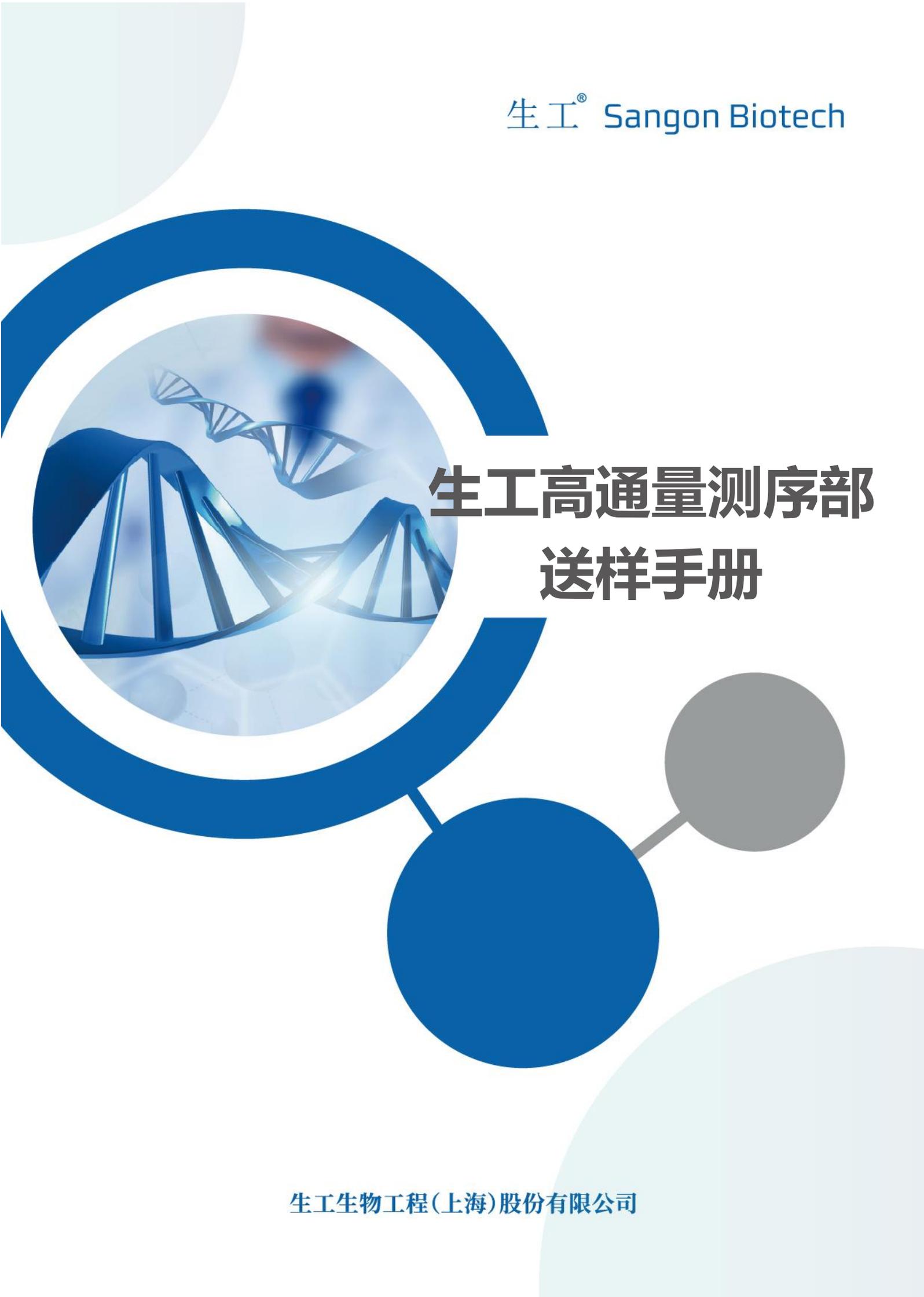


生工<sup>®</sup> Sangon Biotech



# 生工高通量测序部 送样手册

生工生物工程(上海)股份有限公司

## 目录

1. META 类样本送样要求.....	4
1.1 土壤/污泥/沉积物/固体半固体发酵物/混合菌体.....	4
1.2 滤纸/滤膜.....	5
1.3 植物/食品/动物/人体等各种拭子.....	7
1.4 粪便/肠道内容物/食糜.....	8
1.5 瘤胃液/发酵液/肺泡灌洗液（离心有明显沉淀）/混合菌液等液体样本.....	9
1.6 牛奶/酸奶.....	11
1.7 碳毡/塑料/泡沫/电极/活性炭/石英砂.....	13
1.8 动物/植物组织.....	14
1.9 宏基因组 DNA.....	15
2. 常规 RNA 类产品备样要求.....	17
2.1 新鲜动物组织.....	17
2.2 新鲜植物组织.....	18
2.3 细胞类样本.....	20
2.4 血液样本.....	21
2.5 菌体样本.....	23
2.6 RNA 样本.....	24
3. 基因组项目送样要求.....	26
3.1 动植物组织.....	26
3.2 细胞.....	27
3.3 血液.....	27
3.4 菌体.....	28
3.5 FFPE.....	29
3.6 唾液.....	30
3.7 基因组 DNA.....	30
4. 其他类项目送样要求.....	31
4.1 各种 PCR 产物测序.....	31
4.2 客户自备文库测序（二代）.....	32
5. Kbseq 项目送样要求.....	33
5.1 菌体.....	33
5.2 质粒.....	34
5.3 PCR 产物.....	34
6. 单细胞/空间组学送样要求.....	35
6.1 10×单细胞转录组和 10×单细胞免疫组库测序.....	35
6.2 SMART-seq2 项目.....	39
6.3 空间转录组测序.....	40
7. 多组学类项目送样要求.....	50
7.1 转录组+蛋白组.....	50
7.2 转录组+代谢组.....	56
7.3 转录组+蛋白组+代谢组.....	62
7.4 微生物多样性+代谢组.....	68

---

7.5 宏基因组+代谢组 .....	72
8. 样本准备注意事项 .....	77
9. 样本寄送注意事项 .....	78

## 1. META 类样本送样要求

### 1.1 土壤/污泥/沉积物/固体半固体发酵物/混合菌体

#### 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
16S/18S/ITS 微生物分类测序	2g	0.5g	至少 3 个, 有条件做到 6 个比较合适, 临床样本建议 $\geq 30$ 个
功能基因测序	2g	0.5g	
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	2g	0.5g	
16S 全长分类测序	2g	0.5g	
宏基因组测序	2g	0.5g	
宏转录组测序	2g	0.5g	

#### 1.1.2 取样操作流程

##### 样本收集:

##### 1) 土壤

- ① 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;
- ② 取样前除去土壤表层未分解的凋落物和浮土;
- ③ 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;
- ④ 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), 最后将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

**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。

**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

**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。

**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。

#### 样本保存:

将离心管迅速置于液氮中冷冻 5-10min,然后转移至 -80°C 冰箱或液氮中长期保存;

#### 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:

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) 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。

## 1.2 滤纸/滤膜

### 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
16S/18S/ITS 微生物分类测序	3 张	1 张	

功能基因测序	3 张	1 张	至少 3 个, 有条件做到 6 个比较合适, 临床样本建议 $\geq 30$ 个
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	3 张	1 张	
16S 全长分类测序	3 张	1 张	
宏基因组测序	3 张	1 张	
宏转录组测序	3 张	1 张	

### 1.2.2 取样操作流程

#### 样本收集:

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

- ① 根据实验目的先确定水体的取样深度和范围, 取 10~20L 水样;
- ② 采用直径 5ml, 孔径 0.22 $\mu$ m 和 0.45 $\mu$ 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微生物量做一定调整。

#### 样本保存:

迅速置于液氮中冷冻 5-10min, 然后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱或液氮中长期保存;

#### 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:

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) 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℃ 冰箱中，并保证在实验前始终处于 -70℃ 以下，以避免核酸降解。

### 1.3 植物/食品/动物/人体等各种拭子

#### 1.3.1 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
16S/18S/ITS 微生物分类测序	10 根	5 根	至少 3 个，有条件做到 6 个比较合适，临床样本建议 ≥ 30 个
功能基因测序	10 根	5 根	
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	10 根	5 根	
16S 全长分类测序	10 根	5 根	
宏基因组测序	10 根	5 根	
注：测序经验显示，阴道拭子、阴道分泌物和宫腔分泌物等样本去宿主后有效数据量 < 1%，因此该类样本不建议做宏基因组测序。			

#### 1.3.2 取样操作流程

##### 样本收集：

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。

##### 样本保存：

将离心管迅速置于液氮中冷冻 5-10min，然后转移至 -80℃ 冰箱或液氮中长期保存；

##### 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：

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) 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℃冰箱中, 并保证在实验前始终处于-70℃以下, 以避免核酸降解。

## 1.4 粪便/肠道内容物/食糜

### 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
16S/18S/ITS 微生物分类测序	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	至少 3 个, 有条件做到 6 个比较合适, 临床样本建议 ≥ 30 个
功能基因测序	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	
16S 全长分类测序	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	
宏基因组测序	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	
宏转录组测序	2g (小鼠 6-10 粒)	0.5g (小鼠 3 粒)	

### 1.4.2 取样操作流程

#### 样本收集:

##### 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。

**样本保存：**

将离心管迅速置于液氮速冻 5-10min，然后转移至 -80℃ 冰箱或液氮中长期保存；

**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：**

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) 样本提供者近 3 个月内不可接受抗生素治疗，以免造成肠道微生物的菌群改变。
- 2) 由于不同部位粪便样本存在一定的差异，可能会引起分析差异，强烈建议将样本搅拌均匀后再收集。
- 3) 搜集完患者样本后，应迅速放入速冻容器中(干冰盒)并且在 30min 之内将其移到 -80℃ 冻存。如果样本收集后不能及时放于 -80℃ 保存，请于 4℃ 条件下保存，并 24h 内移至 -80℃ 冻存。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 所取样本离体后，应尽快置于干冰或 -80℃ 冰箱中，并保证在实验前始终处于 -70℃ 以下，以避免核酸降解。

**1.5 瘤胃液/发酵液/肺泡灌洗液（离心有明显沉淀）/混合菌液等液体样本**

**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
------	-------	-------	-------

16S/18S/ITS 微生物分类 测序	3ml (沉淀 1g,滤膜 3 张)	1ml (沉淀 0.5g,滤 膜 1 张)	至少 3 个, 有 条件做到 6 个比较 合适, 临床样本 建议 ≥30 个
功能基因测序	3ml (沉淀 1g,滤膜 3 张)	1ml (沉淀 0.5g,滤 膜 1 张)	
16s/ddPCR/qPCR 联合测 序	3ml (沉淀 1g,滤膜 3 张)	1ml (沉淀 0.5g,滤 膜 1 张)	
16S 全长分类测序	3ml (沉淀 1g,滤膜 3 张)	1ml (沉淀 0.5g,滤 膜 1 张)	
宏基因组测序	3ml (沉淀 1g,滤膜 3 张)	3ml (沉淀 0.5g,滤 膜 1 张)	

### 1.5.2 取样操作流程

#### 样本收集:

##### 1) 瘤胃液

方法一: 动物屠宰后, 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。

#### 样本保存：

采集完毕后液氮速冻 5-10min，-80℃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：

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℃冰箱中，并保证在实验前始终处于-70℃以下，以避免核酸降解。

## 1.6 牛奶/酸奶

### 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
16S/18S/ITS 微生物分类测序	3ml (沉淀 1g)	1ml (沉淀 0.5g)	至少 3 个，有条件做到 6 个比较合适，临
功能基因测序	3ml (沉淀 1g)	1ml (沉淀 0.5g)	
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	3ml (沉淀 1g)	1ml (沉淀 0.5g)	

16S 全长分类测序	3ml (沉淀 1g)	1ml (沉淀 0.5g)	床样本建议 ≥ 30 个
宏基因组测序	6-10ml (沉淀 2g)	3ml (沉淀 1g)	
注: 项目经验显示, 这类样本微生物量比较少, 提取效果普遍不佳, 不建议进行宏基因组测序。			

### 1.6.2 取样操作流程

#### 样本收集:

##### 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。

#### 样本保存:

采集完毕后液氮速冻 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:

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) 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。

## 1.7 碳毡/塑料/泡沫/电极/活性炭/石英砂

### 1.7.1 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
16S/18S/ITS 微生物分类测序	沉淀 2g	沉淀 1g	至少 3 个, 有条件做到 6 个比较合适, 临床样 本建议 $\geq 30$ 个
功能基因测序	沉淀 2g	沉淀 1g	
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	沉淀 2g	沉淀 1g	
16S 全长分类测序	沉淀 2g	沉淀 1g	
宏基因组测序	沉淀 5g	沉淀 2g	
注: 建议用灭菌水或 PBS 缓冲液洗脱后过滤到滤膜上, 而不是直接送剪碎的泡沫或者塑料等。			

### 1.7.2 取样操作流程

#### 样本收集:

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。

#### 样本保存:

采集完毕后液氮速冻 5-10min,  $-80^{\circ}\text{C}$  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:

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。

### 1.7.3 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℃ 冰箱中, 并保证在实验前始终处于 -70℃ 以下, 以避免核酸降解。

## 1.8 动物/植物组织

### 1.8.1 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
16S/18S/ITS 微生物分类 测序	1g (内生菌检测存在一定风险, 会测到细胞器的序列)	0.5g (内生菌检测存在一定风险, 会测到细胞器的序列)	至少 3 个, 有条件做到 6 个比较合适, 临床样本建议 $\geq 30$ 个
功能基因测序	1g	0.5g	
16s/ddPCR/qPCR 联合 测序	1g	0.5g	
16S 全长分类测序	1g	0.5g	
宏基因组测序	1g (不建议做内生菌的检测, 宿主污染会比较严重)	0.5g (不建议做内生菌的检测, 宿主污染会比较严重)	

### 1.8.2 取样操作流程

#### 样本收集:

#### 1) 内生菌样本收集

- ① 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;
- ② 将样品用 70%乙醇溶液进行表面冲洗 3 遍;
- ③ 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

- ① 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。

- ② 收集 PBS 冲洗液, 12,000g 离心 2min 后去除上清液, 留取沉淀送样。
- ③ 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 0.22μm 或者 0.45μm 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/cm<sup>3</sup> 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。

### 1.8.3 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。

## 1.9 宏基因组 DNA

### 1.9.1 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
------	-------	-------	-------

16S/18S/ITS 微生物分类测序	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 20μl	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 10μl	至少 3 个, 有条件做到 6 个比较合适, 临床样本建议 ≥ 30 个
功能基因测序	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 20μl	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 10μl	
16s/ddPCR/qPCR 联合测序	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 20μl	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 10μl	
16S 全长分类测序	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 20μl	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 10μl	
宏基因组测序	浓度 ≥ 20ng/ul, 体积 ≥ 30μl	浓度 ≥ 10ng/ul, 体积 ≥ 20μl	
注: 要求 DNA 溶于 TEbuffer, DNA 完整无降解, 无 RNA、蛋白以及多糖污染。 浓度过低或者 DNA 完整性太差的情况下, 可能会影响实验结果。			

### 1.9.2 取样操作流程

#### 样本收集:

建议按照提取试剂盒的说明书进行操作。

#### 样本保存

DNA 质检结束后, -20°C/-80°C 冰箱长期保存, 避免反复冻融。

#### 样本寄送:

预约干冰或冰袋进行样品寄送, 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。

### 1.9.3 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℃ 冰箱中，并保证在实验前始终处于 -70℃ 以下，以避免核酸降解。

## 2. 常规 RNA 类产品备样要求

### 2.1 新鲜动物组织

#### 2.1.1 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

#### 2.1.2 取样操作流程

样本收集：

##### 1) 新鲜组织液氮速冻送样（推荐）

- 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；

##### 2) 新鲜组织 RNA later 保存送样（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。

**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。

**2.1.3 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。

**2.2 新鲜植物组织****2.2.1 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

## 2.2.2 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。

## 2.2.3 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。

## 2.3 细胞类样本

### 2.3.1 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	$\geq 5 \times 10^6$	$\geq 1 \times 10^6$	$\geq 3$ 个；临床样本 建议 $\geq 10$ 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	$\geq 1 \times 10^7$	$\geq 5 \times 10^6$	

### 2.3.2 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

### 2.3.3 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。

## 2.4 血液样本

### 2.4.1 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	$\geq 3$ mL	$\geq 1$ mL	$\geq 3$ 个; 临床样本

全转录组测序	≥ 3 mL	≥ 2 mL	建议 ≥ 10 个
MeRIP-seq 测序	≥ 5 mL	——	
三代全长转录组测序	≥ 5 mL	——	

### 2.4.2 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。

### 2.4.3 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。

## 2.5 菌体样本

### 2.5.1 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 <sup>6</sup> 或 200mg	—	≥3 个
三代全长转录组测序(真菌)	≥500mg	—	—

### 2.5.2 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。

## 2.5.3 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。

## 2.6 RNA 样本

### 2.6.1 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 $\geq 2\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$ , 体积 $\geq 15\mu\text{l}$ )	总量 $\geq 1\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 60\text{ng}/\mu\text{l}$ , 体积 $\geq 15\mu\text{l}$ )	$\geq 3$ 个; 临床样本建议 $\geq 10$ 个
lncRNA 测序/ circRNA 测序	总量 $\geq 2\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$ , 体积 $\geq 15\mu\text{l}$ )	总量 $\geq 1.5\mu\text{g}$ (浓度 $\geq 80\text{ng}/\mu\text{l}$ , 体积 $\geq 15\mu\text{l}$ )	
全转录组测序/ miRNA 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 $\geq 160\text{ng}/\mu\text{l}$ , 体积 $\geq 20\mu\text{l}$ )	
	总量 $\geq 15\mu\text{g}$	总量 $\geq 10\mu\text{g}$	

MeRIP-seq 测序	(浓度 $\geq$ 400ng/ul, 体积 $\geq$ 20 $\mu$ l)	(浓度 $\geq$ 300ng/ul, 体积 $\geq$ 20 $\mu$ l)	
植物小 RNA 找病毒	总量 $\geq$ 2 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 200ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l)	总量 $\geq$ 1.5 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 160ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l)	——
RNA 病毒基因组测序	总量 $\geq$ 0.8 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 50ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l)	总量 $\geq$ 0.5 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 30ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l)	——
新冠分型	总量 $\geq$ 0.5 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 50ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l, CT 值 < 32)	总量 $\geq$ 0.2 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 30ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l, CT 值 < 32)	——
RIP-seq	总量 $\geq$ 0.8 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 50ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l)	总量 $\geq$ 0.5 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 50ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ l)	建议同时做 input 和 IP 样本
三代全长转录组测序	总量 $\geq$ 4 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 200ng/ul, 体积 $\geq$ 20 $\mu$ l)	总量 $\geq$ 3 $\mu$ g (浓度 $\geq$ 200ng/ul, 体积 $\geq$ 15 $\mu$ 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。			

### 2.6.2 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 $^{\circ}$ 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。

### 2.6.3 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。

## 3. 基因组项目送样要求

### 3.1 动植物组织

#### 3.1.1 取样流程

##### 动物组织

- 1) 选取动物肌肉组织, 用生理盐水冲洗去除血渍和污物, 吸干水渍并切小块 (厚度小于 0.5cm), 放入已标记好的 EP 管中, 迅速液氮冷冻后用封口膜封口, 再将 EP 管放置于 50 mL 离心管中或封口袋中, -80°C 保存或干冰运输。如果没有液氮速冻的条件, 可以将组织浸泡于 70%左右的乙醇溶液中固定, 冰袋冷藏运输。
- 2) 对于小型昆虫组织, 分离特定组织比较困难, 可取单头虫体同样液氮速冻或者酒精固定后运输送样。

##### 植物组织

选取幼嫩新鲜的植物叶片样本, 擦拭干净叶片表面的灰尘及泥土, 装入标识好的自封袋后冷藏运输。

#### 3.1.2 适用项目类型

样本类型	动物组织干重		植物组织干重	
	建议送样量	最低送样量	建议送样量	最低送样量
重测序/群体遗传/BSA	2g	1 g	2g	1 g
线粒体/叶绿体基因组测序	2g	1 g	2g	1 g
全外显子组测序	2g	1 g	2g	1 g
SSR 标记开发	2g	1 g	2g	1 g
全基因组甲基化/全基因组羟甲基化/羟甲基化捕获	4 g	2 g	4 g	2 g

多重 PCR_snp 分型/靶向捕获测 序	0.4g	0.5g	1g	0.5g
--------------------------	------	------	----	------

### 3.1.3 注意事项

- 1) 动物类样本不接受活体，比如小型昆虫类；
- 2) 植物组织建议取新鲜的叶片，如果是老根老叶类，因为多糖多酚类物质含量较高，可能比较难提取到合格的 DNA 进行后续实验；中药类样本因为经过高温和失水等炮制处理，比较难提取到合格的 DNA 进行后续实验。
- 3) 动物或者植物标本类样本，因为存放时间较久，DNA 降解严重，比较难提取到合格的 DNA 进行后续实验。

## 3.2 细胞

### 3.2.1 取样流程

将对数生长期的贴壁细胞从培养瓶/板吹洗下来，离心收集细胞沉淀，悬浮细胞直接取适量培养液，离心收集细胞沉淀，用 PBS 缓冲液重悬清洗一遍细胞，离心去除 PBS 缓冲液，收集细胞沉淀，液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱中保存或者干冰运输。

### 3.2.2 适用项目类型

样本类型	细胞	
	建议送样量	最低送样量
重测序	5×10 <sup>6</sup> 个	10 <sup>6</sup> 个
全外显子组测序	5×10 <sup>6</sup> 个	10 <sup>6</sup> 个
全基因组甲基化/全基因组羟甲基化/羟甲基化捕获	5×10 <sup>7</sup> 个	10 <sup>7</sup> 个
多重 PCR_snp 分型/靶向捕获测序/线粒体 snp 分型	5×10 <sup>6</sup> 个	10 <sup>6</sup> 个

### 3.2.3 注意事项

冻存细胞不复苏直接送样也可以，保证足量的细胞即可。

## 3.3 血液

### 3.3.1 取样流程

抽取血液加入含 EDTA 或者枸橼酸钠抗凝剂的采血管，4°保存（可一周）或者 -20°C 保存（半年左右）后冰袋或者干冰运输。

### 3.3.2 适用项目类型

样本类型	血液	
	建议送样量	最低送样量
重测序	≥2ml	≥1ml
全外显子组测序	≥2ml	≥1ml
多重 PCR_snp 分型/靶向捕获测序/线粒体 snp 分型	≥1ml	≥0.5ml

### 3.3.3 注意事项

血液不可用肝素抗凝。

## 3.4 菌体

### 3.4.1 取样流程

#### 细菌菌体

- 1) 取对数生长期的细菌菌液，离心收集菌体沉淀，弃培养基，用 1×pbs 重悬清洗一遍菌体，离心弃上清，收集菌体沉淀，液氮速冻后干冰寄送，如做二代项目可直接冰袋冷藏寄送。
- 2) 挑选平板中生长旺盛的菌体，用刮刀将菌体从平板上刮取下来，或者用 pbs 缓冲液吹洗下来，收集足量菌体到离心管中，液氮速冻后干冰寄送，如做二代项目可直接冰袋冷藏寄送。

#### 真菌菌体

- 1) 取对数生长期的菌液，离心收集菌体沉淀，弃培养基，用 1×pbs 重悬清洗一遍菌体，离心弃上清，收集菌体沉淀，液氮速冻后干冰寄送，如做二代项目可直接冰袋冷藏寄送。
- 2) 挑选平板中生长旺盛的菌体，用刮刀将菌体从平板上刮取下来，或者用 pbs 缓冲液吹洗下来，收集足量菌体到离心管中，液氮速冻后干冰寄送，如做二代项目可直接冰袋冷藏寄送。
- 3) 大型真菌如菌菇类，可取新鲜的子实体，擦拭干净表面的灰尘或培养基质，装入标识好的 EP 管或自封袋后冷藏运输，或液氮速冻后干冰运输。

### 3.4.2 适用项目类型

样本类型	菌体		大型真菌	
	建议送样量	最低送样量	建议送样量	最低送样量
细菌/真菌框架图	5×10 <sup>6</sup> 个	10 <sup>6</sup> 个	≥4g	≥2g
细菌完成图/真菌精细图	5×10 <sup>6</sup> 个	10 <sup>6</sup> 个	≥4g	≥2g

### 3.4.3 注意事项

- 1) 因为菌类样本作为常见的病原微生物，不接受活菌直接寄送，《人间传染的病原微生物名录》中危害程度为第一、第二类不接受任何形式的菌体，必须提供 DNA，其他分类等级的可接受灭活后的菌体。
- 2) 不建议直接寄送甘油菌，但如果甘油菌中菌量能达到 10<sup>6</sup> 菌体，也可尝试送样提取。
- 3) 不建议直接寄送平板，平板运输过程中容易破碎，且存放温度为 4℃可能有污染杂菌的风险。

## 3.5 FFPE

### 3.5.1 取样流程

福尔马林固定石蜡包埋的组织样本（FFPE 样本）是医院病理科为固定组织形态并可常温保存样本采用的常见方法，所以切片可直接常温寄送。

### 3.5.2 适用项目类型

样本类型	FFPE(石蜡切片)	
	建议送样量	最低送样量
重测序	20 片	10 片
全外显子组测序	20 片	10 片
多重 PCR_snp 分型/靶向捕获测序/线粒体 snp 分型	10 片	6 片

### 3.5.3 注意事项

FFPE 样本是对新鲜组织做了甲醛固定后的样品，对 DNA 会造成损伤，所以提取出来 DNA 质量较新鲜组织差很多。

### 3.6 唾液

#### 3.6.1 取样流程

取 30ul-60ul 唾液于预装有 100ul 1×PBS 溶液的管中，标识清楚编号后冰袋冷藏运输。

#### 3.6.2 适用项目类型

因唾液样本中同时包含微生物和宿主的基因组信息，该样本类型仅适用于针对八星捕获测序/多重 PCR 扩增 SNP 分型和线粒体 SNP 分型的产品。

#### 3.6.3 注意事项

无

### 3.7 基因组 DNA

#### 3.7.1 取样流程

取适量的 DNA 样本加入标识清楚的 EP 管中，封口膜封好，装入自封袋中，根据原先的保存条件确定冰袋或干冰送样，如-80℃保存的需干冰送样，-20℃或者 4℃保存的可冰袋送样。

#### 3.7.2 适用项目类型

##### 1) 二代测序

样本类型	DNA 浓度		DNA 体积		OD 比值
	建议浓度	最低浓度	建议体积	最低体积	建议范围
重测序/群体遗传/BSA	50ng/ul	25ng/ul	20ul	10ul	对 OD 值不做硬性要求
线粒体/叶绿体基因组测序	50ng/ul	25ng/ul	20ul	10ul	
全外显子组测序	50ng/ul	25ng/ul	20ul	10ul	
SSR 标记开发	50ng/ul	25ng/ul	20ul	10ul	
全基因组甲基化/全基因组羟甲基化/羟甲基化捕获	60ng/ul	30ng/ul	50ul	25ul	OD260/280=1.8-2.0
多重 PCR_snp 分型/靶向捕获测序/线粒体 snp 分型	20ng/ul	10ng/ul	20ul	10ul	OD260/280=1.8-2.0

##### 2) 三代测序

样本类型	DNA 浓度		DNA 体积		纯度和完整性
	建议浓度	最低浓度	建议体积	最低体积	建议范围

细菌完成图	100ng/μl	60ng/μl	60ul	40ul	OD260/280:1.8-2.0, OD260/230 > 2.0, Nc/Qc=0.95~1.5,DNA 主峰>23kb(PCR 产物主条带明显且单一即可, 大小根据预期来评价), 无弥散, 无降解, DNA 样本无颜色不粘稠, 无螯合剂、金属二价阳离子、变性剂
真菌精细图	100ng/μl	60ng/μl	60ul	40ul	
动植物 denovo	100ng/μl	60ng/μl	60ul	40ul	
PCR 产物测序 (包 cell)	100ng/μl	60ng/μl	40ul	20ul	

### 注意事项

- 1) Chip-Seq 项目/病毒基因组项目只接收客户提供/处理的 DNA 样本, 体积 20ul 以上, 浓度不做要求, 基于项目经验, 这些类型样本为微量 DNA 样本, 即便浓度比较低也可以尝试往后建库, 以实际建库结果为准确定是否可测序。
- 2) 定量需以 Qubit 定量为准, nanodrop 会因为存在杂质等原因导致定量偏高。

## 4. 其他类项目送样要求

### 4.1 各种 PCR 产物测序

建库方式	建议样本量	最低样本量
扩增方式	纯化后的 PCR 产物溶解于 TEbuffer, 总量 $\geq 100\text{ng}$ , 体积 $\geq 10\mu\text{l}$ 。	纯化后的 PCR 产物溶解于 Tebuffer, 总量 $\geq 50\text{ng}$ , 体积 $\geq 10\mu\text{l}$ 。
基因组建库方式 (T4 连接酶建库)	纯化后的 PCR 产物溶解于 TEbuffer, 浓度 $\geq 20\text{ng}/\mu\text{l}$ , 体积 $\geq 25\mu\text{l}$ 。	纯化后的 PCR 产物溶解于 Tebuffer, 浓度 $\geq 10\text{ng}$ , 体积 $\geq 25\mu\text{l}$ 。

注: 要求提供纯化后的 PCR 产物, 产物长度小于 500bp, 无非特异性条带及引物二聚体。

#### 4.1.1 取样操作流程

样本收集:

建议按照实验目的对靶区域进行扩增，扩增结束后回收目的片段再送样。

**样本保存：**

PCR 产物纯化质检结束后，-20℃/-80℃冰箱保存，建议尽快送样，避免反复冻融。

**样本寄送：**

预约干冰或冰袋进行样品寄送，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。

**4.1.2 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℃冰箱中，并保证在实验前始终处于-70℃以下，以避免核酸降解。

**4.2 客户自备文库测序（二代）**

测序平台	建议送样量	最低送样量
Illumina Novaseq/Msieq /Nextseq/Xplus 平台	总量 ≥ 50ng，浓度 ≥ 5ng/μl，体积 ≥ 25μl， 文库大小 300-600bp；	总量 ≥ 30ng，浓度 ≥ 2ng/μl， 体积 ≥ 15μl，文库大小 300- 600bp；
MGI T7 平台	未磷酸化：总量 ≥ 150ng，体积 > 20uL； 磷酸化：总量 ≥ 600ng， 体积 > 20uL；	未磷酸化：总量 ≥ 80ng，体积 > 20uL； 磷酸化：总量 ≥ 300ng，体积 > 20uL；

注意事项	<p>a. 以上浓度均为 Qubit 定量的浓度。如果送样量达不到最小送样量标准, 请提前与销售或技术支持沟通。</p> <p>b. 同批送检的多个包 G 文库, 如出现样本间 index 序列重复, 上机周期需要延长, 延长时间不定。</p>
------	--

#### 4.2.1 取样操作流程

##### 样本收集:

建议按照建库试剂盒的说明书进行操作。

##### 样本保存

PCR 产物纯化质检结束后,  $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 建议尽快送样, 避免反复冻融。

##### 样本寄送:

预约干冰或冰袋进行样品寄送, 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。

#### 4.2.2 注意事项

- 1) 使用 Tn5 转座酶构建的测序文库, 不可以选择华大平台上机; (因为 Tn5 转座酶酶切时所带的测序引物和华大试剂不匹配);
- 2) index 信息尤其重要, 实验时请务必准确记录各样本使用的 index 编号, 以免后期因为 index 编号记录错误混淆数据。
- 3) 为快速推进上机, 建议使用双端各 8 个碱基的 index 组合, 尽量避免使用单端 6 或 8 个碱基的 index, 因为该类 index 重复概率很高, 无法保证测序周期;
- 4) 浓度过低或片段分布异常文库, 不建议送样上机。

## 5 Kbseq 项目送样要求

### 5.1 菌体

#### 5.1.1 取样流程

取对数培养期的菌液 2ml, 离心获得菌体沉淀, 弃上清, 取菌体沉淀冷藏运输, 或直接取菌液 2ml 可以, 菌液也是冷藏运输。

### 5.1.2 注意事项

- 1) 外包装需标识好预约单号, 以便收到样本后可快速转成订单以安排后续实验。
- 2) 不接收细菌之外的其他菌体, 如酵母等真菌。
- 3) 菌体量如果太少可能会提取不到合格量的质粒导致样本判定为不合格, 所以菌量尽可能多一些。

## 5.2 质粒

### 5.2.1 取样流程

- 1) 提好的质粒 DNA 浓度  $\geq 2$  ng/ $\mu$ l, 体积需  $\geq 10$   $\mu$ l, 且主带明显、无污染及降解;
- 2) EP 管标记好样本名称, 装入自封袋, 自封袋备注预约单号等联系人信息, 冰袋冷藏运输送样。

### 5.2.2 注意事项

- 1) 外包装需标识好预约单号, 以便收到样本后可快速转成订单以安排后续实验。
- 2) 质粒片段越长 ( $\geq 30$ kb), 拼接不到全长的风险增大。

## 5.3 PCR 产物

### 5.3.1 取样流程

- 1) 纯化后的 PCR 产物浓度  $\geq 2$  ng/ $\mu$ l, 体积需  $\geq 10$   $\mu$ l。
- 2) PCR 管/EP 管标记好样本名称, 装入自封袋, 自封袋备注预约单号等联系人信息, 冰袋冷藏运输送样。

### 5.3.2 注意事项

- 1) 外包装需标识好预约单号, 以便收到样本后可快速转成订单以安排后续实验。
- 2) PCR 产物建议纯化后送样, 切胶或者磁珠纯化均可, 不接受胶条或者带磁珠的样本送样。

## 6 单细胞/空间组学送样要求

### 6.1 10×单细胞转录组和 10×单细胞免疫组库测序

#### 6.1.1 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
新鲜组织	≥0.4g	≥0.2g	≥3 个, 临床样本 ≥10 个
穿刺样本	≥ 3 根	≥2 根	
血液	5ml	3ml	
冻存组织 (只能抽核, 不适于 免疫组库测序)	≥1g	≥0.5g	
培养细胞系			
冻存细胞	细胞数 ≥ 1×10 <sup>6</sup> ; 冻存前细胞活性在 90%以上		
单细胞悬浮液	细胞量 ≥ 5×10 <sup>5</sup> ; 活性 > 80%; 细胞 直径 < 40μm; 结团率 < 5%		

#### 6.1.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

##### 1) 新鲜组织

###### 样本收集:

- ① 新鲜组织取样后, 后续所有操作均需在 4℃低温进行 (在制冰机制备的碎冰上操作)。
- ② 将新鲜的组织放在培养皿中, 去除非研究组织, 坏死组织等。
- ③ 取适量的新鲜目标组织部位到新的培养皿中, 加入 1XPBS 对新鲜的目标组织块进行几次清洗, 去除血渍, 小心移净液体。
- ④ 使用已灭菌的剪刀和镊子将目标组织部位剪成 2-4mm<sup>3</sup> 大小的组织块。

###### 样本保存:

将处理后的组织块完全浸润于 4℃预冷 1.5ml 样品管的美天旆组织保存液 (货号 130-100-008) 中, 4℃短暂保存

###### 样本寄送:

2-8℃ (冰袋) 避光运输, 取样后需在 48 小时内到达生工生物实验室, 进行组织解离。

**样本备份:**

为防备部分样品重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

**2) 血液****① 新鲜全血****样本收集:**

抽取新鲜的外周血至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中, 轻摇混匀。注意不要产生凝血块, 所有操作均需无菌条件下进行。

**样本保存:**

4 °C 短暂保存

**样本寄送:**

将全血抗凝管使用缓冲介质包裹后, 外部使用冰袋包装后寄送, 注意从-20°C取出的冰袋不要直接接触样品, 以免造成血液样本结冰, 导致样品局部冻伤而使细胞失活。

**② 从全血中收集 PBMC**

- A. 抽取新鲜的外周血 至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中, 注意所有的操作均需无菌条件下进行, 准备的新鲜全血样本需不少于 5mL 并采用 EDTA 抗凝。
- B. 向全血样本中加入等量 1XPBS 稀释全血。
- C. 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正常现象。)
- D. 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, 最佳的分离条件需摸索, 离心转速最大不超过 1200g), (注意离心机降速设置中一定要设置成 no break, 使离心升速与降速平缓)。
- E. 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单个核细胞层, 离心管底部是红细胞与粒细胞。
- F. 小心的吸取白膜层细胞到 15mL 洁净的离心管中, 10mL PBS 或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞。300g, 4°C 离心 10min (注意离心机降速设置中一定要设置成 no break, 使离心升速与降速平缓)。

G. 弃上清, 5mL 的 PBS 或细胞清洗液重悬细胞, 300g, 4°C 离心 10min。(注意离心机降速设置中一定要设置成 no break, 使离心升速与降速平缓)。

H. 重复步骤 F

I. 弃上清, 进行红细胞裂解处理后, 300g, 4°C 离心 10min. 弃上清, 1XPBS 重悬细胞。

#### 样本保存:

细胞计数仪计数, 以按照  $2 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ /mL/管细胞浓度进行冻存, (冻存液配制: 90%FBS+10%DMSO) 放入冻存管中, 梯度降温盒保存置于-80 摄氏度冰箱。

#### 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。

### 3) 培养细胞系

#### 样本收集:

- ① 以贴壁细胞为例, 一般选择生长良好的细胞系, 以生长至 1/3-1/2 瓶底壁为宜;
- ② 无菌环境下去掉旧培养液, 灌满新的培养液, 使用不透气的盖子, 将培养瓶盖用封口膜封紧。

#### 样本保存:

常温短暂保存 (37°C)

#### 样本寄送:

快递箱内需放些缓冲介质避免培养瓶大幅度晃动, 常温运输; 如果温度较低, 需要做好保温。

#### 样本备份:

为避免样品不合格需重新取材、制备或送样, 建议样品至少备份 1-2 份。

### 4) 单细胞悬浮液

- ① 细胞活率:  $\geq 80\%$  (DeNovix® CellDrop FL 细胞计数仪计数, 或血球计数板用显微镜判断);
- ② 细胞形态: 细胞大小均一, 直径介于 7-40 $\mu\text{m}$  (注: 对于非人、鼠物种请提前沟通客户样品的细胞大小, 若细胞直径过小 (<7 $\mu\text{m}$ ) 请确定客户是否有能准确计数及检测活率的方法及仪器;

- ③ 悬液背景: 细胞团及碎片杂质 $<5\%$ , 若有红细胞, 还需进行裂红处理, 无细胞粘连, 无明显的细胞碎片和细胞团, 并保证细胞的完整性;
- ④ 细胞数目: 细胞数目 $\geq 10$  万
- ⑤ 细胞悬液: 不能存在反转录抑制剂, 即不含有  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ 。

#### 样本保存及运输:

- 1)  $4^{\circ}\text{C}$ 运输, 细胞悬液需要在 30 分钟内送达生工生物单细胞测序组实验室。
- 2) 超过 30 分钟需进行细胞冻存, 冻存方法: 细胞数目 $\geq 10$  万进行冻存(冻存液配制:  $90\% \text{FBS} + 10\% \text{DMSO}$ ) 冻存液重悬混匀, 放入冻存管中, 梯度降温盒保存。使用厚度 4cm 以上的泡沫箱包装, 10kg 以上的干冰运输, 避免冻融。

#### 样本备份:

为防备部分样品重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

### 6.1.3 注意事项

- 1) 组织保存液  $2-8^{\circ}\text{C}$  保存, 不可冷冻, 使用时始终置于碎冰 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 上。
- 2) 组织保存液不含抗生素及抗真菌剂等组分, 如有需要可先于细胞培养基中添加。
- 3) 所用耗材(离心管或冻存管)需保证无菌。

### 6.1.4 预约实验说明

#### 1) 样品要求

**组织样品:** 确保样品新鲜无明显坏死; 寄送样品需确保组织离体后 48h 之内, 且在 9:00-15:00 点之间到达实验室, 晚于 15:00 的组织保护液保存至第二天实验。

**细胞悬液:** 确保客户的细胞悬液满足样品质检要求。

#### 2) 预约前提

有客户签字并返回公司的合同。预约实验前, 需指定技术支持, 由项目技术支持确认商务信息合规, 否则不能预约实验。

#### 3) 预约时间及方式

##### 预约时间:

- ① 寄送样本: 建议及早预约, 一般本地提前 2 天、外地提前 3 天预约成功率较高。
- ② 上门服务: 建议提前一周预约成功率较高。

##### 预约方式:

- ① 寄送样本: 预约前请填写《生工生物高通量单细胞测序送样表》, 发邮件预约并抄送技

术支持或项目助理。预估到样时间。

- ② 上门服务：预约前请填写《生工生物 10×Genomics 单细胞上门服务信息确认表》，发邮件预约并抄送技术支持或项目助理；注明时间和地点，时间具体到小时。

**注：**无特殊情况不得轻易更改实验时间，如确需不同项目间做时间调换，请提前沟通确认。

#### 4) 客户细胞悬液制备完成时间要求

- ① 为了保证细胞的活性，同批次的多个样本，第一个样品和最后一个样品悬液制备完时间控制在 30 分钟之内。
- ② 若客户需在同一天进行 2 批或 2 批以上的悬液制备，第一批悬液在上午 9 点之后完成制备，最后一批悬液在下午 16:00 点之前完成制备，且批次之间相隔 1 小时以上。

## 6.2 SMART-seq2 项目

### 6.2.1 各样本类型对应的送样要求

样本类型	送样量	备注	生物学重复
细胞	1-1000 个细胞	不适用于经甲醛或甲酮等固定过的细胞	≥3 个，临床样本 ≥10 个
RNA	建议 ≥50ng; RIN ≥8; 体积 ≥15ul	尽量多送些，过少将无法安排质检	

**备注：**仅适合真核有参考基因组物种来源样本

### 6.2.2 取样操作流程（含取样/保存/运输等）

#### 样本收集（细胞样本）：

由客户制备分离单细胞：可选用有限稀释、流式细胞仪、显微操作，Fluidigm C1 等方法分选单细胞；

- 1) 按照下表在冰上配制 Reaction Buffer，配制好后用移液器轻柔混匀，并短暂离心收集，混匀时避免产生气泡。

组分	体积
10X Cell Lysis Buffer	19μl
RNase Inhibitor	1μl
Total	20μl

**备注：**10X Cell Lysis Buffer 和 Nase Inhibitor 由生工提供，请在收样前提前联系我们寄送

- 2) 请按照下表在冰上配制反应液，充分混匀。

组分	体积
上述 10X Reaction Buffer	1 $\mu$ l
Cell*c	——
Nuclease free water	Up to 10.5 $\mu$ l

**备注:**

- ① 若为 PBS 重悬细胞: 建议加入的细胞液不超过 5 $\mu$ l; 由于培养基及其他组分对反转录及 PCR 反应有抑制作用, 建议将细胞用不含 Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>等的 1X PBS 洗涤两次并重悬, 反应时加入体积越少越好。细胞数量不要超过 1000 Cells, 过多的细胞会对反应产生抑制。
- ② 若用流式细胞仪分选细胞: 可将细胞直接分选至上述 10.5 $\mu$ l 反应液中, 轻柔涡旋混匀。

**样本保存:**

-80°C 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:**

为防备部分样品重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

**6.2.3 注意事项**

- 1) 请直接将细胞裂解于 0.2ml PCR 管中, 避免扩增转管造成的污染和损失。在管上清楚标明样本名称; 样本管上标记的名称要与送样表中一致, 请核实无误; 请用 parafilm 膜把样本管密封好, 然后将样本管置于保护用的 50 mL 离心管或其他类似容器里, 并旋紧盖子;
- 2) 细胞放入 SMART-seq2 试剂盒指定的裂解液中 (提前联系当地销售由生工提供), -80°C 保存, 将样本置于适当的包装箱中, 足量干冰包装, 选择适当的运输方式以避免样本降解;
- 3) RNA 样本寄样前需客户自行对 RNA 的完整性进行检测确认。

**6.3 空间转录组测序****6.3.1 各样本类型对应的送样要求**

- 1) **冷冻组织包埋:** 包括但不限于人、鼠的新鲜组织样本

该类新鲜组织样本冷冻包埋方式称为 OCT 包埋, OCT 包埋是一种聚乙二醇和聚乙烯醇的水

溶性混合物, 此包埋方式可以使样本在冰冻切片时起支撑作用, 增加组织连续性, 减少皱褶及破碎。

## 2) FFPE 样本: 物种仅限于人

使用福尔马林固定, 石蜡包埋的新鲜冻存样本。FFPE 样本常温可长期保存, 是肿瘤研究领域疾病诊断和科学研究中非常常见的生物学材料。

### 6.3.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

#### 1) 冷冻组织包埋

##### 取样说明:

新鲜组织样本必须进行快速冷冻以防止 RNA 降解 (根据样本实际情况选择①或②其中一种冻存方式)

- ① 新鲜组织取样-异戊烷冻存-OCT 包埋: 如果直接放入液氮会在组织周围形成冰晶导致组织形态受损。用异戊烷冷冻后进行 OCT 包埋, 是对组织形态和防止 RNA 降解最有利的保护。
- ② 新鲜组织取样-OCT 包埋-异戊烷冻存: 对具有缝隙、易于卷曲, 组织脆弱易开裂及组织块过小的组织先进行 OCT 包埋再冷冻一种比较好的备样方案。

##### 取样流程:

##### 新鲜组织取样-异戊烷冻存-OCT 包埋

- ① 向金属杯内装入 2/3 的异戊烷 (完全浸没组织的量), 然后将金属杯放入液氮槽中, 液氮的液面和金属杯里面异戊烷的液面高度基本一致, 冷浴 10min 左右, 不易太久, 防止异戊烷凝结。



- ② 使用实验室无尘纸将组织表面多余的血液或液体吸干净, 尽量使组织表面干燥, 防止形成冰晶。

**注意:** 取下新鲜组织, 立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织部分。例如: 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）；送来的组织生工生物均默认为目标组织。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），一个样本需准备至少需要冻存 3 个备份，一份用于常规 RNA 提取，以确保样本自身及样本制备不存在



问题，一份用于切片厚度调整以及捕获区域的确定，一份用作正式实验。

- ③ 用镊子或刮刀将组织放入 2.1 步骤的异戊烷中，直到完全浸没。组织浸入约 1min 或直至冻结。冷冻时间根据组织类型和大小而定。



**注意：**部分组织异戊烷速冻，组织会开裂，开裂会影响其空间结构，不适合继续进行后续操作。

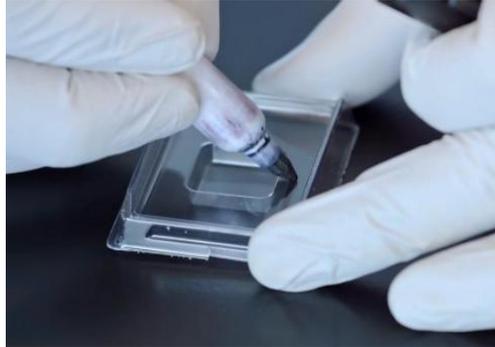
- ④ 将冷冻后的组织转移到预冷的冻存管内，为防止组织样品蒸发和脱水，快速冷冻的组织样品必须储存在密封容器中。然后放在干冰上，及时转移至-80℃冰箱。



**注意：**冷冻的组织在-80℃冰箱可以长期保存，或干冰运输至生工生物实验室，或立即进行

下一步操作。

- ⑤ 标记适当尺寸的包埋模具以标记组织的摆放位置（可拍照记录），将模具放于碎干冰上



**注意：**在加入 OCT 和组织之前，对包埋模具做标记。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。

- ⑥ 从-80℃冰箱取出冷冻组织，干冰转移，并放在干冰上待用。



- ⑦ 先将预冷的 OCT 倒入模具，防止组织沉降。不要产生气泡，若产生气泡，可用枪头或针尖轻轻挑出。



- ⑧ 使用预冷的镊子将冷冻组织放入 OCT 包埋剂内，组织需完全包埋在 OCT 内，需确认无气泡产生，尤其是靠近组织的位置。



- ⑨ 将 OCT 包埋组织的模具立即转移到干冰粉上，继续倒入预冷的 OCT，直至把组织覆盖，组织需要位于包埋盒中间。



- ⑩ 在干冰上等待 OCT 完全冻结成白色，冻结后的包埋样本标记好名称，将 OCT 包埋的组织块在-80℃的密封容器中长期保存，或立即进行冷冻切片和切片放置。不使用密封容器储存可能会使组织脱水并受损。



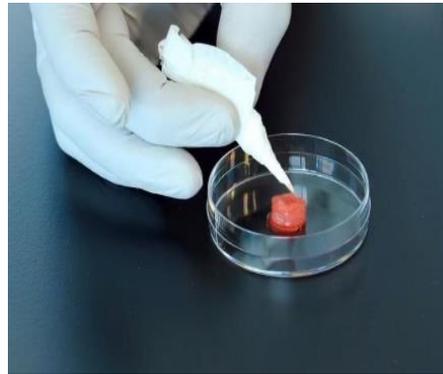
**注意：** 冷冻的包埋样本在-80℃冰箱可以长期保存，或干冰运输至生工生物实验室，或立即进行下一步操作。

**新鲜组织取样- OCT 包埋-异戊烷冻存**

- ① 向金属杯内装入 2/3 的异戊烷 (完全浸没组织), 然后将金属杯放入液氮槽中, 液氮的液面和金属杯里面异戊烷的液面高度基本一致, 冷浴 10min 左右, 不易太久, 防止异戊烷凝结。



- ② 使用实验室纸巾将组织表面多余的血液或液体吸干净, 防止形成冰晶。



- ③ 预冷的 OCT 直接包裹组织不要产生气泡。若产生气泡, 可用枪头或针尖轻轻出, 不要碰到组织。



④ 将包裹 OCT 的新鲜组织转移至 OCT 模具中，继续倒入预冷的 OCT，直至浸没组织。

模具上标记好方位 (可拍照记录)



⑤ 将 6.4 中的 OCT 模具放入预冷的异戊烷中，直至 OCT 完全冻结成白色。



**注意：** 不要将异戊烷浸入到 OCT 模具内。如果没有异戊烷，此步可直接在干冰上操作，干冰可盖上盖子加速冻存。

⑥ 将 OCT 包埋的组织块连同包埋模具放入 5ml 冻存管中-80℃长期保存，不使用密封容器储存可能会使组织脱水并受损，或立即进行下一步操作。



**注意：** 冷冻的包埋样本在-80℃冰箱可以长期保存，或干冰运输至生工生物实验室，或立即进行下一步操作。

## 2) FFPE 样本

**取样流程:**

1) **取材:** 材料选择时须尽可能不损伤所需要的部分, 刀要锐利, 动物组织取材建议灌流后取材, 冲去过血液。尽可能割取鲜活的组织块, 并随即投入固定液。材料应该小而薄, 一般厚度不超过 5mm, 大小不超过 6.5×6.5mm<sup>2</sup>。

**2) 固定: 保持组织形态并硬化**

**福尔马林固定:** 取好的组织块通常选用 10%中性缓冲福尔马林 (PH 值 7.2-7.4) 进行固定, 组织需要在离体后 30 分钟内尽快固定

标本体积	福尔马林体积	固定时间
厚度 3-5mm	组织: 福尔马林	≤6h
截面 5×5mm <sup>2</sup>	≥1: 10	最长不超过 12h

随后用流水冲洗, 大块组织一般冲洗 24 小时, 小块组织一般冲洗 2—10 小时。

**3) 脱水**

脱水指的是利用脱水剂如不同浓度的乙醇将组织内的水分逐步置换出来, 从 30%乙醇开始, 经过 50%、70%、80%、95%、100%至完全脱水。一般各级乙醇中放置 45min 到 1h。需要注意彻底脱水, 避免残留水分导致核酸降解, 该步骤通常由脱水机完成, 需要注意及时更换脱水机中的液体, 使用新鲜的, 高质量, 不经水稀释的试剂, 避免水分残留。

**4) 透明**

当组织内的水分被脱水剂置换出后, 将组织块先经纯乙醇与二甲苯的等体积混合液, 再进入透明剂纯二甲苯, 置换出脱水剂, 因透明剂的折光系数接近蛋白的折光系数, 因此会使组织变得透亮, 该过程称之为透明, 建议使用新鲜的二甲苯, 以避免过去使用时水分残留的可能, 透明时间应由组织大小而定, 一般各级停留时间在 30min 至 2h, 在纯二甲苯中应更换 2 次, 总时间则以不超过 3h 为宜。

**5) 浸蜡**

须在恒温箱中进行, 恒温箱的温度调节至高于石蜡熔点 3 度, 使经过透明的组织块依次用石蜡与二甲苯的等量混合液、纯石蜡处理。纯石蜡应处理 2~3 次, 透蜡的时间依材料性质而定, 一般每次需 15~30min。

**注意:** 浸蜡和包埋福尔马林固定组织中使用的石蜡溶液温度和组分可能各异, 在使用高熔点的石蜡时, 包埋过程需要较高的温度, 可能导致样本降解增加。为了确保从 FFPE 样本中可用核酸和蛋白的理想回收, 应当使用低熔点的石蜡, 避免使用含添加剂如蜂蜡的石蜡, FFPE

样本保存在 4℃，可减缓核酸和蛋白的降解。

#### 6) 组织包埋

准备好纸盒，将熔蜡倒入盒内，迅速用预温的镊子夹取组织块平放在纸盒底部，切面朝下，再轻轻提起纸盒，平放在冷水中，待表面石蜡凝固后立即将纸盒按入水中，使其迅速冷却凝固，30min 后取出。后续可低温保存或运输至生工生物实验室。

#### 样本运输：

- 1) 冷冻的样本或者包埋好的样本，都要埋在干冰里面进行运输。不能冻融。干冰盒为 5cm 以上厚的泡沫箱，加盖，10kg 以上的干冰运输。注意样品运送前保存在-80℃ 冰箱；样本置于干冰中间位置，样品保存期间切忌反复冻融。如下图所示：



- 2) FFPE 样本：低温寄送样本（冰袋）

### 6.3.3 预约实验说明

#### 1) 样品要求

寄送样品：确保样品冻存时无明显坏死，且在 9:00-15:00 点之间到达实验室，晚于 15:00 的保存至第二天实验。

#### 2) 预约前提

有客户签字并返回公司的合同。预约实验前，需指定技术支持，由项目技术支持确认商务信息合规，否则不能预约实验。

#### 3) 预约时间及方式

##### 预约时间：

寄送样本：建议及早预约，一般本地提前 2 天、外地提前 3 天预约成功率较高。

##### 预约方式：

寄送样本：预约前请填写《生工生物空间转录组测序送样表》，发邮件预约并抄送技术支持或项目助理。预估到样时间。

注：无特殊情况不得轻易更改实验时间，如确需不同项目间做时间调换，请提前沟通确认。

### 6.3.4 风险提示

以下任何一种情况出现，样品将判定为不合格，相关影响及风险说明如下：

- 1) 进行冷冻组织包埋：新鲜组织取样-异戊烷冻存-OCT 包埋备样时，必须要进行异戊烷冻存,不能用其它方法替代。目前必须用**异戊烷 (CAS78-78-4, 规格 500 mL, 此试剂易燃, 请小心使用)**。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。
- 2) 进行冷冻组织包埋备样时：只能使用 **OCT** (美国樱花 OCT 冷冻切片包埋剂: SAKURA , 货号: 4583, 规格: 118 mL/瓶) **包埋**，其它类型的包埋不能做空间转录组。OCT 包埋保留组织结构并在冷冻切片过程中提供结构支撑；在切片过程中保持最佳温度，从而使切片光滑；由于其水溶性，可与多种染色程序兼容。
- 3) 客户在制备样本时，同一样本需要准备**至少** 3 个包埋块 (质检, 切片厚度调整、捕获区域确定,正式实验)：一份用于常规 RNA 提取，以确保样本自身及样本制备不存在问题，经过 Agilent2100 检测，RNA RIN>8 则认为样本本身及制备过程没有降解，如若未进行样本 RNA 质检，将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险，另外部分用于正常的切片厚度调整(10-50 $\mu$ m)和捕获区域确定；剩余的样本进行后续正式实验。
- 4) 空间转录组对于冷冻组织包埋样本类型要求较高,某些样本类型明确**不适合**进行该实验：**皮肤、胰脏、骨类, 软骨**等；将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险。
- 5) 目前 Visium 芯片捕获区域大小为 6.5x6.5mm<sup>2</sup>，每块组织样本不宜过大（长宽高约 0.8 cm）；过大会影响包埋效果，也会导致有部分组织切片时捕获不到。
- 6) 目前 Visium 芯片捕获区域大小为 6.5x6.5mm<sup>2</sup>，因此对组织包埋块的大小有一定要求（ $\leq 6.5\text{mm}^3$ ），较小的组织可建议多个组织包埋在一起，组织间隔尽量小，但是不要重叠，多个组织保持在一个水平面，厚度满足 1mm 以上即可。
- 7) 同一 FFPE 样本**至少** 3 个包埋块，一份用于常规 RNA 提取，质检提取的 RNA，要求 DV200 $\geq 50\%$ 。DV200 指的是 RNA 样本中，长度大于 200 nt 的 RNA 分子数量占总分子数量的比例。DV200 值越高，表明 RNA 分子的完整度越高。空间转录组的探针长度是 25+25 nt，RNA 分子越完整，跟探针结合的几率就越高。如果 RNA 降解得过短，就会

影响探针的捕获效率。将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险。如若未进行样本 RNA 质检, 将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险, 另外部分用于正常的切片厚度调整(10-50 $\mu$ m)和捕获区域确定以及正式实验; 剩余的样本可以进行后续正式实验。

- 8) FFPE 样本切片厚度一般不要超过 5 $\mu$ m (区别于冰冻组织样本的 10 $\mu$ m), 切片样本大小不宜超过 6.5mm  $\times$  6.5mm (载玻片的大小), 超出的部分无法被捕获到, 可能会影响其他样本空间信息。

## 7. 多组学类项目送样要求

### 7.1 转录组+蛋白组

#### 7.1.1 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)	$\geq 3$ 个, 临床样本 $\geq 10$ 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	$1 \times 10^7$	
	微生物	$1 \times 10^8$ (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	$\geq 3$ 个, 临床样本 $\geq 10$ 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	$\geq 3$ mL (至少 1mL)	
	细胞	$5 \times 10^6$	
	微生物	$5 \times 10^6$ 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			

## 7.1.2 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 $\leq 0.5$  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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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: 不能振荡采血管) 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) 200 $\mu$ L 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) 200 $\mu$ L 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 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 100μL 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°C, 300g-500g 离心 5min, 弃上清, 用预冷的 PBS 溶液清洗, 4°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 1×10<sup>7</sup> cell/sample 细胞悬浮液于 2mL 无菌离心管中, 4°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 °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

## 7.2 转录组+代谢组

### 7.2.1 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	$1 \times 10^7$	
	微生物	$1 \times 10^8$	
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	$5 \times 10^6$	
	微生物	$5 \times 10^6$ 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

### 7.2.2 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°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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>7</sup> 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

### 7.3 转录组+蛋白组+代谢组

#### 7.3.1 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
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	$1 \times 10^7$	
	微生物	$1 \times 10^8$ (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	≥6 (至少 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	$5 \times 10^6$	
	微生物	$5 \times 10^6$ 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	$1 \times 10^7$	
	微生物	$1 \times 10^8$	

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

## 7.3.2 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 $\leq 0.5$  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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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: 不能振荡采血管) 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 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 100μL 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°C, 300g-500g 离心 5min, 弃上清, 用预冷的 PBS 溶液清洗, 4°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 1×10<sup>7</sup> cell/sample 细胞悬浮液于 2mL 无菌离心管中, 4°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 °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

## 7.4 微生物多样性+代谢组

### 7.4.1 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	
<b>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)</b>			

### 7.4.2 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 $\mu$ m 和 0.45 $\mu$ 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 0.22um 或者

0.45μm 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/cm<sup>3</sup> 的小块状，放在无菌离心管中。

#### 样本保存

液氮速冻 5-10min，-80℃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。

### 7.4.3 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℃冰箱中，并保证在实验前始终处于 -70℃以下，以避免核酸降解。

## 7.5 宏基因组+代谢组

### 7.5.1 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	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
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	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	
<b>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)</b>			

## 7.5.2 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 $\mu$ m 和 0.45 $\mu$ 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 $\mu$ m 或者 0.45 $\mu$ 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/cm<sup>3</sup> 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。

### 7.5.3 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 并保证在实验前始终处于 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下, 以避免核酸降解。

## 8. 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 避免反复冻融。并且样本在 $-80^{\circ}\text{C}$ 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  $25^{\circ}\text{C}$  下能稳定保存样本 3 天,  $4^{\circ}\text{C}$  保存样本 7 天、 $-20^{\circ}\text{C}$  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。

## 9. 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