

---

# 云生物

## 单细胞样本制备和运输指南

### ● 10x Genomics 单细胞转录组平台

- 单细胞转录组
- 单细胞空间转录组
- 单细胞 ATAC
- 单细胞 V(D)J (Human, Mouse)

### ● 物种范围

- 人 / 小鼠
- 可承接的样本包括：新鲜组织、新鲜细胞系、冻存细胞系以及外周血 PBMC 细胞。对于特殊样本，例如血小板、转染细胞、分选细胞、活性低于 80 %等，需要客户充分了解其中的风险。

### ● 样本要求

- 细胞总量：细胞总数大于  $5 \times 10^5$  个
- 样品浓度：  $7 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^6$  cells/mL
- 细胞活率：大于 80 %
- 细胞大小：小于  $40 \mu\text{m}$
- 细胞培养基及缓冲液不能含有  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  等影响酶活性的物质
- 组织需解离成单细胞悬液，植物细胞需制成原生质体
- 冷冻包埋的 OCT 组织，OCT 冰冻切片的 RNA 质检 RIN > 7.0

# 细胞系

## Single Cell Gene Expression/ Single Cell ATAC

从培养细胞系中制备单细胞悬液用于单细胞 RNA 测序，关键是要获得分离良好的细胞悬液、无细胞碎片、极少细胞团块，且细胞活力高 (>80%)。了解所研究细胞的大小范围也很重要，细胞大小通常与细胞表达的转录本数量有关。

**送样建议 1：细胞冻存后干冰运输**

**送样建议 2：培养瓶常温运输**

### 细胞冻存：

贴壁细胞经胰酶消化后，低速离心收集，清洗 1-2 次后，用不含钙镁离子的 PBS 缓冲液重悬，并通过自动计数器计算细胞悬液浓度和活率。若单细胞悬液合格，则可根据送样量  $2 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  个细胞总量，进行细胞冻存。每  $1 \times 10^6$  个细胞用 1ml 4°C 冻存液 (DMEM+20%FBS+10%DMSO) 保存，建议每个冻存管中分装 1ml，每个样本送 2 管。使用程序降温盒冻存。冻存完毕后转移至液氮中长期储存、并用干冰运输。

### 细胞复苏：

液氮中取出冻存管，立即于 37°C 水浴中快速解冻 (1-2min)。将细胞悬液转入生长培养基中摇匀后，清洗细胞 1-2 次，用不含钙镁离子的 PBS 缓冲液重悬，并通过自动计数器计算细胞悬液浓度和活率。

### 注意事项：

- 实验所需的细胞数量取决于样本预期的细胞异质性、样本中的细胞数、细胞亚群预期的最低频率，以及数据分析所需的每种细胞类型的最低数量。

# 全血

## Single Cell Gene Expression/ Single Cell ATAC/ Single Cell Immune Profiling

**送样建议 1: 全血分离得到 PBMC, 细胞冻存后干冰运输**

**送样建议 2: 抗凝管收集全血, 2 小时内室温运输**

### hPBMC 分离 (淋巴细胞分离液):

抗凝管采集全血 (不可用肝素抗凝, 肝素会影响 PCR 酶活, 抑制下游 PCR 反应), 采集后颠倒混匀。HBSS 稀释全血, 用淋巴细胞分离液离心分离 PBMC, 吸取单个核细胞层 (白膜层, 薄)。细胞经离心清洗后计数, 以备按照每管  $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7 / \text{ml}$  细胞浓度进行冻存。

### hPBMC 分离 (BD CPT 真空采血管):

BD CPT 真空采血管, 一种用于从全血中分离单核细胞的全封闭系统, 其细胞分离是在一次采血管中进行的。无菌采血管中包含柠檬酸钠抗凝缓冲液, 液体密度介质和惰性凝胶屏障。在离心过程中, 凝胶在血浆中的单核细胞与红细胞和粒细胞之间形成物理屏障。该 PBMC 分离方法不影响单个免疫细胞亚群的后续回收率和纯度, 而且不影响其基因表达谱。

### hPBMC 冻存:

取  $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  个细胞总量, 进行细胞冻存。每  $1 \times 10^6$  个细胞用 1ml  $4^\circ\text{C}$  冻存液 (DMEM+20%FBS+10%DMSO) 保存, 建议每个冻存管中分装 1ml, 每个样本送 2 管。使用程序降温盒冻存。冻存完毕后转移至液氮中长期储存、并用干冰运输。

### 注意事项:

- 为了最大限度地减少转录组的变化, 在对细胞进行清洗和计数后, 单细胞悬液应当保存于冰上, 直至用于后续的上机和文库制备步骤。在理想状况下, 一旦制备好样本, 应当在 30 分钟内将其用于下游步骤。
- 若单细胞悬液制备完成后过长时间未用, 需重新计数后判定是否可用。
- 细胞冻存前必须先判断单细胞悬液是否符合质控要求, 不符合的不建议冻存送样。

# 组织

## Single Cell Gene Expression/ Single Cell ATAC

单细胞悬液制备方案根据组织来源和细胞类型而变化。每种组织类型都是独特的，必须在开始任何单细胞实验之前优化样本制备。为了获得活力高的细胞并尽量避免细胞死亡和裂解，需要根据特定的样本类型来优化细胞解离的操作。

**送样建议 1：现场新鲜组织解离得到单细胞悬液；质检后直接开展 10x 单细胞实验**

**送样建议 2：现场新鲜组织解离得到单细胞悬液；细胞冻存后干冰运输（需要客户充分了解其中的风险）**

**送样建议 3：新鲜组织冻存后干冰运输；由公司制备单细胞悬液（需要客户充分了解其中的风险）**

### 低温运输（短途）：

商品化试剂例如 Miltenyi Biotec 的 MACS Tissue Storage Solution。从动物模型上取得的新鲜组织样本，先用适量 1×PBS 冲洗，仅保留用于制备单细胞悬液的目标组织；直接将样本转移到预冷的 MACS 组织保存液( $<8^{\circ}\text{C}$ )；在  $2-8^{\circ}\text{C}$  条件下保存和运输样本。可从保存液中移出样本，并直接应用于下游实验：如单细胞悬液制备。

### 冷冻运输（长途）：

冻存液配方，以及冻存方式可参考此文献（仅供参考）：Single-cell transcriptome conservation in cryopreserved cells and tissues。从动物模型上取得的新鲜组织样本，先用适量 1×PBS 冲洗，仅保留用于制备单细胞悬液的目标组织；将组织块转移至含 1~2 mL 冻存液（90% FBS + 10% DMSO）的冻存管中，轻柔混匀；将冻存管放入梯度降温盒内， $-80^{\circ}\text{C}$  过夜；第二天取出冻存管，可于液氮罐中长期保存，并用干冰运输。

### 注意事项：

- 在分离或组织解离后快速处理样本的能力对维持细胞完整性和保留每个细胞的转录组至关重要。请注意，任何样本操作都有可能对基因表达谱、细胞状态或细胞活力产生不利影响，并在研究中引入偏好性。
- 临床组织样本，取材后先用适量 1×PBS 冲洗，仅保留用于制备单细胞悬液的目标组织，将样本转移至 DMEM 溶液中浸没，样本用冰袋保存，2 小时内开展组织解离实验。
- 死细胞会裂解，并向周围环境释放 RNA；这种游离 RNA 会造成检测的背景噪音，并影响单细胞数据的质量。在处理组织时，必须在第一次文库制备之前很好地优化解离方案，以确保达到最佳质量。

# 组织（空间转录组）

## Visium Spatial Gene Expression

Visium 空间基因表达研究可以检测完整组织切片中的总 mRNA，通过分析同一组织切片的组织学和 mRNA 图谱，绘制出基因活动发生的位置、发现新的组织标志物。在开展基因表达研究时不再需要解离样本。与大多数组织类型兼容，包括小鼠、大鼠和人的多种组织类型：如脑、肿瘤、肾脏、肠、心脏等。

### 送样建议：新鲜组织冷冻包埋后干冰运输

#### 组织冷冻（异戊烷/液氮）：

现有空间转录组研究平台是基于新鲜冰冻样本进行研究，所以在样本冻存前至少 10 分钟，将异戊烷和液氮浴准备好（之所以用异戊烷而不直接用液氮进行速冻，是因为液氮沸点比较低，直接液氮处理可能在沸腾过程中使组织周围形成空穴，导致不同区域降温不同步而改变内部形态，甚至组织碎裂）。然后用镊子或者刮刀将新鲜组织转移到异戊烷中，使组织完全浸没至少 1 分钟。冷冻后，可用镊子或者刮刀将组织转移到密封的预冷容器或者冻存管中， $-80^{\circ}\text{C}$  储存，或者进行 OCT 包埋。

#### OCT 包埋：

OCT 包埋是用来为后续切片制作做准备。将预冷好的 OCT 填充入冷冻模具的底部（可做好标记，以确认组织方向），然后用镊子迅速将冰冻好的组织放入，并用 OCT 覆盖组织，使之完全包埋住。该过程应避免产生气泡。然后立即将冷冻磨具转移到粉末状干冰上。当 OCT 变得完全不透明，包埋成功。对组织进行修理，去掉多余部分，留下需要的组织块。最后，包埋好的组织块可进行干冰上运输至  $-80^{\circ}\text{C}$  进行储存。

#### 注意事项：

- 手术取下组织，需在30min之内冷冻，时间过长RNA降解严重。
- OCT冷冻包埋的组织切片，取10片（10 $\mu\text{m}$ 厚）用于RNA抽提，并用Agilent TapeStation质检；空间转录组测序建议样本RIN值 $\geq 7.0$ 。
- 冻存/包埋组织、冰冻切片在 $-80^{\circ}\text{C}$ 至多保存1周。
- 目前Visium针对胰脏、皮肤、骨头的样本需要进一步摸索实验条件。