

# 自動細胞計數器用於 Single cell RNA

單細胞定序 (Single-Cell Sequencing) 使研究人員能夠定義異常細胞群 (Abnormal Cell Populations) , 發現和分析稀有細胞、細胞圖譜網路 (Cellular Map Networks) , 並發現細微但重要的異質性 (Heterogeneities) 。有鑑於其令人難以置信的潛力, 單細胞定序技術出現爆炸式增長和需求也就不足為奇了。然而, 單細胞定序需要大量的成本和時間投資。為確保時間和資源的投資獲得高質量數據的回報, 樣本在處理前的品質便至關重要。

此外, 由於所有單細胞定序Protocol都仰賴在處理前準確量化細胞, 故準確的細胞計數 (Accurate Cell Counts) 是相當重要的第一步。因此, 用於定量單細胞定序樣本的自動細胞計數器必須準確可靠地對所有樣本類型的細胞進行計數, 包括解離組織 (Dissociated Tissues)、分離的細胞核 (Separated Nuclei)、全血 (Whole Blood)和培養的細胞株 (Cultured Cell Lines)等。

本篇展示了 LUNA-FX7™ 自動細胞計數器如何為許多不同的樣本類型提供準確計數, 而且同樣重要的是, 如何驗證樣本質量。

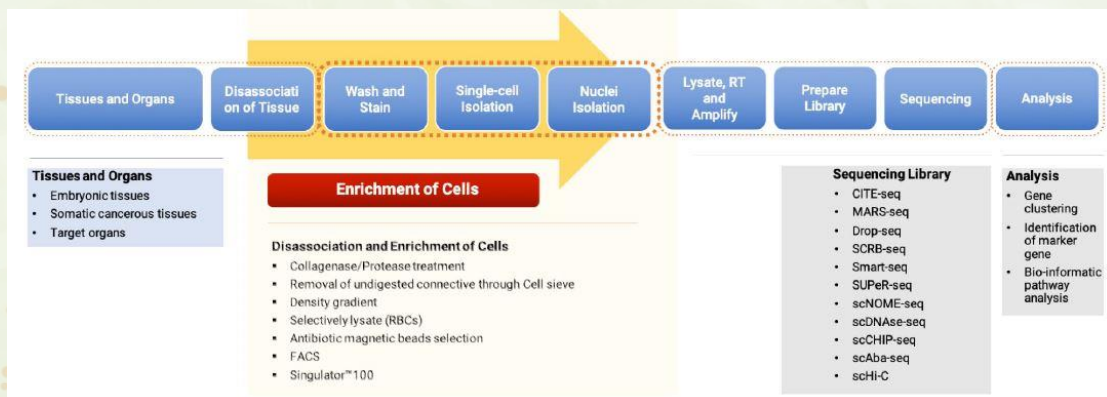


圖1. Single-Cell Sequencing Workflow : 1)組織收集, 2)分離細胞製備, 3)定序文庫 (Library) 製備, 4)定序和5)分析。

**【注意】**

從整塊組織中製造適用於計數和單細胞定序的分離細胞 (Isolated Cells) 需要完全解離 (Complete Dissociation)。細胞團塊 (Cell Clusters) 不僅會產生不準確的計數，還會對定序結果產生負面影響，加上每種組織類型的細胞外基質 (Extracellular Matrix, ECM) 組成可能不同，因此，必須相應地優化解離方法的酶促 (Enzymatic) 反應和化學成分，以確保從解離組織中獲得分離的細胞。

**細胞樣本品質評估**

本篇收集了兩種細胞樣品用於Single-Cell RNA-seq分析。使用標準細胞存活率Protocol和 Acridian Orange/Propidium Iodide細胞染劑 (Cat# F23001) 對兩種樣品進行計數。第一種樣品是從人類外周邊血 (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) 中分離出的B細胞，高細胞存活率和單顆細胞分離程度(圖2)適合下游文庫製備。相比之下，第二種樣品，即貼壁細胞AsPC-1，提供了一個範例，說明了基於圖像的準確計數器 (Accurate Image-Based Counter) 對於評估樣本製備的數量和質量之重要性。

收細胞後，AsPC-1細胞發生不完全解離 (Incomplete Dissociation)。生成的圖像清楚地表明，很大一部分細胞含量仍被納入結合團塊中，比例高達9%，此時AsPC-1的存活率僅為56%。受存活率和細胞分離的影響，該樣品不適合下游處理(圖3)。在許多情況下，單個細胞的樣本細胞是有限的，需要低細胞濃度和重複計數才能獲得最佳和快速的細胞計數。在低濃度細胞的精確計數中，我們使用 LUNA™ 1-Channel Slide (Cat# L72011)，即使細胞濃度低至 $1 \times 10^4$  cells/mL，它也能容納更大的細胞體積來計數(表1)。

## 分析完整細胞核

對於多種單細胞定序應用，需要進一步處理分離細胞以製造分離且完整的細胞核。本篇接下來評估了 LUNA-FX7™ 的效用，以評估完全分離的細胞核之整體品質和數量。為此，本篇中使用了3種細胞株——HL60、HeLa 細胞和 HEK 細胞。圖4顯示了包含完整、健康的 HL60 細胞(左)、核部分分離的HL60細胞(中)和核完全分離(右)的3種圖像，具有完整細胞膜的活細胞在AO染色中顯示綠色螢光。相比之下，死細胞和分離的細胞核都會通過破損或缺失的細胞膜涉入 PI 而發出紅色螢光。然而，LUNA-FX7™ 允許您使用細胞大小(Cell Size) 資訊分辨完整的死細胞與完整的細胞核(圖4，圖6)。例如，完整HL-60活細胞的平均細胞大小為13.4 mm，完全分離細胞核的平均大小為8.3 mm，表明細胞膜和細胞質部分已成功去除。不完全分離的核大小平均為10.2 mm，表明分離核的品質不足以進行下游處理(圖4)。

此外，LUNA-FX7™ 的高解析度明視野圖像可用於目視驗證分離核的質量。例如，分離的細胞核可以很容易地與完整的細胞區分開來，因為細胞核的邊界更薄，並且由於缺乏細胞膜而不明顯。(圖5和圖6)。

綜合以上，LUNA-FX7™ 在三通道成像 (BF、GF和RF) 中的功能和靈敏度，以及複雜的標記演算法 (Sophisticated Tagging Algorithm)，使您能夠在進行昂貴的下游定序處理之前建立樣品通過或失敗的品質管控制標準。

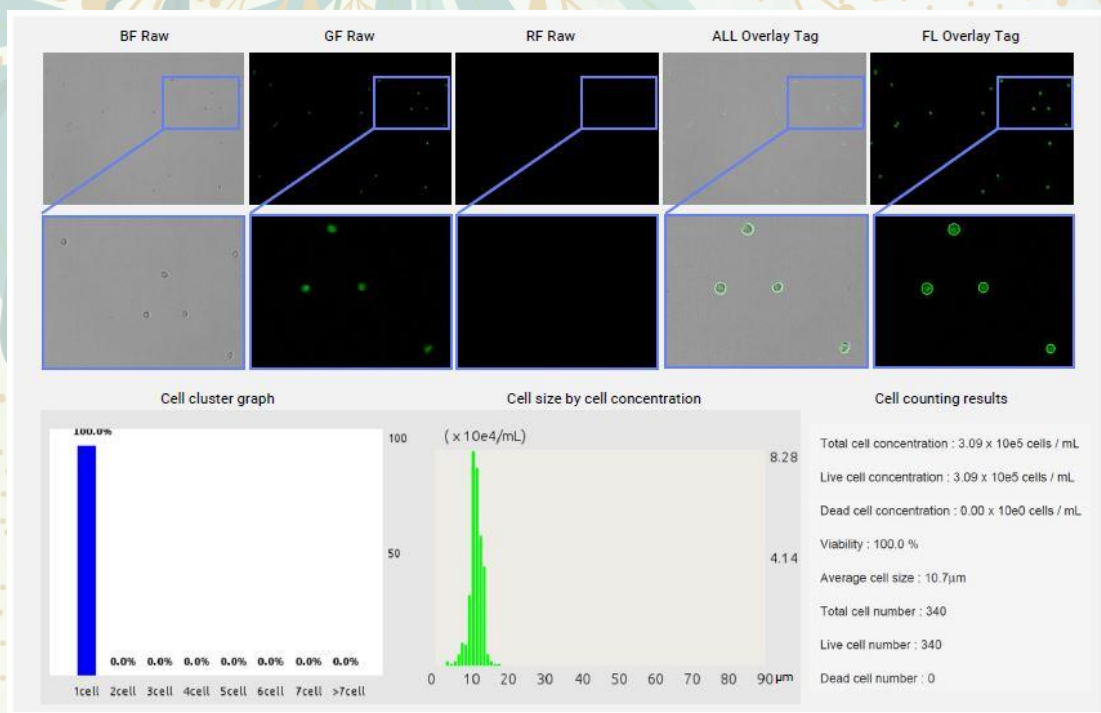


圖2. 充分製備的B細胞可應用於單細胞文庫，包括所有無死細胞 (RF) 或顆粒碎片 (BF) 的陽性綠色細胞，具有100%存活率的優良標記。這些健康細胞的平均細胞大小為10.7 µm，細胞簇圖 (Cell Cluster Plot) 中100%分離單細胞，濃度為  $3 \times 10^5$  cells/mL。

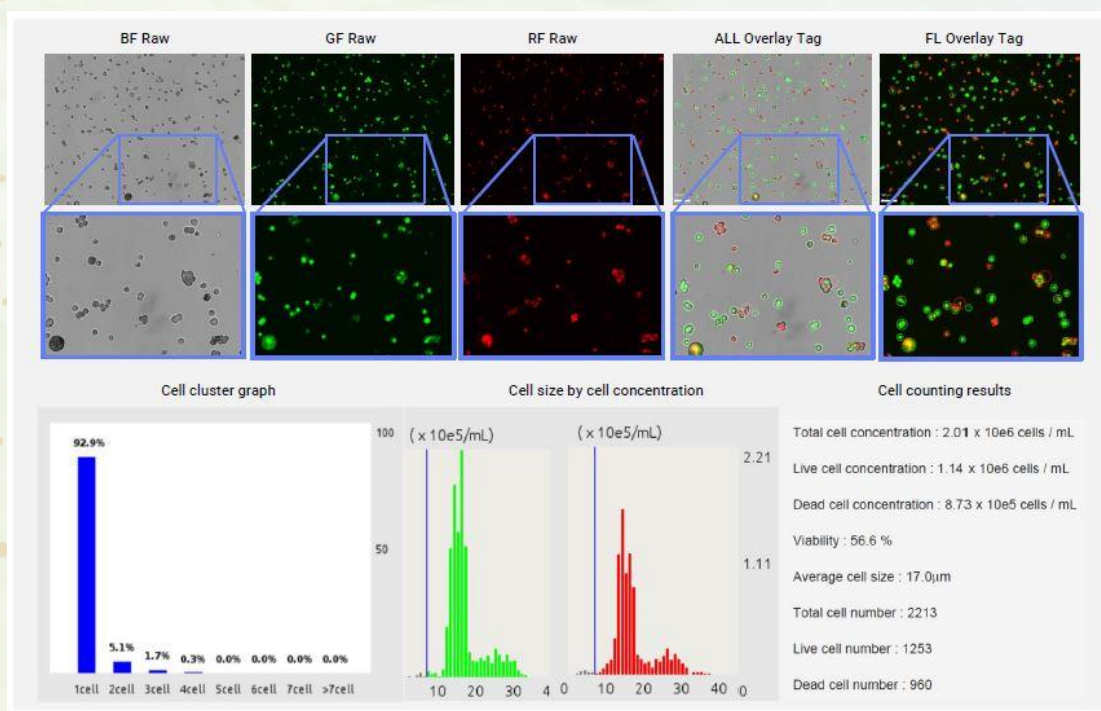


圖3.用於單細胞定序的未充分準備之細胞樣本範例，不適合作為單細胞定序樣品 AsPC-1 細胞。“失敗”的細胞製備展現死細胞含量高與含有未完全分離的細胞團塊。LUNA-FX7™ 的簇直方圖 (Cluster Histogram) 功能允許準確評估細胞團塊與分離細胞之百分比。

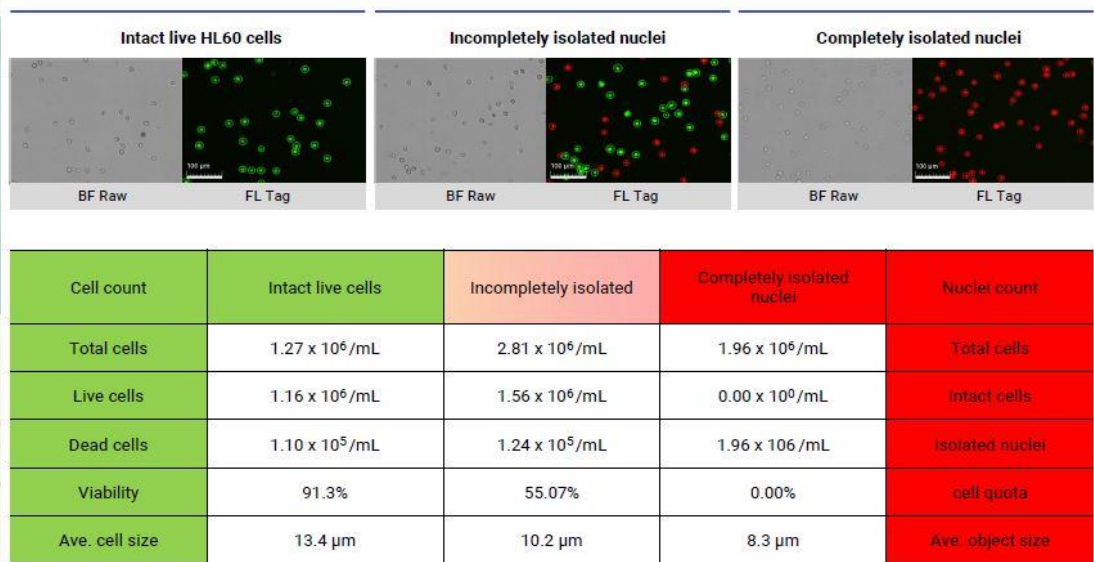


圖4. HL 60細胞核分離過程的可能結果。明視野 (BF) 圖像和帶標籤的疊加螢光圖像讓您輕鬆區分不同的細胞“狀態”。在 BF 圖像中，完整的細胞比分離細胞核明顯更突出、更暗。同時，螢光圖像和計數可以進行準確的定量評估。

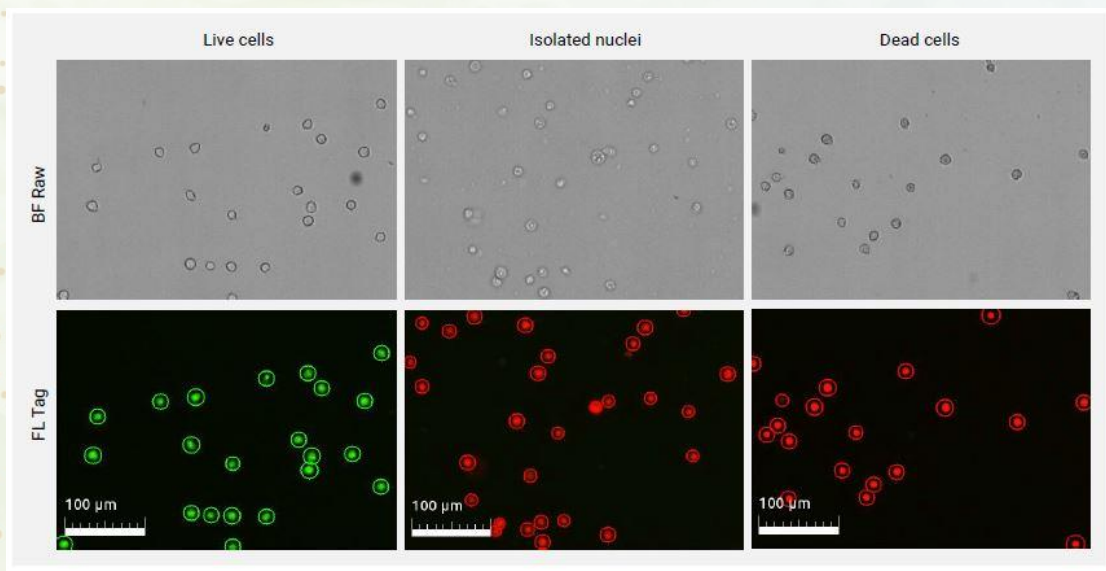
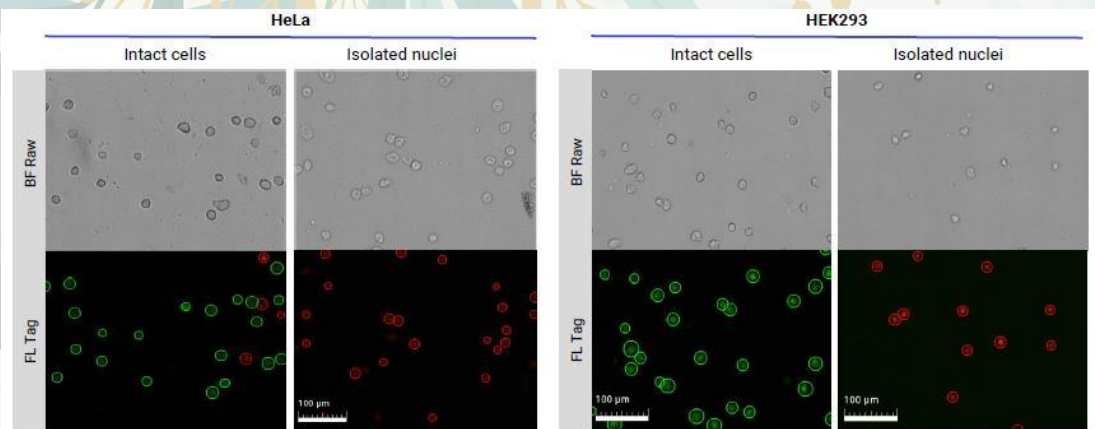


圖5.區分活細胞核、死細胞核和完整細胞核。因為死細胞和完整的細胞核都缺乏完整的細胞膜，所以紅色螢光會從 PI 染色中被偵測到。由 LUNA-FX7™ 生成的 BF 圖像和尺寸測量能夠常規區分死細胞和完整的分離細胞核。



	HeLa		HEK293	
	Intact cell	Isolated nuclei	Intact cell	Isolated nuclei
Total cells	$1.27 \times 10^6/\text{mL}$	$1.80 \times 10^6/\text{mL}$	$2.66 \times 10^6/\text{mL}$	$3.91 \times 10^5/\text{mL}$
Intact live cells	$1.16 \times 10^6/\text{mL}$	$0.00 \times 10^0/\text{mL}$	$2.56 \times 10^6/\text{mL}$	$9.05 \times 10^3/\text{mL}$
Isolated nuclei	$1.10 \times 10^5/\text{mL}$	$1.80 \times 10^6/\text{mL}$	$9.59 \times 10^4/\text{mL}$	$3.82 \times 10^5/\text{mL}$
Intact cell	91.3%	0.00%	96.4%	2.3%
Ave. object size	13.4 $\mu\text{m}$	6.4 $\mu\text{m}$	13.3 $\mu\text{m}$	11.7 $\mu\text{m}$

圖6.分離細胞核的評估和可能的結果。明視野 (BF) 圖像和疊加的螢光圖像讓您可以輕鬆區分不同的細胞“狀態”。與 BF 圖像中的分離細胞核相比，完整細胞明顯更加突出和更暗的邊界。同時，螢光圖像和計數可以進行準確的定量評估。活的完整細胞用 AO 染色 (GF)，分離的細胞核被染成紅色。LUNA-FX7™ 可以準確區分具有大細胞質和小細胞核 (HeLa) 的樣品以及相對於細胞質具有大細胞核的細胞類型 (HEK293)。

表1.計數玻片選項及規格。

Compatible slides	LUNA™ 1-Channel Slides	PhotonSlide™	LUNA™ 3-Channel Slides	LUNA™ 8-Channel Slides
Sample throughput	1 sample	Up to 2 samples	Up to 3 samples	Up to 8 samples
Sample loading volume	50 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}/\text{chamber}$	10 $\mu\text{L}/\text{chamber}$	10 $\mu\text{L}/\text{chamber}$
Analysis volume	5.1 $\mu\text{L}$	1.3 $\mu\text{L}/\text{chamber}$	1.3 $\mu\text{L}/\text{chamber}$	0.5 $\mu\text{L}/\text{chamber}$
Number of image fields	47 fields	12 fields/chamber	12 fields/chamber	5 fields/chamber
Counting concentration	1.00E+04 - 2.00E+07/mL	5.00E+04 - 1.30E+07/mL	5.00E+04 - 1.30E+07/mL	1.00E+05 - 1.30E+07/mL
Image				
Specialty	Larger volume to effectively enumerate in the extreme cases of the low concentration of cells	Comfortable and familiar to use for cell counting, just like using a hemocytometer	Additional statistical report available from triple replicates of mean, SD and CV	Eight samples at once in a high-throughput manner Compatible with multichannel pipettes

## 結論

對於單細胞定序，LUNA-FX7™ 為研究人員提供了提高細胞樣本準確性和可靠性的新面向，以評估各種樣本類型中細胞和分離細胞核樣本的數量和品質。

## REFERENCES

- L., Xiong, F., Wang, Y., Zhang, S., Gong, Z., Li, X., . . . Guo, C. (2021). What are the applications of single-cell RNA sequencing in cancer research: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 163. doi:10.1186/s13046-021-01955-1
- Dong, X., Liu, C., & Dozmorov, M. (2021). Review of multi-omics data resources and integrative analysis for human brain disorders. *Brief Funct Genomics*. doi:10.1093/bfgp/elab024