



NeoraBio

转录组取样参考



目录

1. 样本准备通用建议	1
2. 通用转录组取样参考	2
转录组送样要求总表	2
3. 样本取样建议	3
细胞样本	3
不同细胞量的样本项目推荐	3
组织样本	4
血液样本	5
Total RNA 样本	7
石蜡切片 (FFPE) 样本	7
特殊样本 (一类)	7
特殊样本 (二类)	8
4. 取样技术指标参考	10
5. 声明	12



1. 样本准备通用建议

1. 取样代表性与一致性	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。 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。
2. 取样及保存环境	样本离体后，需快速在低温下进行分装，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 RNA 的降解。 放置样本的管子、使用的刀片器械等需 无菌，无 RNase 。为保证实验及测序结果，请保证样本 无其他微生物污染 （如： 支原体 ，噬菌体） （我司亦可提供支原体检测服务，但需提前说明）
3. 样品名称	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。 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， 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。
4. 样品包装	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 。 干冰运输， 干冰参考量=（运输天数+1）*5kg 。
5. 邮寄样品	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。 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 。

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. 通用转录组取样参考

转录组送样要求总表						
项目类型	TotalRNA	样本类型				
		血液	动物组织	植物组织	细胞	细菌
真核转录组测序	≥1μg	≥2 mL	≥200 mg	≥200 mg	≥5×10 ⁶	/
原核转录组测序	≥2 μg	/	/	/	/	>2×10 ⁷ (对数期)
lncRNA 测序	≥1 μg	≥2 mL	≥200 mg	≥200 mg	≥5×10 ⁶	/
circRNA 测序	≥3 μg	≥3 mL	≥300 mg	≥500 mg	≥1×10 ⁷	/
miRNA 测序	≥1 μg	≥2 mL	≥200 mg	≥200 mg	≥5×10 ⁶	/
全转录组	≥5 μg	≥4 mL	≥500 mg	≥1 g	≥1×10 ⁷	/



3. 样本取样建议

细胞样本	
贴壁细胞采集 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	- 细胞培养结束后，将培养基倒掉，小心加入与培养基等体积的无酶水配制的 PBS（室温）后，平放 1 min 洗涤细胞，然后弃尽 PBS，重复一次，弃尽 PBS - 每 $10^5 \sim 10^7$ 个细胞加 1 mL 的 TRIzol 试剂，反复吹打至裂解充分，裂解充分标准为吹打后液体不粘稠，无成团细胞块，流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分，需添加裂解液，每次添加的量建议为 100 μL 左右，持续添加直到液体不粘稠，呈透亮状态为止 - TRIzol 液体全部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
悬浮细胞采集 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	- 细胞培养结束后，1000 rpm，离心 5 min，去除培养液 - 加入无酶水配制的 PBS（室温）重悬，1000 rpm，离心 5 min，清洗两次，吸尽上清 - 按照每 $10^5 \sim 10^7$ 个细胞加 1 mL 的 TRIzol 试剂，反复吹打至裂解充分，（裂解标准同上面的贴壁细胞处理方式类似） - TRIzol 液体全部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
注意事项	- 细胞必须裂解充分再寄送，勿将干冻细胞直接寄送（冰晶容易刺破细胞，释放内源性 RNase），勿用胰酶消化（胰酶消化膜上的膜蛋白，破裂的细胞会释放 RNase） - 细胞裂解充分的标志：细胞与裂解液的混合物形成清亮不粘稠的液体，且没有细胞团块残留

不同细胞量的样本项目推荐	
	1~2000 个细胞，建议采用 SMART-seq2 裂解液，搭配 SMART-seq2 的建库方式进行 2000~1w 个细胞，建议采用 TRIzol 法裂解细胞，搭配 SMART-seq2 的建库方式进行 1w 以上的细胞，建议采用 TRIzol 法裂解细胞，根据 RNA 得率选择 SMART-seq2、微量转录组或普通转录组的建库方式



注意事项

- ✧ 上述的推荐仅适用于常规细胞，若细胞类型如中性粒细胞这类 RNA 得率少的细胞则不适用。原则上，普通转录组需要 RNA 量达到 400 ng，微量转录组达到 100 ng，SMART-seq2 达到 1 ng

组织样本

动物组织采集

≥200 mg

- ✧ 去除非研究的组织类型（如结缔组织，脂肪组织等），正确判断病变以及正常组织，应将病变组织周围的正常组织去掉
- ✧ 迅速用预冷 RNase-Free 水配制的 PBS 清洗组织表面的血迹和污渍
- ✧ RNase-free 刀片将新鲜组织切割为绿豆颗粒大小(长宽高≤0.5 cm)后置于 1.5 mL RNase-free 冻存管中，每个样本大概 2-3 个小块
- ✧ 迅速置于液氮罐速冻 1 h（3-5 min 内），后转移至 -80 °C 长期保存 或干冰寄送，避免反复冻融；或在冻存管中放入 RNAlater（品牌：Ambion，货号：AM7021），将处理好的组织放入冻存管中，保证组织被充分没入，且 RNAlater 需要装满冻存管，4 °C 保存过夜后，-20 °C 或 -80 °C 长期保存

注意事项：

- ✧ 如遇到胰腺、胃等含有消化液的组织，请尽可能快的处理好组织，这类组织由于消化液的存在，降解异常迅速
- ✧ RNAlater 请严格按照说明书操作，组织块需要提前修剪，因为过大会影响 RNA 组织保护液渗透入组织内部的效率
- ✧ 不允许寄送用裂解液保存的组织样本，因为实验中发现用 TRIzol 保存的组织样本，无论是研磨好的粉末还是切割好的组织块，所抽提的 RNA 质量普遍很差
- ✧ 动物及临床组织不要使用锡箔纸包裹，锡箔纸容易与动物及临床组织粘一起，RNA 抽提的过程锡箔纸容易带入，引起污染



植物组织采集 ≥200 mg	✧ 选取新鲜、幼嫩、生长旺盛的组织部位，植物组织越幼嫩越新鲜所含的次生代谢产物越少，随着植物的逐渐成熟，所含的次生代谢产物产量越来越多，而次生代谢产物会影响 RNA 的抽提 ✧ 采集前用预冷的 RNase-free 水冲洗样本表面并擦拭干净，采集目标部位组织放入冻存管中，或用标记好名称的锡箔纸包裹好，并迅速置于液氮罐速冻 1 h（1min 内），后转移至 -80 °C 长期保存或干冰寄送，每个样本准备 2-3 份，每份 100 mg
	✧ 植物组织不建议使用 RNAlater 保存，因为植物组织含有细胞壁及次生壁，RNAlater 不易渗透；也勿用 TRIzol 直接浸泡植物组织 ✧ 若是一些坚硬、纤维化等植物组织样本，建议样本送样 3 倍以上 ✧ 不可将植物组织磨成粉寄送，RNA 将全部降解

血液样本	
白细胞分离	✧ 请使用 EDTA 抗凝管（紫色）进行血液采集，采血量：2.5 mL，轻轻颠倒混匀 8~10 次，使血液充分抗凝（严禁使用肝素抗凝管，将会影响 RNA 提取） ✧ 在上述样品中加入 3 倍体积红细胞裂解液，颠倒混匀，室温放置 5 min，期间多次混匀，5 min 后 10000 rpm 离心 1 min，弃上清，留下白细胞沉淀 ✧ 在白细胞沉淀中，加入适量的 TRIzol 试剂（一般 2 mL 血液分离获得的白细胞加入 1 mL 的 TRIzol），反复吹至裂解充分，并转移至新的冻存管中，迅速投入液氮速冻 1 h，-80 °C 冰箱保存或干冰寄送
全血样本采集 （不分离白细胞）	✧ BD-PAXgeneTMBloodRNATube 法：采血量：2.5 mL，轻轻颠倒混匀 8~10 次，在室温（18-25 °C）直立存储至少 2 小时，然后转移至 -20 °C 冷冻 24 h，再转入 -80 °C 保存或干冰寄送运输。需用到专门的提取试剂盒，提取费另收 ✧ TRIzol 法：取 6 mL TRIzol 与 2 mL 新鲜抗凝血液（EDTA 抗凝管采集）（TRIzol：血液=3:1）混合，裂解均匀使溶液中无絮状物，-80 °C 保存或干冰寄送，采样后一周内必须提取 RNA。此方法不适合 miRNA 抽提



血清采集 (miRNA 项目)	✧ 使用不含有抗凝剂的采血管采集 2 mL 血液，室温 25℃放置 30~ 60 min，凝血块周围析出的淡黄色液体即血清，小心吸取到冻存管中，液氮速冻后，-80℃保存或干冰寄送 ✧ 注意血液若发生溶血现象不建议使用（血细胞破裂后细胞中 RNA 进入血清中）
血浆采集 (miRNA 项目)	✧ 使用 EDTA 抗凝管采集 2 mL 血液，反复颠倒混匀后正立置于碎冰中。在 1 h (4℃) 内，800-900 g 离心 10 min，吸取上层血浆转至新的离心管中，16000g，4℃离心 10 min，小心吸取上清至冻存管中，液氮速冻 1 h 后，-80℃保存或干冰寄送 ✧ 血清血浆样本仅建议进行 small RNA 测序，且血清血浆 RNA 通常不质检
PBMC	✧ 使用 EDTA 抗凝管采集 5 mL 全血，轻轻颠倒混匀后将抗凝外周血（全血）与无菌 PBS 按照 1:1 在 15 mL 无酶离心管 A 中温和的充分混匀 ✧ 在 15 mL 无酶离心管 B 中加入等体积的 Ficoll 淋巴细胞分离液，用移液管将无酶离心管 A 中稀释的血液沿 15 mL 离心管管壁缓慢叠加于分层液面上，动作一定要轻，注意保持清楚的界面 ✧ 外周血，PBS，淋巴细胞分离液最终体积比为 1:1:1 ✧ 室温 400 g 离心 20 min（水平转子）。管中液体将分成血浆/PBMC/ 分离液/红细胞等四层（PBMC 较少，呈一层白膜状） ✧ 移液器吸取白膜层细胞转入新的 15mL 无酶离心管 C 中，加入 PBS 使体积变为 10 mL，温和翻转摇匀 5 次，室温 400 g 离心 5 min ✧ 如果离心后的细胞中红细胞比较多，可进行红细胞裂解操作，若细胞沉淀中没有红色，则可以不进行裂红处理，直接进入下一步 ✧ 对 PBMC 进行计数，离心弃上清后按照每 $10^5 \sim 10^7$ 个细胞加 1 mL 的 TRIzol 试剂吹打混匀，液氮速冻、-80℃保存、干冰运输
骨髓细胞	✧ 抽取骨髓液后，200-1000 g，4℃下离心 5-10 min，弃上清，得到细胞沉淀 ✧ 加入适量 RNase-Free 水配制的 PBS 后，宽口枪头轻柔吹打重悬细胞沉淀，然后在 4℃下 200 g 离心 5 min，弃上清 ✧ 重复一次，但离心完成后不弃上清，观察离心后的细胞沉淀，如果细胞沉淀中有红色，准备进行红细胞裂解操作；收集后的细胞沉淀中没有红色，则可以不进行裂红处理，直接进入下一步 ✧ 加入适量 RNase-Free 水配制的 PBS 后，宽口枪头轻柔吹打重悬细胞沉淀，然后在 4℃下 200 g 离心 5 min，弃 PBS



	✧ 加入适量 TRIzol 裂解液反复吹打至充分裂解，裂解充分标准为吹打后液体不粘稠，无成团细胞块，流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分，需添加裂解液，每次添加的量建议为 100 μL 左右，持续添加直到液体不粘稠，呈透亮状态为止） ✧ 转移至冻存管后，-80℃长期保存，干冰运输
--	--

Total RNA 样本	
样本要求	✧ RNA 浓度: >80 ng/ μ L，总量 2 μ g，OD260/280 值 1.8~2 之间（特殊物种除外），无 DNA、蛋白质污染
	✧ 样本完整性: RIN $\geq$ 7，28S:18S $\geq$ 1.0，琼脂糖跑胶有两条清晰条带在 28S，18S（真核生物），25S，18S（植物）或 23S，16S（原核生物）
	✧ RNA 样本存放于 RNase-free 水中，送样量 15-20 μ L，液氮速冻，-80℃保存，干冰运输

石蜡切片（FFPE）样本	
石蜡切片	✧ 收集组织含量高的 FFPE 切片/卷片 10~20 张，每张厚度 5~10 μ m（总厚度 80 μ m），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℃或-20℃保存，可常温寄送

特殊样本（一类）	
肠道组织	✧ 做好器械的消毒及去 RNase 处理，小肠样本剪成 3~5 cm，用镊子适当捋出肠道内容物的后迅速放入液氮速冻（整个过程用时少于 3 min），将样本转移至冻存管中，液氮速冻后-80℃保存，干冰寄送



类器官样本	- 去除培养板的孔中的培养基，加入 1 mL 预冷的含 0.1%BSA 的 PBS，轻柔吹打 3-5 次，将 Matrigel 从板底吹起并打碎，将悬液移入 15 mL 离心管中 - 将类器官在 4℃, 300-500 g 离心 5 分钟，去除上清，加预冷的 PBS 重悬，重复清洗过程 3-5 次直至胶去除干净；最后一次离心后，将上清去除干净 - 加入适量裂解液反复吹打至充分裂解（以 TriZol 为例，10-15 cm 的大皿，每次先添加 1-2 mL，吹打混匀，裂解充分的标准为吹打时液体不粘稠，流动性好。如果液体过于粘稠说明还未裂解充分，需添加裂解液，每次添加的量建议为 100 μL 左右持续添加，直到液体不粘稠为止，呈透亮状态） - 转移至冻存管后，-80℃ 长期保存，干冰运输。
微生物样本	非致病性细菌： - 取 2 mL (1×10^7 个，对数期) 单一菌种培养液至 RNase-free 冻存管，4℃ 离心（转数根据菌种调整），弃上清，无酶 PBS 缓冲液重悬，离心弃上清，最后将收集好的菌体沉淀冻存管中，用封口膜封好 - 液氮速冻 1 h 后，-80℃ 保存或干冰寄送 非致病性真菌： - 采集 50 mg 真菌，置于预冷的冻存管中，迅速投入液氮速冻 >1.5 h，-80℃ 保存或干冰寄送 注意事项： - 不建议用 TRIzol 裂解液送样，因为有的菌体用 TRIzol 法提取不成功 - 不建议保存于 RNAlater，因其密度较大，菌体难于再离心收集

特殊样本（二类）	
软骨组织	低温状态下切成 1 cm 长的薄片，在 3~5 min 内完成样本的采集，并迅速放于 RNAlater，4℃ 放置 24 h，放入 -80℃ 保存
硬骨组织	低温状态下将硬骨组织切割成黄豆大小的小块，每个样本中有 2-3 个小块，液氮速冻 1 h，-80℃ 保存，或迅速放于 RNAlater，4℃ 放置 24 h，放入 -80℃ 保存
植物组织 (高含量多糖多酚/	有较多蜡质的或次生代谢物含量极高的植物组织或植物组织的茎和根及种子 RNA 得率通常会较低，为提高 RNA 的得率，送样量为



次生代谢物)	普通样本量的 3~4 倍
注意事项	✧ 二类特殊样本均较难提取，送样量应为常规样本量的 3~4 倍，如有条件，请每份样本准备 2 份备份



4. 取样技术指标参考

RNA 提取得率参考	
人血	2.5 µg/mL
大鼠血液	4.0 µg/mL
羊全血	1.3 µg/mL
肝/脾/胸腺	10~50 µg/50 mg
脑/肺/心/肾	10~15 µg/50 mg
皮肤/骨/脂肪	1~5 µg/50 mg
血管	2 µg/50 mg
骨髓	1~2 µg/mL
叶	5 µg/200 mg
茎/根/果实/种子	2~8 µg/500 mg
花	1~5 µg/50 mg
细胞系/原代细胞	1-2 µg/100w
中性粒细胞	1-2 µg/1000w
注意	RNA 得率随样本类型和新鲜程度各不相同，因此，液氮或-80℃冰箱速冻及保存可以尽可能减少样本中 RNA 降解

培养皿、细胞数量与 RNA 得率参考 (注意：此处采用 Hela 细胞)			
培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (mL)	细胞获取量
96 孔板	0.32	0.1	1×10 ⁵
48 孔板	0.8	0.5	2.5×10 ⁵
24 孔板	2	1.0	5×10 ⁵
12 孔板	4.5	2.0	1×10 ⁶
6 孔板	9.6	2.5	2.5×10 ⁶
3.5cm 培养皿	8	3.0	2×10 ⁶
6cm 培养皿	21	5.0	5.2×10 ⁶
9cm 培养皿	49	10.0	1.1×10 ⁷
10cm 培养皿	55	10.0	1.2×10 ⁷



25cm ² 塑料培养瓶	25	5.0	5×10 ⁶
75cm ² 塑料培养瓶	75	15-30	2×10 ⁷
25cm ² 玻璃培养瓶	19	4.0	3×10 ⁶
100cm ² 玻璃培养瓶	37.5	10	6×10 ⁶
250cm ² 玻璃培养瓶	78	15	2×10 ⁷

试剂使用注意事项

RNAlater (品牌: Ambion, 货号: AM7021)	RNAlater 是一种液态的、无毒的组织保存试剂, 常温保存, 能迅速渗透到组织内以稳定和保护细胞的 RNA, 保护非冷冻细胞 RNA 于原位
	RNAlater 只能用于保存新鲜组织, 在进入 RNAlater 之前不能冷冻组织。简单切碎组织样本 (组织厚度于 0.5 cm), 将组织碎块迅速放入到 5 倍体积的 RNAlater 中, 保证冻存管中布满保存液, 4℃放置过夜后, 转入-80℃保存
	RNAlater 不适合保存全血、血清、血浆、植物、细胞、细菌、骨骼样本, 不利于样本分离
TRIzol	TRIzol 保存细胞: 需要用 TRIzol 将细胞裂解完全 (澄清、透明、无细胞团块), 液氮速冻保存即可



5. 声明

我司拒绝接收《人间传染的病原微生物名录》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，必须事先通过销售、客服或运营经理与技术支持人员联系，确定无高致病性和传染性后才能寄送样品。

样品寄送时应采用 WHO 提出的三包装系统，第一层容器：装样品，要求防渗漏；第二层要求耐受性好、防渗漏，容纳并保护第一层容器；第三层容器：放在一个运输用外层包装内。在第二层包装注明“致病性样品，接收时请注意”字样，并在样品信息单上注明其危害程度及接收注意事项。此类样品寄送时销售或运营经理务必邮件通知样品组，告知样品组相关寄送信息（快递单号、样品类型、样品数量）以及接收时的防护措施和注意事项。

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。