**第2包 大动物、心梗手术及相关检测；人源化小鼠繁育**

**服务项目名称一：大动物、心梗手术及相关检测**

大动物（恒河猴/小型猪）：

所采购相关实验动物单位需具有实验动物生产/使用许可证。且造模单位需严格遵守动物福利要求，并提供国际AAALAC 组织认证/动物伦理委员会（IACUC）等相关认证材料。

技术参数及要求：

动物麻醉后于胸部左侧第3,4肋骨间开胸，暴露心脏，游离左冠状动脉左旋支根部，并进行结扎，以冠脉血流阻断后心电图ST段电压抬高0.1 mV以上确认心肌缺血。检测并记录动物冠脉左旋支血流阻断前至阻断后约4 h的ECG信号。缺血过程中如出现室颤，采用除颤仪进行除颤（10 J左右），同时通过静脉留置针再推入50mg胺碘酮，必要时静脉注射1.5 mg/kg盐酸利多卡因注射液，静脉注射0.25~0.5 mg盐酸肾上腺素注射液。

造模成功率：不低于90%，致死率不高于5%。

为确保模型成功率及稳定性，相关单位或其合作方需具备心电图、冠状动脉造影、心脏超声相关影像学电生理检测指标以及血清生物标志物、病理学检测能力，并提供过程中相关检测数据。

**服务项目名称二：人源化小鼠繁育**

## 技术参数及要求：

1. 供应商资质要求

1.1满足《中华人民共和国政府采购法》第二十二条规定；

1.2取得省科学技术行政部门颁发的实验动物使用许可证书。

1.2饲养管理操作

1.2.1饲养环境符合 SPF 级标准，保障小鼠的健康生长，最终提供的小鼠应符合SPF级小鼠质量标准，并随小鼠提供SPF级小鼠质量合格证。

1.2.2 对饲养过程中的各项数据进行详细记录，包括饲料消耗量、饮水消耗量、环境监测数据、小鼠健康状况等，保证人源化小鼠繁育过程中的各项动物福利。

1.3人员资质要求

1.3.1 技术团队由2名及以上硕士及以上学历的技术人员组成，核心人员在业内具有5年以上工作经验，具有多年的小鼠繁育专业生产团队作为技术支持，提供社保等相关证明。

1.3.2 项目团队中饲养繁育人员持有实验动物上岗证。

1.3.2在人源化小鼠繁育领域有丰富的经验，并提供资质/相关案例优先（商标注册证/论文或者期刊）。

1.4 动物房设施条件

1.4.1 具有严谨、科学、规范、统一的标准操作流程，并提供制度及标准操作规程/作业指导书清单。

1.4.2 具有与时俱进的配套设施，以及高标准、严要求的实验动物管理体系，各项作业过程和监测数据有完整、准确的记录；用于温湿度监控的探头经过相关强检、校准；周边环境定期消毒、灭鼠、杀虫等。

1.4.3 具有国际标准的微生物及遗传背景的质量控制能力，根据遗传学、微生物学、营养学和饲育环境方面的标准定期对实验动物进行质量监测，有合格的实验动物质量检测报告和每个季度实验动物遗传质量监测报告。

1.4.4获得全条件认证的AAALAC资质优先。

1.4.5 拥有SPF级别屏障动物房和可容纳不少于采购需求要求的大/小鼠笼位。

1.4.6 动物房集动物生产繁育、研发实验为一体，可提供包含基因编辑模式动物的开发与扩繁等技术服务项目。

1.4.7 具有小鼠快速扩繁（IVF）能力优先。

2. 技术特点

2.1可提供人源化繁育小鼠至少3年精子冻存。

2.2 每批次交付的小鼠需要提供小鼠质量合格证。

2.3 每两周一次邮件发送进度汇总及汇报（PPT），清楚知晓进展情况，如有问题实时沟通。

3.交付

3.1 交付时间：8-10个月

3.2 交付的形式及数量：人源化基因小鼠，根据项目进展交付小鼠不低于100只/每3个月，总计不低于500只。

3.3 最终可提供SPF级别的人源化繁育小鼠。

3.4 交付方式：专业运输车上门送达，免费运输。同时提供基因鉴定报告。

3.5 运输实验动物使用的转运工具和笼具，符合所运实验动物的微生物和环境质量控制标准，运输车及运输盒符合要求、温湿度达标、实时监控。

4. 售后服务

4.1 课题交付验收后可免费提供周一——周五9：00-17：00工作时间的售后服务和技术支持。免费进行疑难问题解答，并通过技术人员上门、往来信函、电话、传真、电子邮件等，解答客户遇到的各种技术问题。

4.2 如因投标人原因导致项目失败、质量不合格等，投标人承担全部责任并免费重新制备。

4.3提供与该课题相关的后续小鼠饲养方法。

4.4提供与该课题相关的后续小鼠交配和检测方案。

4.5提供甲方项目相关人员到乙方学习实践机会。

4.6 严格执行合同相关规定，对小鼠基因名称、制备设计方案、课题内容、支付条款等信息保密。

**第3包 大动物心衰模型及相关检测的技术服务**

服务内容：大动物心衰模型及相关检测的技术服务

技术规格具体要求：

# 实验目的和内容

## 实验目的

通过实验用巴马小型猪建立可靠的心衰动物模型，用于评估药物的疗效。

## 实验内容

本实验主要使用15只雌性巴马小型猪，其中5头作为正常对照（正常组），其余10头猪用于建立心力衰竭模型。对照组（n=5）喂食标准饮食；心力衰竭组（n=10）喂食含有高胆固醇 （1%），脂肪（21%），果糖（8.9%）和盐（2%）的定制饮食，并接受皮下植入醋酸脱氧皮质酮（DOCA）颗粒（50mg/kg，60天释放）。心衰组再随机分为对照组和人源化组，每四周进行体重、血压监测及采血进行生化检测，0周12周、20周进行心脏超声，12W、20W进行核磁及糖耐实验；第20W对多组织进行取材，留存样本。

# 实验动物及管理

## 基本情况

种属和品系：巴马小型猪

级别：普通级。

数量及性别：15只，雌性。

体重：10-15kg。

## 动物来源：需购自有行政主管部门签发的生产许可证的动物养殖机构。

## 实验动物饲养管理

2.3.1饲养设施：需具有行政主管部门签发的实验动物许可证（有效期内）。

2.3.3饲料：

名称：实验动物猪饲料，购买自有饲料生产许可证的单位。

给料方法：每日饲喂两次，自由采食。

2.3.2动物饲养的环境条件：

温度范围：16～26℃，日温差控制在≤4℃。

相对湿度：40～70%。

换气次数：机械送排风，8～10次/小时。

照度：动物照度100～200 Lx，工作照度≥200Lx。

明暗周期：人工照明12h明/12h暗。

2.3.4饮水：自由饮水

2.3.5 饲养密度：笼具为不锈钢猪专用饲养笼，单笼饲养。

饲养笼具的消毒：实验前，饲养动物用水瓶和食盒，笼架具和托盘等用具，擦拭后，自来水冲洗干净，然后用0.1%新洁尔灭溶液或0.5%的84消毒液喷洒或浸泡消毒30分钟进行清洁消毒，完毕后用自来水将消毒液冲洗干净后使用。

## 实验室消毒及管理

每次工作结束后，将地面及工作台进行冲洗消毒，并将工作服进行清洗和消毒。

人员资质：2名兽医以及2名以上具有10年以上实验动物丰富技术经验的技术人员。

# 实验方法与步骤

# 普通外科手术器械全套

高压蒸汽灭菌132～134℃15～20分钟，部分器械75%乙醇浸泡24小时灭菌。

# 麻醉药品

阿托品，舒泰，异氟烷。

# 动物识别

检疫期用动物预编号，动物笼具标牌上表明动物编号。检疫期结束动物分组后，将检疫期的标牌更换成正式编号标牌。用标牌上的档案号作为该动物的编号，同时将标牌号码制成标签粘贴于笼具。

# 动物接收和检疫

动物到达后，按照订购单的要求接收动物，检查供应商提供动物的相关检测证明材料，检查动物状况及档案记录。逐个检测每只动物的健康状况：包括精神状态、呼吸、行为活动、发育、营养状况、被毛、皮肤、眼、耳、鼻及口腔有无分泌物、大便性状、外阴部等，对不符合要求的动物视情况由兽医决定进行隔离治疗或退回或处死，与生产单位联系，并详细记录在实验记录纸上。对合格动物入检疫室进行进一步的检查，检疫期为1周。检疫合格后移至实验室内进行适应性饲养，开始进行实验。动物接收以及观察结束时称量体重一次。

实验用15只巴马小型猪手术前一天动物开始禁食，术前12小时禁食、禁水，麻醉前称体重。术前按0．05mg／kg剂量皮下注射阿托品。麻醉时使用舒泰诱导麻醉：剂量为0.1mg/kg体重，体重按照接收时体重进行计算。行气管插管，接入异氟烷维持麻醉。手术过程中，由技术人员监测动物麻醉状态，并根据动物的麻醉状态及时进行麻药追加。

# 术前准备

动物麻醉后仰卧绑定，开放静脉通道。监测血氧饱和度、心率、呼吸和体温。

# 手术操作

（1）在猪的颈部皮下选择手术部位。用手术刀切开皮肤（约2-3 cm），分离皮下组织。

（2）将DOCA缓释片或硅胶胶囊植入皮下。确保药物埋植位置合适，避免移动。

（3）使用可吸收缝合线缝合皮下组织。缝合皮肤切口，确保切口闭合良好。

（4）使用碘伏消毒切口区域。

# 术后处理

实验动物麻醉清醒后2小时即恢复饮食，置于动物饲养室中，常规饲料喂食。术后连续给抗生素2周。从第5周开始将模型组随机分为两组，一组为药物干预组，另一组给予相同体积的对照溶液作为对照组。

# 观察、评价指标

# 动物状况观察

观察并记录所有实验动物的外观体征、行为日常活动、体温、腺体分泌、呼吸、排泄物性状、饮食情况、排泄能力、体重、血压和死亡情况等并做好相应记录。

# 动物血生化检测

每四周采血留存血样，进行血糖，血脂，转氨酶、血清肌酐、尿素氮肝肾功能等指标的生化检测

# 动物心脏超声检测

0周、12周、20周进行心脏超声，无创评估心脏结构和功能。

# 动物核磁检测

12周、20周进行核磁检测，高分辨率评估心脏结构和功能。

# 动物糖耐实验

12周、20周进行糖耐实验，监测血糖变化。

# 动物取材

第20周处死，处死后采集试验动物的脑、心、肝、脾、肺、肾、骨骼肌、皮下脂肪等组织。各脏器称量并记录湿重，一部分福尔马林固定后保存，一部分冷冻保存。

1. 实验保障：

5.1 动物和饲料来源：所有实验动物和饲料均采购自具有生产许可证的厂家，来源明确，具有实验动物《质量合格证》和动物来源方以外的第三方检疫报告和生产合格证。

5.2人员保障：

（1）参加本实验人员需具有专业资质证书，并具有10年以上实验动物操作经验。

（2）对所有参加实验人员进行统一培训，熟悉掌握实验过程中的具体实施细则和操作规程。

（3）实验过程中，相关人员必须认真执行实验方案，对于对实验结果有重要影响的各项因素和指标（包括饲养条件和环境、手术操作、术后观察指标）要进行重点控制，在填写实验记录时应按填写要求规范填写，如实、详细、认真记录实验记录各项内容，以确保内容真实、可靠。

5.3环境保障：

（1）饲养室的内环境指标、实验动物笼具、垫料质量均符合国家标准，并定期清洗、灭菌、除尘, 定期更换。

（2）饲养人员根据动物营养需要，给予足够的饲料和清洁的饮水，其营养成分、微生物控制等指标符合国家标准。

5.4 仪器保障：具有实验开展所需要的动物麻醉设备，心电监护仪，超声仪，核磁，生化检测仪，血糖仪等。

1. 售后服务：

1）提供实验动物情况定期沟通服务。按照既定的时间节点，深入交流实验动物的健康状况、行为表现、生长发育等方面的信息，随时掌握实验动物的动态。

2）提供免费数据报告解读服务。由专业人员，运用专业知识和丰富经验，详细剖析数据报告中的各项指标、趋势以及潜在的价值点，从而获取数据背后的核心意义。

3）样本免费冷冻储藏服务。配备先进的冷冻设备和严格的样本管理体系，确保样本在低温环境下保持稳定的生物活性和理化性质，满足后续科研工作对样本的使用需求。

4）项目数据免费存储服务。对项目的原始数据进行加密存储，防止数据丢失和泄露。

5）本项目产生的全部原始数据，未经客户书面同意，禁止向任何第三方泄露。

**第4包 单细胞空间转录组及分析，空间代谢组学及代谢流分析**

技术要求

1、服务范围：单细胞转录组测序及分析，空间转录组测序及分析，空间代谢组学测序及分析，代谢流测序及分析

2、测序及分析平台技术指标

2.1单细胞转录组测序

采用10x Genomics平台进行单细胞转录组建库，每个样本需经流式处理，至少捕获10000个细胞；测序采用Illumina平台PE150，每个样本≥120G raw data，数据质量符合Q20≥95%， Q30≥85%。

2.2 空间转录组测序

采用10x visiumHD平台进行空间转录组建库，质检合格的文库采用Illumina Novaseq6000，双端150bp(PE150)的测序策略进行测序，测序量为200G/slice。

2.3 空间代谢组测序

采用大气压基质辅助激光/解吸电离—（AP）MALDI做为离子源，搭配Thermofisher Obitrap QE plus进行空间代谢组检测。按照送样指南要求送样，下机检测物数量需满足：单张切片鉴定物质在1000-2000+，不同样本类型可不同。

2.4 代谢流测序

采用LC-MS/MS的平台，利用稳定同位素示踪技术，检测下游代谢产物的同位素取代形式（M+0/ M+1/ M+2/ …），从而分析出该化合物在代谢通路中的流向和分布。可提供糖酵解途径、三羧酸循环、磷酸戊糖途径、尿素合成，核苷酸合成，长链脂肪酸等检测，

3、质检标准

3.1单细胞转录组测序

细胞活率 >90%；有核率＞75%；结团率 <7%；细胞浓度 800~1200 cells/μl；体积 >40μl； cDNA和文库质检标准：cDNA浓度 >1ng/μl，cDNA片段大小 200-9000bp，cDNA主峰 1000-2000bp，文库主峰 400-500bp。

3.2空间转录组测序

上机标准：

对于空间转录组样本，需要先进行RNA质检，合格后方可进行后续实验。RNA质检的标准为 DV200>30。除RNA质检外，空间转录组样本还需要进行HE染色切片后，确定切片区域.

下机数据标准：

一般以10x报告无报错为宜，部分指标符合以下要求：

a) Number of 8 µm binned squares under tissue  一般10w以上，与组织覆盖度、组织稀疏程度成正比

b) Mean reads per 8 µm bin ≥1000，与测序量相关

c) Mean UMIs per 8 µm bin ≥300，与组织类型相关

d) Total genes detected ≥18000, 与组织类型相关

3.3空间代谢组测序

检测标准：单张切片鉴定物质在1000-2000+，不同样本类型略有不同。具体标准如下：

人：肺癌1500-2000；胰腺肿瘤2000-4000；肾脏2000-2500；血管及主动脉1000-2000；皮肤2000-4000。

小鼠：脑组织1000-2000；心肌组织600-1500；胰腺1500-2000；肾2000-2500；脊髓2000-2500；肺1600-2000。

3.4 代谢流

可提供糖酵解途径、三羧酸循环、磷酸戊糖途径、尿素合成，核苷酸合成，长链脂肪酸等检测；可提供不同检测方案，视不同需求调整方案；需具备专业的数据分析团队，通过Matlab flux-8等软件进行原始数据处理，并进行PCA、柱状图、热力图、Bi-plot等分析。

4、数据交付

4.1 数据交付与周期

4.1.1 交付时间：自提交合格样品起计算，30个工作日内交付。

4.1.2 交付方式：数据报告，包括方法概述、检测结果及初步数据分析。

4.1.3 严格执行合同相关规定，对测试数据保密。

4.2、实验团队要求

4.2.1 具备在1h内完成单细胞原始数据质控、得到每个样本捕获细胞数及检测基因数的能力。具备在规定时间内完成空间转录组原始数据质控、对数据进行聚类并定义等功能分析的能力。具备大量的空间代谢及代谢流检测项目经验，可跟进不同需求调整设计实验方案。

4.2.2 团队项目参与人员在单细胞空转转录组及空间代谢研究中已经发表SCI论文（影响因子≥10分），需提供认证材料（论文首页）证明。

4.2.3 团队项目参与人员具备专业的生物信息和数据深度挖掘能力。

5、资质要求

5.1 具备相应项目实验经验和处理单细胞空间转录组学与空间代谢及代谢流的数据能力，以及对组学数据的解释说明的能力。

5.2 专业的生物信息和数据深度挖掘能力。

6、实施保障条件

6.1 具有短期处理大量样本，进行单细胞空间转录组测序及空间代谢组学测序的项目经验，有与多家国内外科研单位、医疗机构开展过单细胞空间多组学测序项目的深层次合作，并取得良好的结果与反馈；

6.2具有官方认证的单细胞空间多组学实验相关资质。

7、生物信息分析内容需要满足以下要求

7.1单细胞转录组测序

（1）对测序数据进行质控、比对和定量，获得单细胞表达谱矩阵，去除测序质量不达标的细胞。

（2）多样本的单细胞表达谱数据进行批次间整合，并去除技术噪音导致的批次差异（batch-effect）。

（3）单细胞表达谱数据进行聚类与降维，生成数据的二维展示（t-SNE、UMAP等多种算法）。

（4）细胞功能性亚群进行差异表达分析、特征基因鉴定和特征基因集的富集分析。

（5）对聚类结果进行细胞类型、功能的注释，或进行有监督细胞类型鉴别。

（6）使用多种工具填充单细胞转录组测序过程中转录本丢失（drop-out）事件。

（7）使用多种前沿工具进行分化或发育路径分析（trajectory inference），包括根据基因表达矩阵，进行基于拟时间（pseudo-time）的分析，基于未剪切RNA的单细胞表达谱计算RNA速率（RNA velocity）预测细胞状态的转化，利用线粒体变异推断单细胞谱系等。

（8）根据单细胞配体-受体基因的表达信息，构建细胞间相互作用网络。

7.2空间转录组测序

（1） 对测序数据进行质控、比对和定量，获得与组织切片位置对应Spot基因表达矩阵，去除其他位置的空位点。

（2） 对Spot基因表达矩阵进行标准化，然后选取Spot之间表达分布差异较大的基因集，零均值化数据，用于后续降维，聚类分析。

（3） 用零均值化矩阵进行降维，生成数据的二维展示（t-SNE、UMAP等多种算法）。

（4） 用零均值化矩阵进行聚类，得到Spot分群（聚类算法可选Louvain算法，Leiden算法等）。

（5） 比较Spot分群之间基因表达差异，鉴定差异表达基因。

（6） 根据差异表达基因做下游分析，如基因功能富集分析等。

（7） 对聚类结果进行细胞类型、功能的注释，或进行有监督细胞类型鉴别。

（8） 整合Spot表达矩阵和scRNA-seq表达矩阵，对每个Spot进行细胞类型打分，鉴定每个Spot可能的细胞类型，进行相互验证。

（9） 使用Giotto/SPOTlight/MIA等多种工具，解析每个Spot的细胞类型比例。

（10） 基因共表达与空间位置关联分析（scHOT或其他工具），揭示基因表达与空间位置的关系。

（11） 细胞相互作用。根据Spot表达矩阵，进行相互作用分析，绘制Spot之间显著相互作用的基因对，整合Spot的空间位置信息，筛选相互作用的基因对，相互验证。

7.3空间代谢组测序

（1）对数据进行定性（一级鉴定）和定量分析。定性分析包括使用8个数据库进行搜库和针对KEGG注释的Mummichog共表达分析校正。

（2）生成空间成像图，为后续分析提供基础。

（3）使用UMAP降维聚类、phenograph图聚类和KNN填充等方法，将切片划分为不同的region，进行空间分型（单细胞水平）。

（4）通过多元统计分析和单变量分析筛选差异物质，对组间进行差异代谢物分析；使用火山图、热图等常规可视化方法展示单个代谢物、2-3个代谢物的空间成像叠加图，以及多个代谢物的多离子空间成像矩阵图；生成单切片和多切片的多样本对比成像图。

（5）进行KEGG富集分析，了解差异代谢物的功能；将差异代谢物根据region内的表达模式进行聚类，称为pattern，然后统计各pattern之间共有特有代谢物，并对各pattern进行KEGG富集分析。

7.4 代谢流测序

（1）交付相对定量结果，即该种同位素形式占总和的百分比。根据检测项目评估是否可以做绝对定量，交付浓度结果。

（2）通过Matlab flux-8等软件进行原始数据处理，并进行PCA、柱状图、热力图、Bi-plot等分析。

8、售后服务

8.1 每周安排技术人员，生信科学家对项目进展进行定时汇报。并由专门生信科学家一对一负责该课题组生信分析服务项目。

8.2 提供用于发表文章要求的原始数据结果和图片。

8.3 数据验收合格后提供不少于2年的售后服务，在服务期内，免费进行疑难问题解答，对数据分析结果和相关软件产品进行使用指导，并通过技术人员上门、往来信函、电话、传真、电子邮件等方式，解答在使用中碰到的各种技术问题。

8.4 保证实验数据的可靠性，对数据的生物学解释承担责任。对于质检合格，实验失败的样本，给与免费重新检测。