

根据本项目拟开展的多组学研究方向，基于全血样本类型，结合相关的研究背景，我们提供了两个不同的方案，其中方案一满足同时开展基因组、表观基因组、转录组、蛋白质组、代谢组多组学检测的需求，方案二满足同时开展基因组、表观基因组、蛋白质组、代谢组多组学检测的需求。上述方案的设计，也是综合考虑了临床或流调现场的实验操作简便性，所以制定了本样本收集流程方案是以 EDTA 抗凝全血为基础，进行血浆样本类型、血细胞样本类型及白细胞样本类型的分离处理方案。

此外，各位老师也可以根据科研项目的具体需求，以及样本收集现场的实际实验条件、操作人员熟练性等因素进行样本类型的调整，比如血清样本类型及 PBMC 细胞类型，有关该类型样本的详细收集处理、保存、运输等流程，请及时联系博淼生物负责销售人员索取资料。

博淼生物愿为您提供“量身定制”的全组学不同样本类型的最佳采集流程，为您珍贵的队列样本库建设保驾护航！

◇ **样本采集方案一：**

本方案根据同一例样本采集的 EDTA 抗凝全血，由于转录组的前处理条件与其他组学流程不同，所以需要进行同一例样本采集 1 管 EDTA 抗凝血(4ml 以上)，分装，然后按照如下流程分别进行处理及保存。

一次性采集 4ml 以上的全血，分装 1ml 全血于无 RNA 酶离心管中，进行第二部分实验操作（建议先开展该部分实验处理，RNA 相对更容易降解）。保留其中 3ml 以上全血于 EDTA 抗凝管中，进行第一部分实验操作。对应详细的分离收集流程说明如下：

● **EDTA 抗凝管全血样本处理流程——血浆（满足蛋白质组、代谢组检测）、血细胞（满足基因组、表观基因组检测）：**

1. 采集步骤：

- 1) 准备好 EDTA 抗凝管，核对被采集者信息后，进行静脉采血，4ml 以上。
- 2) 采血后立即轻轻将采血管颠倒混匀 5 次~8 次。

3) 分装管中 1ml 全血于无 RNA 酶的离心管中，用作转录组实验。

- 4) EDTA 管中剩余 3ml 以上全血，进行后续步骤。
- 5) 最佳分离时间为采集之后 30min 以内。如果不能在该时间段内进行分离（比如临时有其他事情处理等），可以先将 EDTA 抗凝管放置于 4℃ 冰箱内，最多可以保存至 4h 之后再继续进行下述离心操作。
- 6) 采用低温离心机，参数设置为温度 4℃，转速 1300-2000g，离心 10-15 min（若没有低温离心机，常温离心机也可以）。

首先收集上层血浆样本——用来开展蛋白质组、代谢组检测。

- 1) 用移液器吸取离心之后的上清样本（血浆的回收率约为全血体积的 1/2，由此该部分可以获取约 1.5ml 的血浆），此时用肉眼观察，如果上清出现血红色，说明有溶血情况，则需要舍弃，不纳入后续的血浆样本保存。
- 2) 根据研究的需求，进行多管分装保存，建议 100ul-200ul/管，其中部分冻存管作为保存液可长期保存于-80 度冰箱，杜绝期间冻融操作，可以满足代谢组 2 年以内、蛋白质组 5 年以内甚至更长时间的检测研究需求；其余部分冻存管可以根据研究实际需求作为工作液保存于-80 度冰箱，便于半年内开展相关技术检测。

3) 关于开展蛋白质组检测的血浆样本，需要在对应分装完成血浆的冻存管中按 1：50 的

比例加入蛋白酶抑制剂（不同厂家的蛋白酶抑制剂添加量不同，以购买试剂的说明书为

主), 再放置于-80 度冰箱保存。

关于开展代谢组检测的血浆样本, 直接将分装完成血浆的冻存管放置于-80 度冰箱保存。

- 4) 如果硬件条件允许的情况下, 先将血浆放入液氮中进行速冻 5min, 然后再转移至-80 度冰箱长期保存。如果条件不允许, 则按照上述流程处理完成之后直接放置-80 度冰箱长期保存。(如果样本采集现场没有-80 度冰箱, 且距离样本库较远, 可以先将样本先保存于-20 度, 不能超过一周时间内, 一次性将全部样本干冰运输至样本库转移至-80 度冰箱长期保存)

***特殊说明:**

- 1) 代谢组不能用柠檬酸钠抗凝采集管。
- 2) 如果能及时分离, 采血管可放置室温等待分层。如果老师手头有工作, 可以先将采血管暂存 4℃, 等工作完成后, 进行分离。分离时间越快越好, 最多不建议超过 4h。
- 3) 离心时有条件可使用 4℃离心机, 没有的话常温离心机也是可以的。
- 4) 血浆参考产率: $\approx 50\%$ (例如: 1 mL 全血大约能得 0.5 mL 血浆)。
- 5) 如发生溶血, 建议重新取样。
- 6) 血浆样本无需等待血液凝结, 更适合于重复性实验。

其次收集下层血细胞样本——用来开展基因组、表观基因组检测。

- 1) 上述收集完上层血浆样本之后, 下层的样本约 1.5ml 全部作为血细胞进行保存, 可以直接放置在 EDTA 采血管中, 短期保存于-20℃, 期间杜绝样本冻融操作, 可以保存半年时间, 不影响 gDNA 的提取质量及降解情况。如需长期保存, 则建议转移至进口 EP 管中, 并在对应管盖、管壁均写上样本 ID, 然后保存于-80℃, 期间杜绝样本冻融操作, 可以保存 1-2 年时间甚至更长。

- 2) 建议将其中 1ml 血细胞在三个月内进行 gDNA 提取, 剩余 0.5ml 血细胞长期保存, 可以保证样本库中 gDNA 及血细胞的同时保存, 以备特殊情况如重要样本丢失等。
- 3) 提取之后的 gDNA 分为两个 EP 管进行分装, 其中一份 EP 管作为工作液用来开展基因组及表观基因组检测, 另外一份 EP 管作为保存液放置-80 度冰箱长期保存。(保存液效果最佳的保存形式为 gDNA 冷冻干粉)

● **分装出 1ml 全血于无 RNA 酶管中样本处理流程——白细胞(满足转录组检测):**

- 1) 请与不超过 30min 内从上述 EDTA 抗凝管中分装出约 **1ml** 新鲜血液至 5ml 无 RNA 酶的离心管中。如果临时有其他工作安排, 先 EDTA 全血放置 4°C 保存, 不超过 4h 内再分装。**(建议请先处理该部分的白细胞的分离工作, 然后再处理第一部分剩余 EDTA 全血样本的血浆及血细胞分离工作)**
- 2) 加入 3ml 红细胞裂解液 (不同厂家的红细胞裂解液添加量不同, 以购买试剂的说明书为主), 手动混匀后, 再用振荡器混匀约 15s。将离心管室温放置 5 分钟, 期间每隔 1min 再颠倒混匀 10 次。
- 3) 采用常温离心机, 参数设置为转速 10000rpm, 离心 1 min (若是离心机最高转速不允许, 可以 6000rpm 离心 3 分钟)。
- 4) 离心后弃掉上清, 保留沉淀。(弃上清时需注意不要将沉淀倒出。)
- 5) 向白细胞沉淀中, 加入 1ml 预冷的 TRIzol。(TRIzol 溶液放置 4°C 冰箱, 预冷 2h。)
- 6) 用振荡器反复震荡离心管, 直至白细胞沉淀溶解, 且没有絮状物。
- 7) 室温孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。
- 8) 如果硬件条件允许的情况下, 先将 TRIzol 裂解后的白细胞放入液氮中进行速冻。然后

再转移至-80 度冰箱长期保存。如果条件不允许, 则按照上述流程处理完成之后直接放
全国统一服务热线: 400-6506-908

置-80 度冰箱长期保存。(不建议样本存于-20℃冰箱。)

◇ 样本采集方案二：

本方案根据同一例样本采集的 EDTA 抗凝全血，可以一次性处理分别获取血浆样本及抗凝血细胞样本，即可满足基因组、表观基因组、蛋白质组、代谢组的检测，操作简便、提升效率。

● EDTA 抗凝管全血样本处理流程——血浆（满足蛋白质组、代谢组检测）、血细胞（满足基因组、表观基因组检测）：

1. 采集步骤：

- 1) 准备好 EDTA 抗凝管，核对被采集者信息后，进行静脉采血。
- 2) 采血后立即轻轻将采血管颠倒混匀 5 次~8 次。
- 3) 分装新鲜血液约 3ml。
- 4) 最佳分离时间为采集之后 30min 以内。如果不能在该时间段内进行分离（比如临时有其他事情处理等），可以先将 EDTA 抗凝管放置于 4°C 冰箱内，最多可以保存至 4h 之后再行下述离心操作。
- 5) 采用低温离心机，参数设置为温度 4°C，转速 1300-2000g，离心 10-15 min（若没有低温离心机，常温离心机也可以）。

首先收集上层血浆样本——用来开展蛋白质组、代谢组检测。

- 1) 用移液器吸取离心之后的上清样本（血浆的回收率约为全血体积的 1/2，由此该部分可以获取约 1.5ml 的血浆），此时用肉眼观察，如果上清出现血红色，说明有溶血情况，则需要舍弃，不纳入后续的血浆样本保存。
- 2) 根据研究的需求，进行多管分装保存，建议 100ul-200ul/管，其中部分冻存管作为保存液可长期保存于-80 度冰箱，杜绝期间冻融操作，可以满足代谢组 2 年以内、蛋白质组 5 年以内甚至更长时间的检测研究需求；其余部分冻存管可以根据研究实际需求作



为工作液保存于-80 度冰箱，便于半年内开展相关技术检测。

- 3) 关于开展蛋白质组检测的血浆样本，需要在对应分装完成血浆的冻存管中按 1: 50 的比例加入蛋白酶抑制剂（不同厂家的蛋白酶抑制剂添加量不同，以购买试剂的说明书为主），再放置于-80 度冰箱保存。

关于开展代谢组检测的血浆样本，直接将分装完成血浆的冻存管放置于-80 度冰箱保存。

- 4) 如果硬件条件允许的情况下，先将血浆放入液氮中进行速冻 5min，然后再转移至-80 度冰箱长期保存。如果条件不允许，则按照上述流程处理完成之后直接放置-80 度冰箱长期保存。（如果样本采集现场没有-80 度冰箱，且距离样本库较远，可以先将样本先保存于-20 度，不能超过一周时间内，一次性将全部样本干冰运输至样本库转移至-80 度冰箱长期保存）

*特殊说明：

- 1) 代谢组不能用柠檬酸钠抗凝采集管。
- 2) 如果能及时分离，采血管可放置室温等待分层。如果老师手头有工作，可以先将采血管暂存 4℃，等工作完成后，进行分离。分离时间越快越好，最多不建议超过 4h。
- 3) 离心时有条件可使用 4℃离心机，没有的话常温离心机也是可以的。
- 4) 血浆参考产率：~50%（例如：1 mL 全血大约能得 0.5 mL 血浆）。
- 5) 如发生溶血，建议重新取样。
- 6) 血浆样本无需等待血液凝结，更适合于重复性实验。

其次收集下层血细胞样本——用来开展基因组、表观基因组检测。

- 1) 上述收集完上层血浆样本之后，下层的样本约 1.5ml 全部作为血细胞进行保存，可以

直接放置在 EDTA 采血管中，短期保存于-20℃，期间杜绝样本冻融操作，可以保存半年
全国统一服务热线：400-6506-908

年时间，不影响 gDNA 的提取质量及降解情况。如需长期保存，则建议转移至进口 EP 管中，并在对应管盖、管壁均写上样本 ID，然后保存于-80°C，期间杜绝样本冻融操作，可以保存 1-2 年时间甚至更长。

- 2) 建议将其中 1ml 血细胞在三个月内进行 gDNA 提取，剩余 0.5ml 血细胞长期保存，可以保证样本库中 gDNA 及血细胞的同时保存，以备特殊情况如重要样本丢失等。
- 3) 提取之后的 gDNA 分为两个 EP 管进行分装，其中一份 EP 管作为工作液用来开展基因组及表观基因组检测，另外一份 EP 管作为保存液放置-80 度冰箱长期保存。(保存液效果最佳的保存形式为 gDNA 冷冻干粉)

◇ 样本的运输：

- 样品需用干冰进行运输。干冰数量不低于 8 公斤/天，夏季运输需要适当增加用量。
- 运输前需确认离心管盖密合度非常佳，且以封口膜将盖口包装，避免杂质混入或者液体溢出。
- 选用密闭性较佳或厚度较厚的泡沫盒进行寄送。附带的文件说明，请以夹链袋再装一次以免湿气毁损文件。宽版胶带缠绕密封泡沫盒即可寄出。

◇ 试剂耗材列表：

- 耗材：

名称	可选厂家	型号
低温离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司	TGL-16
低温离心机	eppendorf	5702R
振荡仪	海门市其林贝尔仪器制造有限公司	QL-901
离心机 (大)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司	TDZ5-WS



离心机 (小)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司	H1650-W
-80°C冰箱	中科美菱	DW-HL218
4°C冰箱	澳柯玛股份有限公司	SC-287
-20°C冰箱	澳柯玛股份有限公司	BC/BD-217HFA
10µl 单枪	eppendorf	4920000024
200µl 单枪	eppendorf	4920000067
1000µl 单枪	eppendorf	4920000083
10µl 透明吸头	Axygen	T-300
200µl 黄色吸头	Axygen	T-200-Y
1000µl 蓝色吸头	Axygen	T-1000-B
真空 EDTA 采血管 (6ml)	BD	367863
1.5ml EP 管	Axygen	MCT-150-C
2ml EP 管	Axygen	MCT-200-C
0.5ml 冻存管	Biologix	88-0050
1.5ml 冻存管	Biologix	88-9150

● 试剂:

名称	可选厂家	型号
蛋白酶抑制剂 (cOmplete, EDTA-free, EASYpack, 20)	Roche	046931320010
红细胞裂解液	天根生化科技 (北京) 有限公司	RT122
TRIzol™ Reagent	赛默飞	15596026