



NeoraBio

微生物组取样参考



目 录

1. 样本准备通用建议	1
2. 通用微生物组取样参考	2
微生物组-样本基础需求量	2
3. 详细取样建议	2
肠道及内容物	2
拭子类样本	3
环境类样本	4
呼吸道相关样本	5
组织	5
单菌（细菌/真菌）	6
细胞样本	6
其他样本	6
4. 声明	9



1. 样本准备通用建议

1. 取样代表性与一致性	<p>样本的取材部位、时间、处理过程等方面尽可能保持一致，否则可能会影响实验结果的可信度及组内重复情况。</p> <p>准确分离病变组织和对照组织，取样部位不一致和不具有代表性同样可能影响结果的准确性。</p>
2. 取样及保存环境	<p>样本质量是影响实验结果的最主要因素，用于研究的样本，在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地快，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。</p> <p>样本离体后，立即在 4℃或冰上等低温条件下进行分离，分离好的样品立即置于液氮、干冰或-80℃冰箱中直至寄送，以避免样本降解。</p>
3. 样品名称	<p>最好采用双重标记以防样品名称模糊；建议使用进口离心管。</p> <p>标记 1：用高质量的油性笔在样品管上写上清晰、简单的样品名称，最好 5 个字符以内（不要写中文），用封口膜封好，</p> <p>标记 2：将样品名称等信息写在标签纸上，贴在管壁上，最好用胶带粘贴牢固以防低温条件下样品标签脱落。</p>
4. 样品包装	<p>按送样建议准备样品，采用高质量离心管盛装样品。冷冻的组织，用高质量的 2 mL 螺旋冻存管装载；离心管应用封口膜密封管口。</p> <p>干冰运输，干冰参考量=（运输天数+1）*5kg。</p> <p>如个别样本需 4° C 或常温保存，请将保存条件纸条附于包裹内。</p>
5. 邮寄样品	<p>邮寄样品请附带完整的样品信息说明。建议自己存好备份样品。如样品有生物危险请提前咨询技术人员。</p> <p>对于需要同时做多种检测的样本，请提前确认各类下游实验的样本保存方式，并分开收集样本，避免分装过程中的反复冻融。</p>

注：液氮速冻及干冰运输时，过大的样本体积容易造成离心管炸裂，建议将样本量控制在离心管最大容积的 80%内。



2. 通用微生物组取样参考

注：需要提前确定样本有无致病性或传染性。

微生物组-样本基础需求量						
项目类型	DNA	血液	动物组织	植物组织	细胞	细菌
扩增子 16S/18S/ITS	≥ 150 ng	/	≥ 200 mg	≥ 2 g	/	沉淀≥ 2 g
宏基因组	≥ 200 ng	2ml	≥ 200 mg	≥ 3 g	/	沉淀≥ 2 g
单菌基因组重测序	≥ 1 μg	/	/	/	≥ 5x10 ⁶	沉淀≥ 3 g

3. 详细取样建议

肠道及内容物	
粪便	<p>人、猪粪便：用无菌勺子取 2 g 粪便内部样品</p> <p>鼠/兔/羊粪便：先将小鼠/兔放进干净的铺有消毒滤纸的笼子里，排便后立即收集 4 粒粪便样本，不同的小鼠/兔取样需要更换新的滤纸</p> <p>鸡粪便：先将鸡放进干净的铺有消毒滤纸的笼子里，排便后立即收集粪便样本，不同的鸡取样需要更换新的滤纸，不取稀便和尿酸盐沉积过多的部分</p> <p>最低量：用灭菌的 2 mL 离心管保存，每个样本取 200-500 mg 至无菌 2 mL 离心管，置于 -80 °C 冰箱保存或直接干冰送样</p> <p>大鼠/兔，2 粒/份，人/小鼠 4 粒/份</p>
肠道内容物	<p>用无菌解剖刀或镊子无菌状态下取出整个肠道，提取并分离所需肠段的内容物，分离内容物时切勿分离到肠道组织，200-500 mg/管，立即放在冰上用无菌离心管进行分装并标记，取样后应尽快置于 -80 °C 冰箱保存或干冰寄送</p>
肠道组织	<p>新鲜取下的肠道组织用无菌刀切断至 2-3 cm 片段，用无菌手术刀或镊子挤出内容物。若除不干净，可用无菌磷酸盐缓冲液（1xPBS, PH=7.2）轻轻清洗，直到无内容物流出。微生物组 ≥ 200 mg；其他 ≥ 300 mg，将肠道组织样本放入无菌 2 mL 螺纹冻存管（注意管壁要厚）中 -80 °C 保存或干冰寄送</p>



拭子类样本	
阴道拭子	消毒外阴或尿道口，无菌棉签拭子拭取宫颈口或宫颈后穹窿的分泌物，不可碰及阴道壁，圆周滚动 5-10 次，充分取样，用无菌剪刀剪下面棉签头部，放入无菌 2 mL 离心管中，保存于-80 °C，干冰寄送
	注：建议至少 3-5 根/样；取样前 30 天内不可使用抗生素或抗真菌类药物
唾液	唾液法： ① 取样前 1 h，不要进食、饮水、饮酒、吸烟或嚼口香糖等，建议晨起取样。 ② 被采样者需要至少在口腔中分泌收集唾液 1 min。打开无菌唾液采集器，采集唾液。此过程需要重复多次采集到 2-5 mL 唾液（不含泡沫部分）。尽快置于液氮速冻，及时转入-80 °C冰箱中冷冻，干冰寄送
	拭子法： ① 24h 内不刷牙，取样前 1 h，不要进食、吸烟、饮水、饮酒或嚼口香糖等。 ② 准备一杯清水，充分洗漱口腔 10-30s，吐掉。 ③ 采样用无菌棉拭子可用无菌生理盐水润湿，以增加微生物附着率。将拭子伸进左侧口腔，使拭子头部充分接触左侧脸颊内部/左侧上下牙床处粘膜，用刷牙的力度上下擦动，同时旋转拭子，让拭子头部充分接触口腔粘膜。采集 2~3 根拭子。 ④ 用同样的方法在右侧脸颊内部/右侧上下牙床处粘膜处进行拭子的取样。采集 2~3 根拭子。 ⑤ 左右口腔拭子各一根插入同一个无菌冻存管（或将棉拭子头部剪落入冻存管中），旋紧盖子，尽快保存于-80 °C，干冰寄送。 建议一式 2 到 3 管备份。
	注：30 天内不能用抗生素或抗真菌类药物，唾液拭子取样量较少，建议直接寄送唾液样本
皮肤	拭子蘸取少许无菌生理盐水后在取样区域（>2x2 cm）反复擦拭至少 30 s，用无菌剪刀剪下棉签头装入 2 mL 离心管中，保存于-80 °C，干冰寄送
	注：建议至少 3-5 根/样；取样前 24 h 不洗澡，不用抗菌活性的护肤品。至少每个样本加入两根拭子，增加微生物含量。
鼻腔	如有鼻腔液可以刮取使鼻腔液浸润拭子，如没有鼻腔液，可以先用无菌生理盐水或无菌 PBS 浸润拭子，再刮取鼻腔，尽量使拭子各面都接触鼻腔，注意不要刮伤鼻腔，一般刮取 10s 以上，棉签深入 2-2.5 cm。用无菌剪刀剪下棉签头装入 2 mL 离心管中，建议至少 3-5 根/样，保存于-80 °C，干冰寄送
蹄积液拭子	取样前对非采样部位进行消毒，露出积液所在的区域，用无菌拭子在取样区域（>2x2 cm）反复擦拭至少 30 s，使拭子充分浸润，用无菌剪刀剪下棉签头装入 2 mL 离心管中，保存于-80 °C，干冰寄送；建议至少 3-5 根/样



环境类样本	
土壤或淤泥	<p>①去除土壤/淤泥上的覆盖物，包括植物、苔藓、可见根系、凋落物以及可见的动物等。</p> <p>②对采样器使用酒精棉擦拭，待酒精挥发完全后，可使用采样样方处土壤/淤泥浸润采样器。后续每次更换样方均需重复此步骤。</p> <p>③同一样方多点混合取样（建议3-5个点等量混合），去除样本中的植物、可见动物以及石粒等，然后根据土壤情况，选择是否过筛，1）推荐过2mm筛；2）一些有机质（如粗腐殖质或泥炭等）不能通过2mm筛，此时可以选择过4-5mm筛；3）如果土壤/淤泥粘度太大或者含水量太高，可以选择不过筛。</p> <p>④将混合好的土壤/淤泥样本，分装多份装入2-5mL灭菌离心管或小自封袋并确保封闭完好，每份3-5g，液氮速冻（如果条件不允许，可以选择放在冰盒中，尽快运回实验室），随后转移至-80℃冰箱保存，干冰寄送。</p> <p>注：可另外留出一部分土壤/淤泥，用于测定土壤/淤泥理化指标（如有机质、全氮、矿质元素等）。</p>
水体	<p>取1-2L水样。若水体浑浊，可先用四层无菌纱布过滤碎石泥沙或1.6μm大孔径过滤膜过滤，后使用相应孔径的滤膜进行过滤，最适滤膜面积3-4cm，收集滤膜，尽快置于-80℃冰箱中冷冻，干冰寄送</p> <p>注：微孔滤膜建议使用0.45μm和0.22μm孔径，0.45μm富集真菌类及直径更大的微生物；0.22μm富集细菌类及直径更大的微生物。请根据科研所需选择适用材质及合适孔径的滤膜。</p>
空气微生物	<p>采样使用的工具需每天进行更换，并且使用75%的酒精进行洗涤</p> <p>1) 根据实验设置，采用不同孔径大小的无菌滤膜进行目的颗粒的筛选，如果不分颗粒大小，可直接选取最小孔径（0.22μm）的滤膜进行过滤，以保证空气微生物最大程度上被过滤下来，使用空气抽滤机抽滤>1500m³空气，或抽滤至滤膜上可见明显覆盖物。</p> <p>2) 将无菌滤膜过滤好后迅速密封，放入50mL的离心管中，每管1~2片滤膜，置于冰上6小时内运回实验室，超过6小时建议液氮或干冰运回实验室，常温需在2小时内完成采集、分装和运输</p> <p>收集滤膜，尽快置于-80℃冰箱中冷冻，干冰寄送</p>
植物内生菌	<p>摘取叶片后，需对表面除菌：先用75%酒精浸泡1min，后用2.5%次氯酸钠溶液再洗1-2次，最后无菌水冲洗表面2-3次</p> <p>刀切开叶片，释放内生菌，置于含有玻璃珠的水中振荡，使用5μm滤膜过滤，滤液4℃离心（15000rpm）5min，收集微生物沉淀，沉淀≥3g，将收集到的微生物置于螺纹冻存管中，置于液氮、干冰或-80℃冰箱中冷冻，干冰寄送。</p>



	注: 内生菌极易被宿主细胞污染, 提取出的核酸可能会含有大量的宿主核酸, 影响测序有效数据量
叶片表面	将所研究的样本放在无菌容器当中, 加入 PBS 缓冲液/无菌水 (完全淹没样本) 后进行振荡, 使得微生物从根表面充分的脱落并聚集在 PBS 缓冲液/无菌水当中, 震荡至少 2 h 以上。用冲洗, 收集冲洗的 PBS 缓冲液/无菌水, 用 0.22 μm 孔径滤膜过滤冲洗的 PBS 缓冲液/无菌水, 将滤膜装入合适的冻存管液氮速冻 1 h 以上, 转至-80 °C 保存, 干冰寄送
根际土壤	采集 20 cm 深的根际土壤于 50 mL 的无菌管中, 使用 20 目的筛子过筛(0.85 mm), 去除植物根、动物残骸以及其他杂质。每个样本采集 3-5 g, 密封后放入-80 °C 冰箱或液氮速冻, 干冰寄送

呼吸道相关样本

肺泡灌洗液	无菌暴露剥离气管, 用注射器抽取灭菌生理盐水插入气管内, 反复抽吸 3 次后将液体抽出, 放入灭菌离心管内, 再抽取灭菌生理盐水, 重复上面操作两次, 将收集的液体注入离心管中。收集的灌洗液采用 0.22 μm 滤膜过滤, 收集滤膜于无菌管, 冻存于-80°C, 干冰寄送
喉气管洗液	无菌剥离喉气管, 可将气管一侧打结, 用注射器抽取灭菌生理盐水插入气管内, 反复抽吸 3 次后将液体抽出, 放入灭菌离心管内, 再抽取灭菌生理盐水, 重复上面操作两次, 将收集的液体注入离心管中, 收集的液体一管≥5 mL, 液体以 0.22 μm 滤膜过滤, 收集滤膜, 将滤膜置于无菌管, 冻存于-80 °C, 干冰寄送
瘤胃液	通过瘤胃瘘管法、口或鼻插入胃管法、穿刺法, 收取瘤胃内容物, 四层无菌纱布过滤后, 收集瘤胃液(3-5 mL/沉淀 1-3g)后迅速置于液氮速冻, -80 °C 冰箱中冷冻, 干冰寄送

组织

动物组织	使用无菌手术刀快速将组织分割成 200-500 mg 小块 (去除非研究的组织), 分装入无菌且无 RNA/DNA 酶的螺纹冻存管中, 迅速投入液氮速冻, 后转入-80 °C 冰箱中保存, 干冰寄送 如样本为胰腺、胃等含有消化液的组织, 需低温迅速处理好组织, 以防组织被消化液降解
植物组织	优先选取干净新鲜的幼叶, 多灰的老叶及根茎组织在采集前用无菌水冲洗样本表面并擦拭干净, 采集 2-3 g 植物组织后, 快速分装入无菌螺纹冻存管中, 迅速投入液氮冷却, 后转入-80 °C 冰箱中保存, 干冰寄送



单菌（细菌/真菌）	
液体培养（发酵液、培养液）	取对数期细菌培养液约 50 mL，4000 rpm 离心 10 min（4 °C），弃上清，分装沉淀 2-4 g 至无菌螺纹冻存管中，螺纹冻存管立即转入液氮中速冻，于 -80 °C 超低温冰箱中保存，干冰寄送
	真菌菌液约 50 mL，4000 rpm 离心 10 min（4 °C），弃上清，分装沉淀 3 g 以上至 2 mL 无菌螺纹冻存管中，螺纹冻存管立即转入液氮中速冻，后转入 -80 °C 超低温冰箱中保存，干冰寄送
固体培养	使用无菌器具（例如无菌刀片）在固体培养基上刮取单一的菌种，转移至标记好的无菌螺纹冻存管中，切记不可以刮到固体培养基，螺纹冻存管立即转入液氮中速冻，后转入 -80 °C 超低温冰箱中保存，干冰寄送
真菌	采集 5 g 分装进无菌 50 mL 离心管中，菌丝（不推荐孢子或是子实体），液氮速冻，然后置于 -80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送
注意事项	甘油保存的菌株不可直接送样，需重新在液体培养基活化到对数期

细胞样本	
贴壁细胞 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	细胞培养结束后，去除培养液，加入 PBS（RNase-free 水配制）清洗两次，胰酶消化并收集细胞，转移至尖底离心管，1000 rpm 离心 5 min，去除胰酶，PBS（RNase-free 水配制）清洗两次，1000 rpm 离心 5 min 去上清后迅速置于液氮罐速冻，后转移至 -80 °C 长期保存，干冰寄送
悬浮细胞 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	细胞培养结束后，1000 rpm，离心 5 min，去除培养液，加入 PBS（RNase-free 水配制）重悬，1000 rpm，离心 5 min，清洗两次，去上清转移至尖底离心管中，并迅速置于液氮罐速冻，后转移至 -80 °C 长期保存，干冰寄送

其他样本	
物体表面微生物样本	<p>方法一：将物体置于无菌容器内，加入适量的 PBS 浸没物体，利用摇床等仪器旋转震荡 10 min 以上，使表面微生物与物体脱落，收集液体，4 °C，13000 rpm 离心 5 min，收集沉淀于螺纹冻存管中，或液体以 0.22 μm 滤膜过滤，收集滤膜，尽快置于干冰或 -80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送</p> <p>方法二：10 根消毒棉签（无菌水湿润），擦拭物体表面，面积约 35 cm²，在棉签一定位置用消毒剪刀剪下拭子放进 EP 管中，低温保存样品（4 °C），运送至实验室。将样品超声 20 s，接着涡旋 1 min，再超声 20 s，无菌移除拭子，13000 rpm 离心 10 min，去上清，留沉淀，-80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送。</p>



酸奶/牛奶等	装无菌 50 mL 离心管中（注意不可将液体装满容器，不超过 2/3 为宜，防止低温液体体积变化导致容器破裂，造成样本污染和损失） 建议分装 3 份，10-20 mL/份，送样 2 份，剩余一份自留。置于干冰或-80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送
尿液 (微生物采样)	行采集空腹、新鲜晨尿，有无血尿均可以收集；女性留取尿样本时应避开经期，并防止阴道分泌物混入尿液；随机留取中段尿为宜，40 mL/样，将样品置于冰上运至实验室，在 1 h 内完成微生物富集工作。可取 20 mL 以上尿液，4 °C，10000 g，5 min 离心富集菌体，去上清，留菌体沉淀。置于-80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送
尿液 (cfDNA 提取)	行采集空腹、新鲜晨尿，有无血尿均可以收集；女性留取尿样本时应避开经期，并防止阴道分泌物混入尿液；随机留取中断尿为宜，50-100 mL/样尿液用 cfDNA 采集管（streck: 230216）保存，保存于 4 °C，及时寄送， 保证 7 天内提取
固体食物 (微生物)	取 20 g 样本寄送，推荐分装于多个 2 mL 无菌离心管/螺纹冻存管内 置于干冰或-80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送。每个样本取 1-3 管备份，送样 2 份，剩余一份自留
FFPE	收集组织含量高的 FFPE 切片/卷片 10~20 张，每张厚度 5~10 μm（总厚度约 80 μm），含组织面积大于 25mm ² 的切片。将蜡片样本转移至冻存管中，4 °C 或-20 °C 保存，可常温寄送
毛发样本	收集带有毛囊的毛发，至少 20 根，置于干燥无菌离心管中；干冰或-20 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送
石蜡块	组织体积 >1.5cm ³ ，置于干燥无菌离心管中；干冰或-20 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送
昆虫样本	昆虫污染较为严重，需额外进行以下处理： (1) 饥饿处理：根据物种饥饿耐受情况，饥饿 6-48 h。 (2) 喂食抗生素：昆虫尽量使用广谱抗生素或者近缘物种报道过的无菌品系构建所使用的抗生素种类、浓度，处理天数 2-5 d，可视物种情况而定。 (3) 去除肠道或整个腹部，保留胸部、头部提取。 (4) 表面消毒：75%乙醇浸泡 1-2 min，无菌水漂洗 1-2 次，滤纸吸干后速冻。 置于干冰或-80 °C 冰箱中冷冻，干冰寄送



甲壳动物、软体动物和刺胞动物样本	(1) 甲壳动物（虾类、蟹类等）/软体动物（海绵、海参等）/刺胞动物（珊瑚等）送样前需额外使用 75%的乙醇进行漂洗。 (2) (2) 针对刺胞动物，可去除头部和肠道等部位，保留肌肉外壁用于提取。 置于干冰或-80 °C冰箱中冷冻，干冰寄送
乳汁样本	取 200g 样本，低速离心，5-10min，避开上层脂肪层，吸取下层液体，富集的菌体管尽快置于-80 °C保存，干冰寄送。



4. 声明

我司拒绝接收《人间传染的病原生物名录》中危害程度为第一、第二类的高致病组织、血液、细菌等样品，只接收提取得到的核酸样品。危害程度为第三、第四类的致病性或传染性的组织、血液、细菌等样品，可通过致病细菌灭活和收集（用于 DNA 项目）后联系销售、技术确认后寄送。

所有潜在致病性或传染性样本必须事先联系销售、技术支持确认，确定无高致病性和传染性后才能寄送样品。

感谢您选择我们！

期待与您携手并进，共创科研新高度。

我们将以严谨、专业的态度对待每一个样本，为您的科研探索保驾护航。