

RNA 项目样本准备、储存及运输指南

目录

1. 准备样本须知.....	3
1.1 取样的代表性.....	3
1.2 取样的准确性.....	3
1.3 取样的重复性.....	3
1.4 取样的及时性.....	3
1.5 取样的低温性.....	3
1.6 样本的特殊处理.....	4
2. 样本准备与保存方法.....	4
2.1 常规样本准备、保存及运送方式.....	4
2.1.1 植物组织.....	4
2.1.2 动物组织.....	4
2.1.3 细胞.....	5
2.1.4 全血样本.....	7
2.1.5 血清、血浆、外泌体类样本制备.....	7
2.1.6 酵母菌.....	7
2.1.7 细菌.....	7
2.1.8 真菌.....	8
2.1.9 核酸样本.....	8
2.2 RNAlater® Tissue Collection.....	9
2.3 风险样本准备说明.....	10
2.3.1 组织量不足.....	10
2.3.2 反复冻融的组织.....	10
2.3.3 长年保存的组织.....	10
2.3.4 微量组织.....	10
3. 送样须知.....	10
3.1 样本命名.....	10

3.2 样本采集与包装.....	10
3.3 样本标识.....	11
3.4 送样量.....	11
3.4.1 组织送样量.....	11
3.4.2 RNA 送样量.....	12
3.5 用于 microRNA 实验的样本总 RNA 准备.....	12
3.6 样本交接.....	13
3.7 样本运输.....	13
4. 样本不足、降解等可能存在的风险.....	13
4.1 总量不足或浓度过低存在风险.....	13
4.2 降解样本.....	13
4.3 目标 RNA 含量低.....	13
4.4 蛋白或其他杂质污染.....	14

1. 准备样本须知

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。取样关系到实验最终结果是否具有科学意义，须根据实验目的设计科学的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，而病变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，实验组与对照组的样本在取材时间、部位、处理条件等方面保持一致，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须准确记录，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本的差异。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至少 3 h，之后保存于-80 °C 冰箱或者干冰中，确保在实验操作前样本始终处于-80 °C，以避免 RNA 的降解。

1.6 样本的特殊处理

样本的特殊处理包括：盐处理、温度处理、药物处理、病毒侵染、伤害处理、干旱处理等胁迫处理方式，不同程度的处理对样本的 RNA 质量会造成不同程度的影响，常见的会导致 RNA 的降解或者得率降低。因此，经过特殊处理的样本，在送样时，务必请在样本信息单中进行详细的备注，以便尽量提高提取的成功率和避免样本的浪费。

2. 样本准备与保存方法

2.1 常规样本准备、保存及运送方式

2.1.1 植物组织

较老组织 RNA 含量低，而且次生代谢物含量相对较高，用于 RNA 提取的成功率低。因此在不影响实验设计的前提下，须选择健康、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，吸干表面水渍，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) 根据组织量多少，将处理好的组织样本混合均匀后保存于 2 mL 或更大体积的螺口冻存管（RNase free）中，在管盖及管壁标注的编号要保证一致。禁止使用锡箔纸及自封袋送样

4) 迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后将单个样本放于自封袋中，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，应进行适当的饥饿处理（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 ≤ 0.5 cm 的小块（即黄豆大小）

6) 将冻处理好的组织样本混合均匀后保存于 2 mL 或更大体积的螺口冻存管（RNase free）中，在管盖及管壁标注的编号要保证一致。禁止使用锡箔纸及自封袋送样

4) 迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后转移至 -80°C 长期保存

5) 干冰运输。

注意： 1. 整个样本收集过程保证样本断血后半小时内完成样本制备；

2. 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存血斑；

3. 对于极其珍贵且易降解的组织，可以取样后将样本分割成长宽高均 ≤ 0.5 cm 的小块（即黄豆大小），先放于 RNAlater®中 4°C 过夜，然后取出再剔除结缔组织等非研究所需的组织。

4. 需注意，切勿直接使用 TRIzol Reagent 代替 RNAlater，TRIzol 对组织块中的 RNA 无法起到保护作用，以免导致 RNA 降解。

2.1.3 细胞

一次提取反应所需细胞数需 $>1 \times 10^6$ 个， $\leq 1 \times 10^7$ 个，以 3×10^6 - 1×10^7 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，即 $3 \times 1 \times 10^7$ 个。

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 μL Qiazol；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。

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 2 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

注意：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，不要使用 RNAlater 保护细胞样品

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

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 °C 保存，干冰运输。

注意：由于细胞量少，干冰运输务必保证细胞处于冷冻环境，防止环境温度升高导致细胞中 RNA 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。

2.1.4 全血样本

1) PAXgene Blood RNA Tube

参照医学采样指导的 1 人全血样本制备流程

2) TRIzol 血液样本制备

A. 取 15 mL 管 1 个，加入 6 mL TRIzol 和 2 mL 新鲜血液（TRIzol:血液 = 3:1），

用移液器吹打几次以帮助裂解样本中的细胞

B. 样本剧烈震荡混匀 1-2 min，直到絮状物全部溶解

C. 室温孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解

D. 将处理过的混合液分装到 2 mL 旋盖尖底离心管中

E. 封口膜封存，-80 °C 冻存

注意：如果具备条件，建议客户采集新鲜的血液直接提取或直接分离淋巴细胞用 TRIzol 裂解后送样，会大大提高提取成功率。

2.1.5 血清、血浆、外泌体类样本制备

参照医学采样指导 2 血清血浆样本和 3 细胞上清样本以及 4 外泌体样本制备流程

2.1.6 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，即 $3 \times 1 \times 10^7$ 个。

1) 显微镜下观察酵母菌生长状态，收集对数期生长旺盛的酵母菌

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冷冻 3~4 h，然后转移至 -80 °C 或液氮

中长期保存

4) 干冰运输

2.1.7 细菌

1) 显微镜下观察细菌生长状态，收集对数期的细菌

- 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 X g 离心 1 min
- 3) 弃尽培养基，将细菌沉淀迅速置于液氮中冷冻 3~4h，然后转移至-80 °C 或液氮中长期保存
- 4) 干冰运输

2.1.8 真菌

显微镜下观察真菌生长状态，根据菌类的生长规律，收集生长旺盛的菌体。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 ~100mg（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 3~4 h, -80 °C 长久保存
- 3) 干冰运输

注意：请勿直接寄送培养平板，低温保鲜寄送的真菌培养平板，无法保证菌体的生长状态。为了提高真菌菌体 RNA 的提取成功率，应将生长旺盛的菌体收集到 2 mL 旋盖尖底离心管（无菌，无核酸酶）中，迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后转移至-80°C或液氮中长期保存。

2.1.9 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，并且将样本直接放入-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 mL 75 %的乙醇，并且将样本直接放入-80 °C 冰箱中进行保存；

注：推荐用第一种方案

- 2) 样本运送前保存在-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，不适用于保存骨头、表皮、蜡质丰富的植物、全血、血浆、血清和细胞等样本。

- 1) 用解剖刀将组织切成长宽高均 ≤ 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

注意：

1. 用 RNAlater® Solution 保存组织之前，需要将组织切割成长宽高均 ≤ 0.5 cm 的小块。
2. 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；
3. 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；
4. 保存于 RNAlater® Solution 中样本，-20 °C 存放时，样本不会结冻，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，样本会结冻，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；
5. 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。但鉴于生物样本的特殊性及实验可重复性，建议所有保存于 RNAlater® Solution 中样本，都要置于-20 °C 或-80 °C 长期保存。

2.3 风险样本准备说明

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 90%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、大脑组织或肿瘤组织等一类 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，不建议再进行 RNA 提取。

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. 送样须知

3.1 样本命名

样本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。

对于备用样本即同一个样本送的备份组织请务必在信息单中备注清楚

3.2 样本采集与包装

为了方便样本的保存、运输和录入系统的准确性，在准备送样之前，需根据样本量的

多少，将速冻后的样本统一转移到 2mL，5mL，15mL，50mL 的螺口冻存管（RNase free）中，或者直接采样到 2mL，5mL，15mL，50mL 的螺口冻存管（RNase free）中，并做好相关标记，迅速置于液氮中冷冻。以避免后期二次倒管导致冻融，影响样本质量。

建议用螺口冻存管存放组织样本；若选用弹开式离心管放置样本，请确认已用 Parafilm 密封管口。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，请务必在样本液氮速冻前将种子和果肉分开包装速冻。

对于样本数量较多的项目为了尽快完成样本的交接入库工作请按名称或信息单中样本顺序按每 5-10 个样本的小包进行一个中包，最后将中包汇总成一个大包。

3.3 样本标识

请在每个样本管上清晰、简明地标记样本名称（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），请勿在锡纸包上直接标记或粘贴易脱落标签，避免后期低温保存时出现编号脱落或者编号不清，导致无法提取情况发生。管上样本名称应与递交的信息单中的样本名称保持完全一致。

3.4 送样量

3.4.1 组织送样量

由于不同样本类型、不同发育阶段、不同生长条件的样本中所含有的 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样本中 RNA 的量可能与常规对应样本有显著的差异。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

3.4.2 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 不同产品类型 RNA 样本送样要求

项目类型	样本状态	浓度 (ng/ul)	体积 (ul)	总量 (ug)	OD260/280	OD260/230	RIN 值	基线	电泳
转录组	样本状态正常、体积不低于 10ul	40	>10	>3	1.8-2.2	1.0-2.5	7	无上抬	无严重基因组、蛋白污染
小 RNA		200	>10	>4.5	1.8-2.2	1.0-2.5	8	无上抬	
LncRNA		100	>10	>3	1.8-2.2	1.0-2.5	7	无上抬	无基因组、蛋白污染
环形 RNA		100	>10	>3	1.8-2.2	1.0-2.5	7	无上抬	
全长		300	>10	>3	1.8-2.2	1.0-2.5	8	无上抬	

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

3.5 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 的样本，请务必确认您采用的总 RNA 的提取方法保留了小 RNA（包括 miRNA）

3.6 样本交接

样本需要**干冰交接**，有条件可以用**液氮交接**，交接时切勿直接将所有样本堆放在干冰表面，应将样本管插入到干冰中，保证组织部位充分包埋于干冰中。需要在百迈客样本中心进行液氮交接的样本需要在送样的样本信息单中特殊备注。

3.7 样本运输

样本的运输方式为干冰运输，请选用保温性好的泡沫盒（建议壁厚 2 公分以上）进行样本存放，按照每天 **5 公斤** 干冰的量，根据实际运输天数添加足够的干冰，夏天温度较高，应适当加大添加的干冰量。注意需要将样本包埋在干冰的内部，以提供低温的样本保存环境，并将样本信息单填写好放入塑封袋中，与样本一同寄送。

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《技术服务样本提交单》填写您的运单号，以便我们与您一起追踪样本的运输状态。

4. 样本不足、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
- 3) 导致 RNA-seq 数据随机性异常

4.2 降解样本

- 1) 建库失败
- 2) 导致 RNA-seq 数据 duplication 比例高、随机性差
- 3) 导致 Small RNA rRNA 比例高，影响有效数据，文库片段异常

4.3 目标 RNA 含量低

- 1) 总 RNA 达到要求，但由于样本特异性，small RNA 含量低于正常样本，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 降解或含量低，导致建库失败或者测序数据中 rRNA 数据比例高

4.4 蛋白或其他杂质污染

- 1) 可能影响 Small RNA 电泳分离，造成切胶不准，影响问题质量
- 2) 可能影响 RNA-seq 磁珠分离导致建库失败，或即使达到上机要求也可能导致文库随机性差等问题