

技巧与诀窍

单细胞基因表达样本制备指南

引言

单细胞转录组学是阐明复杂生物系统的一种强大工具，让您能够逐个细胞地研究基因表达动态。通过生成细胞群体的单细胞图谱，单细胞RNA测序(scRNA-seq)能够解析复杂样本中不同类型细胞之间的特定差异。单细胞基因表达谱分析带来了疾病发展过程中有关细胞进程的重要见解。scRNA-seq 技术的进步让研究人员能够获取之前经常会被大量 (Bulk) 细胞的RNA-seq方法所掩盖的关键数据，如罕见或新的细胞类型，从而在单细胞水平上探索真正的基因表达多样性(图1)。然而，为了充分利用这种革命性的技术，必须妥善地制备单细胞样本。本文对制备单细胞样本的建议进行了概括，这些样本可用于10x Genomics的单细胞基因表达 (Single Cell Gene Expression) 或免疫分析 (Immune Profiling) 解决方案。

scRNA-seq 样本制备方案

- 细胞解离操作的技巧
- 移液技术和枪头选择
- 细胞清洗与过滤
- 细胞计数和活力评估
- 样本制备后的保存

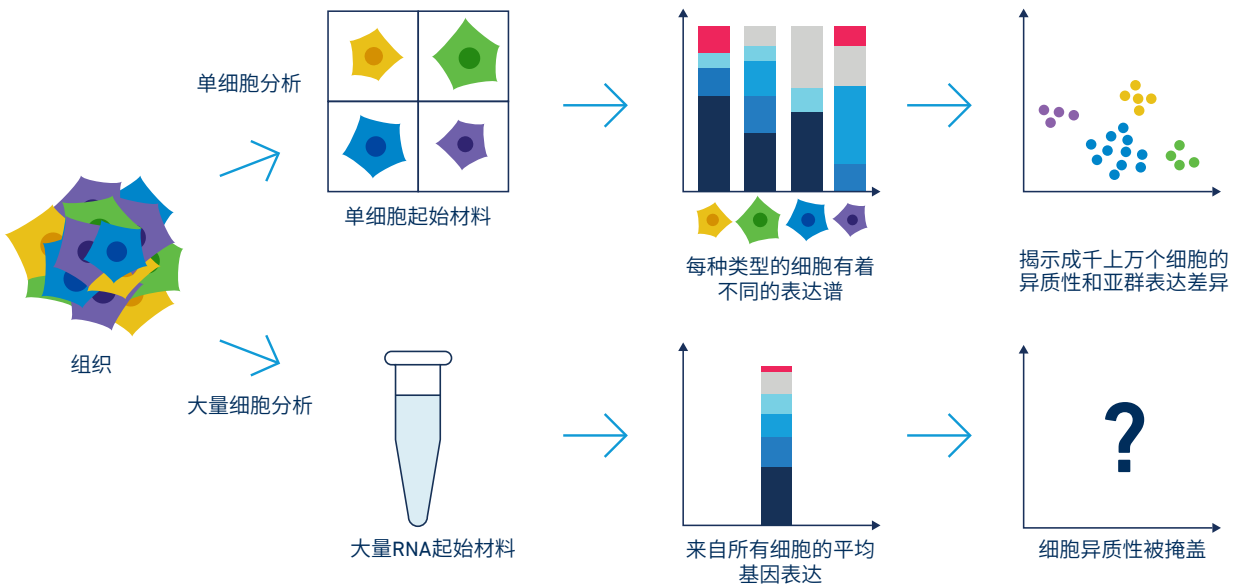


图1. scRNA-seq揭示了被传统的大量细胞RNA-seq方法所掩盖的细胞异质性。

检测的细胞	物种	细胞来源	总RNA (pg/细胞)	细胞大小 (μm)
PBMC	人类	从血液中提取	~0.75	~5-10
E18 neuron	小鼠	脑组织	~2-3	~9
Jurkat	人类	悬浮细胞	5.5	~12
Raji	人类	悬浮细胞	7.3	~12
HEK293T	人类	贴壁细胞	14.2	~18
NIH3T3	小鼠	贴壁细胞	16.1	~18
HCC1954	人类	贴壁细胞	15.7	~18
HCC38	人类	贴壁细胞	21.6	~30

表1. 10x Genomics检测过的细胞类型。RNA利用Maxwell® RSC SimplyRNA细胞试剂盒提取，并通过Qubit™分析测定。

scRNA-Seq的样本制备方案

细胞解离操作的技巧

为了获得活力高的细胞并尽量避免细胞死亡和裂解，您需要根据特定的样本类型来优化细胞解离的操作。死细胞会裂解，并向周围环境释放RNA；这种游离RNA会造成检测的背景噪音，并影响单细胞数据的质量。正确处理细胞将直接影响确定上样到系统上的细胞数和回收细胞数的测量结果。遵循下面的指南可提高细胞计数的准确性，并最大限度减少样本之间的差异。

充分了解对于样本类型的限制和要求将有助于产生更加可靠的数据。许多现有的样本制备方案可以解决这些问题，不过或许需要根据您特定的样本类型进行调整。例如，悬浮细胞系、磁珠富集的细胞和流式分选的细胞已经处于悬浮状态，只需要进行清洗和计数，即可用于Chromium单细胞基因表达或免疫分析解决方案。然而，在处理组织时，必须在第一次文库制备之前很好地优化解离方案，以确保达到最佳质量。我们提供了多个示范方案，指导您优化样本制备（详见第4页）。

另一个考虑因素是不同类型细胞中的起始RNA含量各异，而RNA起始量的准确测定将影响流程中的一些关键决策，如文库制备时的PCR循环数。例如，人外周血单核细胞（PBMC）中的RNA很少，每个细胞只含有0.75 pg，而HCC38细胞系则富含RNA，每个细胞可达21.6 pg（表1）。

移液技术和枪头选择

在解离组织或处理悬浮状态的细胞时，移液技术是至关重要的。例如，当细胞静置在管中时，它们会开始沉降。从溶液的顶部或底部吸取时，吸到的细胞数量可能有很大差异，尤其是在细胞快速沉降时。因此，在吸取前一刻应当通过移液器充分而轻柔地混合细胞悬液，然后每次从管的中部吸取，通常低于溶液的中间标记。

此外，移液时必须轻柔地处理细胞。如处理手法比较剧烈，即便采用大口径的移液吸头，也会对样本质量造成负面影响。表2比较了在HEK293T细胞上开展的四个不同的细胞混合实验得到的单细胞数据的关键指标。剧烈的移液混合和涡旋振荡都会导致细胞过早裂解，从而在周围环境中产生高水平的RNA，引起系统中的背景噪音，并最终降低细胞reads数的比例（以蓝色高亮）显示。同样地，每个细胞的基因数中位值也会因剧烈地细胞处理而减少（表2）。因此，细胞悬液应该通过大口径的移液吸头来轻柔混合。这将有助于获得背景更干净的数据，增加文库的复杂性（即增加每个细胞的基因数中位值），并提高细胞reads数的比例。

指标	对照	大口径 (剧烈)	小口径 (剧烈)	涡旋振荡5秒
细胞数量	1,118	846	1,012	983
每个细胞的reads数	50,000	50,000	50,000	50,000
有效的条形码	95.40%	95.50%	95.30%	95.50%
细胞reads数的比例	79.40%	72.80%	54.00%	63.10%
可以比对到转录组的reads数	70.50%	71.40%	71.80%	71.00%
有效的UMI	99.40%	99.40%	99.40%	99.40%
每个细胞的基因数中值	3,137	3,180	2,833	2,934

表2. 无论移液枪头的大小如何, 剧烈的移液混合都会对样本质量造成负面影响。

细胞清洗与过滤

在处理悬浮细胞系、解离组织或大量细胞时, 我们强烈建议您采用彻底的清洗方案, 这将影响上样至Chromium Controller后的细胞回收。具体方案可根据样本类型以及scRNA-seq方法而调整。我们提供的scRNA-seq清洗方案需要用到含0.04% BSA的PBS溶液, 用于细胞的清洗和重悬。

大的细胞团块或碎片会增加微流体芯片的堵塞风险, 并且干扰准确的细胞计数, 从而影响细胞回收, 特别是在使用自动细胞计数器时。为了避免这一问题, 我们建议您将细胞悬液上样到微流体芯片之前, 使用孔径为30-40 μ m的细胞过滤网。很多过滤网已成功通过测试, 可用于我们单细胞基因表达和免疫分析解决方案中的样本。

值得注意的是, 每次过滤都会导致细胞悬液体积的减少以及细胞浓度的变化。如果需要过滤, 您应当在过滤完成后对单细胞悬液进行重新计数。

细胞计数和活力评估

在评估样本质量时, 您需要在细胞清洗和过滤之后测定细胞活力, 这一点至关重要。测定细胞活力有许多种方法, 但我们发现台盼蓝排除法在鉴定活细胞与死细胞的比例时效果很好。

最终细胞计数的准确性以及目标回收量和实际回收量之间的一致性, 取决于我们了解样本中有多少个细胞。一旦过滤和清洗完成, 可采用细胞计数设备(如血球计数器或自动细胞计数仪)进行定量。这些设备不仅能提供准确的细胞计数, 还能计算出向微流体芯片上样适量细胞所需的细胞悬液体积。

影响最终细胞计数准确性的另一个重要因素是细胞储存液的浓度。我们发现, 浓度介于700-1,200个细胞/ μ L的细胞储存液是最佳的, 可以让回收细胞的数量达到目标值(图2)。细胞悬液的浓度一旦超出这个最佳范围, 将会导致细胞计数不可靠。如果样品在这个范围以外, 我们建议相应地调整细胞储存液的浓度。

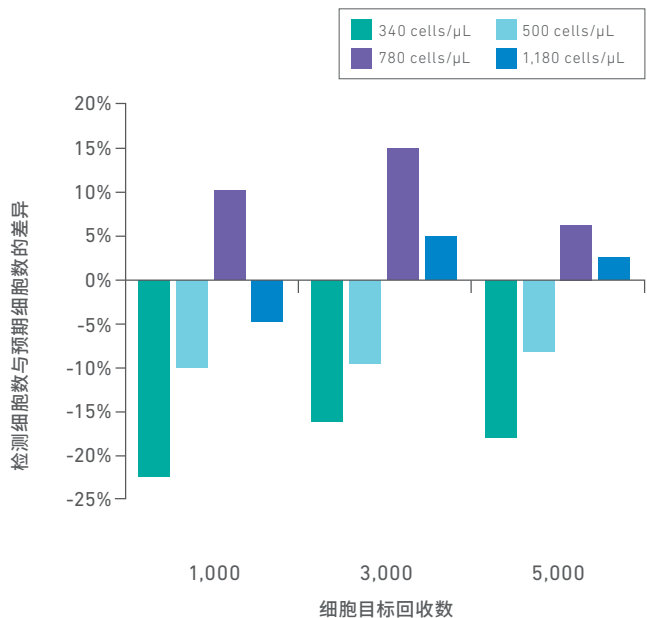


图2. 通过Cell Ranger Analysis Pipelines计算的细胞数与目标细胞数的相对差异。细胞悬液1号(绿色, 340个细胞/ μ L)和2号(浅蓝色, 500个细胞/ μ L)显示出与目标细胞数的最大偏离, 分别为16-23%和8-10%。当细胞悬液由浓度更高的细胞储存液制备时, 比如细胞悬液3号(紫色, 780个细胞/ μ L)和4号(中蓝色, 1,180个细胞/ μ L), 目标准确性得以改善。

高比例的死细胞可能会影响目标细胞的回收量，因此对于死细胞比例较高 (>30%) 的样本，我们建议您参考[从单细胞悬液中去死细胞的示范方案](#)。此方案概括了一些最佳做法，能够降低单细胞悬液中的死细胞比例。

样本制备后的保存

为了最大限度地减少转录组的变化，在对细胞进行清洗和计数后，单细胞悬液应当保存于冰上，直至用于后续的上机和文库制备步骤。在理想状况下，一旦制备好样本，应当在30分钟内将其用于下游步骤。

然而，您还有必要了解各类细胞的不同性质，因为这可能会影响细胞应在冰上保存的时间，以及它们在制备后多久便应当被尽快使用。例如，有些细胞（如PBMC）如果在冰上放置一段时间，它们就开始形成团块。这些团块很难解离，增加了堵塞的风险，而且每个团块被当成单细胞计数，又降低了细胞计数的准确性。此外，有些细胞更加粘稠，形成团块的速度更快。对于这些细胞，必须尽量减少制备和使用之间的时间差。

结语

在制备单细胞悬液时，制定适当的计划来妥善处理样本和制备样本是至关重要的，因为只有考虑到多个因素，才能获得高质量的数据。若有意了解单细胞样本制备的更多指南，您可以参考这些现有的[示范方案](#)，这些方案为特定类型的细胞提供了相应的操作指南。对于那些难以分离出完整细胞的细胞类型，细胞核分离也是一个有效的替代方案。我们还提供样本制备后各个步骤的操作指南，包括[文库制备](#)，[测序](#)，以及[数据分析和可视化](#)等步骤。此外，我们的[教学视频](#)，特别是第4章到第7章，将带您了解样本制备和文库制备的整个过程。

单细胞分离的示范方案

单细胞方案 - 细胞制备指南

该细胞制备指南介绍了在制备大量细胞和有限细胞（细胞总数分别高于或低于100,000个）的悬液时，清洗、计数和浓缩细胞的最佳做法和通用方法，以便用于10x Genomics的单细胞方案。

肿瘤样本解离指南 - 用于单细胞RNA测序

该指南介绍了在处理单细胞悬液和神经组织时，裂解细胞，清洗细胞，去除碎片和浓缩细胞核的最佳做法和通用方法，以便用于10x Genomics的单细胞方案。

从培养细胞系中制备单细胞悬液 - 用于单细胞RNA测序

该指南概述了如何从培养细胞系制备单细胞悬液，以便用于10x Genomics的单细胞方案。

从单细胞悬液中去死细胞 - 用于单细胞RNA测序

该指南概述了减少单细胞悬液中死细胞比例的最佳做法。

分离细胞核 - 用于单细胞RNA测序

该指南介绍了在制备单细胞悬液和神经组织时，裂解细胞，清洗细胞，去除碎片和浓缩细胞核的最佳做法和通用方法，以便用于10x Genomics的单细胞方案。

从解离组织中富集CD3+ T细胞 - 用于单细胞RNA测序和免疫组库分析

该指南概述了从解离肿瘤组织中富集分化抗原3呈阳性（CD3+）的T细胞的最佳做法，以便用于10x Genomics的单细胞方案。

[点击此处查看更多方案](#)



获取最新资讯

请关注10x Genomics公众号

[10XGENOMICS.COM/CN](https://10xgenomics.com/cn)

© 2018 10x Genomics, Inc. FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
LIT000037-CN-2 Rev A Sample Preparation Tips for Single Cell Gene Expression

10x GENOMICS