

Microwell-Seq

High-throughput Single

Cell RNA-Seq Kit

常见问题与解答 (FAQ)

目录

- (一) 关于微孔板
- (二) 关于样本
- (三) 关于 Capture beads
- (四) 关于操作和技术细节
- (五) 关于建库
- (六) 关于测序
- (七) 关于数据分析
- (八) 关于服务
- (九) 其他问题



一、关于微孔板

1、Microwell-seq kit (SC-809-001) 配备几块微孔板 (microwell plate) ? 配 PDMS 吗? PDMS 价格是什么?

A: 一个样本需要消耗 1 块微孔板。Microwell-seq kit 不配备, 微孔板。试剂盒不配 PDMS 板。

2、微孔板的保存条件和保存期是什么?

A: 微孔板保存在 DPBS (含 2mM EDTA) 中或者无菌超纯水中, 4 °C 储存, 建议保存 7 天。

3、微孔板孔径大小是多少? 一只微孔板上有多少个孔?

A: 微孔板孔径 28 μ m, 深度 35 μ m。一只微孔板上大约有 10 万个孔。

二、关于样本

1、Microwell-seq kit 对样本处理有哪些要求?

A: Microwell-seq kit 要求细胞是有活力的新鲜完整细胞; 新鲜组织样本需要消化处理成细胞悬液。具体的要求参见“[Microwell-seq 样本要求](#)”。

2、组织样本怎么处理? 冰冻的组织可以做 Microwell-seq 平台吗?

A: 不同的组织样本, 有不同的处理方法, 一般是经过消化酶消化, 离心、沉淀、过滤等步骤, 最终制备成细胞悬液。建议用户采用合适的组织样本处理方法。冰冻组织不能做。

3、不同物种, 不同组织类型有没有消化标准和质控标准?

A: 不同的组织类型没有统一的消化标准和质控标准。建议用户优化组织样本的消化方法。

4、上 Microwell-seq 平台前, 细胞悬液浓度和体积要求是什么? 任何细胞都适用 Microwell-seq 平台吗?

A: 细胞悬液的浓度 1~1.5 $\times 10^5$ 个/mL, 体积, 至少 0.6mL。Microwell-seq 平台适用于直径大小在 10~20 μ m 之间的哺乳动物细胞 / 无细胞壁的真核细胞。

5、培养的细胞和经过消化的组织细胞, 怎么将死细胞和活细胞分开?

A: 目前没有好的方法分开死细胞和活细胞。建议用户在实验前观察、检测细胞状态, 确定活细胞的比例至少在 90% 以上, 比如用台盼蓝染色确定细胞的活性比例。

三、关于 Capture beads

1、barcode 可以根据用户的需求定制吗?

A: 目前我们在做平台稳定和优化, 不做 barcode 的定制, 在后期会考虑做。

2、一颗 beads 上结合的探针有多少个？

A: 大约 10^8 个

3、beads 单独卖吗？

A: 不单独卖 beads，具体请联系销售获得信息。

四、关于操作和技术细节

1、怎么保证微孔板上的一个微孔只落一个细胞？

A: 目前微孔板孔径 $28\mu\text{m}$ ， $10\text{-}20\mu\text{m}$ 大小的细胞捕获的效果更好。通过调节细胞悬液浓度、落细胞时间和尽量减少细胞悬液中的细胞成团来调节落孔情况。

2、操作教学视频中，落细胞和落磁珠，需要镜检，镜检的目的是什么？镜检时看什么？每个孔都要看吗？细胞或磁珠下落情况不好该怎么办？

A: 镜检的目的是看细胞和磁珠的下落情况，捕获效率怎么样。镜检时不一定要每个孔都看，选取部分区域观察。如果细胞或磁珠下落得不好，建议重新下落，或者换一块新的微孔板操作。

3、每个微孔板可以分离多少细胞？

A: 理论上控制落孔率在 10%（小鼠细胞）比较好（即每个微孔板可分离 10,000 个细胞）。状态好、大小合适的细胞，一般捕获的细胞数目在 5000-10000 左右。

4、Microwell-seq kit 操作过程复杂吗？做下来需要多少时间？有哪些关键的步骤？

A: *Microwell-seq kit* 在一般的生物化学实验室就可以做，整个操作做下来需要 8 个小时左右，操作流程见官网上的 *Microwell-seq kit* 操作手册。比较关键的步骤是落细胞和落磁珠的步骤。

5、Microwell-seq 技术怎么避免污染？

A: 推荐控制 10% 左右的细胞落孔率，污染率比较小。

6、反转录和 cDNA 扩增使用相同的、单一方向的一条引物，如何完成 cDNA 一链合成、二链合成及扩增？机理是怎样的？

A: 原理“模板置换技术”。以 mRNA 为模板从 ployA 到 mRNA 尾端的时候，在 MMLV 这种 RT 酶的作用下会产生 3 个 C，然后与 RT 体系中的 TSO 引物发生作用，TSO 引物会和这三个 C 结合，并加上另外一段和通用序列互补的序列。因此，只用 TSO-pcr 这一个引物就可以实现后续扩增。

五、关于建库

1、Microwell-seq kit 带建库试剂吗？

A: *Microwell-seq kit*(sc-809-001) 不包括建库试剂。

2、一般的建库试剂都可以用吗？有没有推荐的建库试剂？需要加其他的定制引物吗？从何处获得？

A: 可以兼容 illumina 建库试剂：Nextera XT DNA sample preparation kit, 96 samples(illumine, cat.no. FC-131-1096) Nextera XT 24-index kit, 96 samples(illumine,cat.no.FC-131-1001)。

Vazyme 也有配套的建库试剂提供 (货号: TD513)。建库试剂需要加定制的 P5 端接头序列, 用户需要的话, 建库试剂和定制引物都可以提供。

2、建库方法怎么选? (Microwell-seq 平台对建库有什么要求?)

A: 微量样本的 DNA 建库方法 (1ng DNA), 按照建库试剂盒操作方法做, 具体见 Microwell-seq 平台流程。

六、 关于测序

1、Microwell-seq 方法是 3'端测序还是全长测序?

A: Microwell-seq 平台 3'端测序。

2、测序之前需要加定制引物吗? 从何处获得?

A: 需要加定制引物, 客户需要的话, 我们可以提供。上机测序前加平衡文库, 40%的 Phix。

3、测序深度是多少? 一个样本有多少数据量?

A: 关于测序深度, 一般推荐一个样本或两个样本包一条 lane; 数据量与实际捕获的细胞数目和用户需要获得的信息量有关。

4、测序用什么平台?

A: 推荐 Illumina X10。

七、 关于数据分析

1、数据分析有软件吗?

A: Microwell-seq 的数据处理使用 drop-seq core computational 工具。

(<http://mccarrolllab.com/wp-content/uploads/2016/03/Drop-seqAlignmentCookbookv1.2Jan2016.pdf>)

2、提供数据分析服务吗?

A: 提供。

八、 关于服务

1、做服务吗? 服务流程? 报价? 取样流程?

A: 做服务; 但是因为 Microwell-seq 平台对细胞质量要求比较高, 所以请联系销售获得具体服务信息。

2、从样本到数据分析, 最短要多少天完成? 整个流程是怎样的?

A: 大约 60 个工作日, 具体时间根据样本状态、项目情况不同而不同。

3、接合作项目吗?

A: 若有合作项目, 请联系我们的销售, 请或者以邮件的方式与我们联系。

4、有技术人员指导吗? 培训班和技术交流会呢?

A: 操作问题可以随时向我们咨询; 如果需要技术人员现场指导, 请和我们联系确认 (现阶段我们可能无法保证每个客户都有技术人员现场指导)。培训班和技术交流会将会安排, 如有需求, 请联系我们, 我们举办培训班和技术交流会之前会通知用户。

九、 其他问题

1、除了购买 Microwell-seq Kit 以外，用户还需要准备哪些试剂和仪器才能搭建好一个完整的 Microwell-seq 技术平台？磁铁在哪里采购？耗材打包吗？耗材仪器打包的价格？

A: 用户需要的话，我们可以提供耗材、小仪器打包，对于大仪器，可推荐仪器型号。价格信息请联系销售。

2、一套 Microwell-seq kit，可以做几个样？做某一组织的表达图谱，最少需要做几个样？

A: 一套 Microwell-seq kit 可以做 2 个样本；做某一组织的表达图谱需要的样本量具体要看用户需要的细胞量和信息量。