

生工[®] Sangon Biotech



生工高通量测序部送样手册 (单细胞/空间组学类项目)

生工生物工程(上海)股份有限公司

目录

1	单细胞/空间组学送样要求	3
1.1	10×单细胞转录组和 10×单细胞免疫组库测序	3
1.1.1	各样本类型对应的送样要求	3
1.1.2	取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	3
1.1.3	注意事项	6
1.1.4	预约实验说明	6
1.2	SMART-seq2 项目	7
1.2.1	各样本类型对应的送样要求	7
1.2.2	取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	7
1.2.3	注意事项	8
1.3	空间转录组测序	8
1.3.1	各样本类型对应的送样要求	8
1.3.2	取样操作流程 (含取样/保存/运输等)	9
1.3.3	预约实验说明	16
1.3.4	风险提示	17
2.	样本准备注意事项	18
3.	样本寄送注意事项	18

1 单细胞/空间组学送样要求

1.1 10×单细胞转录组和 10×单细胞免疫组库测序

1.1.1 各样本类型对应的送样要求

样本类型	建议送样量	最低送样量	生物学重复
新鲜组织	≥0.4g	≥0.2g	≥3 个, 临床样本 ≥10 个
穿刺样本	≥ 3 根	≥2 根	
血液	5ml	3ml	
冻存组织 (只能抽核, 不适于 免疫组库测序)	≥1g	≥0.5g	
培养细胞系			
冻存细胞	细胞数 ≥ 1×10 ⁶ ; 冻存前细胞活性在 90%以上		
单细胞悬浮液	细胞量 ≥ 5×10 ⁵ ; 活性 > 80%; 细胞 直径 < 40μm; 结团率 < 5%		

1.1.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

1) 新鲜组织

样本收集:

- ① 新鲜组织取样后, 后续所有操作均需在 4℃低温进行 (在制冰机制备的碎冰上操作)。
- ② 将新鲜的组织放在培养皿中, 去除非研究组织, 坏死组织等。
- ③ 取适量的新鲜目标组织部位到新的培养皿中, 加入 1XPBS 对新鲜的目标组织块进行几次清洗, 去除血渍, 小心移净液体。
- ④ 使用已灭菌的剪刀和镊子将目标组织部位剪成 2-4mm³ 大小的组织块。

样本保存:

将处理后的组织块完全浸润于 4℃预冷 1.5ml 样品管的美天旆组织保存液 (货号 130-100-008) 中, 4℃短暂保存

样本寄送:

2-8℃ (冰袋) 避光运输, 取样后需在 48 小时内到达生工生物实验室, 进行组织解离。

样本备份:

为防备部分样品重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

2) 血液**① 新鲜全血****样本收集:**

抽取新鲜的外周血至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中, 轻摇混匀。注意不要产生凝血块, 所有操作均需无菌条件下进行。

样本保存:

4 °C 短暂保存

样本寄送:

将全血抗凝管使用缓冲介质包裹后, 外部使用冰袋包装后寄送, 注意从-20°C 取出的冰袋不要直接接触样品, 以免造成血液样本结冰, 导致样品局部冻伤而使细胞失活。

② 从全血中收集 PBMC

- A. 抽取新鲜的外周血 至 EDTA 抗凝管(紫色帽子)中, 注意所有的操作均需无菌条件下进行, 准备的新鲜全血样本需不少于 5mL 并采用 EDTA 抗凝。
- B. 向全血样本中加入等量 1XPBS 稀释全血。
- C. 在离心管中加入适量分离液 (当稀释后血液体积小于 3mL 时, 加入 3mL 分离液; 大于等于 3mL, 加入等体积分离液。但二者的总体积不能超过离心管的三分之二, 否则会影响 分离效果), 将 稀释后的血液平铺到分离液液面上方, 注意保持两液面界面清晰。(可以使用巴氏德吸管吸取 血液, 然后将血液小心的平铺于分离液 上, 因为两者的密度差异, 将形 成明显的分层界面。如果样品较多加样时间较长, 在离心之前出现红细胞成团下沉属正常现象。)
- D. 室温, 水平转子 500~1000g, 离心 20~30min (血液的体积越大所需的离心力越大, 离心时间越长, 最佳的分离条件需摸索, 离心转速最大不超过 1200g), (注意离心机降速设置中一定要设置成 no break, 使离心升速与降速平缓)。
- E. 离心后将出现明显的分层: 最上层是稀释的血浆层, 中间是透明的分离液层, 血浆与分离液之间的白膜层即为单个核细胞层, 离心管底部是红细胞与粒细胞。
- F. 小心的吸取白膜层细胞到 15mL 洁净的离心管中, 10mL PBS 或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞。300g, 4°C 离心 10min (注意离心机降速设置中一定要设置成 no break, 使离心升速与降速平缓)。

G. 弃上清, 5mL 的 PBS 或细胞清洗液重悬细胞, 300g, 4°C 离心 10min。(注意离心机降速设置中一定要设置成 no break, 使离心升速与降速平缓)。

H. 重复步骤 F

I. 弃上清, 进行红细胞裂解处理后, 300g, 4°C 离心 10min. 弃上清, 1XPBS 重悬细胞。

样本保存:

细胞计数仪计数, 以按照 $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ /mL/管细胞浓度进行冻存, (冻存液配制: 90%FBS+10%DMSO) 放入冻存管中, 梯度降温盒保存置于-80 摄氏度冰箱。

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/ 天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为避免多个实验造成样本反复冻融, 防备部分样品降解重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

3) 培养细胞系

样本收集:

- ① 以贴壁细胞为例, 一般选择生长良好的细胞系, 以生长至 1/3-1/2 瓶底壁为宜;
- ② 无菌环境下去掉旧培养液, 灌满新的培养液, 使用不透气的盖子, 将培养瓶盖用封口膜封紧。

样本保存:

常温短暂保存 (37°C)

样本寄送:

快递箱内需放些缓冲介质避免培养瓶大幅度晃动, 常温运输; 如果温度较低, 需要做好保温。

样本备份:

为避免样品不合格需重新取材、制备或送样, 建议样品至少备份 1-2 份。

4) 单细胞悬浮液

- ① 细胞活率: $\geq 80\%$ (DeNovix® CellDrop FL 细胞计数仪计数, 或血球计数板用显微镜判断);
- ② 细胞形态: 细胞大小均一, 直径介于 7-40 μm (注: 对于非人、鼠物种请提前沟通客户样品的细胞大小, 若细胞直径过小 (<7 μm) 请确定客户是否有能准确计数及检测活率的方法及仪器;

- ③ 悬液背景: 细胞团及碎片杂质<5%, 若有红细胞, 还需进行裂红处理, 无细胞粘连, 无明显的细胞碎片和细胞团, 并保证细胞的完整性;
- ④ 细胞数目: 细胞数目 ≥ 10 万
- ⑤ 细胞悬液: 不能存在反转录抑制剂, 即不含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。

样本保存及运输:

- 1) 4°C运输,细胞悬液需要在 30 分钟内送达生工生物单细胞测序组实验室。
- 2) 超过 30 分钟需进行细胞冻存, 冻存方法: 细胞数目 ≥ 10 万进行冻存(冻存液配制: 90%FBS+10%DMSO) 冻存液重悬混匀, 放入冻存管中, 梯度降温盒保存。使用厚度 4cm 以上的泡沫箱包装, 10kg 以上的干冰运输, 避免冻融。

样本备份:

为防备部分样品重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

1.1.3 注意事项

- 1) 组织保存液 2-8°C保存, 不可冷冻, 使用时始终置于碎冰(4°C)上。
- 2) 组织保存液不含抗生素及抗真菌剂等组分, 如有需要可先于细胞培养基中添加。
- 3) 所用耗材(离心管或冻存管)需保证无菌。

1.1.4 预约实验说明

1) 样品要求

组织样品: 确保样品新鲜无明显坏死; 寄送样品需确保组织离体后 48h 之内, 且在 9: 00-15: 00 点之间到达实验室, 晚于 15: 00 的组织保护液保存至第二天实验。

细胞悬液: 确保客户的细胞悬液满足样品质检要求。

2) 预约前提

有客户签字并返回公司的合同。预约实验前, 需指定技术支持, 由项目技术支持确认商务信息合规, 否则不能预约实验。

3) 预约时间及方式

预约时间:

- ① 寄送样本: 建议及早预约, 一般本地提前 2 天、外地提前 3 天预约成功率较高。
- ② 上门服务: 建议提前一周预约成功率较高。

预约方式:

- ① 寄送样本: 预约前请填写《生工生物高通量单细胞测序送样表》, 发邮件预约并抄送技

术支持或项目助理。预估到样时间。

- ② 上门服务：预约前请填写《生工生物 10×Genomics 单细胞上门服务信息确认表》，发邮件预约并抄送技术支持或项目助理；注明时间和地点，时间具体到小时。

注：无特殊情况不得轻易更改实验时间，如确需不同项目间做时间调换，请提前沟通确认。

4) 客户细胞悬液制备完成时间要求

- ① 为了保证细胞的活性，同批次的多个样本，第一个样品和最后一个样品悬液制备完时间控制在 30 分钟之内。
- ② 若客户需在同一天进行 2 批或 2 批以上的悬液制备，第一批悬液在上午 9 点之后完成制备，最后一批悬液在下午 16:00 点之前完成制备，且批次之间相隔 1 小时以上。

1.2 SMART-seq2 项目

1.2.1 各样本类型对应的送样要求

样本类型	送样量	备注	生物学重复
细胞	1-1000 个细胞	不适用于经甲醛或甲酮等固定过的细胞	≥3 个，临床样本 ≥10 个
RNA	建议 ≥50ng; RIN ≥8; 体积 ≥15ul	尽量多送些，过少将无法安排质检	

备注：仅适合真核有参考基因组物种来源样本

1.2.2 取样操作流程（含取样/保存/运输等）

样本收集（细胞样本）：

由客户制备分离单细胞：可选用有限稀释、流式细胞仪、显微操作，Fluidigm C1 等方法分选单细胞；

- 1) 按照下表在冰上配制 Reaction Buffer，配制好后用移液器轻柔混匀，并短暂离心收集，混匀时避免产生气泡。

组分	体积
10X Cell Lysis Buffer	19μl
RNase Inhibitor	1μl
Total	20μl

备注：10X Cell Lysis Buffer 和 Nase Inhibitor 由生工提供，请在收样前提前联系我们寄送

- 2) 请按照下表在冰上配制反应液，充分混匀。

组分	体积
----	----

上述 10X Reaction Buffer	1 μ l
Cell*c	——
Nuclease free water	Up to 10.5 μ l

备注:

- ① 若为 PBS 重悬细胞: 建议加入的细胞液不超过 5 μ l; 由于培养基及其他组分对反转录及 PCR 反应有抑制作用, 建议将细胞用不含 Mg²⁺、Ca²⁺等的 1X PBS 洗涤两次并重悬, 反应时加入体积越少越好。细胞数量不要超过 1000 Cells, 过多的细胞会对反应产生抑制。
- ② 若用流式细胞仪分选细胞: 可将细胞直接分选至上述 10.5 μ l 反应液中, 轻柔涡旋混匀。

样本保存:

-80°C 保存

样本寄送:

预约干冰进行样品寄送, 由于温度不同, 干冰挥发程度不同, 建议按照 5kg/天计算, 一般时效性在 3 天, 约需要 15-20kg 干冰, 准备足量的干冰, 避免冻融。

样本备份:

为防备部分样品重新取材、制备或送样, 建议样品按需多管分装存储, 至少备份 1-2 份。

1.2.3 注意事项

- 1) 请直接将细胞裂解于 0.2ml PCR 管中, 避免扩增转管造成的污染和损失。在管上清楚标明样本名称; 样本管上标记的名称要与送样表中一致, 请核实无误; 请用 parafilm 膜把样本管密封好, 然后将样本管置于保护用的 50 mL 离心管或其他类似容器里, 并旋紧盖子;
- 2) 细胞放入 SMART-seq2 试剂盒指定的裂解液中 (提前联系当地销售由生工提供), -80°C 保存, 将样本置于适当的包装箱中, 足量干冰包装, 选择适当的运输方式以避免样本降解;
- 3) RNA 样本寄样前需客户自行对 RNA 的完整性进行检测确认。

1.3 空间转录组测序

1.3.1 各样本类型对应的送样要求

- 1) **冷冻组织包埋:** 包括但不限于人、鼠的新鲜组织样本

该类新鲜组织样本冷冻包埋方式称为 OCT 包埋, OCT 包埋是一种聚乙二醇和聚乙烯醇的水

溶性混合物, 此包埋方式可以使样本在冰冻切片时起支撑作用, 增加组织连续性, 减少皱褶及破碎。

2) FFPE 样本: 物种仅限于人

使用福尔马林固定, 石蜡包埋的新鲜冻存样本。FFPE 样本常温可长期保存, 是肿瘤研究领域疾病诊断和科学研究中非常常见的生物学材料。

1.3.2 取样操作流程 (含取样/保存/运输等)

1) 冷冻组织包埋

取样说明:

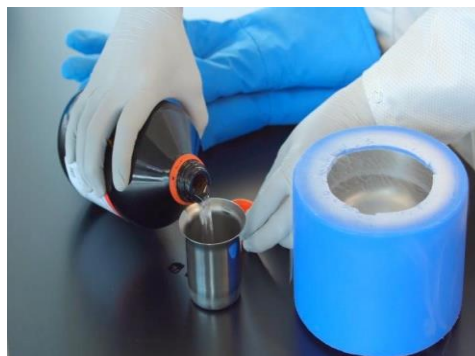
新鲜组织样本必须进行快速冷冻以防止 RNA 降解 (根据样本实际情况选择①或②其中一种冻存方式)

- ① 新鲜组织取样-异戊烷冻存-OCT 包埋: 如果直接放入液氮会在组织周围形成冰晶导致组织形态受损。用异戊烷冷冻后进行 OCT 包埋, 是对组织形态和防止 RNA 降解最有利的保护。
- ② 新鲜组织取样-OCT 包埋-异戊烷冻存: 对具有缝隙、易于卷曲, 组织脆弱易开裂及组织块过小的组织先进行 OCT 包埋再冷冻一种比较好的备样方案。

取样流程:

新鲜组织取样-异戊烷冻存-OCT 包埋

- ① 向金属杯内装入 2/3 的异戊烷 (完全浸没组织的量), 然后将金属杯放入液氮槽中, 液氮的液面和金属杯里面异戊烷的液面高度基本一致, 冷浴 10min 左右, 不易太久, 防止异戊烷凝结。



- ② 使用实验室无尘纸将组织表面多余的血液或液体吸干净, 尽量使组织表面干燥, 防止形成冰晶。

注意: 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部分。例如: 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); 送来的组织生工生物均默认为目标组织。如果组织体积较大, 应尽量将组织切成长宽高约 0.8 cm 的小块(小拇指大小), 一个样本需准备至少需要冻存 3 个备份, 一份用于常规 RNA 提取, 以确保样本自身及样本制备不存在问题, 一份用于切片厚度调整以及捕获区域的确定, 一份用作正式实验。



- ③ 用镊子或刮刀将组织放入 2.1 步骤的异戊烷中, 直到完全浸没。组织浸入约 1min 或直至冻结。冷冻时间根据组织类型和大小而定。



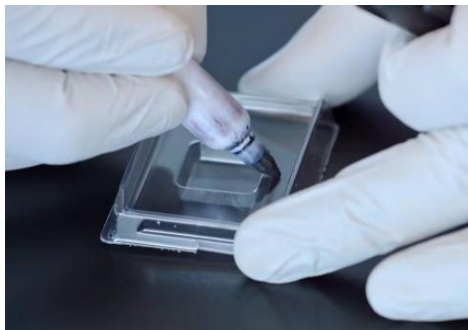
注意: 部分组织异戊烷速冻, 组织会开裂, 开裂会影响其空间结构, 不适合继续进行后续操作。

- ④ 将冷冻后的组织转移到预冷的冻存管内, 为防止组织样品蒸发和脱水, 快速冷冻的组织样品必须储存在密封容器中。然后放在干冰上, 及时转移至-80℃冰箱。



注意：冷冻的组织在-80℃冰箱可以长期保存，或干冰运输至生工生物实验室，或立即进行下一步操作。

⑤ 标记适当尺寸的包埋模具以标记组织的摆放位置（可拍照记录），将模具放于碎干冰上



注意：在加入 OCT 和组织之前，对包埋模具做标记。一旦冷冻，OCT 很快就会变白这使得以后很难确定组织的方向。

⑥ 从-80℃冰箱取出冷冻组织，干冰转移，并放在干冰上待用。



⑦ 先将预冷的 OCT 倒入模具，防止组织沉降。不要产生气泡，若产生气泡，可用枪头或针尖轻轻挑出。



⑧ 使用预冷的镊子将冷冻组织放入 OCT 包埋剂内，组织需完全包埋在 OCT 内，需确认无气泡产生，尤其是靠近组织的位置。



- ⑨ 将 OCT 包埋组织的模具立即转移到干冰粉上，继续倒入预冷的 OCT，直至把组织覆盖，组织需要位于包埋盒中间。



- ⑩ 在干冰上等待 OCT 完全冻结成白色，冻结后的包埋样本标记好名称，将 OCT 包埋的组织块在 -80℃ 的密封容器中长期保存，或立即进行冷冻切片和切片放置。不使用密封容器储存可能会使组织脱水并受损。



注意： 冷冻的包埋样本在 -80℃ 冰箱可以长期保存，或干冰运输至生工生物实验室，或立即进行下一步操作。

新鲜组织取样- OCT 包埋-异戊烷冻存

- ① 向金属杯内装入 2/3 的异戊烷 (完全浸没组织), 然后将金属杯放入液氮槽中, 液氮的液面和金属杯里面异戊烷的液面高度基本一致, 冷浴 10min 左右, 不易太久, 防止异戊烷凝结。



- ② 使用实验室纸巾将组织表面多余的血液或液体吸干净, 防止形成冰晶。

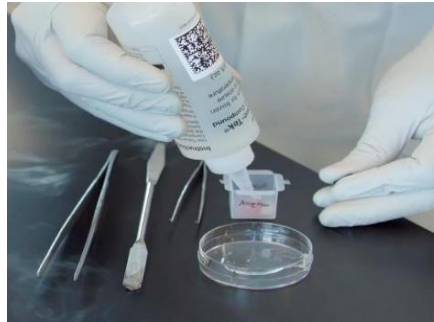


- ③ 预冷的 OCT 直接包裹组织不要产生气泡。若产生气泡, 可用枪头或针尖轻轻出, 不要碰到组织。



④ 将包裹 OCT 的新鲜组织转移至 OCT 模具中，继续倒入预冷的 OCT，直至浸没组织。

模具上标记好方位 (可拍照记录)

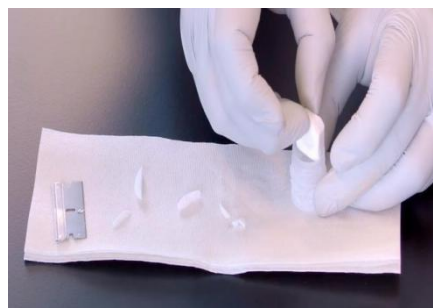


⑤ 将 6.4 中的 OCT 模具放入预冷的异戊烷中，直至 OCT 完全冻结成白色。



注意：不要将异戊烷浸入到 OCT 模具内。如果没有异戊烷，此步可直接在干冰上操作，干冰可盖上盖子加速冻存。

⑥ 将 OCT 包埋的组织块连同包埋模具放入 5ml 冻存管中-80℃长期保存，不使用密封容器储存可能会使组织脱水并受损，或立即进行下一步操作。



注意：冷冻的包埋样本在-80℃冰箱可以长期保存，或干冰运输至生工生物实验室，或立即进行下一步操作。

2) FFPE 样本

取样流程:

1) **取材:** 材料选择时须尽可能不损伤所需要的部分, 刀要锐利, 动物组织取材建议灌流后取材, 冲去过血液。尽可能割取鲜活的组织块, 并随即投入固定液。材料应该小而薄, 一般厚度不超过 5mm, 大小不超过 6.5×6.5mm²。

2) 固定: 保持组织形态并硬化

福尔马林固定: 取好的组织块通常选用 10%中性缓冲福尔马林 (PH 值 7.2-7.4) 进行固定, 组织需要在离体后 30 分钟内尽快固定

标本体积	福尔马林体积	固定时间
厚度 3-5mm	组织: 福尔马林	≤6h
截面 5×5mm ²	≥1: 10	最长不超过 12h

随后用流水冲洗, 大块组织一般冲洗 24 小时, 小块组织一般冲洗 2—10 小时。

3) 脱水

脱水指的是利用脱水剂如不同浓度的乙醇将组织内的水分逐步置换出来, 从 30%乙醇开始, 经过 50%、70%、80%、95%、100%至完全脱水。一般各级乙醇中放置 45min 到 1h。需要注意彻底脱水, 避免残留水分导致核酸降解, 该步骤通常由脱水机完成, 需要注意及时更换脱水机中的液体, 使用新鲜的, 高质量, 不经水稀释的试剂, 避免水分残留。

4) 透明

当组织内的水分被脱水剂置换出后, 将组织块先经纯乙醇与二甲苯的等体积混合液, 再进入透明剂纯二甲苯, 置换出脱水剂, 因透明剂的折光系数接近蛋白的折光系数, 因此会使组织变得透亮, 该过程称之为透明, 建议使用新鲜的二甲苯, 以避免过去使用时水分残留的可能, 透明时间应由组织大小而定, 一般各级停留时间在 30min 至 2h, 在纯二甲苯中应更换 2 次, 总时间则以不超过 3h 为宜。

5) 浸蜡

须在恒温箱中进行, 恒温箱的温度调节至高于石蜡熔点 3 度, 使经过透明的组织块依次用石蜡与二甲苯的等量混合液、纯石蜡处理。纯石蜡应处理 2~3 次, 透蜡的时间依材料性质而定, 一般每次需 15~30min。

注意: 浸蜡和包埋福尔马林固定组织中使用的石蜡溶液温度和组分可能各异, 在使用高熔点的石蜡时, 包埋过程需要较高的温度, 可能导致样本降解增加。为了确保从 FFPE 样本中可用核酸和蛋白的理想回收, 应当使用低熔点的石蜡, 避免使用含添加剂如蜂蜡的石蜡, FFPE

样本保存在 4℃，可减缓核酸和蛋白的降解。

6) 组织包埋

准备好纸盒，将熔蜡倒入盒内，迅速用预温的镊子夹取组织块平放在纸盒底部，切面朝下，再轻轻提起纸盒，平放在冷水中，待表面石蜡凝固后立即将纸盒按入水中，使其迅速冷却凝固，30min 后取出。后续可低温保存或运输至生工生物实验室。

样本运输：

- 1) 冷冻的样本或者包埋好的样本，都要埋在干冰里面进行运输。不能冻融。干冰盒为 5cm 以上厚的泡沫箱，加盖，10kg 以上的干冰运输。注意样品运送前保存在-80℃ 冰箱；样本置于干冰中间位置，样品保存期间切忌反复冻融。如下图所示：



- 2) FFPE 样本：低温寄送样本（冰袋）

1.3.3 预约实验说明

1) 样品要求

寄送样品：确保样品冻存时无明显坏死，且在 9:00-15:00 点之间到达实验室，晚于 15:00 的保存至第二天实验。

2) 预约前提

有客户签字并返回公司的合同。预约实验前，需指定技术支持，由项目技术支持确认商务信息合规，否则不能预约实验。

3) 预约时间及方式

预约时间：

寄送样本：建议及早预约，一般本地提前 2 天、外地提前 3 天预约成功率较高。

预约方式：

寄送样本：预约前请填写《生工生物空间转录组测序送样表》，发邮件预约并抄送技术支持或项目助理。预估到样时间。

注：无特殊情况不得轻易更改实验时间，如确需不同项目间做时间调换，请提前沟通确认。

1.3.4 风险提示

以下任何一种情况出现，样品将判定为不合格，相关影响及风险说明如下：

- 1) 进行冷冻组织包埋：新鲜组织取样-异戊烷冻存-OCT 包埋备样时，必须要进行异戊烷冻存,不能用其它方法替代。目前必须用**异戊烷 (CAS78-78-4, 规格 500 mL, 此试剂易燃, 请小心使用)**。因为空间转录组样本制备时既要防止 RNA 降解，还要避免形成晶体，防止组织形态受损。冷冻新鲜组织时，组织不应直接置于液氮中，因为温度差可能会导致组织表面沸腾，从而导致气穴和不均匀的冷冻，这可能会破裂并在形态上破坏组织。而目前也没有更好的异戊烷替代试剂。
- 2) 进行冷冻组织包埋备样时：只能使用 **OCT** (美国樱花 OCT 冷冻切片包埋剂: SAKURA , 货号: 4583, 规格: 118 mL/瓶) **包埋**，其它类型的包埋不能做空间转录组。OCT 包埋保留组织结构并在冷冻切片过程中提供结构支撑；在切片过程中保持最佳温度，从而使切片光滑；由于其水溶性，可与多种染色程序兼容。
- 3) 客户在制备样本时，同一样本需要准备**至少** 3 个包埋块 (质检, 切片厚度调整、捕获区域确定,正式实验)：一份用于常规 RNA 提取，以确保样本自身及样本制备不存在问题，经过 Agilent2100 检测，RNA RIN>8 则认为样本本身及制备过程没有降解，如若未进行样本 RNA 质检，将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险，另外部分用于正常的切片厚度调整(10-50 μ m)和捕获区域确定；剩余的样本进行后续正式实验。
- 4) 空间转录组对于冷冻组织包埋样本类型要求较高,某些样本类型明确**不适合**进行该实验：**皮肤、胰脏、骨类, 软骨**等；将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险。
- 5) 目前 Visium 芯片捕获区域大小为 6.5x6.5mm²，每块组织样本不宜过大（长宽高约 0.8 cm）；过大会影响包埋效果，也会导致有部分组织切片时捕获不到。
- 6) 目前 Visium 芯片捕获区域大小为 6.5x6.5mm²，因此对组织包埋块的大小有一定要求（ $\leq 6.5\text{mm}^3$ ），较小的组织可建议多个组织包埋在一起，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，厚度满足 1mm 以上即可。
- 7) 同一 FFPE 样本**至少** 3 个包埋块，一份用于常规 RNA 提取，质检提取的 RNA，要求 DV200 $\geq 50\%$ 。DV200 指的是 RNA 样本中，长度大于 200 nt 的 RNA 分子数量占总分子数量的比例。DV200 值越高，表明 RNA 分子的完整度越高。空间转录组的探针长度是 25+25 nt，RNA 分子越完整，跟探针结合的几率就越高。如果 RNA 降解得过短，就会

影响探针的捕获效率。将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险。如若未进行样本 RNA 质检, 将造成数据结果不符合预期或项目失败的风险, 另外部分用于正常的切片厚度调整(10-50 μ m)和捕获区域确定以及正式实验; 剩余的样本可以进行后续正式实验。

- 8) FFPE 样本切片厚度一般不要超过 5 μ m (区别于冰冻组织样本的 10 μ m), 切片样本大小不宜超过 6.5mm \times 6.5mm (载玻片的大小), 超出的部分无法被捕获到, 可能会影响其他样本空间信息。

2. 样本准备注意事项

- 1) 样本离体应当立即放入液氮中速冻, 再放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 避免反复冻融。并且样本在 -80 $^{\circ}$ C 的保存时间不宜过长, 若保存时间超过半年应及时与当地销售或实验人员取得联系。
- 2) 样本应在 EP 管或锡箔纸上做好命名, 并在送样时用密封袋分样本装好, 并在密封袋内部放入用标签字写好的相同命名, 并且样本命名应与《高通量样本送样信息单》上保持一致。
- 3) 因样本提取或检测均会消耗部分样本, 所以送样样本量需至少高于上述提及样本量的三分之一。建议所有样本均做好备份。
- 4) 样本标签勿要粘贴在 EP 管或锡箔纸上, 低温下标签纸易脱落。
- 5) 细胞样本不建议采用 RNeasy 等保护剂保存, 因为保护剂比较粘稠, 无法离心收集存放在保护剂的细胞样本。
- 6) 采用保护剂或乙醇保存的样本需在信息单上注明, 乙醇保存 3 个月以上的样本谨慎使用, 若需寄送石蜡样本, 应与当地销售或实验人员取得联系。
- 7) RNeasy、RNeasy 等保护剂在 25 $^{\circ}$ C 下能稳定保存样本 3 天, 4 $^{\circ}$ C 保存样本 7 天、-20 $^{\circ}$ C 条件下可永久保存样本。建议用保护剂保存的样本厚度不超过 0.5cm。保护剂不适用于血液和液态样本, 组织样本与保护剂的用量至少为 1:10, RNeasy 不适用于植物样本保存。(不同公司保存时间有差异, 具体以说明书为准)。
- 8) Trizol 为裂解液, 不适用于组织样本的保存, 细胞除外。当细胞存放在 Trizol 中需注明每管的细胞数量。

3. 样本寄送注意事项

- 1) 样本需要使用干冰进行寄送, 干冰消耗量为 5kg/天, 订购量以快递实际运输天数为准 (避开大型节假日及线上购物节)。干冰采用厚实的泡沫箱进行打包, 外侧用透明胶封

好。

- 2) 样本寄送需填写《高通量样本送样信息单》。纸质版送样单随样本寄出，电子版送样单及寄送快递单号发送给公司，以便核对及备份数据。
- 3) 样本返还需邮件告知负责的技术支持；对于检测不合格的样本，如需返回，需在收到样本检测报告 7 天内发送邮件告知负责的技术支持，逾期样本将进行销毁；对于完成测序分析后，剩余样本需要返还的项目，需在收到项目完整版结题报告一个月内发送邮件告知负责的技术支持，逾期样本将进行销毁。如果样本特别珍贵，需提前说明。一般情况下，样本不予返还；样本返回需要送样方承担返还费用（包括干冰费和快递费）。
- 4) 为确保实验的顺利，送样方需提供样本备份 1-2 份，以防备部分样本降解重新取材、制备或送样，耽误时间。

5) 样本接收地址

收样地址：上海市松江区香闵路 698 号高通量测序部

收样人：高通量样本接收员

电话：021-57072107/57072133