



联川生物

掌握基因科技核心技术

联川生物 华大stereo-seq空间转录组样本准备及运输指南

# 联川生物华大stereo-seq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

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](http://www.lc-bio.com)

电话：0571-87662413  
传真：0571-81951905  
[www.lcbio.com](http://www.lcbio.com)

联川生物

联川生物

联川生物

联川生物

联川生物

联川生物

# 目录

1.1 新鲜组织包埋 (干冰速冻) .....	5
1.1.1 所需试剂和耗材 .....	5
1.1.2 新鲜组织包埋操作具体步骤 .....	5
1.2 质检标准 .....	7
其他注意事项 .....	9
风险样本及原因 .....	9
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。

## (Stereo-seq; 适用于全物种新鲜冷冻样本)

### 1.1 新鲜组织包埋 (干冰速冻)

可按照“1.1 新鲜组织包埋 (干冰速冻)”的流程完成样本OCT 包埋工作。

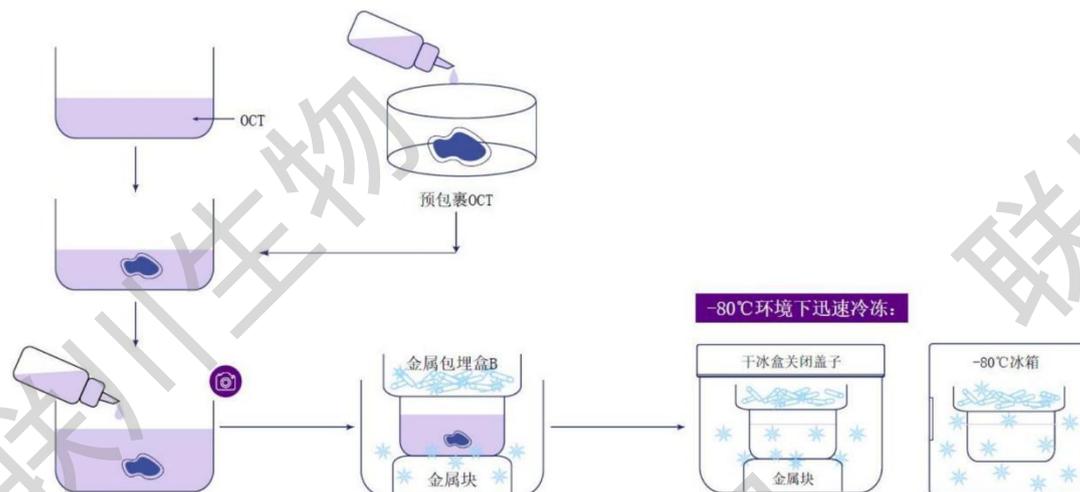


图6 包埋简要流程示意图

#### 1.1.1 所需试剂和耗材

包埋试剂	品牌/规格/要求	包埋耗材	品牌/规格/要求
OCT	Sakura, USA	包埋盒 (塑料/金属均可)	7×7×7mm 或 15×15×7mm
干冰	使用时需要打碎	培养皿	/
		无尘纸/无菌无纺布	KIMBERLY-CLARK
		不锈钢抹刀	可用直头无齿镊子替代
		自封袋	120×80mm
		锡箔纸	/
		记号笔 (油性)	不可选择水溶性

#### 1.1.2 新鲜组织包埋操作具体步骤

(1) 准备工作 1: 需提前30min 准备 1 个装有冰的冰盒, 1 个装有碎干冰的干冰盒 (或 1 个控温良好的-80℃冰箱);

(2) 准备工作2: 塑料包埋盒的选择需考虑组织大小, 以切面 $<1\times 1\text{cm}$ 的组织为例, 建议选择 $15\times 15\times 9\text{mm}$ 规格的包埋盒;

(3) 准备工作3: 向包埋盒中倒入约 $2/3$ 的OCT, 并将包埋盒置于冰上预冷, 同时整管的OCT插入冰中维持低温;

(4) 去除组织表面液体: 离体30min内, 取尺寸合适的组织块, 使用无菌无纺布/无尘纸靠近组织表面, 吸干组织表面血液或组织液(严格执行), 否则易在组织表面形成冰晶, 破坏组织结构;

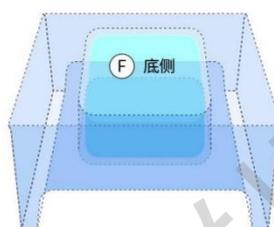
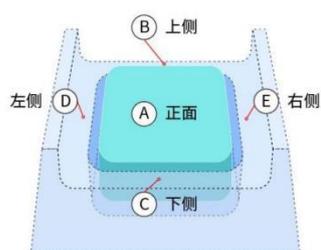
(5) OCT包裹组织: 对于实质紧实的组织, 可将其放入盛有预冷OCT的平皿中, 使用抹刀翻滚组织以使其与OCT充分接触; 若组织质地松散, 则需尽量减少移动操作;

(6) OCT包埋: 用抹刀将组织转移至冰上预冷的包埋盒中, 并调整好位置及切面方向, 通常包埋盒底面为切面;

(7) OCT浸没组织: 向包埋盒中填入预冷OCT, 使组织完全被OCT覆盖, 并使用注射器或其他工具排尽组织周围的气泡; 如果是多空隙组织, 如肺, 组织放于包埋盒中, 需冰上孵育10min, 期间用抹刀轻触组织, 帮助组织内部气泡排出。

(8) 组织排布信息获取: 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));

➤ 标记规则请参看下图7 包埋样本的信息标记规则。



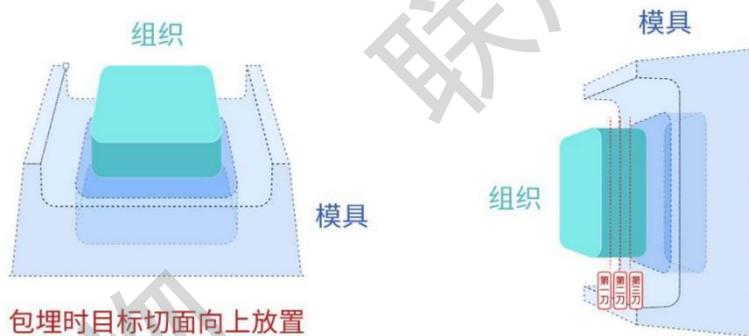


图7 包埋样本标记示意图

- ① OCT 组织包埋块需要标记组织方向，组织所在位置，样本名称等信息，如上图7所示；
- ② 切面需标记“\*”或“切面”，在切片时实验员将从标记面开始切片；
- ③ 在不做任何标记的情况下，默认背对包埋盒底部的一侧为切面（见图7右图“第一刀”位置）；
- ④ 如果由于标记不清楚导致的切面错误损失样本，需要客户重新包埋送样。

(9) 将锡纸包好的样本放于尺寸合适的塑封袋中封口，存于-80℃冰箱，1个月内寄送给我司进行实验（备注：具体多久提供请根据实际情况自行修改）。

## 1.2 质检标准

- ① 组织切片形态完整，无断裂；
- ② 提取的Total RNA RIN 值 $\geq 7$ ；

表1: 时空组组织用量参考表

组织切面 (X×Y)	组织类型	质检用量	透化用量	前处理总用量
任意单边 $\leq 1\text{mm}$	无差别	$> 1\text{mm}$	$\sim 0.2\text{mm}$	$\sim 1.5\text{mm}$
$\leq 3 \times 3\text{mm}$	RNA 丰度低，如多结缔组织样本	$> 1\text{mm}$	$\sim 0.2\text{mm}$	$\sim 1.5\text{mm}$
$\leq 3 \times 3\text{mm}$	RNA 丰度高的组织	$\sim 0.5\text{mm}$	$\sim 0.2\text{mm}$	$\sim 1\text{mm}$
$> 3 \times 3\text{mm}$	RNA 丰度低，如多结缔组织样本	$\sim 0.5\text{mm}$	$\sim 0.2\text{mm}$	$\sim 1\text{mm}$
$> 3 \times 3\text{mm}$	RNA 丰度高的组织	$\sim 0.3\text{mm}$	$\sim 0.2\text{mm}$	$\sim 1\text{mm}$

- a. 本表用量评估的是OCT 包埋样本的Z轴距离，即组织厚度；
- b. 同一样本进行多个实验（质检，透化，建库），每步重新封存后进行下次实验时总量会有大约10张切片的损耗；

c. 在样本制备及送样时，除考虑自身项目需求外，需要考虑寄送样本是否可满足消耗量需要。通常情况下，尺寸较大且无精细切面要求的组织，需额外准备至少1个备份样本。尺寸小或者全切样本，需额外准备至少2个备份样本。

**Tips:**

- (1) 新鲜组织请严格保证离体30min 内进行直接OCT 包埋，最大程度上避免组织内部RNA 降解。
- (2) 组织切面不大于芯片面积（标准芯片大小为1×1cm 和0.5×0.5cm，其他尺寸芯片需要定制）。

## 其他注意事项

- 华大时空平台的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)** 灌流充盈肺泡。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。