

基于 DNBelab C-TaiM 4 平台单细胞测序 送样指南

成都基因汇科技有限公司

v202501

目录

| | |
|---------------------|---|
| 目录..... | 2 |
| 目的..... | 3 |
| 适用范围..... | 3 |
| 一、 细胞悬液送样建议..... | 3 |
| 1. 单细胞悬液样品要求: | 3 |
| 2. 细胞悬液冻存规程: | 3 |
| 3. 样本寄送: | 4 |
| 二、 PBMC 样本送样建议..... | 4 |
| 1. PBMC 样品要求: | 4 |
| 2. PBMC 制备: | 5 |
| 3. PBMC 冻存规程: | 7 |
| 4. 样本寄送: | 8 |

目的

向合作伙伴提供单细胞实验样品的参考标准及其相关注意事项，确保合作伙伴提供合格的样品在经过标准生产实验后能够得出满足要求的高质量数据，并使合作伙伴提供的样品得到有效的保护。

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。

一、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、组织解离细胞、骨髓细胞等；

1.2 样本要求（样本梯度冻存前要求）：

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

1.2.5 细胞培养基及缓冲液中不能含有 Ca^{2+} 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。

*注：样本需进行冻存、复苏等过程，细胞活率和总量会有损耗。

2. 细胞悬液冻存规程：

2.1 配制冻存液：90% FBS+10% DMSO。

- 2.2 已知总细胞量的细胞悬液（活率> 90%），300 g，5 min 室温离心，小心弃上清。
- 2.3 轻弹收集管使细胞悬液沉淀松散至看不到明显细胞团块（避免使用吸头吹散沉淀）。
- 2.4 加适量冻存液，可轻弹使细胞悬液分散，或使用扩口枪头轻柔吹吸混匀，至细胞悬液细胞终浓度 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL，每500 μ L分装至冻存管中。
- 2.5 冻存管置于程序降温盒中，放进 -80°C 冰箱冻存不少于 8h。2-3 天内转移储存于液氮中，建议冻存 2 月之内进行单细胞实验。

***注：**

- (1) 若无液氮储存条件，建议 -80°C 冰箱储存 1 周内送样。
- (2) 3 天后可进行复苏测试，使用台盼蓝检测活率（细胞活率仍 $>85\%$ ，表明冻存过程符合要求，达到送样要求）。
- (3) 若无程序降温盒，可改用手动程序降温冻存法。具体操作方法为：将以上装有组织和冻存液的冻存管在室温放置 3 min，使 DMSO 充分渗入到细胞内。接着将冻存管放在 4°C 冰箱中 30 min，再将冻存管置于 -20°C 冰箱内 1 h，最后放入 -80°C 冰箱过夜（大于 8h）。长时间保存需转至液氮中（不超过两个月为宜，越短越好）。

3. 样本寄送：

- 3.1 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6 kg/天计算；
- 3.2 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；
- 3.3 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；

1.2 样本要求（样本梯度冻存前要求）：

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。

*注：样本需进行冻存、复苏等过程，细胞活率和总量会有损耗。

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。实际采集的血样可根据实际投入量，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 使用水平转子离心机，100 g，室温离心 10 min，设置升速为 7，降速为 2

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 1~2×10⁶ 个/mL。要求活率>90%。**

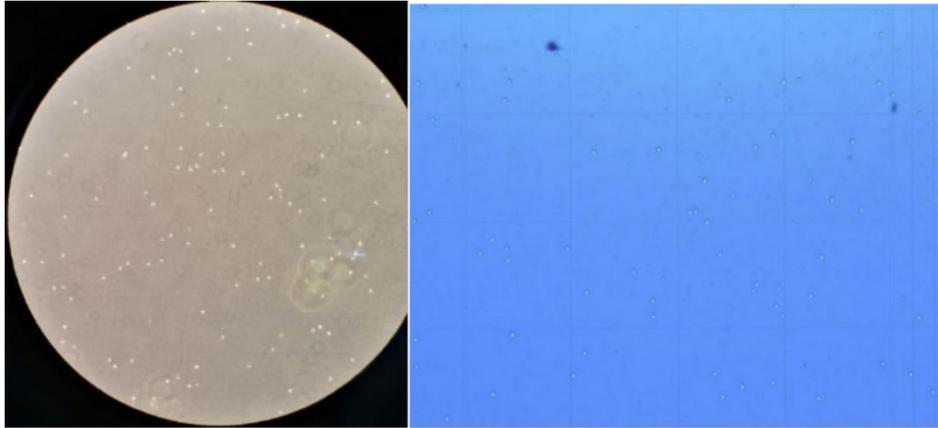


图 2. PBMC 镜检图片

***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. PBMC 冻存规程：

3.1 配制冻存液：90% FBS+10% DMSO。

3.2 已知总细胞量的 PBMC（活率>90%），500 g，10min 室温离心，小心弃上清。

3.3 轻弹收集管使 PBMC 沉淀松散至看不到明显细胞团块（避免使用吸头吹散沉淀）。

3.4 加适量冻存液，可轻弹使 PBMC 分散，或使用扩口枪头轻柔吹吸混匀，至 PBMC 细胞终浓度 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL，每 200-500 μ L 分装至冻存管中。

3.5 冻存管置于程序降温盒中，放进-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存不少于 8h。2-3 天内转移储存于液氮中，建议冻存 2 月之内进行单细胞实验。

***注：**

(1) 若无液氮储存条件，建议-80 $^{\circ}$ C冰箱储存 1 周内送样；

(2) 3 天后可进行复苏测试，使用台盼蓝检测活率（细胞活率仍>85%，表明冻存过程符合要求，达到送样要求）；

(3) 若无程序降温盒，可改用手动程序降温冻存法。具体操作方法为：将以上装有组织和冻存液的冻存管在室温放置 3 min，使 DMSO 充分渗入到细胞内。接着将冻存管放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 30min，再将冻存管置于-20 $^{\circ}$ C冰箱内 1h，最后放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱过夜（大于 8h）。长时间保存需转至液氮中（不超过两个月为宜，越短越好）。

4. 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 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；

4.3 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。