

吉赛生物RNA-Sequencing样本采集、保存运输要求

样本类型	处理方法简介	保存、运输介质	注意事项
细胞	培养细胞去培养基后, 用胰酶消化细胞(悬浮细胞不用), PBS洗涤细胞两次, 取沉淀, 冻存。 meRIP-seq要求细胞量$\geq 1 \times 10^8$; Ribo-seq要求细胞量$\geq 1 \times 10^7$, 活细胞可直接寄送(限广州; 细胞样本也可进行预处理后, 液氮速冻后干冰运输); 其他RNA-Seq项目要求细胞量$\geq 1 \times 10^6$	-80°C保存, 干冰运输	1×10^6个细胞约为1个六孔板生长至80%的密度; 细胞样本需另送10ul培养上清做支原体检测。 如加入Trizol, 建议按照1ml/1×10^6个细胞的比例添加, 充分裂解细胞后再冻存。
细胞上清液	1) 用正常血清培养基培养细胞至80%的密度; 2) 移除原有培养基, 用无血清培养基继续培养48h后, 离心收集细胞上清至离心管; 细胞上清液量要求≥ 20ml, 建议35mL。	-80°C保存, 干冰运输	细胞上清需先做支原体检测; 如客户已从样本中分离出外泌体, 可保存于-80°C, 干冰运输
动物组织	组织离体后, 无菌水或生理盐水清洗表面血污, 吸干水后, 迅速将其放入冻存管或存放于组织保存液中, 液氮速冻, 然后保存于-80°C。 若不能及时保存于-80°C, 可把冻存管放于冰盒/或干冰盒里暂存, 建议不要超过4小时, 再进行冻存处理。 meRIP-seq要求≥ 300mg Ribo-seq要求≥ 200mg 其他测序常规组织样本量要求≥ 100mg (约黄豆大小)	-80°C保存, 干冰运输	组织离体时间越久, 核酸降解程度越高, 取样过程时间应小于3min, 并保持低温。 建议组织放入冻存管后置于液氮/干冰中2min以上, 再保存于-80°C。 组织样本不宜过大, 切至黄豆大小为宜。 如使用保存液保存, 组织样本建议切割至米粒大小, 保存液的量要保证在保存或寄送过程能完全没过组织。
血液	1) 真空抗凝管采血(抗凝剂不推荐肝素, 推荐EDTA), 混匀后, 迅速放入4°C保存。 2) 建议客户自行分离白细胞/淋巴细胞(本司可提供红细胞裂解液分离白细胞)。 3) 抗凝管采血后立即在血液中加入RNA 稳定剂, 如Magen 的 RNAsafer LS, 混匀后4°C或-20°C保存。 全血送样量要求2ml以上, 建议4mL; 建议用3-4ml全血分离白细胞/淋巴细胞	1) 一般干冰运输 2) 新鲜血液可冰袋运输, 但样品不要与冰袋直接接触, 24h内处理 3) 加入RNA稳定剂的血液样品可按照说明书选择冰袋/干冰运输	方法1新鲜血液样本的RNA质量最好; 如需冷冻运输, 请采用方法2或方法3, 注意避免样品冻融造成RNA降解。使用方法2或方法3请严格按照使用试剂的操作说明进行操作。

血清/血浆	1) 采血: 制取血清样本需采血后把血滴入洁净的离心管中; 制取血浆样本则用采血针和抗凝管抽取全血, 混匀; 2) 4°C下静置3~4小时或过夜; 3) 4°C离心, 收集上清, 上清即为血清/血浆样本; 4) 将血清/血浆样本分装, 转移至-80°C保存。 血清/血浆送样量要求2ml以上, 建议4mL。	-80°C保存, 干冰运输	采血后尽快进行血清/血浆分离制备, 制备过程中保持低温。如已从样本中分离出外泌体, 外泌体可于-80°C保存, 干冰运输
FFPE组织	福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的组织样品, 组织样本切成小块后, 一个小时内固定, 固定时间约24h, 不宜过长。样品置于1.5 mL管中, 封口膜封好, 冷冻运输。 一般FFPE组织要求送样10 μm切片8-10片	4°C 保存, 冰袋运输	
Total RNA	可直接保存于-80°C冰箱(建议) ; 长期保存: 可加入3倍体积无水乙醇沉淀后保存; 或者冻干成干粉状态保存。 meRIP-seq要求总RNA: $m \geq 20\mu\text{g}$, $c \geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$, $\text{RIN} \geq 7$; circRNA-seq要求总RNA: $m \geq 4\mu\text{g}$, $c \geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$, $\text{RIN} \geq 7$; mRNA-seq要求总RNA: $m \geq 2\mu\text{g}$, $c \geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$, $\text{RIN} \geq 8$; 其他RNA-seq项目要求总RNA: $m \geq 2\mu\text{g}$, $c \geq 100\text{ng}/\mu\text{l}$, $\text{RIN} \geq 7$;	-80°C保存, 干冰运输	如总RNA是培养细胞中提取的, 建议客户先对细胞样本进行支原体检测, 或者留出细胞上清一并送来做支原体检测。
血清/血浆/细胞上清/外泌体RNA	可直接保存于-80°C冰箱(建议) ; 长期保存: 可加入3 倍体积无水乙醇沉淀后保存; 或者冻干成干粉状态保存。 全转录组测序要求: $m \geq 200\text{ng}$, 如$m \leq 10\text{ng}$, 则采用微量建库; circRNA-seq要求: $m \geq 400\text{ng}$, 如$m \leq 20\text{ng}$, 则采用微量建库; Small RNA测序要求: $m \geq 10\text{ng}$	-80°C保存, 干冰运输	细胞上清RNA和培养细胞的外泌体RNA, 建议客户先对细胞上清进行支原体检测, 或者留出细胞上清一并送来做支原体检测
RIP RNA/pulldown RNA	可直接保存于-80°C冰箱(建议) ; 长期保存: 可加入3 倍体积无水乙醇沉淀后保存; 或者冻干成干粉状态保存。 RIP-全转录组: $m \geq 200\text{ng}$, 如$m \leq 10\text{ng}$, 则采用微量建库; RIP-miRNA: $m \geq 40\text{ng}$	-80°C保存, 干冰运输	

吉赛生物DNA-Sequencing样本采集、保存运输要求

样本类型	处理方法	保存、运输介质	注意事项
细胞	培养细胞去培养基后，用胰酶消化细胞（悬浮细胞不用），PBS洗涤细胞两次，取沉淀，冻存。 ATAC-seq: 冻存细胞（10%DMSO+90%血清的冻存液保存的），要求20万以上个细胞每管，一个样本备份1-2管。	-80℃保存，干冰运输	冻存细胞要保证没有发生冻融
动物组织	处理方法同RNA-seq样本。 ATAC-seq等实验要求≥100 mg	-80℃保存，干冰运输	
环境样本	粪便、土壤等环境样本采集时需注意尽量混匀样本，可放于洁净密封袋或洁净EP管保存寄送。 一般要求送样量不少于2g	-20/-80℃保存，干冰运输	宏基因组测序样本保存于-80℃,16s测序样本可保存于-20℃。
基因组DNA	可直接保存于4℃/-20℃冰箱； 长期保存:可加入3 倍体积无水乙醇沉淀后保存；或者冻干成干粉状态保存。 16S rDNA测序要求DNA:m≥150ng,c≥5ng/ul,有明显的主带； 其他DNA-seq项目要求基因组DNA: m≥4μg,c≥30ng/ul	4℃保存，冰袋运输	
ChIP DNA/ChIRP DNA	可直接保存于-20℃/-80℃冰箱； 长期保存:可加入3 倍体积无水乙醇沉淀后保存；或者冻干成干粉状态保存。 一般要求样本无蛋白质污染，m≥20ng, c≥0.2ng/ul	-20℃保存，短途可用冰袋运输，远途用干冰运输	

以下为几类样本具体的收集处理方法，以供参考。

附件1 Exosome相关样品处理方法参考

1. 血清样品

- 1) 采血后轻轻将全血滴入洁净的离心管；
- 2) 4℃下静置3~4小时，可见血块析出，也可置于4℃冰箱过夜；
- 3) 5000rpm, 4℃离心10min，可见淡黄色血清，取出上清后再3000rpm, 4℃离心10min；
- 4) 将血清分装，送样前可冻存于-80℃。

注：血清送样量>2mL，建议4mL

2. 血浆样品

- 1) 用采血针和**抗凝管**抽取全血，混匀；
- 2) 4℃下静置3~4小时，也可置于4℃冰箱过夜；
- 3) 5000rpm, 4℃离心5min，取上清即为血浆；
- 4) 将血浆分装，送样前可冻存于-80℃。

注：血浆送样量>2mL，建议4mL

3. 细胞上清

- 1) 用无exosomes血清培养基培养细胞至80%的密度；
- 2) 移除原有培养基，加入适当的胰蛋白酶（可覆盖细胞）消化；
- 3) 细胞变圆后加入等体积的含正常血清培养基终止消化；
- 4) 用移液枪吹打悬浮细胞，1100rpm，离心5min；
- 5) 去掉上清，用无exosomes血清培养基重悬细胞；
- 6) 将细胞传到几个培养皿中继续培养；
- 7) 培养48-72h后，收集细胞上清；
- 8) 2000rpm，离心10min，再10000rpm，离心30min，去除细胞或细胞碎片，取上清即可。

注：细胞上清送样量>15mL，建议30mL

附件2 红细胞裂解液分离白细胞方法参考

1. 红细胞裂解液的稀释：取适当体积的10×红细胞裂解液，用RNase-Free ddH₂O或者DEPC水稀释至1×红细胞裂解液。

2. 向1体积人类全血中加入3倍体积的1×红细胞裂解液（需自备合适的干净管子）。

注：为获得最佳的混匀效果，血液和1×红细胞裂解液的混合液体积不应超过管子体积的3/4。

3. 冰上孵育10-15min，在孵育过程中涡旋震荡混匀2次。

注：在孵育的过程中溶液将变成半透明状态，表明红细胞裂解。如果必要的话，孵育时间可延长至20分钟。

4. 10000×g 4℃离心2min，将上清完全去除。

5. 向白细胞沉淀中加入1体积的1×红细胞裂解液（如用第2步1ml全血，则使用1ml的1×红细胞裂解液），重悬细胞。

6. 10000×g 4℃离心2min，将上清完全去除，得到血液中的白细胞，放置在-80℃保存。。

注：如果上清去除不完全将会影响裂解及随后的RNA提取产率。

红细胞裂解液吉赛生物可提供，建议每个样品取3ml的全血进行白细胞分离

附件3 血液加保护剂操作方法参考

该方案使用Magen的RNASafer™ LS Reagent，适用于处理0.5~2.5ml新鲜的抗凝血液

1. 在灭菌的2~15ml离心管中，预先加入3倍体积的RNASafer LS Reagent；

举例：处理1ml新鲜血液时，需加入3ml RNASafer LS Reagent

注意：血液与保护剂比例为1:3，请严格遵守

2. 用EDTA抗凝管采集血液，采集后摇匀EDTA抗凝管；

注意：制成新鲜的抗凝血液后建议马上进行第3步，不宜久放

3. 用移液器往加了3倍体积的RNASafer LS Reagent的离心管中加入1倍体积的新鲜抗凝血液，颠倒混匀10~15次，保证血液与保护剂充分混匀；

4. 室温放置20min,期间颠倒混匀2~3次；

5. 20min后，可直接室温（15~25℃）保存3天，或者置于4℃保存7天，或-20℃/-80℃保存至少6个月以上。

建议送样用2ml新鲜抗凝血与6ml RNASafer LS Reagent

