

# ONT 测序 RNA 样品准备、 储存及运输指南

## 目录

1. 样本准备前注意事项.....	4
1.1 取样的代表性.....	4
1.2 取样的准确性.....	4
1.3 取样的重复性.....	4
1.4 取样的及时性.....	4
1.5 取样的低温性.....	4
2. 样本准备与保存方法.....	5
2.1 常规样品准备、保存及运送方式.....	5
2.1.1 植物组织.....	5
2.1.2 动物组织.....	5
2.1.3 细胞.....	6
2.1.4 全血样本.....	7
2.1.5 酵母菌.....	7
2.1.6 真菌.....	8
2.1.7 核酸样本.....	8
2.2 RNAlater® Tissue Collection.....	8
2.3 风险说明.....	9
2.3.1 组织量不足.....	9
2.3.2 反复冻融的组织.....	9
2.3.3 长年保存的组织.....	9
2.3.4 微量组织.....	10
3. 注意事项.....	10
3.1 样品命名、包装、标识.....	10
3.1.1 样品命名.....	10
3.1.2 样品包装.....	10
3.1.3 样品标识.....	11
3.2 送样量.....	11
3.2.1 组织送样量.....	11
3.2.2 RNA 送样量.....	11
4. 样品不足、降解等可能存在的风险.....	12
4.1 总量不足或浓度过低存在风险.....	12

---

4.2 降解样品（尤其基因组样品） .....	12
4.3 目标 RNA 含量低.....	12
4.4 蛋白或其他杂质污染.....	12

## 1. 样本准备前注意事项

### 1.1 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。

### 1.2 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（低温、迅速）采集、制备、贮存、运输进行实验处理。

### 1.3 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，可以使用同一个体的作为重复的尽量选用同一个体，不能使用同一个体的应保证父母本、雌雄（性别）、年龄相同，否则可能会影响实验结果的重复性和可信度。

### 1.4 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。

### 1.5 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 1-3 h 以上，之后保存于-80 °C 冰箱或者干冰中，确保在实验操作前样品始终处于-80 °C，以避免 RNA 的降解。

## 2. 样本准备与保存方法

### 2.1 常规样品准备、保存及运送方式

#### 2.1.1 植物组织

由于较老组织 RNA 含量低，而次生代谢物含量一般相对较高，因此在不影响实验设计的前提下请尽量选择健康、幼嫩的组织新鲜组织样，采样流程如下：

- 1) 用 70%酒精将材料表面的灰尘及泥土冲洗干净，吸水纸蘸干，再从植物体上取下新鲜组织

注：如果是需要进行处理，请在活体上进行处理后再取样。

- 2) 如果组织体积较大，将组织剪切成小块；
- 3) 将处理好的组织样本混合均匀后保存于 2 mL 或更大体积的旋盖冻存管中，标注编号。
- 4) 迅速置于液氮中冷冻 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后单个样品放于自封袋中，转移至-80 °C 长期保存；
- 5) 运送方式：干冰运输。

#### 2.1.2 动物组织

- 1) 活体取下新鲜组织，立即剔除结缔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）；如果是昆虫样本，需进行表面微生物的清洗，较大个体的尽量选取不带肠道部分的组织，对于较小个体只能用整个个体的，建议进行适当的饥饿处理（但需注意保证昆虫的活性）。
- 2) 迅速用预冷的 PBS 溶液（RNase free）或 0.9%生理盐水将组织表面的残留血液冲洗干净。
- 3) 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）。
- 4) 将处理好的组织样本混合均匀后保存于旋盖的冻存管中。

5) 迅速置于液氮中 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后转移至-80 °C 长期保存。

6) 干冰运输。

注：A. 整个样品收集过程保证样品断血后半小时内完成样品制备；B. 由于血液中 RNase 含量很高，带着血液的组织提取易降解，所以请务必清洗干净残余血液；C. 对于极其珍贵且易降解的组织，可以取样后先放于 RNeasy Lysis Buffer 中 4°C 孵育过夜（使 RNeasy Lysis Buffer 完全浸透组织），然后取出再剔除结缔组织等非研究所需的组织。

### 2.1.3 细胞

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，不同 RNA 提取试剂盒一次反应所需裂解液 的量为: miRNeasy Mini Kit (Qiagen, 217004), 700  $\mu$ l RNeasy Lysis Buffer ; TRIzol Reagent (Invitrogen, 15596-018), 1 mL。可根据细胞裂解是否充分，适当增加裂解液用量。

注：如果细胞个数小于等于  $5 \times 10^5$  或者动物组织小于等于 5 mg，请注意将细胞或者组织直接进行液氮速冻后，不用加入裂解液直接送样，我方可以考虑直接用微量试剂盒进行提取，要进行微量提取的项目请在信息单上进行说明；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 降解或有胰酶残留导致提取蛋白污染严重）。

#### 1) 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 confluence 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 °C 或液氮中长期保存。
- E. 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粘度来判断。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，液体粘稠性下降；若裂解液的量过少，丝状物往往一直存在，液体粘稠性大，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。

## 2) 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
- E. 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；同时因样本少易降解，务必备注信息单微量样本液氮交接

## 3) 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（速冻要求同组织速冻要求）后 -80 保存，干冰运输。

## 2.1.4 全血样本

### 1) PAXgene Blood RNA Tube

参照《医学样品准备、储存及运输指南》中《一、人全血样品》制备流程。

## 2.1.5 酵母菌

一次反应所需酵母菌的量需  $\leq 1 \times 10^7$  个，以  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  个为宜。单次送样量满足 3 次以上提取，建议分装送样，每管满足一次提取量。

- 1) 显微镜下观察酵母菌生长状态，收集对数期的酵母菌；
- 2) 将适量体积的酵母菌液转移至将 2 mL 旋盖尖底离心管（无菌，无核酸酶）中，于室温下  $14000 \times g$  离心 1 min；

- 3) 弃尽培养基，将酵母细胞沉淀迅速置于液氮中 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后转移至-80 °C 或液氮中长期保存；
- 4) 干冰运输。

### 2.1.6 真菌

真菌样本在进行 RNA 提取前，需要进行称重，一次反应所需的真菌量为 50 mg（由于不同真菌得率差异较大，所以建议送样量尽量多或根据客户经验得率送满足 3 次的量）

- 1) 真菌取样方式以客户实验室经验操作即可，要求取样后到速冻前时间短，菌处于快速生长的活跃期；
- 2) 取样后的真菌置于预冷的离心管或冻存管中，迅速置于液氮中冷冻 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），-80 °C 长久保存；
- 3) 干冰运输。

### 2.1.7 核酸样本

- 1) 第一种方案是提取完成后的 RNA 溶液直接放入-80 °C 冰箱中进行保存；第二种方案是采用醋酸钠乙醇沉淀法沉淀 RNA，并且将样品直接放入-80 °C 冰箱中进行保存；第三种方案是向沉淀后的 RNA 固体中直接加入 1 mL75 %的无水乙醇，并且将样品直接放入-80 °C 冰箱中进行保存；

注：推荐用第一种方案。

- 2) 样品运送前保存在-80 °C 冰箱
- 3) 干冰运输。

## 2.2 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动物组织，不能用此试剂保存骨头、表皮蜡质丰富的植物、全血、血浆、血清和细胞等样品。

- 1) 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）。
- 2) 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。



- 3) 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。
- 4) 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；不要将刚浸入 RNAlater 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；RNAlater® Solution 不会影响组织结构，可以把已保存的组织从 RNAlater® 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；保存于 RNAlater® 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；一般来讲，生物样本保存于 RNAlater® 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 RNAlater® Solution 中样品，都要置于 -20 °C 或 -80 °C 长期保存。

## 2.3 风险说明

### 2.3.1 组织量不足

RNA 产量低，未达到建库要求的起始量，文库建库可能失败。特别植物类组织，由于植物叶片、果实、块根或根茎含有高浓度的多糖多酚物质，以及其他复杂的未知成分，提取难度较大，因此送样量必须保证。

### 2.3.2 反复冻融的组织

反复冻融组织 RNA 降解的概率在 80% 以上，RNA 几乎不可能提取成功，RNA 的质量难以满足建库要求，此类组织不建议送样。尤其针对动物肝脏、脾脏、胰腺、肾脏、心脏、脂肪或肿瘤组织等一类 RNase 较活跃的组织以及各类菌体、藻类。

### 2.3.3 长年保存的组织

组织样本保存时间超过一年或以上，RNA 提取风险加大，RNA 质量较差。

### 2.3.4 微量组织

小型昆虫、细胞、菌体等量较少的样本以及植物花瓣、根和较少的任何动植物组织，务必在信息单中备注微量样本需液氮交接防止降解。同时该类样本因只满足一次或低于常规一次提取用量，我们无法保证 100% 提取合格。

## 3. 注意事项

### 3.1 样品命名、包装、标识

#### 3.1.1 样品命名

样品名称尽量避免出现汉字，建议采用字母和数字表示，长度控制在 8 个字符以内最佳。

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。

#### 3.1.2 样品包装

从液氮或-80 °C 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），选用保温性好的泡沫盒（建议壁厚 2 公分以上）进行样品存放，准备大约 8~10 公斤块状干冰（干冰易挥发，具体用量可以向百迈客样品中心咨询），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，例 1 一株植物根、茎、叶均提取，在送样前务必将此 3 类组织分开包装；例 2，果肉和种子提取，请务必在样品液氮速冻前将种子和果肉分开包装速冻。

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，您在记录运单号的同时请务必在《技术服务样品提交单》填写您的运单号，以便我们与您一起追踪样品的运输状态。

### 3.1.3 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标记，并避免与乙醇等有机溶剂接触），样品管需要封口膜封口，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。

## 3.2 送样量

### 3.2.1 组织送样量

由于不同样品类型、不同发育阶段、不同生长条件的组织中所含有的 RNA 的量是不同的，在某些实验条件下或某些病变部位获得的组织中 RNA 的量可能与常规对应组织有显著的差异。此外，储存条件以及储存时间也会影响 RNA 得率。下表是我们根据提取经验汇总的不同类型组织需要的组织量，请根据此表送不低于对应类型的组织量，基于以上的得率差异，该表可做为参考（90%以上该量可满足需求），实际需要量需根据试提取结果确定。

表 1 提取 RNA 的组织送样量

分类	组织量 (g)
植物叶片	1
植物根、茎	1.5
植物花、果实	2
动物组织、菌类	0.6
动物血液	参考血液采样要求
细胞	参考细胞送样要求

### 3.2.2 RNA 送样量

不同项目类型对 RNA 的浓度、纯度以及完整性的要求不同，详细请参考表 2

表 2 ONT 全长转录组 RNA 样品送样要求

项目类型	样品状态	浓度 (ng/ul)	总量 (ug)	OD260/280	OD260/230	RIN 值	基线	电泳
植物 RNA	澄清透明液体、	≥40	>1	1.8-2.2	1.5-2.5	≥7.5	无上抬	无严重基因组、蛋白污染
动物 RNA	无杂	≥40	>1	1.8-2.2	1.5-2.5	≥8.0	无上抬	

	质及 颜色							
--	----------	--	--	--	--	--	--	--

注：a. 以上指标均为检测完剩余量，所以实际提供量需高于此标准

b. 如果样品不是保存于 1.5 mL EP 管中，我们会根据实验情况进行转管后检测。

## 4. 样品不足、降解等可能存在的风险

### 4.1 总量不足或浓度过低存在风险

- 1) 文库构建失败；
- 2) 文库产量低不能上机测序或测序数据量不足。

### 4.2 降解样品（尤其基因组样品）

- 1) 建库失败；
- 2) 测序数据质量差，有效数据比例低。

### 4.3 目标 RNA 含量低

- 1) 总 RNA 达到要求，但由于样品特异性，mRNA 含量低于正常样品，导致建库失败；
- 2) 总 RNA 达到要求，但由于处理或组织部位的特异性，mRNA 降解，导致建库失败。

### 4.4 蛋白或其他杂质污染

- 1) 可能影响建库效率，建库失败风险高。