



基于 Stereo-seq平台 时空转录组学 送样指南

成都基因汇科技有限公司

2025年1月10日

目录

目录.....	2
目的.....	3
适用范围.....	3
时空转录组FF样本准备流程.....	3
一、 样本要求.....	3
1.样本类型.....	错误! 未定义书签。
2.组织尺寸.....	3
3.RNA 完整值 RIN:	4
二、 样本制备.....	4
1.试剂耗材:	4
2.准备.....	5
3.包埋.....	6
二、 样本的保存和运输.....	8
时空转录组FFPE样本准备流程.....	9
一、 样本要求.....	9
1.样本类型.....	9
2.组织尺寸.....	9
3.FFPE样本 RNA 完整值 DV200.....	9
二、 样本制备.....	10
1. 蜡块样本的制备.....	10
2. 蜡片样本的制备.....	10
3. 组织贴芯片样本制备.....	11

三、样本的保存和运输	13
1. 蜡块样本的保存与运输	13
2. 蜡片样本的保存与运输	14
3. 组织贴芯片样本的保存与运输	15

目的

向合作伙伴提供时空转录组实验样品的参考标准及其相关注意事项, 确保合作伙伴提供合格的样品在经过标准生产实验后能够得出满足要求的高质量数据, 并使合作伙伴提供的样品得到有效的保护。

适用范围

本文件主要用于提供**时空转录组**服务相关的样品要求说明、样品的制备说明、样品运输说明以及样品包装说明。

时空转录组FF样本准备流程

一、 样本要求

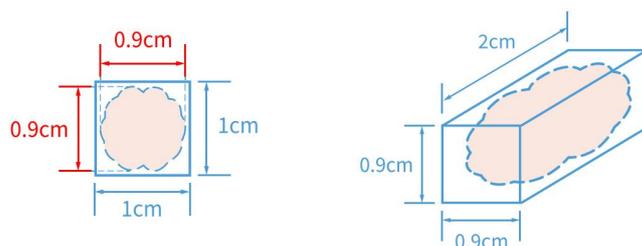
实验室条件下严格保证新鲜样本在离体 30 min 内进行直接包埋处理, 以最大程度避免组织内部 RNA 降解。

***注:** 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, 所以需确认样本的RNA完整性以及组织形态符合要求、可以顺利完成贴片后才能进行下游实验。

1. 组织尺寸

组织长宽分别不超过芯片长宽 $\times 0.9$, 组织切片占芯片面积不应超过80%。

例：适用1cm × 1cm芯片的组织尺寸不应超过 0.9cm × 0.9cm × 2 cm，组织切片 / 芯片面积不应超过 80%。



2. RNA 完整值 RIN:

时空转录组FF v1.3方案适用于 RIN ≥ 4 的组织样本。

二、样本制备

1.试剂耗材:

*以下为一个样本包埋所需耗材或试剂，如需包埋多个样本，需适量增加。



准备材料

名称	推荐品牌/名称/货号	规格	数量
碎冰	-	泡沫箱	1
干冰	-	泡沫箱	1
铝箔纸	-	卷	1
自封袋	-	个	1

金属块	BIOSHARP/Metal Coolbox/BC032	块	1
无菌无纺布	-	张	2
平皿	-	个	1
O.C.T	Sakura/O.C.T Compound/ 4583	瓶	1
金属包埋盒 A	Sakura/Base Molds/4132/4133或其它品牌适合尺寸的包埋盒	个（按组织大小决定）	1
金属包埋盒 B	Sakura/Base Molds/4133/41565/4124或其它品牌适合尺寸的包埋盒	个（尺寸略大于金属包埋盒A）	1
钝头镊子	-	支	1
注射器	-	支	1
药匙或抹刀	-	个	1
剪刀	-	把	1
钢尺	-	把	1

2.准备

1. 提前准备一泡沫箱碎冰并将 OCT 放在冰上预冷 10 min;
2. 根据组织大小提前准备两个合适大小的金属包埋盒 A 和 B（B 的尺寸需略大于 A）;

3. 提前将预冷好的 OCT 填充金属包埋盒 A 的 2/3 左右，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）;



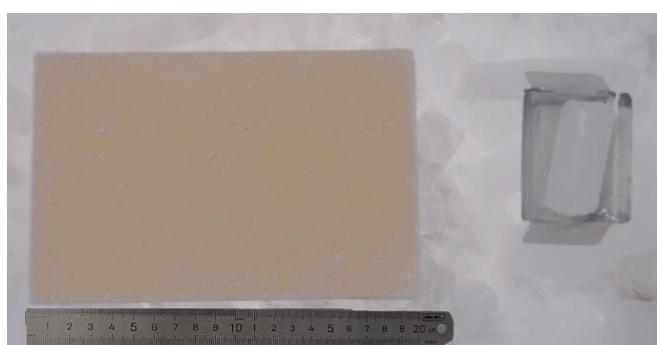
4. 在平皿中加满 OCT，提前预冷10 min（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



5. 准备一泡沫箱干冰；

6. 准备具有平整面的金属块，金属块面积需大于金属包埋盒 A，用于平放金属包埋盒；

7. 将金属块平整面向上放置到干冰中，将金属包埋盒 B 及钢尺放置于干冰中，预冷 5 min 以上。



3.包埋

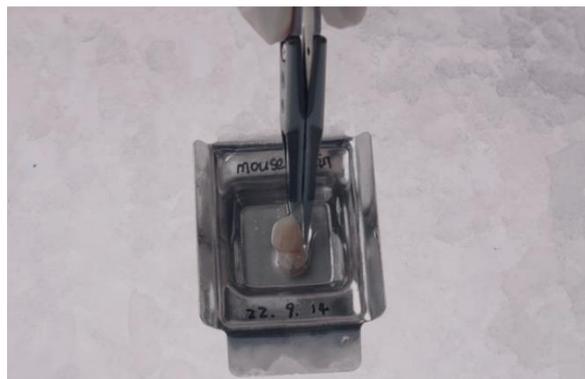
1. 新鲜组织离体30分钟内，用无菌无纺布或无尘纸擦干组织表面液体，以避免在组织表面形成冰块影响后续包埋切片



2. 将组织放入在冰上预冷的OCT中，在不产生气泡的前提下用药匙使组织被OCT包裹（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



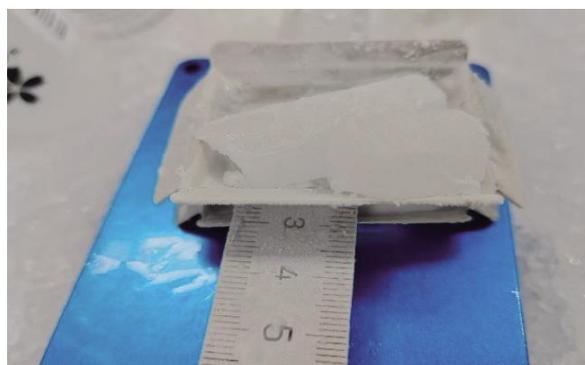
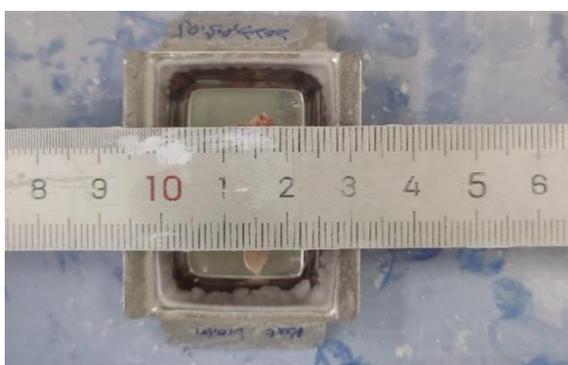
3. 将组织的拟切面朝下，放入冰上预冷的**金属包埋盒 A** 中，使组织接触到**金属包埋盒 A** 的底部。在不产生气泡的前提下用预冷的 OCT 填满**金属包埋盒 A**，直至将组织完全覆盖（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



4. 将装有组织的**金属包埋盒 A**，水平放置在干冰预冷的金属块上；



5. 先将预冷的钢尺放在**金属包埋盒 A** 的长高边上（防止组织被压变形），然后将预冷的**金属包埋盒 B** 开口向上，轻轻加盖于装有组织块的**金属包埋盒 A** 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；



6. 冷冻 5 min 后，移去**金属包埋盒 B** 和钢尺，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 A** 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，在包埋块切面位置做好标记。



二、 样本的保存和运输

将组织包埋块使用锡纸包裹，并做好标记放入自封袋，在自封袋上做好记录，放入 -80°C 冰箱长期保存。如需邮寄，可选干冰邮寄。

时空转录组FFPE样本准备流程

一、样本要求

1.样本类型

适用于常见动物物种的 FFPE 蜡块样本、FFPE 蜡片样本及 FFPE 组织贴芯片样本的时空转录组研究，主要适用于人类病理样本，另外包括但不限于鼠、猴、猪等样本

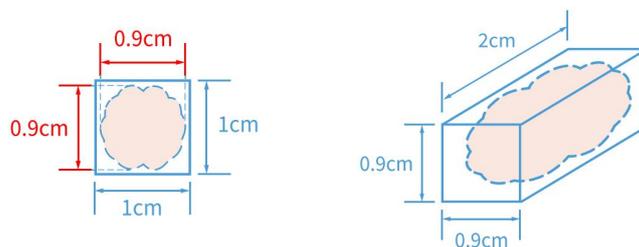
*注：

- 组织取样后应尽快使用 10% 福尔马林或 4% 多聚甲醛（PFA）固定 12-48 hr（参考各医院病理科样本固定的方法），其他固定条件建议先咨询或自行承担风险，优先推荐使用 10% 福尔马林固定；
- 蜡块制作后需封蜡，避免出现组织风干、被腐蚀、发霉等情况；
- 样本处理需保持组织原有结构；

2.组织尺寸

组织长宽分别不超过芯片长宽 $\times 0.9$ ，组织切片占芯片面积不应超过80%。

例：适用1cm \times 1cm芯片的组织尺寸不应超过 0.9cm \times 0.9cm \times 2 cm，组织切片 / 芯片面积不应超过 80%。



3.FFPE样本 RNA 完整值 DV200

样本要求 DV 值 $\geq 30\%$

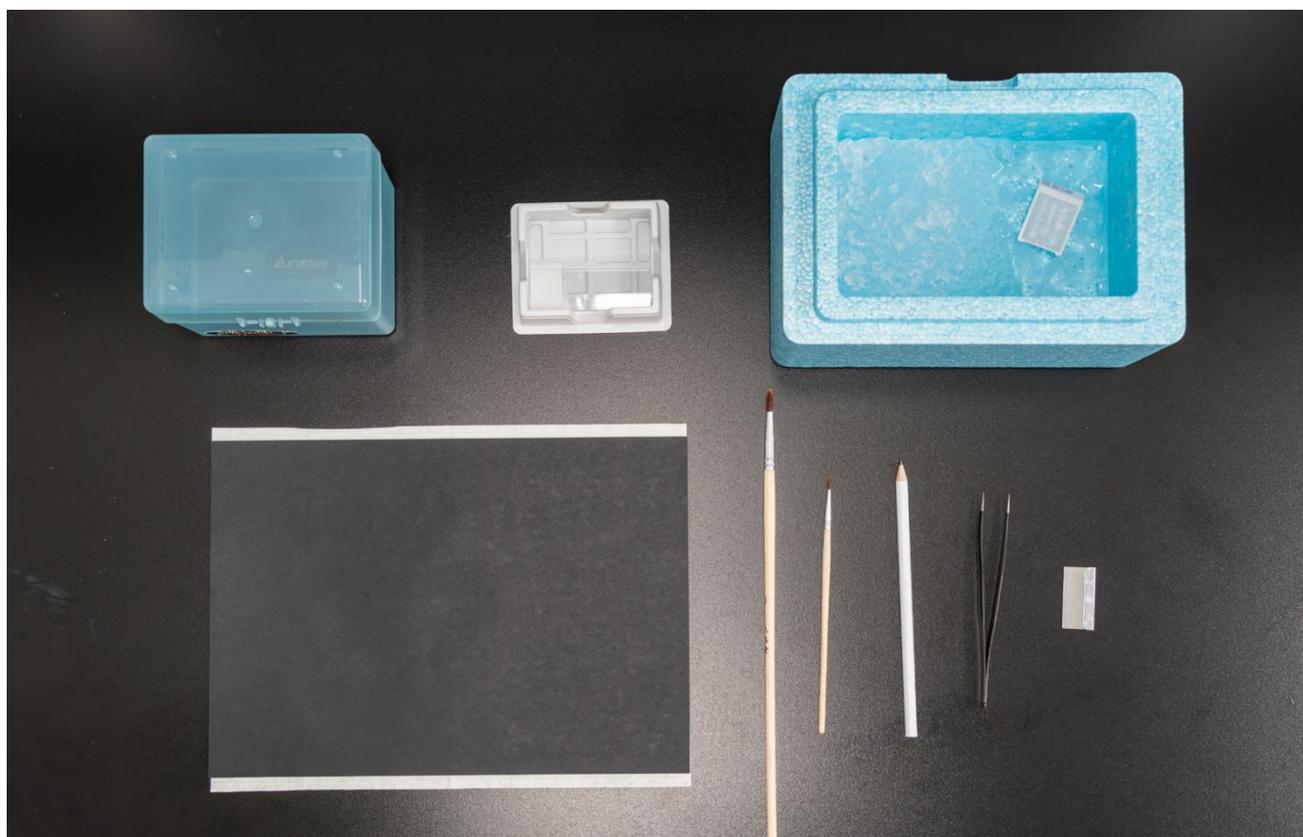
二、样本制备

3. 蜡块样本的制备

蜡块制作可参考各医院病理科制作蜡块的流程，要求脱水充分、浸蜡充分，切片可连续成片、无裂痕和空腔（组织本身自带除外），样本切片过程中不会与外部包埋的蜡分离。

4. 蜡片样本的制备

试剂	准备方法（1片用量）	备注
30%乙醇	120mL无水乙醇加入到 280 mL ddH ₂ O 中，混匀，加入容器中	捞片，现配现用



该流程建议由具有丰富经验的石蜡切片技术人员操作。

当蜡块是脂肪含量高的组织（如乳腺组织）时，可以将蜡块置于 -20℃ 冷冻 10 min 再切片。

1. 准备好石蜡切片机，准备毛刷、镊子以及新的刀片；准备 30% 乙醇（300~400 mL），装于 1 mL 或 200 μ L 枪头盒内（或其他可以承装液体的宽口容器）；
2. 取出 FFPE 蜡块，置于冰水混合物中 10-30 min；或将组织面贴在冷却台上冷敷 5-10 min；

3. 切片前擦拭蜡块表面及周围水迹，固定在切片机上准备切片，若组织包埋较深，可以先用旧刀片修除多余的蜡，切到组织暴露后，锁住刀头，换新的刀片进行切片；



4. 调整切片厚度，普通组织建议 5 μm 、脂肪含量高的组织（如乳腺组织）建议4 μm （为降低后续操作中的脱片风险）进行切片；

5. 正式切片时，首先将第 1 片丢弃（厚度不符合要求）；

6. 在随后的切片过程中选出需要的目标切片，用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体；

*注：如需保留相邻切片，则可连续切 3 片，将第 1 片和第 3 片贴于粘附载玻片用于后续 H&E 染色；小心分割出第 2 片用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体；

5. 组织贴芯片样本制备

提前开启摊烤片一体机，设置水浴温度 40~48 $^{\circ}\text{C}$ （医院病理科可按照各自常用的水浴温度设置），烤片温度 42 $^{\circ}\text{C}$ ；

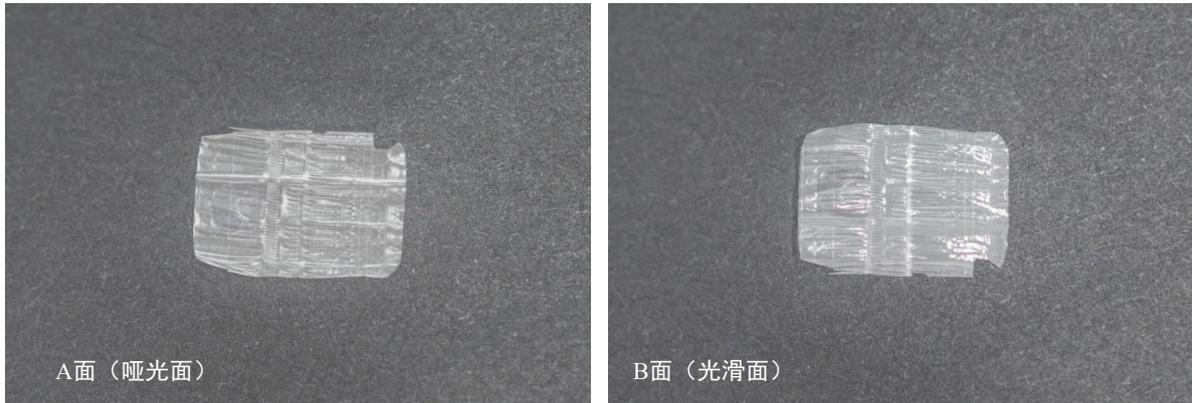
如无摊烤片一体机，可采用摊片水浴锅配合 PCR 仪替代，提前装置 PCR 适配器(adaptor)到 PCR 仪上，设置程序如下并点击运行：

烤片程序设置

程序选择：Incubate

温度	时间
45 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	on
42 $^{\circ}\text{C}$	∞
42 $^{\circ}\text{C}$	3 hr
37 $^{\circ}\text{C}$	∞

*注：一张石蜡切片分 AB 面，正对切片操作人员的一面为 A 面（哑光面），贴于刀刃的面为 B 面（光滑面）；后续操作始终保持 B 面朝下，贴于液体、芯片和玻片，以防脱片。



1. 将目标切片修剪至芯片大小合适的尺寸（以 1 cm × 1cm 芯片为例，修剪至切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），将修剪后的蜡片用毛刷或镊子小心转移至 30% 乙醇中预展片，注意保持 B 面朝下贴于 30% 乙醇；

如需保留严格相邻切片，则建议两张邻片分开转移至 30% 乙醇和水浴锅，后续捞片时 分别贴于两张粘附载玻片，做好标记便于区分。

该步骤用于辅助转移切片至水浴锅中，可确保展片顺利，若由经验丰富的实验师操作，可跳过该步骤。

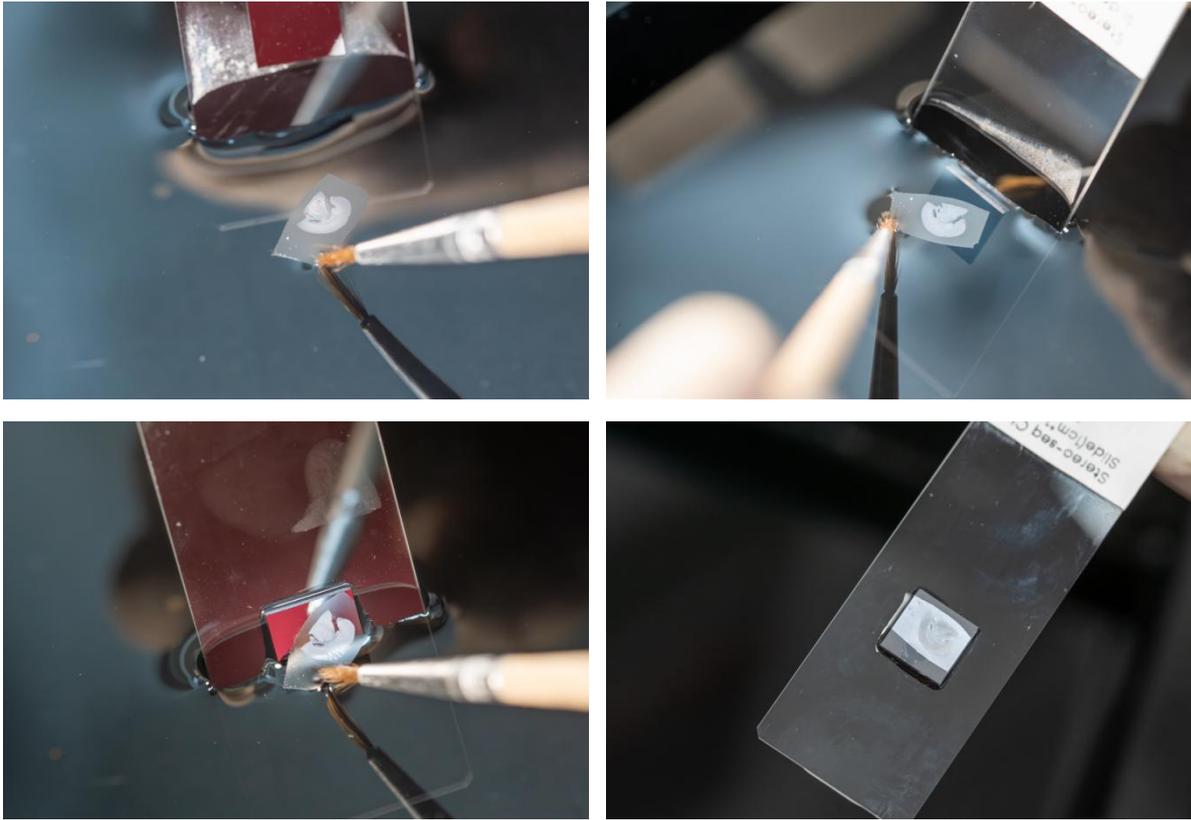
2. 确认水浴锅预热到目标温度（40~48℃），用干净的普通载玻片将蜡片从 30% 乙醇溶液捞起，转移至预热好的水浴锅中，保持 B 面朝下接触水面；

建议切片新手注意观察切片组织在水浴锅中的状态。

组织状态	原因	操作
组织部分完全展平无褶皱	正常	按实验说明开展下一步
组织部分一直有褶皱	温度过低	调高水浴锅温度0.5-1℃，继续观察，直到组织完全展平
组织周围的蜡有融化迹象	温度过高	停止加热并添加少量冷水，并准备立即捞片

3. 组织切片完全展平后，取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，记录芯片编号，注意不要触碰芯片表面；

4. 用毛刷轻轻抵住已展平的切片一角，将芯片载体靠近组织，使组织切片的 B 面能够覆盖到 Stereo-seq 芯片 N 载体上的芯片，离开水面完成贴片（捞片）。如需保留邻片做 H&E 等，将邻片用粘附载玻片捞片即可；



贴到 Stereo-seq 芯片 N 载体的组织区域，需要有明显的组织特征（如肠绒毛结构、免疫细胞明显聚集等），以便于获得捕获矩阵后，同 H&E 图像进行配准；若所选区域组织特征不明显，建议组织在贴芯片时留出约 15% 的留白区域，以便进行 H&E 图像配准。

5. 用无尘纸小心擦去载体背面及芯片四周的水迹，平放在 PCR 适配器(adaptor)上，点击 edit 并点击 next step，跳过 42°C ∞ ,42°C烤 3 hr 后 37°C 烤过夜。如需保留邻片，将捞片后的粘附载玻片按常规 H&E 染色流程进行操作即可；

停止点:

将 42°C 烤片 3 hr 后的 Stereo-seq 芯片 N 载体放入玻片保存盒中，盖上盖子，置于 25°C或 37°C烘箱中，可存放 48 hr；或置于 4°C并添加干燥剂保存 1 周。

*注:

- ① 具有丰富切片经验的技师可按照自己的习惯进行切片和贴片操作，贴芯片操作与贴玻片相同；
- ② 注意贴片后，贴到芯片的切片表面应避免出现气泡；
- ③ 烤片也可以使用金属浴，或其他能够准确恒定加热的模块做替代。

三、样本的保存和运输

1. 蜡块样本的保存与运输

保存条件:

蜡块存放于室温或 4~8℃。

运输条件:

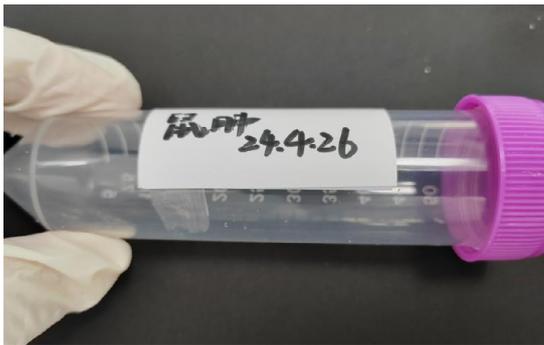
- 蜡块放入密封袋中密封，根据寄送距离和时间，选择大小合适的泡沫盒，其厚度不低于 3 cm，且封口严实，保证泡沫盒密闭；
- 寄送使用冰袋寄送，寄送时间 >24 hr，应不少于 6 块冰袋 (13 cm×23 cm) ；
- 样本做好防撞措施，建议使用泡沫、发泡纸等多层包裹以避免运送过程中碰撞影响样本；
- 夏季因外界温度较高，可适当增加冰袋数量，确保样本运输过程中温度仍处于 2~8℃。

2. 蜡片样本的保存与运输

保存条件:

样本制备完成后，可在 4℃冰箱密封短暂保存，短暂保存加上整个运输过程时长不超过 1 周。

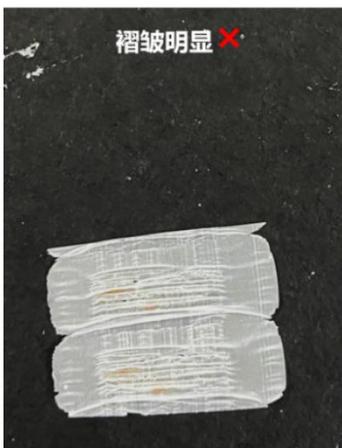
在 50 mL 离心管外标签处写上样本名称和日期，装入自封袋并放入干燥剂密封保存。预防发生损耗，经过质检的同一样本可一次运输 3-5 张蜡片，蜡片运输后可在 4℃ 保存 1 周。



蜡片要求:

- 切片：按照组织切片要求，选取的蜡片需平展，能顺利展片，无需修片；

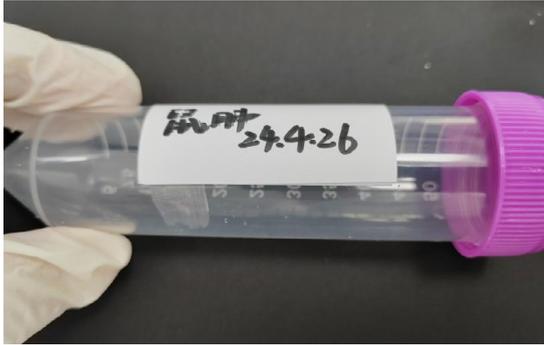
注意不能褶皱过多、破碎，可在蜡片运输前展片测试，如不能成功展片，不建议寄送此蜡片。



- 送样：使用小毛刷或镊子将单张蜡片送进全新的 50 mL 离心管中并盖紧罐盖；



c. 密封保存：在 50 mL 离心管外标签处写上样本名称和日期，装入自封袋并放入干燥剂密封保存。预防发生损耗，经过质检的同一样本可一次运输 3-5 张蜡片



运输条件：

将密封好的自封袋装入泡沫箱中，推荐使用冰袋运输。

- 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；
- 寄送使用冰袋寄送，寄送时间 >24 hr，应不少于 6 块冰袋（13 cm×23 cm）；
- 样本做好防撞措施，建议使用泡沫、发泡纸等多层包裹以避免运送过程中碰撞影响样
- 夏季因外界温度较高，可适当增加冰袋数量，确保样本运输过程中温度仍处于 2~8℃。

3. 组织贴芯片样本的保存与运输

保存条件：

用自封袋在 4℃密封干燥可保存 1 周。

样本制备完成后，可在 4℃冰箱密封短暂保存，短暂保存加上整个运输过程时长不超过 1 周。

运输条件：

将自封袋装至硬盒中（防止被压变形），再放入泡沫箱邮寄，推荐使用冰袋运输。

- 将组织贴芯片样本放入密封袋中密封，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；
- 寄送使用冰袋寄送，寄送时间 >24 hr，应不少于 6 块冰袋（13 cm×23 cm）；
- 样本做好防撞措施，建议使用泡沫、发泡纸等多层包裹以避免运送过程中碰撞影响样本；

d. 夏季因外界温度较高，可适当增加冰袋数量，确保样本运输过程中温度仍处于 2~8℃。

