

附件 1 项目序号 1 的具体需求参数

单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 参数

- 1) 样本接收与预处理: 术中或穿刺获取的肿瘤组织须在 30 分钟内置于预冷保存液, 2 小时内放入 -80°C 或液氮; 运输全程记录温度, 确保组织完整度; 到样后进行宏观形态检查并留影备案。
- 2) 单细胞制备与质控: 采用胶原酶 II/IV 与 DNase I 组合消化, 控制温和震荡时间以减少应激基因表达; 经 $40\text{ }\mu\text{m}$ 过滤并行双染活率检测, 活细胞比 $\geq 70\%$, 死细胞和红细胞比例分别 $< 10\%$; 样本批次间加入外源 ERCC spike-in 评估消化效率。
- 3) 建库与上机: 使用 10x Chromium Controller 单细胞微流控系统, 按照制造商 v3.1 标准流程制备 Gel-Beads in Emulsion; 内置 GEMQC 模块实时监控封装效率; DNA 片段分析仪验证 cDNA 长度分布; 每个样本单独上机, 避免 Index 跳跃。
- 4) 测序与质控: BGI/T7 运行, Raw 数据经 bcl-convert 转 fastq; 平均每细胞 Raw reads $\geq 100\text{ k}$, 过滤后有效 reads $\geq 90\%$; 整库 Q30 比例 $\geq 85\%$, 序列重复率 $< 10\%$ 。
- 5) 生信分析与交付: 使用 Cell Ranger v7.2 对人 GRCh38 参考组装进行比对与定量; 下游基于 Seurat/Scanpy 实施双重过滤 (UMI < 500 或线粒体基因百分比 $> 20\%$ 细胞将被剔除), 对潜在 doublets 进行 Scrublet 纠正; 分群后结合 CellMarker/HPA 数据库与文献 marker 进行注释; 输出差异表达、伪时序轨迹、细胞通讯 (CellPhoneDB)、CNV 推断 (inferCNV) 等分析结果; 交付内容含 fastq、bam、表达矩阵 h5ad、HTML 动态报告、分析脚本与参数清单, 并提供 30 天技术答疑支持。