

单细胞送样指南



影子基因
YINGZI GENE

目录

	一、适用范围	1
	二、送样前准备	1
	三、注意事项	2
	四、样本类型	2
	4.1 冻存样本	2
	4.2 单细胞悬液样本	5
	4.3 新鲜组织样本	5
	4.4 血液样本	6
	4.5 其他液体样品	7
	4.6 骨髓类样本	7
	4.7 培养类样本	7
	五、风险说明	
	5.1 细胞类型	8
	5.2 提核样本前期风险提示	8
	5.3 细胞活率低	9
	5.4 结团率高	9
	5.5 活细胞浓度不适宜	9
	5.6 细胞直径	9



在进行单细胞送样时，确保样本的新鲜度与活性，这是获得高质量单细胞数据的基础。样本采集后应尽快处理，避免长时间存放导致细胞死亡或状态改变。在送样前，对样本进行详细的标记，包括样本类型、采集时间、处理条件等信息，以便接收方准确进行后续实验。

一、适用范围

本指南适用于送测单细胞测序相关样本（包括冻存组织、单细胞悬液、组织样本、血液样本及其他液体样品等）的科研人员，旨在规范送样流程、保障样本质量，确保后续实验（如单细胞（核）测序、单细胞 ATAC-seq 等）顺利开展。

二、送样前准备

1. 样本信息登记：填写《单细胞样本送样申请表》，准确填写样本名称、样本类型、样本来源（如患者信息、动物品系、细胞系名称）、实验目的（如单细胞(核)转录组测序、单细胞 ATAC 测序）、样本数量、制备时间等信息，签字确认后随样本一同提交。

2. 样本质量自检：

① 细胞悬液：检测活细胞比例，显微镜下观察细胞是否聚集，确保符合浓度要求。

② 组织样本：肉眼观察组织是否新鲜、有无坏死，确认重量/尺寸达标。

③ 血液样本：检查抗凝管是否漏液，管子是否过期，全血是否出现溶血、凝固（若凝固则样本作废）。

3. 沟通确认：送样前 1-2 天与实验室对接人联系，确认接收时间、实验室地址及特殊要求（如是否需提前准备特定试剂）。

4. 包装规范：

样本管（离心管/冻存管）需放入密封袋，袋内放置吸水纸（防止漏液污染），再放入泡沫盒。

5. 运输规范:

① 4℃冷藏样本: 运输时间 \leq 24 小时 (细胞悬液 \leq 4 小时, 全血 \leq 24 小时), 泡沫盒内放置冰袋 (用纱布, 卫生纸等包裹, 避免样本直接接触冰袋导致冻伤);。

② 干冰冷冻样本: 运输时间 \leq 72 小时, 确保干冰未完全升华, 泡沫盒内放入足量干冰 (按每 24 小时需 5-10 kg 干冰计算), 密封盒盖, 盒身标注“生物样本+干冰运输+轻拿轻放”。

三、注意事项

1. 所有样本取样过程需严格遵循无菌操作, 避免细菌、真菌污染等其他外源污染 (污染样本将直接作废, 不予实验)。

2. 样本管标注信息需清晰、完整, 避免使用易褪色的笔 (建议用马克笔), 冻存管需使用耐低温的标签。

3. 运输过程中需遵守生物样本运输相关规定, 若为人类来源样本, 需提供伦理审批相关文件 (如适用)。

注: 本指南可根据实验室具体实验平台、技术流程进行调整, 送样前请以实验室最新版本为准。

四、样本类型

4.1 冻存样本

4.1.1 取样类型

1. 冻存细胞
2. 冻存组织

4.1.2 冻存细胞前处理

1. 细胞收集：去除红细胞后的细胞悬液进行细胞计数，300 G，4℃，10 min 离心收集细胞沉淀。
2. 重悬：去除上清，细胞冻存液重悬。（按冻存液推荐浓度选择合适体积冻存细胞）
3. 梯度冻存：细胞若有保存需求，收集好细胞后，加入细胞冻存液，重悬后放入预冷的异丙醇降温盒，直接放入-80℃； 或使用以下步骤：4℃、-20℃各储存半个小时，-80℃储存 24 小时梯度降温；最后转入液氮保存。

4.1.3 冻存组织前处理（后续用于细胞核提取实验）

1. 在取样时（尤其是病变组织）尽量避免取到坏死、钙化、硬化、纤维化的部位，减少杂质引入。
2. 如手术为电刀切割组织，去除因与电刀接触的焦黑坏死组织。
3. 确保目标组织术时无冰冻低温受损。
4. 在取样后可对组织进行修剪，尽可能快速去除非目标部位，减小非目标区域细胞群干扰，用无菌纸巾或纱布擦拭掉组织上的血液与残留的液体水分，防止冻存时组织内有冰晶。
5. 如是高龄动物标本请尽快进行修剪取样步骤。
6. 实体组织量送样量 300 mg 以上，切成 100 mg 大小，防止后续组织速冻时因太厚导致中间部位冻的不实造成坏死。准备多份组织便于后续进行 RNA 质检（RNA 质检使用 1 份组织，提核最少使用 1 份组织，不同样本的提核实验条件不同，可能需要优化，建议多备样本）。
7. 穿刺样本建议 2 条以上，可能细胞核量较少不满足上机要求。

注：冰冻提核组织样本考虑到无法从解离细胞活率等方面评判样本质量，同时考虑到年限影响，需要取约 100 mg 大小用于提取组织 RNA，通过 RNA 质检判断组织是否存在 RNA 降解情况。

4.1.4 冻存样本保存及送样注意事项

1. 冻存细胞：使用细胞冻存液梯度冻存，样本复苏后活性偏低，一般需去死细胞，如果冻存细胞为阳性分选（例如 CD45 +）样本需提前备注，这种情况不能进行死细胞去除操作；

2. 冻存组织（液氮速冻）：建议使用冻存管（密封保存，防止外源 RNA 酶影响）进行组织速冻，提前标记样本信息，将取样好的组织放入冻存管底部，尽快使用镊子夹住冻存管置于液氮中，保持至少 2 min，确保组织完全冻透。

3. 保存：冻存的细胞样品建议置于液氮长期保存：液氮速冻后的组织样本管可以在液氮罐长期稳定保存，或放入 -80℃ 冰箱最深处短期保存（建议 3 个月以内，保存时不可经常翻动）；

4. 质检：冻存的组织样本，实验提核前需要增加 RNA 质检步骤，建议 RQN>7，RQN 值偏低说明样本发生降解；

5. 运输：使用干冰运输，转移复核过程避免停留时间太久样本融化导致 RNA 降解，找出样本后立马埋入干冰底部，冻存管可使用适当大小保存盒存放，防止运输过程中挤碎（干冰量次日达不低于 10KG，加一天运输时间增加 5KG，根据天气、距离酌情考虑）。

4.1.5 建议提核的样本种类

1. 肝（关注肝实质细胞）、脑（关注神经元）、脂肪（关注成熟脂肪细胞，含有油脂，比较轻）、心脏（关注心肌细胞）、肌肉（关注骨骼肌细胞）这类组织，存在直径较大或不规则的细胞，这类细胞常规酶解方案容易碎裂不易收集，提核可以得到该类细胞比较真实的比例；

2. 已冻存液氮中的组织，只能提核；

3. 在保存液 48h 保护期内无法确认结果是否需要开始后续实验，可以先冻存组织，后面确认入组后再进行组织提核。

注：提核的样本后续得到的是核内的遗传信息，细胞质内的信息无法得到；如果选择解离细胞后冻存，复苏的细胞可能会损失一些脆弱的细胞类型。

4.2 单细胞悬液样本

- 1.细胞状态: 细胞活性 $\geq 90\%$, 无明显细胞聚集(单个细胞比例 $\geq 90\%$), 无大量死细胞及细胞碎片, 细胞直径范围: $5\sim 40\mu\text{m}$ 。
- 2.细胞浓度: 浓度控制在 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ cells/mL, 建议使用无血清培养基(如 PBS+1% BSA) 重悬。
- 3.体积要求: 单次送样体积 $\geq 500\mu\text{L}$, 若需多次实验, 可按比例增加体积。
- 4.送样标记: 使用无菌、无酶的 1.5 mL 或 2 mL 离心管, 管身清晰标注“样本名称+细胞类型+浓度+日期”。
- 5.注意事项: 避免使用含 EDTA、肝素等抗凝剂或影响细胞活性的试剂; 制备后 1 小时内送检, 若需暂存, 需置于 4°C 冰箱(不超过 2 小时), 禁止冷冻。

4.3 新鲜组织样本

1. 组织类型: 新鲜哺乳动物实体组织(如肿瘤组织、肝脏组织、肺组织等), 避免取到坏死、钙化、纤维化组织。
2. 取样细节:
 - ① 在取样时(尤其是病变组织) 尽量避免取到坏死、钙化、硬化、纤维化的部位, 减少杂质引入; 如果无法避免或关注此类位置区域, 建议多送样本, 便于做实验优化处理;
 - ② 若为电刀切割取样, 需去除与电刀接触的焦黑坏死组织;
 - ③ 确保目标组织术时无冰冻低温受损;
 - ④ 实体组织单个样本重量 $\geq 200\text{mg}$ (肌肉组织约蚕豆大小), 或尺寸 $\geq 5\text{mm} \times 5\text{mm} \times 5\text{mm}$ (过小易导致细胞量不足);
 - ⑤ 如果组织较多, 可取 2-3 份备用;
 - ⑥ 穿刺样本建议 2-3 条以上, 组织量少也可以尝试解离;
 - ⑦ 在取样后可对组织进行修剪, 尽可能快速去除非目标部位, 可降低非目标区域细胞群干扰, 获得的组织用 $1 \times \text{PBS}$ 或生理盐水洗掉组织中的血液。

注: ① 消化系统组织需用 $1 \times \text{PBS}$ 或者生理盐水多次清洗, 洗去分泌物; ② 穿刺或活检的小体积样本, 无需进行清洗, 防止组织清洗过程中断裂损失。

3. 运输方式:

① 短期 (≤ 2 小时): 将组织放入加满组织保存液 (不能使用 RNA 保存液或固定剂) 的样本保存管中 (按组织大小选取规格), 若无, 也可以放在含无菌培养基 (如 DMEM+10% FBS+双抗) 的离心管中, 用封口膜密封好, 放入样本保存袋或纱布包裹 (不要直接接触冰袋, 防止结冰), 4°C 或湿冰上运输。

② 长期 (> 2 小时): 将目标组织部位清洗过后的组织放入美天旎组织保存液 (MACS® Tissue Storage Solution, 130-100-008) 中, 注意组织要确保完全浸没在保护液中, 4°C 保存, 不要冰冻, 顺丰邮寄 48h 内送到实验室。

4. 信息标注: 冻存管/离心管需标注“样本名称+组织类型+取样日期+保存方式”, 并密封。

注 (部分实验模型会影响样本状态): ① 某些实验模型会对细胞解离造成影响, 如小鼠肺部打入二氧化硅颗粒模型, 二氧化硅密度和细胞类似, 后续无法去除干净; ② 某些药物治疗会对细胞有影响, 如肿瘤治疗后, 大部分肿瘤细胞凋亡后形成的碎片不易与细胞区分, 影响细胞质检有核率; ③ 衰竭、缺血等模型组织解离后活性普遍稍低, 考虑实际情况与样本珍稀程度决定是否继续实验; ④ 如是高龄动物标本样本质量下降快, 请尽快送实验室进行解离。

4.4 血液样本

1. 血液类型:

全血、骨髓血等;

外周血单个核细胞 (PBMC) 悬液。

2. 样本保存:

抗凝剂选择: 使用 EDTA 抗凝管 (紫色帽), 避免肝素抗凝管 (影响后续细胞分离)。

3. 体积要求: 人, 单次送样 5-6 mL; 小鼠, 建议 1 mL 以上新鲜血液, 采集后颠倒离心管 5-10 次混匀抗凝剂, 避免剧烈摇晃。

4. 运输条件: 4°C 冷藏, 24 小时内送检, 禁止冷冻 (仅限于分离 PBMC), 需要分离中性粒细胞, 则常温运输。

5. PBMC 悬液:

① 制备要求: 使用密度梯度离心法 (如 Ficoll-Paque 试剂) 分离 PBMC, 用无菌培养基 (1640+0.04% BSA) 重悬, 活细胞比例 $\geq 90\%$, 浓度 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ cells/mL.

② 送样体积: $\geq 500 \mu\text{L}$, 4°C 冷藏, 12 小时内送检, 容器标注同细胞悬液。

4.5 其他液体样品

1. 胸水, 腹水等液体类样品, 取出后放 4°C 保存, 6 小时内送检, 冰袋运输, 以防结冰, 冰袋数量以到实验室冰袋不完全融化完为准。

2. 送样量: 胸水 (建议取样约 100 mL), 腹水 (建议取样约 100 mL), 尿液 (建议取样约 100 mL), 灌洗液 (建议取样约 5-20 mL), 脑脊液 (建议取样约 1-10 mL) 等。

4.6 骨髓类样本

1. 取样类型

- ① 骨髓组织: 参照新鲜实体组织准备、送样;
- ② 骨缝冲出的骨髓细胞: 参照体液类样本准备、送样;
- ③ 骨髓血: 参照血液类样本准备、送样。

2. 注意事项

① 骨髓血样本使用紫头 EDTA 抗凝管 (容器中样本轻柔颠倒混匀 10 次, 彻底混匀抗凝剂)。

② 骨缝冲出的骨髓细胞按体液类样本进行保存寄送或运输, 如果是小鼠骨样本, 可以寄送关注位置两端骨髓未剪开、中间未断裂的完整骨头, 由公司人员处理。

4.7 培养类样本

1. 取样类型

- ① 培养细胞；
- ② 培养类器官。

2. 运输

- ① 客户自己处理为细胞悬液，按悬液类样本要求寄送；
- ② 未消化的培养细胞平皿，按培养环境确定温度，一般常温寄送即可；
- ③ 培养类器官组织块，按新鲜实体组织要求，使用组织保存液 4℃ 寄送；

同城可使用本身培养液常温寄送。

注：① 培养样本建议处理前做好备份继续培养，防止解离失败样本全部损失；② 有较好的处理经验建议自行解离，寄送悬液进行质检上机。

五、风险说明

5.1 细胞类型

解离、提核等不保证细胞类型，前端解离过程中不能区分细胞类型，某些脆弱细胞解离过程中会优先死亡，例如神经细胞，去死细胞操作可分选掉死细胞，但细胞分群可能会改变。

5.2 提核样本前期风险提示

冻存组织需提取 RNA 质检，判断 RNA 降解程度，要求 RQN (RNA Quality Number) > 7 (RNA 质检实验需要在实验室完成，样本量小不够 RNA 质检需要承担上机风险)；

- a. 可能会存在 RNA 降解的风险： $6 < RQN < 7$ 表明有轻微降解，样本珍贵可继续往下实验。RQN 值 < 6，需酌情考虑样本情况决定是否继续实验；
- b. 细胞核直径较小，可能计数不准确导致细胞捕获数偏差较大；
- c. 等待时间久会导致核膜破裂，细胞碎片、RNA 背景增加，影响下机质控数据；

5.3 细胞活率低

细胞捕获过程对活细胞、死细胞、碎片和颗粒等没有选择性，都会随机捕获，影响最终的结果：细胞数不准确、UMI 分布曲线上有效细胞与非细胞界线不明显、线粒体基因过多等风险；

5.4 结团率高

导致结在一起的两个或多个细胞被包在一个油包水中，被系统认为是一个细胞。结团率太高影响最终分析结果的准确性，导致细胞捕获数偏差，过大的结团可能会堵芯片，导致实验彻底失败。

5.5 活细胞浓度不适宜

如活细胞浓度太低，计数仪误差比较大，细胞总量足够时可以进行浓缩，但是浓缩过程会造成细胞总量的损失、给细胞造成伤害、可能也会改变各细胞类型的比例；细胞浓度过高时，超过计数仪的分辨能力，导致计数不准确、结团率虚高、且浓度不准易导致操作误差。

5.6 细胞直径

细胞直径太小时，超过细胞计数仪可识别的低限，会导致计数不准确，最终细胞数误差较大；细胞直径太大，可能会堵孔，导致实验失败。