



博淼生物  
BIO MIAO BIOLOGICAL  
— SINCE 2009 —

Your Own Laboratory  
您的专属实验室

## 转录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](http://www.biomiao.com)

邮箱：[marketing@biomiao.com](mailto:marketing@biomiao.com)



## 目录

一、	送样标准 .....	3
二、	白细胞沉淀 .....	3
	(一) TRizol 法白细胞样品采集步骤 .....	3
	(二) TRizol 法白细胞样品的保存及运输 .....	4
三、	PBMC 样品 .....	4
	(一) TRizol 法 PBMC 样品采集步骤 .....	4
	(二) TRizol 法 PBMC 样品的保存及运输 .....	5
四、	悬浮细胞 .....	6
	(一) 采集步骤 .....	6
	(二) 悬浮细胞的保存及运输 .....	6
五、	贴壁细胞 .....	7
	(一) 采集步骤 .....	7
	(二) 贴壁细胞的保存及运输 .....	8
六、	常规组织 .....	8
	(一) 液氮速冻法采集步骤 .....	8
	(二) RNA 保护剂采集步骤 (以 RNA later 为例) .....	9
	(三) TRizol 法采集步骤 .....	10
	(四) 常规动物组织的保存及运输 .....	10
七、	附录 .....	11
	(一) 样本采集保存容器 .....	11
	(二) 常见不同规格培养瓶培养细胞量参考值 .....	13
	(三) 常见不同规格培养皿培养细胞量参考值 .....	14

## 一、送样标准

样品类型	实验项目		
	表达谱芯片	转录组测序技术	靶向 RNA 定量技术
白细胞沉淀	1ml 全血分离的白细胞沉淀	1ml 全血分离的白细胞沉淀	1ml 全血分离的白细胞沉淀
PBMC	5-10mL 全血分离出的 PBMC	5-10mL 全血分离出的 PBMC	5-10mL 全血分离出的 PBMC
悬浮/ 贴壁细胞	$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$
组织	100mg (脂肪组织加倍)	100mg (脂肪组织加倍)	100mg (脂肪组织加倍)

## 二、白细胞沉淀

### (一) TRIzol 法白细胞样品采集步骤

试剂	可选厂家	货号
红细胞裂解液	天根生化科技(北京)有限公司	RT122
TRIzol™ Reagent (4°C预冷)	赛默飞	15596026

1. 取 10ml EDTA 抗凝管 (紫色头盖) 1 个, 采集 5 ml 新鲜血液。
2. 取 5 个无 RNA 酶的 5ml 管分别分装 1 ml 新鲜血液 (一管用于做转录组送样, 其他管用于备份和后续 qRT-PCR 定量实验验证), 分别加入 3ml 积红细胞裂解液, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 期间再颠倒混匀几次。
3. 10000rpm 离心 1 分钟 (若是离心机最高转速不允许, 可以 6000rpm 离心 3 分钟), 弃掉上清, 留下白细胞沉淀进行后续操作。
4. 向白细胞沉淀中, 加入 1ml 预冷的 TRIzol。反复震荡至白细胞沉淀溶解, 且没有絮状物。
5. 室温孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。

6. 液氮速冻。
7. -80℃冻存。

## (二) TRIzol 法白细胞样品的保存及运输

### 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。

## 三、 PBMC 样品

### (一) TRIzol 法 PBMC 样品采集步骤

试剂	可选厂家	货号
淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque PLUS	GE	17-1440-03
TRIzol™ Reagent (4℃预冷)	赛默飞	15596026

1. 取 10ml EDTA 抗凝管（紫色头盖）1 个，采集 10 ml 新鲜血液。
2. 取 2 个 15ml 离心管分别分装 5ml 淋巴细胞分离液。
3. 取 10ml 抗凝血与 10ml 无菌 PBS，按照 1:1 充分混匀，用移液管取 10ml 混合液沿管壁缓慢叠加于步骤 2 中的 15ml 离心管中的分离液上面，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为 1:1:1。剩余 10ml 加入另一个 15ml 管中，用于备份。

4. 离心 400g×30min。
5. 离心后，可见管内分为三层，上层为血浆和 PBS，下层为红细胞和粒细胞，中层为淋巴细胞分离液。在上、中层界面处有薄薄一层白色云雾状狭窄带，为 PBMC。
6. 去除部分上层液体（用 1ml 移液器吸取，不可倾倒），保留约 1ml 上层。用 1ml 移液器小心吸取云雾层，稍微吸到上、中层液体无碍。将云雾层置于新的 15ml 离心管中。
7. 向云雾层中加入 5 倍体积 PBS，离心 300g×10 分钟，弃上清。
8. 重复一次。
9. 向白色沉淀中加入 1ml 预冷的 TRIzol。反复震荡至白细胞沉淀溶解，且没有絮状物。
10. 室温孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。将液体转移到无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中。
11. 液氮速冻，-80 °C 冻存。

**\*注：**

- 1) 为保证分离效果，需将离心机升降速率调至最低。这样调整后，升降转速会比较慢，总体离心时间约 1 小时。

## (二) TRIzol 法 PBMC 样品的保存及运输

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、 悬浮细胞

### (一) 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 快速冲洗 1 次。
4. 每  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1ml TRIzol 试剂, 用枪头反复抽打细胞, 直至看不到成团的细胞块, 整个溶液呈清亮而不粘稠的状态。
5. 液氮速冻 5min, 转入 -80°C 保存。

**\*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) 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。
- 4) 不要保存于 RNAlater 一类组织 RNA 保护试剂中送样, 因为 RNAlater 密度较大, 保存于 RNAlater 中的细胞难于再离心收集用于提取, 损失大。

### (二) 悬浮细胞的保存及运输

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、贴壁细胞

### (一) 采集步骤

1. 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。
2. 加入 4℃ 预冷的 PBS 快速冲洗 1 次，按每 10cm<sup>2</sup> 培养面积（相当于六孔板一个孔或 35mm 直径培养皿）加 1ml TRIzol 试剂。
3. 用枪头反复吹打，使 TRIzol 接触所有长有细胞的培养皿表面，并进行充分消化。
4. 转移到 RNase-free 的 1.5ml 或 2ml 的离心管中。
5. 反复吹打至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮而不粘稠的状态。
6. 液氮速冻 5min，转入 -80℃ 保存。

#### \*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，进行后续实验。



- 4) 不要保存于 RNAlater 一类组织 RNA 保护试剂中送样，因为 RNAlater 密度较大，保存于 RNAlater 中的细胞难于再离心收集用于提取，损失大。

## (二) 贴壁细胞的保存及运输

### 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。

### 1. 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。

## 六、 常规组织

### (一) 液氮速冻法采集步骤

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. RNase-free 水配制 1×PBS 或生理盐水快速清洗组织表面的污渍，吸干表面液体。
3. 在冰上，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。
4. 收集进液氮**预冷**的带螺口的无酶冻存管（管的下部分保持在液氮中）。
5. 液氮速冻（≥1h）后，转移至-80℃保存，避免反复冻融。



\*注:

- 1) 组织样品离开活体后, 建议在 3 分钟内完成组织取样及液氮速冻, 处置时间长会导致样品降解。
- 2) 取好组织样后务必装入已经在液氮中预冷的 EP 管。
- 3) 样品离开活体/或者原来的生长环境后, 样品中的内源酶即会开始降解 RNA, 降解速度与内源酶含量及温度有关。(抑制内源酶活性的方法: A.立即加入裂解液, 并彻底而迅速震荡裂解; B.切成小块后立即投入液氮冷冻。这两个办法都要求操作快速。前者只适合细胞; 后者适合所有的样品。通常情况, 肝脏、胸腺、胰腺、脾脏、脑、脂肪、肌肉组织推荐选择后者。)

## (二) RNA 保护剂采集步骤 (以 RNA later 为例)

动物组织样品如果使用 RNAlater 一类商业组织 RNA 保护试剂保存组织样品, 请严格按照相关产品的说明书进行操作, 取材时使组织块保持在试剂盒要求的大小范围, 以保证试剂充分渗透, 以免引起降解。以下步骤为示例。

试剂	可选厂家	货号
RNAlater™	Invitrogen	AM7020

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. RNase-free 水配制 1 × PBS 或生理盐水快速清洗组织表面的污渍, 吸干表面液体。
3. 在冰上, 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。
4. 按比例加入 RNAlater 中 (以 Invitrogen 品牌货号 AM7020 的 RNAlater 为例, 需要将组织切割成小于各维度均小于 0.5cm, 加入小于 5 倍体积 RNAlater 保存液)。
5. 将样本置于 4°C 保存过夜 (使 RNAlater 完全渗透组织)。
6. 转移至-80°C长期保存。

\*注:



- 1) 肿瘤组织样本可优先选用 RNAlater。
- 2) 组织用于 RNA 会在 5 年后出现降解。
- 3) 为避免组织块在运输的过程中露出液面，应将 RNA later 灌满管子。
- 4) 不推荐把样品不速冻直接放冰箱，这种方式降温速度不够，会引起部分 RNA 降解。

### (三) TRIzol 法采集步骤

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. RNase-free 水配制 1 × PBS 或生理盐水快速清洗组织表面的污渍，吸干表面液体。
3. 在冰上，用灭菌的组织剪或手术刀将组织切成 100mg 左右小块。
4. 用液氮进行研磨破碎，溶于 TRIzol 中。（参考用量为 20-50mg/mL TRIzol）
5. 室温裂解 10min。转入-80℃保存。

**\*注：**

- 1) 组织样品切勿过量，组织块大小 0.2cm-0.3cm（绿豆粒大小），避免组织块较大，裂解不充分，且在融化过程中发生内源降解。
- 2) 室温裂解 10min 后，再-80 低温冻存，防止裂解不充分发生降解。

### (四) 常规动物组织的保存及运输

1. 保存：

- 1) 用封口膜将冻存管的管口进行封缠，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。

**\*注：**

1) 组织用于 RNA 会在 5 年后出现降解。

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封度非常佳，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。

## 七、 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 <sub>2</sub> EDTA 或 K <sub>2</sub> EDTA	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. 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



#### (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 <sup>2</sup> )	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 <sup>7</sup>
100ml 玻璃培养瓶	37.5	10.0	6×10 <sup>6</sup>
25ml 玻璃培养瓶	19	4.0	3×10 <sup>6</sup>



75cm 塑料培养瓶	75	15-30	$2 \times 10^7$
25cm 塑料培养瓶	25	5.0	$5 \times 10^6$

### (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 <sup>2</sup> )	加培养液量 (ml)	可获细胞量 (参考值)
96 孔板	0.32	0.1	$1 \times 10^5$
24 孔板	2	1.0	$5 \times 10^5$
12 孔板	4.5	2.0	$1 \times 10^6$
6 孔板	9.6	2.5	$2.5 \times 10^6$
4 孔板	28	5.0	$7 \times 10^6$
3.5cm 培养皿	8	3.0	$2.0 \times 10^6$
6cm 培养皿	21	5.0	$5.2 \times 10^6$
9cm 培养皿	49	10.0	$12.2 \times 10^6$
10cm 培养皿	55	10.0	$13.7 \times 10^6$