Methodenetablierung zur Einzel-Zell RNA-Sequenzierung von Granulozyten mit dem BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System

Adena, Lack, BMA 21-24

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Department for BioMedical Research, Flow Cytometry and Cell Sorting Core Facility

1. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, RNA-Sequenzierungen von Granulozyten auf Einzelz-Zellbasis zu etablieren. Granulozyten stellen aufgrund ihres geringen RNA-Gehalts und der hohen RNase-Aktivität eine Herausforderung dar. Hier stößt das am FCCS CF bereits etablierte System von 10x Genomics an seine Grenzen und es wurde verschiedentlich berichtet, dass das Konkurrenzsystem von BD, das BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System, hier besser geeignet ist.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden für Zellisolation, Zellsortierung (und Imaging), Single Cell Capture, cDNA-Synthese und Library Preparation getestet und optimiert. Die Hauptfragestellung dieses Posters konzentriert sich auf die Leistungsfähigkeit des BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis Systems bei der Erfassung und Analyse der drei verschiedenen Granulozytenpopulationen.
Es wurde festgestellt, dass das BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System gut für diese Zwecke geeignet ist. Die cDNA-Qualitätskontrollen zeigten seht gute Resultate und lagen immer im erwünschten Bereich. Diese Ergebnisse legen eine solide Grundlage für künftige Studien zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung von Granulozyten.

2. Einleitung

Granulozyten

Granulozyten gehören zu den Leukozyten. Sie sind polymorphkernig und machen etwa 50 – 80% der Blutleukozyten aus.
Die neutrophilen Granulozyten gehören zu den Phagozyten und sind somit wichtig bei der Abwehr von Bakterien. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei akuten Entzündungen. Die eosinophilen Granulozyten tragen ihren Beitrag zum Immunsystem, indem sie bei der Abwehr von Infektionen mit Parasiten beteiligt sind. Zudem tragen sie bei Überempfindlichkeitsreaktionen zu Allergien bei. Auch die basophilen Granulozyten spielen mittels Histamin-Ausschüttung bei Allergien mit [1].

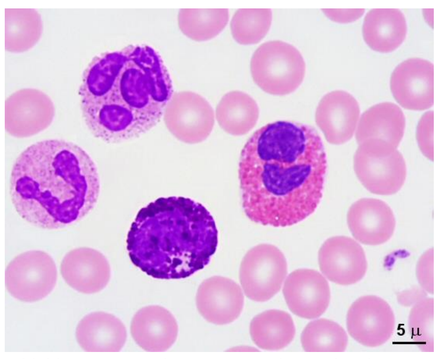


Abbildung 1: Granulozyten unter dem Mikroskop

3. Ziele und Fragestellungen

Grundlegendes Ziel dieser Diplomarbeit ist es eine RNA-Sequenzierung von Granulozyten auf Einzel-zell-Basis durchzuführen zu können. Auf dem Weg dahin müssen jedoch noch die Methoden geprüft und etabliert werden.

Wie gut funktioniert das BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System für Granulozyten?

- Vergleichspunkte und Kriterien
  - Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit
    1. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse: Konsistenz von mehreren Durchläufen
  - Qualität der cDNA
    2. Qualitätskontrolle nach der Random priming and extension (RPE) PCR
       - Konzentration: ~0.5 – 10 ng/µl
       - Peak: ~150 – 2'000 bp
    3. Qualitätskontrolle nach der Index PCR
       - Konzentration: > 1 ng/µl
       - Peak: ~250 – 1'000 bp

4. Material, Methodik, Vorgehen

Library Preparation

Während der Verarbeitung der Probe werden mehrere PCR nötig. Mit der Polymerasekettenreaktion (Englisch: PCR = polymerase chain reaction) kann ein DNA-Stück milliardenfach vervielfältigt werden [2].

Qubit 4 Fluorometer

Der Qubit 4 Fluorometer ist ein Mikrovolumen-Gerät zur präzisen Quantifizierung von DNA, RNA und Proteinen. Die Messung erfolgt durch Fluoreszenz, bei der spezifische Farbstoffe an Zielmoleküle binden und fluoreszieren. Mithilfe von Standards mit bekannten Konzentrationen wird eine Kalibrationskurve erstellt, um die Proben basierend auf den "relative fluorescence units" zu berechnen [3].

Elektrophorese

Bei der Elektrophorese werden geladene Moleküle, wie Nukleinsäuren oder Proteine, in einem Trägermaterial mittels eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Die Trennung erfolgt nach Ladung und Grösse der Moleküle. Eine DNA-Leiter mit bekannten Fragmentgrössen dient als Standard für den Grössenvergleich der Proben [4]. Für diese Analyse wurden die beiden automatisierten Systeme 5200 Fragment Analyzer und 4200 TapeStation verwendet.

5. Ergebnisse/ Resultate

Die kommende Tabelle zeigt eine Übersicht der Qualitätskontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Library Vorbereitung. Die Resultate zeigen sich ziemlich konstant gleich über die verschiedenen Samples hinweg.

Tabelle 1: Resultate der Qualitätskontrolle zu zwei Zeitpunkten während der Library Preparation (Lack, 2024)

Sample	RPE PCR		Index PCR	
	Konzentration (ng/µl)	Peak (bp)	Konzentration (ng/µl)	Peak (bp)
1	0.556	593	27.4	516
2	0.302	470	27.6	502
4	0.436	433	27.4	544
5	0.362	461	33.4	521

6. Diskussion

Die Qualitätskontrolle der cDNA nach der RPE PCR ergab zufriedenstellende Ergebnisse. Die Konzentrationen des ersten Samples lag im erwarteten Bereich von ~0.5 – 10 ng/µl. Die nachfolgenden Samples waren knapp darunter, jedoch bin ich auch damit zufrieden, da Granulozyten wenig RNA beinhalten, wurde dies bereits etwas erwartet. Die Peaks befanden sich immer zwischen 150 – 2'000 bp, was ein anderes Kriterium war. Bei der Index PCR lagen, wie erwünscht, alle Konzentrationen über 1 ng/µl und der jeweilige Peak zwischen 250 – 1'000 bp.
Alle Resultate bewegen sich konsistent im gleichen Bereich, somit kann eine Reproduzierbarkeit der Resultate bestätigt werden. Das System zeigt sich somit zuverlässig.
Somit konnte gezeigt werden, dass das System gut für die RNA-Sequenzierung auf Einzelzellbasis für Granulozyten geeignet ist.

Referenzen

[1] Zakrzewicz, A., & Pschyrembel Redaktion. (2021, Januar). *Pschyrembel Online | Granulozyten*. https://www-pschyrembel-de.medi.swissconsortium.ch/granulozyten/K094B/doc/

[2] Schmidt, O. G. (2023). *Genetik und Molekularbiologie* (2. Aufl.). Springer.

[3] Thermo Fisher Scientific. (2021). *Qubit fluorometers and assays*.

[4] Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2016). *Campbell Biologie* (10. Aufl.). Pearson Deutschland GmbH.

Abbildungen

Abb. 1: *Blut, Granulozyten im Vergleich*. (2024, Mai 14). Anatomie - Histologie. https://e-learn.anatomy.uzh.ch/anatomie/Histologie/histo_HTML/histo_S_Blut/blut_20.html

Tabellen

Tab. 1: Lack, A. (2024). *Resultate der Qualitätskontrolle zu zwei Zeitpunkten während der Library Preparation*. medi.