



空间代谢组-空间转录组 联合项目样本准备指南

2026.01

目录

1.需耗材及试剂	3
2.新鲜组织包埋块寄送流程（首推）	3
2.1 包埋准备	3
2.2 取样及样本要求	4
2.3 包埋	4
2.4 异戊烷/干冰速冻	5
2.5 样本运输及保存	5
3.自行切片寄送流程（不建议）	6
3.1 切片流程（供参考）	6
3.2 贴片区域要求	6
3.3 切片数量	8
4.其他注意事项（非常重要）	8
5.组织质检要求	8
6.样本信息单填写	9
7.干冰运输说明	9
8.收样地址	9
9.FAQ（非常重要）	10

1. 需耗材及试剂

1.1 包埋剂（公司提供或客户自备）：

①徕卡Cryo-Gel包埋剂：Leica Cryo-Gel Embedding Medium, Item No.14020108926

②FSC22蓝色包埋剂：Leica FSC22, Item No. 3801481

③OCT包埋剂；品牌：樱花或徕卡

注：空间代谢空间转录组联合必需使用徕卡Cryo-Gel、FSC22或OCT包埋剂。此类包埋剂为配置好的溶液，可直接使用。每个样本大约需要用7mL包埋剂和1个包埋盒。

包埋剂储存条件：15°C ~ 30°C。

1.2 包埋盒：长30mm，宽15mm，高12mm

1.3 样本存放容器：根据样本大小选取合适容器运输，较大组织可使用冻存盒，切勿容器过小挤压组织

1.4 其他：吸水纸、培养皿、镊子、手术刀、液氮、异戊烷（推荐购买Sigma厂商的货号 270342）、MALDI IntelliSlides玻片、世泰防脱玻片（货号：188105）

2. 新鲜组织包埋块寄送流程（首推）

2.1 包埋准备

在包埋盒的四边用**油性记号笔**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，可以记录样本切面的方向，方便后期切片选片（**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**）。

请务必对包埋固定前的组织进行拍照，并将照片上传至《联川生物空间代谢组送样单》切片方向说明图Sheet中，【**无照片说明的样本我司不会进行任何实验**】。

*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。

将镊子、手术刀、包埋盒、包埋剂等放置在**冰上（或置于4°C冰箱）预冷30min**。

注意：请勿用水性笔做标记，遇水容易脱离。

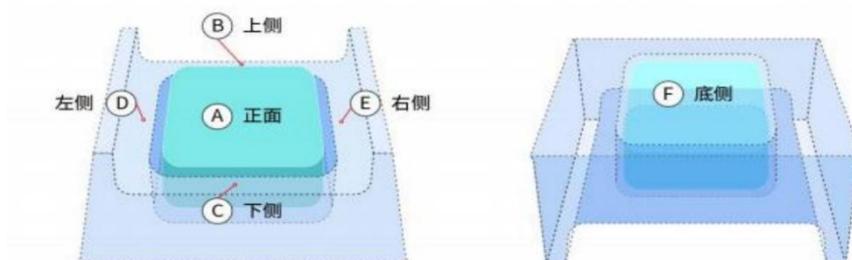


图1：包埋方位标记（左图，正面与上下左右侧；右图，底部）

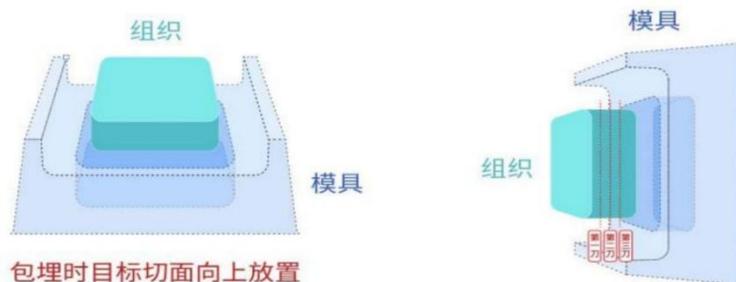


图2：组织包埋时目标组织在包埋盒中的形态及切片方向示意

2.2 取样及样本要求

取新鲜组织样本，先确认好最佳取材位置，尽量保证目标组织完整性，并将组织修剪至合适大小。因空转芯片的面积为10mm x 10mm左右，建议新鲜的组织样本大小为长×宽不超过10mm x 10mm，不小于1.5mm×1.5mm，高度≥5mm的组织块。取样后迅速用实验专用吸水纸吸干表面液体，如血液等（**尽可能保证组织无液体残留，防止冰晶形成**）。

注意：取样过程中需要在冰上操作以保持低温环境。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干净的离心管或密封袋中，埋入湿冰中短暂保存（小于30min）。

2.3 包埋

向预冷的包埋盒中加入少量的包埋剂（铺满包埋盒底部2-3mm），**注意不要引入气泡**，再将上述修剪好的组织块找好角度，用预冷的镊子迅速放在组织包埋盒中，调整组织位置（**组织切面平行于包埋盒底部进行包埋，建议切面朝上**），接着往包埋盒中加入包埋剂（建议从中心区域开始），使之完全浸没组织块，如下图3。

注意：

1) 在整个包埋过程中，**不要引入气泡，气泡的产生会在包埋剂冷却后在组织周围形成空洞，影响切片效果（如有气泡产生，用针尖轻缓挑出或用空的移液枪头吸出）。**

2) 包埋时组织的摆放角度十分重要，请将10mm x 10mm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。如有特殊情况，请提前说明并在包埋盒上标注样本切面方向。

3) 使用倒置的方式保存和放置包埋剂，可减少气泡产生，包埋剂瓶口稍剪大一些，先将包埋剂向纸巾挤出一些，确保瓶口空气全部排出后，再向模具中添加包埋剂。

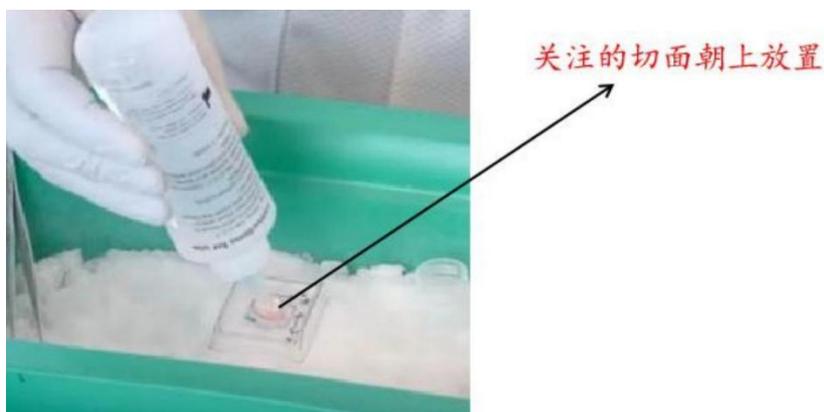


图3: 包埋剂中的组织

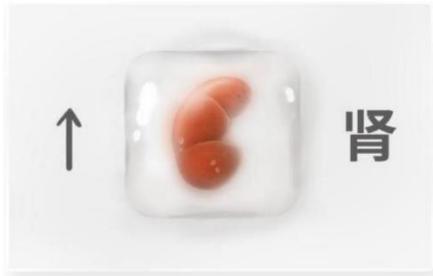


图4: 包埋时的组织界面图

(建议将关注的切面朝上放置并提供照片以便后期选片)

2.4 异戊烷/干冰速冻

将组织包埋盒放在干冰上速冻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,使异戊烷没过其底部但不淹没整个包埋盒,务必避免包埋盒被异戊烷浸没,以防止异戊烷与包埋剂混合),然后等待包埋剂有透明凝固变白,此时组织基本完全冻结(如图4)。

注意:

1) **干冰速冻时:** 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;

2) **异戊烷-液氮浴速冻时:** 在金属容器中倒入2/3异戊烷,再将金属容易放在液氮中,异戊烷在液氮中预冷10-15min。装置中,液氮和异戊烷需要处于同一水平线。异戊烷预冷时间长会出现结冰情况,如未满足15min就出现结冰现象,则可以缩短预冷时间,当异戊烷结冰时,可将异戊烷从液氮中取出室温放置一小段时间。

3) **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)

2.5 样本运输及保存

包埋后的组织固定到包埋盒中,用油性记号笔在包埋盒上标记好样品名称,将包埋盒用锡箔纸包裹并做好样本信息标记。将包埋盒放入密封容器中(如冻存盒中,以避免组织脱水和损伤或被干冰挤压导致样本破碎,装入充满足够干冰的泡沫盒中,将样本没于干冰中,随打印好的样品提交单一起寄出(电子版提交单可联系销售经理提供)。如暂不送样,将包埋盒密封好后先保存在-80℃冰箱中冻存(样本保存时间建议不超过6个月)。

3.自行切片寄送流程（不建议）

样本切片优先建议由我司进行【切片表面平整度影响空间代谢组检测】，如果需要自己切片，需要提前准备世泰玻片（空转）及MALDI IntelliSlides玻片（空代），并在《联川生物空间代谢组送样单》准确备注切片的【厚度】。

我司推荐空间代谢组样本即切即测，保存超3天的切片样本均存在代谢物检出不稳定的风险！

3.1 切片流程如下（供参考）

1) 切片厚度建议在10~20um，最好为10~12um，切片最大不超过检测面积的80%，最小不低于1.5 x 1.5mm，空转芯片大小为10mm x 10mm左右，目标区域大小需要和芯片配对，需要圈出待检测区域10mm x 10mm范围内样本。

2) 于-80°C冰箱取出的组织放于-20°C冰箱或切片机里-20°C平衡30min。将样品固定到样品托头上，用移液器吸取Cryo-Gel、FSC22或者OCT包埋剂溶液于圆形样品托头上，并将组织放在包埋剂溶液上在-20°C环境待溶液结冰后组织便固定。

注意事项：放组织时应尽可能将要切的平面保持向上并水平。

3) 然后把样品托头固定在切片机可定位样品头上，调整好样品的角度和方位。设置好切片厚度。然后调整好防卷板位置，转动手轮一圈，切出切片置于玻片上（若切片破裂，则样品头温度过低，应设置一个较高的温度。若切片软化，则样品头温度过高，应设置一个较低的温度）。

4) 将切好的切片用预冷的毛刷转移到预冷的世泰/MALDI IntelliSlides玻片上，将玻片背面贴紧手背，用手背的温度将组织切片融化至透明，透明后通过手指摩擦玻片背面，通过背面的温度将玻片正面组织上的水分蒸干，组织会由透明变白。在切不同组织样本之间应用纯乙醇擦拭平台和防卷板，以避免样品之间的交叉污染。

5) 切完后将含有组织的MALDI IntelliSlides玻片放入玻片盒中，在真空干燥器中干燥组织水分后，再放到真空包装袋中进行抽真空处理后于-80°C保存。需要运输时用干冰，将玻片盒放入干冰中寄送。【真空有利于样本保存，尤其对于含水量较高的样本】

3.2 贴片区域要求

空间代谢组MALDI IntelliSlides玻片贴片区域（参考空间代谢组取样指南）：

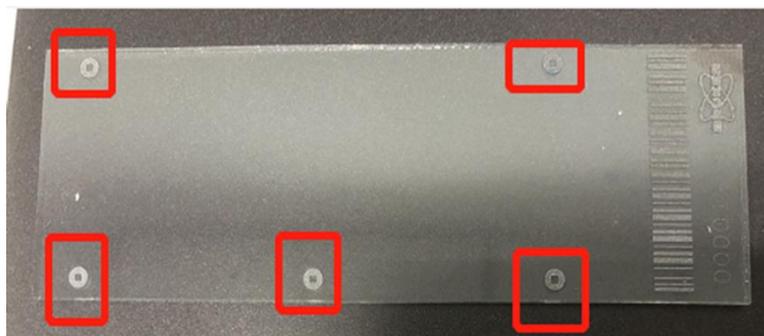


图5：MALDI IntelliSlides玻片实际的贴片范围（红色定位点以内）

空间转录组世泰玻片贴片区域：

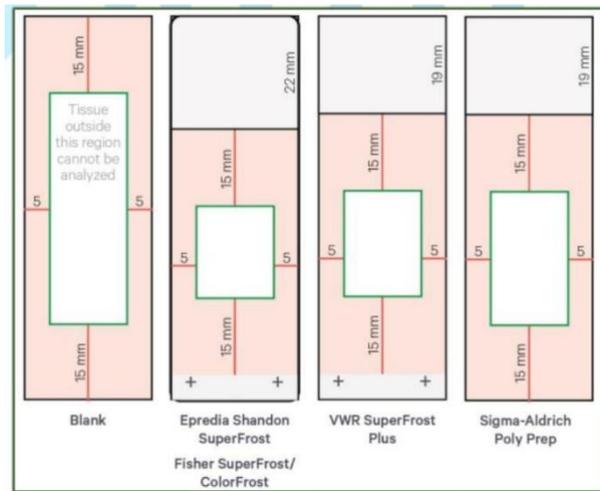


图6: 10x Genomics官方推荐玻片有效区域

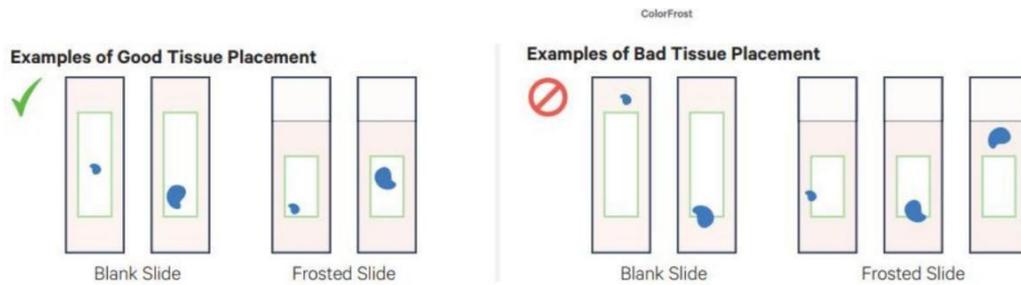


图7: 组织尽量贴在玻片正中位置

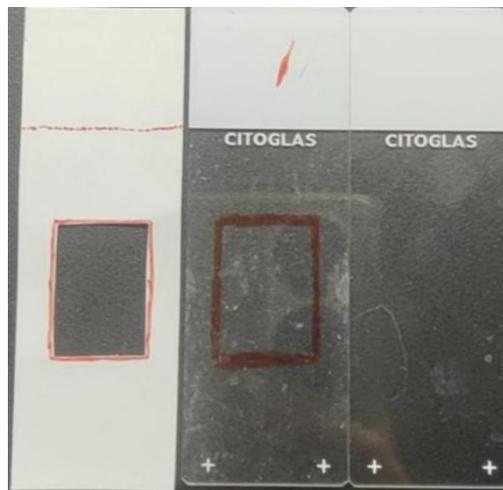


图8: 世泰免疫组化玻片实际的贴片范围 (红色框出来的区域)

注: 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仪器匹配

3.3 切片数量

样本建议准备15片左右（10-12um厚度）；以下罗列实际实验过程需要消耗的切片数量：

- 1) RNA质检：10片（10um/片）
- 2) H&E染色：1~2片用于染色
- 3) 空转正式实验表达：1片（世泰）（10um/片）
- 4) 空代贴片数量：2片（MALDI IntelliSlides玻片）（其中1片为备份）（10um/片）

注：空转-空代联合两组学一般需取邻片，空代2张片在玻片边缘做好标记（如A-B），用于区分及确认哪张是做相邻的切片（通常默认A为第一张，B为第二张）。

4.其他注意事项（非常重要）

4.1 建议多寄送一份备份样本。寄送一份包埋好的样本也可，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。

4.2 新鲜组织包埋，要求组织切片形态完整，无断裂，提取的Total RNA RIN值达到空间转录组质检标准。

4.3 空间转录组默认通过 H&E 染色选片开展实验，切片会连续切片选取相邻切片分别进行空间转录组、空间代谢组检测，其中空间转录组贴片于世泰普通玻片，空间代谢组贴片于MALDI IntelliSlides 玻片，切片厚度默认10um。

4.4 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（脐带、骨、软骨、滑膜、肌腱、皮肤、胰腺、降解的样本等）。

4.5 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）。

4.6 动物肺组织由于存在肺泡等空洞区域，空转需要灌注，不建议进行空转空代联合项目。

5.组织质检要求

1) 空间代谢组：组织切片形态完整，厚薄平均，目标捕获区域无断裂，无气泡，无褶皱、折叠、无污染物（血液残留等）。

2) 空间转录组：组织切片形态完整，厚薄平均，目标捕获区域无断裂，无气泡，无褶皱、折叠、无污染物（血液残留等），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。

10x CytAssist/Visium HD/Xenium平台：RIN \geq 4；

华大Stereo-seq平台：RIN \geq 7；

6. 样本信息单填写

样本信息单用于描述并记录每次运送检测样本类型、数量、状态及检测要求。寄送样本前请填写好此表格（**电子版送样单请联系销售经理提供**），电子版填好后发送至项目联络人或销售经理，打印一份纸质原件装入密封袋中，随样本一同寄送。关于信息单如何填写，可参考《信息单填写说明》，不清楚的地方可咨询销售经理。空转和空代同时做需要分别填写。**样本信息单新增切片厚度信息【若为白片送样】与切片方向说明图【sheet2】，请各位同时注意填写。**

7. 干冰运输说明

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，样本没于干冰中，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！如暂不送样，则需要将包埋盒密封（如用自封袋密封）好后放在-80℃冰箱中冻存。必须密封储存样本，否则可能会导致组织脱水和损伤。

8. 收样地址

- 空间代谢组-空间转录组联合项目收样地址：

收样人：单细胞时空中心

电话：填写对应销售经理电话

收件地址：浙江省杭州市钱塘区下沙街道围垦街758号杭州联川生物医药科技有限公司1号楼8层单细胞时空中心

注：寄样前请提前联系销售经理预约

9.FAQ (非常重要)

1) Q: 包埋剂对样本空间代谢检测是否有影响?

A: 空代优先推荐使用 CMC 包埋, 实验结果表明, 此包埋剂对样本信号影响很小, 与样本贴合程度较高, 能保证切片的形态完整;

明胶可用, 但与样本表面贴合程度较低, 切片结果显示明胶不利于贴片(将样本切片贴在载玻片上);

OCT检测效果与CMC差别不大, 但是OCT包埋不当会浸润至样本边缘, 影响代谢物检出;

石蜡切片不推荐进行空间代谢组检测。

对于空转空代同时检测的项目, 使用Cryo-Gel、FSC22或者OCT包埋剂可以符合两个组学的需求, 实验结果表明, 此类包埋剂对样本信号影响很小, 与样本贴合程度较高, 能保证切片的形态完整。

2) Q: 只做空间代谢检测, 是否可以直接寄送鲜样?

A: 不可以, 不接受仅做空间代谢组的新鲜未处理样本, 仅做空间代谢组的项目【只接受包埋块和白片】。因切片人员无法了解所有样本的结构, 加之样本送来之后是已冷冻的状态, 操作时需要将其冻融再凝固, 形态结构会改变, 无法保证后续实验结果。

3) Q: 空间代谢组-空间转录组联合, 样本寄送前完整流程及切片流程?

A: 鲜样处理, 裁剪至合适大小→鲜样包埋→样本包装→干冰寄送。所有样本默认需要客户使用Cryo-Gel、FSC22或者OCT包埋剂包埋, 客户如果无法购买到包埋剂, 可联系销售寄送, 我司会根据样本数量寄送对应重量包埋剂。

切片选片时, 会提前跟客户预约时间, 选片过程中需客户实时回复, 大致流程为: 空间转录组RNA质检→HE 染色选片→贴片。

通常贴片默认贴1张空转片(世泰玻片), 2张空代片(其中1张为空代备份片, 均为MALDI IntelliSlides 玻片), 如有其他需求, 请提前告知实验人员。

4) Q: 只做空间代谢检测, 样本较大没有合适尺寸的包埋盒如何处理?

A: 最大包埋盒为30 x 20 x 12mm, 样本最大尺寸不超过长(30mm)宽(20mm)高(厚度, 12mm)如果所关注区域的尺寸大于包埋盒的尺寸, 需要在包埋前对样本进行剪裁。

5) Q: 样本包埋时有气泡如何解决?

A: 可使用空的移液枪吸头将气泡吸出, 或使用针尖将气泡挑出。

6) Q: 只做空间代谢检测, 切片碎裂是什么原因造成的, 为什么切片结果与书上的图片相差较大?

A: 切片碎裂常见于植物样本, 因其细胞内含有大液泡, 冷冻状态下为凝固状态, 在刀片压力的作用下会碎裂, 原理类似于刀切冰块, 书上所提供的图片一般为石蜡切片, 其经过

固定脱水的前处理，故形态结构保持相对完整，且冰冻切片无法达到石蜡切片的效果，我司会将样本切片的碎裂程度尽可能降低。

7) Q: 只做空间代谢检测，切片碎裂是否影响检测？

A: 在样本完整的前提下不影响检测，但是空间数据的连续性被破坏，不建议继续进行实验。

8) Q: 切片厚度为多少？

A: 我司默认切片厚度为10-20 μm ，最好为10-12 μm ，会在保证样本完整的前提下选择较薄的厚度。若空间代谢组-空间转录组联合，常规为10 μm 。每份样本切3组，以ABC分类，客户根据扫描图选择完玻片的优先级后进行空间代谢组上机检测。

9) Q: 切片不完整，或者有冰晶可以如何解决？

A: 冰晶形成的原因是组织冷冻速度太慢。冰冻开始时，冰晶成核率较慢，以后逐渐增加，其临界温度为-3.3 $^{\circ}\text{C}$ ，从-3 $^{\circ}\text{C}$ 降至-4.3 $^{\circ}\text{C}$ 之间，成核率急剧增加，然后再减慢。冰晶的大小与其生长速率成正比，而与成核率（形成速率）成反比，即冰晶形成的数量愈多则愈小，对组织结构影响愈严重。可采取速冻措施减少冰晶的形成，目前已知的方法有：第一，标本要尽量不含水，特别是一些含有黏液、体液这些东西，还有像含水丰富的组织如脑组织、乳腺等，我们可以用吸水纸将表面的水吸干一些，这样可以很大范围地减少冰晶。第二使用液氮，可快速冷冻组织，有效减少冰晶形成。第三，取样时将样本中的水分用蔗糖梯度替换。

10) Q: 使用CMC包埋剂进行包埋时，包埋块在冷冻过程中冻裂怎么办？

A: 建议老师先做预实验，10%的CMC溶液进行测试。然后在速冻过程尽量保证包埋盒只有底部与冷冻液接触，长时间大面积接触会导致包埋剂溶液温度迅速下降，体积快速增大导致包埋块冻裂。