高通量测序样品制备

 **一、样品制备的基本原则**

代表性原则：取样的代表性直接关系到实验结果的最后解释和后续分析的的准确性和科学性。实验样品取样，包括样品类型，取样的操作流程，实验分组的设定。基本要求实验处理组和对照组的样品在取材方式和处理条件等方面尽可能保持一致，否则可能会影响实验结果的重复性和可信度。

准确性原则：取样的准确性直接关系到实验结果的科学意义。所有样品取材必须被准确记录，并按要求（低温、迅速）采集、制备、贮存、运输，最终正确地按实验设计进行实验和数据处理，以减少外界因素对样品影响，保证最后的实验结果能够真实的反应样品的状态。

低温原则：所取样本离体后，应立即置于液氮中，并保证在实验前始终处于-70℃以下，以避免RNA的降解。

规范性原则：实验过程包括样品收集、贮存、运输以及后续处理是决定芯片实验结果的稳定性和可信度的关键因素，因此必须制订和严格执行规范化芯片样品的制备规范操作流程。

**二、高通量测序Total RNA和DNA用量标准**

**1、高通量测序DNA用量标准**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **测序类型** | **样品类型** | **质检结果** |
| **总量** | **浓度** | **电泳图** |
| 全基因组测序 | 基因组DNA | m≥6ug | c≥30ng/μl | 电泳检测无明显RNA条带，基因组条带清晰、完整 |
| 外显子测序 | 基因组DNA | m≥6ug | c≥30ng/μl | 电泳检测无明显RNA条带，基因组条带清晰、完整 |
| 甲基化测序 | 基因组DNA | m≥10ug | c≥50ng/μl | 电泳检测无明显RNA条带，基因组条带清晰、完整 |
| ChIP-Seq | Chip样品 | m≥20ng | - | 主峰在100bp-500bp之间（Agilent 2200检测） |

**注意事项**：

1）总量不足或浓度过低：可能文库构建失败；可能文库产量低不能上机测序或测序数据量不足；可能影响文库随机性、数据覆盖度可能偏低；ChIP样品可能存在adapter污染率偏高。

2）DNA定量： NanoDrop定量结果只会作为参考而不会用于总量计算，因为NanoDrop是基于紫外吸收峰OD值进行定量，包括DNA、RNA、蛋白质、盐离子或其他有机物质等在260nm均有一定吸收值，容易造成读数偏高，NanoDrop或分光光度计等结果可能比Qubit定量高出2-10倍；而Qubit定量是通过特异性结合到双链DNA的荧光染料进行定量，定量结果更为准确，最后定量以Qubit定量结果为准。

3）样品进行检测时最少需要消耗1-2μl样品，建议样品体积大于10μl。

4）DNA样品应尽量避免多糖、蛋白质和外切酶的残留；样品必须注明溶剂成分。

**2、高通量测序Total RNA用量标准**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **测序类型** | **样品类型** | **质检结果** |
| **总量** | **浓度** | **电泳图** |
| **RNA-Seq** | 植物、真菌 Total RNA | m≥10ug | c≥200ng/μl，RIN≥6.5，28S/18S≥1.0 | 图谱基线无上抬；5S峰正常；无DNA或杂质污染。 |
| 人、鼠 Total RNA | m≥6ug | c≥80ng/μl，RIN≥7.0，28S/18S≥1.0 |

|  |
| --- |
| 图谱基线无上抬；5S峰正常；无DNA或杂质污染。  |

 |
| 其他动物 Total RNA | m≥10ug | c≥200ng/μl，RIN≥7.0，28S/18S≥1.0 | 图谱基线无上抬；5S峰正常；无DNA或杂质污染。 |
| oligo(dT)纯化的mRNA，去rRNA的RNA | m≥0.2ug | c≥15ng/μl，rRNA<10% | 片段主要分布在1K以上 |
| **小RNA测序** | 真核生物Total RNA | m≥10ug | c≥300ng/μl，RIN≥8.0，28S/18S≥1.5 | 图谱基线无上抬；5S峰正常；无DNA或杂质污染。 |
| Small RNA（＜200nt） | m≥2μg | c≥200 ng/μl | - |

**注意事项**：

1) RNA总量不足或过低：可能导致文库构建失败、文库产量低不能上机测序；可能导致RNA-Seq数据duplication比例高，随机性差。

2) 降解样品：可能导致建库失败；可能导致RNA-Seq数据duplication比例高，随机性差；可能导致Small RNA rRNA污染比例高，影响有效数据。

3) Small RNA含量低：部分样品total RNA达到要求，但是由于样品特异性，small RNA含量远远低于正常样品（如培养细胞等），可能导致建库失败。

4) Small RNA（<200nt）样品：无法判断RNA的完整性，对样品中降解的rRNA/tRNA比例无法预估，文库中可能rRNA/tRNA污染比例高，严重影响有效数据。

5) 蛋白或其他不溶杂质污染：可能影响RNA-Seq过程中磁珠分离mRNA及反转录效率，导致建库失败。

6) “去rRNA样品”中仍残留有rRNA：可能导致rRNA比例高，有效数据偏少。

7) cDNA，mRNA样品：很难检测RNA完整性，质量无法保证。

**三、组织样本制备**

**3.1 DNA组织及血液样品标准**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **样本类型** | **全基因组测序** | **外显子测序** | **甲基化测序** |
| 新鲜动物组织干重 | ≥250mg | ≥250mg | 1g |
| 新鲜植物组织干重 | ≥1g | ≥1g | 1g |
| 培养细胞数量 | ≥8×106个 | ≥8×106个 | ≥9×106个 |
| 全血 | ≥2ml | ≥2ml | ≥5ml |

**3.2 DNA组织样品采集方法**

3.2.1 **植物组织 ：**大田或野外获取的材料，取材后需用70%酒精将材料表面的灰尘及泥土冲洗干净，吸干， 液氮速冻后，放入预冷的50ml离心管或是封口袋中，干冰运输，保证开箱检验时有足够的干冰剩余。

3.2.2 **动物组织 ：**准备好用于包装样品的铝箔或冷冻保存管，并且用油性记号笔在铝箔或冻存管外表多处写明样品编号；活体取材后的组织用RNase-free 的0.9％生理盐水中漂洗样品，去除血渍和污物，并剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型，吸干，并将样品分割成50mg左右的小块（组织块越小，保存效果越好），放入铝箔或冷冻保存管中，液氮速冻后用封口膜封口，再将冷冻保存管放置于50ml离心管中或封口袋中，干冰运输，保证在收到样品开箱检验时有足够的干冰剩余。

3.2.3**血液 ：**要求为全血样本，并加入抗凝剂，推荐使用 EDTA 抗凝的采血管收集样品（由于会影响实验，不能使用肝素抗凝），冷冻后，干冰运输送样。

3.2.4 **离体培养细胞 ：**贴壁细胞或悬浮细胞培养结束后，去除培养液；用PBS 缓冲液快速洗一次，除去PBS 缓冲液，贴壁细胞可用细胞刮将其刮下；收集的细胞转入1.5 ml的EP管中用液氮速冻后，干冰运输。

**注意事项**：

1) 对肿瘤组织的取材，应尽可能准确地判定肿瘤组织和正常组织；

2) 用于DNA抽提的样品制备处理及切割过程应在冰上尽可能快速进行，时间过长会导致样品DNA降解 。

3) 在临床手术过程中采集的病理或正常样品，如果没有条件立即从手术室中取出进行后续处理，应在切除后立即转移到液氮中保存。

**3.3 RNA组织及血液样品标准**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样本类型** | **小RNA测序** | **RNA-Seq** |
| 新鲜动物组织干重 | 250mg | 250mg |
| 新鲜植物组织干重 | 1g | 1g |
| 新鲜培养细胞数 | 3-5×106个 | 3-5×106个 |
| 全血 | 2.5ml以上 | 2.5ml以上 |

**3.4 RNA组织样品采集方法**

3.4.1 **植物组织** ：大田或野外获取的材料，取材后需用DEPC-H2O将材料表面的灰尘及泥土冲洗干净，吸干，并将样品分割成100mg左右的小块放入1.5ml或者2.0ml的RNase-free的EP 管中，加入RNAlater或类似的RNA组织保存试剂，并严格按照使用说明进行操作。如蜡表皮的叶组织可能需要先破坏其屏障，以允许RNAlater 进入组织，液氮速冻后用封口膜封口，再将EP管放置于50ml 离心管中或密封性好的小塑料袋中，干冰运输，保证收到样品时有足够的干冰剩余。

3.4.2 **动物组织** ：活体取材后的组织需迅速用RNase-free 的0.9％生理盐水漂洗，以去除血渍和污物，并剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型，吸干，并将样品分割成50mg左右的小块（组织块越小，保存效果越好），放入1.5ml 或者2.0ml的RNase-free 的EP 管中，并加入RNAlater 一类的RNA 组织保存试剂，液氮速冻后用封口膜封口，再将EP 管放置于50ml 离心管中或密封性好的小塑料袋中，用干冰运输，保证收到样品时有足够的干冰剩余。

微量样本建议浸入液氮冷冻后，在有液氮保护下将组织研磨成粉末并加入足量的裂解液裂解，参考用量为60mg/ml Trizol，常温裂解5min后，大体积干冰运输。

3.4.3**贴壁细胞 ：**

1. 贴壁细胞培养或处理结束后，去除培养液；

2. 按每10 cm2 培养面积加1 mL Trizol 试剂的比例加入Trizol 试剂；

3. 用1 mL枪头反复吹打, 使Trizol接触所有长有细胞的培养瓶表面进行充分消化；

4. 转移到RNase-free 的试管中用一次性注射器进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块，整个溶液应该为清亮而且不粘稠的状态；

5. 放入干冰运输或-80℃冰箱中保存。

3.4.4**悬浮细胞 ：**

1. 悬浮细胞培养或处理结束后，去除培养液；

2. 保留的细胞用PBS 缓冲液快速洗一次，离心除去PBS 缓冲液；

3. 按照每5×106 个细胞加1 mL Trizol 的比例加入Trizol 试剂，用一次性注射器进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮而不粘稠的状态；

4. 放入干冰运输或-80℃冰箱中保存。

3.4.5**血液：**

1. 在已加入EDTA的新鲜全血中加入等体积PBS（1×），充分混匀；

2. 缓慢转入另一已加入淋巴细胞分离液的离心管中，并使上述混合液处于淋巴细胞分离液液面之上（即两种液体不要混合，保留清晰的界面），3000 g 离心30 min；

3. 用移液枪小心分离出白细胞层；用PBS（1×）清洗白细胞，离心回收白细胞，弃去上清；

4. 加入白细胞20倍体积的Trizol 试剂，用一次性注射器或移液器进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮而不粘稠的状态；

5. 放入干冰或-80℃冰箱中保存。

**血液特殊处理：**全血样品要求客户在新鲜样品时加入全血3倍体积的Trizol LS裂解液混匀后裂解后放-80℃保存，干冰运输，以防止RNA降解；

**血清样品处理：**全血样品收集后，马上离心收集血清，然后在血清中加入血清3倍体积的Trizol LS，混匀后-80℃保存，用干冰运输

**注意事项：**

组织量不足：RNA产量低，未达到建库要求的起始量，文库建库可能失败。特别是植物类组织，由于植物叶片、果实、块根或根茎含有高浓度的多糖多酚物质，以及其他复杂的未知成分，提取难度较大，因此送样量必须保证。

反复冻融的组织：RNA降解的概率在80%以上，RNA几乎不可能提取成功，RNA的质量难以满足建库要求，此类组织不建议送样。尤其针对动物肝脏、脾脏、胰腺、肾脏、心脏、脂肪、大脑组织或肿瘤组织等一类RNase活跃的组织。

长年保存的组织：组织样本保存时间超过一年或以上，RNA提取风险加大，RNA质量较差，不建议送样。

离体组织：动植物类组织，如植物老根、果实等，动物肝脏、脂肪、脑组织等，这类组织RNase非常活跃，组织部位离体后，务必在半分钟内将离体组织用液氮速冻，放入-80℃冰箱中保存，或液氮下切割成2-3mm厚的小块，浸入RNAlater保护试剂保存。如果组织离体超过1分钟未进行处理，则活跃的RNase很可能以惊人的速度降解RNA，RNA的质量难以保持。

全血类：为保证提取成功率，客户做好淋巴细胞分离工作，并加入 Trizol裂解液保存再送样。如果分离淋巴细胞条件不允许，也请将新鲜收集的全血以约60ul的量装入RNAprotect® Animal Blood Tubes（100μl）（QIAGEN公司）。如果以上三种全血样品保存方法均难以做到，请客户自行提取。如果客户坚持送样，由客户承担责任和提取风险。

困难样品：多糖多酚含量异常高的植物老根、成熟米粒、花粉、花蕾、种子、青稞、草莓果实、松树、藻类、棉花组织、菌类，成分异常复杂的肿瘤组织。鉴于此类样品提取方法不成熟，为免来回送样影响研究进度，暂不接收RNA提取工作，请客户自行提取。如果客户坚持送样，由客户承担责任和提取风险。

**四、样品储存与运输**

**样品储存**

 组织样品储存于液氮或超低温冰箱中。RNA样品储存于超低温冰箱中，在-20℃冰箱保存时间不宜太久。细胞样品经Trizol处理后储存于超低温冰箱中。在-20℃冰箱中储存不宜太久。血液样品分离白细胞后用Trizol处理，然后储存于超低温冰箱中。

样品运输 ：样品运输建议采取液氮或干冰保存下的超低温运输。

**液氮运输**

1、液氮运输最好在人员监护下进行。长途应采用液氮罐，短途可采用保温杯。应保证液氮足够，以免运输过程中液氮挥发掉，影响材料质量。

2、液氮罐口较为狭小，所以放入的物品不易过大，以免无法取出。最好将样品放入编过号的冻存管中，再根据不同类别放入合适的小布袋，用线绳栓住，线绳另一端用布条做标记，拴在罐口提手上，以方便取出和分辨。

3、冻存管应用进口高质量的冻存管，放入液氮前应拧紧，以免取出时发生炸裂伤人。

**干冰运输**

 干冰运输应采用壁厚且质量完好的泡沫箱，材料用编号后的冻存管存放，用塑料袋包装后埋入干冰中，泡沫箱应扣严并用封箱带密封力求严密。外套纸箱包装，以免碰裂。并标明轻取轻放提示，以保证安全运输。

 干冰运输可委托当地快递公司，注意一定要确保48小时送达，不能送货上门的应提前通知。 ２４小时到达的，干冰数量不得低于５公斤；４８小时到达的，干冰数量不得低于８公斤。夏季可以适当再多增加部分干冰（平时的1.5倍）。

 如果干冰不能填满泡沫盒子，可用泡沫或棉花填充，运输时也可在干冰上再放一排液体冰带。

 运输过程中应随时跟踪货物的情况，记录快递单号，并保持与发出地和接收地的快递公司的联系。

**RNA运输**

 RNA运输须经乙醇(两倍体积)或异丙醇(等体积)沉淀,沉淀后的ＲＮＡ，可以用低温冰袋冰盒运输，但时间也不易太久，以24小时为限。未经沉淀的RNA应用干冰或液氮运输。

**细胞及血液运输**

 细胞短距离可３７度培养瓶（细胞培养液）运输（24小时内）。长途运输可以Trizol处理后干冰运输。

 血液当地短距离可以加入抗凝剂（或直接用抗凝管乘后）后冰块运输（2小时内），长途运输可先分离白细胞，Trizol处理后干冰运输。

**五、样品接收程序**

1、客户与公司签订委托服务合同并付预付款后，将符合要求的样品（附样品送样单）直接或委托销售人员送至本公司实验中心。

2、实验中心收到样品后，立即登记。

3、在接收样品时，将检查运输包装中液氮、干冰等量是否足以保持样品稳定、实际样品数目与样品送样单中的记录样品数目是否相符、样品登记单填写是否完整。

4、接收样品后，将在规定的工作时间内完成核酸提取而后送质量部进行质检。质量部质检后，将出具质检报告。在规定的工作日内向客户提供质检报告。

5、质检合格的样品，实验中心在规定的工作日内完成后续实验。