

生工[®] Sangon Biotech



生工高通量测序部送样手册 (多组学类项目)

生工生物工程(上海)股份有限公司

目录

1. 多组学类项目送样要求.....	3
1.1 转录组+蛋白组.....	3
1.1.1 各样本类型对应的送样要求.....	3
1.1.2 取样流程.....	3
1.2 转录组+代谢组.....	9
1.2.1 各样本类型对应的送样要求.....	9
1.2.2 取样流程.....	9
1.3 转录组+蛋白组+代谢组.....	14
1.3.1 各样本类型对应的送样要求.....	14
1.3.2 取样流程.....	15
1.4 微生物多样性+代谢组.....	21
1.4.1 各样本类型对应的送样要求.....	21
1.4.2 取样流程.....	21
1.4.3 注意事项.....	25
1.5 宏基因组+代谢组.....	25
1.5.1 各样本类型对应的送样要求.....	25
1.5.2 取样流程.....	26
1.5.3 注意事项.....	29
2. 样本准备注意事项.....	30
3. 样本寄送注意事项.....	30

1. 多组学类项目送样要求

1.1 转录组+蛋白组

1.1.1 各样本类型对应的送样要求

项目类型	样本类型	需求量 (每重复送样量)	生物学重复数
蛋白组 (TMT/Label free/DIA)	动物组织	100mg (动物毛发等需 200mg)	≥ 3 个, 临床样本 ≥ 10 个
	植物组织 (茎、叶、花; 木本植物树 根、树皮、树枝等; 草本科 植物, 藻类, 大型真菌等)	500mg (果实, 种子, 花粉需 100mg)	
	血清/血浆	> 100ul	
	细胞	1×10^7	
	微生物	1×10^8 (干重 500mg)	
转录组	动物组织	200mg (不低于 100mg), 脂肪和骨头类样本至少 400mg	
	植物组织	300mg (不低于 200mg), 根系和种子等样本至少 400mg	
	新鲜全血	≥ 3mL (至少 1mL)	
	细胞	5×10^6	
	微生物	5×10^6 或 200mg	

备注: 1) 多组学研究样本需保持一致, 每个分组至少含有三个样本; 2) 多组学研究需分管送样

1.1.2 取样流程

样本收集:

1) 组织类 (动物组织/植物组织)

A. 新鲜动物组织液氮速冻送样 (推荐)

- ① 新鲜组织离体后, 立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型, 如果组织体积较大, 应尽量将组织剪切成宽高均 ≤ 0.5 cm 的小块 (约绿豆大小);

- ② 迅速用预冷的生理盐水或 PBS 将组织洗涤干净, 并用无尘纸吸干水分, 置于 1.5ml 或 2ml 的离心管中液氮速冻;

B. 新鲜动物组织 RNA later 保存送样 (仅限转录组测序项目, 请严格按照保存液说明书操作)

- ① 对一些临床组织样品, 由于条件限制无法立即使用液氮速冻保存, 为了保证后续提取 RNA 的完整性, 可以使用 RNA later 保存;
- ② 组织离体后需要立即分割、剪切成小块 (绿豆大小);
- ③ 用预冷的生理盐水或 PBS 去除血渍和污物, 放入预装有 RNA later (RNA 组织保存试剂) 的 1.5ml 或 2.0ml RNase-free EP 管或螺旋管中, 后续操作按照说明书进行。

C. 新鲜植物组织

地上部分 (花、茎、叶等)

- ① 幼嫩叶片和花瓣等组织直接取样, 装进 15ml 或 50ml 离心管;
- ② 较大叶片需要用剪刀快速剪碎后装入 15ml 或 50ml 离心管。

地下组织 (根、块茎等)

- ① 分离出样本后, 快速用灭菌水清洗 (若无法达到条件, 用普通水代替), 用吸水纸吸走多余的水分后, 快速装进 15ml 或 50ml 离心管;
- ② 如遇块根等组织, 需要用工具切成 1-2cm 大小块状才可以装入离心管。

果肉组织:

利用工具将果肉切成 1-2cm 块状大小, 快速装进 15ml 或 50ml 离心管。

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min (组织量较多可适当延长速冻时间), 然后转移至 -80 °C 冰箱或液氮中保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 使用液氮速冻取样, 请在组织离体 3~5min 内完成所有取样操作, 以防止取样时间过

长导致组织样本中 RNA 降解;

- ② 使用液氮速冻取样, 不建议取样完成后放入锡箔纸中保存, 请置于 1.5ml 或 2ml EP 管或螺旋管中保存;
- ③ 离心管盖应盖好, 最好用封口膜密封, 防止样本运输过程中管盖松落造成样本交叉污染。

2) 血液类

样本收集:

A.未冻存过的抗凝血新鲜全血

- ① 未冻存过的抗凝血新鲜全血, 抗凝剂不可使用肝素钠, 可用 EDTA 或 ACD 抗凝剂。
- ② 取血后摇晃管子使血液与抗凝剂充分混匀。

B.冻存血液

- ① 直接用 EDTA 抗凝管抽血, 边抽边轻摇, 使血液和抗凝剂充分混合;
- ② 抽出一部分和 TRizol 混匀, 200 微升全血加入到 1 毫升 trizol 里, TRizol 和血的大概比例=5: 1, 吹打混匀, 不要有血块;

C.分离白细胞或者有核细胞

- ① 在已加入抗凝剂(推荐 EDTA, 禁止使用肝素) 的新鲜全血中加入等体积 PBS(1×), 充分混匀;
- ② 缓慢转入另一已加入淋巴细胞分离液的离心管中, 并使上述混合液处于淋巴细胞分离液液面之上(即两种液体不要混合, 保留清晰的接口);
- ③ 4°C 条件下 3000g 离心 30min; 用移液器小心分离出白细胞层;
- ④ 用 PBS(1×) 清洗白细胞, 离心后弃去上清;
- ⑤ 按全血: TRizol 为 2:1 的比例加入适量 TRizol 试剂, 并将细胞团吹打散, 或者激烈震荡混匀, 使细胞完全溶于 TRizol 中充分裂解。

D.血清

用含有促凝剂的血清分离胶采血管(常用品牌推荐: BD) 采集血样, 室温静置(注意: 不能振摇采血管) 60 min 使其凝结后, 4°C 条件下 3000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液(即血清) 200μL 分装于合适的已编号的 2mL 离心管中。

E.血浆

用含有 EDTA 或肝素钠的采血管采集血液后(微生物组不能使用肝素钠抗凝), 立即轻轻颠倒混匀, 在 4°C 条件下 3000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液(即血浆) 200μL 置于合适的已编号的 2mL 离心管中。

样本保存:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 4 °C 短暂保存;
- ② **冻存血液/分离白细胞或者有核细胞/血清/血浆:** 迅速置于液氮中冷冻 10 min 左右, 然后转移至 -80°C 或液氮中长期保存;

样本寄送:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 以冰袋保存运输, 注意血液样本不要与冰袋直接接触, 不能使血液冻结;
- ② **冻存血液/分离白细胞或者有核细胞/血清/血浆:** 预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 从取血之时开始计算, 须在 72 小时之内送达生工上海总部高通量测序部。寄出时务必电话联系我们并将快递单号发给我们, 以及时收样并安排提取。请尽量确保样品不要在休息日到达生工上海总部, 以免耽误样品处理, 造成 RNA 降解;
- ② **冻存全血:** 送样时需和相关人员明确已添加 TRIzol;
- ③ **分离白细胞或者有核细胞:** 需在血液采集后半小时内分离白细胞及有核细胞; 送样时需和相关人员明确已添加 TRIzol。
- ④ 血液样本采血后需在 30 min 内尽快离心分离出血浆, 若不能尽快离心, 采集的血液需放在 4°C 冰箱保存, 并必须在 8 h 内完成离心及分装。
- ⑤ 建议尽量多收集样本并使用 2mL 离心管分装冻存, 切记避免反复冻融。

3) 细胞类**样本收集:****A. 悬浮细胞**

- ① 选取生长状态良好的细胞悬液
- ② 200-1000g 离心 5-10min, 弃培养基, 得到细胞沉淀;
- ③ 加入适量 RNase-Free 水配制的 1×PBS 后, 宽口枪头轻柔吹打重悬细胞沉淀, 然后用 200g

离心 5min, 弃 PBS, 重复一次;

④对于转录组测序项目不建议直接寄送细胞沉淀样本, 还需向细胞沉淀中额外加入适量 TriZol 裂解液反复吹打至充分裂解 (以 TriZol 为例, 10-15cm 的大皿, 每次先添加 1-2mL, 吹打混匀, 裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠, 流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分, 需添加裂解液, 每次添加的量建议为 100 μ L 左右持续添加, 直到液体不粘稠为止)。

B.贴壁细胞

转录组项目操作步骤如下:

- ① 从培养箱取出贴壁生长细胞, 显微镜下观察细胞确定生长状态良好弃培养基;
- ② 小心加入与培养基等体积的无酶水配制的 1 \times PBS 后, 平放 1min 洗涤细胞, 然后弃去 PBS, 重复一次 (注意在在无菌条件下打开培养瓶 (皿) 盖子)
- ③ 加入适量裂解液反复吹打至充分裂解 (以 TriZol 为例, 10-15cm 的大皿, 每次先添加 1-2mL, 吹打混匀, 裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠, 流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分, 需添加裂解液, 每次添加的量建议为 100 μ L 左右持续添加, 直到液体不粘稠为止)

蛋白组项目操作步骤如下:

- ① 吸出细胞培养液, 去除培养基
- ② 用预冷的 PBS 溶液快速清洗 2~3 次后, 加入少许 PBS 溶液, 用细胞刮将细胞轻轻刮下, 转移到离心管中
- ③ 4 $^{\circ}$ C, 300g-500g 离心 5min,弃上清, 用预冷的 PBS 溶液清洗, 4 $^{\circ}$ C, 1000g 低速离心 5min, 弃去上清
- ④ 再次用 PBS 溶液清洗, 并对含 PBS 细胞悬液进行计数;
- ⑤ 取 1 \times 10⁷ cell/sample 细胞悬浮液于 2mL 无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 1000g 低速离心 10min, 弃上清。

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min (组织量较多可适当延长速冻时间), 然后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱或液氮中保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融，防备部分样品降解重新取材、制备或送样，建议样品按需多管分装存储，至少备份 1-2 份。

注意事项：

- ① 如细胞样本与其它物种共培养，请您提前沟通，并在送样信息单中填写清楚。
- ② 细胞收集实验过程中使用的试剂耗材必须是 RNase-free 的，请尽可能在超净工作台上进行操作，以防止污染

4) 微生物

样本收集：

1) 液体培养基菌种收集

- ① 挑取单菌落于 50 mL 液体培养基中，适宜温度培养过夜，并在对数生长期进行菌体采集；
- ② 培养好的菌液适量转入合适的离心管中，高速离心收集菌体，弃去上层培养基；

2) 固体或半固体培养菌

涂布平板培养的微生物，在菌体生产最旺盛时期用灭菌后的勺子在平板中刮下，置于 1.5 或 2.0ml 的离心管中；

样本保存：

迅速置于液氮中冷冻 10 min 左右，然后转移至 -80°C 或液氮中长期保存；

样本寄送：

预约干冰进行样品寄送，由于温度不同，干冰挥发程度不同，建议按照 5kg/ 天计算，一般时效性在 3 天，约需要 15-20kg 干冰，准备足量的干冰，避免冻融。

样本备份：

为避免多个实验造成样本反复冻融，防备部分样品降解重新取材、制备或送样，建议样品按需多管分装存储，至少备份 1-2 份。

注意事项：

- ① 若菌体离心管为 1.5-2 mL 的小量程，建议在外层套上 50 mL 的大离心管，以防止小管子冻裂菌体被污染；
- ② 菌样送样前建议做物种鉴定

1.2 转录组+代谢组

1.2.1 各样本类型对应的送样要求

项目类型	样本类型	需求量 (每重复送样量)	生物学重复数
代谢组	动物组织	200mg (最少 100mg)	≥6 个 (至少 3 个), ; 临床样本 ≥ 10 个
	植物组织	200mg (果实, 种子需 500mg)	
	血清/血浆	200-300ul	
	细胞	1×10^7	
	微生物	1×10^8	
转录组	动物组织	200mg (不低于 100mg), 脂肪和骨头类样本至少 400mg	≥3 个, 临床样本 ≥10 个
	植物组织	300mg (不低于 200mg), 根系和种子等样本至少 400mg	
	新鲜全血	≥3mL (至少 1mL)	
	细胞	5×10^6	
	微生物	5×10^6 或 200mg	

备注: 1) 多组学研究样本需保持一致, 每个分组至少含有三个样本; 2) 多组学研究需分管送样

1.2.2 取样流程

1) 组织类 (动物组织/植物组织)

样本收集:

A. 新鲜动物组织液氮速冻送样 (推荐)

- ① 新鲜组织离体后, 立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型, 如果组织体积较大, 应尽量将组织剪切成宽高均 ≤0.5 cm 的小块 (约绿豆大小);
- ② 迅速用预冷的生理盐水或 PBS 将组织洗涤干净, 并用无尘纸吸干水分, 置于 1.5ml 或 2ml 的离心管中液氮速冻;

B. 新鲜动物组织 RNA later 保存送样 (仅限转录组测序项目, 请严格按照保存液说明书操作)

- ① 对一些临床组织样品, 由于条件限制无法立即使用液氮速冻保存, 为了保证后续提取

RNA 的完整性, 可以使用 RNA later 保存;

- ② 组织离体后需要立即分割、剪切成小块 (绿豆大小);
- ③ 用预冷的生理盐水或 PBS 去除血渍和污物, 放入预装有 RNA later (RNA 组织保存试剂) 的 1.5ml 或 2.0ml RNase-free EP 管或螺旋管中, 后续操作按照说明书进行。

C. 新鲜植物组织

地上部分 (花、茎、叶等)

- ① 幼嫩叶片和花瓣等组织直接取样, 装进 15ml 或 50ml 离心管;
- ② 较大叶片需要用剪刀快速剪碎后装入 15ml 或 50ml 离心管。

地下组织 (根、块茎等)

- ① 分离出样本后, 快速用灭菌水清洗 (若无法达到条件, 用普通水代替), 用吸水纸吸走多余的水分后, 快速装进 15ml 或 50ml 离心管;
- ② 如遇块根等组织, 需要用工具切成 1-2cm 大小块状才可以装入离心管。

果肉组织:

利用工具将果肉切成 1-2cm 块状大小, 快速装进 15ml 或 50ml 离心管。

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min (组织量较多可适当延长速冻时间), 然后转移至 -80 °C 冰箱或液氮中保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 使用液氮速冻取样, 请在组织离体 3~5min 内完成所有取样操作, 以防止取样时间过长导致组织样本中 RNA 降解;
- ② 使用液氮速冻取样, 不建议取样完成后放入锡箔纸中保存, 请置于 1.5ml 或 2ml EP 管或螺旋管中保存;
- ③ 离心管盖应盖好, 最好用封口膜密封, 防止样本运输过程中管盖松落造成样本交叉污染。

2) 血液类

样本收集:**A.未冻存过的抗凝血新鲜全血**

- ① 未冻存过的抗凝血新鲜全血, 抗凝剂不可使用肝素钠, 可用 EDTA 或 ACD 抗凝剂。
- ② 取血后摇晃管子使血液与抗凝剂充分混匀。

B.冻存血液

- ① 直接用 EDTA 抗凝管抽血, 边抽边轻摇, 使血液和抗凝剂充分混合;
- ② 抽出一部分和 TRIzol 混匀, 200 微升全血加入到 1 毫升 trizol 里, TRIzol 和血的大概比例=5: 1, 吹打混匀, 不要有血块;

C.分离白细胞或者有核细胞

- ① 在已加入抗凝剂(推荐 EDTA, 禁止使用肝素) 的新鲜全血中加入等体积 PBS(1×), 充分混匀;
- ② 缓慢转入另一已加入淋巴细胞分离液的离心管中, 并使上述混合液处于淋巴细胞分离液液面之上(即两种液体不要混合, 保留清晰的接口);
- ③ 4℃条件下 3000g 离心 30min; 用移液器小心分离出白细胞层;
- ④ 用 PBS(1×) 清洗白细胞, 离心后弃去上清;
- ⑤ 按全血: TRIzol 为 2:1 的比例加入适量 TRIzol 试剂, 并将细胞团吹打散, 或者激烈震荡混匀, 使细胞完全溶于 TRIzol 中充分裂解。

D.血清

用含有促凝剂的血清分离胶采血管(常用品牌推荐: BD) 采集血样, 室温静置(注意: 不能振摇采血管) 60 min 使其凝结后, 4℃条件下 3000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液(即血清) 200μL 分装于合适的已编号的 2mL 离心管中。

E.血浆

用含有 EDTA 或肝素钠的采血管采集血液后(微生物组不能使用肝素钠抗凝), 立即轻轻颠倒混匀, 在 4℃条件下 3000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液(即血浆) 200μL 置于合适的已编号的 2mL 离心管中。

样本保存:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 4℃短暂保存;
- ② **冻存血液/分离白细胞或者有核细胞/血清/血浆:** 迅速置于液氮中冷冻 10 min 左右, 然后转移至-80℃或液氮中长期保存;

样本寄送:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血**: 以冰袋保存运输, 注意血液样本不要与冰袋直接接触, 不能使血液冻结;
- ② **冻存血液/分离白细胞或者有核细胞/血清/血浆**: 预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血**: 从取血之时开始计算, 须在 72 小时之内送达生工上海总部高通量测序部。寄出时务必电话联系我们将快递单号发给我们, 以及时收样并安排提取。请尽量确保样品不要在休息日到达生工上海总部, 以免耽误样品处理, 造成 RNA 降解;
- ② **冻存全血**: 送样时需和相关人员明确已添加 TRIzol;
- ③ **分离白细胞或者有核细胞**: 需在血液采集后半小时内分离白细胞及有核细胞; 送样时需和相关人员明确已添加 TRIzol。
- ④ 血液样本采血后需在 30 min 内尽快离心分离出血浆, 若不能尽快离心, 采集的血液需放在 4°C 冰箱保存, 并必须在 8 h 内完成离心及分装。
- ⑤ 建议尽量多收集样本并使用 2mL 离心管分装冻存, 切记避免反复冻融。

3) 细胞类

样本收集:

A. 悬浮细胞

- ① 选取生长状态良好的细胞悬液
- ② 200-1000g 离心 5-10min, 弃培养基, 得到细胞沉淀;
- ③ 加入适量 RNase-Free 水配制的 1×PBS 后, 宽口枪头轻柔吹打重悬细胞沉淀, 然后用 200g 离心 5min, 弃 PBS, 重复一次;
- ④ 对于转录组测序项目不建议直接寄送细胞沉淀样本, 还需向细胞沉淀中额外加入适量 TriZol 裂解液反复吹打至充分裂解(以 TriZol 为例, 10-15cm 的大皿, 每次先添加 1-2mL, 吹打混匀, 裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠, 流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分, 需添加裂解液, 每次添加的量建议为 100μL 左右持续添加, 直到液

体不粘稠为止)。

B.贴壁细胞

转录组项目操作步骤如下:

- ① 从培养箱取出贴壁生长细胞, 显微镜下观察细胞确定生长状态良好弃培养基;
- ② 小心加入与培养基等体积的无酶水配制的 1×PBS 后, 平放 1min 洗涤细胞, 然后弃去 PBS, 重复一次 (注意在在无菌条件下打开培养瓶 (皿) 盖子)
- ③ 加入适量裂解液反复吹打至充分裂解 (以 TriZol 为例, 10-15cm 的大皿, 每次先添加 1-2mL, 吹打混匀, 裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠, 流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分, 需添加裂解液, 每次添加的量建议为 100 μ L 左右持续添加, 直到液体不粘稠为止)

代谢组项目操作步骤如下:

- ① 吸出细胞培养液, 去除培养基
- ② 用预冷的 PBS 溶液快速清洗 2~3 次后, 加入少许 PBS 溶液, 用细胞刮将细胞轻轻刮下, 转移到离心管中
- ③ 4 $^{\circ}$ C, 300g-500g 离心 5min, 弃上清, 用预冷的 PBS 溶液清洗, 4 $^{\circ}$ C, 1000g 低速离心 5min, 弃去上清
- ④ 再次用 PBS 溶液清洗, 并对含 PBS 细胞悬液进行计数;
- ⑤ 取 1 \times 10⁷ cell/sample 细胞悬浮液于 2mL 无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 1000g 低速离心 10min, 弃上清。

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min (组织量较多可适当延长速冻时间), 然后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱或液氮中保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 如细胞样本与其它物种共培养, 请您提前沟通, 并在送样信息单中填写清楚。

- ② 细胞收集实验过程中使用的试剂耗材必须是 RNase-free 的, 请尽可能在超净工作台上进行操作, 以防止污染

4) 微生物

样本收集:

1) 液体培养基菌种收集

- ① 挑取单菌落于 50 mL 液体培养基中, 适宜温度培养过夜, 并在对数生长期进行菌体采集;
- ② 培养好的菌液适量转入合适的离心管中, 高速离心收集菌体, 弃去上层培养基;

2) 固体或半固体培养菌

涂布平板培养的微生物, 在菌体生产最旺盛时期用灭菌后的勺子在平板中刮下, 置于 1.5 或 2.0ml 的离心管中;

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 10 min 左右, 然后转移至 -80°C 或液氮中长期保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 若菌体离心管为 1.5-2 mL 的小量程, 建议在外层套上 50 mL 的大离心管, 以防止小管子冻裂菌体被污染;
- ② 菌样送样前建议做物种鉴定

1.3 转录组+蛋白组+代谢组

1.3.1 各样本类型对应的送样要求

项目类型	样本类型	需求量 (每重复送样量)	生物学重复数
	动物组织	100mg (动物毛发等需 200mg)	

蛋白组 (TMT/Label free/DIA)	植物组织 (茎、叶、花; 木本植物 树根、树皮、树枝等; 草 本科植物, 藻类, 大型真 菌等)	500mg (果实, 种子, 花粉需 100mg)	≥3 个, 临床样本 ≥10 个
	血清/血浆	> 100ul	
	细胞	1×10^7	
	微生物	1×10^8 (干重 500mg)	
转录组	动物组织	200mg (不低于 100mg), 脂肪和骨头类样本至少 400mg	
	植物组织	300mg (不低于 200mg), 根系和种子等样本至少 400mg	
	新鲜全血	≥3mL (至少 1mL)	
	细胞	5×10^6	
	微生物	5×10^6 或 200mg	
代谢组	动物组织	200mg (最少 100mg)	≥6 (至少 3 个), 临床样本 ≥10 个
	植物组织	200mg (果实, 种子需 500mg)	
	血清/血浆	200-300ul	
	细胞	1×10^7	
	微生物	1×10^8	

备注: 1) 多组学研究样本需保持一致, 每个分组至少含有三个样本; 2) 多组学研究需分管送样

1.3.2 取样流程

1) 组织类 (动物组织/植物组织)

样本收集:

A. 新鲜动物组织液氮速冻送样 (推荐)

- ① 新鲜组织离体后, 立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型, 如果组织体积较大, 应尽量将组织剪切成宽高均 ≤0.5 cm 的小块 (约绿豆大小);

- ② 迅速用预冷的生理盐水或 PBS 将组织洗涤干净, 并用无尘纸吸干水分, 置于 1.5ml 或 2ml 的离心管中液氮速冻;

B.新鲜动物组织 RNA later 保存送样 (仅限转录组测序项目, 请严格按照保存液说明书操作)

- ① 对一些临床组织样品, 由于条件限制无法立即使用液氮速冻保存, 为了保证后续提取 RNA 的完整性, 可以使用 RNA later 保存;
- ② 组织离体后需要立即分割、剪切成小块 (绿豆大小);
- ③ 用预冷的生理盐水或 PBS 去除血渍和污物, 放入预装有 RNA later (RNA 组织保存试剂) 的 1.5ml 或 2.0ml RNase-free EP 管或螺旋管中, 后续操作按照说明书进行。

C.新鲜植物组织

地上部分 (花、茎、叶等)

- ① 幼嫩叶片和花瓣等组织直接取样, 装进 15ml 或 50ml 离心管;
- ② 较大叶片需要用剪刀快速剪碎后装入 15ml 或 50ml 离心管。

地下组织 (根、块茎等)

- ① 分离出样本后, 快速用灭菌水清洗 (若无法达到条件, 用普通水代替), 用吸水纸吸走多余的水分后, 快速装进 15ml 或 50ml 离心管;
- ② 如遇块根等组织, 需要用工具切成 1-2cm 大小块状才可以装入离心管。

果肉组织:

利用工具将果肉切成 1-2cm 块状大小, 快速装进 15ml 或 50ml 离心管。

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min (组织量较多可适当延长速冻时间), 然后转移至 -80 °C 冰箱或液氮中保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 使用液氮速冻取样, 请在组织离体 3~5min 内完成所有取样操作, 以防止取样时间过

长导致组织样本中 RNA 降解;

- ② 使用液氮速冻取样, 不建议取样完成后放入锡箔纸中保存, 请置于 1.5ml 或 2ml EP 管或螺旋管中保存;
- ③ 离心管盖应盖好, 最好用封口膜密封, 防止样本运输过程中管盖松落造成样本交叉污染。

2) 血液类

样本收集:

A.未冻存过的抗凝血新鲜全血

- ① 未冻存过的抗凝血新鲜全血, 抗凝剂不可使用肝素钠, 可用 EDTA 或 ACD 抗凝剂。
- ② 取血后摇晃管子使血液与抗凝剂充分混匀。

B.冻存血液

- ① 直接用 EDTA 抗凝管抽血, 边抽边轻摇, 使血液和抗凝剂充分混合;
- ② 抽出一部分和 TRizol 混匀, 200 微升全血加入到 1 毫升 trizol 里, TRizol 和血的大概比例=5: 1, 吹打混匀, 不要有血块;

C.分离白细胞或者有核细胞

- ① 在已加入抗凝剂(推荐 EDTA, 禁止使用肝素) 的新鲜全血中加入等体积 PBS(1×), 充分混匀;
- ② 缓慢转入另一已加入淋巴细胞分离液的离心管中, 并使上述混合液处于淋巴细胞分离液液面之上(即两种液体不要混合, 保留清晰的接口);
- ③ 4°C 条件下 3000g 离心 30min; 用移液器小心分离出白细胞层;
- ④ 用 PBS(1×) 清洗白细胞, 离心后弃去上清;
- ⑤ 按全血: TRizol 为 2:1 的比例加入适量 TRizol 试剂, 并将细胞团吹打散, 或者激烈震荡混匀, 使细胞完全溶于 TRizol 中充分裂解。

D.血清

用含有促凝剂的血清分离胶采血管(常用品牌推荐: BD) 采集血样, 室温静置(注意: 不能振摇采血管) 60 min 使其凝结后, 4°C 条件下 3000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液(即血清) 200μL 分装于合适的已编号的 2mL 离心管中。

E.血浆

用含有 EDTA 或肝素钠的采血管采集血液后(微生物组不能使用肝素钠抗凝), 立即轻轻颠倒混匀, 在 4°C 条件下 3000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液(即血浆) 200μL 置于合适的已编号的 2mL 离心管中。

样本保存:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 4 °C 短暂保存;
- ② **冻存血液/分离白细胞或者有核细胞/血清/血浆:** 迅速置于液氮中冷冻 10 min 左右, 然后转移至 -80°C 或液氮中长期保存;

样本寄送:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 以冰袋保存运输, 注意血液样本不要与冰袋直接接触, 不能使血液冻结;
- ② **冻存血液/分离白细胞或者有核细胞/血清/血浆:** 预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① **未冻存过的抗凝血新鲜全血:** 从取血之时开始计算, 须在 72 小时之内送达生工上海总部高通量测序部。寄出时务必电话联系我们并将快递单号发给我们, 以及时收样并安排提取。请尽量确保样品不要在休息日到达生工上海总部, 以免耽误样品处理, 造成 RNA 降解;
- ② **冻存全血:** 送样时需和相关人员明确已添加 TRIzol;
- ③ **分离白细胞或者有核细胞:** 需在血液采集后半小时内分离白细胞及有核细胞; 送样时需和相关人员明确已添加 TRIzol。
- ④ 血液样本采血后需在 30 min 内尽快离心分离出血浆, 若不能尽快离心, 采集的血液需放在 4°C 冰箱保存, 并必须在 8 h 内完成离心及分装。
- ⑤ 建议尽量多收集样本并使用 2mL 离心管分装冻存, 切记避免反复冻融。

3) 细胞类**样本收集:****A. 悬浮细胞**

- ① 选取生长状态良好的细胞悬液
- ② 200-1000g 离心 5-10min, 弃培养基, 得到细胞沉淀;
- ③ 加入适量 RNase-Free 水配制的 1×PBS 后, 宽口枪头轻柔吹打重悬细胞沉淀, 然后用

200g 离心 5min, 弃 PBS, 重复一次;

- ④ 对于转录组测序项目不建议直接寄送细胞沉淀样本, 还需向细胞沉淀中额外加入适量 TriZol 裂解液反复吹打至充分裂解 (以 TriZol 为例, 10-15cm 的大皿, 每次先添加 1-2mL, 吹打混匀, 裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠, 流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分, 需添加裂解液, 每次添加的量建议为 100 μ L 左右持续添加, 直到液体不粘稠为止)。

B.贴壁细胞

转录组项目操作步骤如下:

- ① 从培养箱取出贴壁生长细胞, 显微镜下观察细胞确定生长状态良好弃培养基;
- ② 小心加入与培养基等体积的无酶水配制的 1 \times PBS 后, 平放 1min 洗涤细胞, 然后弃去 PBS, 重复一次 (注意在在无菌条件下打开培养瓶 (皿) 盖子)
- ③ 加入适量裂解液反复吹打至充分裂解 (以 TriZol 为例, 10-15cm 的大皿, 每次先添加 1-2mL, 吹打混匀, 裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠, 流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分, 需添加裂解液, 每次添加的量建议为 100 μ L 左右持续添加, 直到液体不粘稠为止)

蛋白组/代谢组项目操作步骤如下:

- ① 吸出细胞培养液, 去除培养基
- ② 用预冷的 PBS 溶液快速清洗 2~3 次后, 加入少许 PBS 溶液, 用细胞刮将细胞轻轻刮下, 转移到离心管中
- ③ 4 $^{\circ}$ C, 300g-500g 离心 5min,弃上清, 用预冷的 PBS 溶液清洗, 4 $^{\circ}$ C, 1000g 低速离心 5min, 弃去上清
- ④ 再次用 PBS 溶液清洗, 并对含 PBS 细胞悬液进行计数;
- ⑤ 取 1 \times 10⁷ cell/sample 细胞悬浮液于 2mL 无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 1000g 低速离心 10min, 弃上清。

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min (组织量较多可适当延长速冻时间), 然后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱或液氮中保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 如细胞样本与其它物种共培养, 请您提前沟通, 并在送样信息单中填写清楚。
- ② 细胞收集实验过程中使用的试剂耗材必须是 RNase-free 的, 请尽可能在超净工作台上进行操作, 以防止污染。

4) 微生物**样本收集:****1) 液体培养基菌种收集**

- ① 挑取单菌落于 50 mL 液体培养基中, 适宜温度培养过夜, 并在对数生长期进行菌体采集;
- ② 培养好的菌液适量转入合适的离心管中, 高速离心收集菌体, 弃去上层培养基;

2) 固体或半固体培养菌

涂布平板培养的微生物, 在菌体生产最旺盛时期用灭菌后的勺子在平板中刮下, 置于 1.5 或 2.0ml 的离心管中;

样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 10 min 左右, 然后转移至 -80°C 或液氮中长期保存;

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

注意事项:

- ① 若菌体离心管为 1.5-2 mL 的小量程, 建议在外层套上 50 mL 的大离心管, 以防止小管子冻裂菌体被污染;
- ② 菌样送样前建议做物种鉴定

1.4 微生物多样性+代谢组

1.4.1 各样本类型对应的送样要求

样本类型	建议送样量	最低送样量	生物学重复
土壤/污泥/沉积物/固体半 固体发酵物/混合菌体	2g	0.5g	至少 3 个, 有 条件做到 6 个 比较合适, 临 床样本建议 ≥ 30 个
滤纸/滤膜	3 张 (直径 5cm)	1 张 (直径 5cm)	
植物/食品/人体/动物等各 种拭子	3 个	1 个	
粪便/肠道内容物/食糜	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	
瘤胃液/组织液/冲洗液 (离 心有明显沉淀) /混合菌液 等液体样本	3ml(沉淀 1g, 滤膜 3 张)	1ml(沉淀 0.5g, 滤膜 1 张)	
牛奶/酸奶	3ml,沉淀 ≥1g	1ml,沉淀 ≥0.5g	
碳毡/塑料/泡沫/电极/活性 炭/石英砂	2g, 建议灭菌水或 PBS 缓冲液洗脱后 过滤到滤膜, 而不 是直接送剪碎的泡 沫或者塑料。	1g, 建议灭菌水或 PBS 缓冲液洗脱后 过滤到滤膜, 而不 是直接送剪碎的泡 沫或者塑料。	
动物/植物组织	1g	0.5g	
注: 多组学研究样本需保持一致, 且分管送样 (以上为单个组学单管送样要求)			

1.4.2 取样流程

样本收集:

1) 土壤/污泥/沉积物/固体半固体发酵物/混合菌体

① 土壤

- A. 根据研究目的确定采样范围, 所有的取样器具要事先消毒灭菌处理;
- B. 取样前除去土壤表层未分解的凋落物和浮土;
- C. 可采取多点取样法采取多个点重量相当的土壤进行混匀后取样;

D. 土壤取样时取土层 5-10cm 的样本, 去除可见杂质后并过筛后进行分装, 保证分装的每个样品约 2g 左右 (分装前需混匀全部样本), 分装样品保存于无菌 EP 管或冻存管;

备注: 取样深度和范围可根据研究目的确定, 取样时需注意植物根、昆虫等对微生物组成产生影响。

② 固体半固体发酵物

将发酵物混合均匀分装到无菌 EP 管或冻存管中, 固液混合的发酵液, 建议提供 3-5ml, 固体发酵物建议大于 2g。

③ 混合菌体

A. **液体培养基菌体收集:** 培养好的菌液适量转入合适的离心管中, 高速离心收集菌体, 弃去上层培养基, 液氮速冻后用封口膜封口。若菌体离心管为 1.5-2mL 的小量程, 建议在外层套上 50mL 的大离心管, 以防止小管子冻裂菌体被污染。

B. **固体或半固体培养基菌体收集:** 在菌体生产最旺盛时期用灭菌后的勺子在平板中刮下, 置于 1.5 或 2.0ml 的离心管中, 迅速液氮速冻, 建议在外层套上 50mL 的大离心管, 以防止小管子冻裂菌体被污染。注意在收集菌体时不要刮到培养物。

④ 污泥/沉积物

A. **污泥:** 通过活性污泥装置, 取 40ml 以上的悬浮污泥样本, 置于无菌的 EP 管中。

B. **沉积物:** 可先移除沉积物上方水样后直接取沉淀, 对于水体泥样可借助采样器进行采样, 将样本装入无菌的离心管中。

2) 滤纸/滤膜

① 对于水质较为清澈或微生物含量极其稀少的水体样本, 如: 自来水、井水、泉水等

A. 根据实验目的先确定水体的取样深度和范围, 取 10~20L 水样;

B. 采用直径 5ml, 孔径 0.22 μ m 和 0.45 μ m 的滤膜抽滤 (有明显颜色沉淀在滤膜上), 然后将滤膜对折放入无菌的离心管中保存。

② 对于浑浊水体

过滤前静置分离悬浮颗粒, 建议先用大孔径的滤膜过滤一遍, 再用小孔径的滤膜过滤。

备注: 取样深度和范围可根据研究目的确定, 具体取样体积可根据水体中。

3) 植物/食品/人体/动物等各种拭子

可使用无菌棉拭子反复擦拭待测试部位, 对于较干燥的表面, 可用生理盐水浸湿拭子后擦拭, 以采取更多的微生物, 然后将直接将擦拭后的棉拭子放入无菌离心管中。

4) 粪便/肠道内容物/食糜

① 粪便

人: 将粪便排泄到干净的容器中(尽量避免尿液、马桶壁等对粪便样本的污染), 用无菌牙签、勺子或粪便取样器截取样品中段里部于无菌离心管中(粪便表层含有肠粘膜脱落细胞, 外部容易污染, 且接触空气后, 部分细菌 DNA 开始降解)。

小鼠(应激排便法): 戴一次性手套, 先用右手将小鼠尾巴提起, 置于鼠笼或粗糙的平面上, 将小鼠固定住; 轻轻按压小鼠下腹部刺激其排便; 采集粪便, 放置于无菌冻存管中, 盖好管盖, 做好标记。

② 肠道内容物/食糜

动物解剖后, 用无菌解剖刀, 在无菌状态下取出整个肠道, 切取所需肠段中的内容物或者肠胃中的食糜, 置于无菌的离心管中保存。

5) 瘤胃液/组织液/冲洗液(离心有明显沉淀)/混合菌液等液体样本

① 瘤胃液

方法一: 动物屠杀后, 剥离出瘤胃, 收取瘤胃液内容物, 四层无菌纱布过滤后, 收集过滤后瘤胃液, 分装于无菌离心管。

方法二: 通过瘤胃瘘管法、口或鼻插入胃管法、穿刺法, 收取瘤胃内容物, 四层无菌纱布过滤, 采集瘤胃液。滤液也可以进一步采用 12,000g 离心 10min, 收集沉淀。

② 发酵液

直接寄送发酵液, 或 12,000g 离心 10min 送菌体沉淀。

③ 肺泡灌洗液

小鼠、大鼠: 将鼠麻醉并固定于手术台, 颈部去毛并消毒, 从颈部正中切口, 暴露剥离气管, 并在气管近端穿线打活结, 活结要比较松, 在所打活结的远端, 剪开气管的 1/2, 行气管插管, 插入后线打死结, 用 10ml 注射器抽取 10ml 的灭菌生理盐水, 通过气管插管注入气管内, 反复抽吸三次, 将液体抽出, 放入灭菌离心管内。再抽取 10ml 生理盐水, 重复上面的操作两次。采集的灌洗液可以采用 0.22um 滤膜过滤, 滤膜保存于无菌离心管。或以 400g 的速度常温离心 10 分钟, 底部沉淀是细胞团, 上清是含有细菌的悬浊液。尽量避免搅起底部细胞团, 将上清转移到高速离心管中。之后以 12,000g 速度离心 10 分钟, 小心弃去上清。

人: 对拟在要灌洗肺段经活检孔注入 2%盐酸利多卡因 1~2ml 局部表面麻醉, 然后将纤支镜顶端楔入段或亚段支气管开口处, 再从活检孔快速注入 37℃ 灭菌生理盐水, 立即以 (6.66~13.3kPa) 负压吸引回收液体, 每次注入 30~50ml, 总量 100~250ml, 一般不超过 300ml, 通常回收率可达 40%~60%。采集的灌洗液采用 0.22um 滤膜过滤, 滤膜保存于无菌离心管。

或以 400g 的速度常温离心 10 分钟，底部沉淀是细胞团，上清是含有细菌的悬浊液。尽量避免搅起底部细胞团，将上清转移到高速离心管中。之后以 12,000g 速度离心 10 分钟，小心弃去上清。

6) 牛奶/酸奶

① 牛奶

取牛奶样品置于离心管中，12,000g 离心 5min，弃上清，去除脂肪，加入 TE 溶液，用移液枪反复吹打，直至沉淀充分溶解，离心，弃上清，去除残留脂肪，保留沉淀。

② 酸奶

使用 PBS 缓冲液对酸奶进行稀释，后续步骤参考上述。

7) 碳毡/塑料/泡沫/电极/活性炭/石英砂

碳毡/塑料/泡沫/电极/活性炭/石英砂等载体样本建议富集菌体后送样，使用 1xPBS 溶液或者利用样品中原有的液体，强烈震荡，使样品表面菌体能够被洗到液体中，洗脱液 12,000g 离心 10min，留沉淀送样。

8) 动物/植物组织

① 内生菌样本收集

- A. 根据研究目的选取组织 (1-2g)，放在适当的无菌容器中，用无菌水清洗除去组织样本表面的杂物；
- B. 将样品用 70%乙醇溶液进行表面冲洗 3 遍；
- C. 再使用 1XPBS 溶液冲洗 3 遍，至消毒液彻底去除，晾干样品（可自然晾干，也可以使用灭菌滤纸将水分吸干）；

② 外生菌样本收集

- A. 根据研究目的选取组织 (1-2g)，放在适当的无菌容器中，加入 1XPBS 缓冲液（完全淹没样本），进行表面震荡冲洗（震荡至少 1h），使样本表面菌群都冲洗到 PBS 中。
- B. 收集 PBS 冲洗液，12,000g 离心 2min 后去除上清液，留取沉淀送样。
- C. 对于离心后无明显沉淀的样本，建议加大取样量后重新洗脱，然后再使用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤，将滤膜对折后装入无菌的冻存管中。

③ 内外生菌样本收集

根据研究目的选取组织 (1-2g)，用无菌的剪刀剪成 1cm/cm³ 的小块状，放在无菌离心管中。

样本保存

液氮速冻 5-10min, -80°C 冰箱保存, 避免反复冻融。

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

1.4.3 注意事项

- 1) 取样的代表性关系到实验结果是否具有科学意义, 应根据实验目的慎重选择取样方案。应做到实验组与对照组的样本在取材时间、部位、处理条件等方面尽可能保持一致, 保证实验结果的可信度。
- 2) 准确记录代表性样本的各种特征数据, 按要求 (低温、迅速) 采集、制备、贮存、运输, 最终正确地按实验设计进行实验和数据处理。
- 3) 样本质量影响实验结果的最关键因素, 在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地做到迅速, 最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。
- 4) 所取样本离体后, 应尽快置于干冰或 -80°C 冰箱中, 并保证在实验前始终处于 -70°C 以下, 以避免核酸降解。

1.5 宏基因组+代谢组

1.5.1 各样本类型对应的送样要求

样本类型	建议送样量	最低送样量	生物学重复
土壤/污泥/沉积物/固体 半固体发酵物/混合菌体	2g	0.5g	
滤纸/滤膜	3 张 (直径 5cm)	1 张 (直径 5cm)	
植物/食品/人体/动物等 各种拭子	10 个	5 个	
粪便/肠道内容物/食糜	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	

瘤胃液/组织液/冲洗液 (离心有明显沉淀)/混 合菌液等液体样本	3ml(沉淀 1g, 滤膜 3 张)	1ml(沉淀 0.5g, 滤 膜 1 张)	正常至少 3 个, 有条件做到 6 个 比较合适, 临床 样本建议 ≥ 30 个
牛奶/酸奶	6-10ml, 沉淀 2g	3ml, 沉淀 1g	
碳毡/塑料/泡沫/电极/活 性炭/石英砂	2g, 建议: 灭菌水 洗脱后过滤到滤 膜, 而不是直接送 剪碎的泡沫或者塑 料。	1g, 建议: 灭菌水 洗脱后过滤到滤 膜, 而不是直接送 剪碎的泡或者塑 料。	
动物/植物组织	1g	0.5g	
注: 多组学研究样本需保持一致, 且分管送样 (以上为单个组学单管送样要求)			

1.5.2 取样流程

样本收集:

1) 土壤/污泥/沉积物/固体半固体发酵物/混合菌体

① 土壤

- A. 根据研究目的确定采样范围, 所有的取样器具要事先消毒灭菌处理;
- B. 取样前除去土壤表层未分解的凋落物和浮土;
- C. 可采取多点取样法采取多个点重量相当的土壤进行混匀后取样;
- D. 土壤取样时取土层 5-10cm 的样本, 去除可见杂质后并过筛后进行分装, 保证分装的每个样品约 2g 左右 (分装前需混匀全部样本), 分装样品保存于无菌 EP 管或冻存管;

备注: 取样深度和范围可根据研究目的确定, 取样时需注意植物根、昆虫等对微生物组成产生影响。

② 固体半固体发酵物

将发酵物混合均匀分装到无菌 EP 管或冻存管中, 固液混合的发酵液, 建议提供 3-5ml, 固体发酵物建议大于 2g。

③ 混合菌体

- A. 液体培养基菌体收集: 培养好的菌液适量转入合适的离心管中, 高速离心收集菌体, 弃去上层培养基, 液氮速冻后用封口膜封口。若菌体离心管为 1.5-2mL 的小量程, 建议在外层套上 50mL 的大离心管, 以防止小管子冻裂菌体被污染。

- B. 固体或半固体培养菌体收集: 在菌体生产最旺盛时期用灭菌后的勺子在平板中刮下, 置于 1.5 或 2.0ml 的离心管中, 迅速液氮速冻, 建议在外层套上 50mL 的大离心管, 以防止小管子冻裂菌体被污染。注意在收集菌体时不要刮到培养物。

④ 污泥/沉积物

- A. 污泥: 通过活性污泥装置, 取 40ml 以上的悬浮污泥样本, 置于无菌的 EP 管中。
- B. 沉积物: 可先移除沉积物上方水样后直接取沉淀, 对于水体泥样可借助采样器进行采样, 将样本装入无菌的离心管中。

2) 滤纸/滤膜

① 对于水质较为清澈或微生物含量极其稀少的水体样本, 如: 自来水、井水、泉水等

- A. 根据实验目的先确定水体的取样深度和范围, 取 10~20L 水样;
- B. 采用直径 5ml, 孔径 0.22 μ m 和 0.45 μ m 的滤膜抽滤 (有明显颜色沉淀在滤膜上), 然后将滤膜对折放入无菌的离心管中保存。

② 对于浑浊水体

过滤前静置分离悬浮颗粒, 建议先用大孔径的滤膜过滤一遍, 再用小孔径的滤膜过滤。

备注: 取样深度和范围可根据研究目的确定, 具体取样体积可根据水体中。

3) 植物/食品/人体/动物等各种拭子

可使用无菌棉拭子反复擦拭待测试部位, 对于较干燥的表面, 可用生理盐水浸湿拭子后擦拭, 以采取更多的微生物, 然后将直接将擦拭后的棉拭子放入无菌离心管中。

4) 粪便/肠道内容物/食糜

① 粪便

人: 将粪便排泄到干净的容器中(尽量避免尿液、马桶壁等对粪便样本的污染), 用无菌牙签、勺子或粪便取样器截取样品中段里部于无菌离心管中(粪便表层含有肠粘膜脱落细胞, 外部容易污染, 且接触空气后, 部分细菌 DNA 开始降解)。

小鼠(应激排便法): 戴一次性手套, 先用右手将小鼠尾巴提起, 置于鼠笼或粗糙的平面上, 将小鼠固定住; 轻轻按压小鼠下腹部刺激其排便; 采集粪便, 放置于无菌冻存管中, 盖好管盖, 做好标记。

② 肠道内容物/食糜

动物解剖后, 用无菌解剖刀, 在无菌状态下取出整个肠道, 切取所需肠段中的内容物或者肠胃中的食糜, 置于无菌的离心管中保存。

5) 瘤胃液/组织液/冲洗液 (离心有明显沉淀) /混合菌液等液体样本

① 瘤胃液

方法一：动物屠杀后，剥离出瘤胃，收取瘤胃液内容物，四层无菌纱布过滤后，收集过滤后瘤胃液，分装于无菌离心管。

方法二：通过瘤胃瘘管法、口或鼻插入胃管法、穿刺法，收取瘤胃内容物，四层无菌纱布过滤，采集瘤胃液。滤液也可以进一步采用 12,000g 离心 10min，收集沉淀。

② 发酵液

直接寄送发酵液，或 12,000g 离心 10min 送菌体沉淀。

③ 肺泡灌洗液

小鼠、大鼠：将鼠麻醉并固定于手术台，颈部去毛并消毒，从颈部正中切口，暴露剥离气管，并在气管近端穿线打活结，活结要比较松，在所打活结的远端，剪开气管的 1/2，行气管插管，插入后线打死结，用 10ml 注射器抽取 10ml 的灭菌生理盐水，通过气管插管注入气管内，反复抽吸三次，将液体抽出，放入灭菌离心管内。再抽取 10ml 生理盐水，重复上面的操作两次。采集的灌洗液可以采用 0.22um 滤膜过滤，滤膜保存于无菌离心管。或以 400g 的速度常温离心 10 分钟，底部沉淀是细胞团，上清是含有细菌的悬浊液。尽量避免搅起底部细胞团，将上清转移到高速离心管中。之后以 12,000g 速度离心 10 分钟，小心弃去上清。

人：对拟在要灌洗肺段经活检孔注入 2%盐酸利多卡因 1~2ml 局部表面麻醉，然后将纤支镜顶端楔入段或亚段支气管开口处，再从活检孔快速注入 37℃ 灭菌生理盐水，立即以 (6.66~13.3kPa) 负压吸引回收液体，每次注入 30~50ml，总量 100~250ml，一般不超过 300ml，通常回收率可达 40%~60%。采集的灌洗液采用 0.22um 滤膜过滤，滤膜保存于无菌离心管。或以 400g 的速度常温离心 10 分钟，底部沉淀是细胞团，上清是含有细菌的悬浊液。尽量避免搅起底部细胞团，将上清转移到高速离心管中。之后以 12,000g 速度离心 10 分钟，小心弃去上清。

6) 牛奶/酸奶

① 牛奶

取牛奶样品置于离心管中，12,000g 离心 5min，弃上清，去除脂肪，加入 TE 溶液，用移液枪反复吹打，直至沉淀充分溶解，离心，弃上清，去除残留脂肪，保留沉淀。

② 酸奶

使用 PBS 缓冲液对酸奶进行稀释，后续步骤参考上述。

7) 碳毡/塑料/泡沫/电极/活性炭/石英砂

碳毡/塑料/泡沫/电极/活性炭/石英砂等载体样本建议富集菌体后送样，使用 1xPBS 溶液或

者利用样品中原有的液体, 强烈震荡, 使样品表面菌体能够被洗到液体中, 洗脱液 12,000g 离心 10min, 留沉淀送样。

8) 动物/植物组织

① 内生菌样本收集

- A. 根据研究目的选取组织 (1-2g), 放在适当的无菌容器中, 用无菌水清洗除去组织样本表面的杂物;
- B. 将样品用 70%乙醇溶液进行表面冲洗 3 遍;
- C. 再使用 1XPBS 溶液冲洗 3 遍, 至消毒液彻底去除, 晾干样品 (可自然晾干, 也可以使用灭菌滤纸将水分吸干);

② 外生菌样本收集

- A. 根据研究目的选取组织 (1-2g), 放在适当的无菌容器中, 加入 1XPBS 缓冲液 (完全淹没样本), 进行表面震荡冲洗 (震荡至少 1h), 使样本表面菌群都冲洗到 PBS 中。
- B. 收集 PBS 冲洗液, 12,000g 离心 2min 后去除上清液, 留取沉淀送样。
- C. 对于离心后无明显沉淀的样本, 建议加大取样量后重新洗脱, 然后再使用 0.22 μ m 或者 0.45 μ m 滤膜过滤, 将滤膜对折后装入无菌的冻存管中。

③ 内外生菌样本收集

根据研究目的选取组织 (1-2g), 用无菌的剪刀剪成 1cm/cm³ 的小块状, 放在无菌离心管中。

样本保存

液氮速冻 5-10min, -80°C 冰箱保存, 避免反复冻融。

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

1.5.3 注意事项

- 1) 取样的代表性关系到实验结果是否具有科学意义, 应根据实验目的慎重选择取样方案。应做到实验组与对照组的样本在取材时间、部位、处理条件等方面尽可能保持一致, 保

证实验结果的可信度。

- 2) 准确记录代表性样本的各种特征数据, 按要求(低温、迅速)采集、制备、贮存、运输, 最终正确地按实验设计进行实验和数据处理。
- 3) 样本质量影响实验结果的最关键因素, 在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地做到迅速, 最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。
- 4) 所取样本离体后, 应尽快置于干冰或 -80°C 冰箱中, 并保证在实验前始终处于 -70°C 以下, 以避免核酸降解。

2. 样本准备注意事项

- 1) 样本离体应当立即放入液氮中速冻, 再放入 -80°C 冰箱中保存, 避免反复冻融。并且样本在 -80°C 的保存时间不宜过长, 若保存时间超过半年应及时与当地销售或实验人员取得联系。
- 2) 样本应在 EP 管或锡箔纸上做好命名, 并在送样时用密封袋分样本装好, 并在密封袋内部放入用标签字写好的相同命名, 并且样本命名应与《高通量样本送样信息单》上保持一致。
- 3) 因样本提取或检测均会消耗部分样本, 所以送样样本量需至少高于上述提及样本量的三分之一。建议所有样本均做好备份。
- 4) 样本标签勿要粘贴在 EP 管或锡箔纸上, 低温下标签纸易脱落。
- 5) 细胞样本不建议采用 RNeasy 等保护剂保存, 因为保护剂比较粘稠, 无法离心收集存放在保护剂的细胞样本。
- 6) 采用保护剂或乙醇保存的样本需在信息单上注明, 乙醇保存 3 个月以上的样本谨慎使用, 若需寄送石蜡样本, 应与当地销售或实验人员取得联系。
- 7) RNeasy、RNeasy 等保护剂在 25°C 下能稳定保存样本 3 天, 4°C 保存样本 7 天、 -20°C 条件下可永久保存样本。建议用保护剂保存的样本厚度不超过 0.5cm。保护剂不适用于血液和液态样本, 组织样本与保护剂的用量至少为 1:10, RNeasy 不适用于植物样本保存。(不同公司保存时间有差异, 具体以说明书为准)。
- 8) Trizol 为裂解液, 不适用于组织样本的保存, 细胞除外。当细胞存放在 Trizol 中需注明每管的细胞数量。

3. 样本寄送注意事项

- 1) 样本需要使用干冰进行寄送, 干冰消耗量为 5kg/天, 订购量以快递实际运输天数为准

(避开大型节假日及线上购物节)。干冰采用厚实的泡沫箱进行打包，外侧用透明胶封好。

- 2) 样本寄送需填写《高通量样本送样信息单》。纸质版送样单随样本寄出，电子版送样单及寄送快递单号发送给公司，以便核对及备份数据。
- 3) 样本返还需邮件告知负责的技术支持；对于检测不合格的样本，如需返回，需在收到样本检测报告 7 天内发送邮件告知负责的技术支持，逾期样本将进行销毁；对于完成测序分析后，剩余样本需要返还的项目，需在收到项目完整版结题报告一个月内发送邮件告知负责的技术支持，逾期样本将进行销毁。如果样本特别珍贵，需提前说明。一般情况下，样本不予返还；样本返回需要送样方承担返还费用（包括干冰费和快递费）。
- 4) 为确保实验的顺利，送样方需提供样本备份 1-2 份，以防备部分样本降解重新取材、制备或送样，耽误时间。

5) 样本接收地址

收样地址：上海市松江区香闵路 698 号高通量测序部

收样人：高通量样本接收员

电话：021-57072107/57072133