

用于高通量测序研究的人类血液样本采集、 处理、运输和储存规范

Blood sample collection, processing, transportation and storage
specification for high-throughput sequencing research

2016 - 04 - 08 发布

2016 - 05 - 01 实施

深圳市市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 样本采集前准备	2
6 样本采集	3
7 样本处理	3
8 样本运输	5
9 样本储存	5
10 质量控制	6
11 信息收集与信息管理系统	6
附 录 A（资料性附录） 知情同意书示例	7
附 录 B（资料性附录） 主要仪器耗材列表	9
附 录 C（资料性附录） 血液样本包装示例	10
附 录 D（资料性附录） 样本信息表	12
参考文献	13

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由深圳市发展和改革委员会归口。

本标准负责起草单位：深圳华大基因研究院。

本标准主要起草人：周欣、李启沅、尹洁芳、贾佳。

本标准首次发布。

引 言

作为临床医学、转化医学等领域研究的主要材料，血液样本是重要的人类遗传资源之一，越来越受生命科学研究人员的重视。随着高通量测序技术的迅猛发展，科学界也开始越来越多地应用高通量测序技术来解决生物学问题，目前已广泛应用于寻找疾病的候选基因上，以更好地理解致病突变以及从根源上对疾病进行诊断和治疗。我国的很多科研单位、大型医疗机构已开始大量收集血液样本以用于后续的科研应用。但是针对高通量测序研究用的血液样本采集与处理，目前尚无相关国家标准、行业标准和地方标准，样本的收集、处理与储存工作基本上是科研人员自发的、零散地进行，缺乏系统的设计和规范。多数样本收集工作都是根据工作人员自身的经验开展，不同的样本库因管理机制、经费、技术能力等条件不同而没有统一的标准化工作流程，收集的资源的质量也是参差不齐，甚至无法用于后续的研究，造成资源的严重浪费，进而影响资源的共享。因此，本标准旨在对高通量测序研究的目标分析物核酸的提取或保存高质量的核酸样本进行规范。

对用于高通量测序研究的血液样本采集、处理、运输和储存操作规程进行统一，也是储存、利用人类遗传资源的前提与基础工作。标准化的血液样本采集、处理、运输和保存，在保护我国的生物样本资源、规范医院、科研机构等单位生物样本库的建立与运营、规范血液样本相关的工作流程与操作具有重要作用，为基础研究、转化医学等领域提供高质量的样本，促进我国转化医学及生物样本库规范有序的发展上具有重大国际战略意义。为使相关工作有章可循，规范相关操作和管理，促进人类遗传资源的保护、研究与开发，加强血液样本的充分利用和共享，我们基于目前的研究积累，参考行业中各专家的建议，制定了本标准。

用于高通量测序研究的人类血液样本采集、处理、运输和储存规范

1 范围

本标准规定了用于高通量测序研究的人类血液样本的采集、处理、运输和储存的基本原则和标准操作规程。

本标准适用于用于高通量测序研究的人类血液样本。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）适用于本文件。

GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写

WS/T 224-2002 真空采血管及其添加剂

SZDB/Z 53-2012 孕妇外周血基因检测胎儿“21-三体综合征”标准

SZDB/Z 91-2014 人类样本库建设与管理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准

3.1

样本 sample

在某特定时间从受检者或捐献者采集到的血液样本。对于某些人类样本，样本可以表示个体的意思。

3.2

捐赠者 donor

按照法定的医学标准、程序和个人隐私法规确定后提供作为样本的人。有的国家用“受试者”或“个体”来表示捐赠者，尤其是在涉及到人体样本的时候。

3.3

知情同意 informed consent

有完全行为能力的个人获取必要信息并充分理解其内容，经考虑后作出同意检测或参与研究的决定。此决定不受恐吓、利诱或其他不当行为的影响。

3.4

知情同意书 informed consent form

受试者、捐赠者或其法定监护人表示自愿捐赠个体生物样本而签署的文件。

3.5

生物安全柜 biosafety cabinet

具备气流控制及高效空气过滤装置的操作柜,可有效降低实验过程中产生的有害气溶胶对操作者和环境的危害。

3.6

感染性样本 infectious specimen

含感染性物质的样本,对可能接触到的人或动物有感染性危害。

4 缩略语

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

RIN: 核糖核酸完整性指数 (RNA Integrity Number)

rRNA: 核糖体核糖核酸 (ribosomal RNA)

5 样本采集前准备

5.1 采集方案设计

应根据样本的研究目的,制定合理的采集方案。采集方案的内容应包括样本的种类、采集的时间、地点、人员、方法等。

5.2 科学性审查和伦理审查

5.2.1 采集方案科学性及生物安全审查

样本采集方案实施前,科学审查委员会应对方案的科学性及生物安全进行审查。科学性审查至少应包括:方案的可行性,如采集的样本如需进行医学诊断,应先满足捐赠者在医学诊断上的需求,剩余的部分才能收集用于科学研究;样本的价值,如采集的样本是否符合当前研究目的或将来可能的研究需要,避免重复采集和采集不需要的样本。对于有研究价值,目前较少或者较难获得的样本应优先采集。样本的采集应符合生物安全政策。

5.2.2 伦理委员会审查

项目启动或样本采集前应提交相关材料至伦理委员会,进行伦理审查,审查通过方可进行样本的采集。整个样本采集过程期间应接受伦理委员会的监督检查。

5.3 捐赠者知情同意

样本采集应遵循“知情同意、自愿”的原则。工作人员(包括医生、样本操作技术人员等)应与捐赠者沟通,详细讲解项目背景、意义,采集的样本量、用途、潜在风险以及捐赠的权利、义务等,获得捐赠者的知情同意。知情同意书参考附录A。

5.4 告知捐赠者采集流程

工作人员应与捐赠者进行沟通,告知捐赠者样本采集流程、注意事项。

5.5 准备仪器、试剂、耗材

5.5.1 样本采集前应先准备所需的仪器、试剂和耗材，并确认仪器可以正常使用。主要仪器、耗材清单参照附录 B。

5.5.2 对于样本标签，应根据 SZDB/Z 91-2014 的要求，进行样本的编码，设计并打印合适数量的标签。在知情同意书、采血管等需要粘贴标签的地方贴上标签。标签的数量应比实际需求多出 1-2 个，以备丢失等特殊情况时使用。

6 样本采集

6.1 安全采样

6.1.1 所有的生物样本都应当认为是具有潜在感染性的。采样过程中，相关工作人员须做好采样时的安全防护措施保证捐赠者、工作人员安全和样本不受污染。

6.1.2 接触样本的工作人员必须穿戴实验服或护士服、口罩、帽子、手套，必要时可戴上护目镜；

6.1.3 样本处理工作人员最好接种过血液传染病如乙型肝炎的疫苗。

6.2 采集操作

6.2.1 采血管的选择：选择采血管时应考虑其抗凝剂对样本及后续处理的影响。应选用不影响核酸提取及后续实验的采血管如 EDTA 抗凝管进行样本采集。

6.2.2 粘贴标签：样本采集前仔细核对捐赠者信息，确定无误后将标签粘贴至采血管上。

6.2.3 血液采集：采集人员用碘酒消毒穿刺部位，采集抗凝血 5-10ml。轻柔颠倒混匀 10 次左右。

6.2.4 血液暂存：采集的血液应尽快进行处理。目标分析物为 RNA 的样本应立即处理；目标分析物为 DNA 的样本，如不能立即进行后续处理，应放入 4℃ 冰箱暂存（如无冰箱，可选择放在有冰袋或碎冰制冷的泡沫箱内）。暂存时间不超过 6 小时，且应在 12 小时内完成处理。

7 样本处理

7.1 总则

样本的处理应在 12 小时内完成。

7.2 前期准备

7.2.1 调试仪器：设置离心机参数为温度 4℃，转速 1600g，离心时间为 10 分钟。在血液离心前，需提前 10 分钟插上离心机电源，并启动离心机，确保使用时工作温度达到 4℃ 低温状态。

7.2.2 根据 SZDB/Z 91-2014 的要求，设计并打印合适数量的标签。标签的数量应根据后续样本处理的需求进行调整。将打印好的标签贴至冻存管上。

7.3 血液离心

7.3.1 取出血液样本，对称放于适配器内进行离心，离心后血液分为三层，上层的是血浆，中间的是白细胞层，下层的是红细胞层，如图 1 所示。

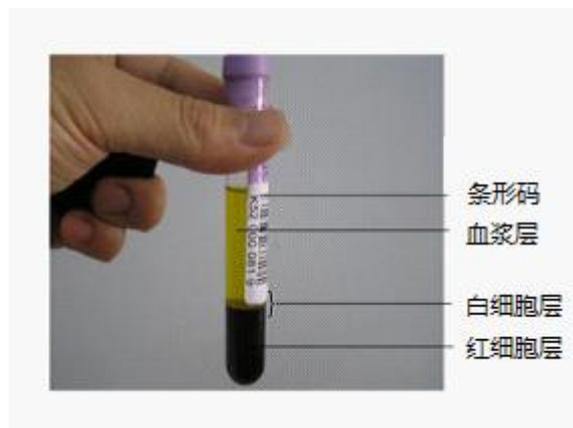


图 1 离心后采血管内血液分层情况示意图

7.3.2 用移液器分别吸取血浆、白细胞层、红细胞层至不同的冻存管中。白细胞层为极薄的一层，为了不影响白细胞的量，在分离血浆时取至白细胞层以上 3-4mm 处为宜。在吸取白细胞层时，将上层剩下的血浆及白细胞层以下 3-4mm 内的红细胞层都吸取。

7.4 血浆处理

7.4.1 血浆中含有游离核酸。为去除残余细胞中核酸对游离核酸的干扰，应将血浆进行二次离心。将血浆在 4℃ 条件下以 16000 g 离心 10 分钟。

7.4.2 血浆根据后续的实验要求进行分装，每管样本量为单次实验所需的量为宜，如 300-500 μ L/管。

7.5 血细胞层的处理

7.5.1 根据研究目的不同，白细胞层可进行 DNA 方向的应用或 RNA 方向的应用。

7.5.2 DNA 方向应用：DNA 方向应用需保证白细胞层中 DNA 的完整。将分离的白细胞层轻微吹打混匀后，根据后续实验需求分装至若干个冻存管中，每管为单次实验所需的量。如暂不确定研究需求，至少分装 2 管以备份储存。

7.5.3 RNA 方向应用：RNA 方向应用需保存白细胞层中 RNA。

- a) 利用红细胞裂解液裂解白细胞层中混杂的红细胞；
- b) 4℃ 条件下 10000g 离心 10 分钟，分离白细胞团；
- c) 向白细胞团中加入缓冲液清洗细胞团，4℃ 条件下 10000g 离心 10 分钟，得到纯化的白细胞团；
- d) 向白细胞团中加入细胞裂解液及 RNA 保存液，吹打混合均匀；
- e) 将含 RNA 的溶液按照研究需求进行分装，至少分为 2 管，以备份储存。

7.6 垃圾处理

剩余样本按照《医疗废物管理条例》进行处理。

8 样本运输

8.1 包装

- 8.1.1 血液样本应选用三层包装，内层容器、第二层包装以及第三层包装。
- 8.1.2 样本的包装容器应符合 SZDB/Z 91-2014 中对样本包装的要求。
- 8.1.3 内层容器外面要包裹足够量的吸收性材料，以便内层容器打破或泄漏时能吸收溢出的所有液体，避免对样本造成污染。
- 8.1.4 应在样本包装的第二层和第三层之间放置足够量的冷冻剂以保证样本的温度。
- 8.1.5 应在样本包装的第二层和第三层之间放置温度记录仪，以记录样本在运输过程中的温度。
- 8.1.6 血液样本的包装示例见附录 C。

8.2 运输要求

- 8.2.1 转运前进行处理：当样本的采集与储存不在同一个城市时，宜先进行样本处理，再转移至样本库进行储存。
- 8.2.2 转运后进行处理：当样本的采集与储存在同一个城市时，可以直接将原始样本转移至样本库处理，再进行储存。
- 8.2.3 样本的运输应由样本库的工作人员或有资质的生物物流公司来承担。
- 8.2.4 样本的运输应符合 SZDB/Z 91-2014 中对样本运输的要求。
- 8.2.5 全血样本应采用冷藏运输，使用胶体冰袋或其它制冷剂保持 2℃~8℃，以避免后期处理时的反复冻融。血液成分样本应采用冷冻运输，使用足量制冷温度在-20℃以下的制冷剂如干冰、液氮，使运输箱内保持-20℃以下，保证样本的生物学活性及细胞的完整性。
- 8.2.6 对于贵重样本，宜安排运输测试，模拟正式运输的条件，以发现潜在的问题，在正式运输时采取正确的措施。
- 8.2.7 运输前应确认所有的运输信息以及运输目的地国家或地区要求的运输证明文件。运输文件应包括样本相关的详细信息如《样本转移申请表》、《样本转移协议》和《样本信息单》及运输相关的文件和证明如《运送货运单》等。
- 8.2.8 样本的运输还应符合 MH/T 1019 的规定。

9 样本储存

- 9.1 血液成分样本如储存期限不超过 5 年，可储存在-80℃以下。如需长期储存(超过 5 年)，应储存在-132℃以下，如液氮中。
- 9.2 样本应分装多管进行备份储存，以避免意外情况发生后损毁所有样本。
- 9.3 应安装温度监控系统，24 小时实时监测储存设备中的温度。如发生异常情况，能及时进行样本转移等处理，保证样本的质量。

10 质量控制

- 10.1 样本应采用唯一的编号进行样本识别，避免混淆。
- 10.2 工作人员应接受生物安全、检测技术等专业培训。
- 10.3 配备必要的基础设施和适宜的检测环境，对设施和环境进行监控。实验室和样本库的仪器应定期进行维护和检修，如冰箱的定期除霜，液氮罐中液氮的补充，离心机的日常维护，以保证样本能及时处理和正常储存。
- 10.4 严格控制样本采集、暂存、处理的时间及温度，避免目标分析物 被污染或降解。
- 10.5 应按照统计学常规抽样方法，根据需求或周期性的对样本进行抽检：对于目标分析物为 DNA 的样本，提取 DNA 并评估其完整性（降解程度）、纯度和浓度；对于目标分析物为 RNA 的样本，提取 RNA 并评估其完整性（RIN 值、电泳图、28S/18S 比值）、浓度和纯度。

11 信息收集与信息管理系统

- 11.1 完整的样本信息应包括捐赠者基本信息、诊疗记录以及样本操作记录。
- 11.2 捐赠者基本信息包括捐赠者 ID、性别、出生年份、居住地址、联系方式等。
- 11.3 捐赠者诊疗记录包括捐赠者样本采集时的体检信息、既往病史、疾病的诊断及治疗记录等。
- 11.4 样本操作记录包括样本采集、处理、运输与储存相关的所有记录。如样本 ID、采集日期、采样量、处理日期、处理所用的时间、处理过程中的温度等。具体可参照附录 D。
- 11.5 将捐赠者资料复印两份，其中一份置于异地储存，以防环境等其他因素导致的资料损毁。另一份留作常规查询使用。原始资料经过防潮防腐处理后置于密封的档案柜储存。
- 11.6 如有条件，建议使用样本管理系统，对样本及其信息进行管理。应根据实际需求制定备份周期，按周期对样本信息与数据进行备份。样本信息管理系统应符合 SZDB/Z 91-2014 中的相关规定。

第二部分 知情同意签名

告知声明

我已告知该捐赠者可能的风险及获益情况，给予他/她足够的时间阅读、与他人讨论知情同意书，并解答了其相关的问题；我已告知该捐赠者当遇到与自身权利/权益相关问题时可随时与 XXX 生命伦理委员会联系，并提供了准确的联系方式；我已告知该捐赠者将得到这份知情同意书的副本（共两页），上面包含我和他/她的签名。

样本采集者签名 _____ 日期 _____

知情同意声明

我已详细阅读了知情同意书，样本采集人员已向我作了详尽的说明，我完全了解参加本次样本采集的目的、我的权益和风险等，并确保个人信息是保密的。

我自愿参加本次样本采集，并同意按照《知情同意书》的内容配合取样人员的操作，认真完成本次采样。

本知情同意书共两页，我将得到签名后的知情同意书复印件。

我声明

- 我同意捐献我的生物样本给 XXX；
- 我允许我的样本及数据将来用于所有经 XXX 生命伦理委员会批准的研究项目。

捐赠者签名 _____ 日期 _____

（当捐赠者无法签署知情同意书时，替换为以下方式）

法定代理人签名 _____ 日期 _____

与捐赠者的关系 _____

附录 B
(资料性附录)
主要仪器耗材列表

表B.1给出了主要仪器列表，表B.2给出了主要耗材列表。

表B.1 主要仪器列表

阶段	仪器名称	用途
采集	低温标签制作套装	打印标签
	冷藏冰箱	样本暂存
处理	冷藏冰箱	样本暂存
	低温标签制作套装	制作标签
	条码扫描器	扫描条码
	冷冻离心机	采血管离心
	生物安全柜	操作平台
	漩涡震荡器	震荡
	移液器	包括 100 μ L、200 μ L、1000 μ L 三个量程的
储存	冻存架	放置冻存盒
	-80 $^{\circ}$ C冰箱	部分样本储存
	液氮罐	部分样本储存

表B.2 主要耗材列表

阶段	耗材名称	用途
采集	手套	个人防护
	弹力绷带	血液采集用
	棉签	消毒
	采血管	采血容器
	采血针	穿刺
	标签	样本标识
	口罩	个人防护
处理与储存	冻存管	储存样本
	冻存盒	放置冻存管

附 录 C
(资料性附录)
血液样本包装示例

C.1 三层包装

生物样本应选用三层包装，内层容器、第二层包装以及第三层包装。

C.2 包装步骤

C.2.1 内层容器：血液样本的内容容器为盛装全血的采血管或盛装血液成分的冻存管。

C.2.2 第二层包装

a) 全血样本的第二层包装

以泡沫盒为例。将放于10 X 10泡沫盒上的血液标本，用皮筋等稍加固定，装入大小刚好合适的纸盒进行固定，透明胶封紧（条件不允许是可用报纸或保鲜膜将装有血液样本的泡沫板整体打包并用透明胶将打包好的泡沫板整体封紧）。如图C.1所示。

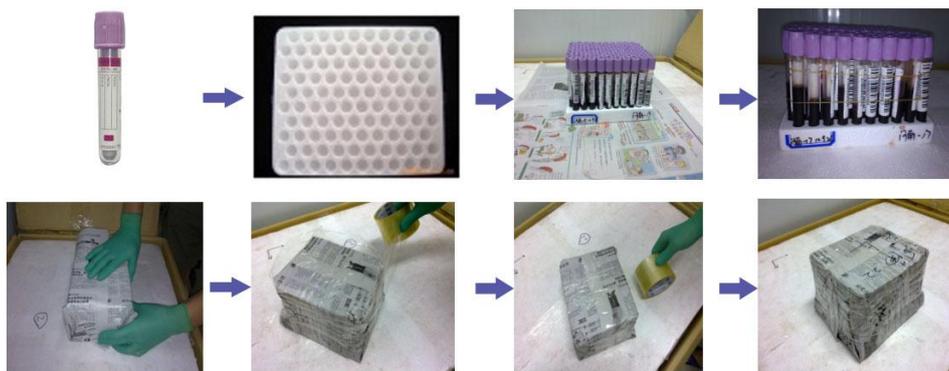


图 C.1 采血管第二层包装简易流程图

b) 血液成分的第二层包装

分装好的血液成分样本放入冻存盒中，即为第二层包装。

C.2.3 第三层包装

a) 放入吸收剂

将封紧的纸盒或打包好的泡沫板或冻存盒整体放进外包装箱内（聚乙烯泡沫盒或医疗样本运输箱），将吸收剂（棉花球/报纸/塑料袋等）放置在第二层包装物和最外层包装物之间，以确保多个第二层包装物被吸收剂包裹，以防被触碰。

b) 加入冷冻剂

对于全血样本，在上述外包装箱内放入足够的冷冻剂如冰袋，确保箱内温度在12小时内保持在4℃-8℃。对于血液成分样本，应使用制冷温度在-20℃以下的冷冻剂如干冰。以干冰

为例，准备10kg的干冰，先将泡沫箱底铺上20mm厚的干冰。将冻存盒放在干冰上。用剩余的干冰将冻存盒周边填满并完全覆盖冻存盒。（如图C.2所示）。

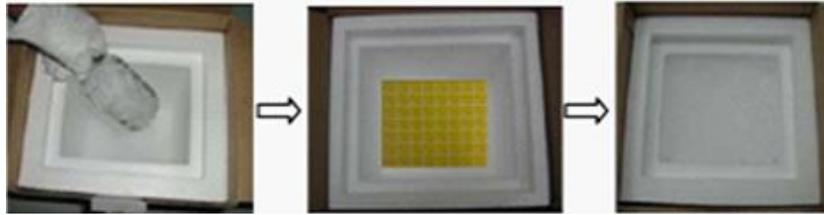


图 C. 2 冻存盒第二层包装简易流程图

c) 放入温度记录仪

把温度记录仪放在外部包装里面，监控样品在运输过程中的温度，确保样品在最适合温度。

d) 粘贴外标签

最外层包装应该贴上相应的包装规格标示，如图C.3所示。



图 C. 3 包装标签示意图

附录 D
(资料性附录)
样本信息表

表 D.1 给出了样本信息表。

表 D.1 样本信息表

捐赠者基本信息			
捐赠者姓名		捐赠者 ID	
性别	<input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	出生日期	
样本采集/处理信息			
样本类型		样本 ID	
样本容器		样本体积	
采样日期		采样时间	
处理前暂存时间		处理前暂存温度	
处理方法	(温度、操作):		
处理开始时间		处理完成时间	
处理后操作	(温度、操作):		
转移方式	<input type="checkbox"/> 冰袋 <input type="checkbox"/> 干冰 <input type="checkbox"/> 液氮		
转移起始时间		转移终止时间	
冻融次数		生物安全级别	
是否有添加剂		添加剂种类	

说明:

- 1) 样本类型包括全血、血浆、白膜层、DNA、RNA 等。
- 2) 如进行过样本处理或转移, 需填写相关信息, 无样本处理或转移, 则忽略相应项。
- 3) 样本容器的信息尽量详细, 血液样本的容器需要写明类型 (EDTA 抗凝管、ACD 管等)。
- 4) 各时间点尽量精准, 以控制样本的质量。

参 考 文 献

- [1] 《赫尔辛基宣言》
 - [2] 《纽伦堡法典》
 - [3] 生物样本库最佳实践 2012 科研用生物资源的采集、贮存、检索及分发[J]. 中国医药生物技术, 2012. 7(Supp).
 - [4] Blood Sample Collection, Processing and Transport. UK Biobank. 2011.
 - [5] 中国人类遗传资源标本采集、运输和保存技术规范[S]. 中国人类遗传资源平台项目组, 2006.
 - [6] 陈朝红,刘志红. 肝素抗凝对全血 DNA 提取及 PCR 扩增效率的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,1997,6,1.
 - [7] 谢军,张鹏,殷锦堂. 血液运输中温度监控及温控效果比对[J]. 甘肃医药,2011,30(12):728-732.
 - [8] 李东. 血液样本采集方法及其检验结果的影响探讨[J]. 中外医疗,2010, 01:180.
 - [9] MARK HOLODNIY. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Gene Amplification by Heparin. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1991, p. 676-679.
 - [10] Peakman TC and Elliott P. The UK Biobank sample handling and storage validation studies[J]. International Journal of Epidemiology. 2008,37:2-6.
-