

微生物基因组项目样品准备、储存及运输指南
目录

一、前言	1
1. 适用范围	1
2. 声明	1
3. 提取风险提示	1
二、样本准备前注意事项	1
1. 取样的代表性	1
2. 取样的准确性	1
3. 取样的重复性	1
4. 取样的及时性	2
5. 取样的低温性	2
三、组织样送样量要求	2
1.二代宏基因组	2
2.二代细菌真菌	3
3.三代宏基因组	3
4.三代细菌真菌	3
四、核酸送样要求	4
1.送样要求	4
2 核酸送样要求	5
五、样本制备保存指南	6
1.1 细菌	6
1.2 真菌	7
1.3 核酸样本	8
1.4 土壤样本	8
1.5 淤泥样品	9
1.6 水体样品	9
1.7 物体表面微生物样品	10
1.8 粪便样品	10
1.9 肠道内容物样品	10
1.10 医学微生物样本	11

1.11 瘤胃液样本.....	11
六、包装、运输等注意事项.....	12
1 样品命名、包装、标识.....	12
1.1 样品命名.....	12
1.2 样品包装.....	12
1.3 样品标识.....	12

百迈客生物科技有限公司

一、前言

1. 适用范围

本指南介绍百迈客微生物基因组常规产品组织样品的送样要求及制备方法。采集送样前请仔细阅读。

2. 声明

对于危害程度为第一、二类的高致病性样品，只接收提取后的核酸样品，不接收组织样。对于危害程度为三、四类的致病性或传染性的组织样，必须先通过销售或运营与实验平台负责人沟通，确认无高致病和传染性且能进行后续实验后再安排样品寄送。危害程度的判定标准具体参见《人间传染的病原微生物名录》。

3. 提取风险提示

核酸提取质量与物种及组织部位、样本制备、样本交接、提取方法与操作、以及环境等因素息息相关，故无法完全保证提取质量，望老师知悉理解，并做好组织备份。为保障获得相对较高质量的核酸，请老师务必按照以下指导原则准备样本。

二、样本准备前注意事项

1. 取样的代表性

所采集的样本应该通过严格的细胞学、组织学、病理学等相关鉴定，因为这关系到实验最终结果是否具有科学意义，所以客户须根据实验目的设计相关科学取样方案和取样步骤。

2. 取样的准确性

正常组织样本中不能含有病变组织，而病理组织样本中也不可以夹带有正常组织。在条件允许的前提下，争取做到实验组与对照组的样本在取材时间、部位、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。代表性样本的各种特征数据必须被准确记录，并按要求采集、制备、储存、运输进行实验处理。

3. 取样的重复性

生物学重复的取样应尽量减少重复间样品的差异。在条件允许的前提下，做到重复样本在取材时间、部位、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。

4. 取样的及时性

样本质量是影响实验结果的最关键因素，因此用于研究的实验样本，在采集、贮存、运输和制备的过程中尽可能地做到迅速，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。

5. 取样的低温性

所取样本离体后，经快速清洗和标记等处理后，应立即投入液氮中速冻至少 3 h，之后保存于-80 °C 冰箱或者干冰中，确保在实验操作前样品始终处于-80 °C，以避免 RNA 的降解。

三、组织样送样量要求

1. 二代宏基因组

组织类型	二代宏基因组	组织类型	二代宏基因组
土壤	1~2g	生物膜	有明显痕迹滤膜 1~2 张
淤泥	2~3g	植物内生菌	2~3g
肠道内容物	0.5~2g	牙菌斑	0.5~1g
昆虫肠道内容物	0.5~2g	水体	富集沉淀物 0.5~1g/有明显痕迹的滤膜 1~2 张
植物表面	富集沉淀物 0.5~1g	发酵液	富集沉淀物 0.2~0.5g
粪便（大型动物）	0.5~2g	唾液	≥1ml
粪便（鼠）	4~6 粒	沉积物	2~3g
灌洗液	富集沉淀物 0.5~1g/有明显痕迹的滤膜 1~2 张	砂石，干土	过 20 目以上筛后 1~2g
拭子	有明显擦痕迹拭子 4~6 个	肌肉	≥1g
表面微生物	富集沉淀物 0.5~1g/有明显痕迹的滤膜 1~2 张	血液	≥1ml

2. 二代细菌真菌

组织类型	二代
大型真菌	≥2g
单细胞真菌	$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 或 ≥1g
细菌	≥0.3g

3. 三代宏基因组

产品类型 组织类型	宏基因组 ONT	宏基因组 PB
	土壤	≥5g
粪便(干重)	≥3g	≥5g

4. 三代细菌真菌

产品类型 组织类型	ONT-细菌/真菌基因组	PB-细菌/真菌基因组
	细菌(菌体)	$\geq 3.5 \times 10^{10}$ 或 ≥0.5g
单细胞真菌	$\geq 5 \times 10^9$ 或 ≥3.0g	$\geq 5 \times 10^9$ 或 ≥3.0g
大型真菌	≥5g	≥10g

* 注：不同类型的组织样品，DNA 的提取得率差别较大，含肌纤维细胞丰富的肌肉组织以及含糖多酚较高的复杂植物，DNA 得率会受到影响。真菌的细胞有含甲壳素（又叫几丁质）为主要成分的细胞壁，提取难度较大，建议尽量多准备一些样品。

四、核酸送样要求

1.送样要求

1.1 术语及定义

本文件使用了以下术语:

1.1.1 检测项目:

m: 总量 (Total quantity), DNA 的总质量

c: 浓度 (Concentration), DNA 溶液的 Qubit 检测浓度

N/Q: Nanodrop 检测浓度与 Qubit 检测浓度的比值

Size: 片段大小 (Fragment size), 指 DNA 分子片段主带大小

OD260/280: Nanodrop 检测中 OD260 和 OD280 的比值, 反映 DNA 纯度的指标之一

OD260/230: Nanodrop 检测中 OD260 和 OD230 的比值, 反映 DNA 纯度的指标之一

1.1.2 样品质量检测方法:

Nanodrop: 使用 Thermo Fisher NanoDrop 2000/8000 Spectrophotometer 进行检测的方法

Qubit: 使用 Invitrogen Qubit Fluorometer 进行检测的方法

AGE: Agarose Gel Electrophoresis 即使用琼脂糖凝胶电泳进行检测的方法

1.2 DNA 样品送样量要求

请提供 DNA 样品的相关检测结果, 例如以下检测手段中的一种或多种检测结果: Qubit、NanoDrop、AGE。请采取适当的纯化方法, 以避免多糖、多酚、蛋白或者核酸酶对 DNA 样品的污染, 并详细注明溶解 DNA 所使用的溶解液类型。

检测结果说明: level A: A 类样品, 指纯度、片段大小和浓度均合格, 总量满足按数据量计算总量要求的样品。

level B: B 类样品, 指纯度、片段大小和浓度均合格, 总量不完全满足按数据量计算总量要求的样品。

level C: 质量不完全满足建库要求, 可以风险建库但不保证文库大小与测序数据量的样品。

level D: 质量完全不满足建库测序要求, 不建议使用的样品。

请您按照上述 A 类样品的要求来准备 DNA 样品以确保后续建库测序能够正常进行。如果您准备的 DNA 样品不能满足 A 类样品指标要求, 并且后续不能提供更多的 DNA 样品, 需要提前联系销售人员进行咨询。

2 核酸送样要求

产品类型	Level	c(ng/uL)Qubit	m(ng)	污染情况	降解情况	判断方法	外观	
二代宏基因组 细菌 真菌	A	≥1	≥100	主带清晰、主带不清晰	无、有降解可用(主要弥散在 Marker 2Kb 以上)	合格, 质量满足建库要求, 总量满足3次及以上建库要求	透明无色 不粘稠	
	B	≥1	≥30	主带清晰、主带不清晰	无、有降解可用(主要弥散在 Marker 2Kb 以上)	质量满足建库要求, 总量不足三次建库	透明无色 不粘稠	
	C	≥0.5	10-30	跳带、或严重锯齿状、或“H”形或下方有非常严重的非RNA样弥散等	严重降解(主要弥散在 Marker 2Kb 以下)	样品浓度、总量、纯度或完整性不满足建库测序要求, 可以风险建库但不保证满足合同要求的样品	有颜色粘稠	
	D	—	<10	—	严重降解(主要弥散在 Marker 2Kb 以下)	样品质量完全不满足建库测序要求, 不建议使用的样品	—	
产品类型	Level	c(ng/uL)	m(ug)	OD260/280	OD260/30	AGE	N/Q	外观
ONT-细菌/ 真菌基因组/ 宏基因组	A	≥40	≥4	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>5K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	B	≥40	≥2	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>5K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	C	≥40	0.8~2	-	-	完整性和纯度等指标不完全满足建库要求	>2.5	正常 颜色异常
	D	<40	<0.8	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	-	粘稠 沉淀物

PB-细菌/真菌基因组	A	≥40	2ug/1G, 低于2G 按 4ug	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>5K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	B	≥40	1ug/1G, 低于2G 按 2ug	1.7-2.2	≥1.5	降解条带>5K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	C	≥40	1ug/1G	-	-	降解条带>3K, 中度杂质污染	>2.5	正常 颜色异常
	D	<40	<0.8ug/1G	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	-	粘稠 沉淀物
PB 宏基因组 (revio)	A	≥50	20ug/cell/70G	1.7-2.2	1.8-2.5	降解条带>5K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	B	≥50	10ug/cell/70G	1.7-2.2	1.8-2.5	降解条带>5K, 点样孔无或有轻微污染	0.8-2.5	正常
	C	≥50	10ug/cell/70G	-	-	降解条带>3K, 中度杂质污染	-	正常 颜色异常
	D	<50	<10	<1.0, 或>3.0	<1.0, 或>3.0	明显降解, 点样孔严重污染	-	粘稠 沉淀物

* 注: 以上核算要求是指核酸质检后标准, 实际送样需多送一点包含核酸质检用量

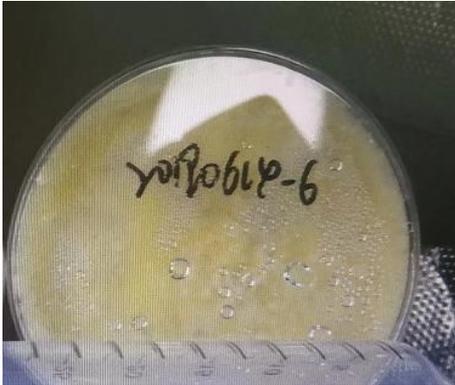
五、样本制备保存指南

1.1 细菌

注意: 所有菌类样品必须分离好菌体或菌丝送样, 切勿连带培养基一起寄送, 带培养基的菌体无法提取。

- 1) 显微镜下观察细菌生长状态, 最好收集生长期处于对数期的细菌。
- 2) 将适量体积的菌液转移至 2 mL 旋盖尖底离心管 (无菌, 无核酸酶) 中, 于室温下 14000 ×g 离心 1 min。

- 3) 弃掉培养基，将细菌菌体沉淀迅速置于液氮中冷冻 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后转移至-80 °C 长期保存。
- 4) 将样品管置于管架上固定好后埋在干冰箱的中间部位，大体积干冰运输。



不规范培养皿送样



规范菌体送样

1.2 真菌

真菌的形态多样，一般分为单细胞和多细胞真菌，酵母菌属于单细胞真菌，而霉菌和蕈菌（大型真菌）都属于多细胞的真菌。

1.2.1 单细胞真菌

单细胞真菌以酵母菌为代表。一次提取反应所需酵母菌的量需 $\leq 1 \times 10^7$ 个，以 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个为宜。您要做的项目要求送样量较大时，可以将样品按上述数量要求分装后单独保存。

- 1) 显微镜下观察酵母菌生长状态，最好收集生长期处于对数期的酵母菌。
- 2) 将适量体积的酵母菌液转移至将 2 mL 旋盖尖底离心管中（无菌，无核酸酶），于室温下 $14000 \times g$ 离心 1 min。
- 3) 弃尽培养基，将酵母细胞沉淀迅速置于液氮中冷冻 1-3 h 以上（冻存时间视组织量而定，保证样品冻存充分），然后转移至-80 °C 长期保存。
- 4) 将样品管置于管架上固定好后埋在干冰箱的中间部位，大体积干冰运输。

1.2.2 大型真菌

大型真菌因种属差异，生长形态差异很大。在制备大型真菌样品时，可参考植物组织制备方法。

- 1) 用 70%酒精将材料表面的灰尘及泥土冲洗干净，吸干，再从植物体上取下新鲜组织

- 2) 液氮冻存前将样品分割成 50~100 mg 左右的小块，处理好的组织样本混合均匀后保存于提前标记编号，液氮预冷的 2 mL 或更大体积的**旋盖冻存管**中，根据组织样本量选择核酸冻存管。

迅速置于液氮中冷冻 1~2 h，然后按照顺序依次放入样品盒或者按照一定的规律（例如 1-10,11-20 等）装于自封袋中，转移至-80 °C 长期保存（禁止乱放，尤其是项目中样品个数较多时）；干冰运输。

1.3 核酸样本

- 1) 第一种方案是提取完成后的 DNA 溶液直接放入-20 °C 冰箱中进行保存；第二种方案是采用醋酸钠乙醇沉淀法沉淀 DNA，并且将样品直接放入-20 °C 冰箱中进行保存；第三种方案是向沉淀后的 DNA 固体中直接加入 1 mL75 %的无水乙醇，并且将样品直接放入-30 °C 冰箱中进行保存；第四种方案是提取完成后的 DNA 样品使用低温冷冻仪冷冻成干粉（可常温运输）

注：推荐用第一种方案

- 2) 样品运送前保存在-20 °C 冰箱，干冰运输

1.4 土壤样本

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点
- 2) 除去土壤表层未分解的凋落物层，用已灭菌的刀或铲去除表层 5cm 的土壤，挖取地下 5~20cm 的土层，多点样本均匀混合（注意保留适当空间），标明采样地点，深度、日期等信息；
- 3) 去除可见杂质后，土壤过 **20 目-60 目筛网**，分装至 2mL 或更大体积的 EP 管或冻存管中；
每管土壤含量大概 0.25~0.5g，需保证送样量在 1~2g，若土壤含微生物较少，需增加送样量；
- 4) 未分装样本 4 °C 保存时间不要超过一个月，分装后样本-80 °C 或液氮中长期保存；
- 5) 运送方式：4 °C 保存样品冰袋运输，-80 °C 或液氮干冰运输；

*注：实验室没有过筛工具，老师需过筛后送样，如果送的组织样本中有植物残渣等，取样时会反馈并尽量避免但不能完全保证不取到植物残渣。



不规范塑封袋送样



规范送样

1.5 淤泥样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点
- 2) 采集污泥样品，放于无菌离心管或其它无菌容器中
- 3) 4 小时内常温带回实验室中分装至 2mL EP 管或冻存管中；或用 PBS 进行清洗，离心收集沉淀，分装于 2 mL 离心管中
- 4) 分装后样本-80℃或液氮中长期保存，干冰运输

1.6 水体样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点
- 2) 采用多点取样法取样，采样时不可搅动水底的沉积物；避免手指和其他物品对瓶口的沾污
- 3) 取样后 4 小时内（期间 4℃避光保存）真空抽滤、富集菌体（平行重复样本可用同一滤膜过滤），或将水体采集后直接 4℃ 12000rpm 离心 10min，弃上清，液氮速冻后-80℃保存干冰运输。离心前可先观察水体中的生物是否丰富，水体中生物少的话取≥1L 以上水体进行离心富集，水体中生物量较多的话可取适量进行离心富集。
- 4) 带有富集菌体滤膜或沉淀（滤膜剪碎或折叠后保存）保存在 2mL 或 5mL 无菌 EP 管中，-20℃或-80℃保存，干冰运输

注意事项：

- A. 过滤大量低微生物含量的清亮水样用 0.22μm 的聚苯醚砜滤膜（Polyethersulfone），每个样本至少 1L 水样。

- B. 浑浊水样使用 0.22 μm 滤膜过滤缓慢容易堵塞时，建议使用 0.45 μm 的混合纤维素酯滤膜（膜醋酸纤维素、硝酸纤维素）；如水体中含有杀虫剂和除草剂，则避免使用这类滤膜；每个样本 0.5 L-1 L 水样，如有堵塞则将同一样本滤膜保存于一管。
- C. 如果水样中不可溶解的颗粒较多，需要使用 2-5 μm 孔径的滤膜将不可溶解的颗粒杂质滤去，再使用 0.22 μm 或 0.45 μm 的滤膜富集菌体；每个样本 0.5 L-1 L 水样，如有堵塞需则同一样本滤膜保存于一管。
- D. 如果研究的是病毒，则需先用 0.22 μm 滤膜把水中的细菌和其它大个头细胞过滤掉，再用带正电荷滤膜（Virozorb 的 1MDS 或 NanoCeram 的 Virus Sampler cartridges）富集病毒；每个样本 20 L 水样。

1.7 物体表面微生物样品

- 1) 根据研究目的选择有代表性的取样地点及采样点
- 2) 采集样品：①水果、植物根茎等表面微生物的可使用灭菌水反复冲洗后离心富集（注意水果不要破坏掉水果表面，不然易将果汁等收集到样本中）；②皮肤等使用棉签反复刮擦大约 20-30 次后；放于无菌离心管或其它无菌容器中速冻后 80 $^{\circ}\text{C}$ 保存
- 3) 其它的一些表面微生物，采集样本后 4 小时内常温带回实验室中用 PBS 进行清洗，离心收集沉淀，分装于 2 mL 离心管中
- 4) 分装后样本 -80 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中长期保存，干冰运输

1.8 粪便样品

- 1) 戴上手套收集新鲜的粪便样品
- 2) 无菌牙签或粪便取样器截取样品中段内部（避免表层中的肠道膜脱落细胞），外部容易污染且细菌 DNA 由于接触空气可能有降解
- 3) 将已取的粪便样品分装至 2mL EP 管（无菌）或冻存管（无菌）中，每管粪便量为 0.5~2g，每个样品分装 2~3 管备份
- 4) 分装好后样本迅速放入液氮中速冻，之后放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中长期保存，干冰运输

1.9 肠道内容物样品

- 1) 在实验对象死亡后，无菌条件下，取出整个肠道，用无菌解剖刀切取所需肠段的内容物。
- 2) 用无菌手术刀挖取内容物，并立即放在冰上进行分装及标记
- 3) 将已取的样品分装至 2mL EP 管（无菌）或冻存管（无菌）中，每管组织量为 0.5~2g，每个样品分装 2~3 管备份

4) 分装好后样本迅速放入液氮中速冻，之后放于-80°C或液氮中长期保存，干冰运输

1.10 医学微生物样本

1) 唾液:取具有研究代表性的个体后，最少提前 30min 使用灭菌水进行漱口，将口中的食物残渣清开干净，30min 以后使用合适的容器（最好是使用螺丝口离心管）收集痰液，液氮速冻后低温保存；如果短时间内不能进行液氮速冻，可买专门收集痰液/唾液的取样管（内有保护液），一个样本使用一管，常温可保存 7-15 天。痰液或唾液也可使用棉签收集，前处理同上，将棉签使用痰液或唾液湿润后保存棉签，液氮速冻低温保存即可（建议使用此方法）。

2) 肺水/腹水一类的取样在手术时将收集到的液体直接装到合适的收集管（15ml-50ml），最少 2ml，如果样品体积较大，可使用 4°C 12000rpm 高速离心后取下层液体及沉淀，混匀后液氮速冻低温保存。

1.11 瘤胃液样本

1) 活体取样（口腔插管法）

适用场景：活体动物的动态监测，无需屠宰。

操作步骤：固定动物头部，将消毒后的胃管经口腔缓慢插入瘤胃（成年牛插入深度约 1.5-2 米）。通过负压吸引或注射器抽取瘤胃液，弃去前段可能含有唾液的部分。收集中段液体样本装到合适的收集管（15ml-50ml）中，再分装至 2ml 无菌离心管。

注意事项：操作需轻柔，避免损伤食道或瘤胃壁。多次取样时需间隔足够时间（至少 2 小时），避免影响瘤胃内环境。

2) 屠宰后取样

适用场景：一次性获取大量样本或全层组织。

操作步骤：屠宰后迅速打开腹腔，暴露瘤胃。用灭菌刀具切开瘤胃壁，直接采集内容物（避免接触瘤胃壁表面以防污染）收集样本装到合适的收集管（15ml-50ml）中，再分装至 2ml 无菌离心管。可混合不同部位的样本（如背囊、腹囊）以提高代表性。

注意事项：从屠宰到取样的时间应尽量缩短（<30 分钟），避免微生物群落变化。

3) 取样后立即置于冰盒或液氮中速冻，抑制微生物代谢和核酸降解。

若需分离微生物细胞，可先离心（10,000×g，10 分钟）去除颗粒物，保留沉淀或上清液。

保存条件 短期保存：4°C 下不超过 24 小时。长期保存：-80°C 超低温冰箱或液氮罐。

特殊说明：

*所有微生物样本（组织做内生菌除外）信息单均没有全部研磨和部分研磨的要求，全

部默认部分研磨，需告知客户，以免后期出现沟通问题而影响项目进展和客户体验

*二代微生物项目在提取时是不称重的，都是按照以往提取经验取合适的量做核酸的提取，如果老师要做定量提取的话务必采样时称量好重量，单次土壤提取重量一般在0.25g-0.5g之间，不要超过0.5g

六、包装、运输等注意事项

1 样品命名、包装、标识

1.1 样品命名

样品名称请避免出现汉字，请采用字母和数字表示，长度控制在8个字符以内。

对于备用样品即同一个样品送的备份组织请务必在信息单中备注清楚

1.2 样品包装

从液氮或-80℃冰箱取出组织样品（建议用冻存管存放组织样品；若选用弹开式离心管放置样品，请确认已用Parafilm密封管口），请选用保温性好的泡沫盒（建议壁厚2公分以上）进行样品存放，准备大约8~10公斤块状干冰（干冰易挥发，具体用量可以向样品中心咨询），以提供低温的样品保存环境。

不同提取样本请务必分开包装，例1一株植物根、茎、叶均提取，在送样前务必将此3类组织分开包装；例2，果肉和种子提取，请务必在样品液氮速冻前将种子和果肉分开包装速冻。

对于样品数量较多的项目为了尽快完成样品的交接入库工作请按名称或信息单中样品顺序按每5-10个样品的小包进行一个中包，最后将中包汇总成一个大包。

在选择与委托快递公司时，请事先确认预计送达的时间，并且应在运输过程中应随时跟踪货物的情况，您在记录运单号的同时请务必在《技术服务样品提交单》填写您的运单号，以便我们与您一起追踪样品的运输状态。

1.3 样品标识

请在每个样品管上清晰、简明地标记样品名称（采用质量较好的油性笔标记，并避免与乙醇等有机溶剂接触），请勿在锡纸包上直接标记或粘贴易脱落标签，避免后期低温保存时出现编号脱落或者编号不清，导致无法提取情况发生。样品管请用Parafilm封口。管上样品名称应与递交的信息单中的样品名称保持完全一致。