

DNA 项目样品准备、储存及运输指南

目录

一、前言	1
1. 适用范围	1
2. 声明	1
3. 提取风险提示	1
二、样本准备前注意事项	1
1. 取样的代表性	1
2. 取样的准确性	1
3. 取样的重复性	1
4. 取样的及时性	2
5. 取样的低温性	2
三、组织样送样量要求	2
1. DNA 提取组织送样量要求	2
1.1 二代	2
1.3 三代	2
四、核酸送样要求	3
1.送样要求	3
1.1 术语及定义	3
1.2 DNA 样品送样量要求	4
2 二代核酸送样要求	4
3 三代核酸送样要求	5
五、样本制备保存指南	7
1 植物组织	7
2 动物组织（不含昆虫和水产类）	9
3 昆虫	9
4 水产动物	9
5 细胞	10
6 全血样本	10
7 细菌	11

8 真菌	11
8.1 单细胞真菌	12
8.2 大型真菌	12
9 核酸样本	12

一、前言

1. 适用范围

本指南介绍百迈客 DNA 类组织样品的送样要求及制备方法。采集送样前请仔细阅读。

2. 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》。

3. 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、样本准备前注意事项

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。

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，并按要求采集、制备、储存、运输进行实验处理。

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，否则可能会影响实验结果的重复性和可信度。

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。

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品始终处于-80 °C，以避免 RNA 的降解。

三、组织样送样量要求

1. DNA 提取组织送样量要求

1.1 二代

产品类型 组织类型	SLAF	重测序	甲基化
新鲜动物组织干重	0.5g	0.5~1g	1~2g
新鲜植物组织干重	0.5~1g	1~2g	1~2g
全血	1.5ml	1.5ml	2ml
菌体 (干重)	1~2g	1~2g	1~2g

1.3 三代

产品类型 组织类型	ONT-动植物 基因组	ONT-动植物重 测序/甲基化	PB-动植物 基因组
肝脏/肾脏等内脏组织	≥3.5g	≥0.35g	≥3.5g
肌肉	≥5.0g	≥0.5g	≥5.0g
哺乳动物血液	≥5.0mL	≥0.5mL	≥5.0mL
禽类/鱼类血液	≥0.5mL	≥0.1mL	≥0.5mL
新鲜叶片	≥5.0g	≥0.5g	≥5.0g
花瓣/茎	≥10.0g	≥1.0g	≥10.0g
根/种子	≥20.0g	≥2.0g	≥20.0g

培养细胞 (细胞数)	$\geq 1 \times 10^8$	$\geq 1 \times 10^7$	$\geq 1 \times 10^8$
------------	----------------------	----------------------	----------------------

组织类型 \ 产品类型	ONT-细菌/真菌	PB-细菌/真菌基
	基因组	因组
细菌	$\geq 3.5 \times 10^{10}$	$\geq 3.5 \times 10^{10}$
单细胞真菌	$\geq 3.5 \times 10^{10}$	$\geq 3.5 \times 10^{10}$
大型真菌	$\geq 10.0g$	$\geq 10.0g$

* 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多糖多酚较高的复杂植物，DNA 得率会受到影响。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。

四、核酸送样要求

1.送样要求

1.1 术语及定义

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。

2 二代核酸送样要求

产品类型	Level	c(ng/uL) NanoDrop	m(ug)	OD260/2 80	OD260/ 230	AGE	外观
SLAF	A	≥35	≥1.6	1.6-2.5	—	正常/轻度污染 无降解/轻度降解	正常
	B	≥35	≥0.8	<1.6, 或>2.5	—	中度污染 无降解/轻度降解	正常 颜色异常 粘稠 沉淀物
	C	≥20	≥2	<1.6, >2. 5	—	中度污染 中度降解	颜色异常 粘稠 沉淀物
	D	< 20	≤2	<1	—	严重污染 严重降解	颜色异常 粘稠 沉淀物

产品类型	Level	c(ng/uL) Qubit	m(ug)	污染情况	降解情况	判断方法	外观
------	-------	-------------------	-------	------	------	------	----

重测序	A	≥ 0.6	≥ 0.06	正常 轻度污染	无、有降解可用 (主带清晰、主带不清晰, 主要弥散在 5K 以上)	所有指标均满足	正常
	B	≥ 0.6	0.03-0.06	正常 中度污染	无、有降解可用 (主带清晰、主带不清晰, 主要弥散在 2K 以上)	总量满足 1 次建库	正常/ 颜色异常
	C	≥ 0.6	≥ 0.03	严重污染	无、有降解可用、严重降解 (主带清晰、主带不清晰, 主要弥散在 2Kb 以下)	除总量外其它任一或多个指标出现所描述的情况; 其他指标合格但总量只满足一次低起始量建库 (0.1ug) 且组织已无	颜色异常/粘稠/沉淀物
	D	< 0.6	< 0.03	严重污染	无、有降解可用、严重降解 (主带清晰、主带不清晰, 主要弥散在 2Kb 以下)	总量或降解情况任一或两个指标出现所描述的情况	颜色异常/粘稠/沉淀物

3 三代核酸送样要求

产品类型	Level	c(ng/uL)	m(ug)	OD260/280	OD260/230	AGE	N/Q	外观
ONT-动植物重测序/ 甲基化	A	≥ 30	≥ 4	1.7-2.2	≥ 1.5	降解条带>3K, 主带清晰, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	B	≥ 30	≥ 2	1.7-2.2	≥ 1.5	降解条带>3K, 主带清晰, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常

	C	≥20	1.5~2	-	-	完整性和纯度等指标不完全满足建库要求	>2.5	正常 颜色异常
	D	<20	<1.5	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	-	粘稠 沉淀物
ONT-动植物基因组	A	≥30	满足按数据量计算总量 (单次 12ug)	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>6.5K, 点样孔无或有轻微污染	≤2	正常
	B	≥30	满足按数据量计算总量 (单次 6ug)	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>6.5K, 点样孔无或有轻微污染	≤2	正常
	C	≥30	满足按数据量计算总量	-	-	完整性和纯度等指标不完全满足建库要求	>2.0	正常 颜色异常
	D	<30	<5	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	-	粘稠 沉淀物
ONT-细菌/真菌基因组	A	≥20	≥4	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>3K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	B	≥20	≥2	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>3K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	C	≥20	0.8~2	-	-	完整性和纯度等指标不完全满足建库要求	>2.5	正常 颜色异常
	D	<20	<0.8	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	-	粘稠 沉淀物
PB-动植物基因组	A	≥50	满足按数据量计算对总	1.7-2.2	1.8-2.5	无降解, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常

			量要求, 一般按 10ug DNA 可产出 100G 数据计算					
	B	≥50	不完全满足按数据量计算总量要求	1.7-2.2	1.8-2.5	无降解, 点样孔无或有轻微污染	-	正常
	C	≥50	-	-	-	无降解, 中度杂质污染	-	正常
	D	<10	-	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	0.9-2.5	颜色异常 粘稠 沉淀物
PB-细菌/ 真菌基因 组	A	≥20	2ug/1G, 低于 2G 按 4ug	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>9K, 点样孔无或有轻微污染	0.9-2.5	正常
	B	≥20	1ug/1G, 低于 2G 按 2ug	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>9K, 点样孔无或有轻微污染	-	正常
	C	≥10	1ug/1G	-	-	降解条带>3K, 中度杂质污染	-	正常 颜色异常
	D	<10	<0.8ug/1G	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	0.8-2.0	粘稠 沉淀物

五、样本制备保存指南

1 植物组织

由于老叶或其它组织 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, 请尽量选择健康、幼嫩的叶片组织; 不建议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、茎等组织致密的器官。另外藻类组织中的水分会影响提取得率, 取样时需将组织样中的水分吸干。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, 再从植物体上取下新鲜组织

- 2) 样品分割成 50~100 mg 左右的小块，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；并标注编号。
- 3) 迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后按照顺序依次放入样品盒或者按照一定的规律（例如 1-10,11-20 等）装于自封袋中，转移至-80 °C 长期保存（禁止乱放，尤其是项目中样品个数较多时）；干冰运输。

*注:

- ①一定不要使用自封袋常温寄送非干燥组织样，天气炎热，高温下组织样易腐烂变质，易产生霉菌，导致提取的核酸中混有污染物种的核酸或提取失败，影响公司成本的同时给客户造成不好的影响。
- ②干燥样品现在不建议送样，提取成功率低，如果只有干燥样品，使用纸质袋装样，在外包装自封袋中可以统一装硅胶干燥颗粒。



腐烂叶片送样



新鲜叶片送样



不规范锡箔纸送样



规范送样

2 动物组织（不含昆虫和水产类）

- 1) 活体取下新鲜组织（肌肉、肝脏或其他组织，避免用易于寄生微生物的表皮和肠道、可能有变异细胞的病变组织），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）；
- 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）
- 4) 将冻处理好的组织样本混合均匀后保存于旋盖的存管中
- 5) 迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后转移至 -80°C 长期保存，送样时干冰运输

注：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

3 昆虫

- 1) 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) 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）
- 3) 将冻处理好的组织样本混合均匀后保存于旋盖的存管中
- 4) 迅速置于液氮中冷冻 3~4 h，然后转移至 -80°C 长期保存，送样时干冰运输

*注：蜜蜂送样时尽量要求老师取胸部肌肉送样，整个蜜蜂送样提取的核酸状态大多数异常，影响后续实验。不建议送实验室剔除，因为组织速冻过之后再剔除会化冻，提取降解的可能性较大！

4 水产动物

- 1) 取得活体组织后，用清水清洗，以去除污物，吸干表面液体；
- 2) 如果是甲壳类（如虾蟹等），需解剖活体组织，只取软组织，将组织样品割成约 50 mg 的小块（约黄豆大小）
- 3) 液氮速冻后，放入干净的带螺纹旋盖保存管中；
- 4) 转移至 -80°C 低温保存，送样时选择干冰运输寄送。



不规范带壳送样



规范送样

5 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，可以将细胞经裂解液裂解后冻存运输。

- 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) 弃去培养基，用 PBS 缓冲液快速洗一次，除去 PBS 缓冲液，贴壁细胞可用细胞刮将其刮下
- 3) 收集的细胞转入 1.5 mL 的 EP 管中用液氮速冻后置于 -80°C 保存，一管装一次提取的量，可以将备份样品单独装，**禁止将一个样品多次提取的细胞装到一个管中**，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

6 全血样本

- 1) 用医用抗凝管或已装有抗凝剂（选用柠檬酸钠或 EDTA 抗凝剂，不可用肝素）的旋盖管收集全血样本
- 2) 上下轻轻颠倒混匀十次后，分装到常规 EP 管中，转移至 -20 或 -80°C 长期保存（实际根据采血管的说明要求操作）
- 3) 干冰运输

注：①血液采集管请尽量不要用需专门对应提取试剂盒的采血管，以防送样后我们因无对应试剂盒影响提取时间（尽量送样前沟通）

②采集完血液之后需将血液转移至 EP 管中，**玻璃材质采血管冷冻之后易碎**



不规范送样玻璃管破碎

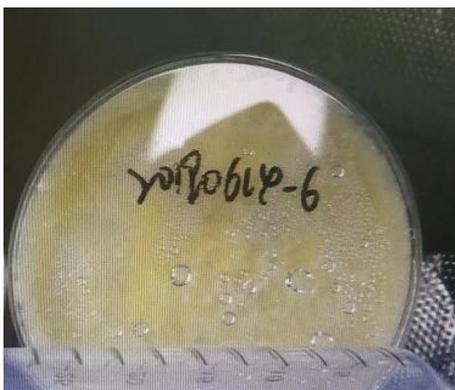


规范送样

7 细菌

注意：所有菌类样品必须分离好菌体或菌丝送样，切勿连带培养基一起寄送，带培养基的菌体无法提取。

- 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。



不规范培养皿送样



规范菌体送样

8 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。

8.1 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 $14000 \times g$ 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 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。

8.2 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 1.1 植物组织制备方法。

9 核酸样本

- 1) 第一种方案是提取完成后的 DNA 溶液直接放入 -20°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 DNA,并且将样品直接放入 -20°C 冰箱中进行保存;第三种方案是向沉淀后的 DNA 固体中直接加入 1 mL 75% 的无水乙醇,并且将样品直接放入 -30°C 冰箱中进行保存;第四种方案是提取完成后的 DNA 样品使用低温冷冻仪冷冻成干粉(可常温运输)

注: 推荐用第一种方案

- 2) 样品运送前保存在 -20°C 冰箱,干冰运输