

基于 DNBelab C-TaiM 4 平台 单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 送样指南

适用范围：本文件主要用于提供单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 服务相关的样品要求说明、样品的制备说明、样品运输说明以及样品包装说明。

成都基因汇科技有限公司

v202502

目录

目录.....	2
一、单细胞悬液送样建议.....	3
1. 单细胞悬液样品要求:	3
2. 样本寄送:	3
二、PBMC 样本送样建议	4
1. PBMC 样品要求:	4
2. PBMC制备:	4
3. 样本寄送:	7
三、新鲜组织送样建议.....	8
1. 新鲜样本制备（保存液保存样本）.....	8
2. 样本寄送:	10

一、单细胞悬液送样建议

1. 单细胞悬液样品要求：

1.1 细胞悬液种类：培养的细胞系、组织解离后的细胞、骨髓细胞等；

1.2 样本要求（新鲜制备或复苏后的单细胞悬液）：

1.2.1 样品总量：细胞悬浮液，一个样本细胞起始量一般不低于 1×10^6 个；

1.2.2 样品浓度：最低浓度一般不低于 1×10^3 cells/ μ L；

1.2.3 细胞活性：活细胞数在 90% 以上；

1.2.4 细胞大小：小于 40 μ m

1.2.6 单细胞悬液中无明显杂质，无细胞碎片，无细胞黏连（黏连比例小于5%），无红细胞干扰。

1.2.7 对于短时间运输（1h以内可到达实验室）的样本：细胞悬液使用PBS缓冲液（不能含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等影响酶活性的物质）保存于离心管，使用封口膜封好。PBS缓冲液应包含 0.5% BSA及RNA酶抑制剂（每1mL PBS加入5 μ L RNA酶抑制剂（40U），品牌建议为MCE）。

1.2.7 较长时间运输则需要加入4%~10%FBS溶液和DMEM培养基。

2. 样本寄送：

2.1 每例样本建议平行送样 2~3 管。使用冰袋寄送，至少3个500ml冰袋。

2.2 对于培养的细胞系样本，可常温寄送。

2.3 样本做好防撞措施，建议使用泡沫、棉花等包裹以避免运送过程中碰撞影响样本；

2.4 客户填写“[基因汇单细胞平台样品信息收集表](#)”并打印，随样本一起寄送到收集表中所示地址。

二、PBMC 样本送样建议

1. PBMC 样品要求：

1.1 PBMC种类：人PBMC、鼠PBMC等哺乳动物PBMC细胞；

1.2 样本要求（新鲜制备或复苏后的PBMC）：

1.2.1 样品总量：一个样本细胞起始量一般不低于 1×10^6 个；

1.2.2 样品浓度：最低浓度一般不低于 1×10^3 cells/ μ L；

1.2.3 细胞活性：活细胞数在 90% 以上；

1.2.4 细胞大小：小于 40 μ m；

1.2.5 细胞培养基及缓冲液中不能含有 Ca^+ 和 Mg^{2+} 等影响酶活性的物质。

1.2.6 单细胞悬液中无明显杂质，无细胞碎片，无细胞黏连（黏连比例小于5%），无红细胞干扰。

2. PBMC制备：

2.1 血液样本采集

2.1.1 采用EDTA抗凝管收集血液，血液采集量大于5ml；

2.1.2 采集好的血液应置于冰上或4°C短暂存放；

2.1.3 注意避免溶血以及凝血，在 1~2h 之内进行分离。

2.2 PBMC分离流程

（本规程以20mL全血样品作为示例。可根据实际投入血量，对规程中所加的试剂体积进行等比例调整。）

2.2.1 打开生物安全柜紫外灯，照射20min。1×PBS，全血，Ficoll室温平衡；

2.2.2 使用巴氏管将20mL新鲜抗凝血从抗凝管转入50mL离心管中；

2.2.3 100 g室温离心10 min;

2.2.4 弃掉上层血浆，可不完全吸净，避免吸走下面血细胞层，但留太多会导致血小板污染严重，影响 PBMC scRNA 文库数据

2.2.5 使用水平转子离心机，700 g，室温离心 10min ，设置升速为 7，降速为 7

2.2.6 弃掉上层血浆，避免吸走下面血细胞层

2.2.7 使用移液吸头贴管壁匀速加 1×PBS (pH 7.4) ，补至 20mL (最初血液体积)

2.2.8 使用巴氏管轻柔吹吸混匀

2.2.9 按照 Ficoll : 血细胞悬液 = 4 : 5 的比例，吸取 Ficoll 至新 50mL 离心管底部

2.2.10 使用巴氏管将血细胞稀释液缓慢匀速贴壁加至 Ficoll 层液面上，避免两层混合。

***注意：样品较多时，避免铺好血细胞-Ficoll 放置过久，血细胞稀释液会因重力在 Ficoll 层中下沉**

2.2.11 使用水平转子离心机，800 g，室温离心 25 min ，设置升速为 5，降速为 0

2.2.12 离心后，将离心管平稳取出，避免剧烈晃动。可见离心管中呈现 4 层，由上至下依次为（如图 1）：稀释液层、环状乳白色 PBMC 层、透明分离液层、红细胞层。使用巴氏管弃掉第一层稀释液层，后沿管周缓慢收集白膜层，收集至新 50mL 离心中。向收集管中缓慢加入 1×PBS，至 45mL。



图 1. PBMC 样本分层情况

2.2.13 使用水平转子离心机，500 g，室温离心 10 min ，设置升速为 8，降速为 8

2.2.14 离心后，可见微黄色沉淀，若有红细胞，会呈现红色。弃上清，可不完全吸干净。手弹离心管，使 PBMC 沉淀团松散，至肉眼观察不到明显细胞沉淀团。注意：勿使用移液吸头直接吹散沉淀团

2.2.15 再次贴壁加入 1×PBS，至最初血液体积，即 20mL，巴氏吸管轻柔吹吸混匀

2.2.16 取 10 μ L PBMC 悬液与等体积 Trypan Blue 染液混匀，进行细胞计数（如图2）。

***注：按照 10mL 全血可回收 10⁷ 数量级的PBMC 推算，该步细胞计数浓度应为 1~2 \times 10⁶ 个/mL。要求活率>90%。**

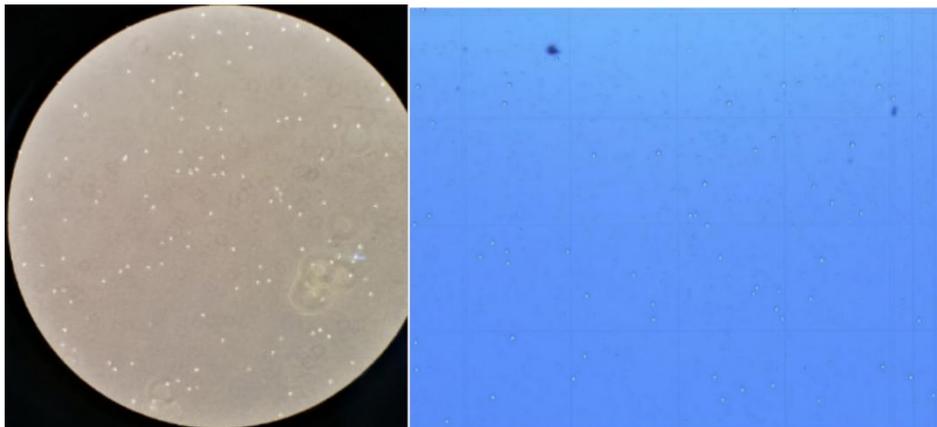


图 2. PBMC 镜检图片

***注：PBMC 的分离注意事项**

- (1) PBMC 分离规程按 20ml 血液样本为例，若其他体积血液可等比改变试剂体积用量；
- (2) 实验人员须严格佩戴口罩及一次性无粉乳胶手套，分离 PBMC 过程在生物安全柜或超净工作台中完成，使用无菌移液吸头及离心管；
- (3) 实验中所有试剂均要放于室温平衡，离心过程在可控制升降速的水平转子离心机中进行，25°C室温离心；

(4) 新鲜采集的全血，置于抗凝管中（使用的抗凝管类型不做要求），未溶血，1~2h 之内进行分离，并避免剧烈晃动导致溶血；

3. 样本寄送：

- 4.1 每例样本建议平行送样 2~3 管。冷冻样品通过干冰运输，干冰量以6kg/天计算；
- 4.2 PBMC样本需在5-6h内寄送到达基因汇单细胞实验室。
- 4.3 样本做好防撞措施，建议使用泡沫、棉花等包裹以避免运送过程中碰撞影响样本；
- 4.4 客户填写“[基因汇单细胞平台样品信息收集表](#)”并打印，随样本一起寄送到收集表中所示地址。

三、新鲜组织送样建议

1. 新鲜样本制备（保存液保存样本）

1.1 准备工作：

1.1.1 试剂：**清洗液**（无菌PBS，可替代为0.9%无菌生理盐水，建议使用无菌PBS）、**组织保存液**（如美天旎组织保存液miltenyi#130-100-008，可替代为无菌PBS）。

1.1.2 耗材（客户自备）：组织保存管（冻存管，确认完整无裂痕）、一次性无菌剪刀或者一次性刀片或者无菌手术刀、无菌镊子、封口膜、无菌培养皿。

1.1.3 闪送所需物料（客户自备）：冰袋（提前将冰袋放于-20°C冰箱冻住）、泡沫或棉花、自封袋/样品袋、泡沫盒。

1.1.4 试剂耗材，均提前放入2-8°C冰箱预冷，用时取出放置于冰上；颠倒混匀**清洗液**和**组织保存液**，并确保管内无冰块。

1.2 2ml冻存管中预先加入1ml预冷的**组织保存液**，放于冰上；

1.3 取样：手术切割下来组织后，立即于无菌条件下取目标组织。取样时注意事项：

- a) 取样时用无菌剪刀或手术刀进行取样，**切勿使用电刀**，会引起目标组织灼伤，因此应避免使用电刀取样。
- b) 取样组织不能有坏死。
- c) 不能取靠近电刀灼烧部位的组织。
- d) 取样组织上不能有血凝块。

1.4 新鲜组织离体30min内浸入装有预冷**清洗液**的无菌培养皿中（无菌培养皿至于冰上），并尽快漂洗两遍，将粘液和血液冲洗干净；若条件允许，剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型。（如果是胃癌或者胰腺癌等含酶量比较高的组织，用**清洗液**清洗2~3 遍后用**组织保存液**清洗一遍，立即放入预冷的**组织保存液**中）。

1.5 用无菌镊子取出漂洗干净的组织，取约黄豆粒大小组织（由于不同组织相同体积的重量差异较大，0.1-1g），用剪刀或者手术刀片剪碎成小块（约3*3*3mm大小最佳），放于冻存管中，使组织碎块完全浸于**组织保护液**中。每管可以收集5-6小块组织，重量约300-500mg；建议保存2-3管。

1.6 冻存管中保护液加满，尽量不留空隙，盖紧盖子，用封口膜封口（如图3）。

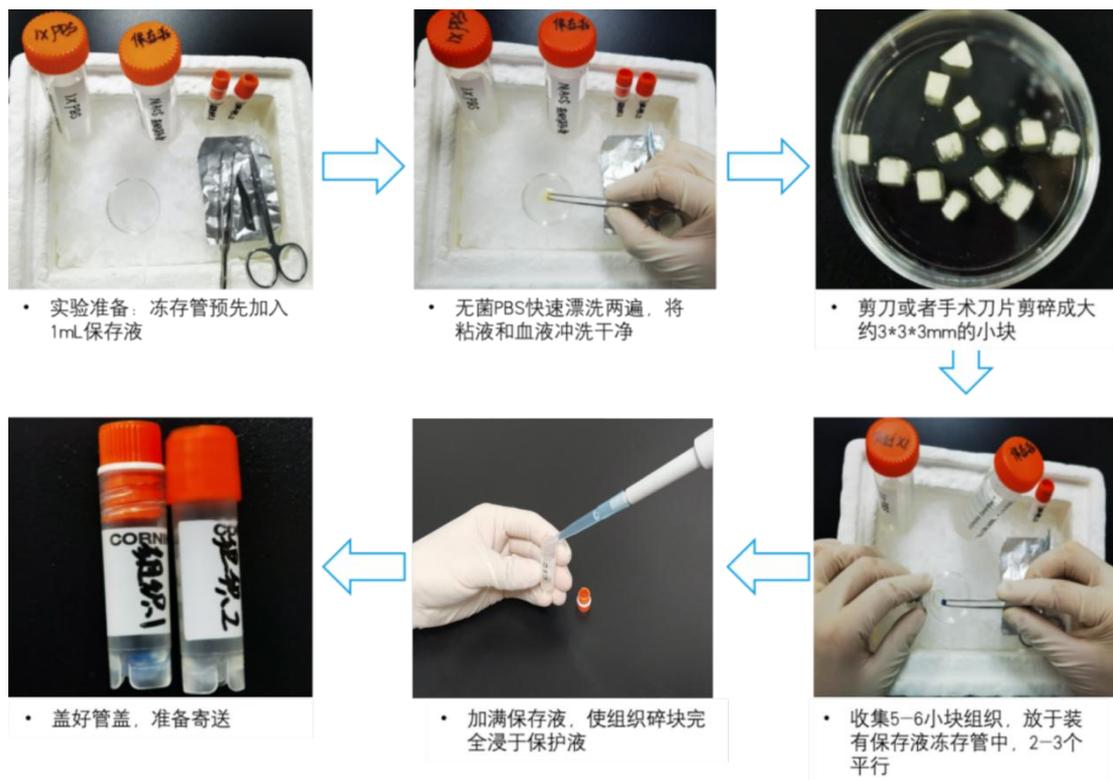


图3 新鲜样本制备方法流程图

1.7 标记样本：用marker笔在组织保存管上标记样本编号（字母、数字或下划线，不超过8位，首位是字母，下划线位于中间，例如A2025_19），标记要清晰、准确、完整、可识别。

1.8 将样本置于4℃冰箱暂存，待全部采集完后一起打包寄送。

*注：

- (1) 部分样本如：软骨、肌腱等样本细胞含量少，建议多取几管保存；
- (2) 组织保存液的体积应不小于采集样本体积的5倍，日常存放于4℃冰箱保存；严禁液氮速冻或放在-20℃、-80℃冰箱中保存。

2. 样本寄送：

2.1 每例样本建议平行送样2~3管；

2.2 使用泡沫（或棉花等）包裹装有样本的封装袋并用胶带密封；该操作可以避免运送过程中碰撞影响样本；同时可避免冰袋直接接触样本，导致样本局部温度过低，细胞冻融、破裂，最终导致实验失败。

2.3 将冰袋和包裹好的样本放在准备好的运输箱中，用胶带密封运输箱。请根据运输时间确认冰袋的数量，确保样本运输到达目的地时，样本温度仍在2-8℃。

2.4 客户填写“[基因汇单细胞平台样品信息收集表](#)”并打印，随样本一起寄送到收集表中所示地址，如图4。



图4 新鲜样本寄送方法流程图