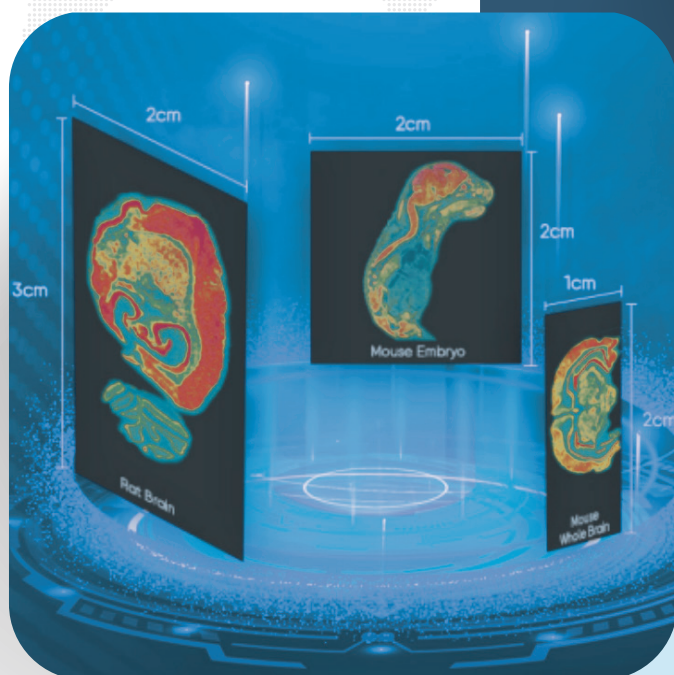


空间转录组

动物新鲜冰冻(FF) 样本送样建议



本档旨在提供通用性的操作指引与思路借鉴，仅供相关工作人员在相关工作中参考。鉴于不同实验的研究目的存在多样性，样本特性各有差异，且实际应用环境和条件复杂多变，本档所包含的所有信息、流程与方法均仅为建议性内容，不构成对任何特定样本处理目的或最终结果的确定性承诺与保证。使用者须充分考量自身的实验设计方案、样本具体属性、实际业务目标及专业判断，独立进行评估与决策，并灵活调整、合理运用本档中的建议。

目录

CHAPTER 01

样本要求	02
------	----

CHAPTER 02

动物 OCT 冷冻包埋	03
-------------	----

CHAPTER 03

样本包装及运输条件	08
-----------	----

 注意事项

 提示可选操作

关于本指南

本指南详细介绍三亚智数生物科技有限公司关于时空转录组测序服务中 FF（新鲜冰冻）实验样品的送样要求、实验样品的参考标准及其相关注意事项、包装指南以及运输规范，确保客户提供的合格样品在经过标准生产实验后能够获得满足要求的高质量数据，并确保客户提供的样品得到妥善保护。采集FF相关组织样品送样前请仔细阅读本指南。

声明

对于危害程度为第一、二类的高致病性样品，只接收提取后的核酸样品，不接收组织、血液、菌体等样品。对于危害程度为三、四类的致病性或传染性的样品（组织、血液、菌体等），必须先通过销售或项目管理与三亚智数生物技术人员沟通，确认无高致病和传染性且能进行后续实验后再安排样品寄送。危害程度的判定标准具体参见《人间传染的病原微生物名录》。

合作伙伴需要根据本文件所述操作进行样本组织前处理。对于生物安全等级要求为 BSL-1 的样本，送样前按系统立项要求填写病原微生物。对于生物安全等级要求为 BSL-2、BSL-3 和 BSL-4 的样本，因实验室条件及实验操作特殊性不满足接收要求，请送至满足 BSL-2、BSL-3 和 BSL-4 要求的实验室。

样本合规性要求

合作伙伴需承诺所提供的样本，其采集、收集、进口、运输、保管、使用和处置符合来源国法律、法规、规章及伦理规范，人类血液及其他人源样本的采集利用已获被采集者的知情同意（包括但不限于书面或其他伦理审查认可的形式），如需经国家主管部门批准或备案的，已经报国家主管部门批准或备案。保证其可提供证明人源样本资源来源及合法性的证明材料，包括但不限于《样本伦理审查批件》、《中国人类遗传资源审批决定书》，样本提供者签字确认的《知情同意书》等。

01. 样本要求

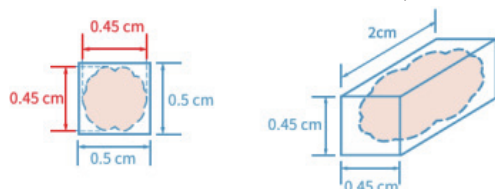
样本处理

实验室条件下严格保证新鲜样本在离体 **30 min 内进行直接包埋处理**，以最大程度避免组织内部RNA降解。也支持对冻存组织进行包埋处理后开展实验。但冻存组织可能存在碎裂、挤压变形等情况，所以接收样本后除了确认RNA完整性，还应特别注意组织形态，确认组织形态符合要求、可以顺利完成贴片后再进行下游实验。

芯片规格

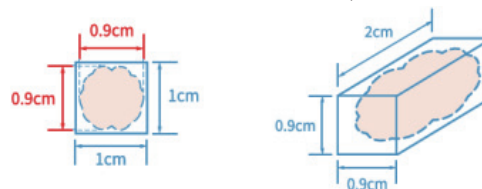
- ① Stereo-seq 芯片 (0.5cm * 0.5cm) :

组织尺寸不应超过0.45cm X 0.45cm X 2cm，组织切片/芯片面积不应超过 80%；



- ② Stereo-seq 芯片 (1cm * 1cm) :

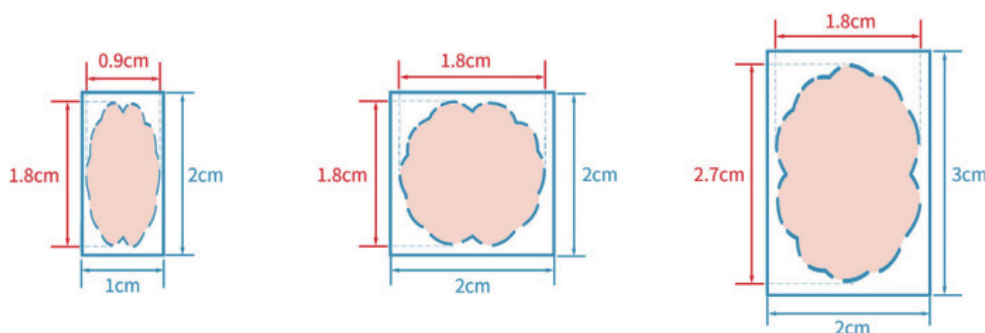
组织尺寸不应超过0.9cm X 0.9cm X 2cm，组织切片/芯片面积不应超过 80%；



- ③ Stereo-seq 芯片 (1cm * 2cm) : 组织尺寸不应超过0.9cm X 1.8cm X 0.7cm；

- ④ Stereo-seq 芯片 (2cm * 2cm) : 组织尺寸不应超过1.8cm X 1.8cm X 0.7cm；

- ④ Stereo-seq 芯片 (2cm * 3cm) : 组织尺寸不应超过1.8cm X 2.7cm X 0.7cm，组织切片/芯片面积不应超过 80%。



样本RNA质检检测

在执行正式时空转录组实验前，一般会对组织包埋块进行RNA质检，检测其RNA完整性，保证样本质量，降低后续实验风险。RNA质检实验前需进行切片取样，一般会对常规动物组织切取 **20~25 张 10 μm 切片**，存放至已在 **-20 °C**下预冷的 **1.5 mL 离心管**中，然后进行Total RNA 的提取和质量检测，提取的RNA量即可满足检测需要；若对于组织较小、RNA本身很少或难以提取的样本，需要收集更多组织切片数量，才足以满足实验检测需求。

实验所需样本数

质检约消耗 25~30 张 10 μm 厚度切片，透化测试 6~10 张 10 μm 厚度切片，正式转录组 5~10 张 10 μm 厚度切片。

注意

密封上的组织重新切开还需消耗 5-10 张表层小部分组织（正常修片损耗）；如果客户的目标区域包埋较深，需要切取的数量更多。

02. 动物 OCT 冷冻包埋

使用试剂及耗材

实验试剂/耗材	品牌/货号/要求	实验试剂/耗材	品牌/货号/要求
OCT包埋剂	SAKUAR/4583	包埋盒 A/B	世泰 7×7×5 mm/ 15×15×5 mm
1*PBS	无菌无酶	培养皿	/
75%酒精	/	镊子	直头无齿
RNase-Zap	thermo fisher/AM9780	注射器	/
无尘纸	KIMTECH/34120	手术刀片	/
自封袋	/	尺子	/
锡箔纸	/	金属块	/

动物组织取样要求

新鲜动物组织请严格保证离体 30 min 内进行后续实验操作，需最大程度上避免组织内部 RNA 降解。保留合适大小的组织，组织切面大小不建议大于芯片面积（标准芯片大小为1 cm x 1 cm，其他尺寸芯片需要定制）。

动物组织包埋实验步骤

1 实验前准备

将实验台面使用 75% 乙醇和 RNase-Zap 试剂进行擦拭，实验使用的工具如镊子、剪刀等均需消毒。提前在碎冰上预冷整管 OCT 包埋剂、组织缓冲液、PBS 等，准备合适大小的包埋盒（建议使用金属包埋盒，冷冻效果更佳；如无金属包埋盒也可使用合适大小的塑料包埋盒代替），向包埋盒中预先倒入 1/2~2/3 的 OCT，并放置在冰上预冷 10 min 以上（可使用注射器吸弃产生的气泡）。准备一些碎干冰，装在保温盒中，以备后续冷冻包埋块使用。



2 组织预处理

新鲜动物组织放在预冷的组织缓冲液、1 X PBS 等液体中清洗两到三次，去除血液及表面杂质等，清洗后需用无菌无纺布或无菌无尘纸擦干组织表面液体；若浸泡或清洗组织，需注意一定要吸干组织表面液体，避免在冷冻时导致组织表面产生冰晶，破坏组织结构。



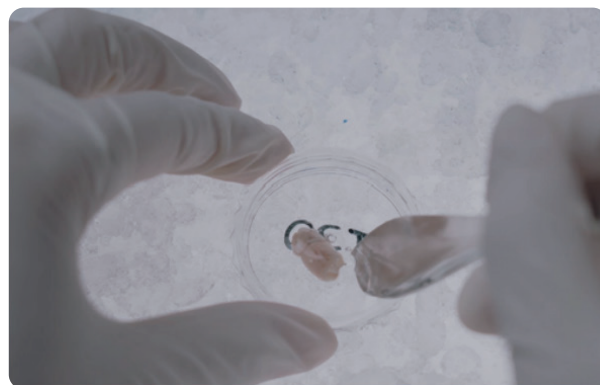
⚠ 注意

- ①不同的组织需根据组织结构及生理学特性选择适合的清洗液进行清洗；
- ②若组织样本内部空隙较大，清洗速冻后内部容易产生冰晶，影响后续切片效果和组织形态结果，则此步骤则无需进行；
- ③实验动物器官组织可 OCT 灌注后再进行冷冻包埋，避免空隙和血液对后续实验的影响。
- ④在取样时如无特殊需求，尽量避免取到钙化、硬化、纤维化的部位，可剔除不必要的组织部位（如脂肪、结节等）。

动物组织包埋实验步骤

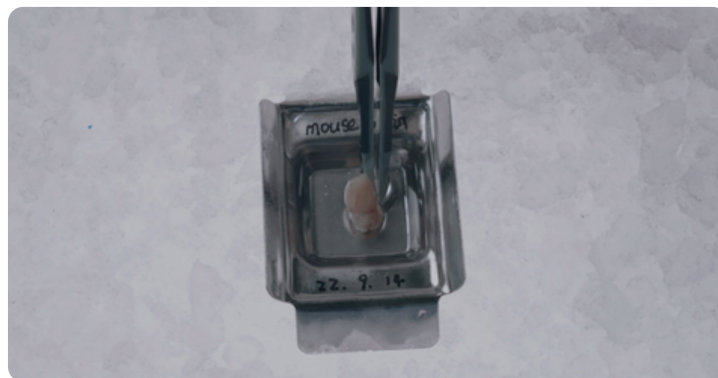
3 OCT 包裹组织

在平皿中加满 OCT，提前预冷 10 min（可使用注射器吸弃产生的气泡）；若实质紧实的组织，可直接放入盛有预冷 OCT 的平皿中，使组织与 OCT 充分接触；若组织质地松散，则需尽量减少移动操作，直接进行 OCT 包埋。



4 OCT 包埋

用镊子轻轻地将组织转移至已加预冷 OCT 的包埋盒中，并调整好位置及切面方向，记录组织包埋方向和预切片方向，拍照记录未冷冻时组织在包埋盒中的形貌以及位置分布；再加入预冷的 OCT 将组织完全包埋（可使用注射器吸弃产生的气泡）。



5 组织包埋块冷冻

将包埋盒置于打碎平铺的干冰中，保持水平放置进行冷冻，防止样本在冷冻过程中移位。



不推荐液氮速冻或液氮+异戊烷速冻，冰冻速度太快容易导致材料在切片时破碎。

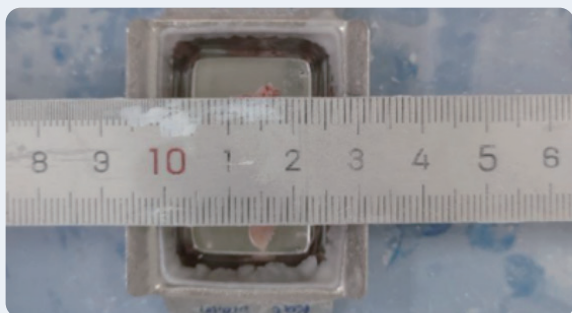
Tips

也可在干冰上放置提前预冷的比包埋盒面积大的金属块，将包埋盒放置金属块上快速均匀导冷（如下图所示）。



Tips

也可将预冷的钢尺放在金属包埋盒的长高边上（防止组织被包埋盒 B 压变形），然后将包埋盒 B 开口向上，轻轻加盖于装有组织块的金属包埋盒的上方，并在其开口中放置碎干冰，使干冰尽可能充分覆盖金属包埋盒表面（如下图所示）。



- 6 冷冻 5 min 后，检查 OCT 是否完全凝固且变成白色不透明状，若未完全冷冻好，则重复步骤 5。
- 7 如果组织块完全凝固并变成白色不透明状，用手轻掰金属包埋盒 A 两侧，即可使 OCT 包埋组织块从金属包埋盒中脱模。



- 8 检查包埋块底部是否被完全覆盖，如未完全覆盖，则将组织块放置在金属块上，底部向上，在表面涂上少量 OCT，待 OCT 完全凝固且不透明，在包埋盒上以“*”号标记标记切面方向，或在包埋块上用记号笔以“*”号标记切面方向（如未标记则切片时默认包埋盒底面为切面方向）。

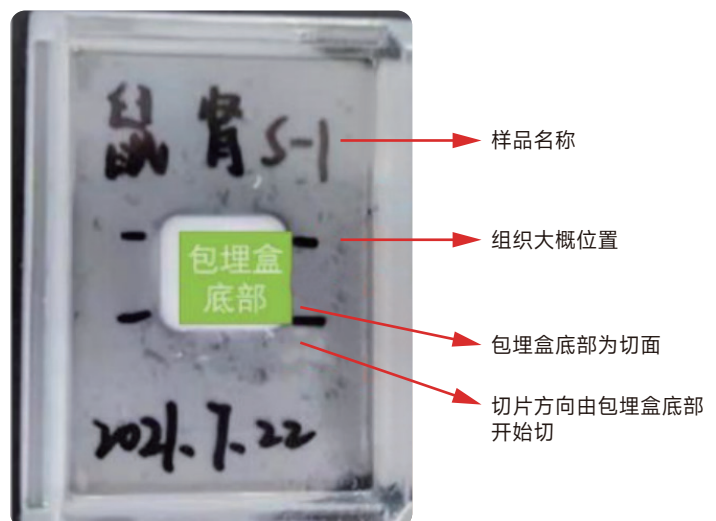
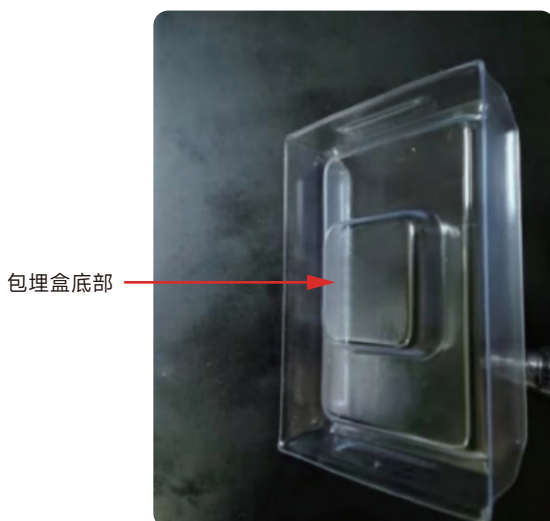
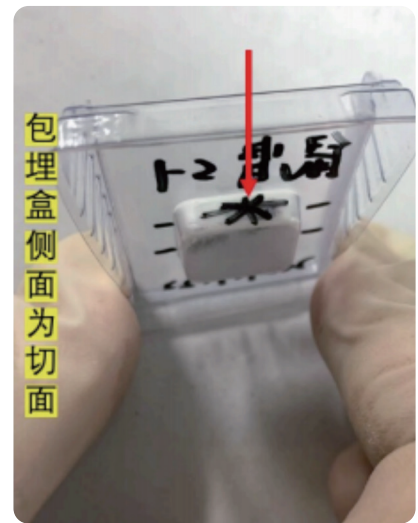


9 组织样本保存

冷冻好的组织块需确认已在包埋盒上标记完整信息，使用锡箔纸包裹好，放于密封袋中封口并标记样本信息，放于 -80 °C 冰箱进行保存，1 个月内寄送至样本中心进行实验安排。

包埋样本信息标记

OCT 组织包埋块需要准确的在包埋盒上标记组织信息，包含样本名称，组织类型，组织位置，切面方向等信息，需在包埋盒上对应位置进行标记“*”或“切面”，在切片实验时实验员将从标记面开始进行切片。



03. 样本包装及运输条件

- ① 样本信息标记与信息单填写要求：应在样本盒或其独立包装袋上明确标记样本组织名称、物种类型、包埋时间等基本信息，必须严格按照要求正确填写《样本入库信息单》，填写之后需与相关负责人核对信息无误，以保证样本中心及实验人员能准确核对样本信息。如因样本信息填写错误导致的样本处理错误，后果由填表人自行承担。至少提前1个工作日将该表通过邮件发送至三亚智数样本中心公邮：hn-ngs@id-biotech.com，并抄送对应项目管理及项目负责人，邮件主题标明“寄送人-快递单号-其他重要信息”；
- ② OCT 包埋好的组织需用锡箔纸包裹（防止样本在运输过程中，从包埋盒中脱落，可能会分不清切面方向）放入密封袋中密封或样本冻存盒中，转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，使用干冰运输；
- ③ 根据寄送距离和时间，选择大小合适的泡沫盒，其厚度不低于 3 cm，且封口严实，保证泡沫盒密闭；
- ④ 寄送使用干冰运输，确保干冰充足，以运输 24h 计为 $N=1$ ，按消耗 $(N+0.5)\times 5\text{kg}$ 计算寄送所需的干冰用量；
- ⑤ 寄出时确认组织标记清晰与包装完好，可将组织在包埋盒中的照片以及组织、切面等标记的照片附在样本信息表中；因封口袋容易被冻裂，样品建议随冻存盒一同寄出，并做好防撞措施，避免寄送过程中产生变形。



官方二维码



公众号二维码

联系方式:

邮箱: info@id-biotech.com

网址: www.id-biotech.com

地址: 海南省三亚市崖州湾科技城招商三亚深海装备产业园A栋9楼