



博淼生物
BIO MIAO BIOLOGICAL
— SINCE 2009 —

Your Own Laboratory
您的专属实验室

蛋白质组送样标准和样本准备注意事项



全国统一服务热线：4006-506-908

官方网站：www.biomiao.com

邮箱：marketing@biomiao.com



博淼生物
BIO MIAO BIOLOGICAL

Your Own Laboratory
您的专属实验室

系统生物学技术服务

目录

博淼生物

一、送样标准

(一) 定性产品

实验类型	送样建议
胶点胶条	送考马斯亮蓝染色或银染后的胶点/胶条，要求条带清晰，无降解，单个胶条面积小于 1*1.5cm ² 。4°C保存，放入 EP 管中，加入去离子水浸泡，冰袋寄送。 *注：考马斯亮蓝染色的条带鉴定到目标蛋白的概率高于银染。
相互作用谱 (IP/Co-IP/Pull down)	方案一：IP/Co-IP/Pull-down 的蛋白洗脱液，跑 SDS-PAGE 胶。不要跑完整泳道，在样本跑出分离胶 1-1.5cm 后停止电泳，切胶送样。此方案鉴定到目标蛋白的概率降低，因为 shot-gun 优先检测高丰度蛋白。 方案二：送蛋白溶液，必须提供溶液成分或详细样本处理过程及试剂，蛋白总量为 20μg 以上。此方案需要沟通评估。
FFPE	每片厚度 10μm，面积 1.5×2 cm，5 片。

(二) 标准定量蛋白质组

样品类型		实验项目		
		label free/ DIA/PRM	TMT	内源性多肽
动物组织	常规组织 (脑、心、肝、脾、肺、肾、肌肉等柔软组织)	20 mg	30 mg	200 mg
	坚硬组织 (软骨、毛发)	200 mg	300 mg	/
微生物	常见细菌、真菌菌体 (菌体沉淀)	50 μL	100 μL	500 μL
细胞	悬浮/贴壁培养细胞 (细胞计数/沉淀)	5×10 ⁶ 或 20 μL	1×10 ⁷ 或 30 μL	200 μL
液体类	血浆/血清/脑脊液 (不去除高丰度)	10 μL	20 μL	500 μL
	血浆/血清/脑脊液 (去除高丰度)	200 μL	500 μL	500 μL
	卵泡液 (不去除高丰度)	100 μL	200 μL	/
	卵泡液 (去除高丰度)、尿液	1 mL	2 mL	/
	淋巴液、关节液、穿刺液、腹水	3 mL	5 mL	/
	唾液/泪液/乳汁	500 μL	1 mL	/
其他	培养基上清 (不能使用含血清的培养基)	10 mL	20 mL	/
	蛋白溶液，溶解缓冲液最佳 buffer 是 8M Urea	20 ug	200 ug	/



FFPE	每片厚度 10 μm , 面积 1.5×2 cm	10 片	15-20 片	/
------	-----------------------------	------	---------	---

*注：常规去高丰度默认伯乐试剂盒。

(三) 修饰蛋白质组

样品类型		实验项目			
		磷酸化 label free/DIA	糖基化	标记磷酸化	乙酰化/琥珀酰化/泛素化/巯基修饰
动物组织	常规组织 (脑 心 肝 脾 肺、肾、肌肉等)	500 mg	50 mg	50 mg	2 g
	坚硬组织 (软骨、毛发)	3 g	/	300 mg	10 g
微生物	常见细菌、真菌菌体 (沉淀)	200 μL	50 μL	50 μL	1 mL
细胞	悬浮/贴壁培养细胞 (因为细胞大小不一, 重点是必须达到要求的体积)	5×10 ⁷ 或 500 μL	5×10 ⁶ 或 30μL	5×10 ⁶ 或 30μL	10 ⁸ 或 500 μL
液体类	血浆/血清 (不去除高丰度)	/	20 μL	/	1.5 mL
	血浆/血清 (去除高丰度)	/	500 μL	/	/
	泪液、穿刺液	30 mL	/	3 mL	300 mL
	淋巴液、关节液、唾液、乳汁、腹水	10 mL	1 mL	1 mL	50 mL
其他	蛋白溶液 (溶解缓冲液最佳 buffer 是 8M Urea)	2 mg	500 μg	500 μg	10 mg

(四) 微量样本定量蛋白质组

样品类型		实验项目	
		label free/DIA	TMT(无馏分)
动物组织	常规组织 (脑 心 肝 脾 肺、肾、肌肉等软组织)	1 mg	5 mg
细胞	悬浮/贴壁培养细胞 (细胞计数/沉淀)	200-5000	200-5000
液体类	血浆/血清/脑脊液/乳汁 (不去除高丰度)	5 μL	5 μL
	血浆/血清/脑脊液 (去除高丰度)	10 μL	10 μL



	卵泡液 (不去除高丰度)	10 μ L	10 μ L
	卵泡液 (去除高丰度)、尿液	100 μ L	100 μ L
	淋巴液、关节液、穿刺液、腹水	1 mL	1 mL
	唾液/泪液	100 μ L	100 μ L
	培养基上清 (不能使用含血清的培养基)	5 mL	5 mL
FFPE	每片厚度 10 μ m, 面积 1.5 \times 2 cm	1 片	2 片

*注：超微量不提供 SDS-PAGE 的 QC 报告；人员样本去除高丰度有 3 种试剂盒可选；报价翻倍。

二、 动物组织

(一) 常规动物组织 (心, 肝, 脾, 肾, 肺等) 采集步骤

1. 每个样本的取材部位要尽量一致, 准确切除所需组织后, 剔除无关的干扰组织 (血管、脂肪、结缔组织等)。
2. 用预冷的生理盐水或 PBS 迅速漂洗样本, 以去除血渍和污物。
3. 用无尘吸水纸快速吸干表面的液体。
4. 用灭菌的组织剪或手术刀将组织切成 100mg 左右小块, 分装保存。
5. 用镊子夹住样本, 放入液氮中速冻样本 5-10min, 存入预冷的冻存管或离心管中。
6. 转入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

*注:

- 1) 对于人体手术切除的组织, 最好用 PBS (磷酸缓冲盐溶液, 作为溶剂, 起溶解保护试剂的作用) 取完之后直接去血。
- 2) 对于小鼠、大鼠、兔子之类的组织样品, 建议用灌流的方式来去血, 尤其是像肝脏、胃、心脏这类大的组织, 可以直接用灌流的方式去血, 去得最干净。其次的方案是在后期剪碎的时候去血。
- 3) 对于组织重量远低于 100 mg 的样本, 如斑马鱼大脑组织、小鼠海马组织等, 可考虑混样。



(二) 动物毛发采集步骤

1. 用适量 2% SDS, 50mM 磷酸钠 (pH7.8) 缓冲液漂洗样品, 去除污染物。
2. 干燥, 保存在-80 °C。

***注:**

- 1) 拔毛发时, 顺毛方向进行拔取, 尽量保证毛囊的完整性。
- 2) 动物组织建议使用研磨管。

(三) 动物软骨等坚硬组织样本采集步骤

1. 准确切除所需组织后, 剔除无关的干扰组织 (血管、脂肪、结缔组织等)。
2. PBS 洗涤, 用手术刀将软骨切成 0.5cm³ 左右的小块。
3. 液氮速冻。
4. 保存在-80°C。

***注:**

- 1) 动物组织建议使用研磨管。

(四) 线虫采集步骤

1. 收集得到的线虫, 用 M9 buffer 冲洗, 震荡 20min 以使其排空其肠道内容物。
2. 室温下约 1100g 离心 4min。
3. 弃上清液, 将得到的沉淀物用 M9 buffer 重悬。
4. 将悬浮液分装 1.5ml 离心管中室温下以 1100g, 离心 4 分钟, 将上清液吸出, 将沉淀物在液氮中冷冻。



5. -80°C 冰箱保存。

***注:**

- 1) M9 buffer 成分: 每升缓冲液中含 15.12g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (或 6g Na_2HPO_4), 3g KH_2PO_4 , 5g NaCl , 0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 宜现用现配。
- 2) 动物组织建议使用研磨管。

(五) 软体动物 (血吸虫、旋毛虫等) 采集步骤

1. 收集样本, 用预冷的 PBS 去除污染物。
2. 做好标记, 液氮速冻 5min 以上。
3. -80°C 保存。

***注:**

- 1) 动物组织建议使用研磨管。

(六) 组织样品的保存及运输

1. 保存:

- 1) 分装保存到-80°C, 避免反复冻融。
- 2) 随样品附带一份对应明细, 单独包装。

2. 样品的运输:

- 1) 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。
- 2) 运输前需确认密合度非常佳, 且以封口膜将盖口包装, 避免杂质混入或者液体溢出。
- 3) 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。



三、 液体样本

(一) 血清采集步骤

1. 用红盖采血管或促凝管收集血液，避免阳光直射（如不能短时间内进行分离，需先放入 4°C，至多 2h，进行分离）。
2. 红管采血管于 4°C/室温放置 30-60min，自然凝集。吸取上清至离心管中。
促凝采血管于 4°C/室温放置 5-15min。吸取上清至离心管中。
3. 4°C，1500-2000g，离心 3-5min（若没有低温离心机，常温离心机也可以）。
4. 取上清，加入蛋白酶抑制剂。
5. 进行多管分装。建议 100~200μl/管。
6. 液氮速冻 5min。
7. 短期存于离心管中或冻存管中，长期存于冻存管中。

***注：**

- 1) 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°C，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 2h。
- 2) 静置时可斜放采血管，增加血清析出面积。
- 3) 若取样对象为小鼠，离心条件为 1000-1500rpm，10-15min。
- 4) 若一次离心后效果不佳，可取离心后上清再次离心，第二次离心可采用高速离心。
- 5) 血清参考产率：30%~50%（例如：1 mL 全血大约能得 0.3~0.5 mL 血清）。
- 6) 因血清结冰时体积会增长约 10%，故管中要留有一定的体积空间。
- 7) 如发生溶血，建议重新取样。



试剂	可选厂家	货号	使用方法
蛋白酶抑制剂 (cOmplete,EDTA-free,EASYpack,20)	Roche	04693132001	该推荐蛋白酶抑制剂为片剂，需用水以 1: 50 对片剂进行溶解。再根据血浆体积加入，按样本总体积的 1/50 加入蛋白酶抑制剂。

(二) 血浆采集步骤

1. 用 EDTA 抗凝管采血（如不能短时间内进行分离，需先放入 4°C，至多 2h，进行分离）。
有条件的话首选 BD Vacutainer®蛋白质组学产品 BDTM P100 组件或 BDTM P800 采血管（含抗凝剂和蛋白酶抑制剂）。
2. 4°C，1600g，离心 10-15 min（若没有低温离心机，常温离心机也可以）。
3. 取上清，加入蛋白酶抑制剂。
4. 进行分装保存，建议 100~200µl/管。
5. 液氮速冻，5min。
6. 短期存于离心管中或冻存管中，长期存于冻存管中。

*注：

- 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°C，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 2h。
- 3) 离心时有条件可使用 4°C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。

试剂	可选厂家	货号	使用方法
蛋白酶抑制剂 (cOmplete,EDTA-free,EASYpack,20)	Roche	04693132001	该推荐蛋白酶抑制剂为片剂，需用水以 1: 50 对片剂进行溶解。再根据血浆体积加入，按样本总体积的 1/50 加入蛋白酶抑制剂。

(三) 乳汁、腹水采集步骤

1. 采集乳汁、腹水样本于离心管中。
2. 用进口离心管分装，建议 1-10ml/管。
3. 液氮速冻。
4. -80℃冻存。

*注：

- 1) 若要去掉样品中的高丰度酪蛋白，可以超速离心除去。

(四) 唾液采集步骤

1. 采集前 30 分钟漱口，禁食 2h 以上。建议上午 9-12 点取样。
2. 用舌尖抵住上颌或下颌齿根以富集唾液，向椭圆形漏斗中轻轻吐入唾液，直至液体唾液（非气泡）达到 2ml 填充线高度。
3. 取样本于离心管中，1000g~2000g，离心 5min。取上清。
4. 用进口离心管分装，建议 0.1-1ml/管，液氮速冻。
5. 存于-80℃。



(五) 泪液采集步骤

1. 使用毛细管微量移液管收集样品。
2. 4°C, 8000-14000g, 离心 5min。
3. 取上清, 液氮速冻。
4. -80°C保存。

(六) 痰液采集步骤

1. 采样前 12h 禁食。建议清晨取样, 痰量多, 含菌量亦大。
2. 取样前可先用洁口液, 再用凉开水或生理盐水漱口, 以除去口腔中细菌。
3. 深吸气后用力咳出 1-2 口痰于广口无菌瓶中。
4. 对痰液进行液化。用注射器将痰液来回抽提并打出, 使得痰液混匀。
5. 液氮速冻。
6. -80°C短期保存

***注:**

- 1) 痰量极少可用 45°C, 10%氯化钠溶液雾化吸入导痰。

(七) 脑脊液、淋巴液、关节液、穿刺液采集步骤

1. 需要专业人员进行采样, 样本置于 50ml 离心管中。
2. 吸取样本置小离心管中, 1000g-2000g, 离心 5min。
3. 取上清, 液氮速冻, -80°C保存。

***注:**

- 1) 吸取多次，分装保存。

(八) 尿液采集步骤

1. 采集尿液之前用中性肥皂水或者清水对尿道口周围进行清洁。
2. 取空腹晨尿、中段尿或晨间 1 h 尿（动物）于 50 mL 收集器皿中。
3. 收集后立即转移至 15ml 离心管中，1000-2000g 离心 10-15min，0.22 μ m 滤膜过滤，去掉沉淀颗粒。
4. 加入蛋白酶抑制剂。
5. 离心管分装，1ml/管。
6. 可在 4°C 保存不超过 8h，长期保存于 -80 °C。

试剂	可选厂家	货号	使用方法
蛋白酶抑制剂 (cOmplete, EDTA-free, EASYpack, 20)	Roche	04693132001	该推荐蛋白酶抑制剂为片剂，需用水以 1: 50 对片剂进行溶解。再根据血浆体积加入，按样本总体积的 1/50 加入蛋白酶抑制剂。

*注:

- 1) 建议在收集尿液 1 个月内启动项目，长期保存可能影响外泌体形态。
- 2) 注意避免细菌污染，收集前注意对饮食的控制。

(九) 液体样本的保存及运输

1. 保存:
 - 1) 离心管或冻存管应及时放进 -80°C 冰箱。



- 2) 用封口膜将管口进行封缠，防止低温导致管盖崩开，样本污染。
 - 3) 随样品附带一份对应明细，单独包装。
2. 样品的运输：
- 1) 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。
 - 2) 运输前需确认管盖密合度非常佳，且以封口膜将盖口包装，避免杂质混入或者液体溢出。
 - 3) 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。

四、 细胞样本

(一) 悬浮细胞采集步骤

1. 连同培养基转移到 15 mL 的进口离心管中。
2. (4°C) 400-1000g，离心 5-10min，使细胞沉淀于离心管的底部。
3. 倒掉培养基（尽量倒干净），用预冷的 PBS 反复冲洗 2 ~ 3 次。
4. 1 ml PBS 重悬细胞后转移到新的 1.5 ml 离心管。
5. 再次用上述条件离心，尽可能将上清去除干净。
6. 用适量 PBS 重悬，标记离心管，将离心管的尖端插入液氮中，淬灭细胞 1 min。
7. 存于-80°C。

***注：**

- 1) 转移前，可先将培养基反复吹打，吹打部分贴壁的悬浮细胞。
- 2) 操作尽量迅速，培养基尽量倒干净，如有滤纸，建议用滤纸将残留的培养基吸尽。
- 3) 液氮淬灭细胞时，请小心离心管质量，防止离心管破碎导致样本受损。



4) 取对数生长期，培养至同一时期的细胞，建议多准备样本，以备后续使用。

(二) 贴壁细胞采集步骤

1. 细胞在合适的培养基中培养至培养皿 70-90%的面积。
2. 小心弃掉培养液，并将培养皿倒置于吸水纸上尽量吸干培养液。
3. 加入 4℃预冷的 PBS 反复冲洗 2~3 次（若用移液枪加，则靠着培养皿壁加入，以免将细胞冲起），然后弃 PBS（建议用微量移液器少量多次吸尽残余 PBS）。
4. 将培养皿置于冰上，加入 PBS 重悬。
5. 收集到 15ml 离心管中，4℃，400-1000g 离心 5-10min，去 PBS。
6. 1ml PBS 重悬细胞后转移到 1.5ml 离心管。
7. 用液氮淬灭。
8. 存于 -80℃。

*注：

- 1) 取对数生长期，培养至同一时期的细胞，建议多准备样本，以备后续使用。
- 2) 贴壁细胞收集时如遇培养皿较大，1mL 试剂无法完全转移，建议加入最大试剂体积不超过 3mL。
- 3) 贴壁细胞的收集也可使用胰酶消化后，低速离心，去掉培养液上清，再使用 PBS 溶液清洗 1-2 次，弃掉 PBS 上清溶液，将收集好的细胞沉淀液氮淬灭后进行后续实验。

(三) 细胞样本的保存及运输

1. 保存：

- 1) 用封口膜将离心管的管口进行封缠，防止低温导致管盖崩开，样本污染。
- 2) 随样品附带一份对应明细，单独包装。



2. 样品的运输:

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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。

五、 微生物样本

(一) 菌体沉淀采集步骤

1. 连同培养基转移到进口的 15 ml 的离心管中。
2. 4°C, 3000-5000g 离心 10min, 使细菌沉淀于离心管的底部 (1*10⁸ 个细菌为宜), 倒掉培养基。
3. 用预冷的 PBS 溶液小心重悬清洗沉淀 3 次。
4. 4 °C , 3000-5000g 离心 10min , 弃上清。
5. 将离心管的尖端插入液氮中, 淬灭细菌 1 min。
6. 存于-80°C保存。

*注:

- 1) 适用于大肠杆菌、枯草杆菌、酿酒酵母菌、恶臭假单胞菌、酵母、棒杆菌属、单胞藻、运动发酵单胞菌、氧化葡萄糖酸杆菌等。
- 2) 培养基需尽量分离干净，避免培养基蛋白对菌的污染。

(二) 微生物培养液过滤法采集步骤

1. 培养好的菌液混匀后，取 10 mL 菌液于离心管中。



2. 用 0.22 μm 孔径的过滤膜进行快速抽滤，去除菌体。
3. 将滤液按 1 ml/管进行分装。
4. 液氮速冻。
5. 放入 -80°C 冰箱保存。

(三) 微生物培养液过滤法采集步骤

1. 培养好的菌液混匀后，取 1 ml 菌液于离心管中。
2. 3000 rpm, 4°C 离心 10 min, 取上清约 800 μl 于离心管中。
3. 液氮速冻。
4. 将离心管放入 -80°C 冰箱保存。

(四) 微生物样本的保存及运输

1. 保存：

- 1) 用封口膜将冻存管或离心管的管口进行封缠，防止低温导致管盖崩开，样本污染。
- 2) 随样品附带一份对应明细，单独包装。

2. 样品的运输：

- 1) 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。
- 2) 运输前需确认冻存管或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。
- 3) 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。

六、附录

(一) 样本采集保存容器

1. 采血管

耗材	可选厂家	货号
真空采血管	美国 BD	依据类型不同货号不同
真空采血管	威高洁瑞	依据类型不同货号不同



管盖颜色	可制备的标本类型	添加剂	要求
	血清/血凝块	无	抽血后不需要摇动
	全血/PBMC	EDTA、 NA_2EDTA 或 K_2EDTA	抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次
	全血/血细胞	109mmol/L 枸橼酸钠	抗凝剂与血液为 1: 4 混合, 抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次
	全血/血浆	109mmol/L 枸橼酸钠	抗凝剂与血液为 1: 9 混合, 抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次

	血清/血细胞	含促凝剂和分离胶	可将血球与血清快速很好的分开，减少影响实验的因素
	血浆/全血	肝素锂、肝素钠	抽血后立即颠倒混匀 5 次~8 次
	血浆/全血	血糖降解抑制剂	抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次

各种真空采血管头盖的颜色均为国际通用标准，试管上的标签有刻度线、取血量、有效期、内含添加剂物等说明。

2. 离心管 (1.5ml、2ml)

耗材	可选厂家	货号
1.5ml EP 管	Axygen	MCT-150-C
2ml EP 管	Axygen	MCT-200-C



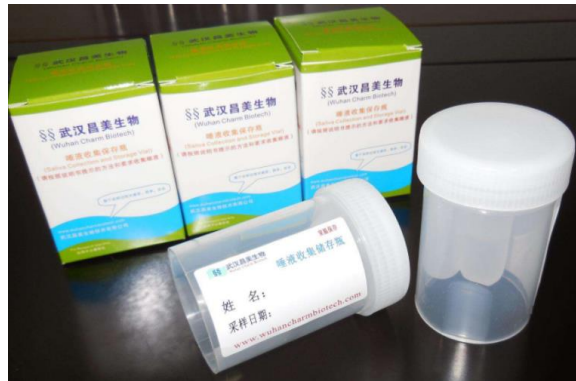
3. 离心管 (15ml、50ml)

耗材	可选厂家	货号
15ml 离心管	Solarbio	YA0476
50ml 离心管	Solarbio	YA0471



4. 唾液采集器

耗材	可选厂家	货号
Charm-Protect 唾液 DNA 收集保存瓶	武汉昌美生物	SV-100



5. 冻存管

耗材	可选厂家	货号
0.5ml 冻存管	Biologix	88-0050
1.5ml 冻存管	Biologix	88-9150



6. 尿液采集皿





(二) 常见不同规格培养瓶培养细胞量参考值

培养器皿	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量 (参考值)
250ml 玻璃培养瓶	78	15.0	2×10^7
100ml 玻璃培养瓶	37.5	10.0	6×10^6
25ml 玻璃培养瓶	19	4.0	3×10^6
75cm 塑料培养瓶	75	15-30	2×10^7
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	5×10^6

(三) 常见不同规格培养皿培养细胞量参考值

培养器皿规格	底面积 (cm ²)	加培养液量 (ml)	可获细胞量 (参考值)
96 孔板	0.32	0.1	1×10^5
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
4 孔板	28	5.0	7×10^6
3.5cm 培养皿	8	3.0	2.0×10^6
6cm 培养皿	21	5.0	5.2×10^6
9cm 培养皿	49	10.0	12.2×10^6
10cm 培养皿	55	10.0	13.7×10^6