

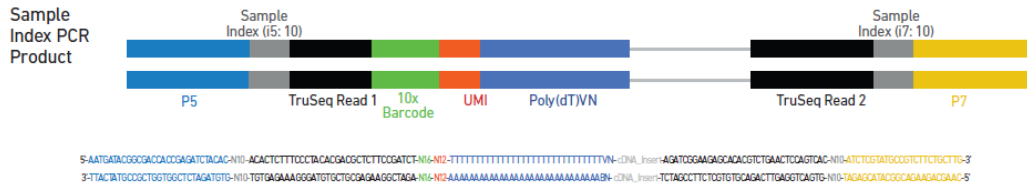
# 安升达 10X 单细胞转录组常见问题及解读

## 湿实验环节：

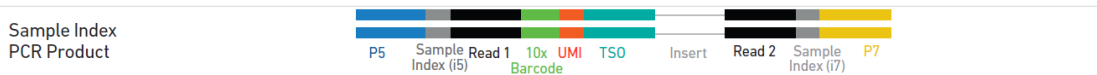
1: 单细胞转录组 3'试验与 5'试验的区别有哪些？

答：方法相似，主要为 10X 文库捕获 polyadenylated 尾的转录本时不同。都是使用 ploydT 引物反转录，3'试验 polydT 引物位于 gel bead oligo（凝胶珠寡头上）而 5'试验 polydT 供给是在 RT 引物里。

Single Cell 3' v3.1 Gene Expression Library:



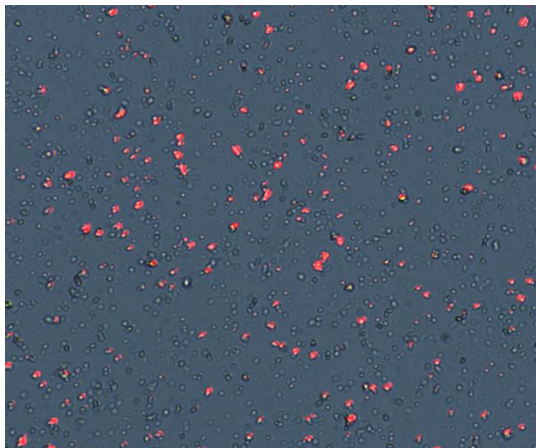
Single Cell 5' v2 Gene Expression Library:



2: 如果我的单细胞/细胞核悬液含有大量碎片，我该怎么办？

细胞结团、碎片和纤维会干扰准确的细胞或细胞核计数，并在生成乳化凝胶珠（GEM）时导致芯片故障。去除碎片和细胞结团对于使用自动计数器进行准确的细胞计数也很重要。此外，碎片中的环境 RNA 可能会判断成细胞，导致数据中出现更多噪声，并且算法难以调用细胞。但是，有些碎片可能是不可避免的。虽然对于样品中可能存在的碎片没有严格的界限，但以下示例可以让您更好地了解什么是“低碎屑”样品

high debris (nuclei)



Low debris (nuclei)



3: 我可以将样本储存在组织保存溶液中吗？

理想的情况下，新鲜样本能最大程度地提高样本质量；然而，有些样本可能需要进行保存以方便运输、储存或在单细胞流程中提供更大的灵活性。细胞悬液的冷冻保存是长期储存和运输的常用方法，但在采集样本的过程中可能无法进行冷冻保存或组织解离。组织样本储存解决方案是一种有吸引力的替代方案，可以减缓组织样本中细胞的死亡，同时也只需在 4°C 条件下储存，也不需要冷冻保存能力。

#### 4: 组织保存液能保存的组织能保存多久呢?

不同品牌的组织保存液保存的时间不同, 金唯智使用的组织保存液是美天旆的组织保存液, 有效的保存时间为 48h(2-8°C), 有些其他品牌的组织保存液保存时间为 72h(2-8°C)。

#### 5: 新鲜细胞与解冻后细胞的基因表达是否有差异?

10x 官方做过测试, 详情请见 <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/115004021986-Are-there-gene-expression-differences-between-fresh-and-frozen-thawed-cells>

使用单细胞 3'转录组比较了来自同一供体的新鲜和冻融人 PBMC。新鲜和冻存的 PBMC 之间的整体基因表达高度相关。除已知对冻融条件敏感的红细胞 (RBC) 外, 多个供体的细胞类型分布在低温保存前后保持一致。

#### 6: 我有血液做单细胞测序, 是送全血好还是送冻存的 PBMC 好?

两种方案其实都是可以的。

全血运输对样本本身不会造成很大的影响, 细胞数目, 细胞活性等 90%以上都是可以达到的。一般运输对血液造成的最大影响是基因表达的变化, 会影响降维和聚类, 但是基因表达的变化在血液离体 4-6h 内就会发生, 所以只要运输其实都会有基因表达的变化。如果担心基因表达的变化最好的办法是在血液离体后 30min 内提取 PBMC 后冻存运输, 但是冻存运输也有缺点, 可能会导致细胞死亡比较多, 就需要去除死细胞, 有可能会导导致细胞群体的比例发生变化, 但冻存运输对基因表达是基本没有什么变化的。两种方案有利有弊, 可以均衡考虑。例如有些客户的医院不具备提取 PBMC 的能力, 所以选择直接寄送血液。

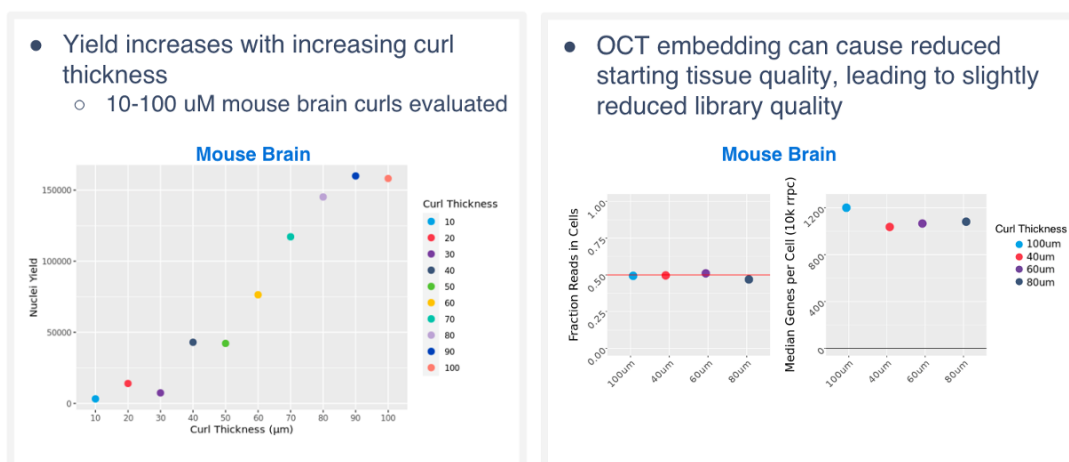
#### 7: 在进行 10x 单细胞上机之前, 是否可以使用 RNAlater 或其他 RNA 稳定剂处理细胞或组织?

在使用单细胞基因表达(3')或单细胞免疫分析 (5') 之前, 我们尚未测试过使用 RNAlater 或 RNAprotect 对细胞或组织的处理, 因此无法提供任何具体建议。但是, 这些试剂可能会裂解或透化细胞 (以细胞类型特异性的方式), 这会损害引物条形码和 mRNA 的结合, 同时, 如果发生转录组和蛋白发生交联, 逆转录也会大受影响。

#### 8: 我能使用 Chromium 细胞核分离试剂盒从 OCT 包埋的样品中分离细胞核吗?

理论上是可以的, 10x 官方也有数据支持, 如下图:

## Isolating nuclei from OCT embedded tissue



Storage can impact different sample types and cell types differently, run a pilot when possible

有几点请注意：

一：由于 OCT 嵌入和多次冻融循环增加了样本处理步骤，组织质量可能会降低。对于组织质量未知或可能存在问题的 OCT 包埋组织块，评估 RIN 值可能有助于判断组织中 RNA 是否发生降解。

二：OCT 清洗不干净可能会造成油包水堵塞

三：切片厚度请尽量厚一些，例如 40 $\mu\text{M}$ -100 $\mu\text{M}$ ，这有助于提高抽核的产量，不同的组织类型，细胞核的产量也不同。

### 9: 10x 分 scRNA-seq 和 snRNA-seq，我该如何选择呢？

使用细胞还是细胞核作为起始材料取决于几个因素，包括样本类型、样本的运输和储存以及所选的分析方法。如果可获得新鲜组织，我们建议分离成细胞。对于冷冻的组织样本、细胞类型大的细胞以及很脆弱的细胞（如神经元和肝细胞）或难以解离的组织，细胞核则是一个不错的选择。

### 10: 我是否可以用甲醇/多聚甲醛 固定细胞用来做单细胞测序？

固定类的方式是可以用来做单细胞测序的，但通过传统 smart 方式是不可以的，我们是通过 FLEX 探针捕获的方式来做单细胞测序。

### 11: 单细胞免疫分析（5'转录组+VDJ）与细胞核兼容吗？

我们在有限数量的样本类型上使用细胞核作为输入测试了单细胞免疫分析解决方案，并评估了这两种数据类型的性能。结论就是与细胞核不兼容，或者说质量较差。

基于这些测试和 10x 官方的数据，我们发现从细胞核中获取 VDJ 数据质量较差，并且在使用细胞核而不是细胞时我们无法保证 VDJ 能够完全的扩增并检测出来。造成这种情况的主要原因是提取细胞核导致的成熟转录本的丢失。VDJ 转录本不仅在细胞核内表达低，在细胞中的表达也不高。仅分离细胞核意味着细胞质中的成熟剪切好的 mRNA 的丢失，从而导致可用于捕获和分析的转录本减少。此外，提取细胞核也会导致细胞悬液中环境 RNA 的增加，会使 Cell Ranger VDJ 算法更难准确组装并确定哪些液滴里包含，哪些液滴里不包含 T/B 细胞。

## 12: 细胞悬液的制备过程中是否会影响基因的表达?

目前常用的方法中,不管是酶消化还是机械操作都会不可避免的对细胞产生影响,前者会使细胞产生应激反应,后者则容易损伤细胞,进而影响细胞活性。所以,在单细胞测序实验设计时,设置对照是非常重要的。前述的这些影响,在 case 和 control 中同样存在,我们关注 case 和 control 的差异表达基因,就可以去除实验的系统误差,找到决定感兴趣生物学过程的关键基因

## 13: 在制备细胞悬液时候,活率低,结团率高,是否可以继续实验?

一般来说,安升达单细胞悬液质检要求:细胞活率 > 80%,细胞结团率 < 10%,活细胞浓度范围: 700 ~ 1200 cells/ $\mu$ l,有核率 > 70%。但具体情况具体分析,应根据具体实验材料而定,细胞活率 70%也有成功案例,结团率 30%也有成功案例。

## 14: 在样本质检合格的情况下,一般情况下细胞数在预期细胞数的 0.5-2 倍之

间,细胞数与预期相差较大的原因有哪些?

### 一: 样本质量与特点

样本的活性低,有核率低,含有红细胞啊等等

### 二: 细胞计数的准确性

目前的细胞计数的方式是通过台盼蓝和 AOPI 计数的方式,同时呢计数仪的算法导致的计数不准的情况,这个方法并不完全准确,有时候会测到的活性很好,实际上没那么好,一般来说会计数 3 次取平均来代表最终的计数结果。

### 三: 油包水的状态

油包水过程本身没法质控的,一般来说是稳定的,但有一些时候会不正常,极端的时候就是油包水基本没生成,这个可被肉眼观察发现,但介于中间的一些状态无法肉眼判断,比如油包水实际效率下降了,但仍然生成了乳浊状态,这个也有可能是细胞数偏差的一个原因;

## 15: 安升达 10XGenomics 单细胞平台有什么优势?

一.细胞通量高,一次可捕获上万细胞 ;

二.对细胞大小及类型限制低,且捕获效率最高高达 65% ;

三.性价比高,且从悬液到文库构建周期短。

## 16: 单细胞测序对送样有什么要求?

详情请见安升达单细胞送样指南

## 17: 我的样本不同时间获得,会有批次效应么?

10x 单细胞测序,一个芯片同时只能测 8 个样或 16 个样,同时呢,样品多的情况下,时间批次,处理人员,试剂批次,实验环境的不同都会有批次效应,但我们在后续分析时,会通过生信手段例如 Harmony, Seurat3, fastMNN 等去除批次效应。