensitivity RNA sequencing 기법들이 활용된다.

최근 발표된 논문에서 CEL-Seq 방식을 이용하여 단일 세포를 분석 시 optimized T7 promoter로 단일 세포에서 cDNA amplification을 했을 때, detection된 gene의 수 및 detected된 molecule의 수가 증가한 것을 확인하였다 [6].

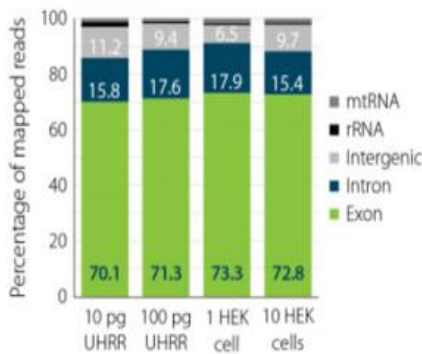
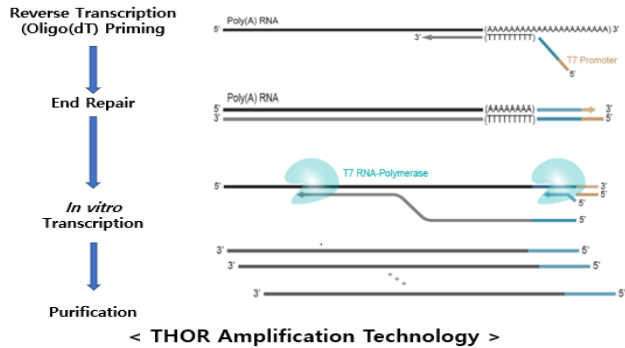


Thomas Conrad et al. (2020). *Maximizing transcription of nucleic acids with efficient T7 promoters*. *Communications Biology*, 3. 439.

독자적인 RNA expression profiling 기술을 보유한 독일의 Lexogen사는 이러한 T7 promoter를 이용한 단일 세포의 고분해능 sequencing 기술인 THOR (T7 High-resolution Original RNA) Amplification 기술을 접목한 "LOTHOR 3'mRNA-Seq Library prep kit"를 2020년 새롭게 선보였으며, 기존의 sequencing 시장을 이끌던 다른 상용화된 제품들보다 높은 감도를 보여주고 있다. LUTHOR는 동일한 cell 타입에서의 평균 유전자 발현을 확인할 수 있었던 기존 single cell RNA-Seq의 한계를 극복하고 단일 세포의 전사체 발현 분석을 가능하게 한다.

### Feature of LUTHOR

- High Quality Performance for **One Cell and Ultra-low input RNA**
- Direct Counting for **Gene Expression Quantification**
- One cell – One Comprehensive
- **THOR<sup>+</sup>** Amplification
- Direct RNA Amplification method



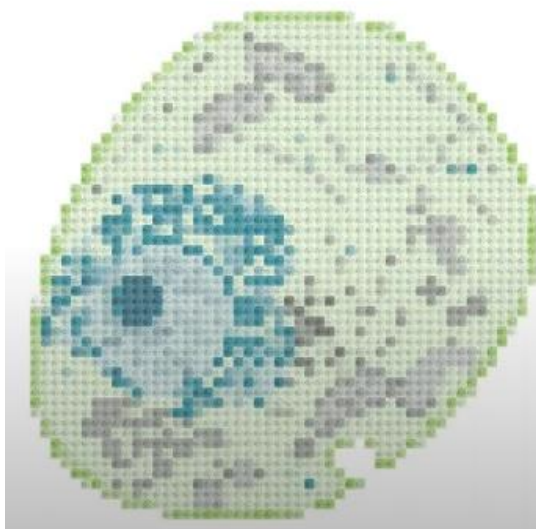
# Feature distribution of uniquely mapped reads for LUTHOR 3'mRNA-Seq. The majority of LUTHOR reads generated from 10 and 100pg UHRR, or 1 and 10 single HEK293T cells map to exonic sequences.

Method	Input	Detected Genes*
LUTHOR 3' mRNA-Seq	1 cell (HEK293T)	~11,000 – 15,000
SMART-Seq v4 3' DE	1 cell (K562)	~ 6,000 – 8,000 <sup>1</sup>
SMART-Seq Single Cell (WTS)	1 cell (GM22601)	~9,000 – 10,500 <sup>1</sup>
CEL-Seq 2 (C1 HT) (WTS)**	1 cell (mES)	~7,000 <sup>2</sup>
SMART-Seq 2 (WTS)**	1 cell (mES)	~8,000 – 9,000 <sup>2</sup>
SMART-Seq 3 (WTS)**	1 cell (HEK293FT)	~11,000 – 12,000 <sup>3</sup>

\*Obtained from manufacturers specifications [1] and from published benchmarking studies [2,3] at 1 M reads/sample, threshold of >1 Counts Per Million (CPM). Methods are shown for 3'-Seq and whole transcriptome sequencing (WTS). \*\* Academic protocol.

### "Single-Cell" RNA-Seq

Merging of Gene Expression Profiles of Hundreds of Cells



### LUTHOR RNA-Seq

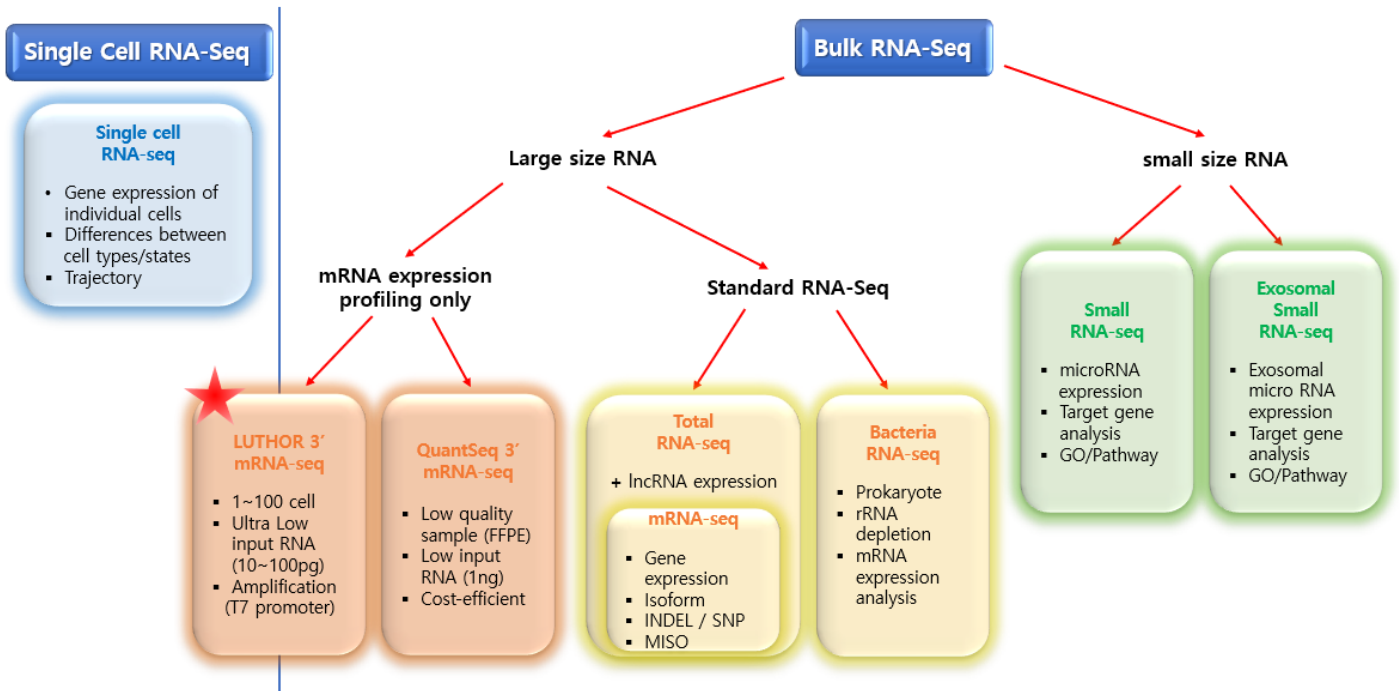
One cell - One Comprehensive Expression Profile



Single cell RNA-Seq 기법의 발달은 유전자 발현과 RNA 생합성 및 대사 연구의 넓이와 깊이를 비약적으로 늘려주고 있으며 sequencing 기술의 발달에 따라 새로운 RNA-Seq 방법들이 나오고 있어, 어떠한 실험 방식이 연구 목적에 부합하며 원하는 결과를 얻을 수 있을지에 대한 선택은 연구자의 몫이 되었다.

자사에서는 Bulk RNA-Seq 뿐만 아니라 droplet based 방식의 10X Genomics를 이용하여 Single cell RNA-Seq를 수행하고 있으며, direct RNA amplification 기술과 one-step 3' RNA-Seq library 제작 기술이 접목된 Lexogen사의 LUTHOR를 이용하여 LUTHOR 3'mRNA-Seq도 새롭게 서비스를 시작했다. 아래의 RNA-Seq Guide가 연구자가 원하는 sequencing 실험 분석을 선택하는데 도움이 되길 바란다.

< Ebiogen's RNA-Seq Guide Map >



< 참고 문헌 >

1. 뇌종양에서의 단일 세포 RNA 시퀀싱을 이용한 전사체 연구동향. <http://www.ibric.org/myboard>. 2018, T37
2. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*\_2015, 161(5), 1202-1214
3. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*\_2015, 161(5), 1187-2101
4. Single-cell RNA sequencing 기술동향. <http://www.ibric.org/myboard>. 2018, T28
5. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*\_2009,6,337-382
6. Maximizing transcription of nucleic acids with efficient T7 promoters. *Communications Biology*\_2020, 3, 439
7. TECH Note: Unprecedented sensitivity with the SMART-Seq Single Cell Kit. <https://www.takarabio.com>, 2020
8. Comparative analysis of Single-cell RNA Sequencing Methods. *Mol Cell*\_2017, 65, 631-643
9. Single-cell RNA counting at allele- and isoform-resolution using Smart-seq3. *Nat Biotechnol*\_2020, 38, 708-714
10. Single-Cell RNA Sequencing of the Cardiovascular System : New Looks for Old Diseases. *Front Cardiovasc Med*\_2019, 6, 173
11. Dissecting Cellular Heterogeneity Using Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cells*\_2019. 42(3), 189-199