

NGS 常规测序和微量样本 mRNA 测序项目送样指南

声明

晶能生物技术（上海）有限公司（以下简称晶能生物）拒绝接收《人间传染的病原微生物名录》（主要依据卫生部发布的《人间传染的病原微生物名录》（卫科教发[2006]15号）整理）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，必须事先通过销售或项目管理与晶能生物技术人员联系，确定无高致病性和传染性后才能运输样品。样品运输时应采用 WHO 提出的三级包装系统，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。此类样品运输时销售或客户务必邮件通知实验室，告知实验室相关运输信息（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。

目录

1. 常规 NGS 测序样本送样要求

1.1 可提取 DNA 的组织样本要求

1.1.1 不同类型可抽提的 DNA 组织样本准备

1.1.1.1 血液

1.1.1.2 动物组织

1.1.1.3 细胞

1.1.1.4 植物根、茎、叶等组织样本

1.1.1.5 血浆、血清样本

1.1.1.6 粪便

1.1.1.7 FFPE 组织

1.2 可提取 RNA 的组织样本要求

1.2.1 不同类型可抽提 RNA 组织样本准备

1.2.1.1 新鲜动物组织

1.2.1.2 细胞

1.2.1.3 全血

1.2.1.4 植物的根、茎、叶

1.2.1.5 菌体

1.2.1.6 FFPE 组织

1.2.1.7 类器官或细胞团

1.3 DNA/RNA 送样建议

1.3.1 DNA 送样建议

1.3.2 RNA 送样建议

1.3.3 文库送样建议

1.3.3.1 散文库上机送样

1.3.3.2 包 lane 上机送样

2. 微量样本 mRNA 测序送样要求

3. 样本寄送打包及运输

4. 附录

1. 常规 NGS 测序送样要求

1.1 可提取 DNA 的组织样本要求

可提取 DNA 样本类型	样本要求
血液	≥0.6mL 新鲜或者冷冻保存的抗凝血(全血或者从全血中提取的白细胞), 推荐使用 EDTA 抗凝剂, 不能用肝素抗凝, 以免影响实验。
动物组织	≥100mg 新鲜或者冷冻保存的动物组织, 建议按一次提取的量 50-100mg 用锡箔纸包裹或 EP 管分装。
细胞	≥5×10 ⁶ 个, 请清洗后离心得细胞沉淀, 干冰运输。
植物组织	≥1g, 建议清洗后用锡箔纸包裹或 EP 管按照一次提取的量 100mg 分装, 在 3 min 内进行液氮速冻。干冰运输。
血浆、血清	≥5 mL, 4h 内完成血浆分离。干冰运输。
粪便	≥1g, 避免尿液污染, 取粪便中段没有接触空气和地面的部分, -80℃冰箱中保存, 干冰运输。
石蜡切片, 蜡卷	5-10 张/卷未经 HE 染色的切片; 厚度≥5μm; 组织区域面积≥10mm×10mm; 有核细胞比例>80%; 肿瘤细胞比例>20%。建议使用 1 年内的 FFPE 样本。常温运输。

注意:以上组织送样要求默认针对单个测序类型项目; 如果同一样本用于多个测序类型服务项目, 则送样要求和服务项目数量成正比。

1.1.1 不同类型可抽提的 DNA 组织样本准备

1.1.1.1 血液

- 1) 全血样本, 并加入抗凝剂。推荐使用 EDTA 抗凝的采血管收集样本(不能使用肝素抗凝), 冷冻后干冰运输;
- 2) 加入抗凝剂后的新鲜血液一般可以在 4℃放置 12-24 小时, 但经过速冻后的样本一定要低温保存; 切记血液样本一定避免反复冻融;
- 3) 血液样本应使用塑料材质的采血管送样, 避免使用玻璃材质采血管送样或装液太满, 以至冻裂。建议转移 0.6mL 到无 DNase 酶/RNase 酶的无菌离心管中再运输。

1.1.1.2 动物组织样本

- 1) 优先选用新鲜采集的样本, 其次为冻存的样本; 在与研究目的不冲突的前提下, 采集样本时应选取核酸含量较多的部位(如: 动物的肝脏、脾、肺等组织)。
- 2) 快速从动物活体取材获得组织后, 立即用预冷的生理盐水进行漂洗, 以去除血渍和污物, 将样本分割成 50-100mg 左右的小块(组织块越小, 保存效果越好), 迅速放入预冷带螺旋帽的 2mL 冻存管中(避免装样太满以至冻裂, 造成样本污染), 立即液氮速冻 15min 以上, 随后-80℃保存。
- 3) 样本采集是建议将样本按一次提取的量进行分管保存, 避免提取取样引起的样本冻融导致的原始样本降解。为确保实验的顺利, 建议样本备份 1-2 份, 以防部分样本降解重新取材、制备或送样, 耽误时间。**严禁运输活体动物, 晶能实验室不具备动物解剖和处理的实验条件。**
- 4) 运输时将样本管放入更大的管或自封袋中以防运输过程中被破坏, 并用大体积干冰进行运输。用锡箔纸包装的组织样本折叠时要有纹理可循, 避免打开时样本散落。

5) 若采用商业核酸稳定剂保存样本，须严格按照说明书要求进行操作和样本运输。

1.1.1.3 细胞

1) 悬浮细胞

悬浮细胞培养结束后，离心去除培养基；收集的细胞用 PBS 缓冲液快速洗 2 次，低速离心去除 PBS 缓冲液；收集后的细胞要求约 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个，-80℃ 冰箱中保存，干冰运输。

2) 贴壁细胞

贴壁细胞培养结束后，吸取去除培养液，胰酶消化，用 PBS 缓冲液快速洗 2 次；低速离心去除 PBS 缓冲液；收集后的细胞要求约 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个，-80℃ 冰箱中保存，干冰运输。

1.1.1.4 植物根、茎、叶等组织样本

1) 优先选择新鲜采集的样本，其次才是冻存样本或经过干燥处理的样本；在与研究目的不冲突的前提下，尽量选取新鲜、幼嫩、生长状态良好的组织部位（植物组织越幼嫩新鲜所含的次生代谢产物就越少，随着植物组织的逐渐成熟，次生代谢产物的含量会逐渐增多，二次生代谢产物的存在会影响核酸的提取效果）。

2) 样本采集时如果植物组织表明污渍较多，应迅速用预冷的纯净水或 75% 乙醇擦拭或冲洗干净，再用吸水纸吸干植物表面残留液体；活体采集后将样本分割成 100mg 小块，迅速放入预冷的冻存管（1.5mL/15mL/50mL）中，在 3 min 内用液氮速冻 15min 以上，然后 -80℃ 保存。

3) 对于多糖多酚的植物样本（特别是木本类植物），建议在采集样本之前，将样本置于黑暗环境 24-48 小时后再取材。如果需要立即取材，请采集样本后，迅速置于低温保存或运输，减少因酚等化合物的氧化对核酸的影响。

4) 样本采集是建议按照一次提取的量 100mg 进行分管保存，避免提取时有二次样本分管造成样本降解。

5) 运输是将样本放入更大的管或自封袋中，防止样本运输时被破坏，并用大体积干冰运输。

1.1.1.5 血浆、血清样本

1) 使用 EDTA 抗凝管采集新鲜血液至少 5mL，去掉针头后轻微颠倒 5~8 次以充分混匀，避免凝固，4h 内完成血浆分离。

2) 将采血管中外周血样本在室温条件下 1600g 离心 10min，离心后将上清（血浆）分装到提前准备好的管子中，在吸取血浆过程中注意不能吸到 Buffy Coat 层（中间白膜层，含有核细胞）。

3) 将第一次分装出来的血浆样本 16000g 离心 10min，将上清转入新离心管中，在吸取过程中不能吸到管底细胞。

4) 将分离好的血浆置于 -80℃ 存储，用防震防碎密闭包装后干冰运输。

1.1.1.6 粪便样本

1) 尽量避免尿液污染粪便，可以事先排尿，粪便尽可能排入洁净干燥容器内；用采样管中无菌勺挖去粪便中段没有接触空气和地面的部分，挖取一满勺（3-5g）。小鼠至少 3-5 粒粪便；将挖取的粪便放入采样管中，盖紧盖子。

2) 收集的样本应立即 -80℃ 保存，可置于干冰上转移至 -80℃ 冰箱中保存，干冰运输。

1.1.1.7 FFPE 组织

1) 石蜡切片或蜡卷厚度 5-10μm，组织区域面积 $\geq 10\text{mm} \times 10\text{mm}$ ，需 5-10 片；若为穿刺样本，由于表面积小，建议 10 片以上；若为石蜡块，厚度需达到 40μm

2) 切片中组织细胞 > 30000 个，有核细胞比例 $> 80\%$ ；肿瘤细胞比例 $> 20\%$ 。

3) 常温运输，注意避免不同样本间蜡片交叉污染。

4) FFPE 样本不宜保存时间过长，建议使用 1 年内的 FFPE 样本。

1.2 可提取 RNA 的组织样本要求

可提取 RNA 样本类型	样本要求
新鲜动物组织	≥100mg，分割成小块，速冻后-80℃保存并干冰运输。或者分割成小块，浸没在 RNAlater 中保存并按照 RNAlater 说明书要求运输样本。
新鲜培养细胞	≥5×10 ⁶ 个，请清洗后离心得细胞沉淀，建议用 TRIzol 充分裂解并干冰运输。
新鲜全血	新鲜 EDTA 抗凝血液样本，不可使用冻存血。方式一 0.5mL 新鲜 EDTA 抗凝血，立即加入 3 倍体积 Trizol 充分震荡混匀后送样；有分离 PBMC 或者白细胞的客户，可分离 PBMC 细胞或者白细胞后，按照细胞加入 TRIzol 充分裂解并干冰运输。方式二 BD RNA tube 保存血液，干冰运输。
植物根茎叶	≥1g，含糖多酚等的复杂植物组织，请尽可能多的送样。新鲜组织建议清洗后用锡箔纸包裹或 EP 管按照一次提取的量 100mg 分装，在 3 min 内进行液氮速冻。干冰运输。
菌体	≥5×10 ⁶ 个，500mg 以上新鲜菌体沉淀（大约 5ml 以上对数生长期菌液离心），在 3min 内进行液氮速冻。菌类样品不建议保存于 TRIzol 裂解中送样。
石蜡切片，蜡卷	5-10 张/卷未经 HE 染色的切片；厚度≥5μm；组织区域面积≥10mm×10mm；有核细胞比例>80%；肿瘤细胞比例>20%。建议使用 1 年内的 FFPE 样本。

注意:以上组织送样要求默认针对单个测序类型项目；如果同一样本用于多个测序类型服务项目，则送样要求和服务项目数量成正比。

1.2.1 不同类型可抽提 RNA 组织样本准备

注意事项

- ① RNA 因其结构的特殊性，极易降解（相比于 DNA）。
- ② RNA 酶非常稳定且几乎无处不在，常规的高压灭菌等物理方法很难有效灭活 RNA 酶。
- ③ RNA 在细胞体内有严谨有序的调控模式，这些信号通路会因为外部环境的改变而变化。

基于以上三点，为保证 RNA 的质量及所获得的数据能够真实反映母体内该组织或器官的 RNA 表达水平，请务必在规范操作的同时快速操作。

1.2.1.1 新鲜动物组织

1) 建议选用新鲜采集的样本，采集样本时应选取核酸含量较多的部位（如：动物的肝脏、脾、肺等组织）。

2) 快速从动物活体取材获得组织后，立即用预冷的 RNase-free 水进行漂洗，以去除血渍和污物，并剔除结缔组织和毛发组织等非研究组织；

3) 将样本分割成 50-100mg 左右的小块（组织块越小，保存效果越好），迅速放入预冷的带螺旋帽的 2mL 无 RNase 酶冻存管中（避免装样太满以至冻裂，造成样本污染），立即液氮速冻 15min 以上，随后-80℃保存。

4) 样本处理及切割过程须在冰上快速进行，时间过长或处理温度过高，样本中的内源酶会很快降解 RNA 导致采样失败。

5) 样本采集是建议将样本按一次提取的量 100mg 进行分管保存，避免提取取样引起的样本冻融导致的原始样本降解。为确保实验的顺利，建议样本备份 1-2 份，以防部分样本降解重新取

材、制备或送样，耽误时间。**严禁运输活体动物，晶能实验室不具备动物解剖和处理的实验条件。**

6) 若采用 RNAlater 等保护剂保存样本，须严格按照说明书要求进行操作和样本运输。

7) 大体积干冰进行运输，保证实验室收样时有足量干冰剩余。

1.2.1.2 细胞

1) 肿瘤细胞样本

肿瘤细胞本身的 RNase 代谢非常活跃，培养结束后，离心去除培养液，立即用 PBS 冲洗 2 次，在操作过程中应轻柔，防止细胞破碎，低速离心除去 PBS 缓冲液；每 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞加入 1mL TRIzol 试剂（用 1mL 吸头反复抽取细胞至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮不粘稠的状态），使样品管在室温放置 10min，放入干冰或 -80℃ 冰箱中保存，干冰运输。

注意事项：

①肿瘤细胞不同于其他类型细胞，如果客户有条件的话，建议处理完自行提取，避免因途中不确定的因素导致样本生物活性的改变甚至降解；

②细胞样本不能加入 RNAlater 保护液，溶解 1×10^7 个细胞的 TRIzol 试剂体积不能少于 1mL。

2) 悬浮细胞

悬浮细胞培养结束后，离心去除培养液；收集的细胞用 PBS 缓冲液快速冲洗 2 次，低速离心除去 PBS 缓冲液；在操作过程中应轻柔，防止细胞破碎，低速离心除去 PBS 缓冲液；每 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞加入 1mL TRIzol 试剂（用 1mL 吸头反复吹打细胞至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮不粘稠的状态），使样品管在室温放置 10min，放入干冰或 -80℃ 冰箱中保存，干冰运输。

3) 贴壁细胞

贴壁细胞培养结束后，吸取去除培养液，用 PBS 缓冲液快速冲洗 2 次；按每 10cm 培养面积（相当于六孔板一个孔或 35mm 直径培养皿）加入 1mL TRIzol 试剂的比例，用 1mL 吸头反复吹打至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮不粘稠的状态，使 TRIzol 接触所有长有细胞的培养皿表面，并进行充分消化；转移到 RNase-free 的 1.5mL 或 2mL 离心管中，放入干冰或 -80℃ 冰箱中保存，干冰运输。

注意：如果细胞量较少（小于 1×10^5 ）的情况下，请告知并备注。建议用微量 RNA 提取试剂盒提取。

1.2.1.3 全血样本

1) 样本必须为新鲜血液样本，不可使用冻存血液。

A. TRIzol 法样本制备

a. EDTA 抗凝管采集新鲜血液 0.5mL，直接加入 3 倍体积的 Trizol 裂解液，充分震荡混匀后，室温孵育 5min，-80℃ 保存，干冰送样。

b. 有分离 PBMC 或者白细胞的客户，也可采用裂红细胞得到白细胞；或者分离得到 PBMC 细胞的方式后，再加入适量的 TRIzol 裂解液。用 1mL 吸头反复吹打至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮不粘稠的状态，室温孵育 5min，随后 -80℃ 冰箱中保存，干冰送样。

注意：根据裂红细胞试剂或者 Ficoll(样本密度分离液)的产品说明书进行操作。

B. 使用 QIAGEN 公司的 PAXgene Blood RNA Tube 采血

每管盛装 2.5mL 的全血，采集完血后立即温和颠倒 10 次左右，室温放置 2-12 小时，随后 -80℃ 冰箱中保存，干冰运输；

注意：客户使用 PAXgene Blood RNA Tube 采血管采集样本时，按产品说明书进行操作。须提前同实验室沟通，以备提取准备相应提取试剂盒。

1.2.1.4 植物根、茎、叶样本

1) 优先选择新鲜采集的样本，在与研究目的不冲突的前提下，尽量选取新鲜、幼嫩、生长状

态良好的组织部位（植物组织越幼嫩新鲜所含的次生代谢产物就越少，随着植物组织的逐渐成熟，次生代谢产物的含量会逐渐增多，二次生代谢产物的存在会影响核酸的提取效果）。

2) 样本采集时如果植物组织表面污渍较多，应迅速用预冷的 RNase-free 水或 75%乙醇擦拭或冲洗干净，再用吸水纸吸干植物表面残留液体；

3) 样本处理与切割须在冰上快速进行；活体采样后将样本分割成 100mg 左右小块，迅速放入预冷的 RNase-free 冻存管（1.5mL/15mL/50mL）中，立即用液氮速冻 15min 以上，然后-80℃保存。

4) 样本采集是建议按照一次提取的量进行分管保存，避免提取时有二次样本分管造成样本降解。为确保实验的顺利，建议样本备份 1-2 份，以防部分样本降解重新取材、制备或送样，耽误时间。

5) 不建议使用 RNAlater 等 RNA 保护剂保存植物样本，因为植物细胞一般都含有细胞壁，RNAlater 很难渗透到细胞中。

6) 大体积干冰进行运输，保证实验室收样时有足量干冰剩余。

1.2.1.5 菌体

1) $\geq 5 \times 10^6$ 个或者 500mg 以上新鲜菌体沉淀（大约 5ml 以上对数生长期菌液离心）

2) 在 3min 内进行液氮速冻。

3) -80℃保存，干冰运输。

注意：菌类样品不建议保存于 TRIzol 裂解中送样。

1.2.1.6 FFPE 组织

1) 石蜡切片或蜡卷厚度 5-10 μ m，组织区域面积 $\geq 10\text{mm} \times 10\text{mm}$ ，需 5-10 片；若为穿刺样本，由于表面积小，建议 10 片以上；若为石蜡块，厚度需达到 40 μ m

2) 切片中组织细胞 >30000 个，有核细胞比例 $>80\%$ ；肿瘤细胞比例 $>20\%$ 。

3) 常温运输，注意避免不同样本间蜡片交叉污染。

4) FFPE 样本不宜保存时间过长，建议使用 1 年内的 FFPE 样本。

1.2.1.7 类器官或者细胞团

1) 对于培养在液体培养基中的类器官或者细胞团等样本，也可以按照细胞的方式处理和送样。离心得类器官或者细胞团后，加入 500 μ L 的 TRIzol，用 1mL 吸头反复吹打至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮不粘稠的状态，室温孵育 5min，随后-80℃冰箱中保存。

如果样本量少，建议通过增加样本量的方式，多准备几份样本，合并提取。同时建议备注用微量提取试剂盒提取增加总 RNA 得率。

2) 对于无法从凝胶培养基中分离的细胞团，建议加入等量的 TRIzol 后，用钢珠和研磨仪将凝胶状培养基和细胞团充分研磨后，室温下孵育 5min 随后-80℃冰箱中保存。干冰运输。

如果样本量少，建议通过增加样本量的方式，多准备几份样本，合并提取。同时建议备注用微量提取试剂盒提取增加总 RNA 得率。

1.3 DNA/RNA 送样建议

本公司接收客户自提取的核酸样本，收样后会进行总量和完整性的质控。

1.3.1 DNA 送样建议

1) DNA 样本体积 $v \geq 10\mu\text{L}$ 。无 RNA 和蛋白污染，样品澄清无色，无粘稠，无不溶解物。

2) 建议 DNA 送样总量: DNA-seq, Exome-seq 和定制捕获 $\geq 500\text{ng}$; WGBS, RRBS $\geq 1000\text{ng}$; ChIP DNA $\geq 20\text{ng}$; FFPE DNA $\geq 1000\text{ng}$; ctDNA $\geq 20\text{ng}$; PCR 产物 $\geq 300\text{ng}$ 。

3) DNA 样品建议在-20℃保存。短时间保存或运输可以使用冰袋，4℃保存或运输。长时间运输，建议采用干冰加冰袋的方式。

DNA 类型	DNA 完整性	DNA 总量质检合格		判定	说明
		DNA-seq , Exom-seq 和定制捕获	WGBS , RRBS		
gDNA	条带清晰, 无拖尾	$m \geq 0.2\mu\text{g}$	$m \geq 0.5\mu\text{g}$	1	1 代表质量合格。完整性和总量 2 个参数都达到要求。
	条带清晰, 无拖尾	$m < 0.2\mu\text{g}$	$m < 0.5\mu\text{g}$	3	3 代表风险: 质量完整性和总量有 1 个参数不达标即风险。其中完整性分为条带清晰, 条带弥散主峰 $> 500\text{bp}$, 主峰 $< 500\text{bp}$ 3 种情况, 其风险逐渐增加; 不同测序类型对 DNA 要求不同, DNA-seq, Exom-seq 和定制捕获总量 $m \geq 0.2\mu\text{g}$ 为合格, $m < 0.2\mu\text{g}$ 为风险。WGBS 和 RRBS 总量 $m \geq 0.5\mu\text{g}$ 为合格, $m < 0.5\mu\text{g}$ 为风险。
	条带弥散, 主峰 $> 500\text{bp}$	$m \geq 0.2\mu\text{g}$	$m \geq 0.5\mu\text{g}$	3	
	条带弥散, 主峰 $> 500\text{bp}$	$m < 0.2\mu\text{g}$	$m < 0.5\mu\text{g}$	3	
	主峰 $< 500\text{bp}$	$m \geq 0.2\mu\text{g}$	$m \geq 0.5\mu\text{g}$	3	
	主峰 $< 500\text{bp}$	$m < 0.2\mu\text{g}$	$m < 0.5\mu\text{g}$	2	2 代表不合格: 完整性和总量 2 个参数都不达标。
ChIP DNA (ChIP-Seq)	主峰在 250-500bp 左右	$m \geq 10\text{ng}$		1	1 代表质量合格。ChIP-Seq 的 gDNA 主峰在 250-500bp 左右, 总量 $\geq 10\text{ng}$ 。
	主峰在 250-500bp 左右	$m < 10\text{ng}$		3	3 代表风险: 片段大小和总量有 1 个参数不达标即风险。
	主峰 $< 250\text{bp}$	$m \geq 10\text{ng}$		3	
	主峰 $< 250\text{bp}$	$m < 10\text{ng}$		2	2 代表不合格: 片段大小和总量 2 个参数都不达标。
FFPE DNA	主峰 $> 500\text{bp}$	$m \geq 0.5\mu\text{g}$		3	3 代表风险: 质量完整性和总量有 1 个参数不达标即风险。FFPE 样本一般完整性较差, 电泳条带弥散。
	主峰 $> 500\text{bp}$	$m < 0.5\mu\text{g}$		3	
	主峰 $< 500\text{bp}$	$m \geq 0.5\mu\text{g}$		3	
	主峰 $< 500\text{bp}$	$m < 0.5\mu\text{g}$		2	2 代表不合格: 2 个参数都不达标。
ctDNA	无大片段污染	$m \geq 10\text{ng}$		1	1 代表质量合格。ctDNA 无大片段污染, 总量 $\geq 10\text{ng}$ 。
	无大片段污染	$m < 10\text{ng}$		3	3 代表风险。其中总量 $m < 10\text{ng}$ 不合格。
	有大片段污染	$m \geq 10\text{ng}$		2	须纯化后重新质检
	有大片段污染	$m < 10\text{ng}$		2	建议重新送样
PCR 产物	条带单一	$m \geq 0.1\mu\text{g}$		1	1 代表质量合格, PCR 产物条带单一, 总量大于 $0.1\mu\text{g}$ 为合格
	多条条带	$m \geq 0.1\mu\text{g}$		3	3 代表风险, 条带不是单一条带, 或者总量小于 $0.1\mu\text{g}$ 为风险。
	条带单一	$m < 0.1\mu\text{g}$		3	
	多条条带	$m < 0.1\mu\text{g}$		2	2 代表不合格: 2 个参数都不达标。

				条带不单一，且总量小于 0.1μg 为不合格。
--	--	--	--	-------------------------

1.3.2 RNA 送样建议

- 1) RNA 样本体积 $v \geq 10\mu\text{L}$ 。无 DNA 和蛋白污染，样品澄清无色，无粘稠，无不溶解物。
- 2) 建议 RNA 总量送样量： $\geq 500\text{ng}$
- 3) RNA 样品建议在 -80°C 保存。短时间保存或运输可以使用干冰。长时间运输，建议采用足量干冰运输（2 kg/天）。

RNA 类型	RNA 完整性	RNA 总量质检合格	判定	说明
总 RNA (人和小鼠)	$28\text{s}:18\text{s} \geq 1:1$	$m \geq 0.3\mu\text{g}$	1	1 代表合格：须 RNA 完整性和总量 2 个参数同时符合；人和小鼠的总 RNA $28\text{s}:18\text{s} \geq 1:1$ ，其他物种的 $23\text{s}:16\text{s} \geq 1:1$ ，总量 $m \geq 0.3\mu\text{g}$ 。 3 代表风险：完整性和总量有 1 个不达标即风险。 2 代表不合格：2 个指标都不达标。
	$28\text{s}:18\text{s} \geq 1:1$	$m < 0.3\mu\text{g}$	3	
	$28\text{s}:18\text{s} < 1:1$	$m \geq 0.3\mu\text{g}$	3	
	$28\text{s}:18\text{s} < 1:1$	$m < 0.3\mu\text{g}$	2	
总 RNA (其他物种)	$23\text{s}:16\text{s} \geq 1:1$	$m \geq 0.3\mu\text{g}$	1	
	$23\text{s}:16\text{s} \geq 1:1$	$m < 0.3\mu\text{g}$	3	
	$23\text{s}:16\text{s} < 1:1$	$m \geq 0.3\mu\text{g}$	3	
	$23\text{s}:16\text{s} < 1:1$	$m < 0.3\mu\text{g}$	2	

注意：昆虫、软体动物虽然也是真核生物，由于 28s rRNA 存在“隐裂”现象，产生了 2 个小片段：28s α 和 28s β ，二者与 18s rRNA 重叠在一起形成单峰趋势。故不遵从 $28\text{s}:18\text{s} \geq 1:1$ 的 RNA 完整性要求。

1.3.3 文库送样建议

本公司接收客户 illumina 高通量测序文库样本，收样后会进行浓度和片段大小的质控。

- 1) 文库样本体积 $V \geq 15\mu\text{L}$ 。样品澄清无色，无粘稠，无不溶解物。
- 2) 文库样品建议在 -20°C 保存。短时间保存或运输可以使用冰袋， 4°C 保存或运输。长时间运输，建议采用干冰加冰袋的方式。

注意：本公司的 illumina 高通量测序平台为 NovaSeq™ 6000, 试剂版本为 v1.5, PE 双端 Index 读取策略为 Index1(i7)正向, Index2(i5)反向互补。详见 <https://support.illumina.com.cn/bulletins/2020/11/introducing-the-novaseq-6000-v1-5-reagents.html>

1.3.3.1 散文库上机送样

Post-PCR 文库接收要求：	
合格标准	Post-PCR 文库的总摩尔量 $\geq 0.4\text{pmol}$ ；且分值介于 210-430bp (包含 210 和 430)。(摩尔量 (pmol) = 样本质量 (ng) / 0.66 / 文库片段平均峰 (bp))
让步标准	$0.2\text{pmol} \leq$ Post-PCR 文库的总摩尔量 $< 0.4\text{pmol}$ ；或峰值介于 188-210bp (包含 188, 不含 210) (摩尔量 (pmol) = 样本质量 (ng) / 0.66 / 文库片段平均峰 (bp))
拒收标准	Post-PCR 文库的总摩尔量 $< 0.2\text{pmol}$ ；或峰值 $< 188\text{bp}$ ；或峰值 $> 430\text{bp}$

1.3.3.2 包 lane 上机送样

Post-PCR 文库接收要求：	
合格标准	Post-PCR 文库的总摩尔量 $\geq 1.5\text{pmol}$ ；且分值介于 210-430bp (包含 210 和 430)。

	(摩尔量 (pmol) = 样本质量 (ng) / 0.66 / 文库片段平均峰 (bp))
让步标准	1.0pmol ≤ Post-PCR 文库的总摩尔量 < 1.5pmol; 或峰值介于 188-210bp (包含 188, 不含 210) (摩尔量 (pmol) = 样本质量 (ng) / 0.66 / 文库片段平均峰 (bp))
拒收标准	Post-PCR 文库的总摩尔量 < 0.2pmol; 或峰值 < 188bp; 或峰值 > 430bp

2. 微量样本 mRNA 测序送样要求

晶能生物的微量 mRNA 扩增，只适合哺乳动物细胞或其他无细胞壁结构的真核细胞，10 pg -10 ng 纯化后的带 poly A 序列的总 RNA。不适用于原核细胞，不适用于固定后的细胞。

核酸提取质量与物种及组织部位(或者细胞状态)、采集方法及保存状态、提取方法及操作、实验器材及环境等因素均有密不可分的联系，望知悉及理解，并做好样本备份。为了保障获得高质量的核酸，请务必按照送样指南所规定的准备样本。对于珍贵样本，建议自行提取。

2.1. 样本准备:

2.1.1. 哺乳动物组织样本:

1) 新鲜组织: 组织离体后，细胞内核酸便开始降解了，因此在采集样本时，组织离体后除去多余血水和结缔组织，分割成小块，建议选择液氮速冻，若条件不允许，可放入-80℃冰箱冻存。

2) 组织送样量: 至少肉眼可见。

3) 组织样本保存和运输: 建议选择液氮速冻，若条件不允许，可放入-80℃冰箱冻存。若组织发生过冻融，则提取成功的可能性几乎为零，请确保组织未发生过冻融情况。样本保存时间超过一年的组织不建议送样。冷冻组织使用干冰运输。动物组织可使用核酸保护液保存。如果使用核酸保护液，按照说明书要求保存和运输。

4) 送样组织部位要求: 请确保运输样本为目标组织部位，不能含有其他部位。提取实验无法精准取样，且不负责称重。若送样量过多，则随机选取适量组织进行提取。

2.1.2. 真核细胞样本:

细胞类型: 适用于哺乳动物细胞或其他无细胞壁结构的真核细胞。**不适用于原核细胞,不适用于固定后的细胞。**

1) 细胞送样量: 至少大于等于 3000 个。

2) 细胞活性: 建议细胞冻存前，先观察细胞状态，选用细胞状态良好的细胞冻存。

3) 细胞样本保存和运输:

A. 建议选择离心得细胞沉淀后，用 500μL 的 TRIzol，用 1mL 吸头反复吹打至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮不粘稠的状态，室温孵育 5min，随后-80℃冰箱中保存。干冰运输。备注用微量 RNA 提取试剂盒提取。

B. 也得到细胞在 10 微升的 PBS 缓冲液，-80℃保存，干冰运输。备注用微量 RNA 提取试剂盒提取。

2.1.3. 带 poly A 序列的总 RNA

1) RNA 总量 ≥ 1-10ng，体积 v ≥ 10μL，浓度 ≥ 100pg/μL。无 DNA 和蛋白污染，样品澄清无色，无粘稠，无不溶解物。

2) RNA 样品建议在-80℃保存。短时间保存或运输可以使用干冰。长时间运输，建议采用足量干冰运输（2 kg/天）。

3. 样本寄送，打包及运输

3.1 寄送要求

所有样品必须附带一份纸质版《晶能生物样品登记表》，若是 illumina 高通量测序纯文库样品，需附带《晶能生物 Illumina 高通量测序纯文库样本登记表》；请详细填写信息单上所要求的各项样品信息，包括样品编号、管数、浓度、体积等，随同样品一起寄出，并将电子版发送至 service@genenergy.cn，请同时抄送销售和销售助理邮箱。

3.2 打包建议

样品运输时应采用 WHO 提出的三级包装系统，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。还可以酌情增加四级包装。

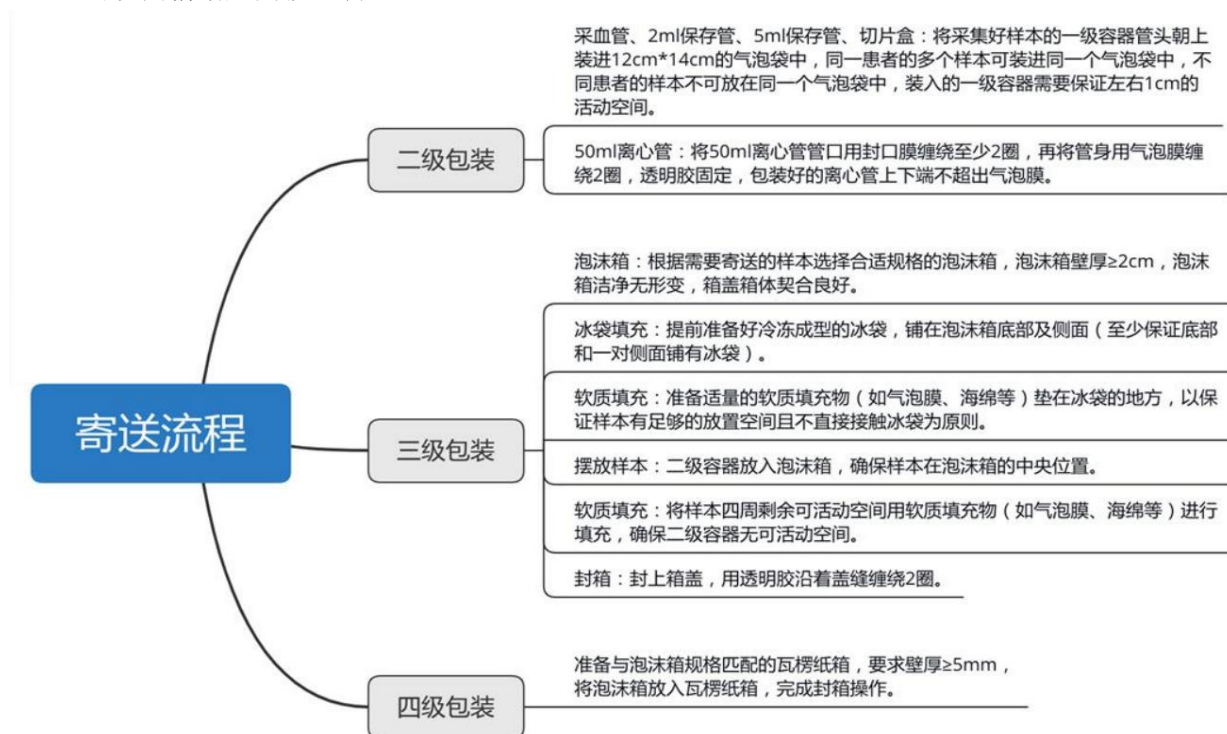


图 1.样本运输流程图

3.3 邮寄信息

地址：上海市松江区中心路 1158 号 5 幢 5 层
单位：晶能生物技术（上海）有限公司
收件人：样本库+销售姓名
手机号：13917411562

4. 附录

《人间传染的病原微生物名录》