



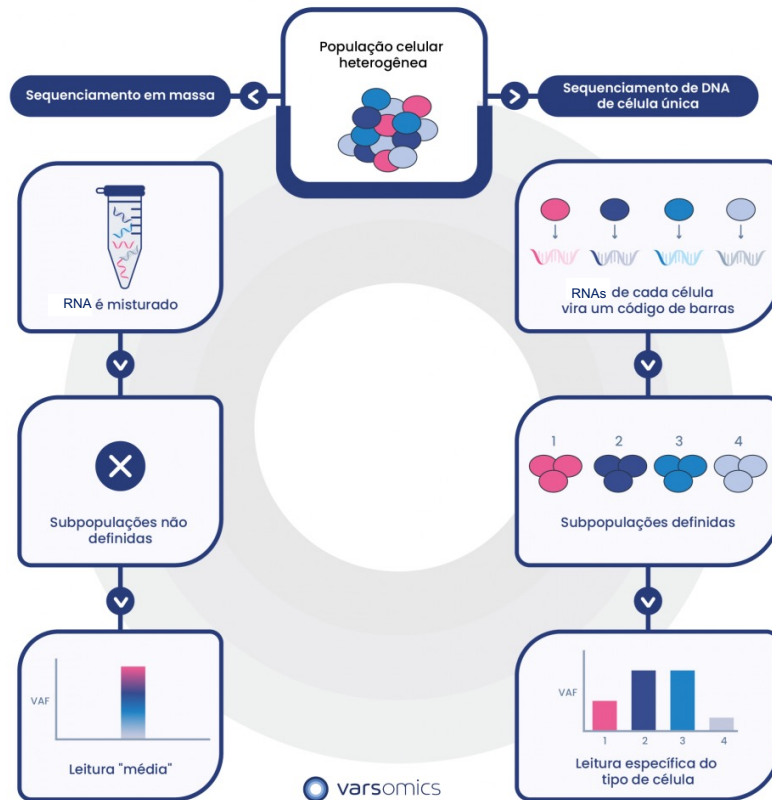
SINGLE-CELL: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Rafaella Sousa Ferraz

Bulk RNA vs single-cell

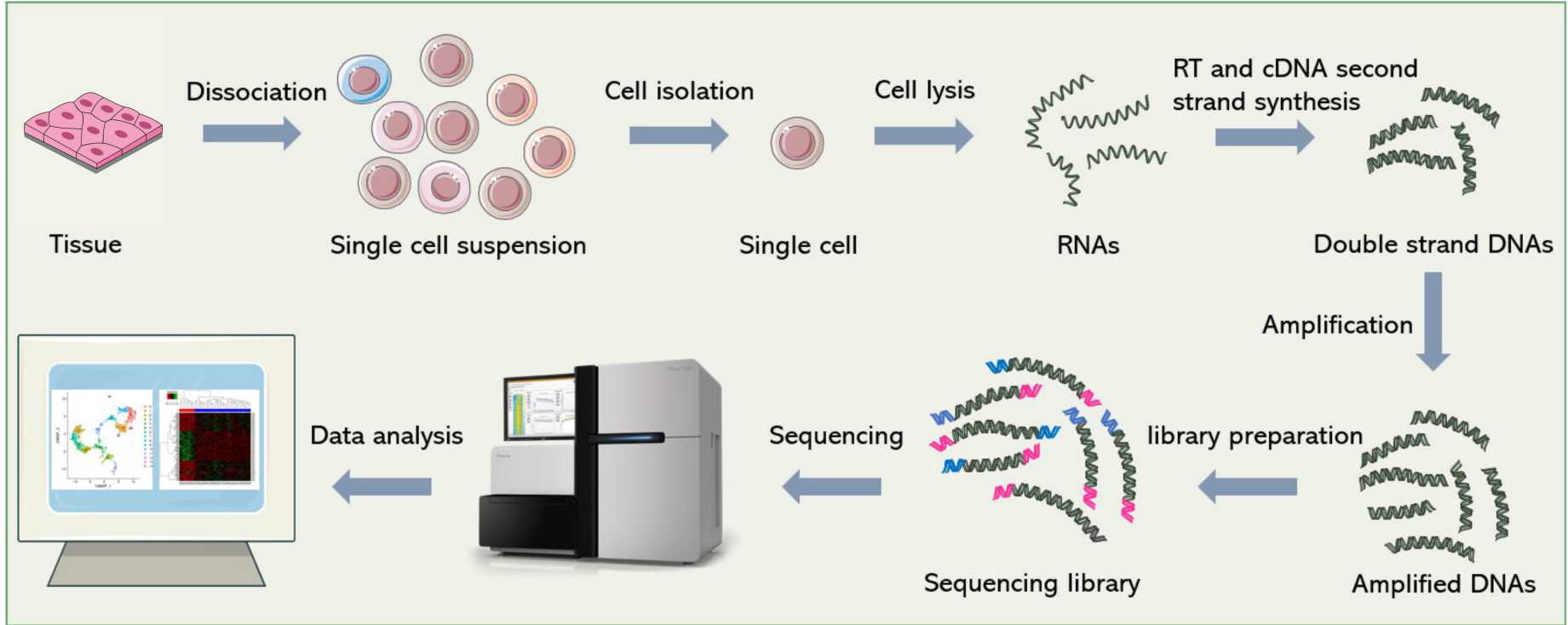
Média de expressão

- Sistema homogêneo
- Transcriptoma Comparativo
- Biomarcador



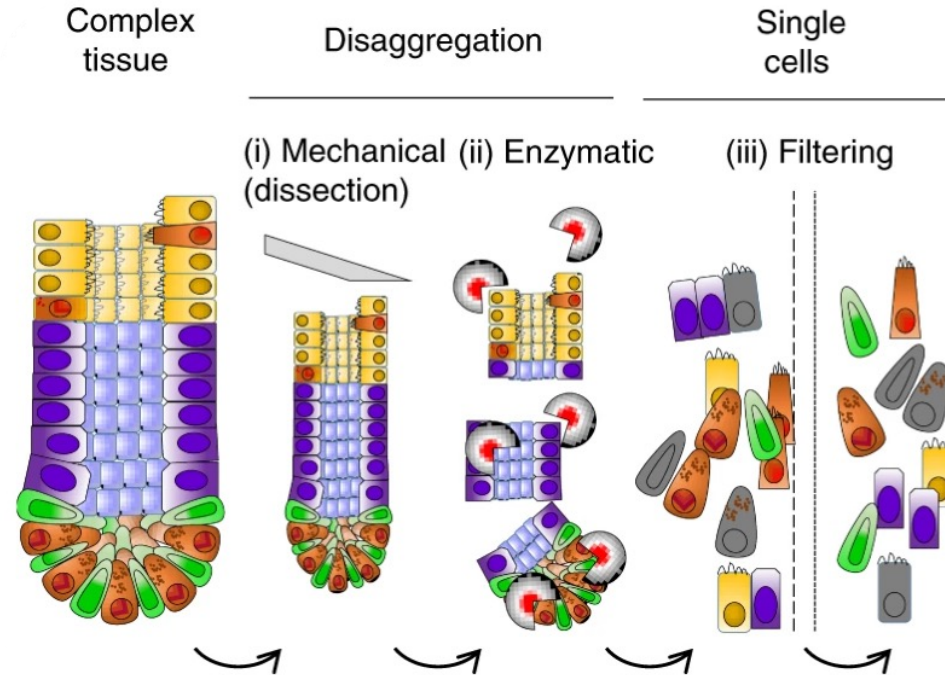
- Sistema Heterogêneo
- Identifica populações celulares

Workflow



1 Suspensão celular

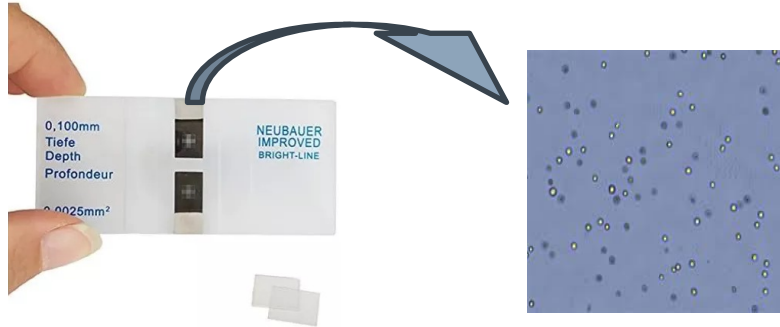
Remover aglomerados celulares
Ácidos nucleicos não celulares



1 Suspensão celular

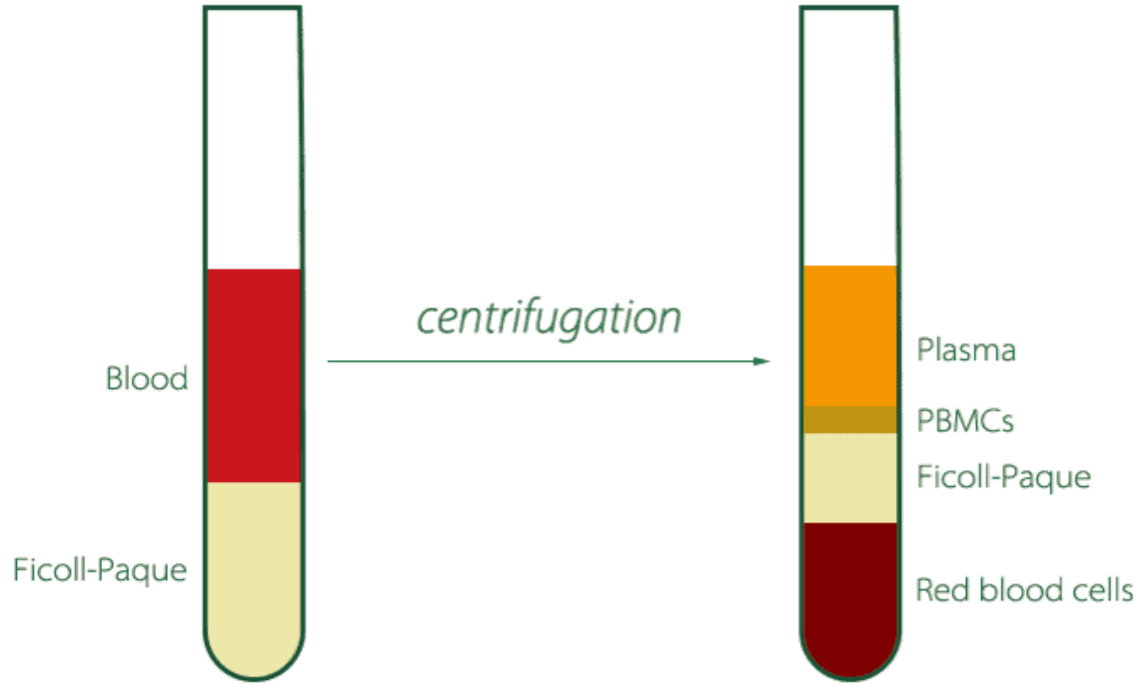


1 Suspensão celular



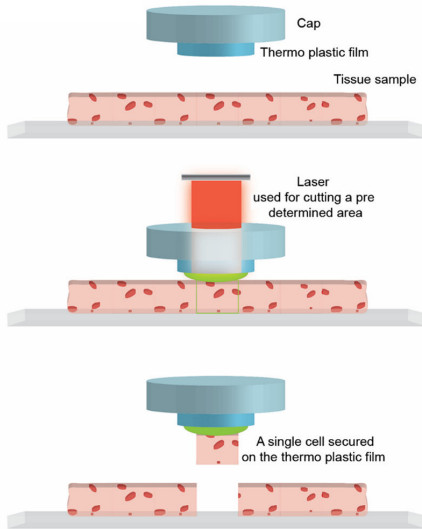
Viabilidade > 90%
Aceitável > 70%

1 Suspensão celular

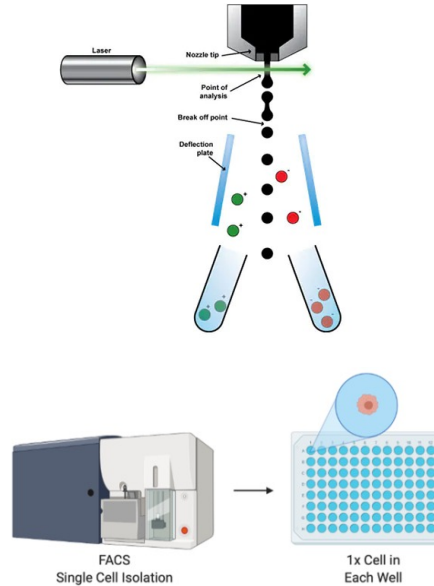


2 Isolar e capturar uma única célula

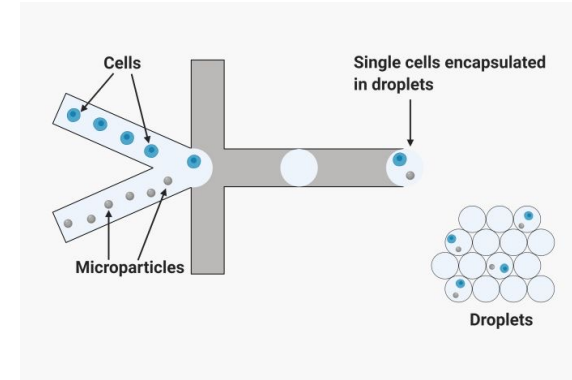
Microdissecação por laser



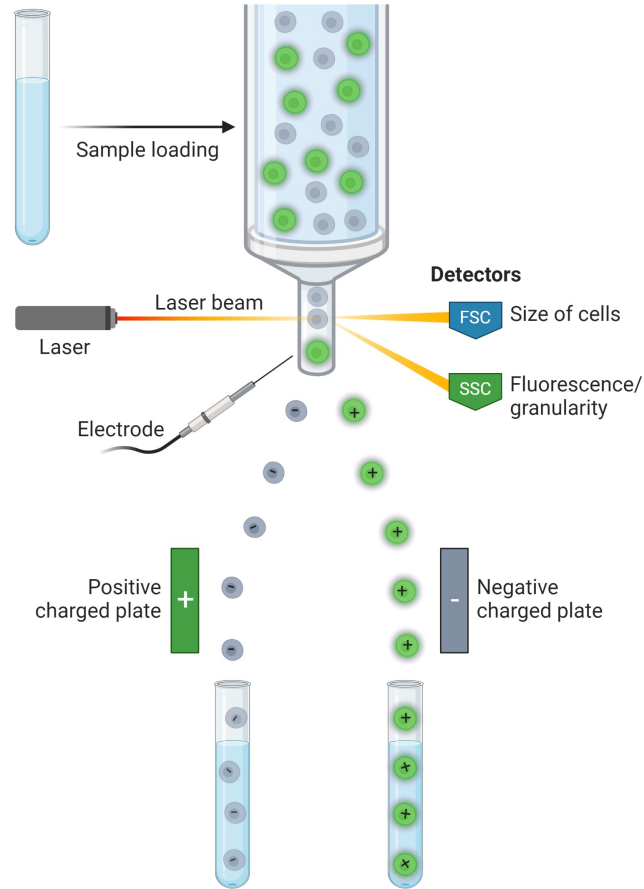
FACS



Sistema microfluídico



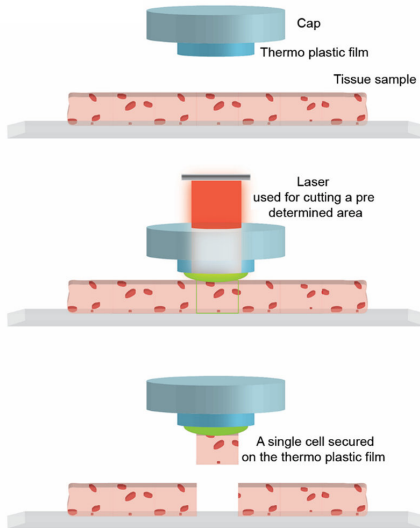
2 Isolar e capturar uma única célula



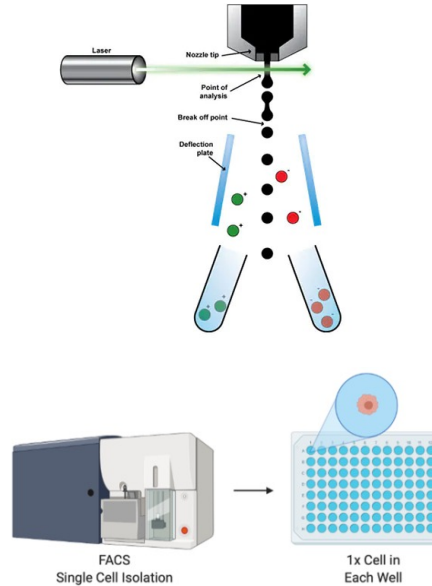
2 Isolar e capturar uma única célula

Resposta de estresse
transcricional artificial

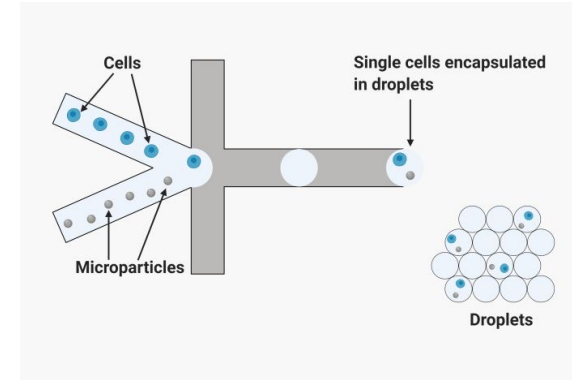
Microdissecação por laser



FACS

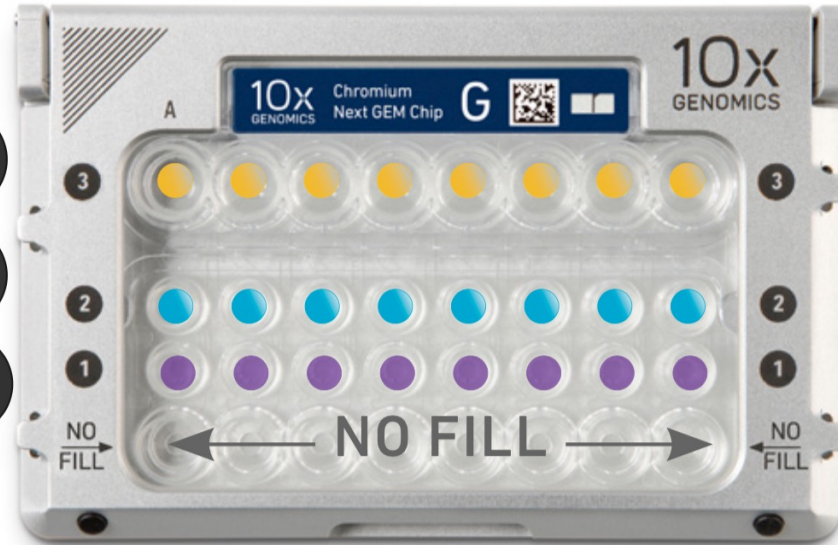


Sistema microfluídico



2 Isolar e capturar uma única célula

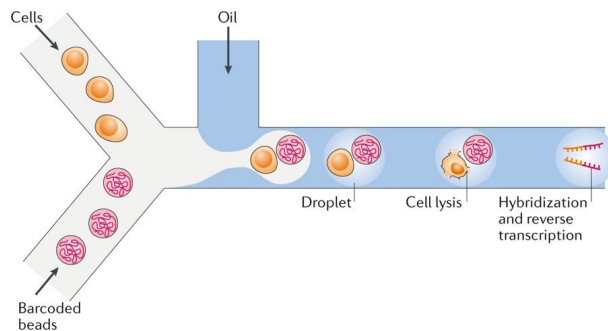
- Partitioning Oil 3
- Gel Beads 2
- Master Mix + Sample 1



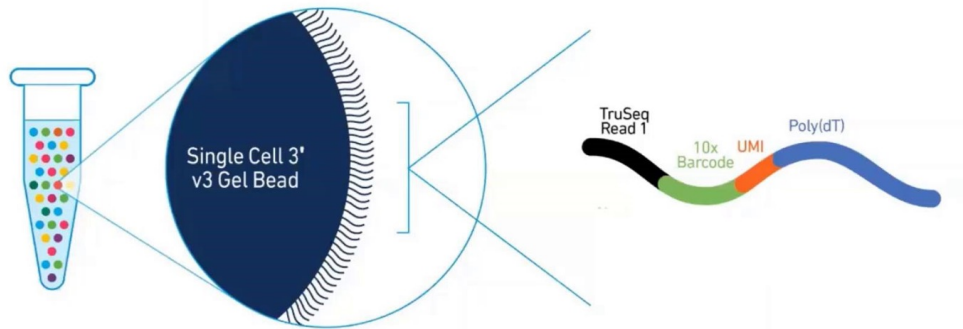
São 8 lanes (8 amostras)
Cada lane suporta de 500 a 10.000 células
Ideal: 700 a 1.200 células/uL
↑ Células ↑ Multiplets

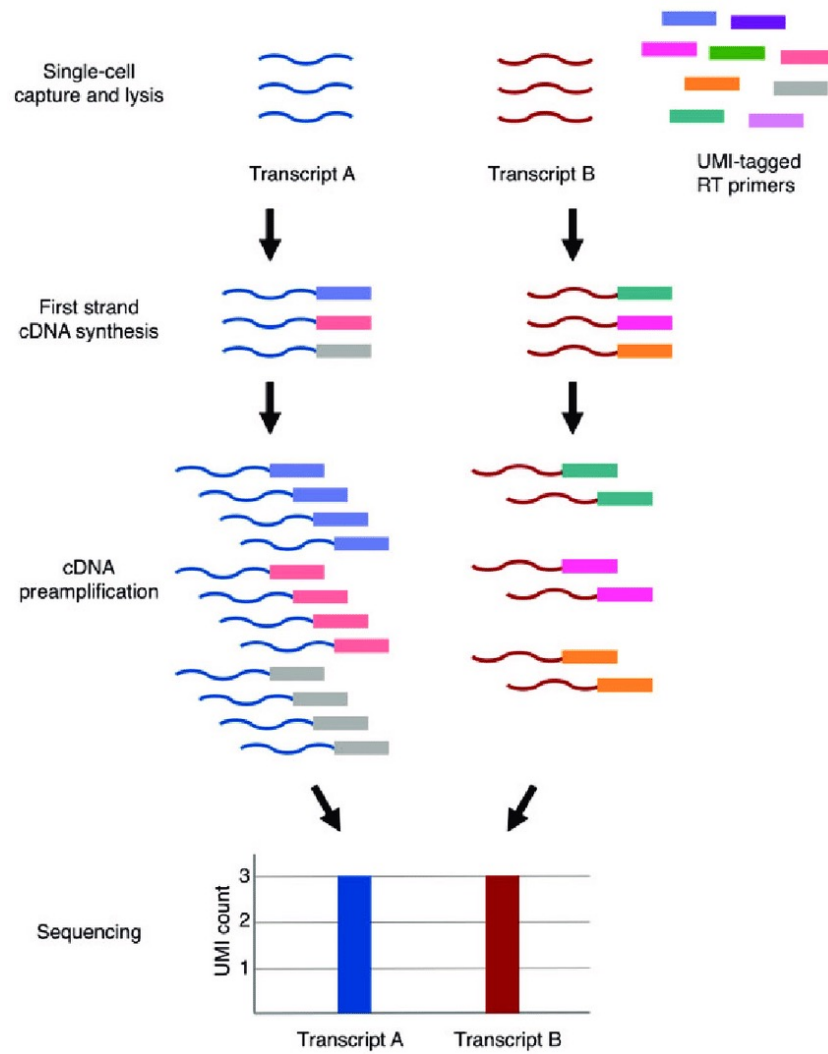
3 Lise celular

Tampão hipotônico



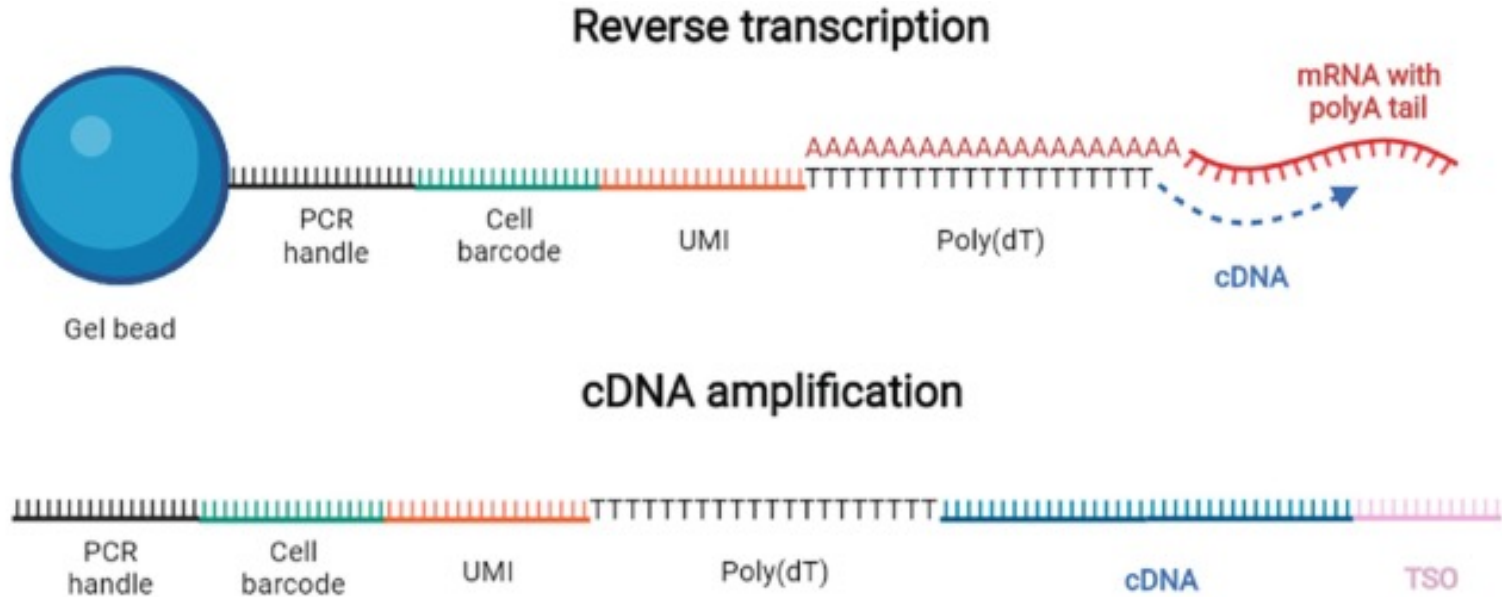
4 Transcrição reversa





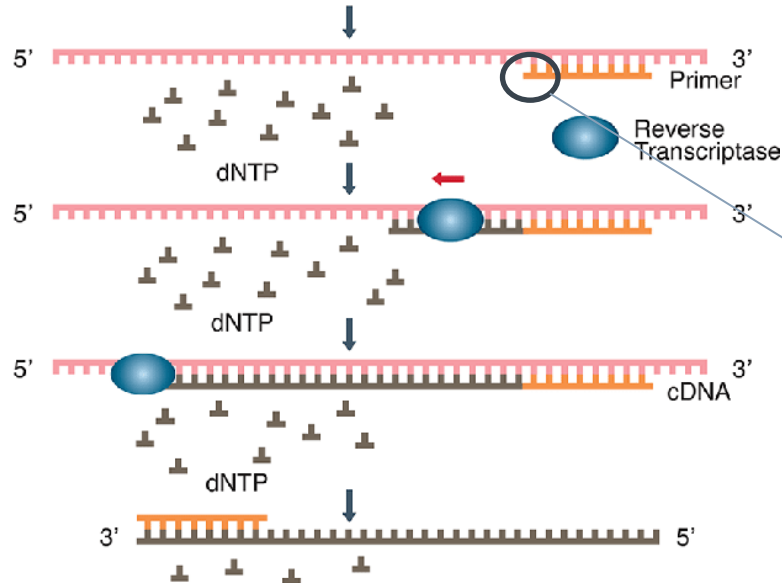
10X v2 e v3

5 Amplificação do cDNA

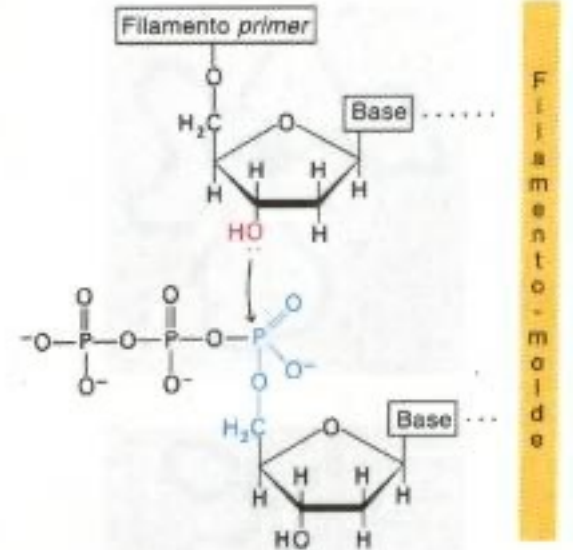


5 Amplificação do cDNA

Viral RNA 5' 3'

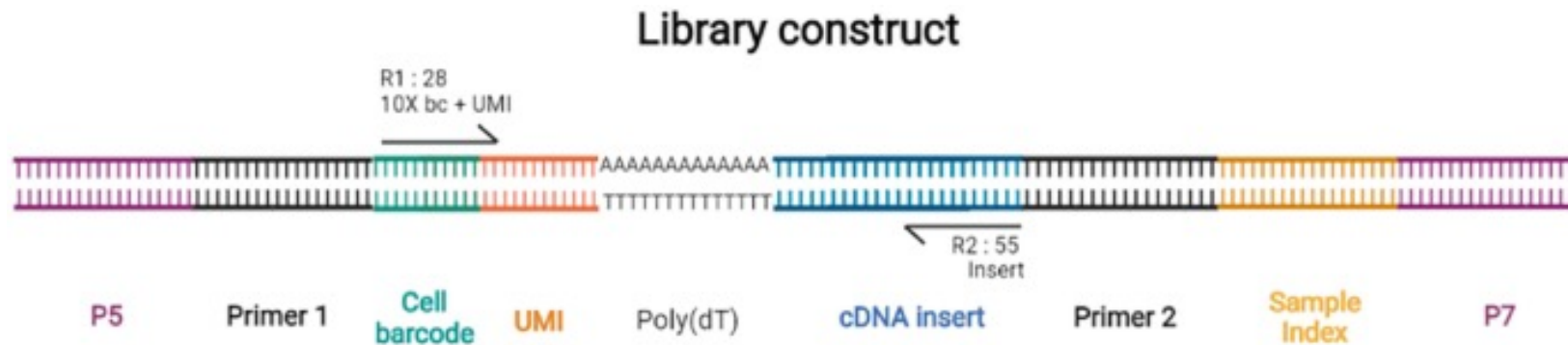


PCR amplification
with DNA polymerase

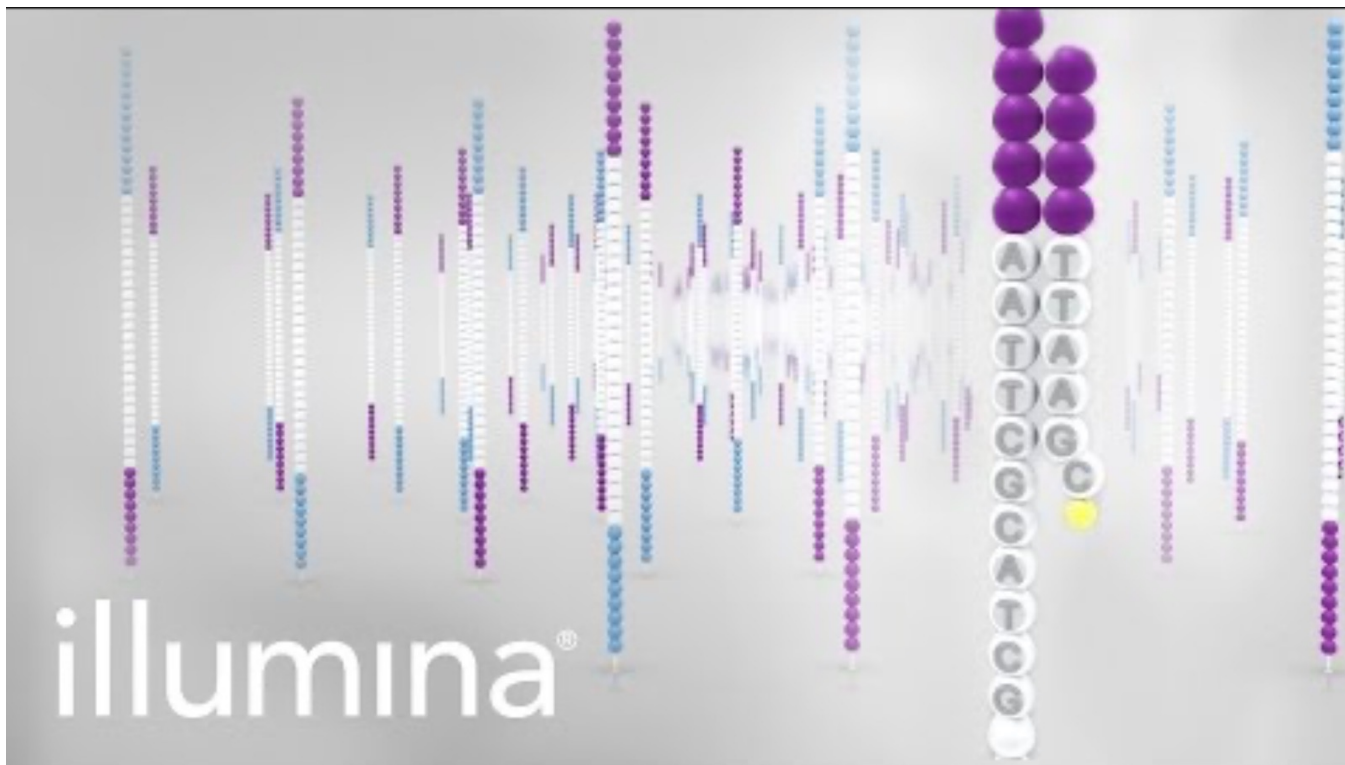


Reação de alongamento de
cadeia catalisada pelas DNA polimerases.

6 Preparação de biblioteca



6 Preparação de biblioteca



6 Preparação de biblioteca

Pontos de atenção:

- **Genes com baixa expressão/baixa quantidade de RNA**
 - Não ser capturado durante a preparação de biblioteca
 - Não ser sequenciado em número suficiente para detecção
- **Processo de captura de células e RNA**
 - Degradação → subestimação da expressão gênica
- **Variação da expressão entre células**
 - Difícil detectar genes em células com expressão baixa
- **Erro de sequenciamento**
 - Substituições ou quedas de leituras

Platforms	Isolation strategies	UMI	Amplification methods	Region
Smart-seq	FACS	×	PCR	Full-length
Smart-seq2	FACS	×	PCR	Full-length
Fluidigm C1	Micro-fluidic	×	PCR	Full-length
Drop-seq	Microdroplets	√	PCR	3' end
10x Genomics	Microdroplets	√	PCR	3' end
MATQ-seq	FACS	√	PCR	Full-length
Seq-Well	Micro-fluidic	√	PCR	3' end
CEL-seq	FACS	√	IVT	3' end
MARS-seq	FACS	√	IVT	3' end
inDrop-seq	Microdroplets	√	IVT	3' end
DNBelab C4	Microdroplets	√	PCR	3' end