



联川生物

掌握基因科技核心技术

联川生物 10x Visium HD 3' 空间转录组样本准备及运输指南

联川生物 10x Visium HD 3' 空间转录组 样本准备及运输指南

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

1.1 新鲜组织包埋（干冰速冻/异戊烷速冻，选择任意一种方式）	4
1.1.1 所需试剂和耗材	4
1.1.2 新鲜组织包埋操作具体步骤	5
1.2 新鲜组织包埋质检要求	8
其他注意事项	8
风险样本及原因	8
运输说明	9

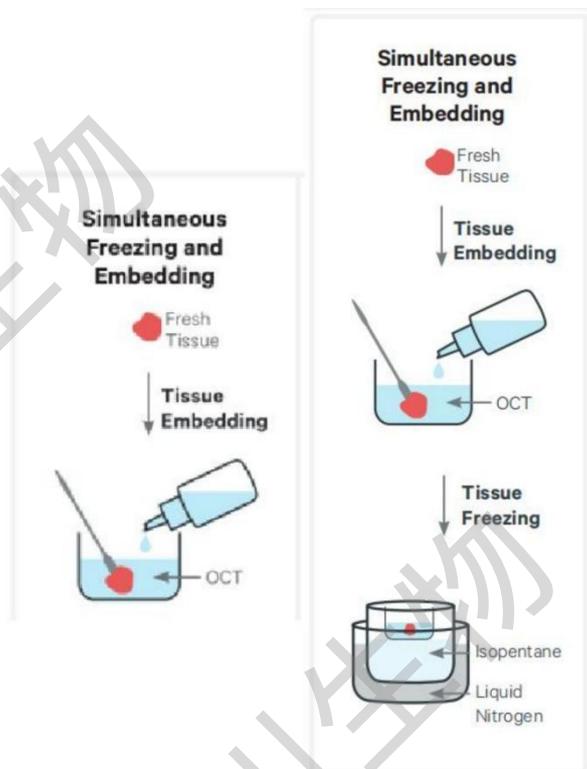
样本处理方式说明:

1. 目前针对新鲜样本优先建议采用干冰进行OCT包埋的方式，建议新鲜取样后半小时内直接用OCT进行包埋并用干冰速冻，干冰建议敲碎成为碎干冰后再进行包埋，这样可以最大程度地实现包埋过程中组织受冷均匀。
2. 对于特殊样本，建议尝试异戊烷冷浴的方式进行OCT包埋。
3. 禁止直接用液氮进行OCT冷冻包埋，液氮的沸点低，包埋盒直接放入液氮后会沸腾，在周围产生气穴，导致降温过程中不同区域降温不同，影响组织形态。

注意：两种方式选择任意一种方式进行包埋，联川提供相应操作视频。操作过程中均需要快速处理，避免组织长期置于常温下，同时避免反复冻融操作，目的是防止组织形态改变和RNA降解。此外，组织离体后一般会经过PBS或者生理盐水清洗表面血渍，在包埋前务必用滤纸等材料将组织表面水分吸干，以免在包埋中组织表面形成冰晶，后续切片容易断裂。

(Visium HD 3': 适用于不限物种新鲜冷冻样本)

1.1 新鲜组织包埋 (干冰速冻/异戊烷速冻, 选择任意一种方式)



新鲜组织OCT包埋干冰速冻和 (左图) 和新鲜组织OCT包埋异戊烷速冻 (右图)

1.1.1 所需试剂和耗材

名称	厂商	货号	备注	提供方
OCT 组织包埋液	Sakura	PN-4583	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
异戊烷+液氮	Sigma (异戊烷)	270342 (异戊烷)	异戊烷+液氮/干冰 选择一种方式即可	客户自备
干冰	/	/	干冰用研钵和杵敲碎为干冰碎, 以保证包埋过程中组织受冷均匀	客户自备
组织包埋盒	/	/	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
医用手术刀	/	/	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
医用镊子	/	/	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备

1.1.2 新鲜组织包埋操作具体步骤

(1) 样本标记

在包埋盒的四边用记号笔标记方向并写上样品名称（如图1和图2）。主要目的是后期包埋完成后，记录样本切面的方向，作为基础信息提供给切片选片环节（**组织放入包埋剂时建议目标切面朝上，方便后续切片时寻找目标切面**）。请客户务必对包埋固定前的组织进行拍照，并提供于样本预约单中。

*该步骤缺失将导致无法确定组织目标截面及最大截面，增加选片环节组织暴露时间，或被迫多个方向变更进行切片选择，将导致过程中组织核酸降解，表达水平检出降低。

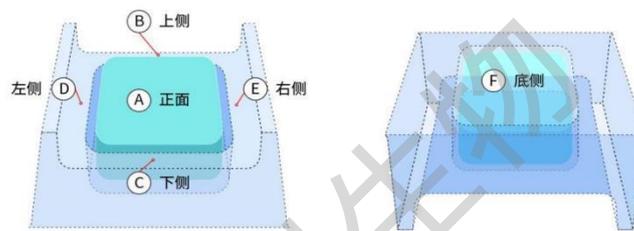


图1：包埋方位标记（左图，正面与上下左右侧；右图，底部）

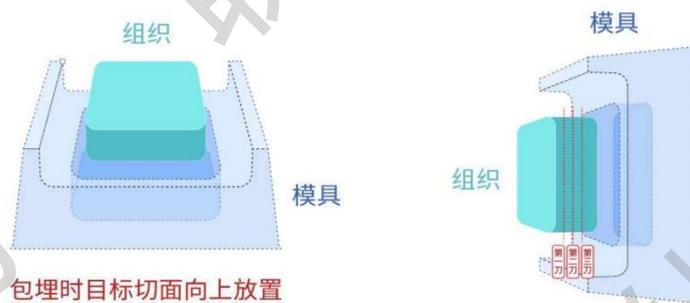


图2：组织包埋时目标组织在包埋盒中的形态及切片方向示意

(2) 取样

建议新鲜的组织样本大小为长×宽不要过大，建议如下范围6.5mm×6.5mm，高度≥5mm的组织块（空转芯片的面积为6.5mm×6.5mm），**用实验专用吸水纸擦干表面（防止冰晶的形成）。**

备注1: 建议多寄送一份备份样本。如样本较难获取, 只寄送一份样本也可, 此样本的高度达到5mm 以上, 以保证足够用于质检和正式实验。(默认单次切片厚度 10 μ m)

备注2: 组织过大可能导致速冻不均匀, 影响组织形态与核酸完整性。

注意: 新鲜取样后务必在30min 内开始包埋。若无法立即包埋, 须在包埋前将样本置于合适的组织保存液/培养基中并于湿冰上暂保存, 请勿干燥暴露在空气中。



(3) 包埋

向预冷的包埋盒中加入少量的OCT (铺满包埋盒底部2-3 mm), 不要引入气泡, 再将上述修剪好的组织块找好角度放在组织包埋盒中。接着往包埋盒中加入OCT 完全浸没组织块, 如下图3。因为OCT 比较黏, 在整个加入过程中, 务必不要引入气泡。

注意：包埋时组织的摆放角度十分重要，请将 6.5mm×6.5mm 的横切面平行于包埋盒底部进行包埋，**建议切面朝上**（图4），我司收到样品后将默认按照平行于包埋盒底部的角度进行切片。



图3：OCT 包埋液中的组织

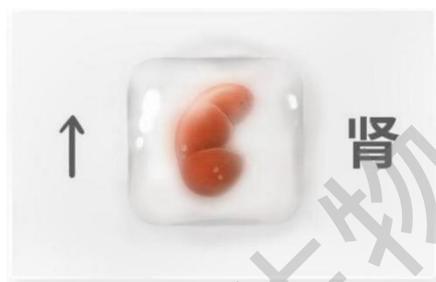


图4：包埋时的组织界面图（以肾组织为例，请将关注的切面朝上放置并提供包埋照片）

(4) 速冻

将组织包埋盒放在干冰粉末上速冻3-5min 直至包埋剂变硬变白（如图5）或者将包埋盒置于预冷的异戊烷-液氮浴上（可以用镊子提托住包埋盒，避免包埋盒被异戊烷浸没），然后等待OCT 凝固变白（如图5）。

注意：在干冰盒中放入足够的干冰，建议使用**碎干冰**便于样本在冷冻过程中保持水平并**均匀受冷**；若只有块状干冰，可事先将干冰敲碎成干冰碎；

干冰速冻包埋/异戊烷速冻包埋任选一种方式即可。



图5：干冰速冻包埋后的组织（左图）和异戊烷速冻包埋后的组织（右图）

(5) 寄送与保存

包埋后的组织固定到包埋盒中，对组织于包埋盒中的位置等信息进行标记，并拍照记录未冷冻时组织于包埋盒中的形貌以及分布（此处照片随《联川生物样本信息收集表》一同发给我司负责人（备注：根据自身实际情况进行调整）；在包埋盒上标记好样品名称，转入自封袋内标记好，装入充满足够干冰的泡沫盒中，随打印好的样品提交单一起寄出。如暂不送样，先保存在-80℃冰箱中（一般可保存3个月左右）。

1.2 新鲜组织包埋质检要求

- (1) 组织切片形态完整，无断裂；
- (2) 提取的Total RNA RIN 值 ≥ 7 。

其他注意事项

- Visium HD 3'空间转录组实验默认是通过H&E染色选片，选定区域后的临片进行实验，如需免疫荧光选片，需要提前和客户沟通好是什么荧光，目前我们的扫片仪器只有DAPI (350/400/460) 和Orange (546/556/572) 两种荧光选择模式。

风险样本及原因

- 原则上高脂肪、高钙化、高致密性、高结缔组织目前不建议做空转，组织透化荧光信号强度较低，继续实验后基因表达得到的基因信息较少（皮肤/脂肪/硬骨/软骨/主动脉斑块/滑膜/韧带/肌腱/脐带等）；
- 本身细胞少，RNA含量更少的样本，组织透化的时候荧光信号极低，后续数据分析基本拿不到很多的数据，不建议做空间转录组测序（血管组织、角膜组织、有研究本身样本中细胞类群很少的如卵母细胞等）；
- 动物肺组织由于存在肺泡等空洞区域，如采用新鲜样本OCT包埋，后续切片会有断裂或者区域缺失的问题，建议在离体前进行灌注，灌注具体方法：用50% OCT和50% PBS v/v（即1:1稀释的OCT）灌注充盈肺泡。后续按照正常新鲜组织OCT包埋流程开展包埋实验，切片断裂缺失的情况会好一些。备注：OCT粘度极高，灌注对操作要求过高。

运输说明

干冰运输：将样品从冻存环境中取出，放入壁厚且质量完好的泡沫盒中，样品的上下和四周都用干冰填满，将泡沫盒子封好后邮寄。24 小时内能够到达的，干冰重量不得低于5kg；48 小时内能够到达的，干冰重量不得低于10kg；72 小时内能够到达的，干冰重量不得低于15kg。**注意：运输过程中包埋样本切勿冻融！** 针对于FFPE 样本及其白片建议采用密封室温或者冰袋运输。