

生工[®] Sangon Biotech



生工高通量测序部送样手册 (常规 RNA 类项目)

生工生物工程(上海)股份有限公司

目录

1. 常规 RNA 类产品备样要求.....	3
1.1 新鲜动物组织.....	3
1.1.1 各项目类型对应的送样要求.....	3
1.1.2 取样操作流程.....	3
1.1.3 注意事项.....	4
1.2 新鲜植物组织.....	4
1.2.1 各项目类型对应的送样要求.....	4
1.2.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	5
1.2.3 注意事项.....	5
1.3 细胞类样本.....	6
1.3.1 各项目类型对应的送样要求.....	6
1.3.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	6
1.3.3 注意事项.....	7
1.4 血液样本.....	7
1.4.1 各项目类型对应的送样要求.....	7
1.4.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	8
1.4.3 注意事项.....	9
1.5 菌体样本.....	9
1.5.1 各项目类型对应的送样要求.....	9
1.5.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	9
1.5.3 注意事项.....	10
1.6 RNA 样本.....	10
1.6.1 各项目类型对应的送样要求.....	10
1.6.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	11
1.6.3 注意事项.....	11
2. 样本准备注意事项.....	12
3. 样本寄送注意事项.....	12

1. 常规 RNA 类产品备样要求

1.1 新鲜动物组织

1.1.1 各项目类型对应的送样要求

项目类型	建议样本量	最低样本量	生物学重复
真核转录组测序/lncRNA 测序 /miRNA 测序/circRNA 测序	≥200mg	≥100mg	≥3 个, 临床样本建议
全转录组测序	≥400mg	≥200mg	≥10 个
MeRIP-seq 测序	≥400mg	——	
三代全长转录组测序	≥400mg	——	

备注：RNA 含量较少（如皮肤，骨类等）组织样本需比正常组织样本量多 1 倍以上

1.1.2 取样操作流程

样本收集：

1) 新鲜组织液氮速冻送样（推荐）

- 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）；
- 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；

2) 新鲜组织 RNA later 保存送样（请严格按照保存液说明书操作）

- 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；
- 组织离体后需要立即分割、剪切成小块（绿豆大小）；
- 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。

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。

1.1.3 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 对于保存在 RNA later 中的样本，放入保护液前请切割成绿豆大小的块状，以防止组织过大或者过厚导致保护液无法充分浸润；取样时建议按照所购买的 RNA later 保护剂使用说明操作；
- ④ 组织样本非常不建议使用 Trizol 送样，该方法极易导致 RNA 降解，如非要用 Trizol 送样，样本需充分液氮研磨后溶于适量 Trizol 中，且组织样品切勿过量，冰上裂解 5min 后，-80°C 低温保存，干冰运输；
- ⑤ 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。

1.2 新鲜植物组织

1.2.1 各项目类型对应的送样要求

项目类型	建议样本量	最低样本量	生物学重复
真核转录组测序/lncRNA 测序 /miRNA 测序/circRNA 测序	≥ 300mg	≥ 200mg	≥ 3 个
全转录组测序	≥ 500mg	≥ 300mg	
MeRIP-seq 测序	≥ 500mg	——	
植物小 RNA 找病毒	≥ 300mg	≥ 200mg	——
三代全长转录组测序	≥ 500mg	——	——

备注： RNA 含量较少（如根茎）及果肉等富含多糖多酚组织样本需比正常组织样本量多 1 倍以上

1.2.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

样本收集:

1) 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。

2) 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。

3) 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 5 kg/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。

1.2.3 注意事项

- 1) 优选幼嫩新鲜的样本组织, 植物纤维含量较高, 应采集尽可能多的样本并备份
- 2) 对于多糖多酚的难提组织样本, 需提前与实验人员联系并在送样单中备注;
- 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; 样本量不要超过离心管容积的 2/3;
- 4) 组织样品处理及切割过程应在冰上尽可能快速进行, 时间过长会导致样品降解;
- 5) 建议使用离心管分装样本, 不建议仅用锡箔纸或封口袋分装。

1.3 细胞类样本

1.3.1 各项目类型对应的送样要求

项目类型	建议样本量 (活细胞数)	最低样本量 (活细胞数)	生物学重复
真核转录组测序/lncRNA 测序 /miRNA 测序/circRNA 测序	$\geq 5 \times 10^6$	$\geq 1 \times 10^6$	≥ 3 个; 临床样本 建议 ≥ 10 个
全转录组测序	$\geq 1 \times 10^7$	$\geq 5 \times 10^6$	
MeRIP-seq 测序	$\geq 5 \times 10^7$	$\geq 1 \times 10^7$	
三代全长转录组测序	$\geq 1 \times 10^7$	$\geq 5 \times 10^6$	

1.3.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

样本收集:

1) 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 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)。

2) 贴壁细胞

- 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)

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。

1.3.3 注意事项

- 1) 细胞样品勿用胰酶消化, 胰酶会消化细胞膜上的膜蛋白, 导致细胞破裂, 破裂的细胞会释放核酸酶;
- 2) 勿将干冻的细胞直接寄送, 因为细胞冷冻的过程中冰晶很容易刺破细胞, 此时破碎的细胞会容易造成 RNA 的降解;
- 3) 细胞培养时易被支原体污染, 样本 RNA 提取以及建库测序过程中无法获悉是否污染, 建议您送样前对细胞培养上清使用支原体检测试剂盒检测, 确认无污染后再送样品细胞样本, 其次送样前建议同时做物种鉴定;
- 4) 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。
- 5) 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。

1.4 血液样本

1.4.1 各项目类型对应的送样要求

项目类型	建议样本量	最低样本量	生物学重复
真核转录组测序/lncRNA 测序 /miRNA 测序/circRNA 测序	≥ 3 mL	≥ 1 mL	≥3 个; 临床样本 建议 ≥10 个
全转录组测序	≥3 mL	≥ 2 mL	
MeRIP-seq 测序	≥ 5 mL	—	

三代全长转录组测序	≥ 5 mL	——	
-----------	--------	----	--

1.4.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

样本收集:

1) 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。

2) 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;

3) 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。

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: 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;
- 3) 分离白细胞或者有核细胞: 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: 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。

- 3) **分离白细胞或者有核细胞:** 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) **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) **冻存血液:** 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。

1.5 菌体样本

1.5.1 各项目类型对应的送样要求

项目类型	建议样本量	最低样本量	生物学重复
真核转录组测序(真菌)/原核转录组(细菌)/miRNA 测序(真菌)	5×10 ⁶ 或 200mg	—	≥3 个
三代全长转录组测序(真菌)	≥500mg	—	—

1.5.2 取样操作流程(含取样/保存/运输等)

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。

1.5.3 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。

1.6 RNA 样本

1.6.1 各项目类型对应的送样要求

项目类型	建议样本量	最低样本量	生物学重复
转录组测序	总量 ≥ 2μg (浓度 ≥ 100ng/ul, 体积 ≥ 15μl)	总量 ≥ 1μg (浓度 ≥ 60ng/ul, 体积 ≥ 15μl)	≥ 3 个; 临床样本建议 ≥ 10 个
lncRNA 测序/ circRNA 测序	总量 ≥ 2μg (浓度 ≥ 100ng/ul, 体积 ≥ 15μl)	总量 ≥ 1.5μg (浓度 ≥ 80ng/ul, 体积 ≥ 15μl)	
全转录组测序/ miRNA 测序	总量 ≥ 4μg (浓度 ≥ 200ng/ul, 体积 ≥ 20μl)	总量 ≥ 3μg (浓度 ≥ 160ng/ul, 体积 ≥ 20μl)	
MeRIP-seq 测序	总量 ≥ 15μg (浓度 ≥ 400ng/ul, 体积 ≥ 20μl)	总量 ≥ 10μg (浓度 ≥ 300ng/ul, 体积 ≥ 20μl)	

植物小 RNA 找病毒	总量 $\geq 2\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 200\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	总量 $\geq 1.5\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 160\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	——
RNA 病毒基因组测序	总量 $\geq 0.8\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 50\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	总量 $\geq 0.5\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 30\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	——
新冠分型	总量 $\geq 0.5\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 50\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$, CT 值 < 32)	总量 $\geq 0.2\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 30\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$, CT 值 < 32)	——
RIP-seq	总量 $\geq 0.8\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 50\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	总量 $\geq 0.5\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 50\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	建议同时做 input 和 IP 样本
三代全长转录组测序	总量 $\geq 4\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 200\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 20\mu\text{l}$)	总量 $\geq 3\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 200\text{ng}/\mu\text{l}$, 体积 $\geq 15\mu\text{l}$)	——
注: RNA 完整, 无降解, 无 DNA、无蛋白、无多糖污染。浓度过低或者 RNA 完整性太差的情况下, 可能会影响实验结果。			

1.6.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

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。

1.6.3 注意事项

- 1) 建议送样前先做初步质检;

- 2) 寄送 RNA 样品请置于 1.5 ml 离心管中, 管上注明样品名称、浓度以及制备时间, 管口使用 Parafilm 封口。

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 RNAlater 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) RNAlater、RNAstore 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, RNAstore 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