



博淼生物
BIO MIAO BIOLOGICAL
— SINCE 2009 —

Your Own Laboratory
您的专属实验室

单细胞组送样标准和样本准备注意事项



全国统一服务热线：4006-506-908

官方网站：www.biomiao.com

邮箱：marketing@biomiao.com



目录

一、	送样标准	3
二、	PBMC	3
(一)	采集步骤	3
(二)	PBMC 的保存及运输	4
三、	悬浮细胞	5
(一)	采集步骤	5
(二)	悬浮细胞的保存及运输	6
四、	贴壁细胞	6
(一)	采集步骤	6
(二)	贴壁细胞的保存及运输	7
五、	组织	7
(一)	采集步骤	7
(二)	组织的保存及运输	8
六、	OCT 包埋组织	8
(一)	采集步骤	8
(二)	OCT 包埋组织的保存及运输	10
七、	石蜡包埋组织	11
(一)	采集步骤	11
(二)	石蜡包埋组织的保存及运输	12
八、	附录	13
(一)	样本采集保存容器	13
(二)	常见不同规格培养瓶培养细胞量参考值	15
(三)	常见不同规格培养皿培养细胞量参考值	16

一、送样标准

样品类型	实验项目	
	单细胞转录组测序技术服务	空间转录组测序技术服务
PBMC	$\geq 10^6$	——
悬浮/贴壁细胞	$\geq 10^6$	——
组织	$\geq 0.2g$ (黄豆粒大小)	——
OCT 包埋组织	——	8×6×10mm
石蜡包埋组织	——	8×6×10mm

二、PBMC

(一) 采集步骤

实际操作时可参考 PBMC 分离液的使用说明，不同厂家的分离液操作步骤可能略有不同。以下流程仅供参考。

1. 取新鲜抗凝全血 (**EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝管均可**) 或者去纤维蛋白血液，用等体积的全血及组织稀释液或者 PBS 稀释全血。
2. 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。(可以使用巴氏德吸管吸取血液，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于正常现象。)
3. 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，最佳的离心条件需摸索，离心转速最大不超过 1200g)。
4. 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淋巴细胞层，离心管底部是红细胞与粒细胞。



5. 小心的吸取白膜层细胞到 15ml 洁净的离心管中，10mlPBS 或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞。250g，离心 12min。
6. 弃上清，1ml 的 PBS 或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心 10min。
7. 重复步骤 6。
8. 弃上清，用 0.5mlFBS 重悬细胞。
9. 冰上 4h 内进行单细胞实验，或重悬后逐滴加入等体积 20%的 DMSO，混匀后冻存。（在冰上操作）
10. -80℃储存（短期），干冰运输。

试剂	可选厂家	货号
人外周血淋巴细胞分离液	Solarbio	P8610
FBS	Gibco	10099-141
DMSO	SIGMA	C6164

*注：

- 1) 血液样本最好为新鲜抗凝血（采血 2h 以内），为保持淋巴细胞的活性，应避免冷冻和冷藏。
- 2) 稀释血液或洗涤细胞，不可使用含 Ca、Mg 离子的缓冲液及培养液，其成分会导致血细胞凝集，大大降低细胞得率及纯度。
- 3) 部分塑料制品（如聚苯乙烯）因其带有的静电作用，可能会导致细胞挂壁，影响分离效果。
- 4) 吸取过多的淋巴细胞层及分离液层会导致分离液交界处的粒细胞被吸出从而使混杂的粒细胞数量增加；吸取过多的血浆层可能会导致淋巴细胞中血浆蛋白及血小板污染。

(二) PBMC 的保存及运输

1. 保存：

- 1) 离心管应及时放进-80℃冰箱。

- 2) 用封口膜将离心管的管口进行封缠，防止低温导致管盖崩开，样本污染。(冻存管需拧紧管盖，可以不封膜)
 - 3) 随样品附带一份对应明细，单独包装。
2. 样品的运输：
- 1) 样品需用干冰进行运输。干冰数量不低于 8 公斤/天，夏季运输需要适当增加用量。
 - 2) 运输前需确认离心管盖密合度非常佳，且以封口膜将盖口包装（冻存管确定管盖拧紧），避免杂质混入或者液体溢出。
 - 3) 选用密闭性较佳或厚度较厚的泡沫盒进行寄送。附带的文件说明，请以夹链袋再装一次以免湿气毁损文件。宽版胶带缠绕密封泡沫盒即可寄出。

三、 悬浮细胞

(一) 采集步骤

1. 连同培养基转移到 15 mL 的进口离心管中。
2. (4°C) 400-1000g，离心 5-10min，使细胞沉淀于离心管的底部。
3. 倒掉培养基（尽量倒干净），用预冷的 PBS 反复冲洗 2 ~ 3 次。
4. 弃上清，用 0.5ml PBS+12%BSA 重悬细胞。
5. 放置于冰上 1h 内进行单细胞实验。

试剂	可选厂家	货号
BSA	Roche	735108-10

*注：

- 1) 转移前，可先将培养基反复吹打，吹打部分贴壁的悬浮细胞。

- 2) 操作尽量迅速，培养基尽量倒干净，如有滤纸，建议用滤纸将残留的培养基吸尽。
- 3) 取对数生长期，培养至同一时期的细胞，建议多准备样本，以备后续使用。

(二) 悬浮细胞的保存及运输

1. 保存：

冰上保存或放进 4°C 冰箱 1h 内进行实验。

2. 样品的运输：

不建议冻存运输，可联系博淼直接上门实验。

四、 贴壁细胞

(一) 采集步骤

1. 小心弃掉培养液，并将培养皿倒置于吸水纸上尽量吸干培养液。
2. 加入 4 °C 预冷的 PBS 反复冲洗 2~3 次（若用移液枪加，则靠着培养皿壁加入，以免将细胞冲起），然后弃 PBS（建议用微量移液器少量多次吸尽残余 PBS）。
3. 将培养皿置于冰上，加入 PBS 重悬。
4. 收集到 15ml 离心管中，4°C，400-1000g 离心 5-10min，去 PBS。
5. 0.5ml PBS+12%BSA 重悬细胞后转移到 1.5ml 离心管。
6. 放置于冰上 1h 内进行单细胞实验。

试剂	可选厂家	货号
BSA	Roche	735108-10



***注:**

- 1) 取对数生长期，培养至同一时期的细胞，建议多准备样本，以备后续使用。
- 2) 贴壁细胞收集时如遇培养皿较大，1mL 试剂无法完全转移，建议加入最大试剂体积不超过 3mL。
- 3) 贴壁细胞的收集也可使用胰酶消化后，低速离心，去掉培养液上清，再使用 PBS 溶液清洗 1-2 次，进行后续实验。

(二) 贴壁细胞的保存及运输

1. 保存:

冰上保存或放进 4°C 冰箱 1h 内进行实验。

2. 样品的运输:

不建议冻存运输，可联系博淼直接上门实验。

五、 组织

(一) 采集步骤

1. 每个样本的取材部位要尽量一致，准确切除所需组织后，剔除无关的干扰组织（坏死、脂肪、结缔组织等）和杂质。组织重量不低于 0.2g。
2. 用预冷的生理盐水或 PBS 迅速漂洗样本，以去除血渍和污物。
3. 用无尘吸水纸快速吸干表面的液体。
4. 用镊子夹住样本，放入带有组织保存液的冻存管中。
5. 直接开展实验或放入 4°C 冰箱（存放不能超过 48 小时）。

***注:**



- 1) 组织需完全浸入保存液中。

(二) 组织的保存及运输

1. 保存：

- 1) 用锡箔纸将冻存管整个包好，达到避光效果，冰箱 4℃保存。
- 2) 随样品附带一份对应明细，单独包装。

2. 样品的运输：

- 1) 样品需用-20℃冰箱的冰袋进行运输。3 个冰袋以上（根据冰袋大小），夏季运输需要适当增加冰袋数量，样本与冰袋要用气泡袋间隔，不能紧贴。
- 2) 运输前需确认冻存管盖密合度非常佳，避免杂质混入或者液体溢出。
- 3) 选用密闭性较佳或厚度较厚的泡沫盒进行寄送。附带的文件说明，请以夹链袋再装一次以免湿气毁损文件。宽版胶带缠绕密封泡沫盒即可寄出。

*注：

- 1) 组织样本收集后保存及运输总时间不能超过 48h。

六、 OCT 包埋组织

(一) 采集步骤

1. 前期准备：在 50ml 离心管（穿刺样本用 2ml 离心管即可）中装入 2/3 体积无镁钙的 PBS，并插入碎冰中预冷（要在离心管盖和管壁提前标好样本名称，防止弄混样本）。
2. 标本下来后，尽快切好需要的部位，放入已预冷的 PBS 中带回实验室进行后续包埋。
3. 预冷 OCT 和镊子：将 OCT 和镊子放在冰上≥30 分钟。



4. 用预冷好的镊子取出组织，立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型。对肿瘤组织的取材，应尽可能准确地判定肿瘤和正常组织，肿瘤组织应将周围的正常组织切除干净（正常组织也应将周围的肿瘤组织切除干净）；
5. 迅速用预冷的 PBS 溶液 (RNase free) 或生理盐水将组织表面的残留血液冲洗干净，然后用干净的纱布或吸水纸将液体吸干净；
6. 如果组织体积较大，应尽量将组织切成长宽高约 0.8 cm 的小块（小拇指大小）。
7. 用异戊烷（足以完全浸没组织）填充三分之二的金属烧杯，然后放入液氮杜瓦瓶中（与异戊烷相同的水平）以充分接触。孵育至少 15 分钟；
8. 用镊子将组织放入异戊烷中，直到完全浸没；浸泡至少 1 分钟；
9. 组织冷冻结束后迅速转移到预冷的冻存管中，置于干冰上，并选用无核酸酶的试剂和耗材；
10. 将冷冻组织在 -80°C 长期保存，或立即进行冷冻组织包埋；
11. 为防止组织样品蒸发和脱水，快速冷冻的组织样品必须储存在密封容器中。
12. 标记一个合适大小的包埋盒以便记录组织放置的方向（可拍照记录），将包埋盒放于碎干冰上。在加入 OCT 和组织之前，对包埋盒做标记。一旦冷冻，OCT 很快就会变白，这使得以后很难确定组织的方向。
13. 在包埋盒中注入冷冻 OCT，避免产生气泡。
14. 使用预冷镊子，将冷冻组织放入 OCT 中。用额外的 OCT 覆盖任何暴露表面；确认组织周围没有气泡；
15. 立即将含有组织和 OCT 的冷冻模放在粉状干冰上，直至 OCT 完全冻结；
16. 包埋后，对组织进行修理，将多余的部分去掉，留下需要的组织块。此时的组织块保持在长宽高约 0.8cm 的小块（约小拇指大小）最佳；
17. 将 OCT 包埋的组织块在 -80°C 的密封容器中长期保存，或立即进行冷冻切片和切片放置；在 -80°C 保存时注意严格避免反复冻融。



试剂	可选厂家	货号
OCT 包埋剂	Sakura	1035-00

*注:

- 1) 建议针对活体或刚死亡个体进行解剖取样;
- 2) 个体死亡后, 实在无法立即解剖, 需将生物体放入 4°C冰箱暂存, 不可冻融;
- 3) 所有器械和环境需要消毒灭菌;
- 4) 目前必须用异戊烷。因为空间转录组样本制备时既要防止 RNA 降解, 还要避免形成晶体, 防止组织形态受损。冷冻新鲜组织时, 组织不应直接置于液氮中, 因为温度差可能会导致组织表面沸腾, 从而导致气穴和不均匀的冷冻, 这可能会破裂并在形态上破坏组织。而目前也没有更好的异戊烷替代试剂。

(二)OCT 包埋组织的保存及运输

1. 保存:

- 1) 将 OCT 包埋的组织块在-80°C的密封容器中长期保存, 或立即进行冷冻切片和切片放置; 在-80°C 保存时注意严格避免反复冻融。
- 2) 随样品附带一份对应明细, 单独包装。

2. 样品的运输:

- 1) 样品需用干冰进行运输。干冰数量不低于 8 公斤/天, 夏季运输需要适当增加用量。
- 2) 选用密闭性较佳或厚度较厚的泡沫盒进行寄送。附带的文件说明, 请以夹链袋再装一次以免湿气毁损文件。宽版胶带缠绕密封泡沫盒即可寄出。



七、 石蜡包埋组织

(一)采集步骤

1. 取材固定：离体的组织不及时固定，组织就会自溶，抗原就会扩散。固定就是加入一些可以让蛋白质变性的物质（比如说甲醛），使得蛋白质的结构被固定住，不再发生变化，同时也不会再发生一些活性反应，这样才好做后续的染色步骤。常见固定液是 4% 的多聚甲醛和饱和苦味酸。根据不同目的、组织特征代表性取材。取的材料应该小而薄。便于固定剂迅速渗入内部，一般厚度不超过 2mm，大小不超过 5×5mm²。每个组织最好多切几块。新鲜组织固定（组织块不宜太大太厚，这样固定液很难进入里面，可能会导致在较短的时间内脱水不完全，引起一系列的问题，比如浸蜡不彻底，切片不好完成，切不完整。导致后来切片染色的脱落，造成染色的失败。组织块也不能太小，否则不能保证切片数量，且透明时间和浸蜡时间不能很好的把握。）固定时间因固定剂种类而异，大多 6-12 小时，一般不超过 12 小时。视组织固定的难易程度而定。后续如果做免疫组化，不应超过 12 小时；后续如果做 HE 染色，不应超过 24 小时。固定完之后用水洗（目的：洗去渗入组织的固定液，终止固定以免影响对组织的内结构的观察，分析。换液两次，一次半小时。）之后可直接脱水包埋或放入 75% 的乙醇 4 度可长期保存。
2. 脱水：从 75% 的乙醇中取出，分别放到 80%，90%，100% (I) 的乙醇中半小时，再放入 100% 乙醇中 15min。固定完直接水洗包埋的，应从 70% 乙醇开始，易碎组织从 50% 乙醇开始。组织脱水时间不应过长，尤其是高浓度乙醇，要特别注意控制时间。广告 包埋石蜡解决方案帮您确保正确的组织定位，避免出现热损坏并创造理想的组织块形状; 查看详情 >
3. 透明：透明的目的是置换组织内的脱水剂，为下一步浸蜡起到桥梁作用，二甲苯可以去除脂肪。乙醇+二甲苯 (1:1) 2h; 二甲苯 (I)，二甲苯 (II) 各 10min（根据组织的大小和透明的难易程度不同，透明的时间可以根据具体情况调整。颜色浅的组织表面油亮，可以透过光时效果较好，颜色较深的组织



至少边缘可以透光。类似于风干的杏肉。) 标本下来后, 尽快切好需要的部位, 放入已预冷的 PBS 中带到实验室进行后续包埋。

4. 浸蜡: 浸蜡目的是置换组织中的透明剂, 为包埋作准备。二甲苯+石蜡 (1:1) 2h; 石蜡 (I) 1h; 石蜡 (II) 2h. (浸蜡的时间也可以长一些)
5. 包埋: 在冰盒上进行, 将融好的纯蜡 (最好提前 4 小时以上开始融蜡, 新蜡更难融) 倒入蜡盒 (可以浸没组织就行, 大约蜡盒的三分之一) 由于蜡盒底部与冰盒接触, 底部的蜡会先凝固, 这样就可以把组织用镊子夹住立在底部。然后继续将蜡盒倒满, 便于切片机夹住蜡块。待蜡块完全凝固, 包埋就完成了。迅速用预冷的 PBS 溶液 (RNase free) 或生理盐水将组织表面的残留血液冲洗干净, 然后用干净的纱布或吸水纸将液体吸干净;

(二)石蜡包埋组织的保存及运输

1. 保存:
 - 1) 阴凉密封常温保存即可
 - 2) 随样品附带一份对应明细, 单独包装。
2. 样品的运输:
 - 1) 样品常温进行运输即可。
 - 2) 选用密闭性较佳或厚度较厚的泡沫盒进行寄送。附带的文件说明, 请以夹链袋再装一次以免湿气毁损文件。宽版胶带缠绕密封泡沫盒即可寄出。


八、附录

(一) 样本采集保存容器

1. 采血管

耗材	可选厂家	货号
真空采血管	美国 BD	367861
真空采血管	威高洁瑞	—



管盖颜色	可制备的标本类型	添加剂	要求
	PBMC	EDTA、NA ₂ EDTA 或 K ₂ EDTA	抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次

各种真空采血管头盖的颜色均为国际通用标准，试管上的标签有刻度线、取血量、有效期、内含添加剂物等说明。

2. 离心管 (1.5ml、2ml)

耗材	可选厂家	货号
1.5ml EP 管	Axygen	MCT-150-C

2ml EP 管	Axygen	MCT-200-C
----------	--------	-----------



3. 离心管 (15ml、50ml)

耗材	可选厂家	货号
15ml 离心管	Solarbio	YA0476
50ml 离心管	Solarbio	YA0471



4. 冻存管

耗材	可选厂家	货号
0.5ml 冻存管	Biologix	88-0050
1.5ml 冻存管	Biologix	88-9150



5. 包埋盒

耗材	可选厂家	货号
一次性石蜡包埋盒	Shandon	1220221918301841



(二) 常见不同规格培养瓶培养细胞量参考值

培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量 (参考值)
250ml 玻璃培养瓶	78	15.0	2×10 ⁷
100ml 玻璃培养瓶	37.5	10.0	6×10 ⁶
25ml 玻璃培养瓶	19	4.0	3×10 ⁶
75cm 塑料培养瓶	75	15-30	2×10 ⁷
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5×10 ⁶

(三) 常见不同规格培养皿培养细胞量参考值

培养器皿规格	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量 (参考值)
96 孔板	0.32	0.1	1×10 ⁵
24 孔板	2	1.0	5×10 ⁵
12 孔板	4.5	2.0	1×10 ⁶
6 孔板	9.6	2.5	2.5×10 ⁶
4 孔板	28	5.0	7×10 ⁶
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0×10 ⁶
6cm 培养皿	21	5.0	5.2×10 ⁶
9cm 培养皿	49	10.0	12.2×10 ⁶
10cm 培养皿	55	10.0	13.7×10 ⁶