

10x Xenium 原位分析样品包埋及运输指南

目录

10x Xenium 原位分析样品包埋及运输指南	1
一、Xenium 原位分析技术	3
(适用于人和小鼠新鲜及FFPE 样本)	3
1 Xenium 原位分析技术适用的样本类型 (任意一种样本即可)	3
1.1 石蜡包埋的样本	3
1.2 OCT 包埋的样本	3
2 质检标准	4
2.1 FFPE 样本	4
2.2 OCT 包埋的样本	4
3 Xenium 石蜡样本原位分析样本制备流程	4
3.1 所需试剂和耗材	4
3.2 石蜡样本的制备过程	4
3.3 蜡膜制备	6
4 Xenium 新鲜样本原位分析样本制备流程	8
4.1 所需试剂和耗材	9
4.2 新鲜组织包埋操作具体步骤	9
二、其他注意事项	12
三、风险样本及原因	12
四、运输说明	13

一、Xenium 原位分析技术

(适用于人和小鼠新鲜及FFPE 样本)

1 Xenium 原位分析技术适用的样本类型 (任意一种样本即可)

10x Xenium 原位分析技术采用探针法进行基因的杂交和表达检测, 目前仅适用人、小鼠物种的组织样本。其中**可根据具体的组织样本选择 panel list, 也可以定制化 panel list**。目前已有的 panel list 包括:

①小 panel:

人乳腺 (280 基因); 人脑 (266 基因); 人肺 (289 基因); 人皮肤 (282 基因); 人肠道 (325 基因); 人肿瘤免疫 (380); 人泛组织 (癌) (377 基因); 小鼠脑 (247 基因); 小鼠泛组织 (379 基因)。

②大 panel:

5000 (人); 5000 (小鼠)

探针链接:

<https://www.10xgenomics.com/support/in-situ-gene-expression/documentation/steps/panel-design/pre-designed-xenium-gene-expression-panels>

由于定制 panel list 需要一定的周期, 因此如需要定制化服务请提前与项目经理/技术支持联系, 以确认定制化周期以及需要满足的定制化要求。

1.1 石蜡包埋的样本

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 2-8°C 寄送。

石蜡样本支持蜡膜送样。

由于实验流程限制, 不能接受石蜡白片, 只允许寄送石蜡块。

1.2 OCT 包埋的样本

提供新鲜组织的 OCT 包埋块, 组织离体之后, 擦干组织, 做 OCT 冰冻包埋, 封装好干冰寄送。

2 质检标准

目前Xenium 没有明确的质检标准，仅以RNA 质检完整性与组织形态作为参考。

2.1 FFPE 样本

形态质检（重要）：

HE 染色：确保组织形态完整，无断裂

RNA 质检（参考）：

- (1) $DV200 \geq 30\%$ ：质检合格
- (2) $DV200 < 30\%$ ：不合格，不建议进行下游实验

2.2 OCT 包埋的样本

形态质检（重要）：

✓ HE 染色：确保组织形态完整，无断裂

RNA 质检（参考）：

✓ $RIN \geq 4.0$

Tips: Xenium 关注的重点是组织形态，故对做Xenium 的样本中重要的质检是组织形态及 HE 染色，确保组织形态完整无断裂。

3 Xenium 石蜡样本原位分析样本制备流程

3.1 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

3.2 石蜡样本的制备过程

3.2.1 取材

根据 10x Xenium 原位分析区域大小需求（芯片大小为：12x24mm，实际可贴片的区域为：10.45x22.45mm）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，石蜡包埋在同一个包埋块内。

3.2.2 组织固定

将材料固定在 10% 的福尔马林溶液当中，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。

3.2.3 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。

3.2.4 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。

3.2.5 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。

3.2.6 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，且样本不可在阳光下暴晒。

3.3 蜡膜制备

3.3.1 蜡膜切片厚度为5μm。注意：不需要在水中展片！

3.3.2 切片须保持平整无皱褶、无裂痕（各实验室切片方法有别，可以借鉴：低温冰冻蜡块表面，切片不易卷曲打褶；快速，匀速摇切不易打褶；勤换刀片）。



10x Xenium 原位分析样品包埋及运输指南

合格

不合格

3.3.3 切片放置在较宽松器具里，以 6 孔培养板为最佳选择，每孔放置 1 张组织蜡膜，培养板应置于冰板上保障低温，避免蜡膜粘附。如选用试管，最小应不小于 50ml 试管，管径越宽越好。其他器皿也可。优先建议细胞孔板。

3.3.4 切片轻轻从镊子或毛刷脱离，放置在孔板中，置于孔板中后不要再对蜡膜做频繁的移动、铺设动作，尤其不要尝试重新将组织展开贴于底部，容易导致组织粘附在塑料表面。



3.3.5 参考视频另行发送。

3.3.6 六孔板提前写好样本编号，切蜡膜的时候把六孔板放置在冰盒或者干冰上收集，一盒收集完用胶带缠绕，手指不要触摸孔板底部，切片后尽快放置于低温干燥环境中，有条件情况下建议立马放入 -20°C 或者 -80°C 冰箱，待样本全部收集完毕用干冰邮寄。高温环境更容易使切片蜡膜软化粘附于周围器具壁，造成组织蜡膜不可用。

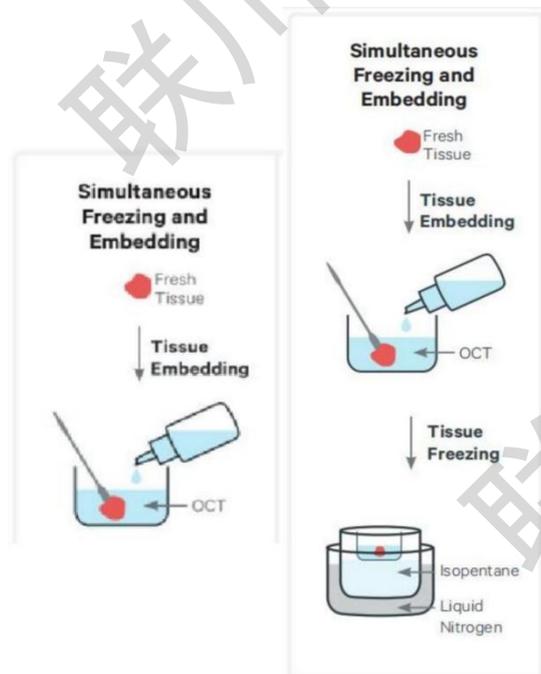
3.3.7 以胶带完整缠绕 6 孔板，其他管、瓶等器具拧紧瓶盖，使之不能因低温、干冰融化和空间增大而自动开盖，其他封口膜等材料会因低温失效。

10x Xenium 原位分析样品包埋及运输指南

3.3.8 正式实验蜡膜用量

组织类型	组织截面尺寸	切片厚度	数量要求	明细
手术组织	黄豆大小	5 μ m	4张	拼片寻找位置可能存在损耗，正式拼片1张，其余备份
手术组织	绿豆大小	5 μ m	4张	拼片寻找位置可能存在损耗，正式拼片1张，其余备份
穿刺组织*	2条粗针（1cm长度左右）	5 μ m	4张	拼片寻找位置可能存在损耗，正式拼片1张，其余备份
穿刺组织	1条粗针（1cm长度左右）	5 μ m	4张	拼片寻找位置可能存在损耗，正式拼片1张，其余备份

4 Xenium 新鲜样本原位分析样本制备流程



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）

4.1 所需试剂和耗材

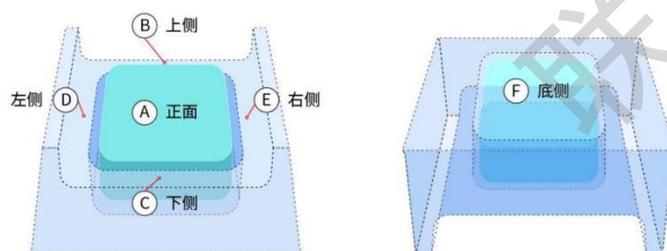
名称	厂商	货号	备注	提供方
OCT 组织包埋液	Sakura	PN-4583	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
异戊烷+液氮	Sigma (异戊烷)	270342 (异戊烷)	异戊烷+液氮/干冰, 选择一种方式 即可	客户自备
干冰	/	/	干冰用研钵和杵敲碎为干冰碎, 以保证包埋过程中组织受冷均匀	客户自备
组织包埋盒	/	/	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
医用手术刀	/	/	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
医用镊子	/	/	湿冰或4℃冰箱预冷≥30min	客户自备
吸水纸	/	/	/	客户自备

4.2 新鲜组织包埋操作具体步骤

4.2.1 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。



10x Xenium 原位分析样品包埋及运输指南

图1：包埋方位标记（左图，正面与上下左右侧；右图，底部）

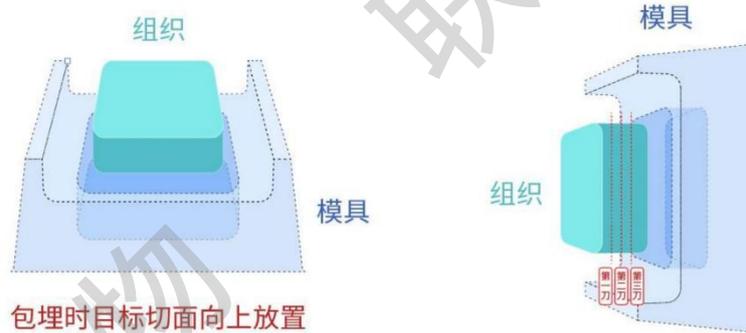


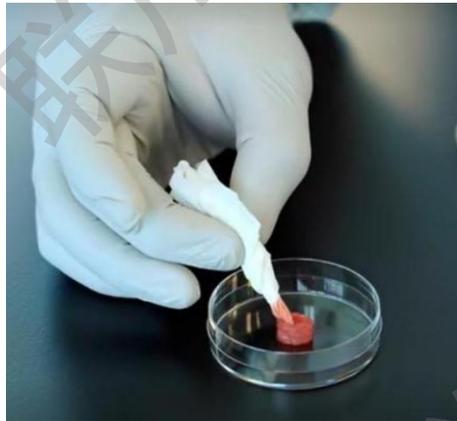
图2：组织包埋时目标组织在包埋盒中的形态及切片方向示意

4.2.2 取样

建议新鲜的组织样本大小为长×宽不要过大，**用实验专用吸水纸擦干表面（防止冰晶的形成）。**

备注：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）

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。



4.2.3 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。

10x Xenium 原位分析样品包埋及运输指南

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

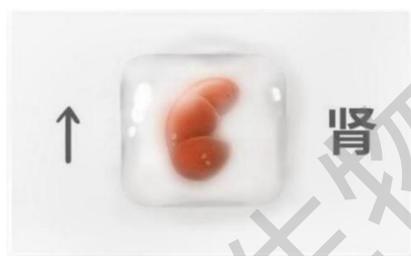


图4：包埋时的组织界面图（以肾组织为例，建议将关注的切面朝上放置并可以提供类似照片以便选片）

4.2.4 速冻

将组织包埋盒放在干冰粉上速冻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）

4.2.5 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；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）。

二、其他注意事项

1. 在确保实验准确性和可靠性的前提下，有可能出现样品不能成功完成全流程实验，其原因可能是①组织在长时间液体反应清洗过程中，发生组织脱落，或者组织移位，导致影响解码成像风险极高，不建议进行后续实验；②组织特性如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或者组织包埋质量原因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，严重时影响解码成像。
2. 组织特性或者组织包埋质量原因导致在Xenium Analysis 内进行解码成像时，由于反复的成像洗脱导致组织在Xenium 芯片上大面积脱落，该阶段处于仪器运行中无法在过程中发现，实验无法终止，请甲方知悉。
3. Xenium 成本较高，试剂需要按需采购，订购周期预计在35个工作日左右乙方一旦采购下单，甲方均需要承担对应的费用；
4. 个性化探针定制费用，甲乙双方确认没有问题并下单，甲方均需要承担所对应的费用；
5. 如需甲方自己贴片，不论后期是否进行正式实验，Xenium 芯片的费用均需甲方承担，Xenium 芯片的费用6000 元/芯片；
6. Xenium 运行需要2 张芯片并行，如甲方是单张芯片，需要等待凑片时间；
7. 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。

三、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（**皮肤/脂肪/硬骨/软骨/主动脉斑块/滑膜/韧带/肌腱/脐带等**）以及本身细胞少，RNA 含量更少（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）的样本目前不建议做Xenium，探针很难结合到转录本上且组织细胞含量较低，后续数据分析基本拿不到很多的数据，不建议做Xenium原位分析；

四、运输说明

针对于新鲜组织包埋建议干冰运输，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 样本建议采用密封室温或者冰袋运输。