

## 表观类产品送样、接收、保管指南

### 目录

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 百迈客 Hi-C 取样要求 .....          | 2 |
| 1. 动物样本-全血 .....             | 3 |
| 1.1 新鲜血液 .....               | 3 |
| 1.2 冻存血液 .....               | 3 |
| 1.3 血液需求量 .....              | 3 |
| 1.4 全血取样注意事项（防止污染、溶血） .....  | 3 |
| 2. 动物样本---组织标本 .....         | 3 |
| 2.1 冻存样品 .....               | 3 |
| 2.2 （冻存）组织样品理论用量 .....       | 4 |
| 3 动物样本---细胞 .....            | 4 |
| 3.1 取样要求 .....               | 4 |
| 3.2 细胞样品量要求 .....            | 4 |
| 3.3 交联细胞 .....               | 4 |
| 4. 真菌样本 .....                | 4 |
| 4.1 冻存样品—“慢冻快融”或“直接速冻” ..... | 4 |
| 4.2 组织样品理论用量 .....           | 4 |
| 5. 植物样本 .....                | 5 |
| 5.1 活体植株 .....               | 5 |
| 5.2 离体枝条 .....               | 5 |
| 5.3 冻存植物组织 .....             | 5 |
| 5.4 其他植物样品 .....             | 6 |
| 5.5 植物取样注意事项 .....           | 6 |
| 附录 1 Hic 交联流程 .....          | 7 |
| 百迈客 ATAC-seq 取样要求 .....      | 8 |
| 1. 生物学重复 .....               | 8 |
| 2. 样品的保存与运输 .....            | 8 |
| 3. 取样要求 .....                | 8 |
| 3.1 组织样本 .....               | 8 |
| 3.2 细胞样本 .....               | 8 |
| 3.3 全血样本 .....               | 9 |

## 百迈客 Hi-C 取样要求

### 原则一：“安全”

1. 人身安全：现有实验条件下（采取一定防护后），样品对实验人员本身无伤害；
2. 环境安全：样品对室内、室外环境无影响（以免因为不小心导致一些活体样本进入外界环境造成不良影响）；

### 原则二：“无污染”

任何样品除本样品外不得有其他样品的污染，如：

1. 植物样本不得有其它植物的污染，不得有病害，不得有虫害（尤其是一些肉眼不容易发现的虫卵等）；
2. 全血样品不得引入取血物种本身携带的病菌、病毒等潜在污染；

### 依据：“理论”&“实践”

“理论”：基于各种实验原理的理论依据；

“实践”：基于 BMK 本身积累的多物种、多样品的项目经验；

### 说明：

\*客户或销售人员应将样本的信息详细说明，所有样品必须标注好关键样品信息：如物种名称、样品名称、到样日期、是否需要返样等；

\*样品信息单必须早于或与样品同时到达公司，一则方便样品中心录样，二则方便项目尽快启动；

\*因为样品首次取样不足、质量不好或信息单未及时到位造成项目进度延后时需要由客户或销售部承担相关责任（特殊项目除外）；

\*因公司内部培养条件不能同时满足各种物种的生长需求，因此，送达活体样品应该尽量是送到即可进行实验的样品（量足，质好），不建议在公司保存过长时间，防止培养样本死亡；

\*所有需要特殊关注的样品，在华开任务单中需要备注相关信息，并提前邮件通知 Hi-C 相关注意事项；特殊物种需要书面告知材料培养条件（光、温度、水、肥 or 有机营养物等等）；

\*生长状态趋于不好的样品，或一些离体枝条需要提前与实验沟通，保证到样后可及时处理样品；

**法定节假日期间和周末送样要求：**（1）节假日当天及假日前后各一周不建议再到样，如遇特殊情况需要节前一周与实验平台沟通送样需求；（2）周末休息日 2 天不建议到样，如遇特殊情况需要节前一周与实验平台沟通送样需求。

## 动物（Animals）

### 1. 动物样本-全血

#### 1.1 新鲜血液

取样要求：

血液采集后加入含 EDTA 或柠檬酸钠抗凝管中（因肝素钠抗凝会影响后续实验，故不建议用肝素钠抗凝），轻轻颠倒十次混匀，室温正立放置，平衡 2 h 后立即送样，并尽量确保 24 h 内运至实验室。

#### 1.2 冻存血液

取样要求：

血液采集后加入含 EDTA 或柠檬酸钠抗凝管中（因肝素钠抗凝会影响后续实验，故不建议用肝素钠抗凝），轻轻颠倒十次混匀，室温正立放置，平衡 2 h 后直接液氮速冻，干冰运输。

#### 1.3 血液需求量

每一个样品，建议送样 1~2 mL。

#### 1.4 全血取样注意事项（防止污染、溶血）

- (1) 取样前要做好消毒处理：包括取样部位、取样器材、取样者戴的手套等，防止所取血液样品被物种本身携带的细菌等污染物污染；
- (2) 准备柠檬酸钠或 EDTA 抗凝管（抗凝管有多种规格）；
- (3) 依据抗凝管的实际规格采取全血样品，比如：10 mL 规格的抗凝管可以取样 10 mL；
- (4) 取完血后，迅速轻柔颠倒混匀全血样品，保证血液与抗凝剂充分混匀；
- (5) 天气较热时：含有血液样品的抗凝管运输时使用冰袋低温运输，注意，冰袋不要与抗凝管直接接触，以防止血液冻凝；天气较冷时：含有血液样品的抗凝管运输时无需加冰袋运输。

### 2. 动物样本---组织标本

#### 2.1 冻存样品

取样要求：

- (1) 应保证组织样品新鲜冻存，保存时间不要太长（以冻存时间 1 个月为宜）；
- (2) 应将肌肉表面附着的血液、脂肪、毛皮等非肌肉组织处理干净；
- (3) 直接液氮速冻干冰运输。

## 2.2 (冻存) 组织样品理论用量

组织量 2 g 为佳, 最少 1 g; 1 g 可满足 3 个文库构建, 最低要求至少 0.2 g。

## 3 动物样本---细胞

### 3.1 取样要求

需要进行甲醛交联固定后送样。

### 3.2 细胞样品量要求

一般来讲  $2 \times 10^6$  个细胞满足一个 Hi-C 文库, 建议培养到  $10^7$  个细胞用于固定, 以保证试验的可重复性, 由于细胞的数量可能会影响 Hi-C 试验的质量, 因此需要细胞数目尽量精确。

### 3.3 交联细胞

- (1) 取  $10^7$  个新鲜活细胞置于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 的 cold 1×PBS 摇匀, 1000 g, 4°C 离心 2 min;
- (2) 吸弃上清, 每管再次加入 10 mL 的 cold 1×PBS 轻混匀, 1000g, 4°C 离心 2 min;
- (3) 吸弃上清, 用 10 mL cold 1× PBS 重悬沉淀, 加入适量 (570  $\mu$ L) 37% 甲醛 (终浓度 2%) 混匀, 室温放置 10 min(1-2 min 混匀一次); (注意甲醛需要使用 sigma 等进口品牌, 以免影响固定效果, 也可以由当地销售申请实验室寄送固定试剂);
- (4) 加适量 (710  $\mu$ L) 2 M 的甘氨酸 (常温保存) 终止反应 (终浓度 0.125 M), 室温混匀 5 min, 冰上放置 15 min。
- (5) 固定好的细胞 600 g 4°C 离心 8 min, 弃上清。
- (6) 1 mL cold PBS 重悬沉淀, 600g 4°C 离心 8 min, 去上清。
- (7) 液氮速冻干冰运输或 -80°C 保存;

注: 做到此步直接液氮速冻, 干冰运输, 信息单中备注: “细胞交联完成”。

## 真菌 (Fungus)

### 4. 真菌样本

#### 4.1 冻存样品—“慢冻快融”或“直接速冻”

- (1) 应保证菌体为对数生长期, 保存时间不要太长 (以冻存时间 1 个月为宜);
- (2) 直接液氮速冻干冰运输。

#### 4.2 组织样品理论用量

组织量 1 g 为佳, 最少 0.2 g。

## 植物 (Plants)

### 5. 植物样本

#### 5.1 活体植株

取样要求:

- (1) 幼嫩植株: 种子培育的低龄幼苗、组培苗——全部叶片、部分幼嫩茎;
- (2) 成熟植株: 茎尖组织及靠近茎尖的第 1-2 片幼嫩叶片;
- (3) 取样量: 保证每一个库的理论用量 1g;
- (4) 其它: 特殊贵重活体样品需要客户提供样品的种植、保存条件, 以保证样品的正常生长。

#### 5.2 离体枝条

取样要求:

- (1) 枝条选择: 枝条顶端有待萌发叶芽, 且叶芽周边有几片幼叶 (到样后会选择叶片进行实验); 枝条中下端保留部分成熟叶片;
- (2) 枝条预处理: 剪断枝条, 自底端往上约 5 cm 用浸透水的吸水纸包裹好, 放入自封袋, 袋中喷水, 填充部分空气, 密封袋口;
- (3) 枝条运输: 自封袋放入泡沫箱, 箱体内侧壁放部分冰袋 (保证低温运输), 冰袋与自封袋间放置泡沫板, 防止冰袋积压样品或因冰袋与样品直接接触导致样品被冻伤;
- (4) 运输时间: 保证 24h 内到样, 最多不得超过 3 天;
- (5) 取样量: 保证每一个库的理论用量 1g;
- (6) 其它: 取“离体枝条”仅限比较难以获得幼嫩活体植株的项目, 如野外采样、植株过大等导致的取样或运输比较困难的项目; 离体枝条到样后如有损伤等将不再用于实验; 离体枝条如果保存、运输不善会存在部分潜在风险: 即得到的实验效果可能会比活体植株检测结果稍差 (理论上的潜在风险)。

#### 5.3 冻存植物组织

若客户只能提供冻存植物样本时, 实验室可以尝试进行提取建库, 但是冻存样品可能会出现以下情况:

- a. 植物组织液氮速冻后容易造成破碎, 导致后续固定等操作无法有效实施;
- b. 植物组织破碎严重时会对核甚至染色体造成物理机械损伤。

取样要求:

- (1) 获取样品组织:

从植物体上, 取下新鲜组织, 取材后需用清水将材料表面的灰尘或泥土冲洗干净, 吸干。

- (2) 如果组织体积较大，应在冰上将组织切成小块薄片；
- (3) 将处理好的组织样本混合均匀保存于 2 mL 或更大体积的旋盖冻存管中，每份植物>1 g，准确标记样品名称；
- (4) 迅速置于液氮中冷冻至少 5min，然后转移至-80℃冰箱中保存，；
- (5) 为确保实验的顺利，建议样品备份 1-2 份，植物>1 g/份，以防部分样品降解重新取材、制备或送样；
- (6) 应保证组织样品新鲜冻存，保存时间不要太长（以冻存时间 1 个月为宜）；
- (7) 运送方式：将冻存管置于密封性好的塑料袋中，用胶布缠到冰袋上，并在泡沫盒中装入足量的干冰进行运输。

#### 5.4 其他植物样品

取样要求：

- (1) 非叶片（活体植株）：有常规提取经验，须为 DNA 提取率高、黏度低的部位；
- (2) 非叶片（离体植株）：处理与运输与离体枝条相同，有常规提取经验，须为 DNA 提取率高、黏度低的部位；
- (3) 取样量：保证每一个库的理论用量 1 g；

其他：非叶片样品适用于叶片难提取的植株或老师的特殊要求，此类样品 DNA 提取失败的风险高于叶片样本，需要销售与老师交代清楚。

#### 5.5 植物取样注意事项

- (1) 建议一次送样量在 1~4g；
- (2) 所有待取的幼嫩组织长势必须正常（无病虫害、无营养缺失）；
- (3) 对于需要保留茎尖的特殊情况，取样时不取茎尖组织，只取紧靠近茎尖的第 1-2 片嫩叶；
- (4) 因为通常裸子植物比被子植物更难选择适合的解离液，裸子植物的叶子大多为针形、线形、鳞形，叶片表面有较厚的角质层，细胞内次生代谢物多，这对提取完整的细胞核极为不利，因此，选取萌发的新鲜幼苗作为材料会更合适；
- (5) 客户没有条件寄送活体植物样本时，可以选择自己固定，由当地销售像实验室申请寄送固定试剂（ $\beta$ -巯基乙醇需要老师自己准备）。

## 附录 1

## Hic 交联流程

1. 配制 NIBuffer 工作液 1，配制好后置于冰上放置：

| 试剂            | 体积   |
|---------------|------|
| NIBuffer      | 35ml |
| $\beta$ -巯基乙醇 | 35ul |
| 100mM PMSF    | 35ul |

2. 取 2g 新鲜幼嫩组织样品，用冰水清洗干净
3. 用剪刀将样品组织剪碎，放置于 50mL 离心管中
4. 加入上述配制好的 NIBuffer 工作液 1
5. 加入 2 mL 36%甲醛溶液，室温条件下，旋转杂交炉中反应 90 min
6. 加入 2.5 mL 2M 甘氨酸，连续手摇 5 min 终止交联反应
7. 滤掉液体，用灭菌水清洗至无泡沫为止
8. 吸干样品表面水分，将样品置于预冷的 50ml 离心管中，并将管置于液氮中
9. -80℃保存或干冰寄送



## 百迈客 ATAC-seq 取样要求

### 1. 生物学重复

取样应尽量减少重复间样品的差异。尽可能做到重复在取样时间、部位、处理条件等方面保持一致，不同样本的性别、年龄尽量相同，否则可能会影响实验结果的可重复性及可信度。

每个处理至少 3 个生物学重复。

### 2. 样品的保存与运输

简单处理并标记后，应立即浸入液氮中速冻，之后保存于-80℃冰箱，以免实验操作前样品降解的可能性。

### 3. 取样要求

#### 3.1 组织样本

(1) 获取样品组织：

动物：取下新鲜组织，立即剔除结缔组织和脂肪等杂质，用预冷的 1×PBS 溶液漂洗，将组织表面的残留血液冲洗干净。

植物：从植物体上，取下新鲜组织，取材后需用清水将材料表面的灰尘或泥土冲洗干净，吸干。

(2) 如果组织体积较大，应在冰上将组织切成小块薄片；

(3) 将处理好的组织样本混合均匀保存于 2 mL 或更大体积的旋盖冻存管中，每份组织>50mg，准确标记样品名称；

(4) 迅速置于液氮中冷冻至少 5min，然后转移至-80℃冰箱中保存；

(5) 为确保实验的顺利，建议样品备份 1-2 份，组织>50mg/份，以防部分样品降解重新取材、制备或送样；

(6) 运送方式：将冻存管置于密封性好的塑料袋中，用胶布缠到冰袋上，并在泡沫盒中装入足量的干冰进行运输。

**注意事项：**

(1) 昆虫类样本建议进行饥饿处理后送样；

(2) 若样本有微生物污染（细菌、病毒等），实验过程无法去除，下机数据会有污染。

#### 3.2 细胞样本

(1) 获取细胞样品

##### A. 贴壁细胞

将贴壁细胞用移液器缓慢地吹/刮至悬浮状，或采用胰酶或 EDTA 消化方法制备细胞悬液。



## B. 悬浮细胞

确定细胞生长状态良好。

- (2) 按照 50 万个细胞每管进行分装，准确标记后将分装好的细胞 4℃、500G 离心 5min。（到公司后解冻，由我们再挑选 5 万个相对完整的细胞核进行实验）；
- (3) 小心吸去全部上清，加入 500 μL 预冷的 1×PBS 溶液洗涤，4℃、500G 离心 5min；
- (4) 小心吸去全部液体，加入 1 mL 预冷的细胞冻存液，宽口枪头轻轻敲打细胞沉淀混匀，管壁标记样本名称，慢速梯度降温冻存；
- (5) 梯度降温可参考：4 度 10min > 负 20 度 30min > 负 80 度过夜 > 液氮冻存。
- (6) 将冻存管置于密封性好的塑料袋中，用胶布缠到冰袋上，并在泡沫盒中装入足量的干冰进行运输；
- (7) 为确保实验的顺利，建议样品备份 1-2 份，50 万个/份，以防部分样品降解重新取材，制备或送样。

### 注意事项：

若细胞样本有支原体污染，实验过程无法去除，下机数据会有污染。

## 3.3 全血样本

### (1) 新鲜血液：

每一个样品，建议送样 1~2 mL。血液采集后加入含 EDTA 或柠檬酸钠抗凝管中（因肝素钠抗凝会影响后续实验，故不建议用肝素钠抗凝），轻轻颠倒十次混匀，4℃ 正立放置，确保 5 天内运至实验室。

### (2) 冻存血液：

每一个样品，建议送样 1~2 mL。血液采集后加入含 EDTA 或柠檬酸钠抗凝管中（因肝素钠抗凝会影响后续实验，故不建议用肝素钠抗凝），轻轻颠倒十次混匀，4℃ 正立放置，平衡 2 h 后直接液氮速冻，干冰运输。

### 注意事项：

- (1) 取样前要做好消毒处理：包括取样部位、取样器材、取样者戴的手套等，防止所取血液样品被物种本身携带的细菌等污染物污染；
- (2) 准备柠檬酸钠或 EDTA 抗凝管（抗凝管有多种规格）；
- (3) 依据抗凝管的实际规格采取全血样品，比如：10 mL 规格的抗凝管可以取样 10 mL；
- (4) 取完血后，迅速轻柔颠倒混匀全血样品，保证血液与抗凝剂充分混匀；
- (5) 天气较热时：含有血液样品的抗凝管运输时使用冰袋低温运输，注意，冰袋不要与抗凝管直接接触，以防止血液冻凝；天气较冷时：含有血液样品的抗凝管运输时无需加冰袋运输。