

- >
- >
- >
- >
- >
- >
- >
- >
- >

1. 三代微生物
- 1.1 单菌组织样本（细菌，真菌）
- 1.2 三代扩增子组织样本
- 1.3 三代宏基因组组织样本
- 1.4 核酸样本（微生物）

2. 打包及寄送建议
- 2.1 样本的打包
- 2.2 样本的名称标识

声明：

实验室不接收《[人间传染的病原微生物名录](#)》([点击查看](#))的所有样品。对于高毒性动植物等样品，必须事先通过销售、客服或运营经理与诺禾致源技术人员联系，确定无高致病性和传染性后才能寄送样品。

提取风险提示和注意事项：核酸提取质量与物种及组织部位、采集方法及保存状态、提取方法及操作、实验器材及环境等因素均有密不可分的联系，尤其是三代超长提取对样本的要求更高。组织提取时可能受到上下游处理操作的影响，因此较难保证单次提取满足质量要求，客户应在寄送组织样品前进行备份。为了保障获得高质量的核酸，请务必按照送样手册所规定的准备样本。对珍贵样本或者微量样本，建议自行提取。取样过程中，需要全程佩戴手套，并且使用预冷乙醇对取样器材进行擦拭消毒，以免样本污染

1. 三代微生物

1.1 单菌组织样本（细菌，真菌）

- (1)样本量：菌体≥3g，-80℃保存，干冰寄送。
- (2)样本准备：对数期细菌（50ml）菌液，4000×g 离心 10min（4℃），弃上清，沉淀（离心后至少3g）用无菌水洗 2 次后干冰送样，建议送 2-3个平行，避免一次提取不成功。
- 真菌（100mL）菌液，4000×g 离心 10min（4℃），弃上清，沉淀用无菌水洗 2 次后干冰送样，若是新鲜真菌建议 3g 以上，建议送 2-3个平行，避免一次提取不成功。
- (3)提取成功的样品类型：鲍曼不动杆菌，沃氏葡萄球菌，肠炎沙门氏菌，埃希氏菌，粪肠球菌，葡萄球菌，不动杆菌，放线菌，链霉菌等。
- (4)注意事项：
- a) 甘油保存，需要重新液体培养基（例如 LB）活化到对数期，不可直接送甘油保存的菌株；
- b) 不建议送固体培养皿的菌，如是只有固体培养基才能活，可以刮到有 PB 缓冲液的离心管里面，离心，送沉淀 2g 以上；
- c) 真菌（5g）大型菇类等，建议送菌丝，不建议送孢子或是子实体，杂合率较高，不利于组装；
- d) 样本一定为非灭活样本，灭活会导致核酸严重降解。

1.2 三代扩增子组织样本

(1)样本量：

| 样本类型 | 建议送样量 | 最低送样量 |
|------------------------------|-------|-------|
| 土壤／污泥／沉积物／腐殖质 | 3-5g | 1g |
| 水体滤膜 （孔径0.22-0.45μm／直径3-4cm） | 2-3张 | 1张 |
| 拭子 | 3-5个 | 1个 |
| 瘤胃液／发酵液／组织液 （离心有明显沉淀） | 3-5mL | 1mL |
| 粪便／肠道内容物 | 3-5g | 1g |
| 动物／人组织 | 1-3g | 1g |
| 血浆 | 3-5mL | 1mL |

(2)样本运输：-80℃保存，干冰寄送。

(3)提取成功的样品类型

| 项目类型 | 样本类型 |
|------|--|
| 16s | 土壤、粪便、淤泥、人和动物组织样本、水体、酒糟（发酵液）、棉签拭子、瘤胃液、菌体 |
| 18s | 土壤、粪便、淤泥、水体、酒糟（发酵液）、藻类 |
| ITS | 土壤、粪便、淤泥、沉积物、人和动物组织样本、水体、酒糟（发酵液） |

1.3 三代宏基因组组织样本

(1)样本量：

| 样本类型 | 建议送样量 | 最低送样量 |
|--------------------------------|-------------|----------|
| 土壤／污泥／沉积物／腐殖质 | 6g | 2g |
| 水体滤膜（孔径0.22-0.45μm／直径3-4cm） | 6张 | 2张 |
| 空气滤膜（直径种类多，与采样器搭配，有明显颜色沉淀在滤膜上） | 6张 | 2张 |
| 拭子 | 10-20个 | 6个 |
| 瘤胃液／发酵液／组织液／冲洗液（离心有明显沉淀） | 6-10mL，沉淀2g | 2mL，沉淀1g |
| 粪便／肠道内容物 | 5g | 2g |
| 动物／人组织 | 2g | 1g |
| 牛奶／酸奶 | 100mL／100g | 20mL／10g |
| 食糜 | 4g | 2g |
| 食品表面拭子 | 20个 | 10个 |

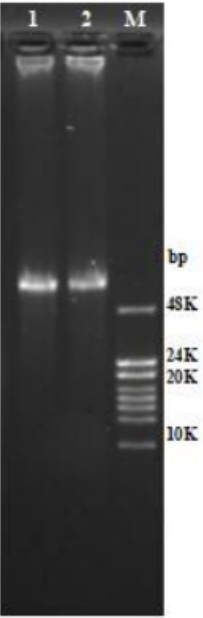
(2)样本运输：-80℃保存，干冰寄送。

(3)提取成功的样品类型： 土壤、水体、粪便、肠道内容物、发酵液等。

1.4 核酸样本（微生物）

1.4.1 单菌DNA送样量要求

（1）纯度要求：OD260/280=1.8~2.0，DNA 条带单一，无杂带，无 RNA、蛋白质等杂质污染；



图中M为48Kb GeneRuler High Range DNA Ladder，图中对应上表序列1,2为原液稀释5倍上样2μl。

(2) 样品浓度和总量要求：

| 产品 | 送样量 |
|-------|-------------------|
| PB单菌 | 浓度≥70ng/μL，总量≥5μg |
| ONT单菌 | 浓度≥60ng/μL，总量≥6μg |

(3) 细菌和真菌 DNA 样本，请老师首先进行污染排查检测和物种鉴定，污染排查和物种鉴定方法：细菌可以扩增 16S 全长后送一代测序，真菌还需扩增 ITS 全长，确定物种正确，无其他杂菌污染再送样。

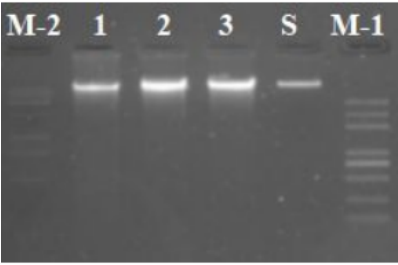
(4) 注意事项：

- ①菌液应当为对数生长期；
- ②霉菌和蕈菌可能存在二倍体杂合度比较高的情况，而且也可能包含其他杂菌，如果直接提取 DNA 送样，会影响后续染色体组装效果，建议先进行纯化培养，多传几代，可以取孢子分离纯培养，然后再提取 DNA 送样。

1.4.2 三代扩增子DNA送样量要求

1.4.2.1 DNA样本

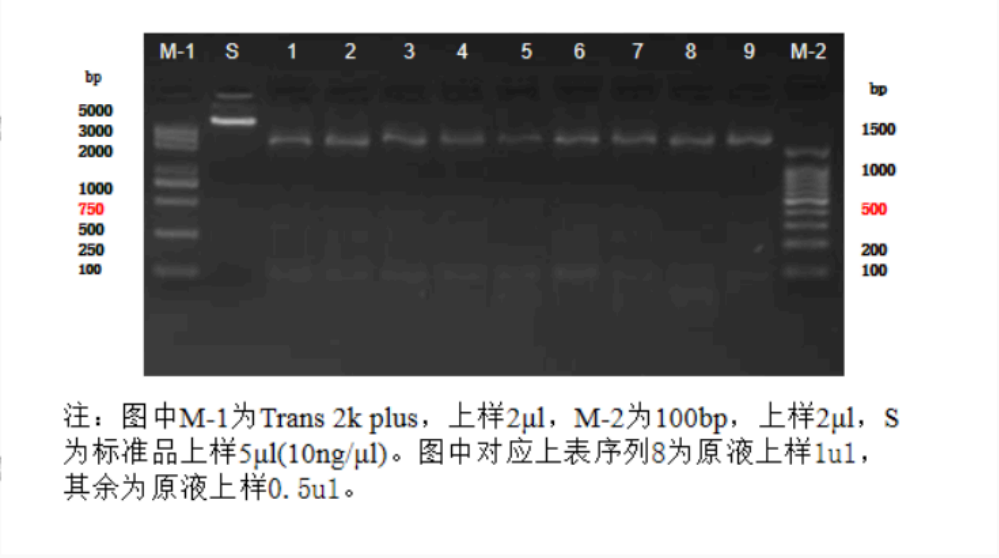
- (1) 样品浓度：DNA≥10 ng/μL，总量：DNA≥150 ng；
- (2) 需客户提供电泳图；
- (3) 送样时请使用干冰或冰袋运送（建议用干冰）；
- (4) DNA 要有明显主带，无降解，无 RNA、蛋白质等杂质污染，例如如下电泳图：



注：图中标为标准品，上样5μL（10ng/μL）；M-1为Trans 2k plus，上样2μL；M-2Trans 15k plus，上样2μL；白色数字为样本序列号，原液上样5μL。

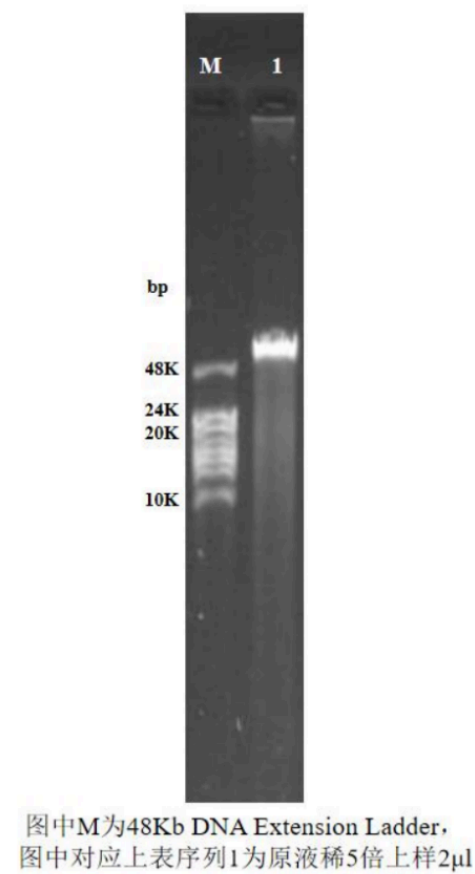
1.4.2.2 PCR样本（包cell）

- (1) PCR产物浓度≥20 ng/μL，PCR 产物总量≥2μg(支持1次文库构建)；
- (2) PCR产物要经过纯化（如胶回收纯化），确保条带单一，无降解，无引物二聚体；
- (3) PCR 产物需带有双端Barcode序列（注意区别于二代barcode序列，每个样本有成套barcode序列）；
- (4) 需客户提供电泳图；
- (5) 送样时请使用干冰或冰袋运送。



1.4.3 三代宏基因组DNA送样量要求

- (1) 样品总量：DNA浓度 ≥80 ng/μL，DNA总量≥5 μg（nanopore平台）或 DNA总量≥10 μg（Pacbio平台）；
- (2) 纯度要求：OD260/280=1.8-2.0，无 RNA、蛋白质等杂质污染；



注：三代样本1为pass类样本，脉冲场电泳，主带在30K以上，基因组轻微断裂，轻微降解。

(3) 注意事项：人或动物组织样本宏基因组，要避免宿主DNA的污染，如果宿主基因组序列占环境DNA比例较高，测序后得到的有效数据量很低，且我们无法通过已知宿主基因组序列去污染，会对后续分析结果造成较大影响。建议可通过以下方法尽量避免宿主DNA的污染：

- ① 取样时，尽量不要取靠近组织的部位；
- ② 提取时，采用适用于样本类型的 DNA 提取试剂盒；
- ③ 如果宿主有参考基因组，可以通过比对去除宿主基因组污染。

1.4.4 样本检测方法

- (1) Invitrogen Qubit®Fluorometer
- (2) Agarose Gel Electrophoresis
- (3) NanoDrop™/酶标仪
- (4) Agilent 2100 Bioanalyzer

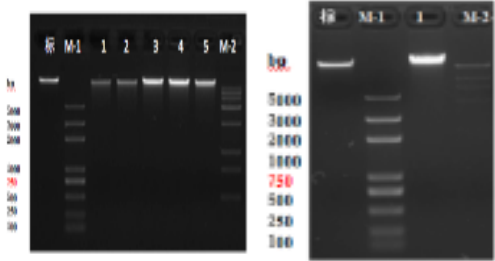
1.4.5 样本检测使用量

| 样本类型 | Qubit® | AGE | Agilent 2100 | NanoDrop™/酶标仪 | 稀释度 |
|-------|--------|------------------|--------------|---------------|-------------------------------|
| DNA样品 | 1-3μL | 100ng或5μL(低浓度样品) | 1.5-3μL | 1-2μL | 如样品浓度 >= 200ng/μL 将用TE缓冲液稀释原液 |

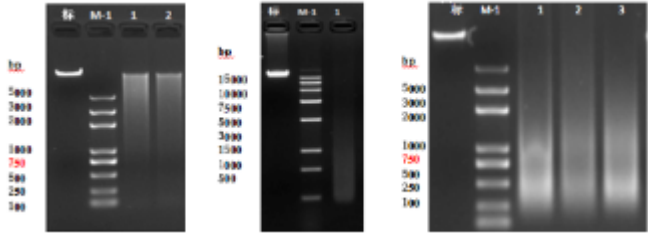
1.4.6 DNA样本本质控说明

DNA样本质量图示。

(1) 质量好的DNA样本（推荐）：

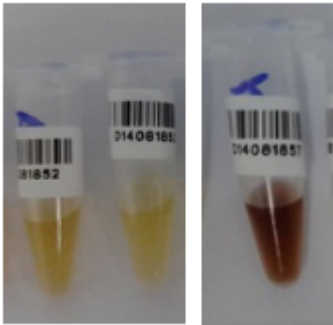


(2) 质量差的DNA样品（不推荐）：

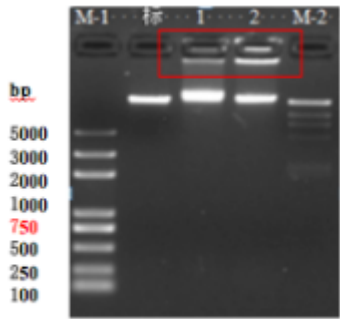


DNA样本风险文库构建风险：

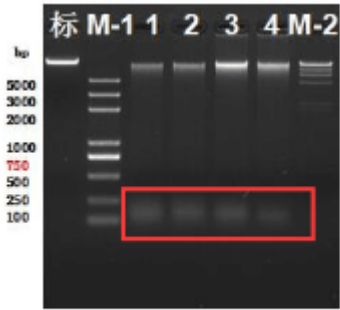
1. 总量不足：可能导致 a. 文库构建失败；b. 文库产量低不能上机测序或测序数据量不足；c. 影响文库随机性；d. 导致数据产量和覆盖度偏低；
2. 样品降解（尤其基因组样品）：影响覆盖均一性和随机性；可造成duplication偏高等。
3. 含有杂质样本：可能造成文库构建失败，建议纯化后送样。



c1. 有颜色



c2. 蛋白杂质



c3. RNA 污染

2 样本打包及寄送建议

2.1 样本的打包

- (1) 核酸样品建议使用质量好的1.5ml或2ml 低吸附EP管装载样品，并用封口膜封口。为了防止样品管破裂，或者污染和混乱，请不要使用诸如PCR管、0.5ml EP管、八联管、96孔板、深孔板等非标准管送样。非标准管不利于样品保存以及后续实验的进行。如有样品使用非标准管制备，还请在送样前自行转管处理。
- (2) 组织样本建议根据送样量使用合适规格带螺纹帽的EP管、冻存管或者离心管装载组织样品，并用封口膜封口。
- (3) 为防止样品管在运输过程中受到干冰挤压破裂，最好将样品管放到50ml离心管或其他支撑物中，并在支撑物里添加棉花或卫生纸缓冲。大量样品建议将EP管放置在冻存盒中，并在冻存盒外面包裹气泡垫。如使用锡箔纸、自封袋装载的样品，为防止运输中受挤压破损，建议将锡箔纸折叠整齐装在自封袋中，在样品包装外再用气泡垫包好并固定。
- (4) 对于血液样品，建议采用5-10ml 塑料抗凝采血管装载，为了防止运输过程中采血管因挤压而损坏，需要将每支采血管管身均用气泡垫包好，然后放置到塑料或纸质包装盒中。
- (5) 用乙醇沉淀的样品由于运输中会有少量乙醇挥发，建议将样品管盖用封口膜缠绕4-5圈。
- (6) 为便于处理和保存，组织样品送样量请不要超过建议送样量的5倍（特殊的得率较低的样品除外）。

2.2 样本的名称标识

- (1) 所有的样品必须具有清晰的标记，并且简洁明了。
- (2) 使用锡箔纸包装的组织样品建议在锡箔纸内外均标记样品名称，并将锡箔纸放在自封袋中，自封袋外面再标记上样品名称，防止锡箔纸上样品名称模糊引起样品混乱。
- (3) 使用乙醇沉淀的核酸样品，由于挥发出的乙醇会使记号笔的标记模糊，建议用油性记号笔将样品名称写在标签纸上，然后用透明胶带将标签纸粘贴在样品管壁上，并缠绕2-3圈。

（4）样品名称建议使用“字母+数字”命名方式标注在管盖。其他信息如日期、浓度、物种等可标注在管壁。所有标注内容需与《样品信息单》保持一致。