

代谢组送样要求及样本预处理

一、送样要求

样本类型	非靶向代谢	脂质组	类靶向代谢	靶向代谢
动物组织	250mg	250mg	250mg	250mg
植物组织	250mg	250mg	250mg	1 g
血清/血浆	200μL	200μL	200μL	200μL
尿液	500μL	2mL	500μL	1mL
唾液	250μL	1mL	-	500μL
脑脊液、羊水、胆汁等体液	200μL	1mL	200μL	500μL
细胞	10 ⁷ (50μL)	10 ⁷ (50μL)	10 ⁷ (50μL)	10 ⁷ (50μL)
培养基上清	>5mL	>5mL	>5mL	>5mL
微生物菌体	250mg/250μL	250mg/250μL	-	250mg/250μL
微生物菌液	>5mL	>5mL	-	>5mL
微生物培养基	350mg	350mg	-	350mg
粪便/肠道内容物	250mg	250mg	250mg	250mg
土壤样本	1 g	1 g	-	1 g

注：细胞保证数目一致，菌体为菌体沉淀
请使用 2mL 的进口离心管进行样本分装。

二、样本的预处理

1. 动物组织类代谢组学样本处理方法

1.1 组织样本处理步骤

1) 动物组织样本：若取整个组织采用灌流法，用预冷的去离子水去除组织中的血液残留；若取部分组织则在破碎组织后用预冷的去离子水漂洗掉血液残留；

人组织样本：小的活检样本，快速用预冷的去离子水冲洗，去除血液残留；

2) 根据具体实验设计取特定的部位，250 mg/sample 装入离心管中；

3) 做好标记后迅速放入液氮中冷冻处理至少 15min;

4) -80℃冰箱冻存。足量干冰寄送。

1.2 注意事项

1) 生物学重复取样部位尽量保持一致;

2) 组织样本收集处理过程中注意避免麻醉、Ep 管、收集器械等的污染;

3) 样本收集应快速、冰上进行操作, 尽量减少在-20℃或-80℃冰箱中保存时间;

4) 及时分装样本, 避免反复冻融。

2. 细胞代谢组学样本处理方法

2.1 细胞样本处理步骤

1) 悬浮细胞样本: 离心收集悬浮细胞, 用预冷的 PBS 快速清洗 2~3 次, 4℃, 1000g 低速离心 1min, 弃去上清, 收集细胞 (细胞沉淀 50 μ L) 于 2 mL 进口离心管中, 液氮速冻 15min, -80℃保存, 足量干冰运输。

2) 贴壁细胞样本: 将培养好的细胞去除培养基, 用预冷的 PBS 清洗 2~3 次, 弃去上清, 最后加入 1mL 预冷的 80%的甲醇水溶液 (色谱级), 使用细胞刮将培养容器中所有细胞都刮取干净, 进行细胞计数 (10^7), 转入 2 mL 进口离心管 (冻存管) 中, 液氮速冻 15min, -80℃保存, 足量干冰运输。

2.2 细胞培养基 (研究细胞外代谢) 处理步骤

吸取大于 5mL 贴壁细胞的培养基, 1000g, 4℃离心 1min, 取全部上清, 液氮速冻 15min, 冻存到-80℃冰箱内, 足量干冰寄送。

2.3 注意事项

1) 每个样本收集细胞数目尽量保证一致, 上述整个过程需尽量迅速完成。

2) 培养基类型影响代谢物的种类, 需保证细胞培养过程中培养基类型一致。

3) 研究胞外代谢, 在保证细胞存活率的情况下请使用无血清培养基。

4) 将每个样本做好标记。

3. 血浆、血清代谢组学样本处理方法

3.1 血浆样本处理步骤

推荐使用肝素钠抗凝管采集全血，并尽快进行血浆分离：3000rpm 4℃离心 10min，取上层，0.2mL/管分装至 2 mL 离心管中。做好标记后，液氮速冻 15 min，-80℃冰箱冻存。足量干冰寄送。

3.2 血清样本处理步骤

血液收集在离心管或真空采血管中 37℃(或室温)静置 1h 进行凝固分层。然后 3000rpm 离心 5min，取上清转至干净的离心管中。再 12000rpm 4℃离心 10min，取上清分装到 2 mL 离心管中，每管 0.2mL，做好标记后，液氮速冻 15min，-80℃冰箱冻存。足量干冰寄送。

3.3 注意事项

- 1) 取样前动物样本禁食不禁水至少 10h，临床样本取样前 3 天，注意饮食清淡，取样前一天 8 点以后禁食禁水。样本处理过程尽量保持一致，包括样本放置时间、离心时间等。
- 2) 取血时如用酒精消毒，请擦干擦拭部位，待酒精完全挥发后再取样。
- 3) 采血管选择：血浆：推荐使用肝素钠抗凝管（绿色头盖），柠檬酸钠抗凝剂（蓝色或黑色头盖）与 EDTA 抗凝剂（紫色头盖）会对代谢物产生干扰及基质效应，但 EDTA 抗凝管的干扰可以通过上机空白对照进行干扰的扣除，不影响代谢物检测。血清：采血时请使用不加抗凝剂的真空采血管（红色盖头）。
- 4) 建议尽量多收集样本并使用 2mL 离心管分装冻存，切记避免反复冻融。
- 5) 血清参考得率：30%~50%（例如：1mL 全血大约能得 0.3~0.5mL 血清）；血浆参考得率：≈50%（例如：1mL 全血大约能得 0.5mL 血浆）。

4. 唾液代谢组学样本处理方法

4.1 样本处理步骤

上午 9:30-11:30 取样，将唾液外吐于无菌痰杯内（保持冰浴），不要咳痰，短

时间内收集足量样本，4℃，2000g 离心 10min，取上清，再经 0.22 μm 滤膜过滤除菌（可不过滤），分装 2-3 管，液氮速冻 15min，保存于 -80℃，足量干冰寄送。

4.2 注意事项

1) 禁食禁烟禁酒 1h 以上，取样前不要刷牙。 2) 建议尽量多收集样本并使用 2mL 离心管分装冻存，切记避免反复冻融。

5.尿液代谢组学样本处理方法

5.1 样本处理步骤

晨起中段尿（临床）或晨间 1h 尿（动物），3000rpm，4℃ 离心 10min，取澄清尿液，分装到离心管中，每管 500mL，做好标记后，液氮速冻 15min，-80℃ 冰箱冻存，足量干冰寄送。

5.2 注意事项

1) 若动物 1h 尿量不够，可分多次收集，如果需要收取 24h 尿液，请使用带有低温装置的代谢笼收取，并添加叠氮化钠（0.05~0.1%w/v）。
2) 叠氮化钠的作用是防腐杀菌，有毒，请万分小心。

6.粪便、肠道内容物代谢组学样本处理方法

6.1 样本处理步骤

收集到新鲜粪便或肠道内容物样本后，分装样本 250mg/管，然后立即用液氮速冻处理 15min，做好标记后保存至 -80℃ 冰箱，足量干冰寄送。

6.2 注意事项

由于粪便/肠道内容物中有非常多的微生物，微生物代谢速度非常快，所以反复冻融会对代谢水平有非常大影响。建议样本收集后，按照 250mg/sample 进行分装冻存。

7、微生物代谢组学样本处理方法

7.1 微生物菌体取样步骤

采用离心法收集菌体（保证离心后菌体的体积一致），用预冷的 PBS 快速冲洗 2-3 次，每次清洗后 4℃，5000rpm，离心 5min；将上清完全弃去，菌体收集在 2 mL 进口离心管（冻存管）中，液氮速冻 15min，-80℃ 保存，足量干冰运输。

7.2 微生物培养液（研究胞外代谢）取样步骤

培养好的菌液混匀后，取大于 5mL 的菌液，3000rpm，4℃ 离心 10min，取全部上清，液氮速冻 15min，冻存到-80℃ 冰箱内，足量干冰寄送。

7.3 微生物固体培养基取样步骤

用刀片将培养基切成 2g 的正方形片，液氮速冻 15min，冻存-80℃ 冰箱内，足量干冰寄送。

7.4 注意事项

- 1) 微生物代谢速度非常快，所以所有的步骤需要尽快完成；
- 2) 不同样本间菌体数量要保持一致；
- 3) 一般 OD₆₀₀ 在 0.6~0.8 之间表明细菌处于对数生长期，经验浓度为 10⁸/mL，需根据具体情况确认。

8. 植物类代谢组学样本处理方法

8.1 叶片、茎、花

8.1.1 样本处理步骤

取整片叶片/一段茎/一朵花，用锡箔纸包裹并标记后，迅速放入液氮中冷冻处理至少 15min。取出后迅速放入自封袋中（每组一袋），在自封袋中放入标签纸注明样本信息。迅速放入-80℃ 冰箱冻存。足量干冰寄送。

8.1.2 注意事项

- 1) 采集叶片样本时，最好在中午光照好的时间收集。
- 2) 根据实验设计，采集样本时保持样本一致性，尤其是同一组样本（颜色、衰老程度、叶脉占比、光照、位置等）。

3) 由于锡箔纸上 marker 笔标记容易模糊，所以建议同时在自封袋中放入标签纸注明。

8.2 根

8.2.1 样本处理步骤

- 1) 取整株植物的根部，迅速用 $1\times$ PBS 漂洗掉根上的泥土。
- 2) 根据具体实验设计取植株根特定的部位，500mg/sample 装入离心管中。
- 3) 做好标记后迅速放入液氮中冷冻处理至少 15min。
- 4) -80°C 冰箱冻存。足量干冰寄送。

8.2.2 注意事项

- 1) PBS 漂洗时间要尽快；
- 2) 由于根部组织特别脆弱，被挤压后会变成浆糊状，所以推荐保存至离心管中，不建议用锡箔纸包裹。

8.3 果实、种子

8.3.1 样本处理步骤

- 1) 对于含多汁、块头较大的果实（番茄、西瓜、苹果等）需要先用锋利的刀分割成“均匀”合适的小块（ $\approx 250\text{mg/sample}$ ）分装至 2mL 离心管中，做好标记后迅速放入液氮中冷冻处理至少 15min。
- 2) 对于细小的颗粒种子（拟南芥种子、谷物种子等），可以先将同一组的植株种子混匀后再分装（ $\approx 250\text{mg/sample}$ ）至 2 mL 离心管中。做好标记后迅速放入液氮中冷冻处理至少 15min。
- 3) 对于要求对整个果实进行提取的（整粒葡萄等），需要把果实装在 50mL 离心管中/自封袋中，做好标记后（同时放入自封袋中标签纸，注明样本信息）迅速放入液氮中冷冻处理至少 15min。

8.3.2 注意事项

1) 对多汁的果实进行取样很难保持均一性（如番茄、皮、果肉、果瓢、籽的占比），强烈建议将整个果实进行研磨、冻干，对粉末进行称重分装。

2) 不推荐用锡箔纸包裹。

9.土壤代谢组学样本处理方法

9.1 土壤样本取样步骤

将收集到的土壤样本用离心管收集，冷冻干燥；将土壤进行过筛处理：使用 2mm 土壤筛以中速振动 2 分钟，并用容器收集；将收集到的样本每 500mg 放入进口离心管（冻存管）中，液氮速冻 15min，-80° C 保存，足量干冰运输。

9.2 注意事项

土壤筛和收集容器均需用 70%乙醇进行擦拭，并保证使用时是干燥的。