

基因芯片、测序等技术服务样品准备、储存与运输指南

◆ 仪方生物友情提示：重要样本请做好备份！

一、 样本准备应该遵循的基本原则

代表性原则

取样的代表性关系到实验结果是否具有科学意义，因此您应该根据实验目的慎重选择您的取样方案。病变组织样本中应不夹带正常组织，正常组织样本中不能含有病变组织。有条件时，应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可信度。

准确性原则

代表性样本的各种特征数据必须被准确记录，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。

迅速性原则

样本质量是表达谱芯片实验中影响实验结果的最关键因素，因此用于表达谱芯片研究的样本，在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地做到迅速，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。

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-80℃以下，以避免RNA的降解。

二、 样本采集、包装中的注意事项

1. 请在冷冻保存管表面，用油性记号笔标明样本编号及样本类型，并且不要与乙醇等有机溶剂接触。
2. 请不要用纱布、纸张、塑料袋、铝箔玻和玻璃容器直接放置样本，而是用冷冻保存管装入样本后放入冻存盒中，然后用放入液氮罐或者超低温-80 度冰箱。
3. 请不要把标签纸或其他纸制的说明性文件放入在液氮中，因为纸质在液氮中是易碎的。不要把带说明性文字的标签纸或其他纸质贴于冷冻保存管表面以免脱落造成样本混乱。
4. 请客户在填写《登记单》时尽量详细描述样本的类型、处理方法、储存条件以及储存时间等相关细节，以便技术人员确定合理的实验方案。

三、样品储存与运输

样品储存

组织样品储存于液氮或超低温-80 度冰箱中。

RNA 样品储存于超低温-80 度冰箱中，在-20 度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-80 度冰箱中。在-20 度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-80 度冰箱中。

样品运输

样品运输建议采取液氮或干冰保存下的超低温-80 度运输。

（一）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. 液氮为危险品，受到交通部门的管制。飞机运输应用空运型液氮罐，可以作为行李托运，不能随身携带。火车运输可用普通液氮罐，可随车托运，不能随身携带。托运时应有固定基座，以免倾倒，使液氮泄露。

3. 托运前开具《非危险品证明》（非易燃易爆，无毒无害，无腐蚀），并加盖公章。
4. 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。
5. 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。

（二）干冰运输

1. 飞机运输干冰上限约为 2 公斤，超过 2 公斤原则上不能运输。
2. 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封严。外套纸壳箱包装，以免碰裂。并标明轻取轻放提示，以保证安全运输。
3. 干冰运输可委托当地快递公司，注意一定要确保 48 小时送达我方手中，不能送货上门的应提前通知我方。
4. 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）。超过 48 小时到达的，建议不要用此法运输。
5. 运输时可在干冰上再放一排液体冰带。
6. 如委托快递运输，运输过程中应随时跟踪货物的情况，记录货单号，并保持与发出地和接收地的快递公司的联系。

三、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。

四、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、其它保存样品的方式介绍

如果用液氮或干冰运输有困难,建议以 RNAlater 或 RNasecure 保存样品进行运输,具体如下:

(一)RNAlater 的使用方法(以下内容是根据 Ambion 公司的产品说明书编译的, 仅供参考)

1. RNAlater 的简介

产品描述 RNAlater 是一种液态的, 无毒的组织保存试剂。它能迅速稳定组织, 保护非冷冻细胞 RNA 于原位。获得组织块后, 迅速浸泡在 RNAlater 中保存, 而不会引起 RNA 的降解, 这样可以不必马上处理样本或将样本冷冻在液氮之中以备以后处理。

RNAlater (注意: 指的是不含组织的 RNAlater 保护液原液) 应保存在室温下, 保质期 6 个月。如放置在 4℃ 条件下则会引起沉淀, 此时需加热到 37℃ 才可澄清。

RNAlater 可广泛应用于多种脊椎动物样本。包括脑、心、肾、脾、肝、睾丸、骨骼肌、脂肪、肺和胸腺。RNAlater 对大肠杆菌、果蝇、组织培养细胞、全血细胞和一些植物也有效。

RNAlater 可与大多数 RNA 提取试剂盒相协调。特别是 TRI Reagent®, RNAwiz, RNAqueous, and Poly(A)Pure。

2. 如何使用 RNAlater

RNAlater 只能用于新鲜组织, 在浸入 RNAlater 之前不能冷冻组织。简单切碎组织样本(取样部位病理状况请老师确认清楚, 如癌组织、癌旁组织、正常组织等, 尽量 做到一个样本

单纯性),任何一边的最大厚度不能大于 0.5cm,然后将组织碎块放入到 5 倍体积的 RNAlater 中保存。

动物组织

RNAlater 不会溶解或破坏组织样本的结构。如果需要的话,仍可将已经平衡在 RNAlater 溶液中的组织取出并分割成更小的块再重新放入到 RNAlater 中。小器官如鼠肝、肾和脾可以完整地保存在 RNAlater 中。

植物组织

许多植物组织可以简单浸泡在 5 倍体积的 RNAlater 中保存。具有自然屏障防止扩散的植物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。

组织培养细胞

沉淀细胞,用 PBS 洗一次,再用少量的 PBS 悬浮细胞,然后加 5~10 倍体积的 RNAlater 保存。

白细胞

如果将白细胞从红细胞和血清中分离出来,并按组织培养细胞一样处理后,白细胞便能有效地保存在 RNAlater 中。不要将全血、血浆或血清中的 RNA 保存在 RNAlater 中,因为它们蛋白含量过高,与 RNAlater 混合后易形成不溶的沉淀。

细菌

RNAlater 是抑菌的,虽然细菌在 RNAlater 中不能生长,但细胞仍保持其完整性。大肠杆菌保存在 RNAlater 中 4℃ 条件下 1 个月仍很完整, RNA 不降解。

3. RNAlater 中样品的保存

建议保存于-80℃或-20℃

保存于-80℃

建议用于批量保存。将样本在 4℃ 条件下孵育过夜,然后从 RNAlater 溶液中取出样本保存于-80℃。对于组织培养细胞,不必移去 RNAlater,只需简单冻存整个溶液。实验证明,

细胞在-80℃条件下冻存于 RNAlater 溶液中并未出现溶解。样本可随后在室温下解冻及再冻存，其 RNA 的质和量都不会受到影响。

保存于-20℃

建议用于批量保存。将样本在 4℃ 条件下孵育过夜，然后转移到-20℃。样本在-20℃ 条件下不会冻结，但在存贮缓冲液中会有结晶形成，这并不影响随后的 RNA 提取。样本可随后在室温下解冻及再冻存，其 RNA 的质和量都不会受到影响。

以下数据可以参考，但是尽量低温保存：

保存在 RNAlater 中的样品 RNA 可以在 37 度下稳定保存 1 天，或者在 18-25 度保存 7 天，或者 2-8 度稳定 4 周，或者在-20 度永久保存。

4. RNAlater 中样本的 RNA 提取

组织

用消毒镊子将组织从存贮溶液 RNAlater 中取出，浸泡在 RNA 提取溶液中。一旦将组织放入 RNA 提取溶液中，匀浆一定要迅速进行。

细胞

从存贮在 RNAlater 中的细胞中提取 RNA 有两种操作方法可供选择：去除 RNAlater 或者从细胞与 RNAlater 的混合物中直接提取 RNA。

5. 从 RNAlater 中取出样品

去除 RNAlater

因为 RNAlater 的浓度比典型的细胞培养介质的浓度高，因此用通常沉淀活细胞的离心力无法沉淀 RNAlater 中的细胞。离心沉淀细胞，去除 RNAlater。（HeLa 细胞大约需要 3000×g，但其他细胞可能不能容忍这个速度，或者他们需要更大的离心力。）

从 RNAlater 中的细胞直接提取 RNA

作为选择，我们可以用一步法破碎/提取溶液（如 TRIReagent 和 RNAwiz）从没有去除

RNAlater 的细胞中纯化 RNA。这可通过向细胞混合物中加入 10 倍体积的一步提取溶液完成，其他照常。

(二)RNAsecure 的使用方法

1. 简介

在分子生物学试剂中用 Ambion 公司的 RNAsecure 代替 DEPC，有很多优点：

- 1) 可以加入到不能用 DEPC 处理的溶液中（如：Tris 或 MOPS 缓冲液）；
- 2) 可以加入到不能被高压灭菌的溶液中；
- 3) 可以加入到加酶之前的酶促反应中。Ambion 已经测试了有 RNAsecure 试剂存在的如下酶促反应（先于酶加入）：RNA 多聚酶 T7, T3 和 SP6 的体外转录（37℃），MMLV 和 AMV 逆转录（42℃），以及 SuperTaq PCR（94℃），均没有出现酶抑制现象。

2. 使用方法

- 1) 用缓冲液或经过处理的溶液稀释 RNAsecure 试剂到 1×，充分混匀。
- 2) 将混合物在 60℃ 水浴温浴 20 min，冷却至室温。这样的溶液可备用于接下来的 RNA 提取和分析，或者保存于室温、4℃ 或 -20℃ 以备将来使用。
- 3) 为了消除任何可能发生在经过初处理之后的 RNA 酶的污染，在使用前可以将 RNAsecure 溶液在 60℃ 水浴中重新温浴 10~20 分钟。

3. 注意事项

RNAsecure 试剂只在高于 45℃ 的条件下才有活性，但当反应体系孵育温度超过该温度时可能会使一些酶失活。因此，用 RNAsecure 处理反应缓冲液时要以加入酶之前做为临界点，然后进行酶促反应时孵育温度低于 45℃。注意：这不适用于 Taq 多聚酶。