



PacBio & Nanopore 送样指导-DNA

文件编号: _____

版本编号: _____

签发日期: _____

目录

1. 送样要求.....	3
1.1 术语及定义.....	3
1.2 DNA 样品送样量要求.....	3
1.3 组织样品送样量要求.....	7
2. 样品制备方法指导.....	8
2.1 植物组织.....	8
2.2 动物组织.....	9
2.3 血液组织.....	9
2.4 细胞.....	9
2.5 细菌.....	10
2.6 真菌.....	10
2.7 环境样品.....	11
3. 样品质检.....	13
3.1 检测方法.....	13
3.2 样品检测需要的体积及质量.....	13
4. 样品命名、包装及标识.....	13
4.1 样品命名.....	13
4.2 样品包装.....	13
4.3 样品标识.....	14

1. 送样要求

1.1 术语及定义

本文件使用了以下术语:

1.1.1 检测项目:

m: 总量 (Total quantity), DNA 的总质量

c: 浓度 (Concentration), DNA 溶液的 Qubit 检测浓度

N/Q: Nanodrop 检测浓度与 Qubit 检测浓度的比值

Size: 片段大小 (Fragment size), 指 DNA 分子片段主带大小

OD260/280: Nanodrop 检测中 OD260 和 OD280 的比值, 反映 DNA 纯度的指标之一

OD260/230: Nanodrop 检测中 OD260 和 OD230 的比值, 反映 DNA 纯度的指标之一

1.1.2 样品质量检测方法:

Nanodrop: 使用 Thermo Fisher NanoDrop 2000/8000 Spectrophotometer 进行检测的方法

Qubit: 使用 Invitrogen Qubit Fluorometer 进行检测的方法

AGE: Agarose Gel Electrophoresis 即使用琼脂糖凝胶电泳进行检测的方法

1.2 DNA 样品送样量要求

请提供 DNA 样品的相关检测结果, 例如以下检测手段中的一种或多种检测结果: Qubit、NanoDrop、AGE。

请采取适当的纯化方法, 以避免多糖、多酚、蛋白或者核酸酶对 DNA 样品的污染, 并详细注明溶解 DNA 所使用的溶解液类型。

检测结果说明:

level A: A 类样品, 指纯度、片段大小和浓度均合格, 总量满足按数据量计算总量要求的样品。

level B+: B+类样品, 指纯度、片段大小和浓度均合格, 总量不完全满足按数据量计算总量要求的样品。

level C: 质量不完全满足建库要求, 可以风险建库但不保证文库大小与测序数据量的样品。

level D: 质量完全不满足建库测序要求, 不建议使用的样品。

请您按照上述 A 类样品的要求来准备 DNA 样品以确保后续建库测序能够正常进行。如果您准备的 DNA 样品不能满足 A 类样品指标要求, 并且后续不能提供更多的 DNA 样品, 需要提前联系销售人员进行咨询。

产品类型	Level	c(ng/ uL)	m(ug)	OD260/ 280	OD26 0/230	AGE	N/Q	外观

ONT-动植物基因组	A	≥150	满足按数据量计算对总量要求，一般按10ug DNA可产出30G数据计算	1.8-2.2	1.8-2.5	size≥23K，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.9-2.0	无颜色、无沉淀物
	B+	≥150	不完全满足按数据量计算总量要求	1.8-2.2	1.8-2.5	size≥23K，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.9-2.0	无颜色、无沉淀物
	C	≥50	-	1.8-2.2	1.6-2.5	完整性和纯度等指标不完全满足建库要求	-	-
	D	-	-	<1.8，或>2.2	<1.6，或>2.5	明显降解，点样孔严重污染	-	有颜色或沉淀物
ONT-动植物重测序	A	≥50	满足按数据量计算对总量要求，一般按2ug DNA可产出60G数据计算	1.8-2.2	1.8-2.5	size≥23K，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.9-2.0	无颜色、无沉淀物
	B+	≥50	不完全满足按数据量计算总量要求	1.8-2.2	1.8-2.5	size≥23K，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.9-2.0	无颜色、无沉淀物
	C	≥20	-	1.7-2.5	≥0.5	完整性和纯度等指标不完全满足建库要求	-	-

	D	-	-	<1.7, 或>2.2	<0.5	明显降解, 点样孔 ^严 重污染	-	有颜色 或沉淀 物
ONT-细菌 /真菌基因 组 (非片 筛)	A	≥50	≥3.0	1.7-2.2	1.7-2. 5	size≥23K, 降解条 带>5K, 点样孔无或 有轻微污染	0.8-2. 5	无颜 色、无 沉淀物
	B+	≥50	≥1.5	1.7-2.2	1.7-2. 5	size≥23K, 降解条 带>5K, 点样孔无或 有轻微污染	0.8-2. 5	无颜 色、无 沉淀物
	C	≥20	0.5-1.5	1.7-2.2	0.5-2.5	完整性和纯度等指 标不完全满足建库 要求	-	-
	D	-	<0.5	<1.7, 或>2.2	<0.5, 或>2.5	明显降解, 点样孔 ^严 重污染	-	有颜色 或沉淀 物
ONT-细菌 /真菌基因 组 (片筛)	A	≥150	≥12	1.7-2.2	1.7-2. 5	size≥23K, 降解条 带>5K, 点样孔无或 有轻微污染	0.8-2. .5	无颜 色、无 沉淀物
	B+	≥150	≥6.0	1.7-2.2	1.7-2. 5	size≥23K, 降解条 带>5K, 点样孔无或 有轻微污染	0.8-2. .5	无颜 色、无 沉淀物
	C	≥150	<6.0	1.7-2.2	1.5-2. 5	完整性和纯度等指 标不完全满足建库 要求	-	-
	D	-	-	<1.7, 或>2.2	<1.5, 或>2.5	明显降解, 点样孔 ^严 重污染	-	有颜色 或沉淀 物

PB-动植物基因组	A	≥50	满足按数据量计算对总量要求，一般按10ug DNA 可产出 100G 数据计算	1.8-2.2	1.8-2.5	size≥23K，无降解，点样孔无或有轻微污染	0.9-2.5	无颜色、无沉淀物
	B+	≥50	不完全满足按数据量计算总量要求	1.8-2.2	1.8-2.5	size≥23K，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.9-2.5	无颜色、无沉淀物
	C	≥50	-	1.8-2.2	1.6-2.5	size≥23K，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	-	-
	D	<10	-	<1.8, 或>2.2	<1.6, 或>2.5	明显降解，点样孔 ^严 重污染	-	有颜色或沉淀物
PB-细菌/真菌基因组	A	≥30	>16	1.7-2.2	1.7-2.5	size≥23K，单一，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.8-2.0	无颜色、无沉淀物
	B+	≥30	>8	1.7-2.2	1.7-2.5	size≥23K，单一，降解条带>5K，点样孔无或有轻微污染	0.8-2.0	无颜色、无沉淀物
	C	≥10	>16（满足2次建库）	1.7-2.2	1.5-2.5	size≥23K，单一，降解条带>2K	-	-
	D	-	-	<1.7, 或>2.2	<1.5, 或>2.5	明显降解，点样孔 ^严 重污染	-	有颜色或沉淀物
PB-16S/ITS/18S 全	A	≥5.0	满足3次以上建库	1.7-2.5	0.5-2.5	PCR 扩增条带大小正确，浓度合适	-	无颜色、无

长								沉淀物
	B+	≥5.0	满足 2 次以上 建库	1.7-2.5	0.5-2. 5	PCR 扩增条带大小 正确, 浓度合适	-	无颜 色、无 沉淀物
	C		样品质量不完 全满足建库测 序要求-	-	<0.5	PCR 扩增条带大小 正确, 浓度低	-	-
	D	-	-	-	-	PCR 扩增无条带或 条带大小不正确	-	有颜色 或沉淀 物

*样品质量以本公司专业检测人员在本公司实验室检测结果为准。由于检测过程中会使用一部分样品, 在条件允许的情况下, 请尽量多提供一些样品, 以保证检测后剩余样品满足后续建库测序要求。

1.3 组织样品送样量要求

声明: 对于任何有致病性或传染性的样品(组织、血液、菌体等), 必须先通过项目经理与百迈客技术人员沟通; 样品的采集及运输需遵守国家相关规定(例如: 《病原微生物实验室生物安全管理条例》), 并在样品保存管或保存袋上做好清晰标记。

物种	组织部位	ONT-动 植物基因 组	ONT-动植 物重测序	PB-动植物 基因组
动物	肝脏/肾脏等 内脏组织	≥3.5g	≥0.35g	≥1.0g
	肌肉	≥5.0g	≥0.5g	≥1.5g
	哺乳动物血 液	≥5.0mL	≥0.5mL	≥1.5mL
	禽类/鱼类血 液	≥0.5mL	≥0.1mL	≥0.2mL
植物	新鲜叶片	≥5.0g	≥0.5g	≥1.5g
	花瓣/茎	≥10.0g	≥1.0g	≥3.5g
	根/种子	≥20.0g	≥2.0g	≥7.0g
细胞	培养细胞	≥1×10 ⁸	≥1×10 ⁷	≥3×10 ⁷

物种	组织部位	ONT-细菌/真菌基因组 (片筛)	ONT-细菌/真菌基因组 (非片筛)	PB-细菌/真菌基因组
细菌	细菌	$\geq 4.5 \times 10^{10}$	$\geq 4.5 \times 10^9$	$\geq 1.5 \times 10^{10}$
真菌	单细胞真菌	$\geq 4.5 \times 10^{10}$	$\geq 4.5 \times 10^9$	$\geq 1.5 \times 10^{10}$
	大型真菌	$\geq 10.0\text{g}$	$\geq 1.0\text{g}$	$\geq 3.5\text{g}$

* **注：**不同类型的组织样品，DNA 的提取得率差别较大，像人或哺乳动物的全血中红细胞没有细胞核，每毫升血液中实用细胞数少，DNA 得率比较低，送样量需相应增加；而鸟类或鱼类血液中红细胞含有细胞核，DNA 得率会增高，送样量可适当减少。含肌纤维细胞丰富的肌肉组织以及含糖多酚较高的复杂植物，DNA 得率会受到影响。

2. 样品制备方法指导

注意事项

- 在不影响研究前提下，应尽可能选择新鲜幼嫩的组织或生长旺盛的组织部位。
- 在样品制备前，最好事先阅读操作指南，以最快的速度来制备样品，以免样品制备过程中被污染或核酸降解的情况发生。
- 将组织放入液氮中进行速冻时，尽量将组织淹没在液氮液面以下以提高速冻效果；速冻时间要充足，以免组织块内部未充分速冻。

2.1 植物组织

植物不同组织中 DNA 含量差异较大，一般来说叶片>花、茎、果实>根、种子。根部易受土壤微生物污染，且根部 DNA 含量低，不建议送此类样品。种子中碳水化合物和脂质较多，提取出的 DNA 纯度一般较差，不建议送此类样品。由于老叶、花和果实 DNA 含量可能较低，而次生代谢物含量一般相对较高，因此，为降低 DNA 提取难度并减少污染物干扰，请尽量选择新鲜、幼嫩的叶片组织；不要选择易带有寄生或共生生物的组织，以及不易清洗和研磨的根、茎等纤维丰富的器官，新鲜组织样采集流程如下：

- 1) 在活体植株上用 70%酒精或蒸馏水将叶片表面的灰尘及泥土冲洗干净，吸水纸吸干水分，再从植物体上取下新鲜叶片。
- 2) 将叶片剪成边长 0.5cm 的小块，保存于 2 mL 或更大体积的旋盖冻存管中，并用 Marker 笔在管盖、管壁或锡箔纸表面标注上样品名称。
- 3) 迅速将样品置于液氮中冷冻 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后每个样品单独放于一个自封袋中，转移至 -80 °C 长期保存。

4) 将组织样品埋在干冰箱的中间部位，大体积干冰运输。

2.2 动物组织

动物组织中，推荐送样肝脏、肾脏等内脏组织、肌肉组织或者全血样品。像脂肪、结缔组织、表皮组织或骨组织，不易研磨且预期 DNA 含量较低的组织，不建议送样。肠道组织清洗不彻底易有微生物污染，也不建议送样。

- 1) 活体取下新鲜组织（肝脏、肾脏或肌肉组织），立即剔除结缔组织和脂肪组织等连接组织。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。
- 2) 迅速用预冷的 PBS 溶液或 0.9%生理盐水将组织表面的残留血液冲洗干净，将组织切成边长<0.5cm 的小块，保存于 2 mL 或更大体积的旋盖冻存管中，并用 Marker 笔在管盖、管壁标注上样品名称。
- 3) 迅速将样品置于液氮中冷冻 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后每个样品单独放于一个自封袋中，转移至-80°C 长期保存。
- 4) 将组织样品埋在干冰箱的中间部位，大体积干冰运输。

如果是昆虫样本，建议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。

2.3 血液组织

要求是抗凝剂处理过的全血样品。

- 1) 用医用抗凝管或装有抗凝剂（推荐柠檬酸钠或 EDTA 抗凝剂，不可用肝素）的其它抗凝管采集血液样本。
- 2) 上下轻轻颠倒混匀十次后，转移至-80 °C 长期保存（实际根据采血管的说明书要求操作）。
- 3) 将采血管固定好，防止相互碰撞导致采血管破损，将固定好的采血管埋在干冰箱的中间部位，大体积干冰运输。

2.4 细胞

一次提取反应所需细胞数 $\leq 1 \times 10^7$ 个，以 3×10^6 - 1×10^7 个为宜。要求送样量较大时，可以将细胞按上述数量要求分装后单独保存。

- 1) 从培养箱中取出贴壁培养的细胞或悬浮培养的细胞，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）。
- 2) 离心弃去培养基，用 PBS 缓冲液快速清洗细胞沉淀一次，离心除去 PBS 缓冲液；贴壁细胞可用细胞刮将其刮下后使用 PBS 缓冲液快速清洗细胞沉淀。

3) 收集的细胞转入 1.5mL 的离心管中, 用液氮速冻 1-3 h 以上 (冻存时间视组织量而定, 保证样品冻存充分), 置于-80 °C 保存。

4) 将样品管置于管架上固定好后埋在干冰箱的中间部位, 大体积干冰运输。

2.5 细菌

我们没有专门的前处理实验员, 所以只接收处理好的细菌菌体样品, 请勿直接寄送平板或菌液, 以免耽误您的项目进度。

1) 显微镜下观察细菌生长状态, 最好收集生长期处于对数期的细菌。

2) 将适量体积的菌液转移至 2 mL 旋盖尖底离心管 (无菌, 无核酸酶) 中, 于室温下 14000 ×g 离心 1 min。

3) 弃掉培养基, 将细菌菌体沉淀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), 然后转移至-80 °C 长期保存。

4) 将样品管置于管架上固定好后埋在干冰箱的中间部位, 大体积干冰运输。

2.6 真菌

真菌的形态多样, 一般分为单细胞和多细胞真菌, 酵母菌属于单细胞真菌, 而霉菌和蕈菌 (大型真菌) 都属于多细胞的真菌。真菌的细胞有含甲壳素 (又叫几丁质) 为主要成分的细胞壁, 提取难度较大, 建议尽量多准备一些样品。

2.6.1 单细胞真菌

单细胞真菌以酵母菌为代表。一次提取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。您要做的项目要求送样量较大时, 可以将样品按上述数量要求分装后单独保存。

1) 显微镜下观察酵母菌生长状态, 最好收集生长期处于对数期的酵母菌。

2) 将适量体积的酵母菌液转移至将 2 mL 旋盖尖底离心管中 (无菌, 无核酸酶), 于室温下 14000×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), 然后转移至-80 °C 长期保存。

4) 将样品管置于管架上固定好后埋在干冰箱的中间部位, 大体积干冰运输。

2.6.2 大型真菌

大型真菌因种属差异, 生长形态差异很大。在制备大型真菌样品时, 可参考上述 2.1 植物组织制备方法。

1) 从菌体上取下生长旺盛的组织, 用无菌水冲洗干净, 再使用 75%乙醇冲洗, 用吸水纸吸干样品表面。

2) 如果组织体积较大, 应尽量将组织剪切成长宽高均 $\leq 0.5\text{cm}$ 的小块。

- 3) 将处理好的组织样本保存于 2 ml 或更大体积的旋盖冻存管中。
- 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），然后转移至-80℃长期保存。
- 5) 将样品固定好后埋在干冰箱的中间部位，大体积干冰运输。

2.7 环境样品

2.7.1 土壤样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点。
- 2) 除去土壤表层未分解的凋落物层，用已灭菌的刀或铲去除表层 5cm 的土壤，再用烧灼过的勺、铲或土壤取样器取样 10-25g，装于无菌塑料封口袋内，多点样本均匀混合（注意保留适当空间），标明采样地点，深度、日期等信息。
- 3) 两天内常温或冰袋运送到实验室，除去动植物残体、石砾等杂质，将大块的样品捣碎，过 2mm 筛后，分装至 2mL 或更大体积的 EP 管或冻存管中；每管土壤含量大概 0.25~0.5g，需保证送样量在 1~2g，若土壤含微生物较少，需增加送样量。
- 4) 未分装样本 4℃保存时间不要超过一个月，分装后样本-80℃或液氮中长期保存。
- 5) 运送方式：4℃保存样品冰袋运输，-80℃或液氮干冰运输。

2.7.2 淤泥样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点。
- 2) 采集污泥样品，放于无菌离心管或其它无菌容器中。
- 3) 4 小时内常温带回实验室中分装至 2mL EP 管或冻存管中；或用 PBS 进行清洗，离心收集沉淀，分装于 2 mL 离心管中。
- 4) 分装后样本-80℃或液氮中长期保存。
- 5) 干冰运输。

2.7.3 水体样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点。
- 2) 采用多点取样法取样，采样时不可搅动水底的沉积物；避免手指和其他物品对瓶口的沾污。
- 3) 取样后 4 小时内（期间 4℃避光保存）真空抽滤、富集菌体（平行重复 样本可用同一滤膜过滤）。
- 4) 带有富集菌体的干燥滤膜剪碎或折叠后保存在 2mL 或 5mL 无菌 EP 管中，-20℃或-80℃保存。
- 5) 干冰运输。

注意事项：

- 1) 过滤大量低微生物含量的清亮水样用 0.22 μm 的聚苯醚砜滤膜 (Polyethersulfone), 每个样本至少 1L 水样。
- 2) 浑浊水样使用 0.22 μm 滤膜过滤缓慢容易堵塞时, 建议使用 0.45 μm 的混合纤维素酯滤膜 (膜醋酸纤维素、硝酸纤维素); 如水体中含有杀虫剂和除草剂, 则避免使用这类滤膜; 每个样本 0.5L-1L 水样, 如有堵塞则将同一样本滤膜保存于一管。
- 3) 如果水样中不可溶解的颗粒较多, 需要使用 2-5 μm 孔径的滤膜将不可溶解的颗粒杂质滤去, 再使用 0.22 μm 或 0.45 μm 的滤膜富集菌体; 每个样本 0.5L-1L 水样, 如有堵塞需则同一样本滤膜保存于一管。
- 4) 如果研究的是病毒, 则需先用 0.22 μm 滤膜把水中的细菌和其它大个头细胞过滤掉, 再用带正电荷滤膜 (Virozorb 的 1MDS 或 NanoCeram 的 Virus Sampler cartridges) 富集病毒; 每个样本 20L 水样。

2.7.4 物体表面微生物样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点。
- 2) 采集样品, 放于无菌离心管或其它无菌容器中。
- 3) 4 小时内常温带回实验室中用 PBS 进行清洗, 离心收集沉淀, 分装于 2 mL 离心管中。
- 4) 分装后样本-80 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中长期保存。
- 5) 干冰运输。

2.7.5 粪便样品

- 1) 戴上手套收集新鲜的粪便样品。
- 2) 无菌牙签或粪便取样器截取样品中段内部 (避免表层中的肠道膜脱落细胞), 外部容易污染且细菌 DNA 由于接触空气可能有降解。
- 3) 将已取的粪便样品分装至 2mL EP 管 (无菌) 或冻存管 (无菌) 中, 每管粪便量为 0.5~2g, 每个样品分装 2~3 管备份。
- 4) 分装好后样本迅速放入液氮中速冻, 之后放于-80 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中长期保存。
- 5) 干冰运输。

2.7.6 肠道内容物样

- 1) 在实验对象死亡后, 无菌条件下, 取出整个肠道, 用无菌解剖刀切取所需肠段的内容物。
- 2) 用无菌手术刀挖取内容物, 并立即放在冰上进行分装及标记。
- 3) 将已取的样品分装至 2mL EP 管 (无菌) 或冻存管 (无菌) 中, 每管组织量为 0.5~2g, 每个样品分

装 2~3 管备份。

4) 分装好后样本迅速放入液氮中速冻，之后放于-80°C或液氮中长期保存。

5) 干冰运输。

2.7.7 组织内微生物样品

1) 取新鲜组织样品，PBS 清洗表面微生物。

2) 组织切块、液氮速冻。

3) -80°C或液氮中长期保存。

4) 干冰运输。

注：因组织内微生物含量很低，且很难进行富集，我们是按常规方法提取组织和菌全部核酸进行扩增。

该类样本成功率较低

3. 样品质检

3.1 检测方法

我们使用的检测仪器或检测方法有 Thermo Fisher NanoDrop 2000/8000 spectrophotometers、Qubit、琼脂糖凝胶电泳。

3.2 样品检测需要的体积及质量

NanoDrop	Qubit	琼脂糖凝胶电泳
1-2uL	1-2uL	50ng

4. 样品命名、包装及标识

4.1 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，最好能体现出其生物学属性和取样情况。比如：“W_2_L_3”，“W”表示野生型，“2”表示第 2 个时期，“L”表示叶，“3”表示第 3 份等。

4.2 样品包装

液体样品，建议使用螺旋口的离心管运输，并使用 Parafilm 密封离心管口。干冰运输时，请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 8~10 公斤粒状或块状干冰（粉末状干冰较易挥发），以提供低温的样品保存环境；多管样品寄送时，请将所有管装于一个自封袋或更大的离心管中，保证能于干冰区分开，以防样品丢失。在选择与委托快递公司时，应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。

4.3 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。管壁样品名称应与递交的《技术服务样品提交单》中的样品名称保持完全一致。