



Miltenyi Biotec

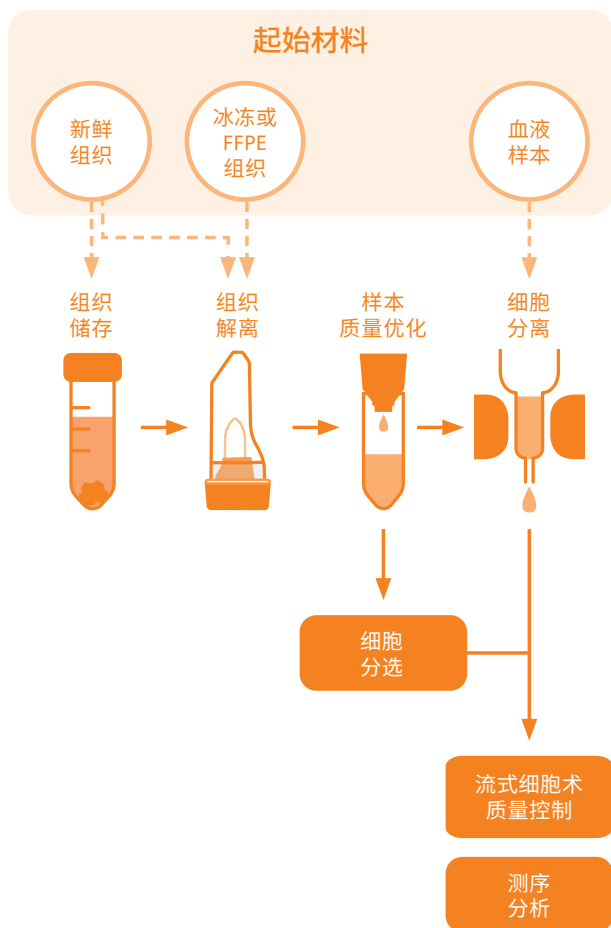
用于测序分析的细胞制备

优化的样本制备助推测序分析达到新高度



提升样本质量是关键

为了获得极佳的测序分析结果，我们为细胞和细胞核制备的每个步骤都提供了相应的解决方案。从组织储存到质量控制，我们的技术可助推您的研究达到新高度。





目录

- 4 组织保存、解离和
样本质量优化
- 12 磁性细胞分离
- 18 细胞分选和
流式细胞术质量控制
- 22 操作建议与产品信息



组织保存、解离和 样本质量优化

制备高活性的单细胞悬液或完整的细胞核悬液对于单细胞测序分析至关重要。我们的样本制备产品可确保实现高效的细胞和细胞核制备，且能够灵活地处理新鲜、冰冻和FFPE组织。

组织保存

短期的保存组织可为样本处理提供更大灵活性。MACS® 组织保存液经验证，可在2-8°C下对新鲜实体组织安全储存长达48小时。该产品已经过多种人类和啮齿动物组织测试，包括肿瘤、肺、脾脏、脑和骨骼肌。将组织保存在MACS组织保存液中可避免坏死和细胞应激效应，同时保护细胞类型组成和细胞的活化状态。

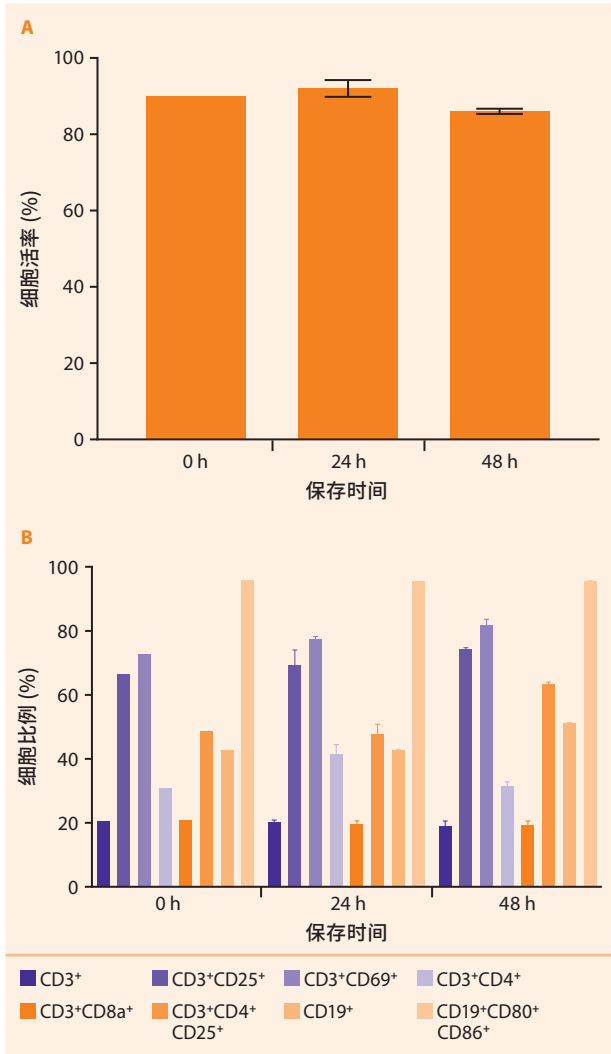


图1：小鼠肿瘤经MACS组织保存液保存后保持细胞活性和TIL组成。 CT26小鼠肿瘤在MACS组织保存液中于4°C保存24或48小时。解离后，通过流式细胞术分析总细胞活性 (A) 和TIL (肿瘤浸润白细胞) 组成 (B)。细胞比例基于CD45⁺活细胞。此外，CD3⁺和CD19⁺细胞亚群的比例分别基于相应的CD3⁺和CD19⁺起始细胞群体。

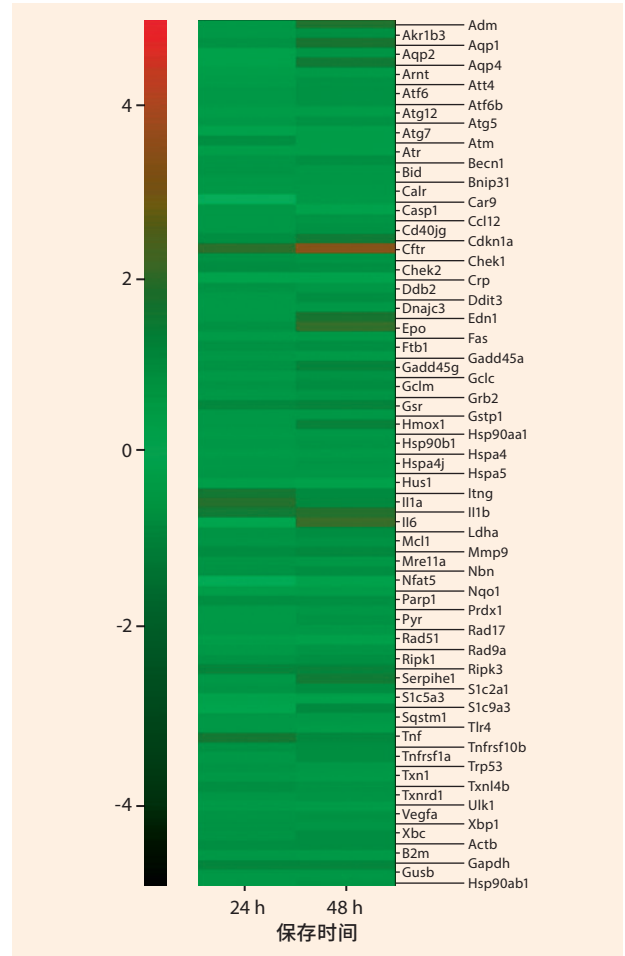


图2：新鲜和经保存的肿瘤细胞中细胞应激相关基因的表达。 从新鲜和经保存的CT26肿瘤细胞中提取RNA，并分析细胞应激相关基因的表达。热图显示了与新鲜组织相比表达水平的倍数变化。

从实体组织中制备细胞

将实体组织高效解离成高活性单细胞悬液是单细胞组学工作流程中最关键的一步。解离过程必须保护组织的细胞组成以及细胞表面抗原表位不受损害，以便进一步分离特定的目的细胞。我们的gentleMACS™技术能够在封闭的无菌系统中简便快速地解离实体组织，通过机械扰动与酶解作用的结合，温和地解离获得细胞。

gentleMACS组织解离器与解离管

带加热模块的gentleMACS Octo组织解离器可实现全自动的组织解离。这款组织解理器有8个样本处理单元，带集成加热装置，可直接在仪器上进行酶解孵育。每个处理单元可独立运行，即使其它单元正在使用，您也能随时处理新的样本。我们开发出40多种预设程序以配合组织解离试剂盒获得最优结果。此外，您还可以根据具体需求创建自定义程序。



gentleMACS解离管是gentleMACS技术的重要组成部分。解离管的每个元素均经过精心设计，以确保实现最佳的组织样本解离或匀浆性能。紫色管盖的C管适用于组织解离，可从组织中获得高活性的单细胞悬液，橙色管盖的M管用于组织匀浆，后续进行分子分析。

MACS®组织解离试剂盒

我们提供多种用于人和啮齿动物组织的解离试剂盒。这些试剂盒具有高度的批次间一致性，含有高纯度的酶，可确保获得标准化、可重复的解离结果，并保留细胞表位。对于所有解离试剂盒，我们均提供预设实验方案，确保获得最高的活细胞回收率。

单细胞水平的小鼠肿瘤异质性分析

对小鼠肿瘤进行优化的解离后，单细胞基因表达分析可以清楚地鉴定出组织中存在的不同细胞群体。

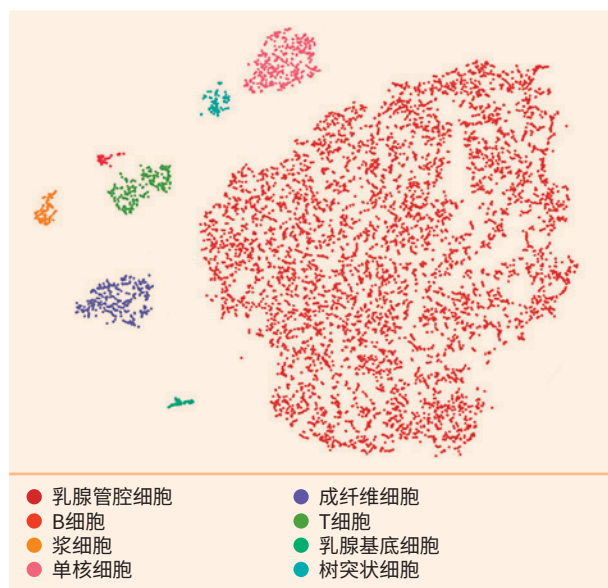


图3: 小鼠乳腺肿瘤的单细胞基因表达分析。使用小鼠肿瘤解离试剂盒以及带加热模块的gentleMACS Octo组织解离器解离肿瘤。10x Genomics的Chromium™平台构建单细胞RNA测序文库，Illumina技术进行测序。Cell Ranger™软件进行聚类分析并以Loupe Cell Browser可视化(两款软件均来自10x Genomics)。根据已知的标志物基因，手动校验后将细胞类型分类添加到“基于图片”的聚类中。

从实体组织中制备细胞核

有些测序应用需要使用细胞核作为起始材料。对于某些特定的组织，如瞬间冷冻组织，由于细胞在解冻过程中受到严重损伤，只能提取细胞核用于分析。针对这些应用，我们开发出细胞核提取缓冲液。配合使用 gentleMACS™ Octo组织解离器和C管，细胞核提取缓冲液可在4°C、7分钟内快速提取单细胞核，并且可以同时处理多达8个样本。细胞核提取缓冲液已成功测试过多种新鲜和冰冻组织，包括小鼠脑、肝、心、肾，小鼠异种移植肿瘤和OCT包埋的人原代肿瘤组织，如黑色素瘤、乳腺、结肠和前列腺肿瘤。

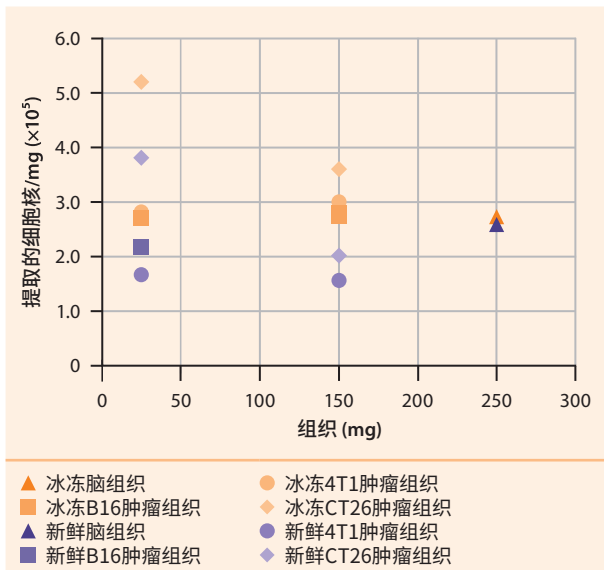


图4：从新鲜和冰冻组织中自动提取并获得高得率的单细胞核。使用细胞核提取缓冲液和gentleMACS Octo组织解离器从新鲜和速冻的小鼠脑和小鼠同系肿瘤中制备单细胞核悬液。使用DAPI染色细胞核，MACSQuant® Analyzer 10进行流式细胞分析。

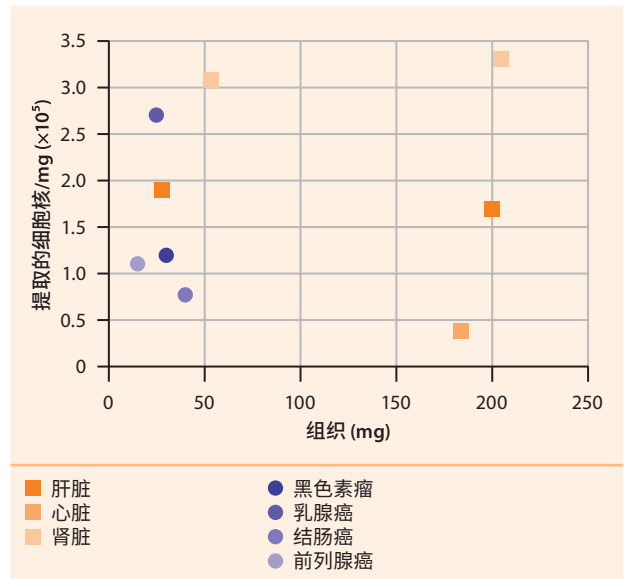


图5：从冰冻和OCT包埋组织中自动提取并获得高得率的单细胞核。使用细胞核提取缓冲液和gentleMACS Octo组织解离器从速冻的小鼠组织（包括肝、心和肾）和OCT包埋的人组织（包括黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌）中制备单细胞核悬液。使用DAPI染色细胞核，MACSQuant Analyzer 10进行流式细胞分析。

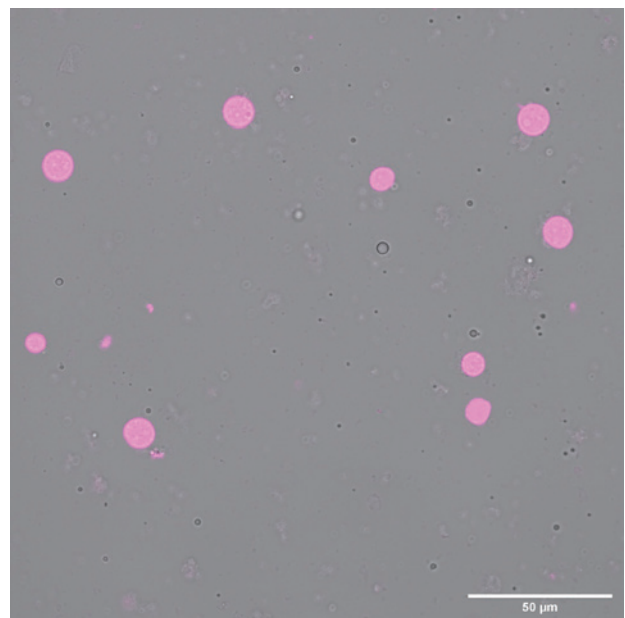


图6：小鼠肝脏的单细胞核悬液。使用细胞核提取缓冲液和gentleMACS Octo组织解离器从速冻的小鼠肝脏中提取单细胞核。提取细胞核后立即使用DRAQ5™ 染液进行细胞核染色。图片为DRAQ5™ (粉色) 和明场叠加图像。

访问



如需更多有关细胞核提取的信息，请访问我们的网站：

► miltenyibiotec.com/nucleiextraction

样本质量优化

细胞悬液中常含有干扰成分，如细胞团块、死细胞、细胞碎片和红细胞，它们会影响细胞计数和下游测序应用。进行单细胞转录组分析时，只有活细胞才能得到可靠的测序信息。

我们的MACS® SmartStrainer细胞滤筛和去除试剂可实现高效的样本纯化和制备，用于测序分析。

MACS SmartStrainer采用特殊设计，过滤时不会发生堵塞，可轻松适配15 mL和50 mL离心管，快速去除细胞悬液或血液样本中较大的颗粒和细胞团块。



对有核活细胞进行测序，确保细胞计数准确

死细胞、红细胞和细胞碎片会影响测序分析，需要从样本中去除。

使用去死细胞试剂盒，可通过磁性分离快速地直接去除外周血单核细胞（PBMC）、冻存细胞或实体组织（含有耐受性好的细胞，如上皮细胞、肿瘤细胞和免疫细胞）细胞悬液中的死细胞。

碎片去除溶液是一款即用型密度梯度试剂，能够快速便捷地去除含有脆弱细胞（包括来源于成年小鼠脑、心脏、肝脏和肾脏的细胞）悬液中的碎片。去除死细胞和碎片，裂解红细胞，可提高目的细胞的活细胞得率，用于下游应用。

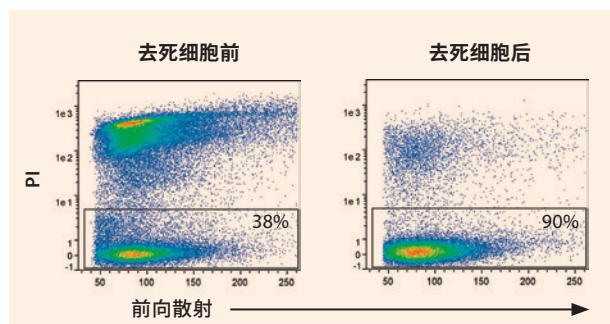


图7：即使样本中死细胞含量较高，亦可高效去除死细胞。使用去死细胞试剂盒从PBMC样本中去除死细胞。死细胞指PI阳性细胞，活细胞为PI阴性细胞。

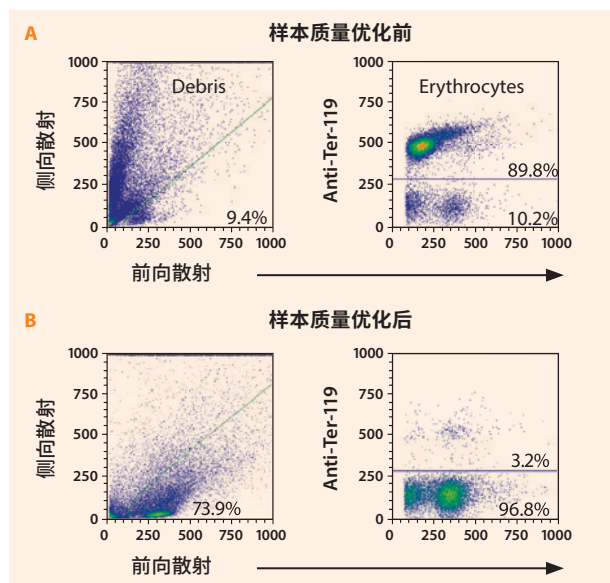


图8：从成年小鼠脑中富集高活性的神经细胞。(A) 成年脑细胞悬液中包含大量的细胞碎片和红细胞。(B) 使用碎片去除溶液和红细胞裂解液（10×）高效去除细胞碎片和红细胞后，富集高活性的神经细胞。

肿瘤样本质量优化有助于提升单细胞测序分析的质量

在对小鼠肿瘤进行单细胞测序前有效过滤并去除死细胞和红细胞，有助于提高细胞回收率，进而提升测序数据的质量。

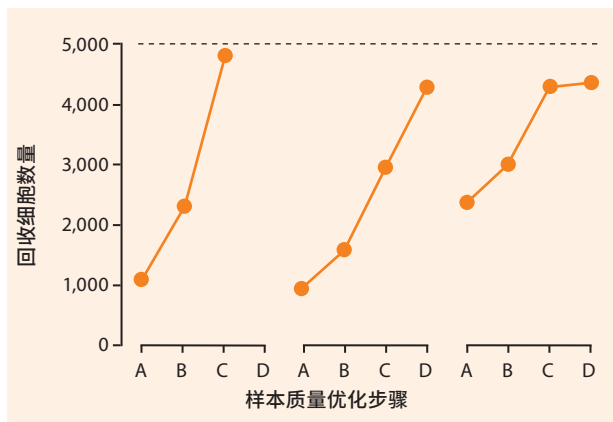


图9: 样本质量优化对小鼠结肠肿瘤单细胞RNA测序的影响，三个重复。使用带加热模块的gentleMACS Octo组织解离器和小鼠肿瘤解离试剂盒解离肿瘤，然后用70 μm的MACS SmartStrainer过滤 (A)；使用红细胞裂解液 (10x) 去除红细胞 (B)；去死细胞试剂盒去除死细胞一次 (C) 或两次 (D)。每个步骤留取样本，使用10x Genomics Chromium平台构建单细胞RNA测序文库，Illumina技术测序，10x Genomics Cell Ranger软件分析数据。

成年小鼠脑的单细胞基因表达分析

采用包含碎片去除和红细胞裂解的成年小鼠脑组织优化解离方案，能够对成年小鼠脑的主要神经细胞类型实现高效的单细胞测序分析。

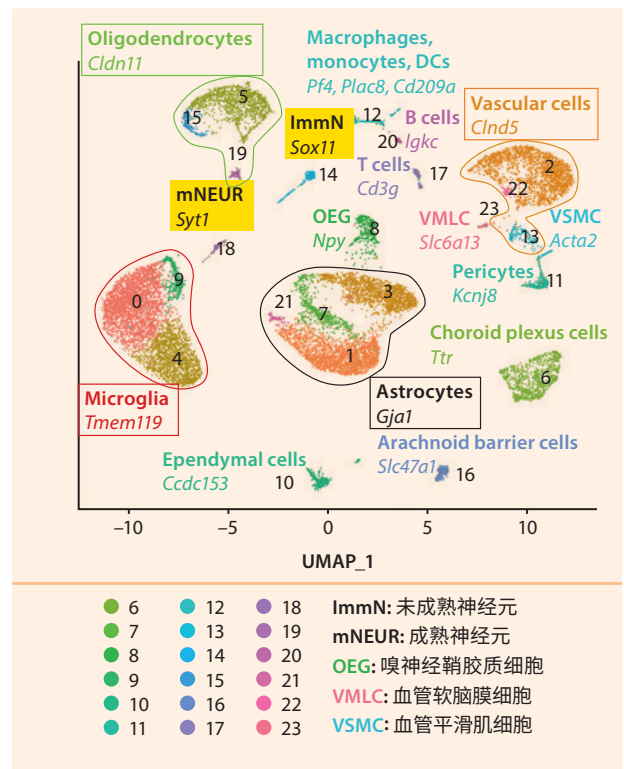


图10: 成体神经细胞的单细胞基因表达分析。使用小鼠和大鼠成年脑解离试剂盒和带加热模块的gentleMACS Octo组织解离器解离成年小鼠脑组织。该试剂盒包含去除碎片和红细胞的试剂。随后，细胞上样至10x Genomics Chromium平台并采用Illumina技术进行单细胞文库测序。根据基因表达谱，采用统一流形逼近与投影 (UMAP) 可视化不同神经细胞聚类。



磁性细胞分离

对PBMC或样本中的特定细胞类型进行测序分析十分耗时且价格昂贵，尤其是当目的细胞丰度非常低的时候。细胞分离能够去除来自非目的细胞的背景信号，有助于提高分析的灵敏度，同时节省时间和测序成本。



选择最佳的分离方案

MACS®技术通过使用与超顺磁珠结合的特异性抗体靶向表面抗原，实现细胞群体的磁性分选。标记细胞在磁性作用下滞留在分选柱中，然后可以从分选柱中洗脱。这种快速温和的分离方法可以最大程度减少细胞变化，并确保高细胞活性。

基于MACS技术，我们提供了不同的细胞分离方案，以满足各种需求。

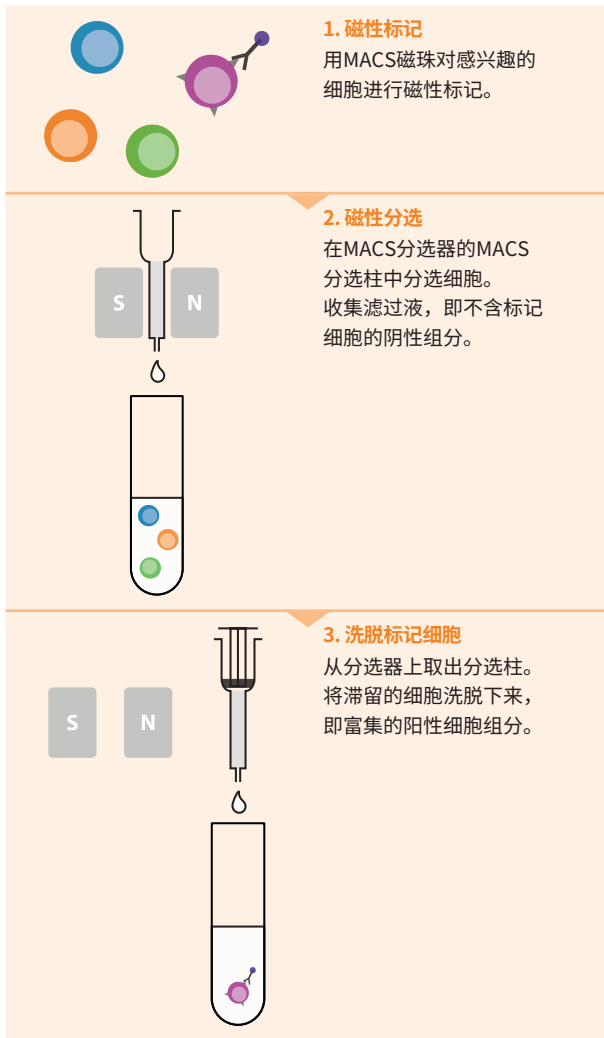
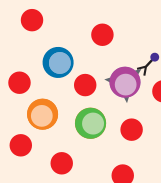


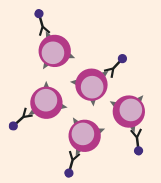
图11: MACS磁珠技术采用三个简单的步骤分离感兴趣的细胞。

满足各种需求的分选方案




StraightFrom®磁珠

- 可在30分钟内从血液样本中直接分离出白细胞亚群，无需密度梯度离心和红细胞裂解
- 避免密度梯度离心和红细胞裂解引起的细胞变化



MACS磁珠

- 温和的阳性细胞分离确保获得最高的纯度，亦适用于稀有细胞
- 适用于几乎所有细胞类型和组织，包括PBMC和复杂的组织
- 无需去除磁珠即可用于下游应用



MACS分离试剂盒

- 非常适合分离PBMC和无明确谱系特异性标志物的细胞，如肿瘤细胞或神经元
- 目的细胞不带标记，可用于后续的分选步骤



访问 

如需更多有关MACS技术的信息，请访问我们的网站：
[▶ miltenyibiotec.com/macstech_genomics](https://miltenyibiotec.com/macstech_genomics)

自动化有助于减少人工操作带来的干扰

不论是处理少量样本还是进行高通量分析，自动化都有助于简化细胞分选。我们的细胞分选仪器可实现不同程度的自动化，适用于各种样本通量，还可实现细胞分选流程的标准化。

autoMACS® Pro Separator分选仪可进行全自动的磁性细胞分选，同时最大程度地减少温度变化和操作人员差异，因此具有高重复性。除了对特定的目的细胞进行磁性分选外，autoMACS Pro还可以用于从血液样本中分离PBMC，以及使用去死细胞试剂盒去除死细胞。

采用免疫磁珠法直接从全血中分离PBMC可防止细胞应激反应

与密度梯度离心法相比，采用免疫磁珠法直接从全血中温和且自动地分离PBMC，可避免激活细胞应激反应。

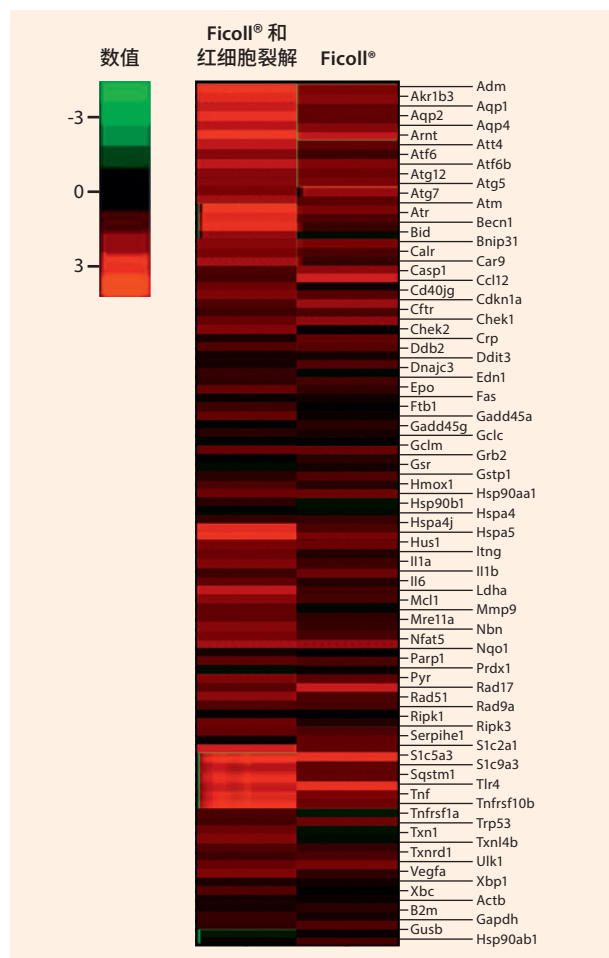


图12：采用免疫磁珠法从全血中分离PBMC可防止细胞应激。采用密度梯度离心法 (Ficoll®) 或使用人全血PBMC分离试剂盒和沉降试剂盒2制备PBMC。使用红细胞裂解液 (10×) 去除用Ficoll (Ficoll和红细胞裂解) 制备的PBMC样本中的红细胞。提取RNA并对细胞应激相关基因的表达进行分析。热图显示了与免疫磁珠制备的PBMC相比，基因表达水平的倍数变化。



通过分离TIL大幅提高单细胞免疫谱分析的灵敏度

在肿瘤解离后对TIL进行磁性分离，可提高对T细胞和B细胞受体进行单细胞RNA测序的灵敏度，从而分辨出在混合样本中代表性较差或缺乏代表性的克隆型。

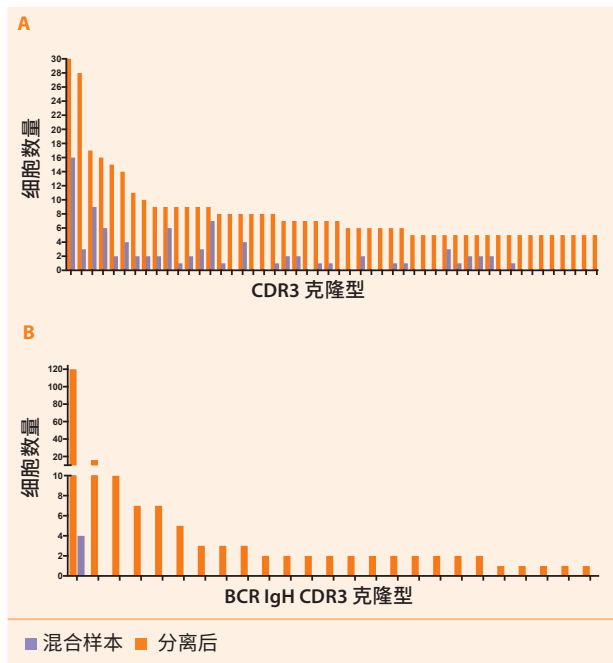


图13：通过分离TIL可提高单细胞免疫谱分析的灵敏度。对人卵巢癌样本进行解离和样本质量优化后，采用MACS技术分离T细胞和B细胞。利用10x Genomics和Illumina技术对混合样本或分离的T细胞和B细胞进行单细胞免疫谱分析。图片显示了在分离的T细胞或B细胞组中按丰度排列前50位的TCR (A) 和前25位的BCR (B) CDR3克隆型 (橙色柱)。紫色柱显示了混合样本中同样包含相应受体的CDR3克隆型的细胞数量。

采用免疫磁珠法直接从全血中分离PBMC可防止细胞应激反应

通过分离肿瘤细胞得以准确地检测人实体瘤中的单核苷酸多态性 (SNP)，从而提高杂合性缺失 (LOH) 的检测能力。

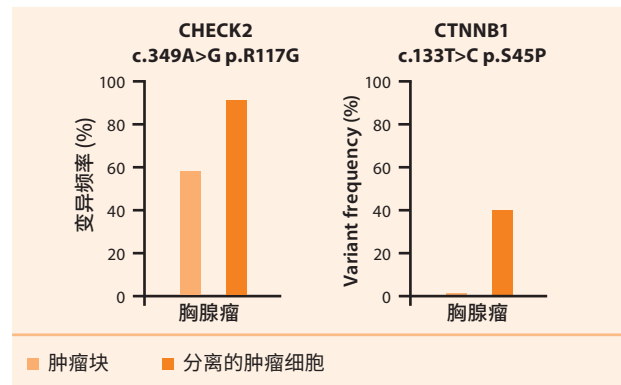


图14：通过分离肿瘤细胞实现准确检测实体瘤的SNP合子型。从解离的人乳腺癌中分离出肿瘤细胞。使用从肿瘤块或分离的肿瘤细胞中提取的DNA，利用Illumina技术生成外显子捕获测序文库。图中显示的是CHECK2 c.349A>G p.R117G和CTNNB1 c.133T>c p.S45P变异。肿瘤块中CHECK2基因的突变频率表明其具有杂合性，但在分离的肿瘤细胞组中可以检测到LOH。此外，仅在分离的肿瘤细胞中检测到CTNNB1基因中的体细胞突变c.133T>c p.S45P。



细胞分选和 流式细胞术质量控制

我们基于微芯片的温和的多参数细胞分选方案在提高测序分析质量、节省时间和成本方面发挥重要作用。流式细胞术质量控制可提供准确的活细胞计数，从而避免无效的分析，并设定结果预期。

温和的多参数细胞分选

流式细胞分选能够根据不同标志物和物理参数的组合，分离出纯度最高的目的细胞，还可以同时去除死细胞和细胞碎片。但是，由于系统内存在高压及电荷，使用液滴式分选仪进行细胞分选可能会造成细胞损伤，并导致应激相关基因的表达上调。MACSQuant[®] Tyto[®]细胞分选仪采用独特的微芯片技术，避免了严苛的分选条件，可实现温和的多参数细胞分选，从而获得最高质量的样本。

细胞分选过程在一次性的全封闭MACSQuant Tyto样本舱中完成，有效避免了样本污染和残留，以及气溶胶释放。此外，在分选过程中，目的细胞已高度浓缩，细胞分选后无需再进行额外的离心步骤。



温和的细胞分选可改善小鼠乳腺上皮细胞的单细胞基因表达分析

MACSQuant Tyto可确保对细胞(如乳腺上皮细胞)进行温和的分选，以便最大程度减少对转录的影响并获得高质量样本，使单细胞基因组分析更可靠。

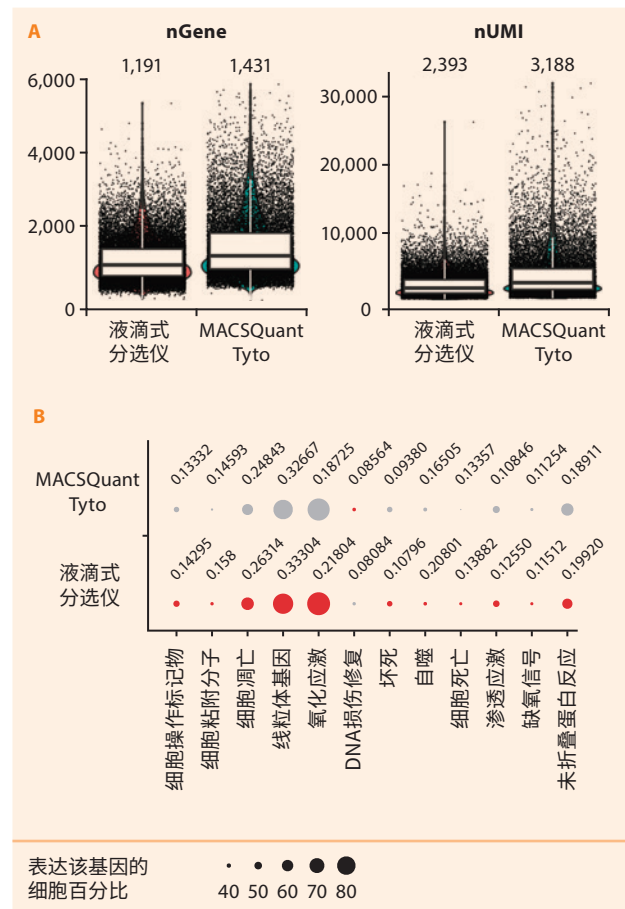


图15: 温和的细胞分选可改善乳腺上皮细胞的单细胞基因表达分析。使用液滴式分选仪或MACSQuant Tyto分选小鼠乳腺上皮细胞。随后将分选的细胞上样至10x Genomics Chromium平台。(A) 与传统的液滴式分选仪相比，采用MACSQuant Tyto分选的细胞可以得到更多的基因和唯一分子标识符 (UMI)。(B) 与传统的液滴式分选仪相比，使用MACSQuant Tyto分选的细胞显示较低的应激相关基因表达。红色点表示基因活化程度更高的数据集。点的大小表示表达相应基因的细胞百分比。数据由加州大学欧文分校的Quy Nguyen提供。

缩短流式细胞分选和分析所需时间

在某些样本 (如肿瘤) 中, 特定细胞群体的占比极低, 这会延长细胞分选和采集时间。使用MACS®磁珠进行免疫磁性细胞分离, 能够对这些细胞群体进行预富集, 进而节省大量时间并提高流式细胞分析或细胞分选的质量。

| 细胞类型 | 待分析的细胞 | 采集的次数 | 流式细胞分析时间/样本* | 总的流式细胞分析时间** |
|-----------------------------|--------|--------------------|--------------|--------------|
| CD4⁺ T 细胞 | | | | |
| 混合细胞群 | 5,000 | 7.96×10^6 | 66.3 min | >10 h |
| 分离后*** | 5,000 | 5.41×10^4 | 0.5 min | ~11 min |
| CD8⁺ T 细胞 | | | | |
| 混合细胞群 | 5,000 | 2.80×10^6 | 23.3 min | >3.5 h |
| 分离后*** | 5,000 | 4.37×10^4 | 0.4 min | ~10 min |
| T 细胞 | | | | |
| 混合细胞群 | 10,000 | 8.13×10^5 | 6.8 min | >1 h |
| 分离后*** | 10,000 | 3.24×10^4 | 0.3 min | <10 min |

* 流速: 2,000 events/s

** 共9个样本 (3个实验组 × 3个重复/组)。包含MACSQuant® Analyzer样本间的45秒自动混匀和冲洗时间

*** 分别使用CD8 (TIL)、CD4 (TIL) 或CD4/CD8 (TIL) 磁珠进行分离

表3: 细胞富集有助于缩短流式细胞分选和分析时间。使用小鼠CD4 (TIL) 磁珠、CD8 (TIL) 磁珠和CD4/CD8 (TIL) 磁珠从不同的小鼠肿瘤模型中分离CD4⁺、CD8⁺和pan T细胞, 可大幅缩短分析时间。



质量控制

在下游测序分析之前对样本进行质量控制可以节省时间和成本，并设定适当的分析结果预期。尤其是在进行单细胞基因组分析时，样本必须满足特定的要求，才能获得可靠、可重复且准确的结果。这些要求包括活细胞比例高于90%，处于单细胞悬液状态，以及准确的细胞计数。使用MACSQuant[®] Analyzer流式细胞分析仪，可以同时检查上述所有参数。

MACSQuant Analyzer 10是任何用户都能轻松使用的流式细胞分析仪。其具有独特的定量移液功能，可

在不到一分钟的时间内对每次样本检测和每个细胞群体进行分析，自动完成绝对细胞计数且无需计数微球。只需25 μ L样本即可获得准确的总细胞数，并确定目的细胞的活性。此外，在计数和活细胞鉴别实验中采用Express模式还可自动获得样本中的活细胞数量。

MACSQuant分析仪还有许多其他的非常有用的创新功能，例如，自动标记功能可实现样本采集的完全自动化，集成软件包可提供统计报告。

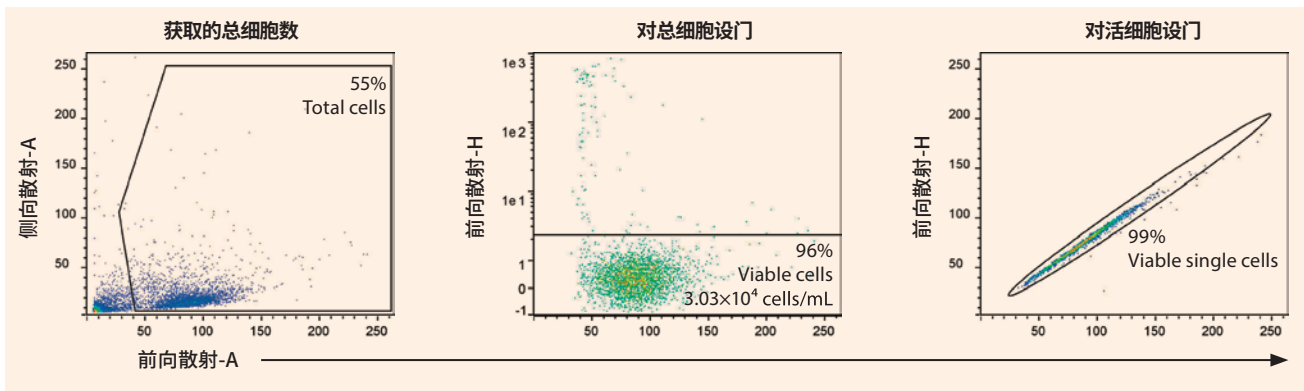


图16：在下游基因组应用之前，对细胞数量和细胞活性进行简便快速的评估。小鼠脑解离后获得的神经细胞悬液的质量控制分析示例，使用MACSQuant Analyzer 10进行分析。利用DNA结合染料碘化丙啶 (PI) 以及仪器的自动标记功能测定细胞活力。



操作建议与产品信息

有关测序分析用的细胞和细胞核制备的建议。



最佳操作建议

- 制备样本时速度要尽可能快。尽量减少细胞制备步骤，避免细胞死亡和基因表达谱变化。
- 如条件允许，使用宽口移液器以尽量减少细胞损伤，并使用不含核酸酶的试剂和耗材。
- 组织解离后，由于游离DNA的存在，一些细胞容易聚集。
解离后再进行一次DNA酶洗涤可能有助于减少细胞团聚。
- 在开始进行单细胞分析前，对最终的单细胞悬液做细胞计数并分析细胞活性。
- 活细胞比例低于90%时，去除死细胞，以提高活细胞回收率。
- 去除红细胞可提高有核细胞的回收率。然而红细胞裂解可能会诱导细胞应激反应，因此仅在必要时进行红细胞裂解，如分离目的细胞则无需去除红细胞。
- 在分析前先去除样本中的细胞碎片和细胞团块，有助于提高细胞计数的准确度，可避免在细胞分选时以及在单细胞平台上发生堵塞。
- 细胞或细胞核悬液制备完成后应立即上样至单细胞平台。样本放置一段时间可能会导致细胞或细胞核聚集。如果无法立即上样，可将样本暂时放置在冰上，但不得超过30分钟。

产品信息

| 产品 | 货号 |
|--|-------------|
| 仪器 | |
| gentleMACS Octo Dissociator with Heaters | 130-096-427 |
| autoMACS Pro Separator Starter Kit | 130-092-545 |
| MACSQuant Tyto Cell Sorter | 130-103-931 |
| 如需进一步了解MACSQuant流式细胞分析仪，请访问 miltenyibiotec.com/macsqquant4genomics | |
| 试剂 | |
| MACS Tissue Storage Solution | 130-100-008 |
| Dead Cell Removal Kit | 130-090-101 |
| Debris Removal Solution | 130-109-398 |
| Red Blood Cell Lysis Solution (10x) | 130-094-183 |
| Nuclei Extraction Buffer | 130-128-024 |
| 如需组织解离试剂盒完整列表，请访问 miltenyibiotec.com/TK4genomics | |
| 如需磁珠和分离试剂盒完整列表，请访问 miltenyibiotec.com/kits4genomics | |
| 如需StraightFrom产品完整列表，请访问 miltenyibiotec.com/SF4genomics | |
| 如需进一步了解从血液中直接分离PBMC的产品，请联系我们 | |

访问



点击此处下载更多应用数据

► [miltenyibiotec.com/
data2download](https://miltenyibiotec.com/data2download)

► miltenyibiotec.com



Miltenyi Biotec

美天旆生物技术



欢迎访问
美天旆官方网站



欢迎关注
美天旆服务号



欢迎关注
美天旆订阅号

上海办公室

上海市浦东新区张衡路1077号4楼A401室

电话: (021) 6235 1005

北京办公室

北京市朝阳区恒通商务园B10座604室

电话: (010) 6410 7101

广州办公室

广州市越秀区世界贸易中心大厦南塔2414室

电话: (020) 2237 8592

联系热线: 800-820-2606

产品咨询与技术支持邮箱: technicalsupportCN@miltenyi.com.cn

除特别说明, 美天旆产品和服务仅限于研究用途。

MACS and the Miltenyi Biotec logo are registered trademarks or trademarks of Miltenyi Biotec and/or its affiliates in various countries worldwide.
Copyright © 2022 Miltenyi Biotec and/or its affiliates. All rights reserved.

130-130-159