

## 《医学常规产品样本采集及运输指南》

### 目录

一、前言.....	2
二、取样原则.....	2
三、组织采集保存指南.....	4
1、细胞.....	4
2、全血.....	5
3、动物以及临床标本组织.....	7
4、血清/血浆.....	10
5、外泌体样本采集.....	11
四、样品命名、包装、标识.....	12
1、样品命名.....	12
2、样品包装.....	13
3、样品标识.....	13
五、附：医学样品采集不建议接收情况汇总.....	13

## 一、前言

### 适用范围

本指南介绍百迈客医学实验平台常规产品组织样品的送样要求及制备方法。采集送样前请仔细阅读。

### 声明

对于危害程度为第一、二类的高致病性样品，只接收提取后的核酸样品，不接收组织样。对于危害程度为三、四类的致病性或传染性的组织样，必须先通过销售或运营与医学实验平台负责人沟通，确认无高致病和传染性且能进行后续实验后再安排样品寄送。危害程度的判定标准具体参见《人间传染的病原微生物名录》。

### 提取风险提示

核酸提取质量与物种及组织部位、样本制备、样本交接、提取方法与操作、以及环境等因素息息相关，故无法完全保证提取质量，望老师知悉理解，并做好组织备份。为保障获得相对较高质量的核酸，请老师务必按照以下指导原则准备样本。

## 二、取样原则

### 取样的代表性

所采集的样本应该通过严格的细胞学、组织学、病理学等相关鉴定，因为这关系到实验最终结果是否具有科学意义，所以客户须根据实验目的设计相关科学取样方案和取样步骤。

## 取样的准确性

正常组织样本中不能含有病变组织，而病理组织样本中也不可以夹带有正常组织。在条件允许的前提下，争取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，否则可能会影响实验结果的重复性和可信度。代表性样本的各种特征数据必须被准确记录，并按要求采集、制备、储存、运输进行实验处理。

## 取样的重复性

生物学重复的取样应尽量减少重复间样品的差异。在条件允许的前提下，做到重复样本在取材时间、部位、处理条件等方面尽可能保持一致，否则可能会影响实验结果的重复性和可信度。

## 取样的及时性

样本质量是影响实验结果的最关键因素，因此用于研究的实验样本，在采集、贮存、运输和制备的过程中尽可能地做到迅速，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。

## 取样的低温性

所取样本离体后，经快速清洗和标记等处理后，应立即投入液氮中速冻至少 3 h，之后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱或者干冰中，确保在实验操作前样品始终处于 $-80^{\circ}\text{C}$ ，以避免 RNA 的降解。

## 三、组织采集运输指南

### 1、细胞

#### 细胞样品收集及运输方法

一次 RNA 提取反应所需细胞数 $\leq 1 \times 10^7$  个，以  $3 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  个为宜，可以将细胞经裂解液裂解后冻存运输。细胞富集过程，请勿使用胰酶（胰酶使用对操作要求较严，操作不当易导致细胞损伤从而导致提取的 RNA 降解）！

#### 贴壁细胞

- a 从培养箱中取出贴壁培养的细胞，显微镜下观察细胞，确定生长状态良好（正常细胞融合度在 80 %左右）；
- b 弃去培养基，向细胞培养瓶或培养皿中加入 5 mL PBS (RNase free, 室温)，洗一次；
- c 弃尽 PBS，加入适量细胞裂解液，反复吸打数次；直至看不见成团的细胞块，使之充分溶解于裂解液中形成清亮不粘稠的液体；
- d 将裂解好的细胞转移至 1.5 mL 旋盖尖底离心管 (RNase free) 中，置于 $-80^{\circ}\text{C}$  或液氮中长期保存；

运输方式：干冰运输。

\*注：判断裂解液加入量是否合适的标准可以根据细胞溶解物的黏度来判断。在细胞刚溶解时，可以发现丝状物出现，若裂解液加入量合适，吹打几次后，丝状物会消失，液体黏稠性下降；若裂解液的量过少，丝状物往往一直存在，液体黏稠性大，应继续补加裂解液。裂解液加入量过少，会导致抽提的 RNA 降解。

#### 悬浮细胞

- a 确定细胞生长状态良好；离心得到细胞沉淀（依据客户实验室细胞离心步骤，注意细胞离心要适度，不要使细胞离心过实而造成裂解液不能充分渗透）；
- b 弃去培养基，加入 1 mL PBS (RNase free, 室温)，轻轻将细胞沉淀悬起，转移至 2 mL 旋盖尖底离心管 (RNase free) 中；
- c 离心（依据客户实验室细胞离心步骤，注意细胞离心要适度，不要使细胞离心过实而造成裂解液不能充分渗透）得到细胞沉淀，弃去 PBS，加入适量细胞裂解液，反复吸打数次，直至看不见成团的细胞块，使之充分溶解于裂解液中。

d 置于-80 °C长期保存；

运输方式：干冰运输。

\*注：判断裂解液用量是否合适的标准同上。

其他方式

对于不具备裂解液的客户，得到清洗后的细胞后可以液氮速冻后-80°C保存，干冰运输。

\*注：由于细胞量少，干冰运输务必保证细胞处于冷冻环境，防止环境温度增加细胞降解。

## 细胞样品的保存及运输要求

### DNA 提取

液氮速冻法：离心收集的细胞直接液氮速冻后，转移至-80°C低温保存，送样时选择干冰运输寄送。

### RNA 提取

#### 液氮速冻法：

离心收集的细胞直接液氮速冻后，转移至-80°C低温保存，送样时选择干冰运输寄送。

#### TRIzol 裂解法：

离心收集的细胞迅速溶于 TRIzol 裂解，参考用量为每  $5 \times 10^6$  个细胞加 1 mL TRIzol；

细胞溶于 TRIzol 后，如出现成团，需用吸头将细胞团吹打散，或者激烈震荡混匀，使细胞完全溶于 TRIzol 中充分裂解；

之后转移至-80°C低温保存，送样时选择干冰运输寄送。

## 2、全血

### DNA 提取

要求为全血样本，使用 EDTA 抗凝管或柠檬酸抗凝管采集样品（由于会影响

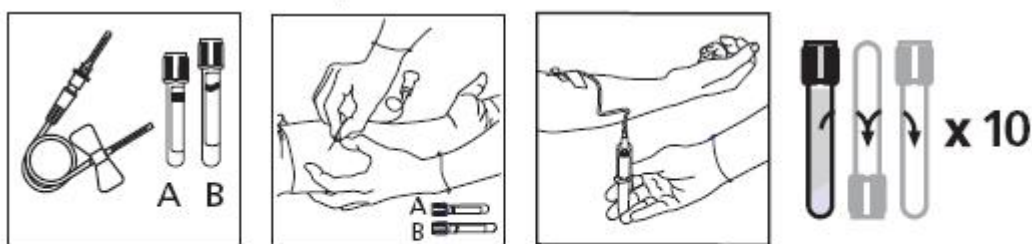
后续建库实验，禁止使用肝素抗凝)

采集血液时，必须经过抗凝，避免出现凝结成块。新鲜采集好的抗凝血液，用移液器转移到 2mL 离心管中，足量冰袋或干冰寄送；冷冻的血液，干冰寄送。注意：由于 EDTA 抗凝采血管大多为玻璃易碎材质，切勿使用采血管原管寄送，以防采血管在运输转移途中破裂，造成样品污染、损失。

## RNA 提取

### PAXgene Blood RNA 管采集法

- 1、使用前，将 BD 公司的 PAXgene Blood RNA Tube 正立放置于室温或 4°C 保存，采血前，需将采血管温度恢复至室温；
- 2、采集病人血样时，如果使用多种不同的采血管采集同一病人的多管血样，请在最后一次采血时使用 PAXgene Blood RNA Tube；如果仅用 PAXgene Blood RNA Tube 采集血样，需先用另外一个采血管采集 1-2 mL 血样，丢弃该管血样，再使用 PAXgene Blood RNA Tube 采集血样。



Draw Order:  
Tube A - Discard Tube  
Tube B - PAXgene™ Blood RNA Tube

- 3、血样采集后，请立即将采血管上下颠倒混匀（十次），并于 18-25 °C 正立放置至少 2 h。
- 4、若不能立即进行 RNA 提取，请将采血管正立置于塑料试管架上（注意：试管架与采血管壁之间需留有一定的空间，防止低温保存过程中管壁裂开），先于 -20 °C 放置 24 h，然后转移至 -70 °C 或 -80 °C 进行长期保存；
- 5、采血及样品保存视频操作过程，请查看：  
<http://www.preanalytix.com/videos/rna-tube-collection-video/>，  
<http://www.preanalytix.com/videos/rna-tube-freezing-video/>，详细的操作步骤请查阅官方使用手册；
- 6、运输方式：干冰运输。

### PAXgene Blood RNA 管送样量要求：

项目类型	全血送样量要求
转录组	1 管
Lnc	1 管
小 RNA	1 管
转录组+小 RNA	2 管
Lnc+小 RNA	2 管
转录组+Lnc+小 RNA	2 管

### 血液细胞分离法

分离白细胞或有核细胞（须在血液采集后半小时内进行，血液不能冻存）

- 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；
- 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），3000 g 离心 30 min；
- 用移液器小心分离出白细胞层；用 PBS（1×）清洗白细胞，离心回收白细胞，弃去上清；
- 按 2mL 血液分离的白细胞加入 1mL TRIzol 的比例加入适量 TRIzol 试剂，用吸头将细胞团吹打散，或者激烈震荡混匀，使细胞完全溶于 TRIzol 中充分裂解；
- 转移至-80℃低温保存。

建议客户自行根据实验室条件选择红细胞裂解液或白细胞分离液进行细胞收集。

运输方式：干冰运输。

## 3、动物以及临床标本组织

### 组织解剖速冻法

- 1、建议针对活体或刚死亡个体进行解剖取样；

- 2、个体死亡后，实在无法立即解剖，需将生物体放入 4℃冰箱暂存，不可冻融；
- 3、所有器械和环境需要消毒灭菌；
- 4、在医用托盘上放一层冰块，然后覆盖上一层锡箔纸，再铺几层无菌布，将个体放在无菌布上进行取样。保持整个取样过程在低温中进行可以延缓核酸的降解；
- 5、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类型。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）；
- 6、迅速用预冷的 PBS 溶液（RNase free）或生理盐水将组织表面的残留血液冲洗干净；
- 7、如果组织体积较大，应尽量将组织切成长宽高均 $\leq 0.5$  cm 的小块（即黄豆大小）；
- 8、将处理好的组织样本混合均匀后保存于旋盖的冻存管中；
- 9、迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后转移至-80 °C长期保存；
- 10 运送方式：干冰运输。

## 稳定剂保存法

### RNAlater® Tissue Collection

RNAlater® Solution 室温保存，如产生沉淀，37 °C加热使沉淀溶解。RNAlater® Solution 仅适用于新鲜采集的样本，已冷冻保存的组织样本，请选用 RNAlater® -ICE (P/N AM7030) 进行保存。RNAlater® Solution 可以保存绝大多数的组织样本、细菌、酵母。不适用于骨头及表皮蜡质丰富的植物（不建议用 RNAlater 保存全血、血浆、血清和细胞样品）。

用解剖刀将组织切成长宽高均 $\leq 0.5$  cm 的样本，也可以保存较小体积的整个组织器官（如小鼠脾脏及肾脏等）；

将组织样本浸入 10 倍组织体积的 RNAlater® Solution 中，以使组织完全浸没；

将样本置于 4 °C 保存过夜（以使 Solution 完全渗透组织），然后转移至-80 °C长期保存；

运输方式：干冰运输。

注：如果组织带血液或其他体液，需要过夜后更换一次 RNAlater® Solution。



\*注：

- (1) RNeasy Lysis Solution 仅适用于新鲜采集样本，在浸入 RNeasy Lysis Solution 之前，不要将组织冷冻。
- (2) 在浸入 RNeasy Lysis Solution 之前，将组织切成长宽高均 $\leq 0.5$  cm（任何一边的最大长度不能大于 0.5cm）的样本。
- (3) 不要将刚浸入 RNeasy Lysis Solution 中的样本立即冷冻，需将样本置于 4 °C 保存过夜（使 Solution 充分浸润组织样本），然后转移至-20 °C 或-80 °C 长期保存；如果采集样本时，在没有冰箱的情况下，可以把保存于 RNeasy Lysis Solution 样品置于冰上数小时再转移至室温。
- (4) RNeasy Lysis Solution 不会影响组织结构，可以把已保存的组织从 RNeasy Lysis Solution 中取出，切下实验所需的用量，把剩余的组织再放入到原来的保存液中继续保存。
- (5) 保存于 RNeasy Lysis Solution 中样本，-20 °C 存放时，样品不会结冻，但可能会有晶体析出，这并不影响后续的 RNA 提取工作；-80 °C 存放时，样品会结冻，在进行 RNA 提取前，需置于冰上融化再进行后续操作，解冻后的样本可再次放入-80 °C 保存。
- (6) 一般来讲，生物样本保存于 RNeasy Lysis Solution 中，37 °C 可存放 1 天，25 °C（室温）可存放 1 周，4 °C 可存放 1 个月，-20 °C 或-80 °C 可长期保存。但鉴于生物样品的特殊性 & 实验可重复性，建议所有保存于 RNeasy Lysis Solution 中样品，都要置于-20 °C 或-80 °C 长期保存。

### 组织样制备注意事项

1) 组织样品离开活体后，建议在 3min 内进行液氮速冻，速冻前操作时间越长，RNA 降解的可能性越大。

2) 对于 RNA 类项目的癌症样品，我们建议手术取下的组织迅速放入 RNeasy Lysis Solution 中，4°C 孵育 24 小时，然后弃掉 RNeasy Lysis Solution，切下坏死区的组织以及癌旁组织，转入旋盖的液氮预冷冻管中，液氮速冻，-80°C 保存，干冰运输。

3) 组织样不建议使用 TRIzol 送样，如必须，需充分液氮研磨后溶于适量 TRIzol 中，组织样品切勿过量（按试剂说明书要求操作），常温裂解 5min 后，-80 低温冻存，干冰运输。

## 4、血清/血浆

血清/血浆类液体样本由于基本不含细胞，游离核酸量极不稳定，提取得率低，波动大， 此类样品建议客户提取核酸后送样。

### 血清样品采集方法

- 1) 使用含凝血激活剂的采血管或普通真空采血管采集血液样品，室温静置 10-60min 使血液凝集。
- 2) 1900g (或 3000rpm) , 4°C, 离心 10min。
- 3) 小心转移上层血清 (黄色) 至新的 1.5ml 离心管中，枪头不要触碰中间层 (白细胞和血小板层)。一般情况下，10ml 的血液可分离出 3-5ml 血清。
- 4) 将分离出的血清 16000g, 4°C, 离心 10min。
- 5) 枪头不要触碰到管底一侧的杂质,小心转移上清到一个新的 1.5ml 离心管中,-80°C 保存。

### 血浆样品采集方法

- 1) 使用 EDTA 抗凝管采集血液样品 (采集后的血液样品可置于室温或 4°C 短暂保存, 但不得超过 1h)。
- 2) 1900g (或 3000rpm) , 4°C, 离心 10min。
- 3) 小心转移上层血浆 (黄色) 至新的 1.5ml 离心管中，枪头不要触碰中间层 (白细胞和血小板层)。一般情况下，10ml 的血液可分离出 4-5ml 血浆。
- 4) 将分离出的血浆 16000g, 4°C, 离心 10min。
- 5) 枪头不要触碰到管底一侧的杂质,小心转移上清到一个新的 1.5ml 离心管中,-80°C 保存。

### 血清血浆样品送样要求

- 1) 冰冻状态下的血清血浆样品，呈淡黄色或黄色，如果呈淡红色或红色，则为溶血样品，视为不达标，不予提取。
- 2) 室温融化后的血清血浆样品，应为黄色或淡黄色透明液体，如有絮状物或浑浊状态，视为不达标，不予提取。
- 3) 每个样品总体积要求 >2ml，体积 <1ml 视为不达标，不予提取。

## 5、外泌体样本采集

### 注意事项：

用于分离外泌体的样品不能加入任何 RNA 保护剂

### 血清样本（送样量不低于 2ml）

制备详细步骤同血清样品采集方法

为最大程度保证血清质量，建议将血清过孔径为 0.8um 的滤膜。

### 血浆样品（送样量不低于 2ml）

制备详细步骤同血浆样品采集方法

为最大程度保证血浆质量，建议将血浆过孔径为 0.8um 的滤膜。

### 细胞上清

注：细胞培养基必须使用去除 exosome (de-exosome) 的血清或者无血清培养基（客户自制或购买）。

- 1) 细胞在正常含有血清的培养基中培养一定时间，细胞融合度在 70%-80%，
- 2) 对于贴壁细胞，去除原有培养基，换为新的不含外泌体的培养基或者无血清培养基；对于悬浮细胞， $300 \times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ，10 分钟收集细胞，使用不含外泌体的培养基或者无血清培养基悬浮细胞并继续培养。
- 3) 细胞继续培养 24-48 小时，根据细胞的生长速度确定收取上清时间。
- 4) 收集细胞上清（收集前先过孔径为 0.8um 的滤膜）， $300 \times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 分钟；小心吸取上清，注意避免吸入细胞或者细胞碎片。
- 5)  $3000 \times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ，再次离心 15 分钟，确保将细胞或者细胞碎片去除干净。
- 6) 将上步骤中的上清转移到新管中， $2000 \times g$ ，20min 去掉细胞和细胞碎片。
- 7) 将上步骤中的上清转移到新管中， $10000 \times g$ ，30min 去掉大的 EVs。
- 8) 将上步骤中的上清转移至 50mL 注射器中，过孔径为 0.22um 的滤膜去掉大的 EVs。
- 9) 取上清，注意避免吸入细胞或者细胞碎片，合并相同的细胞培养液上清样品，装入无菌的玻璃瓶，可在  $4^{\circ}\text{C}$  短期保存（1-2 天），长期保存可冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。建议细胞上清分离后尽快进行外泌体分离，保存在  $4^{\circ}\text{C}$  和  $-80^{\circ}\text{C}$  都会对产量有一定的影响。

### 细胞上清样品送样要求

- 1) 样品总体积 $\geq 50\text{ml}$ ， $< 30\text{ml}$  不予提取。
- 2) 样品在液体状态下澄清透明，无絮状或块状不溶物；非澄清透明、浑浊、有不溶物的样品，视为不合格，不予提取。

注：客户自行富集好的外泌体应充分溶解在 $\leq 100\mu\text{l}$  的 PBS 中， $-80^{\circ}\text{C}$ 保存，大体积干冰运输。

## 6、核酸样品

- 1) 提取完成后的 RNA 溶液直接放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行保存；样品运送前保存在 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱；（送样体积不小于  $10\mu\text{l}$ ，核酸信息单中务必填写溶剂名称）
  - 2) 提取完成后的 DNA 溶液直接放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行保存；样品运送前保存在 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱；（送样体积不小于  $10\mu\text{l}$ ，核酸信息单中务必填写溶剂名称）
- 运输方式：干冰运输。

### 用于 microRNA 实验的样本总 RNA 准备

如果您开展的实验项目为 miRNA 的相关实验，并且提供的是总 RNA 的样品，请务必确认您采用的总 RNA 的提取方法保留了小 RNA（包括 miRNA）。

## 四、样品命名、包装、标识

### 1、样品命名

“样品名称”请避免出现汉字，请采用字母和数字表示，长度控制在 8 个字符以内。

对于备用样品即同一个样品送的备份组织请务必在信息单中备注清楚。

## 2、样品包装

溶于 DEPC-H<sub>2</sub>O, TRIzol、RNAlater 等液体的样品, 建议使用螺纹管或使用 Parafilm 密封 1.5 mL 离心管运输。

从液氮或-80℃冰箱取出组织样品(建议用冻存管存放组织样品;若选用弹开式离心管放置样品,请确认已用 Parafilm 密封管口),请选用保温性好的泡沫盒(建议壁厚 2 厘米以上)进行样品存放,准备大约 8~10 公斤块状干冰(干冰易挥发,具体用量可以向样品中心咨询),以提供低温的样品保存环境。不同提取样本请务必分开包装,对于样品数量较多的项目为了尽快完成样品的交接入库工作请按名称或信息单中样品顺序按每 5-10 个样品的小包进行一个中包,最后将中包汇总成一个大包。

在选择与委托快递公司时,请事先确认预计送达的时间,并且应在运输过程中应随时跟踪货物的情况,以便您一起追踪样品的运输状态。

## 3、样品标识

请在每个样品管上清晰、简明地标记样品名称(采用质量较好的油性笔,并避免与乙醇等有机溶剂接触)。样品管请用 Parafilm 封口。管上样品名称应与递交的信息单中的样品名称保持完全一致。

## 五、附：医学样品采集不建议接收情况汇总

- ① 组织样直接投入 trizol 中保存,未经液氮充分研磨的组织样不接;
- ② 提取 RNA 项目,全血样品必须用 PAXgene 血液 RNA 管采集,其他采血管送全血样品不接。(可建议老师自行分离 PBMC 冻存或加入 trizol 中充分裂-80℃保存,干冰送样);
- ③ 提取 DNA 项目,凝血样品不接(需要用 EDTA 抗凝管采集血液);
- ④ 血清血浆样品淡红色或者红色状态,不接(要求为黄色或淡黄色,体积大于 2ml);

- 
- ⑤ 客户富集的外泌体样品体积不大于 100ul；
  - ⑥ 细胞上清样品解冻后浑浊状态, 不接(要求为清澈透明, 体积大于 50ml)；
  - ⑦ 细胞保存在 RNAIater 等商业保护液中, 不接(无法收集细胞)；
  - ⑧ 细胞送样量至少要达到 10 的 6 次方(做过分选的细胞要保证细胞活性)；
  - ⑨ 解剖组织样(比如肺、心脏、肠)外周带血或污物或者腐烂发黑样品不接(需要冲洗干净)；
  - ⑩ 骨髓样品需要制备成细胞送样(骨髓提取得率低, 完整性差)；
  - ⑪ 送检核酸样品, 体积大于 10ul(体积过少的样品检测会消耗完, 无法继续建库测序)；
  - ⑫ 带有传染性病原微生物的组织样不接(不满足实验室环境条件, 传染后果严重)