

附件 B：血清和血浆收集、分离和储存的建议

本流程针对使用下列试剂盒对血清、血浆样本中的无细胞 RNA 进行提取时的样品收集处理和储存给出了建议，不保证其他样品和提取试剂盒的使用效果：

- miRNeasy Serum/Plasma Kit
- miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit

为了从全血样品中分离循环无细胞核酸，我们建议遵循下述流程，包括了初始的低速离心来从血清或血浆分离细胞，然后使用高速离心或过滤来移除可能的细胞碎片。后续的离心步骤能够显著降低细胞或基因组 DNA 和 RNA 的数量。由于细胞内的 RNA 含量很高，即使是少量的细胞碎片也会引起表达谱的巨大变化。从血液收集到去除细胞成分的速度越快，胞内核酸带来的污染风险越低。

¹第二步离心的速度会影响不同类型核酸的回收效率。中速（如 3000xg）能显著移除细胞物质，包括血小板和凋亡小体。更高速度的离心（如 16000xg）能移除从破裂的血细胞中去除完整的染色质，但是也会移除更大的可能包含游离核酸（尤其是 mRNA）的胞外小体。

0.8 μ m 针头滤器（如密理博 SLAA033SB）能够基于尺寸来去除细胞组分和碎片，而不是密度。这类滤器的死体积在 100-200 μ l 左右。

¹ 本中文版为对 QIAGEN 《miRNeasy Serum/Plasma Advanced Handbook》的非官方翻译，仅供参考使用，限于水平，可能存在表述错误和歧义，请以原版为准。如需英文原版请联系我司。

流程：血浆分离和储存

1. 使用含 EDTA 的 BD Vacutainer® Venous Blood Collection tubes (367525)收集血液（或者其他任何含有 EDTA 作为抗凝剂的采血管）。在室温（15-25℃）或者 4℃下存放少于 1 小时。

注意：不要使用肝素作为抗凝剂的采血管，因为肝素会干扰下游的实验，例如 RT-PCR。

2. 使用水平转头，在 4℃下以 1900 x g（3000 rpm）离心 10min。
3. 小心移取上方的（黄色）血浆到新的锥底管内，注意不要扰动中间白膜层（含有白细胞和血小板）。通常可以从 10ml 全血中获得 4-5ml 的血浆。

注意：不慎吸取的白细胞和血小板是胞内 miRNA/RNA 污染的主要来源

注意：在这个阶段就能提取无细胞核酸。但是，增加一个过滤或者离心操作能够去除细胞碎片并尽可能降低 gDNA 和细胞内 RNA 的污染。

4. 在 4℃下以 3000xg 离心 15min（或者 16000xg 下离心 10min），或用 0.8μm 滤器过滤。

这一步操作可以尽可能去除结合在细胞碎片上的胞内核酸。

5. 小心将上清转移到新的管内，尽量不要扰动底部沉淀，沉淀会呈涂抹状贴附在管底或管壁。
6. 如果样本在当天（6h 内）就提取核酸，则可以在 2-8℃暂存。如果要长时间保存，则建议根据实验目的进行分装后存储于 -65℃~-90℃。
7. 冻存的血浆样品在使用之前在室温（15-25℃）充分融化。

可选：为了移除沉淀物，将融化的血浆样本在 3000xg，4℃离心 5min，或者通过 0.8μm 过滤器。将上清转移到新的管内，并开始核酸纯化流程。

流程：血清分离和储存

1. 使用含或不含促凝剂的采血管均可用于血液收集，但是采血管不能含有 EDTA 或柠檬酸这类抗凝剂。为了充分凝血，将管放在室温（15-25℃）10min 到 1h。

注意：含有促凝剂的采血管可以将凝血时间缩短到 10min，而不含促凝剂的采血管需要在室温下放置至少 30min 来达到充分凝血。

2. 使用水平转头，在 4℃下以 1900 x g（3000 rpm）离心 10min。

注意：如果使用 Sarstedt S-Monovette Serum-Gel 9ml 管，在上层血清和下层细胞间会形成胶层，能有利于血清的回收。

3. 小心移取上方的（黄色）血清到新的锥底管内，注意不要扰动中间白膜层（含有白细胞和血小板）。通常可以从 10ml 全血中获得 3-5ml 的血浆。

注意：放置将细胞内物质转移到上层。

注意：这个阶段就能提取无细胞核酸。但是，增加一个过滤或者离心操作能够去除细胞碎片并尽可能降低 gDNA 和细胞内 RNA 的污染。

4. 在 4℃下以 3000xg 离心 15min（或者 16000xg 下离心 10min），或用 0.8μm 滤器过滤。

这一步操作可以尽可能去除结合在细胞碎片上的胞内核酸。

5. 小心将上清转移到新的管内，尽量不要扰动底部沉淀，沉淀会呈涂抹状贴附在管底或管壁。

6. 如果样本在当天（6h 内）就提取核酸，则可以在 2-8℃暂存。如果要长时间保存，则建议根据实验目的进行分装后存储于 -65℃~-90℃。

可选：为了移除沉淀物，将融化的血浆样本在 3000xg，4℃离心 5min，或者通过 0.8μm 过滤器。将上清转移到新的管内，并开始核酸纯化流程。