

百迈客空间转录组产品

送样指南



百迈客生物科技
BIOMARKER TECHNOLOGIES

为 世 界 创 造 新 的 可 能

目录

1、前言	3
1.1 适用范围	3
1.2 声明	3
2、项目流程	4
3、新鲜冷冻样本	4
3.1 样本要求	4
3.2 样本采集与运输	5
3.2.1 采集前准备	5
3.2.2 样本采集	5
3.2.3 植物样本采集	6
3.2.4 动物组织速冻包埋	7
3.2.5 植物组织速冻包埋	9
3.2.6 样本寄送运输	13
3.3 切片质控标准	13
3.4 测序数据量推荐	14
4 FFPE 样本	14
4.1 样本要求	14
4.2 样本寄送运输	14
4.3 切片质控标准	15
4.4 测序数据量推荐	16

1、前言

1.1 适用范围

本指南介绍百迈客实验平台空间转录组产品的送样要求及制备方法,采集送样前请仔细阅读。

1.2 声明

我国法定的传染病分为三大类:甲类(一类)传染病包括霍乱和鼠疫;乙类(二类)传染病包括传染性非典肺炎、新型冠状病毒(2019-nCoV)肺炎、艾滋病、病毒性肝炎、人感染高致病性禽流感、脊髓灰质炎、麻疹、流行性出血热、狂犬病、登革热、流行性乙型肝炎、细菌性和阿米巴性痢疾、肺结核、伤寒和副伤寒、炭疽、流行性脑脊髓膜炎、白喉、百日咳、新生儿破伤风、猩红热、布鲁士病、梅毒、淋病、钩端螺旋体病、血吸虫、疟疾。丙类(三类)传染病包括流行性感冒、流行性腮腺炎、流行性和地方性斑疹、伤寒、风疹、麻风病、急性出血性结膜炎、黑热病、丝虫病、包虫病、还有除了霍乱、细菌、阿米巴性痢疾、伤寒和副伤寒以外的感染性腹泻。

涉及上述传染病的科学研究需符合国家的相关规定,为严格遵守国家法律法规,本着对社会及相关操作人员负责的态度,我司要求客户方真实准确地提供样品的生物安全性信息,对样品是否含有上述感染性病原体进行事先说明。样品中含有上述感染性病原体时,客户方需要提供符合生物安全等级要求的实验室以便开展相关实验,实验进行时,客户方有义务协助我方实验员做好实验安全防护。客户方不得隐瞒样品的生物安全性信息,若出现样品含有感染性病原体而客户事先未告知我司的情况,一经发现我司将停止进行相关项目,已产生的费用由客户方承担。如因客户方提供的生物安全性信息不实、隐瞒样品感染性等有关情况等造成实验员及相关人员被感染、疾病传播等严重后果的,我司将按规定报告国家相关部门,并将通过法律等手段追究相关责任。

2、项目流程

目前百迈客空间转录组测序服务模式默认为**组织寄送模式**，如果有特殊情况需要上门服务，请与百迈客技术人员确认实验室仪器设备情况。

组织寄送前请至少提前1周进行预约，百迈客接收到样本并确认样本无异常后，**3-5天内**安排RNA质检并反馈质检结果，质检合格后安排切片、组织结构确认与透化。

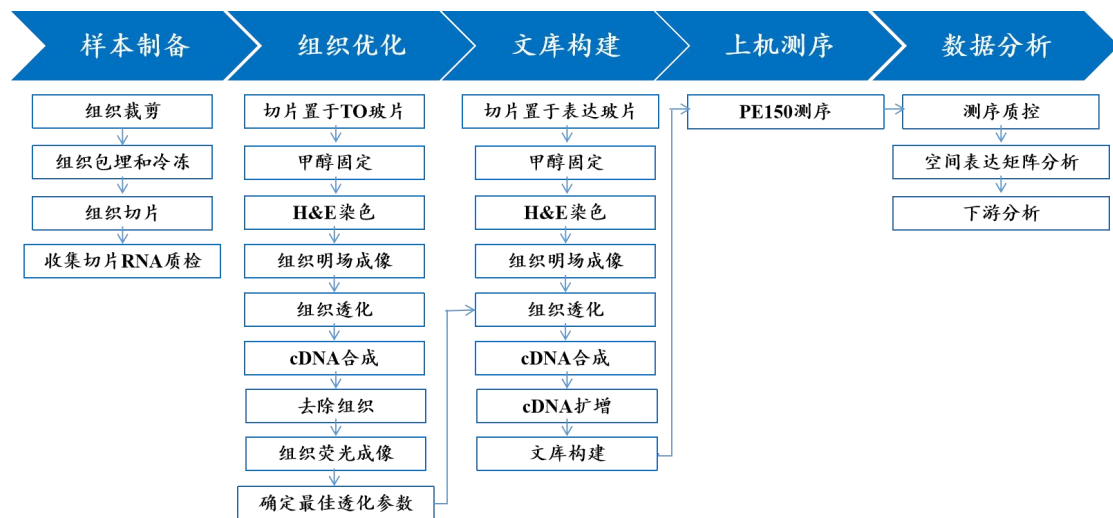
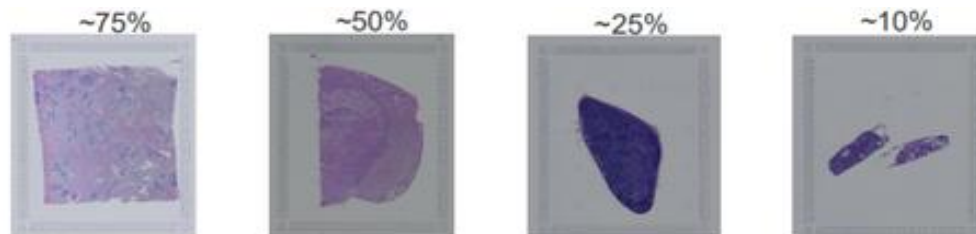


图1 百迈客新鲜冷冻样本空间转录组服务流程

3、新鲜冷冻样本

3.1 样本要求

10x 空间转录组每块组织样本长宽不宜超过 $6.5*6.5\text{mm}^2$ ，百创 S1000 空间转录组每块组织样本长宽不宜超过 $6.8*6.8\text{mm}^2$ ，厚度 $>1.5\text{mm}$ ，组织截面覆盖小于25%的组织，建议多个包埋成一个OCT包埋块，组织间隔尽量小，但是不要重叠，多个组织保持在一个水平面充分利用捕获区域。



- ◇ 注 1: 在样本量足够的情况下, 每个**动物样本**最好准备至少 **2 个包埋块**, 1 份用于 RNA 质检 (切片质控标准见第 3.3 部分)、切片选片、上透化芯片和表达芯片, 另 1 份用做备份, 避免因样本异常等特殊情况需要重新送样而耽误项目周期。
- ◇ 注 2: 在样本量足够的情况下, 每个**植物样本**最好准备至少 **3-5 个包埋块**, **因植物组织目的结构较薄**, RNA 质检 (切片质控标准见第 3.3 部分)、切片选片、上透化芯片和表达芯片, 需各准备一个包埋块。避免因样本异常等特殊情况需要重新送样而耽误项目周期。

3.2 样本采集与运输

3.2.1 采集前准备

- 1) 所有器械和环境需要消毒灭菌, 所有器械 (如剪刀、镊子等) 需要冰上预冷;
- 2) 在医用托盘上放一层冰, 然后覆盖上一层锡箔纸, 再铺几层无菌布, 将个体放在无菌布上进行取样, 保持整个取样过程在低温中进行, 可以延缓核酸的降解, (动物组织建议针对活体或刚死亡个体进行解剖取样);
- 3) 动物组织如果取样后无法立即进行后续包埋实验, 可以将样本清理干净后, **暂时放入组织保护液 (美天旎, 货号130-100-008) 或DPBS或生理盐水中并置于4°C冰箱暂存, 暂存时间最长不要超过5h**, 以免造成RNA降解, RIN值质检不合格;
- 4) 使用指定品牌的**OCT (樱花牌-4583)** 进行包埋, OCT使用前在冰上预冷30分钟。

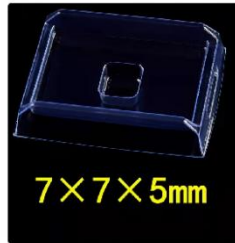
3.2.2 动物样本采集

- 1) 取下新鲜组织, 立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型, 对肿瘤组织的取材, 应尽可能准确地判定肿瘤和正常组织, 肿瘤组织应将周围的正常组织切除干净 (正常组织也应将周围的肿瘤组织切除干净);
- 2) 迅速用预冷的 PBS 溶液 (RNase free) 或生理盐水将组织表面的残留血液冲洗干净, 然后用无菌纱布吸净表面液体;

- 3) 如果组织体积较大,需要将组织切成长宽 $<6.5*6.5\text{mm}^2$ (10x Genomics)/ $6.8*6.8\text{mm}^2$ (百创S1000) 的小块,用 $7*7*5\text{mm}^2$ 的特小号包埋盒进行包埋;取下的组织应立即进行后续包埋实验。



OCT包埋剂 (樱花牌-4583)



包埋盒最小规格



异戊烷纯度95% (CAS: 78-78-4)

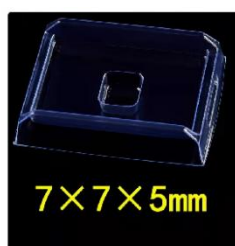
- 注:原则上实验室不提供组织冷冻包埋相关试剂,需客户网上自行购买,如有需要请联系运营确认实验室是否有存货,因OCT试剂无法分装运送,实验室也仅仅可提供包埋盒。

3.2.3 植物样本采集

- 1) 在无菌超净台中处理组织,从活体植株上取下新鲜目标区域组织置于培养皿中,利用 4°C 预冷的镊子和剪刀尽量将组织裁剪成 $<6.5*6.5\text{mm}^2$ (10x Genomics) / $6.8*6.8\text{mm}^2$ (百创S1000) 的小块;
- 2) 利用预冷的蒸馏水将组织冲洗3次,用吸水纸轻轻吸干组织表面的溶液,用 $7*7*5\text{mm}^2$ 的特小号包埋盒立即进行包埋;



OCT包埋剂 (樱花牌-4583)



包埋盒最小规格



异戊烷纯度95% (CAS: 78-78-4)

- 注:原则上实验室不提供组织冷冻包埋相关试剂,需客户网上自行购买,如有需要请联系运营确认实验室是否有存货,因OCT试剂无法分装运送,实验室也仅仅可提供包埋盒。

3.2.4 动物组织速冻包埋

下文提供了 2 种包埋方法：干冰包埋法、异戊烷+液氮包埋法，客户可根据实验条件进行选择。干冰包埋法适合更多的组织类型，是最常用的包埋方法，也可以得到较好的切片结果；异戊烷+液氮包埋法，可以快速降温，保护细胞完整性，但操作较复杂，而且异戊烷对人体有一定的健康危害，一些较小、较轻的样本如穿刺样本推荐使用液氮+异戊烷的方法进行冷冻包埋。

✓ 方法 1 干冰包埋法（常用）

无需异戊烷，直接用干冰粒进行包埋。

- 1) 将新鲜组织置于培养皿中，用干净的纱布或者纸巾吸干组织周围血水，尽量使组织表面干燥；
- 2) 标记包埋盒（样本名称、样本方向、包埋日期等，一定在冷冻之前，对包埋盒做标记，一旦冷冻包埋盒将很难标记信息）；
- 3) 将包埋盒转移到冰上，在包埋盒中注入预冷 OCT，避免产生气泡；
- 4) 冰上预冷镊子，将组织放入 OCT 中，调整好方向，用 OCT 覆盖任何裸露组织的表面，确认没有气泡，尤其是在组织附近，如果有气泡可用移液枪将气泡移除，以免影响组织切片形态结构（此步需要拍照记录，OCT 冷冻后会变白，将很难确定组织的方向）；
- 5) 将包含组织和 OCT 的包埋盒放在干冰粒上轻轻按压（如下图，左），确保水平（否则会影响组织的方向，同时能保证干冰粒与包埋块的接触面积最大以达到快速降温的效果），直到包埋块完全冻结变白（如下图，右）。



包埋块干冰粒速冻



OCT 冷冻后的包埋块

- 6) 将 OCT 包埋的组织块和包埋盒用锡纸包裹好，做好样本标记，直接保存在 -80°C 的密封容器中，利用干冰运输。

✓ 方法 2 异戊烷+液氮包埋法

异戊烷液氮不接触新鲜组织冷冻和 OCT 包埋同时进行。

- 1) 用异戊烷（足以完全浸没组织）填充三分之二的金属烧杯，然后放入液氮杜瓦瓶中（液氮与异戊烷保持相同的水平面）以充分接触，孵育 15 分钟；
- 2) 将新鲜组织置于培养皿中，用干净的纱布或者纸巾吸干组织周围血水，尽量使组织表面干燥；
- 3) 标记包埋盒（样本名称、样本方向、包埋日期等，一定在冷冻之前，对包埋盒做标记，一旦冷冻包埋盒将很难标记信息）；
- 4) 将包埋盒转移到冰上，在包埋盒中注入预冷 OCT，避免产生气泡；
- 5) 冰上预冷镊子，将组织放入 OCT 中，调整好方向，用 OCT 覆盖任何裸露组织的表面，确认没有气泡，尤其是在组织附近，如果有气泡可用移液枪将气泡移除。以免影响组织切片形态结构（此步需要拍照记录，OCT 冷冻后会变白，将很难确定组织的方向）；
- 6) 用镊子将包埋盒放到异戊烷中，但不要使异戊烷浸入包埋盒内，直到组织冻结，冷冻时间可根据组织类型和大小而变化；
- 7) 将 OCT 包埋的组织块和包埋盒用锡纸包裹好，做好样本标记，直接保存在

- 80°C的密封容器中，利用干冰运输。

3.2.5 植物组织速冻包埋

下文提供了3种包埋方法，根据植物组织的部位不同，我们推荐了不同的包埋方式：

组织类型	推荐的包埋方法	风险样本
幼茎、根	方法一	根，茎
幼芽、花苞、叶片、籽粒、 幼果	方法二	叶片
愈伤组织	方法三	愈伤组织

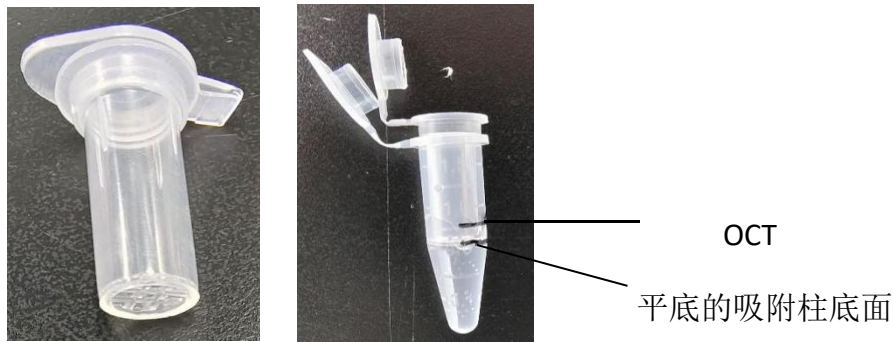
✓ 方法一：固定+抽真空

- 1) 将植物组织浸泡在 1ml 0.05%吐温 20 中,室温 15min
- 2) 将植物组织浸泡在 1ml 预冷的 EAA(无水乙醇:乙酸 3:1)中,抽真空 10min,固定组织。
- 3) 将组织转入新的加入了 1ml 预冷的 10%蔗糖溶液（用 1X PBS 配制）的 EP 管中（此时组织漂浮在液面上），抽真空 20min。小心取出 EP 管并盖紧，注意不要摇晃让溶液中混入空气，在 4°C 中震荡至少一个小时，直至组织沉底。
- 4) 取出 EP 管，去除其中溶液，加入预冷的 20%蔗糖溶液（用 1X PBS 配制），重复操作 3。
- 5) 按照组织个数，室温下，用 OCT 包埋剂填满包埋盒，注意尽量不要产生气泡，并在包埋盒上写上样品名称做好标记（可拍照记录）。
- 6) 取出 EP 管置于冰上，将放在蔗糖溶液中的组织取出，用吸水纸轻轻吸干组织表面的溶液。考虑到植物组织，如茎杆中的维管束本身就存在空隙，所以尽量不要吸干整个组织中的蔗糖溶液，防止空气进入。用镊子轻轻夹住组织，缓慢放入 OCT 包埋剂中，直至 OCT 完全包裹组织，如果有气泡可以用移液

- 器将气泡吸出。室温下静止 20-30min，使残留的蔗糖溶液与 OCT 充分融合。
- 7) 用异戊烷（足以完全浸没组织）填充三分之二的金属烧杯，然后放入液氮杜瓦瓶中（液氮与异戊烷保持相同的水平面）以充分接触，孵育 5- 10 分钟，时间不宜太久，防止异戊烷凝结。
 - 8) 调整组织在 OCT 中的位置，尽量将组织放置于包埋盒的中部，保证目标平面与切面水平一致。如果多个组织包埋在一起时一定要将组织放置于包埋盒的中部排列整齐，避免重叠在一起，此过程中避免产生气泡，如有气泡产生用用针尖轻缓挑出气泡或用 200 μ l 枪头吸出气泡。
 - 9) 用镊子夹住包埋盒置于预冷的液氮-异戊烷浴上（避免模具被异戊烷浸没）或干冰上，然后等待 OCT 凝固变白。
 - 10) 将 OCT 包埋的组织块和包埋盒用锡纸包裹好，直接保存在 -80°C 的密封容器中，做好样本标记，利用干冰运输。

✓ 方法二：抽真空+异戊烷冷冻 OCT 包埋（不需要固定）

- 1) 在无菌超净台中处理，从活体植株上取下新鲜目标区域组织置于培养皿中，利用 4°C 预冷的镊子和剪刀尽量将组织裁剪成 $6.5*6.5\text{mm}$ 大小，去除植物组织目标区域之外其余组织，空隙较多组织（花苞、茎尖）将组织部分切开利用预冷的蒸馏水将组织冲洗 3 次，用吸水纸轻轻吸干组织表面的溶液。
- 2) 将植物组织浸泡在 1ml 0.05%吐温 20 中,室温 15min。
- 3) 冰上预冷 75% OCT 包埋剂溶液（7.5mlOCT+2.5ml 灭菌水颠倒混匀），1.5ml 离心管中加入 500 μ l 75%的 OCT，将植物组织浸润在其中，将平底的无吸附膜的吸附柱放入 1.5ml 离心管中，以防止抽真空过程组织上浮在 OCT 表面，打开所有管盖，置于真空浓缩仪中（注意配平）。室温抽真空 10min，摸索设置成 V-AQ，促进 OCT 溶液充分包裹和进入组织空隙中，保证 OCT 填充包埋组织的完整性。如下图：



真空浓缩仪

- 4) 用异戊烷（足以完全浸没组织）填充三分之二的金属烧杯，然后放入液氮杜瓦瓶中（液氮与异戊烷保持相同的水平面）以充分接触，孵育 5- 10 分钟，时间不宜太久，防止异戊烷凝结。
- 5) 将包埋盒放置在冰上，标记包埋盒（组织放置的方向、样品名称等）（可拍照记录），在包埋盒底部加入适量的 OCT 包埋剂，约 1/4 深度，微凝固后待用，防止组织沉底直接接触包埋盒底部。
- 6) 在冰上用镊子轻轻夹住组织，轻轻擦拭表面的 OCT，缓慢放入预冷的含 OCT 的包埋盒中，加预冷的 OCT 直至完全包裹组织，并调整组织在 OCT 中的位置，保证目标平面与切面水平一致，如果多个组织包埋在一起时一定要将组织放置于包埋盒的中部排列整齐，避免重叠在一起，此过程中避免产生气泡，如有气泡产生用用针尖轻缓挑出气泡或用 200 μ l 枪头吸出气泡。
- 7) 用镊子夹住包埋盒置于预冷的液氮-异戊烷浴上（避免模具被异戊烷浸没）或干冰上，然后等待 OCT 凝固变白。
- 8) 将 OCT 包埋的组织块和包埋盒用锡纸包裹好，直接保存在 -80°C 的密封容

器中，做好样本标记，利用干冰运输。

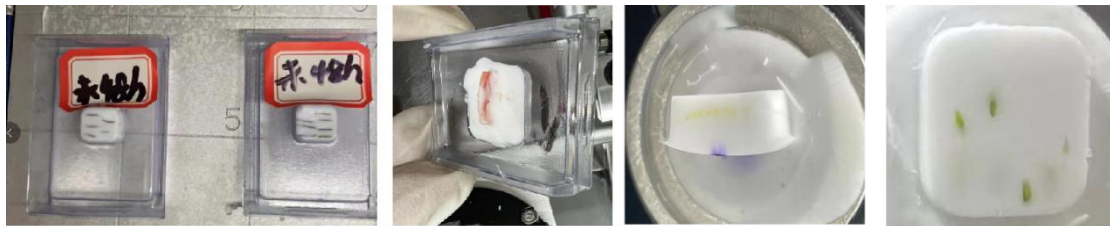
✓ 方法三：直接冷冻 OCT 包埋（不需要固定，不需要抽真空）

- 1) 用异戊烷（足以完全浸没组织）填充三分之二的金属烧杯，然后放入液氮杜瓦瓶中（液氮与异戊烷保持相同的水平面）以充分接触，孵育 5-10 分钟，时间不宜太久，防止异戊烷凝结。
- 2) 将包埋盒（冷冻切片 OCT 包埋盒，7x7x5mm，实际尺寸是 10 x 10 x 5mm）放置在冰上，标记包埋盒（组织放置的方向、样品名称等）（可拍照记录），在包埋盒底部加入适量的冰上预冷的 OCT 包埋剂，约 1/4 深度，微凝固后待用，防止组织沉底直接接触包埋盒底部。
- 3) 在无菌超净台中处理组织，从活体植株上取下新鲜目标区域组织置于培养皿中，利用 4 度预冷的镊子和剪刀尽量将组织裁剪成 6.5*6.5mm 大小，去除植物组织目标区域之外其余组织，利用预冷的蒸馏水将组织冲洗 3 次，用吸水纸轻轻吸干组织表面的溶液。
- 4) 在冰上用镊子轻轻夹住组织，缓慢放入预冷的 OCT 包埋剂中，直至 OCT 完全包裹组织。
- 5) 调整组织在 OCT 中的位置，尽量将组织放置于包埋盒的中部，保证目标平面与切面水平一致。如果多个组织包埋在一起时一定要将组织放置于包埋盒的中部排列整齐，避免重叠在一起，此过程中避免产生气泡，如有气泡产生用用针尖轻缓挑出气泡或用 200 μ l 枪头吸出气泡。
- 6) 用镊子夹住包埋盒置于预冷的液氮-异戊烷浴上（避免模具被异戊烷浸没）或干冰上，然后等待 OCT 凝固变白。取出包埋盒并放入 -80 $^{\circ}$ C 保存（在室温下，异戊烷温度会迅速升高，冷冻过程中一旦异戊烷升温，需要马上置于液氮中重新冷却）或直接进行切片。冷冻时间可根据组织类型和大小而变化。
- 7) 将 OCT 包埋的组织块或者包埋盒用锡纸包裹好，直接保存在 -80 $^{\circ}$ C 的密封容器中，做好样本标记，利用干冰运输。

3.2.6 样本寄送运输

包埋后的组织用锡箔纸包住，放入密封袋中密封，放入样本盒在液氮或者-80℃冰箱长期保存，或者放置在干冰上进行冷冻运输，寄送到百迈客实验室，干冰寄送推荐用量约 5kg/日。

✧ 不规范送样示例：



A

B

C

D

- A. 包埋时组织放置靠近最下层，组织未被 OCT 包裹，导致样本 RNA 降解，质检不合格；
- B. 组织暴露在空气中，导致样本降解，组织两侧无 OCT 支撑，展片时可能会破坏样本结构；
- C. 组织较小，不满足做表达最小 25%的要求；
- D. 同一个包埋块包埋了多个样本，但不在同一个平面，并且每一个样本组织过小，覆盖区域有限，可能导致分析有效数据偏低。

3.3 切片质控标准

- **组织形态学检测：**对切片进行 H&E 染色，观察是否获取到目标区域，组织形态完整性是否在可接受范围内（例如是否有大的裂痕，存在明显的空泡、褶皱等）。
- **RNA 完整性检测：**取 10-15 张切片，利用 Agilent2100 对样本进行 RNA 完整性检测，要求 **RNA RIN \geq 7**，则认为样本完整性满足实验要求，可以进行后续实验。具体切片质检量如下：
 - 1) 10 微米切片厚度，组织占包埋块面积的 1/5-1/4，质检量要求**~15 张**（左图）；
 - 2) 10 微米切片厚度，组织占包埋块面积的 $>1/3$ ，质检量要求**~10 张**（右图）。



3.4 测序数据量推荐

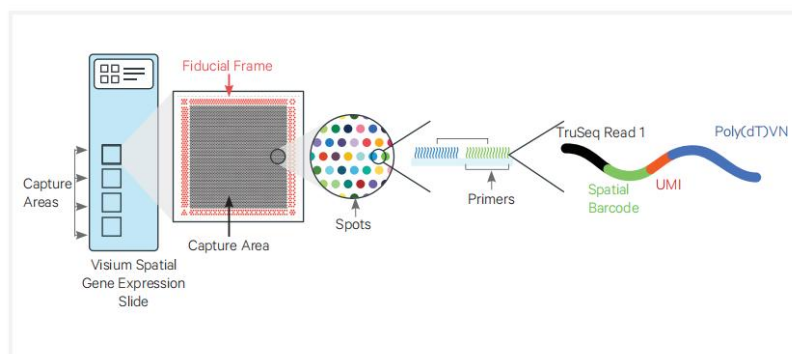
测序数据量：推荐 60G/样；

测序平台：NovaSeq 6000 (PE150)。

4 FFPE 样本

4.1 样本要求

1) 目前 10x Genomics FFPE 空间转录组适用物种为**人和小鼠**，用于 FFPE 样本的捕获区域为 $6.5*6.5\text{mm}^2$ ，若组织块超过 $6.5*6.5\text{mm}^2$ ，则需要对样本进行划割，确定目标区域为 $6.5*6.5\text{mm}^2$ 内；



2) 在样本量足够的情况下，每个样本最好准备至少 2 个石蜡块，1 份用于质控和正式实验，另 1 份用做备份，避免因样本异常等特殊情况需要重新送样而耽误项目周期。

4.2 样本寄送运输

石蜡包埋好组织块放在密闭的容器中，**4°C寄送**，低温运输以确保 RNA 的完整性。

4.3 切片质控标准

FFPE 空间实验启动前需要从石蜡切片中提取 RNA 进行 DV200 的质检和在 Test 玻片上贴片测试组织的粘附性。当 DV200 > 50% 且组织粘附性高时，实验成功率更高，因此若有多余的蜡块可送备份从而保证实验的顺利进行。

1) **提取 RNA 检测 DV200**：要求 **DV200 ≥ 50%**，DV200 检测表示大于 200 个核苷酸的 RNA 片段占有所有 RNA 片段的百分比，指控合格可以表明 RNA 没有片段化严重，降解程度较轻，RNA 完整性较高；

检测 DV200 样本量要求：10 微米切片厚度，截面积 > 50mm²，~5 张；截面积 < 50mm²，~10 张。

2) **组织粘附性**：石蜡样本容易脱片，需要在 Test 玻片上贴片测试组织的粘附性，是否脱片，组织粘附性高时，实验成功率更高。

粘附性样本量要求：两个样本测试一张 Test 芯片（此芯片是 10x 定制的芯片），每个样本需要 4 张切片。

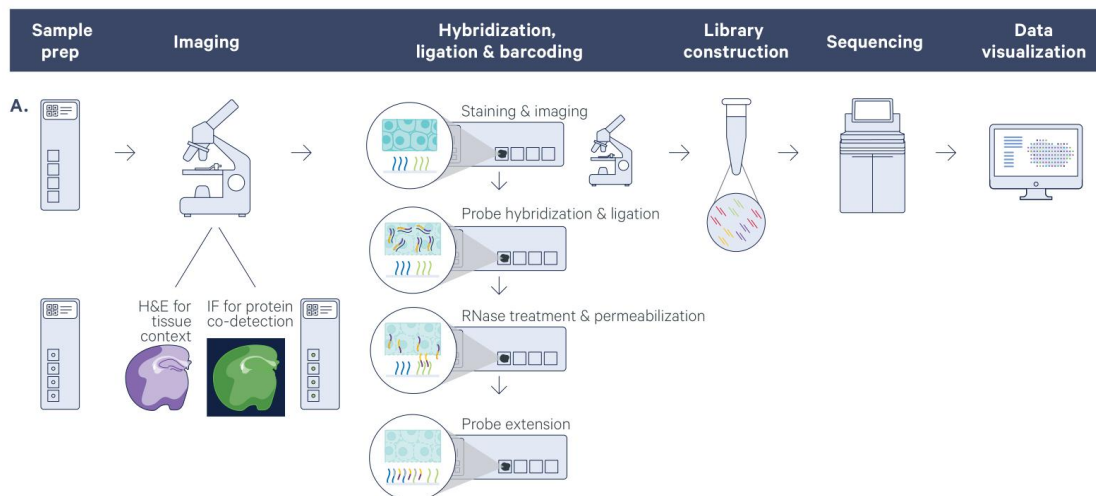


图 4 百迈客石蜡包埋样本（FFPE）空间转录组服务流程

		冷冻样本Visium方案	石蜡样本Visium方案
样本状态		新鲜冻存	FFPE
物种		不限物种	人和小鼠
样本准备	样本包埋	新鲜组织或OCT包埋组织	现有石蜡包埋组织
	切片	冷冻切片机（厚度10um）	常规切片机（厚度5um）
样本检测		RIN值\geq7	DV200\geq50%，粘附性实验
组织透化预实验		需要	不需要
全转录组探针		不需要	需要

图 5 石蜡包埋组织与冷冻包埋组织比较

4.4 测序数据量推荐

测序数据量：推荐 60G/样；

测序平台：NovaSeq 6000（PE150）。