



联川生物

掌握基因科技核心技术

联川生物 10x Visium HD 空间转录组样品包埋及运输指南

联川生物 10x Visium HD 空间转录组

样品包埋及运输指南

(适用于人和小鼠新鲜及FFPE/FxF 样本)

杭州联川生物技术股份有限公司
浙江省杭州市钱塘区下沙街道围垦街758号
邮编: 310018

电话: 0571-87662413
传真: 0571-81951905
www.lc-bio.com



目录

1. Visium HD 空间转录组适用的样本类型 (任意一种样本即可)	3
1.1 石蜡包埋组织块	3
1.2 石蜡玻片	3
1) RNA 质检:	3
1.3 OCT 包埋的样本	3
1) RNA 质检:	4
1.4 新鲜固定冻存组织OCT 包埋样本 (FxF)	4
1) RNA 质检:	4
2. 石蜡样本空间转录组样本制备流程	5
2.1 所需试剂和耗材	5
2.2 石蜡样本的制备过程	6
3. 新鲜组织OCT 包埋空间转录组样本制备流程	8
4. 新鲜固定冻存组织OCT 包埋空间转录组样本制备流程	8
4.1 组织固定	8
4.2 组织冷冻包埋	10
5. 质检标准	10
5.1 FFPE 样本	10
5.2 OCT 包埋的样本	11
5.2 FxF 样本	11
6. 运输	11
7. 注意事项	12



1. Visium HD 空间转录组适用的样本类型 (任意一种样本即可)

10x Visium Visium HD 空间转录组采用探针法进行基因的杂交和表达检测, 目前仅适用人、小鼠物种的 FFPE/FF/FxF 样本。其中人近18000 个基因的探针; 小鼠近20000 个基因的探针。

1.1 石蜡包埋组织块

石蜡块具有一定的厚度, 建议厚度2-5mm。石蜡块封装好常温或4℃寄送至联川生物实验室。

以下罗列实际实验过程需要消耗的切片数量:

1) RNA 质检:

① 组织较小: $\leq 6.5 \times 6.5\text{mm}$: 5-10 片切片

② 组织较大: $\geq 6.5 \times 6.5 \text{ mm}$: 2-5 片切片

2) H&E 染色选片: 1-2 片 $5\mu\text{m}$ 厚度切片并染色;

3) 正式试验表达: 1 片 $5\mu\text{m}$ 厚度表达切片。

1.2 石蜡玻片

白片或贴片建议准备6-13片 ($5\mu\text{m}$ 厚度), 需要将切下来的石蜡贴在玻片上 (采用世泰免疫组化的玻片), 且 42°C 进行烤片处理3 小时之后, 密封好 (可放置在玻片盒中), 常温或 4°C 寄送至联川生物实验室。

以下罗列实际实验过程需要消耗的切片数量:

1) RNA 质检:

① 组织较小: $\leq 6.5 \times 6.5\text{mm}$: 5-10 片切片

② 组织较大: $\geq 6.5 \times 6.5 \text{ mm}$: 2-5 片切片

2) H&E 染色: 1~2 片用于染色;

3) 正式实验表达: 1 片。

1.3 OCT 包埋的样本

提供新鲜组织的OCT包埋块, 建议组织大小为长 \times 宽不超 $6.5\text{mm} \times 6.5\text{mm}$, 高度 $\geq 5\text{mm}$, 封装好干冰寄送至联川生物实验室。

以下罗列实际实验过程需要消耗的切片数量:

1) RNA 质检:

质检: 10 μ m/片*10 片;

2) H&E 染色: 1~2 片用于染色;

3) 表达: 10 μ m/片, 1 片;

1.4 新鲜固定冻存组织OCT 包埋样本 (FxF)

提供经过PFA 固定的新鲜组织的OCT 包埋块, 建议组织大小为长 \times 宽不超过6.5mm \times 6.5mm, 高度 \geq 5mm, 封装好干冰寄送至联川生物实验室。

以下罗列实际实验过程需要消耗的切片数量:

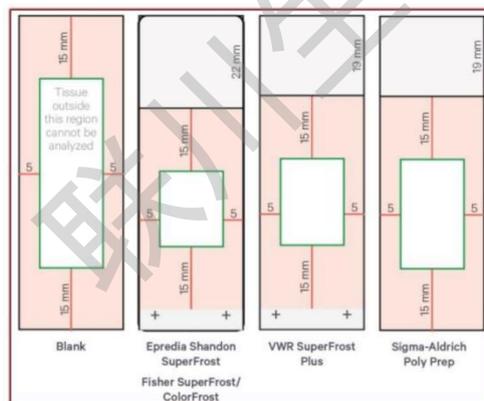
1) RNA 质检:

质检: 10 μ m/片*10 片;

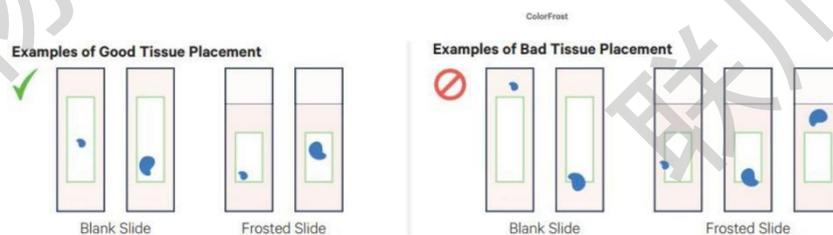
2) H&E 染色: 1~2 片用于染色;

3) 表达: 10 μ m/片, 1 片;

Tips: 如寄送FFPE 切片的玻片, 玻片建议选用世泰玻片 (货号: 188105), 玻片必须是防脱的, 推荐型号及有效区域如下所示;



10x Genomics 官方推荐玻片有效区域

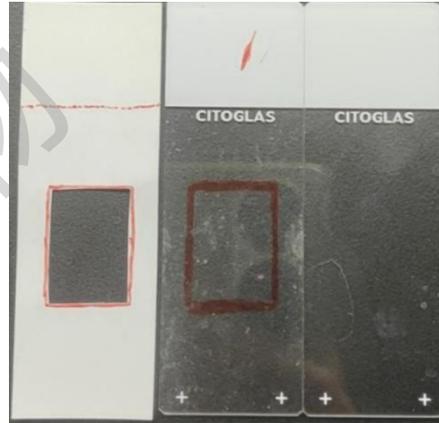


组织尽量贴在玻片正中位置



Slide Brand and Name	Item Part Number	Length(mm)	Width(mm)	Thickness(mm)
Epredia Shandon Colorfrost Plus Slides	6776214	75	25	1
Fisher SuperFrost Slides	12-544-7	75	25	1
Sigma-Aldrich Poly-Prep Slides	P0425-72EA	75	25	1
VWR SuperFrost Plus Slides	48311-703	75	25	1

10x Genomics 官方推荐玻片型号



世泰免疫组化玻片实际的贴片范围 (红色框出来的区域)

玻片的常规尺寸在25mm*75mm*1mm，但是玻片太大或者太小均会导致玻片无法与HD 匹配，故目前HD 兼容组织玻片尺寸为：

- 宽度：24.80mm-25.29mm
- 长度：74.40mm-76.22mm
- 厚度：1mm

2. 石蜡样本空间转录组样本制备流程

2.1 所需试剂和耗材

名称	厂商	货号	备注	提供方
福尔马林/固定液	/	/	/	客户自备
组织包埋盒	/	/	/	客户自备
医用手术刀	/	/	/	客户自备
医用镊子	/	/	/	客户自备
吸水纸	/	/	/	客户自备



2.2 石蜡样本的制备过程

2.2.1 取材

根据 10x Visium HD 空间转录组基因表达芯片捕获区域大小需求 (Visium HD 芯片捕获区域有两种规格, 6.5 * 6.5 mm 和 11 * 11mm) 进行准备, 允许稍大于芯片捕获区域, 高度需 ≥ 5 mm。如单个组织样本量不足, 可将两个组织分别固定、脱水、透明、浸蜡后, 石蜡包埋在同一包埋块内。

2.2.2 组织固定

将材料固定在 10% 中性福尔马林溶液或者 4% 多聚甲醛固定液当中, 福尔马林溶液与材料的比例至少应为 10:1, 推荐使用中性福尔马林缓冲液, 固定时间建议 24-48h, 最好不超过 72h。

Tips:

- ① 新鲜组织离体后用实验专用吸水纸擦干表面, 立即进行固定, 组织缺血离体时间控制在 1h 内。
- ② 组织尽量小而薄, 便于固定剂迅速渗入组织内部, 一般厚度不超过 5mm。
- ③ 将组织固定在 10% 的中性甲醛缓冲液中 (NBF, neutral-buffered formalin)。固定剂应该有足够的量, 一般为组织块体积的 10-15 倍, 固定剂需重新配制, 不可使用经过长期保存的固定剂。
- ④ 在室温下固定 12-24 小时, (厚度小于 0.5 cm 的组织, 对于较大组织可能需要更长的固定时间, 具体时间需测试)。
- ⑤ 提醒: 固定时间根据组织类型, 组织块大小确定。
- ⑥ 如固定时间较长, 为终止固定, 可用水洗去渗入组织中的固定液。

说明:

- ① 固定不足可能导致组织中出现伪影, 例如不规则染色质图案、细胞质过度染色 (伊红) 和常见的自溶表现, 组织中的 RNA 可能因未及时被固定而进一步发生降解。
- ② 固定过度的组织块可能过硬, 切片难度增加, 组织 H&E 染色结果可能出现伪影, 例如形状不规则或较小的细胞或深染的细胞核。过度固定也会导致某些分子特征的结构完整性丧失、脂质氧化、过度交联, 不利于后续探针结合 RNA, 直接影响数据的检出转录水平。



2.2.3 脱水

固定后的组织中因含有比较多的水分，所以需使用不同浓度梯度（70%，80%，90%，2*95%和2*无水酒精的脱水程序）的乙醇对组织进行脱水，以确保组织中的水分完全去除干净，为后续的透明及浸蜡做好准备，以保证与透明剂或者石蜡相融合。

Tips:

- ① 脱水时间应根据组织块的大小和组织类型而定。
- ② 组织块在高浓度（无水乙醇）中放置时间不宜过长，无水乙醇吸水能力太强，易造成组织过度硬化，后续切片容易脆裂，同时可能影响RNA完整性，进而影响表达检测UMI。
- ③ 每次更换新的脱水剂时，都要把组织块放在吸水纸上吸干，装组织块的容器需晾干水分，以免将水从低浓度脱水剂带入高浓度的脱水剂中，影响脱水效果。

2.2.4 透明

组织经过脱水之后，需要经过浸蜡的媒剂进行透明，主要的目的是使石蜡完全渗透到组织中，能够起到对包埋的支持作用。目前常用的脱水剂主要是酒精等，需要使用一种既可以和酒精又能和石蜡相混合的媒剂，在组织脱水之后，浸蜡之前将所研究的组织放置到该媒剂中。

2.2.5 浸蜡

组织经透明作用之后，被转移到融化好的石蜡内浸渍，石蜡完全浸入组织间隙，取代透明剂，这一程序就叫浸蜡。根据所用石蜡的熔点，浸蜡需要能够保持于54-60℃温箱内进行。

2.2.6 包埋

将已经经过上述处理的组织块从蜡浴取出后置入充满熔融石蜡的包埋框内，包埋成块，使组织和包埋剂相熔一体并迅速冷却，这个程序称为包埋。包埋剂凝固后，进一步加强了组织的硬度和韧度而便于进行切片。

Tips:

- ◇ FFPE 块优先建议保存在 2-8℃ 环境下，保证保存环境干燥，样本不可在阳光下暴晒。

2.2.7 切片

1. 样本准备：提前将石蜡块冰浴至充分预冷。



2.切片：将切片机设置为 5 μ m 进行切片，让蜡块切成蜡带，并用毛笔挑起、牵引成带，平放在蜡带盒上，靠刀面的一面较光滑，朝下，较皱的一面朝上。用单面刀片切取蜡片一小段，放在载玻上加水一滴，置于放大镜或显微镜下观察切片是否良好。

3.展片：将水浴锅保持在 37-42 $^{\circ}$ C（水浴温度可能需要根据组织类型进行优化），将切片转移到水浴中进行展片。让切片漂浮在水浴表面，直到它的大部分是平的，没有皱纹；漂浮的时间取决于样品的类型。如果切片有太多的褶皱或折叠，让它漂浮更长时间；通过这个摸索大概确定展片时间

4.贴片：在放置切片之前，在空白载玻片背面画出允许区域的轮廓。捞起展开的切片，使其平展于玻片上。

5.烤片：贴好的切片置于 42 $^{\circ}$ C 恒温箱内干燥 3 小时并室温干燥过夜，待蛋白质凝固后于 4 $^{\circ}$ C 保存即可。

Tips:

如果组织膨胀时间过长，请您将水浴温度提高 1 或 2 $^{\circ}$ C，让切片漂浮更长时间。

如果组织膨胀过快并解离，请您将水浴温度降低 1 或 2 $^{\circ}$ C，并缩短漂浮时间。

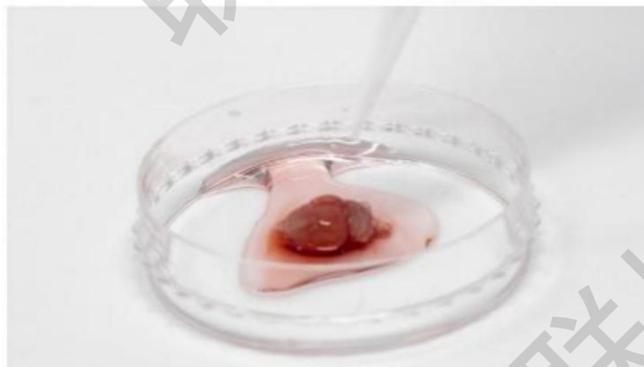
3. 新鲜组织OCT 包埋空间转录组样本制备流程

可按照“新鲜组织包埋（干冰速冻/异戊烷速冻）”的流程完成样本OCT 包埋工作。

4. 新鲜固定冻存组织OCT 包埋空间转录组样本制备流程

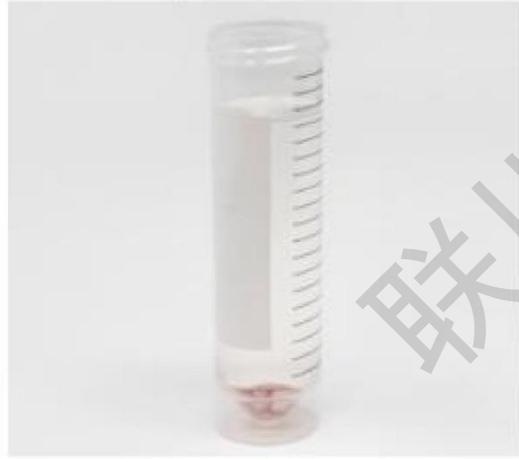
4.1 组织固定

- 1.提前将4% PFA/PBS (pH7.4)、30%蔗糖/PBS 溶液、1X PBS 、OCT 预冷；
- 2.用预冷的1X PBS 冲洗组织，去除残留的血液；



- 3.使用镊子或细胞刮刀，将组织转移到含有新鲜制备4% PFA/PBS 溶液的50ml 离心管中。可将含有组织的离心管放在振荡器上轻轻振荡，在4 $^{\circ}$ C 下约12-16 小

时，直到组织沉入管底，组织块大小影响固定时间。12-16 小时后，将试管从振荡器上取下，检查组织是否已沉入离心管底部。如果没有，每2-3 时检查一次，持续至24 小时；



4.使用镊子或刮刀，将组织转移到含有预冷 1X PBS 的 50 毫升离心管中，室温孵育 1 分钟，小心弃去 PBS，确保组织块停留在试管底部，使用预冷 PBS 重复洗涤两次以上；



5.使用镊子或刮刀，将组织转移到含有30%蔗糖/PBS 溶液的50ml 离心管中，在 4°C 下孵育至组织沉入管底，约6-12 小时。6 小时后，检查组织是否沉入管底。如果没有，每2-3 小时检查一次，持续至12 小时。



4.2 组织冷冻包埋

1. 取一个适当大小的低温包埋盒，标记组织方向，并在室温下放置；
2. 包埋盒内加入预冷的OCT，OCT 的量要完全覆盖模具底层且不能有气泡；
3. 使用预冷的镊子，将组织放入OCT 中，用额外的OCT 覆盖表面。确认没有气泡，特别是在组织附近；
4. 立即将含有组织和OCT 的低温包埋盒置于粉末状干冰上或浸没在异戊烷-液氮中或，等待OCT 完全冻结；禁止将包埋盒直接置入-80℃替代速冻过程。
5. 将OCT 包埋组织块密封保存在-80℃ 中，可长期保存。



注：冰冻切片厚度：10 μ m/片

5. 质检标准

5.1 FFPE 样本

(1) RNA 质检

✓ DV200 \geq 30%: 质检合格



联川生物

掌握基因科技核心技术

联川生物 10xVisium HD 空间转录组样品包埋及运输指南

- ✓ **DV200>26-29%:** 处于质控临界值, 可尝试但存在较大风险, 可能影响UMI counts 及基因中位值, 不建议进行下游实验。
- ✓ **DV200<26%:** 不合格, 不建议进行下游实验

(2) **组织形态质检:** 组织切面完整, 厚薄平均, 切片无明显刀痕、裂隙, 切片平坦无皱褶、折叠, 无污染物(血液残留等); 无气泡; 细胞核与细胞质染色清晰明显, 切片无松散, 表达区域满足客户要求。

5.2 OCT 包埋的样本

(1) RNA 质检

- ✓ **RIN \geq 4.0:** 合格;

(2) **组织形态质检:** 组织切面完整, 厚薄平均, 切片无明显刀痕、裂隙, 切片平坦无皱褶、折叠, 无污染物(血液残留等); 无气泡; 细胞核与细胞质染色清晰明显, 切片无松散, 表达区域满足客户要求。

5.2 FxF 样本

(1) RNA 质检

- ✓ **DV200 \geq 50%:** 合格;

(2) **组织形态质检:** 组织切面完整, 厚薄平均, 切片无明显刀痕、裂隙, 切片平坦无皱褶、折叠, 无污染物(血液残留等); 无气泡; 细胞核与细胞质染色清晰明显, 切片无松散, 表达区域满足客户要求。

6. 运输

在样本运输前, 请您将样本安全的固定包装好, 切片可放置于玻片盒中, 质检石蜡卷放置于EP 管中, 4°C 或者常温下运输, 避免蜡块表面/玻片挤压。



7. 注意事项

(1) 在确保实验准确性和可靠性的前提下，有可能出现样品原因导致不能成功完成全流程实验，其原因可能是①组织在长时间解交联杂交清洗过程中，发生组织脱落，或者组织移位，导致无法转移表达芯片；②组织特性或者组织包埋质量原因导致的在表达芯片上的大面积脱落，严重影响表达区域；③石蜡组织核酸交联严重导致难以捕获导致过程质控不合格等。在相应实验环节均将产生相应费用。

(2) **特殊组织样本（皮肤/脂肪/硬骨/软骨/血管/角膜/视网膜/主动脉斑块/滑膜/韧带/肌腱/脐带等）目前不建议进行空间组学实验**，前期质检不合格率较高脱片风险较大，后期数据结果极差；

(3) 拼片样本（2个）需要采用高防脱玻片600元/个，玻片数量有限，需要售前确认，可能存在备货周期；

(4) 原则上不支持拼片，涉及到多组织拼片目前建议最多2个组织拼在一个捕获区域内，拼片过多石蜡附着较少容易易脱片；其次拼片过程较长，可能对核酸完整性有影响，导致检出量低，此外拼片过程如果出现组织有叠合，重叠部分数据无法纳入分析。

(5) 组织区域的核定与芯片对齐均系人工操作完成，将不可避免具有相应的微移偏差，请甲方知悉。

(6) 石蜡组织面自身存在组织破损时，或者组织截面自身较为细碎时，将存在在长时间液体反应中更进一步破损扩大或者组织脱落移位的风险，请甲方知悉。

(7) Visium HD 单个捕获区域6mm*6mm，外周0.5mm的小区域非常容易出现移位的情况导致捕获不到对应区域内的转录本，请甲方知悉；

(8) 基因表达水平与样品自身特性有关，不同样品间存在一定差异是正常的。