



ANLEITUNG

- Bitte richten Sie Ihren Zeitplan für die Zellvorbereitung am Einreichungszeitplan des Single-Cell Centers aus.
- Minimieren Sie Verzögerungen zwischen der Zellvorbereitung und dem Einreichen. Bewahren Sie die Zellen auf Eis auf.
- Festes Gewebe und andere große Zellaggregate müssen durch mechanische oder enzymatische Dissoziation aufgespalten werden.
- Seien Sie bei der Zellvorbereitung sehr vorsichtig (langsam pipettieren).
- Um die Scherkräfte beim Pipettieren zu minimieren, verwenden Sie 10X Genomics validierte 1000- μ l-Pipettenspitzen mit großem Durchmesser für die Zellmanipulation und Resuspension (Rainin cat#30389218).
- Es wird empfohlen, eine erste Zellzählung durchzuführen, bevor die Zellen in das Single-Cell Center transportiert werden, um die Zellkonzentration und die Lebensfähigkeit der Zellen zu bestimmen.
- Eine Zellfiltration kann durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass eine gute Einzelzellsuspension frei von Zellbruchstücken und Zellaggregaten ist. Achten Sie darauf, dass die Porengröße größer ist als der Durchmesser der Zellen, aber klein genug, um Klumpen und Bruchstücke abzufangen. Berücksichtigen Sie den mit dem Filtrationsprozess verbundenen Volumenverlust und wiederholen Sie die Zellzählung, um den Zellverlust auszugleichen.
- Reichen Sie Zellproben mit einer Konzentration von <2000 Zellen/ μ l (2 Millionen Zellen/ml) ein. Eine zu hohe Zellkonzentration kann zu Aggregation und Verklumpung führen, was die Herstellung idealer Einzelzellsuspensionen beeinträchtigen kann. Der Zielwert für Zellkonzentrationen liegt zwischen 1000 und 2000 Zellen/ μ l (1 Million bis 2 Millionen Zellen/ml).
- Zielwert für die Zellsuspensionen ist eine Lebensfähigkeit von $>90\%$. Eine geringere Lebensfähigkeit der Zellen verringert die Effizienz der Zellteilung und -verwertung, da nicht lebensfähige und absterbende Zellen im Allgemeinen weniger RNA enthalten, die stärker fragmentiert ist.
- Zell-Lebensfähigkeiten von $<70\%$ werden nicht für die Herstellung von Einzelzellbibliotheken verarbeitet.
- Die Zellen dürfen beim Pelletieren nicht überzentrifugiert werden. Empfohlene Zentrifugationsbedingungen sind 150 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur für größere Zellen (z. B. immortalisierte Zelllinien) und 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur für kleinere Zellen (z. B. PBMCs).
- Die empfohlene Lösung zum Waschen und Resuspendieren der Zellen ist 1xPBS (kalzium- und magnesiumfrei) mit 0,04% w/v BSA (400 μ g/ml). Bei anderen empfindlichen Zelltypen kann das Waschen und Resuspendieren in alternativen Puffern (10X validiert - DPBS & HBSS) erfolgen.