



技术引领医学转化
专业创造行业口碑



**SAMPLE HANDLING
TECHNICAL MANUALS**

**常规样品处理方法
技术手册**



目录

第一部分 病理常规样本处理方法	2
1. 组织样本	2
2. 细胞样本	3
第二部分 WB 样本处理方法	5
1. 细胞样本	5
2. 动物组织样本	5
3. 植物样本	5
4. 细菌样本	6
第三部分 ELISA 样本处理方法	7
1. 临床样本的收集	7
2. ELISA 的样本实验准备	10
第四部分 qPCR 样本处理方法	12
1. 细胞样本	12
2. 动物组织样本	12
3. 植物样本	12
4. 细菌样本	13
第五部分 电镜样本处理方法	14
1. 标本处理方法:	14
2. 具体标本取材方法	14
第六部分 外泌体样本处理方法	17
1. 血清样品	17
2. 血浆样品(不能用肝素抗凝).....	17
3. 细胞上清	17
4. 尿液	18
5. 脑脊液	18
第七部分 代谢组样本处理方法	20
1. 粪便样本	20
2. 尿液样本	20
3. 血清样本	21
4. 组织样本	23

第一部分 病理常规样本处理方法

1. 组织样本

1.1 取材:

1.1.1. 刀具需锋利，避免拉、扯、压；

1.1.2. 在动物死亡几分钟内完成；

1.1.3. 根据研究目的，按重要性先后取；器官多时，先取出血少的，后取出血多的；先取自溶快的，后取自溶慢的；先取胸腔后取腹腔；

1.1.4. 用于光镜的组织块应 $< 1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ ；

1.1.5. 尽量保持组织的原有形态，防止其弯曲扭转。

1.2 固定:

1.2.1. 组织标本一经取下，立即保存于固定液中；

1.2.2. 用量为组织块的10-20倍；

1.2.3. 固定液现配现用，短期低温保存；

1.2.4. 根据组织大小、质地、环境温度而定，一般在12-48 h之间；

1.2.5. 确保组织在固定期间能够完整浸泡于固定液中；

1.2.6. 室温固定即可。

最常用固定液：10%福尔马林

免疫组化染色推荐：4%多聚甲醛中性溶液

1.3 运输:

1.3.1. 如样本为固定的组织，需将装有固定液与组织的离心管保持直立，谨防固定液漏出；

1.3.2. 如样本为包埋好的蜡块，需将蜡块排列整齐并包裹好，谨防尖锐器物划伤蜡块组织面；

1.3.3. 如样本为石蜡切片，需将切片放置于切片盒中，并用纸巾覆盖于切片盒盖子内面，谨防因晃动而导致切片破碎；

1.3.4. 如样本为冰冻切片，处理方式如上，但切记需将切片盒置于装有干冰的泡沫盒中进行运输，泡沫盒中的空隙处应填满，谨防切片盒晃动；

2. 细胞样本

2.1 处理：

2.1.1. 爬片法-- 爬片上的细胞要均匀，密度最少需 $1*10^4$ 个细胞/片；

2.1.2. 涂片法-- 涂片的细胞要集中在切片中某区域；

2.1.3. 包埋法-- 细胞集中收集在载体中，建议采用石蜡，且密度最少需 $1*10^4$ 个细胞/块

2.2 保存：

2.2.1. 爬片-- 爬片需放在对应的细胞培养孔板中，孔板需加满固定液，最后用封口膜密封好；

2.2.2. 涂片-- 涂片需在固定液中浸泡5-10 min，晾干后放在切片盒中；

2.2.3. 包埋-- 如使用石蜡进行细胞收集，可直接将蜡块室温放置；如使用棉絮或者其他物体，需放进固定液中室温保存；

2.3 运输：

2.3.1. 如样本为爬片，按上述要求保存后，平放于泡沫盒中进行运输，泡沫盒中的空隙处应填满，谨防孔板颠倒；

2.3.2. 如样本为涂片，按上述要求保存后，用纸巾覆盖于切片盒盖子内面，谨防因晃动而导致切片破碎；

2.3.3. 如样本为石蜡收集的细胞，需将蜡块排列整齐并包裹好，谨防尖锐器物划伤蜡块组织面；

2.3.4. 如样本为固定液中浸泡的细胞,需将装有固定液的离心管保持直立,谨防固定液漏出。

第二部分 WB 样本处理方法

1. 细胞样本

1.1 悬浮细胞

1.1.1. 把细胞及培养液一起收集到15 ml或者50 ml离心管中, 1500 rpm离心3 min, 弃去上清;

1.1.2. 加入预冷PBS轻轻吹打, 1500 rpm离心3 min, 弃去上清; 尽量把上清吸净, 于-80 °C或者液氮冻存待用。

1.2 贴壁细胞

1.2.1. 移去培养基, 加入预冷PBS(动作轻柔一些以免细胞脱落)清洗细胞, 可重复一次预冷PBS清洗, 尽量吸干净PBS。将细胞连同培养皿/培养瓶于-80 °C或者液氮冻存待用。

1.2.2. 若需特殊蛋白抽提液裂解细胞, 可加入细胞裂解液, 将细胞刮下并收集于1.5 ml EP管, 于-80 °C或者液氮冻存待用。

2. 动物组织样本

动物处死后行心间取血, 尽量将血液去除干净, 取下合适组织样品装入EP管(对于WB和mRNA提取, ~100 mg组织即可); 若动物血液去除不干净, 可用预冷的PBS或者生理盐水漂洗尽量除尽残留血液, 用滤纸把多余PBS吸取干净, 然后将组织装入EP管, 做好标记, 于-80 °C或者液氮中保存。

3. 植物样本

取得待测植物样品后, 用蒸馏水把泥土漂洗干净, 用滤纸把多余水分吸取干净, 分装成合适大小于-80 °C或者液氮中保存。

4. 细菌样本

细菌培养完成后, 10000 rpm离心5 min收集细菌, 加入PBS吹打, 10000 rpm离心5 min, 弃去上清, 于-80 °C或者液氮冻存待用。

提示: 以上样本检测磷酸化蛋白, 建议新鲜样本提取蛋白(蛋白抽提液加入适当的磷酸酶抑制剂), 提取后的蛋白加Loading buffer煮沸10 min, 如果短期内做可以-20 °C保存, 长时间-80 °C保存。请在3个月内进行, 长时间保存样品容易使磷酸化蛋白去磷酸化而检测不到磷酸化条带。

注意:

- 1) 提取胞浆、胞核蛋白应尽量采用新鲜样品, 冻存样品提取的胞核蛋白可能会减少;
- 2) 样本保存在-80 °C或液氮也要避免反复冻融, 建议尽快检测;
- 3) 长距离运送样品时采用干冰或者液氮。
- 4) 样本为细胞时, 应尽量保证细胞数量 $\geq 10^6$; 样本为组织时, 应尽量保证组织重量 ≥ 100 mg

第三部分 ELISA 样本处理方法

利用ELISA 进行临床检验常见的样本一般包括血液(指血, 静脉血), 尿, 粪便, 脑脊液, 胸腹水, 前列腺液, 精液, 阴道分泌物等, 这些样本收集的时间、方法和保存都有一定的要求。

1. 临床样本的收集

1.1 血液样本

有些生理因素, 如吸烟、进食、运动、情绪波动、妊娠、体位等均可影响血液中某些成分的变化, 有些甚至还有昼夜变化。因此血液标本的采集应尽量避免生理因素干扰, 以条件一致为宜, 如无法避免, 应在标本上注明该因素。

1.1.1. 外周血

一般选取左手无名指内侧采血, 该部位应无冻疮, 炎症, 水肿, 破损。如该部位不符合要求, 以其他手指部位代替。对烧伤病人, 可选择皮肤完整处采血。由于部分血液常规检测(如白细胞计数、分类等)受生理因素影响波动过大, 比较时宜使条件尽量一致。涉及到体内出、凝血功能的检测项目(如血小板计数, 出血时间或凝血时间等)的检测, 一定要注意了解患者是否用过抗凝、促凝药物, 以便在减少或避免干扰因素的影响。

1.1.2. 静脉血

除涉及各种止血和血栓检测等项目需采用抗凝静脉血血浆外, 目前绝大多数检测项目的分析检测可直接采用静脉血的血清。在血清检测项目中, 有些(如血糖, 血脂等)受饮食及昼夜因素影响较大, 一般以清晨空腹血标本为宜; 有些在血中衰变较快(血清酶活性测定如ACP活性等), 0~4 °C贮存活性减弱也不一, 这些项目的检测必须及时而快速; 有些(如肌酸激酶

等)受运动等因素影响较大。抽血时避免溶血的发生也十分重要,尤其涉及血钾,LDH等的测定。

1.2 尿液样本

同血标本一样,尿液标本受饮食、运动、药物量等因素的影响也较大,特别是饮食的影响,故一般来说晨尿优于随机尿。晨尿是指清晨起床后的第一次尿标本,较浓缩和酸化,有形成分(如血细胞,上皮细胞,管形)相对集中便于观察。随机尿即随意一次尿,留取方便,但受饮食、运动、药物影响较甚,易于出现假阳性和假阴性结果,如饮食性蛋白尿,饮食性糖尿,维生素C干扰潜血结果等。餐后尿(午餐后2 h收集的患者尿液)适用于尿糖,尿蛋白和尿胆原的检查,此时的尿标本可增加试验敏感性,检出较轻微的病变。12 h尿细胞计数即Addis计数(前晚8 h排空膀胱后留取至次日晨8时的所有尿液),因时间较长,细菌易繁殖,须加入防腐剂甲醛。24 h尿(第一天晨8时排空膀胱后留取至次日晨8 h的所有尿液)中化学物质的定量,包括蛋白,糖,尿17-酮、17-羟类固醇,儿茶酚胺, Ca^{2+} 等,检测不同的物质,选择不同的防腐剂防腐。清洁中段尿多用于尿细菌培养,要求无菌,冲洗外阴后留取标本。所有尿标本的收集都应足量,最少12 ml,最好50 ml,定时尿须全部收集,对女性患者应避免阴道分泌物、经血污染尿标本。

1.3 粪便样本

粪便标本的检测对判断消化系统疾病有重要参考价值。采集时要求用干净的竹签选取含有粘液、脓血等异常病变成分的粪便,对外观无异常的粪便须从表面、深处及粪端多处取材。找寄生虫虫体及作虫卵计数应收集24 h粪便。查痢疾阿米巴滋养体应于排便后立即检查,从有脓血和稀软处取材,保温送检。查日本血吸虫虫卵时应取粘液、脓血部分,孵化毛蚴时至少留取30 g粪便,且需尽快处理。检查蛲虫卵须用透明薄膜拭子于晚12 h或清晨排便前自肛门周围皱襞处拭取并立即镜检。隐血试验(化学法),试验前3日禁食肉类及含动物血食物并

禁服铁剂，维生素C等。所有粪便标本采集后1小时内应检查完毕，以防止有形成分受消化酶及pH的破坏。

1.4 脑脊液样本

脑脊液标本采集后立即送检，放置过久将影响检验结果：如细胞变性，破坏，导致计数和分类不准；有些化学物质如葡萄糖等将分解含量减少；细菌发生自溶影响细菌的检出率。脑脊液抽取后一般分装三个无菌管，第一管作细菌培养，第二管作化学分析和免疫学检查，第三管作一般性状及显微镜检查，三管的顺序不宜颠倒。因标本采集较难，全部送检和检测过程应注意安全。

1.5 胸腹水样本

与脑脊液标本一样，采集后的标本注意安全，及时送检。一般也分装三管，一管作常规细胞学检查，一管生化检查，一管细菌培养，顺序以与脑脊液相同为宜。

1.6 前列腺液样本

前列腺液标本由前列腺按摩后采集，液量少时直接滴在载玻片上及时送检，须注意防止标本蒸干，量多时收集在洁净干燥的试管中。若按摩不出前列腺液，可检查按摩后的尿液沉渣。

1.7 精液样本

精液标本采集前应禁欲3~7天，排净尿液后可用手淫法或其他方法将精液直接排入干净的容器中，保温并及时送检。由于精子生成日间变动较大，一般应检查2~3次(每次间隔1~2周)方可做诊断。

1.8 阴道分泌物样本

阴道标本采集前24 h应禁止房事、盆浴、阴道检查、阴道灌洗及局部上药等，取材所用器械需清洁。一般用盐水浸湿的棉拭子自阴道深部或阴道穹后部、宫颈管口等处取材，制成

生理盐水涂片后观察阴道分泌物标本，经期的女性患者不宜检查阴道分泌物标本。

2. ELISA 的样本实验准备

在收集样本前都必须有一个完整的计划，必须清楚要检测的成份是否足够稳定。对收集后当天就进行检测的样本，及时储存在4 °C备用。对于隔天再检测的样本，及时分装后冻存在-20 °C备用，有条件的，最好-70 °C冻存储用可长期保存。标本应避免反复冻融。

液体类标本：包括血清、血浆、尿液、胸腹水、脑脊液、细胞培养上清等。

2.1. 血清

室温血液自然凝固10-20 min后，离心20 min左右(2000-3000 r/min)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

2.2. 血浆

应根据标本的要求选择EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，混合10-20 min后，离心20 min左右(2000-3000 r/min)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

2.3. 尿液

用无菌管收集。离心20 min左右(2000-3000 r/min)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照此实行。

2.4. 细胞培养上清

检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心20 min左右(2000-3000 r/min)。仔细收集上清。

2.5. 培养细胞

检测细胞内的成份时，用PBS(PH 7.2-7.4)稀释细胞悬液，细胞浓度达到100,000/ml左右。通过反复冻融或加入组织蛋白萃取试剂，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心20 min左右

(2000-3000 r/min)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

2.6. 组织标本

切割标本后，称取重量。加入一定量的PBS，PH 7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持2-8 °C的温度。加入一定量的PBS(PH 7.4)，或组织蛋白萃取试剂，用手工或匀浆器将标本匀浆化。离心20 min左右(2000-3000 r/min)。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。

第四部分 qPCR 样本处理方法

1. 细胞样本

1.1 悬浮细胞

1.1.1. 把细胞及培养液一起收集到15 ml或者50 ml离心管中, 1500 rpm离心3 min, 弃去上清;

1.1.2. 加入预冷PBS轻轻吹打, 1500 rpm离心3 min, 弃去上清; 尽量把上清吸净, 加入适量Trizol, 于-80 °C或者液氮冻存待用。

1.2 贴壁细胞

移去培养基, 加入预冷PBS(动作轻柔一些以免细胞脱落)清洗细胞, 可重复一次预冷PBS清洗, 尽量吸干净PBS。加入适量Trizol, 将细胞刮下并收集于EP管中, -80 °C或者液氮冻存待用。

2. 动物组织样本

动物处死后行心间取血, 尽量将血液去除干净, 取下合适组织样品装入EP管(用于去PCR的mRNA提取, ~100 mg组织即可); 若动物血液去除不干净, 可用预冷的PBS或者生理盐水漂洗尽量除尽残留血液, 用滤纸把多余PBS吸取干净, 然后将组织装入EP管, 加入适量Trizol, 做好标记, 于-80 °C或者液氮中保存。

3. 植物样本

取得待测植物样品后, 用蒸馏水把泥土漂洗干净, 用滤纸把多余水分吸取干净, 分装成合适大小, 加入适量Trizol, 做好标记, 于-80 °C或者液氮中保存。

4. 细菌样本

细菌培养完成后, 10000 rpm离心5 min收集细菌, 加入PBS吹打, 10000 rpm离心5 min, 弃去上清, 加入适量Trizol, 做好标记, 于-80 °C或者液氮冻存待用。

注意:

- 1) qPCR样本应尽量采用新鲜样品;
- 2) 样本保存在-80 °C或液氮也要避免反复冻融, 建议尽快检测;
- 3) 长距离运送样品时采用干冰或者液氮。
- 4) 样本为细胞时, 应尽量保证细胞数量 $\geq 10^6$; 样本为组织时, 应尽量保证组织重量 ≥ 100 mg

第五部分 电镜样本处理方法

1. 标本处理方法:

1.1 标本血供中断(离体)后, 最好1 min内(时间越长, 组织自溶越严重, 产生的人工假象越严重)应放入预冷2.5%戊二醛固定液中(2-8 °C, 严禁冷冻); 4 °C保存

1.2 取材要小, 米粒大小为宜, 可取成长条状, 横截面不超1 mm², 取材太大会严重影响实验结果! 同一标本可取2-3条组织, 固定液要装满;

1.3 取材部位要准确, 否则会观察不到目标结构。

2. 具体标本取材方法

电镜固定液(2.5%中性戊二醛)配方(有细胞壁等样品, 请用多聚甲醛-戊二醛混合固定液):

戊二醛溶液(市售, 浓度为25%): 10 ml

0.2 M 磷酸缓冲液: 50 ml

蒸馏水(或双蒸水): 40 ml

混匀后即配成2.5%中性戊二醛溶液。

注: 0.2 M 磷酸缓冲液: NaH₂PO₄·2H₂O:0.588 g; Na₂HPO₄·12H₂O:5.8 g; 蒸馏水(或双蒸水)

定容至: 100 ml混匀、溶解后调PH至7.2-7.4即可。

透射电镜: 观察各种实体组织或培养细胞等的内部超微结构

2.1 细胞

数量要求: 10⁶以上。生长在培养皿或培养板上细胞取材, 若是悬浮的细胞将细胞转移到圆

底EP管里直接离心, 贴壁细胞就先倒出培养液, 用胰蛋白酶消化或细胞刮刮下, 而后带培

养液一起低速离心, 800-1200 rpm, 离心5-10 min使细胞沉淀成团, 离心完后倒

2.2 肌肉

观察纵切面时沿着肌束方向,用锋利的刀片或剪刀在取出的组织一边取出1-3条细长的肌束,横截面约1mm*1mm,投入到2-8°C的电镜固定液(2.5%的中性戊二醛)里。若有条件,为防止肌肉收缩变形,可将取出的肌束贴在载玻片毛玻璃一侧,使其略微伸展。再将贴好标本的载玻片放入戊二醛中进行固定(下面有图示)。若无,则可取出长条状组织后,垂直缓慢放入固定液中,悬空在固定液里稍等3秒再放入。出培养液,沿壁缓慢加入电镜固定液(1.5%-2.5%中性戊二醛),注意不要把细胞团打散。4°C下固定15分钟或以上再送检。若送检样品较难固定(如真菌有细胞壁等),可稍离心去上清后,加固定液后吹悬固定10 min再离心成团。

2.3 植物、昆虫等密度比固定液低的样品

必须先用针筒或抽真空仪器先抽气,再使标本沉入固定液中。

扫描电镜观察:各种实体组织暴露面或培养细胞等的表面结构

细胞样本:

在细胞培养的时候都开始保留样本,方法如下:

- 1) 爬片:使培养的细胞在一病理盖玻片(不能太大,5*5 mm左右的)上生长爬片,然后刺激诱导。
- 2) 完后用磷酸缓冲液轻柔漂洗掉培养基,然后连同盖玻片一起放到戊二醛中固定(注意一定要加满戊二醛,否则会因固定液晃动而导致细胞脱落)。固定和送检期间请勿剧烈振动,以防细胞脱落。

取材要求:

固定前严格漂洗(生理盐水或磷酸盐缓冲液),否则表面杂物会影响结构的观察;组织大小控制在1 cm*1 cm,厚度小于1 cm。

图片要求:

- 1) 倍数：1500/2000/3K/4K/5K/8K/10K/15K/20K/25K/30K/40K/50K等(请视观察的目标结构选择合适的图片倍数，若无要求，我们会视实际情况拍合适的倍数的图片，K代表1000倍)；
- 2) 数量：样本数量，样本拍照部位。

第六部分 外泌体样本处理方法

1. 血清样品

- 1.1 用采血针和普通血清管(不含任何试剂, 10 ml规格)采血10 ml。
- 1.2 室温静置30 min, 然后4 °C条件下, 静置3-4 h(此时可见血块析出)。
- 1.3 用移液器吸取上面的淡黄色血清(应该有4 ml左右)转入15 ml离心管中, 4 °C条件下3000 g离心15 min, 小心取上清转入新的15 ml离心管中, 最大程度保证血清质量。
- 1.4 离心后的血清15 min内冻存于-80 °C冰箱。

提示: 送样量最好4 ml以上(分离4 ml血清约需要10-15 ml全血)。

2. 血浆样品(不能用肝素抗凝)

- 2.1 用采血针和EDTA抗凝管抽取全血, 轻柔混匀后室温或者4 °C保存, 并在1 h内进行下一步处理。
- 2.2 4 °C条件下, 使用吊桶式转头1900 g离心10 min, 小心吸取上清即为血浆, 最后500 μl左右丢弃。得到的血浆再次离心, 条件为4 °C, 3000 g, 15 min, 小心吸出血浆, 注意不要碰到底部和侧面的沉淀物。
- 2.3 将血浆冻存于-80 °C。

提示: 送样量最好4 ml以上(分离4 ml血浆约需要8-10 ml全血)。

3. 细胞上清

- 3.1 细胞在正常含有血清的培养基中培养一定时间, 贴壁细胞密度在70%-80%, 悬浮细胞密度在60%-70%;

3.2 对于贴壁细胞，去除原有培养基，换为新的不含外泌体的培养基或者无血清培养基。

4. 尿液

4.1 收集尿液时，应该尽量选择受试者的“新鲜”尿液100 ml，并注意避免细菌污染，收集前注意对饮食的控制；

4.2 并于3000 g离心15 min，去除细胞或细胞碎片；

4.3 -80 °C冰箱中保存。对于悬浮细胞，300 g，4 °C，10 min收集细胞。

4.4 使用不含外泌体的培养基或者无血清培养基悬浮细胞并继续培养。细胞继续培养24-48 h，根据细胞的生长速度确定收取上清时间。

4.5 收集细胞上清，300 g，4 °C，离心10 min；小心吸取上清，注意避免吸入细胞或者细胞碎片。

4.6 3000 g，4 °C，再次离心15 min，确保将细胞或者细胞碎片去除干净。

4.7 取上清，注意避免吸入细胞或者细胞碎片，合并相同的细胞培养液上清样品，装入无菌的玻璃瓶，可在4 °C短期保存(1-2天)，长期保存可冻存于-80 °C。建议细胞上清分离后尽快进行外泌体分离，保存在4 °C和-80 °C，都会对产量有一定的影响。

提示：送样量最好50 ml以上。

5. 脑脊液

5.1 收集脑脊液10 ml，避免受到血液污染；

5.2 并于3000 g离心15 min，去除细胞或细胞碎片；

5.3 -80 °C冰箱中保存。

注意事项：

- 1) 采集的样本需要符合纳入标准：如年龄、肥胖(身高、体重)、血糖血脂血压、诊断情况等。统一早晨空腹采血，尽量避免样本间的差异影响。
- 2) 如个别样本发生溶血，则弃掉。
- 3) 样本编号用油性笔清楚地写在管壁及管盖上。
- 4) 离心管在放入冰箱前，用封口膜密封。
- 5) 如果提供的是冻存细胞株，需提供详尽的复苏方法。
- 6) 细胞培养基必须使用去除Exosome(De-exosome)的血清或者无血清培养基(例如Thermo Fisher的SFM)。
- 7) 分离外泌体前的样品不能加入任何RNA保护剂(如Trizol)。
- 8) 分离好的外泌体如需进行电镜观察，需要放4 °C保存，并且不宜保存太久。
- 9) 全血建议使用PAXgene管保存，不可冻融，取血后尽早制备血浆或血清，血浆或血清可以-80 °C保存，但应避免反复冻融。
- 10) 储存条件以及储存时间影响外泌体得率，保存在-80 °C冰箱中的样本，如果储存时间过长，外泌体产量也会显著降低。
- 11) 干冰运输应采用壁厚且质量完好的泡沫箱，24 h到达的，干冰数量不得低于5 kg；48 h到达的，干冰数量不得低于8 kg；夏季适当增加干冰(1.5倍)

第七部分 代谢组样本处理方法

1. 粪便样本

1.1 样本量要求:

1.1.1 NMR 平台500 mg 鲜重/样

1.1.2 GC-MS 平台300 mg 鲜重/样

1.1.3 LC-MS 平台300 mg 鲜重/样

1.2 样本收集:

1.2.1 取得粪便样本后迅速放入液氮速冻;

1.2.2 迅速转入-80 °C冰箱保存, 期间不得反复冻融;

1.2.3 全程干冰运送。

1.3 注意事项:

1.3.1 粪便样本在肠道里形成时间和区段不一样, 含有微生物的量以及形成的成分不一致, 因此所选择样本的节段不同, 最终测到的代谢物也会因为个体的差异性而比较大;

1.3.2 若不能确定是否选择同一节段的粪便样本, 建议先取大量样本如8-10 g鲜样, 并将样本混匀后进行后续实验, 避免带来的个体差异太大。

2. 尿液样本

2.1 样本量要求:

2.1.1 NMR 平台500 ul/样

2.1.2 GC-MS 平台300 ul/样

2.1.3 LC-MS 平台300 ul/样

2.2 样本收集:

2.2.1 对尿液样本进行编号以及做好临床样本的采样信息记录;

2.2.2 取尿液大于1 mL, 在4 °C保存, 静置;

2.2.3 取1 mL 尿液进行离心分离, 4 °C, 10000 rpm, 5 min;

2.2.4 离心后取500 μ L上层清液, 并加入微生物抑制剂(建议加叠氮化钠溶液(0.0025 mol/L)20 μ L)。

2.2.5 冰冻样本, 迅速将尿液样本至于-80 °C冰箱冰冻, 直到实验。

2.3 注意事项:

2.3.1 为了排除样本(特别是女性样本)所引入的微生物干扰, NMR平台的样本需要加入生物抑制剂;

2.3.2 尿液样本不能及时进行离心处理, 务必放入到4 °C的冰箱中静置保存, 但不宜超过24 h;

2.3.3 尿液样本在进行前处理时保证每个生物学重复样本所有的时间一致;

2.3.4 注意样本冰冻后避免反复冻融, 如果需要做其他生化检测应提前分装保存。

2.3.5 建议临床样本需要记录的采样信息:

2.3.6 例如: 性别; BMI; 年龄; 种族; 饮食结构; 过往病史; 是否有其他疾病干扰; 采样时间; 采样方式; 采样地; 采样量。

3. 血清样本

3.1 样本量要求:

3.1.1 NMR 平台500 μ L/样

3.1.2 GC-FID/GC-MS平台200-300 μ L/样

3.1.3 LC-MS平台200-300 μ L/样

3.2 样本收集:

3.2.1 采集血样, 静置30 min, 血液凝固;

3.2.2 取液体部分进行离心分离, 4 °C, 3000 rpm, 5 min;

3.2.3 离心后取上层清液(一般为淡黄色), 每个样本至少需取500 μL生物量, 准确记录并进行编号。此过程中要求每个生物学重复样本所用的时间一致, 而且血样在室温放置不超过3 h,

4 °C保存不应超过24 h, 以防止血液中的代谢物发生变化;

3.2.4 冰冻样本, 将血清样本至于-80 °C冰箱冰冻。

3.3 注意事项:

3.3.1 采血过程中注意消毒, 防止微生物污染;

3.3.2 离心速率建议不宜过快, 以免血细胞破碎;

3.3.3 准确记录每个样本收集的血清样本体积;

3.3.4 血清样本冰冻后避免反复冻融;

3.3.5 在运输样本过程提供干冰保证低温(环境);

3.3.6 如果制备血浆样本, NMR 平台宜用肝素钠抗凝, GC-MS、LC-MS 平台宜用EDTA抗凝; 如果计划做多平台组合, 建议各平台都制备血清为宜, 且需要提前分装保存。

3.3.7 用于NMR平台分析的样本如果储存在-80 °C环境超过3 months, 则需要加入微生物抑制剂(建议添加叠氮化钠溶液(0.0025 mol/L)20 μL); 用于GC-MS、LC-MS 样本不应添加任何微生物抑制剂。

3.4 样本运输:

3.4.1 若需送检, 运输过程中需要提供干冰寄送。

4. 组织样本

4.1 样本量要求:

4.1.1 NMR 平台50 mg 冻干粉/样=500 mg 鲜重/样

4.1.2 GC-MS 平台30 mg 冻干粉/样=300 mg 鲜重/样

4.1.3 LC-MS 平台30 mg 冻干粉/样=300 mg 鲜重/样

4.2 样本收集:

4.2.1 取得组织样本后迅速放入液氮速冻;

4.2.2 在液氮条件下将冻好的组织样本研磨成粉;

4.2.3 尽可能将样本研磨细腻和均匀;

4.2.4 液氮研磨过程中液氮不宜过少, 防止样本研磨过程中融化;

4.2.5 液氮研磨成粉后, 样本应在-80 °C保存5 h以上或过夜存储, 然后再于真空冷冻干燥机中抽为冻干粉状态;

4.2.6 每个生物学重复需要提供至少50 mg/个的干粉生物量;

4.2.7 运输过程仅需要普通冰盒运输即可。

4.3 注意事项:

4.3.1 如果样本还需要做其他检测, 应提前分装保存, 不应反复冻融。