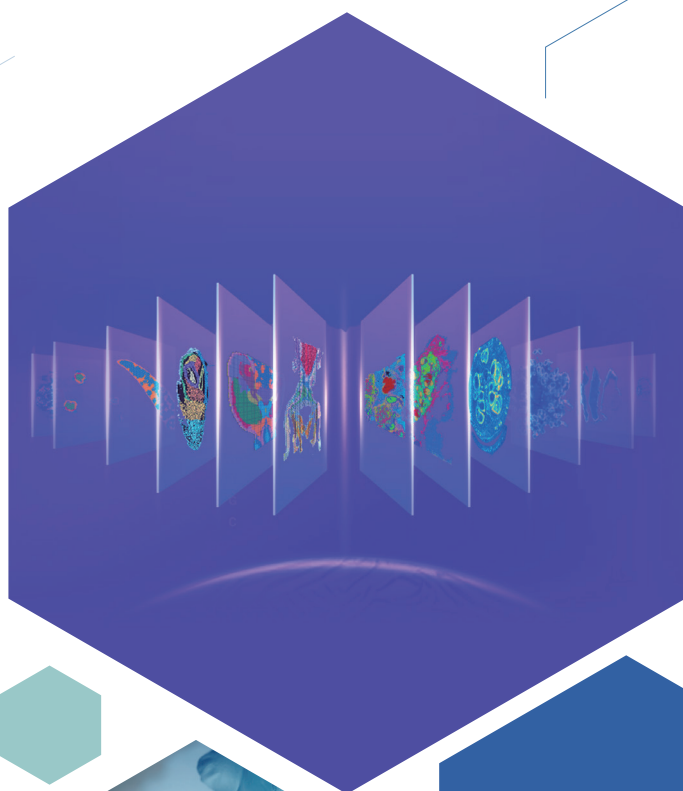


空间转录组

植物新鲜冰冻 (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

植物直接 OCT 冷冻包埋 03

CHAPTER 03

植物固定后 OCT 冷冻包埋 06

CHAPTER 04

样本包装及运输条件 10

 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

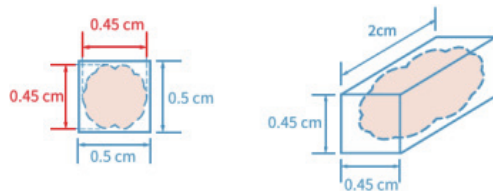
样本处理

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

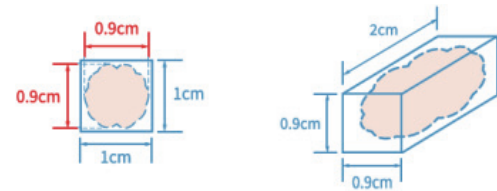
- ① Stereo-seq 芯片 (0.5cm * 0.5cm) :

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) :

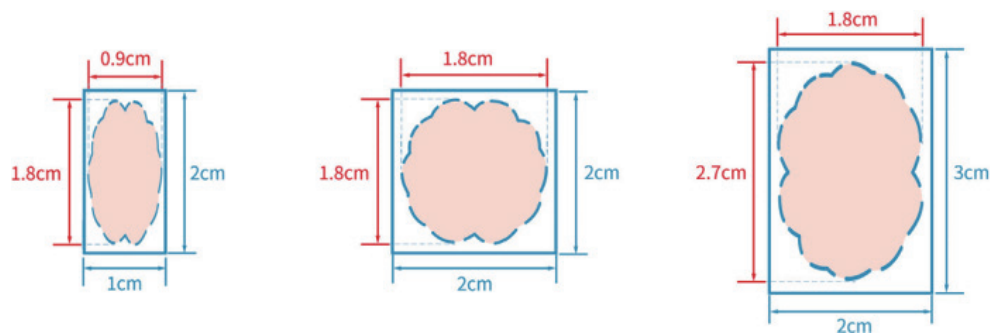
组织尺寸不应超过0.9cm X 0.9cm X 2cm，组织切片/芯片面积不应超过 80%；



- 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，一般会对常规植物组织取 **40~50 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40~50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。

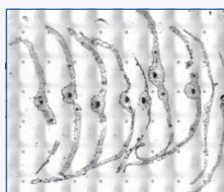
注意

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。

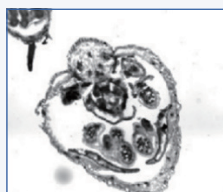
Tips

本送样建议提供“植物直接OCT冷冻包埋”和“植物固定后OCT冷冻包埋”两种包埋方法，成片效果有所区别，如下图所示，请根据样本需求选择合适的包埋方式。

方法一：新鲜样本直接包埋



拟南芥叶片

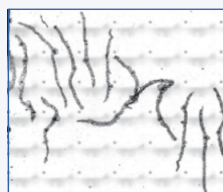


拟南芥花

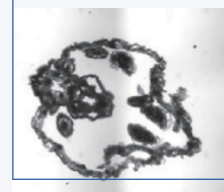
优点 组织细胞保持原有形态

缺点 含水量高的组织细胞破碎概率较大

方法二：组织固定置换后包埋



拟南芥叶片



拟南芥花

优点 RNA保存相对完整

缺点 固定后组织发生皱缩，细胞形态受到影响

02. 植物直接 OCT 冷冻包埋

组织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	biosharp BL557A	包埋盒底膜	世泰 7×7×5 mm/ 15×15×5 mm
无水乙醇	分析纯及以上	培养皿	/
75%酒精	/	镊子	直头无齿
RNase-Zap	thermo fisher/AM9780	注射器	/
离心管	无菌无酶	刀片	/
手术剪	/	尺子	/
无尘纸	KIMTECH/34120	记号笔	非水溶性
自封袋	/	锡箔纸	/

组织取样要求

新鲜植物组织请严格保证**离体 30 min 内**进行实验处理，需最大程度上避免组织内部 RNA 降解。组织切面不建议大于芯片面积（标准芯片大小为 1×1 cm，其他尺寸芯片需要定制）。

操作步骤

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，实验使用的镊子、剪刀均需消毒，并用无尘纸擦干；在**冰上预冷整管 OCT 包埋剂（或提前将 OCT 放置 4 °C 保存）**，准备合适大小的包埋盒，在包埋盒上进行相应信息标记，向包埋盒中预先倒入 1/2~2/3 的 OCT，并将包埋盒置于冰盒上预冷。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

取新鲜植物组织，用剪刀剪下想要测试的部位，并将材料剪切成便于包埋的尺寸。用镊子轻柔地夹起已剪切好的植物材料，快速放入在冰上预冷的 OCT 的包埋盒中，然后调整植物组织摆放方向，组织不要倾斜。

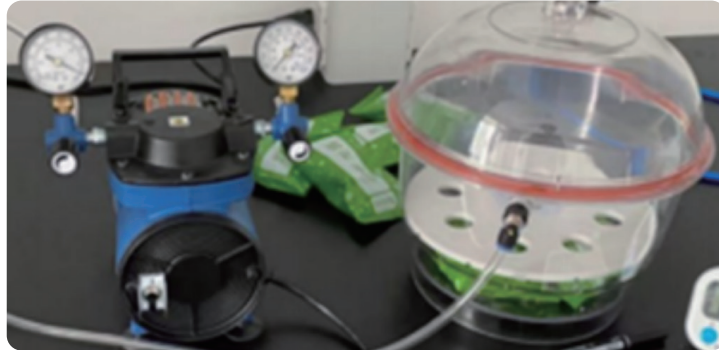
⚠ 注意

- ① 植物外层表皮、韧皮部、木质部等组织在成熟时形成坚硬质地，切片时不容易成片，一般建议取用稍幼嫩的组织进行包埋；
- ② 包埋时，组织不要塞满包埋盒，会导致切片操作困难，建议在一侧留出 2-3 mm 的空白区域。



3 真空抽滤

材料放置完毕后，将包埋盒水平放置在冰盒中，再将冰盒水平放置于真空抽滤的干燥器中，真空抽滤 5-10 min (-0.1 MPa)。真空抽滤后，组织位置会发生一定的变化，可再次用镊子轻压材料，使材料贴在包埋盒底面上，保证表面平整（如有气泡可用枪头或注射器吸弃，以便于后续切片实验）。



4 样本速冻

将含有植物组织的包埋盒转移到盛有干冰的保温盒内，保持水平放置直到包埋盒内部 OCT 完全凝固（如果没有干冰，可以在 -80 °C 冰箱中进行 OCT 冷冻凝固）。

⚠ 注意

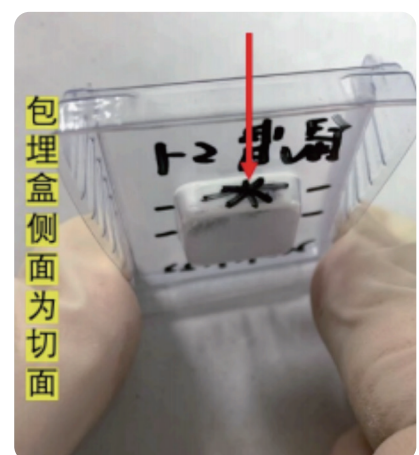
- ①此方法包埋的组织块应尽量避免反复冻存，建议一次性对同一组织包埋多个组织块冻存在 -80 °C，每次取新的组织块切片，切片后组织块可丢弃；
- ②不推荐液氮速冻或液氮+异戊烷速冻，冰冻速度太快容易导致材料在切片时破碎。

5 样本保存

将 OCT 已凝固好的包埋盒，使用锡箔纸包裹，放入自封袋内，并在袋上标记包埋植物组织名称、物种类型和包埋时间等信息，保存于 -80 °C 冰箱中，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。在切面位置打“*”，并标记箭头来指示切片方向。



03. 植物固定后 OCT 冷冻包埋

组织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	biosharp BL557A	包埋盒底膜	世泰 7×7×5 mm/ 15×15×5 mm
无水乙醇	分析纯及以上	培养皿	/
75%酒精	/	镊子	直头无齿
冰醋酸	分析纯及以上	注射器	/
RNase-Zap	thermo fisher/AM9780	刀片	/
Nuclease-Free Water	Invitrogen/4387936	尺子	/
蔗糖	/	记号笔	非水溶性
10×PBS	/	锡箔纸	/
离心管	无菌无酶	无尘纸	KIMTECH/34120
手术剪	/	自封袋	/

组织取样要求

新鲜植物组织请严格保证**离体 30 min 内**进行实验处理，需最大程度上避免组织内部 RNA 降解。组织切面不建议大于芯片面积（标准芯片大小为 1×1 cm，其他尺寸芯片需要定制）。

Tips

OCT包埋前需使用固定液的样本主要针对含水量较多、结构精细、易变形或特殊成分的组织（如根尖分生组织、花药等），以确保冷冻切片时维持形态完整性和分子稳定性。

操作步骤 (该实验步骤需连续操作3天, 每天1-3h)

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, 实验使用的镊子、剪刀均需消毒, 并用无尘纸擦干; 在冰上预冷整管 OCT 包埋剂 (或提前将 OCT 放置 4 °C 保存), 准备合适大小的包埋盒, 在包埋盒上进行相应信息标记, 向包埋盒中预先倒入 1/2~2/3 的 OCT, 并将包埋盒置于冰盒上预冷。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 第 1 天实验操作内容

a. 所需溶液配置: 配制卡诺氏固定液 (试剂的体积比为乙醇:冰醋酸=3:1, 准备2次的使用量, 冰醋酸具有挥发性和刺激性, 应在通风橱中操作, 卡诺氏固定液的体积不超过装载容器容积的四分之三, 并置于冰上或 -20 °C 预冷); 根据下方两个表, 配制含有 3% (w/v) 蔗糖的 0.5×PBS 溶液 (2次使用量), 先配制 0.5×PBS 溶液, 再根据不同体积称取蔗糖加入新的容器中; 加入 0.5×PBS定容至对应体积, 置于冰上预冷 (建议最后以定容体积为准, 不要按照计算好的体积加)。

配制0.5×PBS溶液

体积	5 mL	10 mL	100 mL
10×PBS	250 μL	500 μL	5 mL
Nuclease-Free Water	补充至 5 mL	补充至 10 mL	补充至 100 mL

根据不同体积称取蔗糖

体积	5 mL	10 mL	100 mL
蔗糖加入量	0.15 g	0.3 g	3 g

b. 剪取合适大小的植物组织, 用镊子迅速将其放入预冷的卡诺氏固定液中, 冰上或 -20 °C 固定 1 h; 孵育 1 h 结束后, 吸弃原有固定液, 再加入新鲜的预冷卡诺氏固定液, 冰上或 -20 °C 固定 1 h, 共计固定 2 次;

c. 固定完毕后, 弃掉固定液, 加入预冷的 3% 蔗糖 0.5×PBS 溶液, 冰上放置 1 h;

d. 吸弃液体, 加入新的预冷 3% 蔗糖 0.5×PBS 溶液, 4 °C 放置过夜。

③ 第 2 天实验操作内容

- e. 取合适大小的包埋盒，在包埋盒上进行相应信息标记，加入适量 OCT，置于冰盒上预冷；
- f. 弃去 3% 蔗糖 0.5×PBS 溶液，用镊子轻柔地夹取植物组织，用无尘纸吸干组织表面液体，放入包埋盒中，调整植物组织摆放方向；

⚠ 注意

包埋时，组织不要塞满包埋盒，会导致切片操作困难，建议在一侧留出 2-3 mm 的空白区域。



- g. 组织摆放好后，将含有植物组织的包埋盒水平放置到小冰盒中，再将小冰盒水平放置于真空抽滤的干燥器中，真空抽滤 5-10 min (-0.1 Mpa)；



- h. 真空抽滤结束后，将包埋盒水平放置于有盖容器中，盖上盖子，转移至 4 °C 放置过夜。

④ 第 3 天实验操作内容

- i. 将保存于 4 °C 的植物组织包埋盒取出，用镊子轻轻调整组织位置。
- j. 快速将含有植物组织的包埋盒转移到干冰中，水平放置，直到包埋盒内部 OCT 完全凝固；
- k. 将 OCT 已凝固好的包埋盒，使用锡箔纸包裹，放入自封袋内，并在袋上标记包埋植物组织名称、物种类型和包埋时间等信息，保存于 -80 °C 冰箱中，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。在切面位置打“*”，并标记箭头来指示切片方向。



包埋盒切面标记示例图

04. 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，放入密封袋中密封或样本冻存盒中，转移至 -80 °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 $(N+0.5) \times 5$ 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