

# 单细胞免疫组库测序备样指南

地址/ Add: 上海市松江区香闵路 698 号 (698 Xiangmin Road, Songjiang District, Shanghai China 201611)

电话/Tel: 86-21-37772168

传真/Fax: 86-21-37772170

技术支持/Support: 800-820-1016 400-821-0268

邮箱/Email: [sales@sangon.com](mailto:sales@sangon.com)

网址/Web: [www.sangon.com](http://www.sangon.com)

# 1.10x Genomics 单细胞免疫组库

## 1.1. 样本类型 (所有样本类型物种仅限于人和小鼠) :

- A. 新鲜组织样本
- B. 血液
- C. 细胞悬液
- D. 细胞系样本

### 样本说明 :

V(D)J 建库建议先进行 T/B 细胞流式分选或磁珠富集,未富集样本不会影响 5 端转录组数据,但 T/B 细胞占比过低会导致 TCR/BCR 文库建库失败。若客户同意未富集情况下进行单细胞捕获上机,T/B 细胞占比过低导致的建库失败或 V(D)J 文库的有效数据占比过低的风险需由客户承担。

### 样本要求 :

#### A. 新鲜组织样品

1) 直接寄送新鲜组织样本,由客户进行目标组织取样,生工生物进行目标组织的解离,具体方法可参考以下:

新鲜组织取样后,后续所有操作均需在 4°C低温进行(在制冰机制备的碎冰上操作)。将新鲜的组织放在培养皿中,去除非研究组织,坏死组织等。取 1g 以上的新鲜目标组织部位到新的培养皿中,加入 1XPBS 对新鲜的目标组织块进行几次清洗,去除血渍,小心移净液体。使用已灭菌的剪刀和镊子将目标组织部位剪成 2-4mm<sup>3</sup> 大小的组织块;将清洗后的组织块转移到完全浸润于 4°C预冷 1.5ml 样品管的美天旎组织保存液中,2-8°C避光运输,取样后 30 小时内到达生工生物实验室,进行组织解离,送来的组织生工生物均默认为目标组织。

地址/ Add: 上海市松江区香闵路 698 号 (698 Xiangmin Road, Songjiang District, Shanghai China 201611)

电话/Tel: 86-21-37772168

传真/Fax: 86-21-37772170

技术支持/Support: 800-820-1016 400-821-0268

邮箱/Email: [sales@sangon.com](mailto:sales@sangon.com)

网址/Web: [www.sangon.com](http://www.sangon.com)

**注：寄送实验样品建议使用单细胞专用的组织保存液，客户若自行购买（推荐购买品牌：美天旆组织保存液，货号 130-100-008，）或联系生工生物单细胞实验室寄送单细胞专用的组织保存液。**

**2) 预约上门实验：**由客户进行目标组织取样，生工生物单细胞实验人员到达客户所在实验室现场进行目标组织的解离，和单细胞悬液质检捕获上机以及 RT 反应等，上门实验需提前预约，具体细节及注意事项请见 1.2 预约实验说明。

## B. 血液

**1) 对于无法处理新鲜全血的客户，具体方法可参考以下：**

抽取新鲜的外周血不少于 5mL 至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中，轻摇混匀。注意不要产生凝血块，所有操作均需无菌条件下进行，准备新鲜的全血样本需不少于 5mL 并采用 EDTA 抗凝，样本需 8h 内送达，4℃运输。

样品运输：取样后 4℃运输，或者将全血抗凝管使用缓冲介质包裹后，外部使用冰袋包装后寄送，注意从-20℃取出的冰袋不要直接接触样品，以免造成血液样本结冰，导致样品局部冻伤而使细胞失活。

**2) 对于有条件处理全血，收集 PBMC 的客户，具体制备方法可参考以下：**

抽取新鲜的外周血 5mL 至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中，注意所有的操作均需无菌条件下进行，准备的新鲜全血样本需不少于 5mL 并采用 EDTA 抗凝。

- a. 向全血样本中加入等量 1XPBS 稀释全血。
- b. 在离心管中加入适量分离液（当稀释后血液体积小于 3mL 时，加入 3mL 分离液；大于等于 3mL，加入等体积分离液。但二者的总体积不能超过离心管的三分之二，否则会影响分离效果），将稀释后的血液平铺到分离液液面上方，注意保持两液面界面清晰。（可以使用巴氏吸管吸取血液，然后将血液小心的平铺于分离液上，因为两者的密度差异，将形成明显的分层界面。如果样品较多加样时间较长，在离心之前出现红细胞成团下沉属正常现象。）

- c. 室温，水平转子 500~1000g，离心 20~30min (血液的体积越大所需的离心力越大，离心时间越长，最佳的分离条件需摸索，离心转速最大不超过 1200g)，(注意离心机降速设置中一定要设置成 no break，使离心升速与降速平缓)。
- d. 离心后将出现明显的分层：最上层是稀释的血浆层，中间是透明的分离液层，血浆与分离液之间的白膜层即为单个核细胞层，离心管底部是红细胞与粒细胞。
- e. 小心的吸取白膜层细胞到 15mL 洁净的离心管中，10mL PBS 或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞。300g，4°C 离心 10min (注意离心机降速设置中一定要设置成 no break，使离心升速与降速平缓)。
- f. 弃上清，5mL 的 PBS 或细胞清洗液重悬细胞，300g，4°C 离心 10min。注意离心机降速设置中一定要设置成 no break，使离心升速与降速平缓)。
- g. 重复步骤 6
- h. 弃上清，进行红细胞裂解处理后，300g，4°C 离心 10min。弃上清，1XPBS 重悬细胞。DeNovix® CellDrop FL 细胞计数仪计数或使用显微镜进行血球计数板计数，分选/富集后的目的细胞以按照  $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ /mL/管细胞浓度进行冻存，(冻存液配制：90%FBS+10%DMSO) 放入冻存管中，用封口膜封口，放入梯度降温盒保存置于-80 摄氏度冰箱。

**样品运输：**将样品管用封口膜封口，再放置于 50mL 离心管中或封口袋中，里面添加棉花等固定 (切勿在 50 mL 管内或其他支撑物内加入液氮等危险品)，使用厚度 4cm 以上的泡沫箱包装，10kg 以上的干冰运输。注意样品运送前保存在-80°C 冰箱；样品保存期间切忌反复冻融。

**3) 预约上门实验：**由客户抽取新鲜的外周血不少于 5mL 至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中，轻摇混匀，注意不要产生凝血块。生工生物单细胞实验人员到达客户所在实验室现场进行 PBMC 细胞收集，和单细胞悬液质检捕获上机以及 RT 反应等，上门实验需提前预约，具体细节及注意事项请见 1.2 预约实验说明。

## C) 单细胞悬液样品

### (1) 新鲜组织制备细胞悬液，具体制备方法可参考以下：

手术后将切下的组织浸于 1X PBS 管中移至超净台，用 1X PBS 将新鲜组织清洗干净，在培养皿中用无菌手术剪将新鲜组织在剪碎成约 0.5mm<sup>3</sup> 的组织匀浆，所有操作均需在 4°C 低温进行（在制冰机制备的碎冰上操作）；

以肺癌组织为例，按下表的比例消化至细胞悬液：37°C 恒温摇床孵育 30min：

表 1 肺癌组织细胞悬浮液配比

试剂	体积/终浓度
组织匀浆	X
培养液(90%DMEM+10%FBS)	(5-10)X
肿瘤组织解离液	10%

注：对于不同组织类型要根据文献使用不同的酶和消化方法

消化完成后，在超净台内将细胞悬液用 40µm 细胞筛过滤，收集滤过液，4°C，300×g 离心 5min 去上清，保留管底沉淀；加入(1XPBS+0.04%BSA)重悬细胞。

### 悬液要求：

细胞活率：≥80% ( DeNovix® CellDrop FL 细胞计数仪计数，或使用显微镜用台盼蓝对细胞进行染色在血球计数板上判断细胞悬液活率，如果活率低于 80%，有流式分选条件的建议用流式细胞仪去除死细胞。)

细胞形态：细胞大小均一，直径介于 7-40µm，若细胞直径过小 (<7µm) 请确定客户是否有能准确计数及检测活率的方法及仪器。( 推荐使用 DeNovix® CellDrop FL 细胞计数仪 )

悬液背景：细胞团及碎片杂质<5%。若有红细胞，还需进行裂红处理，无细胞粘连，无明显细胞碎片和细胞团，并保证细胞的完整性。

细胞数目：细胞数目 ≥ 10 万 ( 分选/富集后的目的细胞 )

细胞悬液: 不能存在反转录抑制剂, 即不含有  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ 。

#### 样品运输方式:

- A. 4°C运输,细胞悬液需要在 30 分钟内送达生工生物单细胞测序组实验室。
- B. 超过 30 分钟需进行细胞冻存, 冻存方法: 细胞数目 $\geq 10$  万进行冻存(分选/富集后的目的细胞)(冻存液配制: 90%FBS+10%DMSO)冻存液重悬混匀,放入冻存管中,梯度降温盒保存。使用厚度 4cm 以上的泡沫箱包装, 10kg 以上的干冰运输。样品保存期间切忌反复冻融。

(2) 预约上门实验: 由客户进行单细胞悬液的制备。生工生物单细胞实验人员到达客户所在实验室现场进行单细胞悬液质检, 并单细胞捕获上机以及 RT 反应等, 上门实验需提前预约, 具体细节及注意事项请见 1.2 预约实验说明。

#### e) 细胞系样本

(1) 细胞系寄送要求: 以贴壁细胞为例, 一般选择生长良好的细胞系, 以生长至 1/3-1/2 瓶底壁为宜。细胞系直接运输: 去掉旧培养液, 灌满新的培养液, 使用不透气的盖子, 将培养瓶盖用封口膜封紧, 放些缓冲介质避免培养瓶大幅度晃动, 常温运输即可。

(2) 预约上门实验: 由客户提供生长良好的细胞系, 以生长至 1/3-1/2 瓶底壁为宜。生工生物单细胞实验人员到达客户所在实验室进行现场细胞系解离或客户自己解离, 和单细胞悬液质检捕获上机以及 RT 反应等, 上门实验需提前预约, 具体细节及注意事项请见 1.2 预约实验说明。

## 1.2. 预约实验说明

### 1) 建库类型

单细胞 V(D)J 测序可只检测免疫组库 TCR/BCR 或检测 5' 端转录组+免疫组库,

请提前告知建库类型, 具体建库类型说明请参照下表。

只检测免疫组库			5' 端转录组+免疫组库		
只检测 T 细胞 TCR	只检测 B 细胞 BCR	只检测 B 细胞和 T 细胞 BCR+TCR	T 细胞 TCR + 5 端转录组	B 细胞 BCR + 5 端转录组	T 细胞 TCR + B 细胞 BCR + 5 端转录组

## 2) 样品要求

寄送新鲜组织样品：确保样品新鲜无明显坏死；寄送样品需确保组织离体后 48h 之内，且在 9:00-15:00 点之间到达实验室，晚于 15:00 的组织保护液保存至第二天实验。

细胞悬液：确保客户的细胞悬液满足样品质检要求。

## 3) 预约前提

有客户签字并返回公司的合同。预约实验前，需指定技术支持，由项目技术支持确认商务信息合规，否则不能预约实验。

## 4) 预约时间及方式

预约时间：

A.寄送样本：建议及早预约，一般本地提前 2 天、外地提前 3 天预约成功率较高。

B.上门服务：建议提前一周预约成功率较高。

预约方式

A.寄送样本：预约前请填写《生工生物 10×单细胞免疫组库测序送样表》，发邮件预约并抄送技术支持或项目助理。预估到样时间。

B.上门服务：预约前请填写《生工生物 10×单细胞免疫组库测序上门服务信息确认表》，发邮件预约并抄送技术支持或项目助理；注明时间和地点，时间具体到小时。

**注：无特殊情况不得轻易更改实验时间，如确需不同项目间做时间调换，请提前沟通确认。**

### 5) 客户细胞悬液制备完成时间要求

为了保证细胞的活性,同批次的多个样本,第一个样品和最后一个样品悬液制备完时间控制在 30 分钟之内。

若客户需在同一天进行 2 批或 2 批以上的悬液制备,第一批悬液在上午 9 点之后完成制备,最后一批悬液在下午 16:00 点之前完成制备,且批次之间相隔 1 小时以上。

## 1.3. 风险提示

以下任何一种情况出现,样品将判定为不合格,相关影响及风险说明如下:

### (1) 细胞悬液未经 T/B 细胞富集,或细胞悬液中 T/B 细胞占比过低。

- T/B 细胞占比过低在免疫组库富集过程中会有大量非特异扩增,使得有效的 TCR/BCR 数据占比过低

### (2) 组织样品未在 2-8°C组织保护液中保存及运输,或在合格条件下保存时间过长(超过 48h)

- 将影响细胞活率。
- 可能导致细胞基因表达特征变化,数据失真。

### (3) 经去死细胞处理后,细胞活率仍低于 80%(DeNovix® CellDrop FL 细胞计数仪计数)

- 可能影响最终获得的有效细胞数。
- 可能导致有效的 Reads 数低(分析结果中的 Fraction Reads in cell),因为细胞处于死亡或者凋亡状态,细胞碎片、杂质以及游离的 RNA 都会导致背景噪音中 Read 比例升高,相应有效细胞中 Reads 比例就低。
- 细胞活性低表明 mRNA 降解,mRNA 降解导致基因检出少,同时死亡细胞释放大量的 RNA 到环境中,导致正常细胞与背景噪音的强度接近,使得有效细胞也无法根据阈值筛选出来。样本处于死亡或者凋亡状态,此时线粒体基因组会被测到一定比例。

### (4) 经过滤、清洗等处理,细胞悬液中仍有>5%的细胞团、颗粒或杂质。

地址/ Add: 上海市松江区香闵路 698 号 (698 Xiangmin Road, Songjiang District, Shanghai China 201611)

电话/Tel: 86-21-37772168

传真/Fax: 86-21-37772170

技术支持/Support: 800-820-1016 400-821-0268

邮箱/Email: [sales@sangon.com](mailto:sales@sangon.com)

网址/Web: [www.sangon.com](http://www.sangon.com)



- 可能堵塞微流控通道，导致获取的有效细胞数偏离预期；可能导致有效的 Reads 数低（分析结果中的 Fraction Reads in Cell），因为细胞处于死亡或者凋亡状态，细胞碎片、杂质以及游离的 RNA 都会导致背景噪音中 Read 比例升高，相应有效细胞中 Reads 比例就低。

(5) **细胞悬液中细胞浓度低于 100 Cells/ $\mu$ L，低出细胞计数仪量程范围。**

- 致使无法细胞计数，导致获取的有效细胞数严重偏离预期。

(6) **经必要的过滤和去除死细胞处理后，细胞悬液浓度低于所需浓度。**

- 导致获取的有效细胞数可能低于预期。

(7) **制备细胞悬液时所用 PBS 含有  $Ca^{2+}$ 和  $Mg^{2+}$ 。**

- $Ca^{2+}$ 和  $Mg^{2+}$ 会影响反转录过程，导致建库失败。

上述因组织或细胞悬液不合格而可能导致测序数据不符合预期或项目失败的风险，需客户提前知情，在项目进行过程当中，在发现（不限于）上述不合格情况时，实验人员会第一时间反馈技术支持，由技术支持与客户取得联系并充分说明现象和相关风险，经确认后继续完成实验。

## 1.4. 样本寄送须知

### 1.4.1 寄送准备

由于 10x 单细胞建库实验的特殊性，请于样品寄送前 3 天沟通预约，以便进行实验安排。

样品寄出后请及时告知快递信息。

### 1.4.2 试剂耗材说明及注意事项

组织保存液 2-8 $^{\circ}$ C 保存，不可冷冻，使用时始终置于碎冰（4 $^{\circ}$ C）上。

组织保存液不含抗生素及抗真菌剂等组分，如有需要可先于细胞培养基中添加。

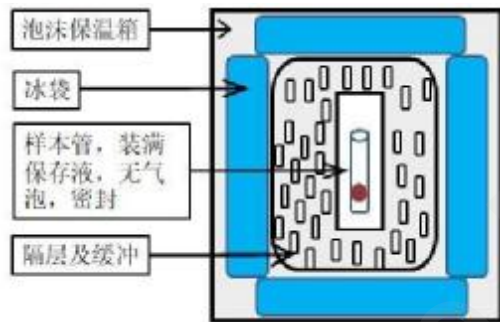
所用耗材（离心管或冻存管）需保证无菌。

### 1.4.3 样本处理和运输

**新鲜样本量**：1g 以上。

**样本处理**：切取新鲜组织 1g 以上，立即加入 4℃预冷的 1.5ml 样品管的组织保存液中，并保证样本完全浸没于组织保存液中（如果样品已置于其他 Buffer 或培养基中，需先将 Buffer 或培养基弃净后再加入保存液）。

**样本运输**：样本管中尽量加满组织保存液，避免管内存在气泡，保证管口密封且不会在运输中弹开、漏液；2-8℃避光运输，保证组织取样后 30h 之内到达实验室进行解离。**注：新鲜组织不可冷冻，避免与冰袋直接接触；造成细胞冻伤。**



**冻存细胞数目**：≥10 万（分选/富集后的目的细胞）

**样本运输**：使用厚度 4cm 以上的泡沫箱包装，10kg 以上的干冰运输。注意样品运送前保存在-80° C 冰箱；样本置于干冰中间位置，样品保存期间切忌反复冻融。

寄样时请填写完整的样品信息单，用自封袋密封后随样品一起寄送，样品运送

<b>地址</b>	上海市松江区香闵路 698 号生工生物工程（上海）股份有限公司
<b>联系人</b>	高通量测序部单细胞实验室
<b>电话</b>	021-57072133/2097/2177/2059
<b>邮箱</b>	rna_sample@sangon.com
<b>邮编</b>	201600