

团 体 标 准

T/LTIA 18—2022

时空组学 时空转录组样本制备操作规范

Spatiotemporal omics — Standardized biological material preparation
for spatiotemporal transcriptomics

2022 - 09 - 20 发布

2022 - 09 - 30 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 组织样本冷冻包埋	2
5.1 样本要求	2
5.2 样本前处理	2
5.3 包埋处理	2
5.4 切片	3
5.5 储存	3
6 组织样本石蜡包埋	3
6.1 样本要求	3
6.2 样本前处理	3
6.3 包埋处理	4
6.4 切片	4
6.5 储存	4
附录 A (规范性) 植物和动物组织样本的处理方法	5
A.1 植物组织样本的处理方法	5
A.2 动物组织样本的处理方法	5
附录 B (资料性) 动物和植物组织切片厚度	7
B.1 动物和植物组织切片厚度	7
附录 C (资料性) FAA 固定液和蔗糖-PBS 溶液 (3%) 配制方法	8
C.1 FAA 固定液	8
C.2 蔗糖-PBS 溶液 (3%)	8
参考文献	9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由深圳市生命科技产学研资联盟提出并归口。

本文件起草单位：深圳华大生命科学研究院、中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心、中国科学院广州生物医药与健康研究院、华中农业大学、青岛华大基因研究院、青岛华大智造科技有限责任公司、深圳市生命科技产学研资联盟。

本文件主要起草人：姜芳芳、吴静静、沈志明、刘夏薇、刘龙奇、Miguel Esteban、赖毅维、董志强、陈奥、李启沅、钱璞毅、王博、陈力群、陈嘉瑜、武庆超、杨晓萍、王萌萌、李陶莎、胡杨子、刘宇瀚。

时空组学 时空转录组样本制备操作规范

1 范围

本文件提供了时空转录组的组织样本冷冻包埋和石蜡包埋的制备建议。
本文件适用于开展时空组学研究的相关机构。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 37864-2019/ISO 20387:2018 生物样本库质量和能力通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

时空转录组 spatiotemporal transcriptomics

指在组织原位测序全转录组基因表达的一种技术，可展示组织切片中不同区域的基因表达情况，同时能够得到目的基因在组织内部的空间位置信息。

3.2

组织样本 tissue sample

从生物体中切取的组织。

3.3

石蜡包埋 paraffin embedding

将组织样本置于石蜡中，产生坚硬的周围基质，以便切割出薄层显微切片的过程。

3.4

OCT 包埋 optimal cutting temperature compound embedding

指利用一种聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物包埋剂将需要包埋的组织包裹起来以提供性能支撑或化学保护的过程。

3.5

处理 processing

在生命周期的所有阶段对生物样本和相关数据执行的全部活动。

[来源：GB/T 37864-2019/ISO 20387:2018, 3.36]

3.6

储存 storage

将生物样本保持在特定条件下以备将来使用。

[来源：GB/T 37864-2019/ISO 20387:2018, 3.47]

3.7

切片 slice

指用特制刀具将生物体的组织切成适用于时空转录组实验的薄片。

3.8

透明 clearing

指利用透明剂的性质将脱水剂从组织中置换出来，使石蜡能够顺利进入材料中的过程。

3.9

浸蜡 waxing

指组织透明后，在熔化的石蜡内浸渍的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

OCT: 冷冻切片包埋剂 (optimal cutting temperature compound)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

FAA: 酒精醋酸福尔马林混合固定液 (formalin-acetic acid-alcohol)

ACSF: 人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid)

PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline)

HE: 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining)

5 组织样本冷冻包埋

5.1 样本要求

样本应为新鲜组织或冷冻组织块。

5.2 样本前处理

对于不同的组织，宜采用不同方式获取组织样本，在样本处理过程中不应有组织的挤压和形变。应根据预期要求选择对组织样本进行固定或不固定直接包埋处理。

5.2.1 样本直接包埋前处理

5.2.1.1 植物组织样本直接包埋前处理宜参考附录 A.1.1。

5.2.1.2 动物组织样本直接包埋前处理宜参考附录 A.2.1。

5.2.2 样本固定组织处理

5.2.2.1 植物组织样本固定处理宜参考附录 A.1.2。

5.2.2.2 动物组织样本固定组织处理（灌流取样）宜参考附录 A.2.2。

5.2.3 样本运输

5.2.3.1 如需运输样本，应采取干燥运输方式。如实验室条件允许，建议在新鲜样本离体 30 分钟内进行速冻、直接包埋或固定处理，最大程度上避免组织内部 RNA 降解。

注：干燥运输方式指将新鲜组织放置在可以密闭的干燥无菌容器内，置于干冰上保持低温运输。

5.2.3.2 经过固定处理后的组织应保存在固定液中常温运输。

5.3 包埋处理

样本包埋前组织表面不应有液体残留。

5.3.1 直接冷冻包埋

直接冷冻包埋宜采用液氮异戊烷包埋或干冰包埋。

应根据组织大小选择合适的包埋盒，组织与包埋盒底面和四面应有空间间隔，避免速冻时反膨胀导致组织变形。

5.3.1.1 液氮异戊烷包埋

液氮异戊烷包埋宜采用如下步骤：

a) 提前准备不同尺寸的不锈钢烧杯，其中大烧杯加入 1/3 液氮，小烧杯加入 1/3 的异戊烷；

- b) 将盛有异戊烷的小烧杯放入盛有液氮的大烧杯中，孵育至少 10 分钟；
- c) 提前在包埋盒底部加入一层厚度约 3 mm 的 OCT，并将 OCT 置于冰上预冷；
- d) 确定组织包埋的方向，将组织放入包埋盒中预铺的 OCT 上，调整方向后加入预冷的 OCT 至完全覆盖。此过程中需避免产生气泡；
- e) 将包埋盒放入已用液氮预冷过的异戊烷中，等待 OCT 完全变硬；
- f) 组织包埋完成后，在包埋盒的四面标记组织方向和预切片方向；
- g) 将包埋后的组织块放入-80 °C 的密封容器中长期保存，或即刻进行冷冻切片和切片放置。

5.3.1.2 干冰包埋

干冰包埋宜采用如下步骤：

- a) 提前将包埋盒和 OCT 置于干冰上预冷；
- b) 在包埋盒底部加入一层厚度约 3 mm 的 OCT，保持 OCT 表面平整；
- c) 待 OCT 冰冻至不透明状后，按照预定的方向将组织放置在预铺的 OCT 上，加入预冷的 OCT 至完全覆盖；
- d) 组织包埋完成后，在包埋盒的四面标记组织方向和预切片方向；
- e) 将包埋后的组织块放入-80 °C 的密封容器中长期保存，或即刻进行冷冻切片和切片放置。

5.4 切片

切片应采用如下步骤：

- a) 将包埋后的组织块置于已用 OCT 填充的样品盘上，切面朝外放置在冷冻切片机上；
- b) 切片前，将包埋后的组织块放入冷冻切片机的腔体中温度平衡（-25 °C ~ -20 °C，15 分钟 ~ 20 分钟），具体的温度平衡时间根据样本类型设定；

注：组织块过冷会导致切片破裂，组织块过热会导致切片压缩或皱缩。

- c) 冷冻切片机腔体和冻头的温度参考切片机说明书设定至符合预期要求；
- d) 使用冷冻切片机去除多余的 OCT，持续切片至组织清晰可见。可对冷冻组织切片进行质检，以确定组织中 RNA 的完整性。组织切片厚度见附录 B；
- e) 芯片正面朝上置于切片机中，预冷时间与后续切片、贴片步骤相关（预冷时间不宜小于 30 秒，最长不宜超过 6 分钟）。预冷时间避免过长或过短，以免芯片表面产生水雾或无法达到预冷温度；
- f) 获得所需的组织切片后，将组织切片小心覆盖在芯片正中央，用指腹加温芯片反面使组织切片贴合，快速置于 37 °C 下烤片 3 分钟；
- g) 切片过程和组织切片放置过程应全程在冷冻切片机内进行。

5.5 储存

应使用 OCT（4 °C 温度下提前预冷）覆盖剩余包埋组织块的暴露组织面，使其冻结并放入密封盒，保存于-80 °C 的冰箱中。

6 组织样本石蜡包埋

6.1 样本要求

样本应为新鲜组织。

6.2 样本前处理

6.2.1 样本固定

组织在取材后应迅速置于 FAA 固定液中进行固定，FAA 固定液配制方法见附录 C.1。

6.2.2 脱水

脱水程序宜采用逐级脱水，从较低浓度酒精，逐渐替换到高浓度酒精缓慢进行，避免组织出现变硬、变脆或发生收缩的现象。

示例：等级脱水为 50%浓度酒精→70%浓度酒精→80%浓度酒精→95%浓度酒精→无水酒精（两次），每级停留时间视组织的大小和类型做适当调整，约 2~4 小时或更长。

6.2.3 透明

透明程序宜采用逐级的方式进行，减少材料收缩。

示例 1：逐级透明为 2/3 纯酒精+1/3 二甲苯→1/2 纯酒精+1/2 二甲苯→1/3 纯酒精+2/3 二甲苯→二甲苯（两次）。透明时间视组织的大小和类型做适当调整。一般各级停留时间在 30 分钟~2 小时，总时间控制在 3 小时内。

示例 2：如样本材料放入二甲苯中有白色浑浊现象发生时，把样本材料退回至纯酒精中再次进行脱水。

6.2.4 浸蜡

6.2.4.1 在样本材料最后一次进行二甲苯透明后即可浸蜡，浸蜡宜从低温到高温、从低熔点到高熔点逐级进行。

6.2.4.2 整个浸蜡过程应在水浴或融蜡恒温箱中进行，避免使用明火加热石蜡。

示例：浸蜡逐级过程为石蜡（软蜡：熔点 45℃~50℃）→石蜡（硬蜡：熔点 56℃~58℃）→石蜡（硬蜡：熔点 56℃~58℃），直至石蜡饱和为止。

6.3 包埋处理

石蜡包埋宜采用如下步骤：

- 将融化的石蜡（硬蜡）倒入包埋模具中；
- 将浸蜡后的组织块按切面或指定面朝下，并埋入含有熔蜡的包埋模具中；
- 将组织块平整的置放于包埋模具的底面中央，避免气泡的产生；
- 当蜡块冷却至蜡面出现一层透明蜡膜时，浸入冷水中迅速使其冷却；
- 从包埋模具中取出包埋组织块，将样品编号封于蜡块上，避免混淆；
- 用刀片修正成为规则的正方形或长方形，并可粗视到包埋组织块切面。

6.4 切片

切片宜采用如下步骤：

- 切片机的使用参照厂商提供的使用方法，组织切片厚度见附录 B；
- 切片机刀口运行方向与包埋组织块切面平行，并根据样本类型和预期要求调整所需切片厚度后进行切片。切片完整、均匀、无刀痕颤痕、无褶皱开裂和缺损，宜进行镜检；
- 选取合适的石蜡组织切片放入 37℃~50℃ 的温水中使其展开后附于载玻片上。附着的过程避免切片与载玻片之间产生气泡；
- 将载玻片斜置流出多余水分，并进行烘烤；
- 在载玻片一端贴上样本条形码标签，在 HE 染色后进行组织成像。

6.5 储存

石蜡组织块应在每次切片后及时将切面用蜡封盖，避免组织长时间与空气直接接触。宜采用蜡封固切片和-20℃低温保存组织切片，或石蜡组织块 4℃低温保存。

附 录 A (规范性)

植物和动物组织样本的处理方法

A.1 植物组织样本的处理方法

A.1.1 植物组织样本直接包埋前处理

植物组织样本包埋前处理步骤如下：

- a) 使用酒精对工具进行消毒并擦干；
- b) 取植物样本，用剪刀剪下测试部位，并将样本剪切至便于包埋的尺寸；

示例：以叶片为例，将一片叶子沿垂直于主叶脉方向剪成宽度约 0.5 cm 的小条，尽量控制叶片宽度短于包埋盒长度，若叶片过大可按要求修剪。

- c) 用镊子夹起剪切好的植物样本，快速放入在冰上预冷的 OCT 包埋盒中，并调整样本方向；

示例 1：以叶片为例，将叶片条竖起，横切面正对包埋盒的底面，将叶片条沿着包埋盒的一边竖直排列在 OCT 中，用镊子将叶片条轻轻往下压，使叶片横切面尽量贴到包埋盒底部，保持叶片条垂直于包埋盒底部，不倾斜。

示例 2：以花序为例，用镊子将花序轻轻下压，使花序以侧面方向贴到包埋盒底部，并用镊子轻压每朵小花，使其尽量贴到包埋盒底部。

- d) 将装有植物样本的包埋盒水平放置到冰盒中，再将冰盒水平放置于真空抽滤的干燥器中，并做固定处理，真空抽滤 5 分钟（-0.1 MPa）；
- e) 抽滤后，样本位置会发生一定变化，再次用镊子轻压样本，使样本贴在包埋盒底部，以方便后续切片；
- f) 参照 5.2 进行包埋处理。

A.1.2 植物组织样本固定处理

植物组织样本固定处理步骤如下：

- a) 操作人员提前准备好大小合适的容器，配制 2 次使用量的卡诺氏固定液（乙醇：冰醋酸=3:1），置于冰上或在 -20 °C 的温度下预冷。固定液体积不超过容器容积的四分之三；
- b) 配制 2 次使用量的蔗糖-PBS 缓冲液（3%），配制方法见附录 C.2；
- c) 使用酒精对工具进行消毒并擦干，剪取植物样本，迅速放入预冷后的卡诺氏固定液中，置于冰上或 -20 °C 温度下固定 1 小时；
- d) 去净固定液，加入新鲜的预冷过的卡诺氏固定液中，置于冰上或 -20 °C 温度下固定 1 小时；
- e) 滤去固定液，加入预冷的蔗糖-PBS 溶液（3%），冰上放置 1 小时；
- f) 滤去溶液后，重新加入新的预冷蔗糖-PBS 溶液（3%），在 4 °C 的温度下放置过夜；
- g) 准备包埋盒并进行信息标记，加入 OCT 后置于冰上预冷；
- h) 滤去液体后，用镊子轻夹出样本，吸干表面液体后将样本剪切成合适包埋的尺寸，放入包埋盒中。固定后的植物样本非常绵软，在夹出及修剪尺寸时要注意力度；
- i) 调整样本方向，将样本横切面垂直于包埋盒一侧的侧壁，使横切面贴在侧壁上方便后续切片；
- j) 将装有样本的包埋盒水平放置于小冰盒中，并将其水平放置于真空抽滤的干燥器，真空抽滤 5 分钟（-0.1 MPa）。需注意包埋盒在真空抽滤时要进行固定；
- k) 将包埋盒水平放置于有盖容器中，盖上盖子在 4 °C 的温度下放置过夜后即可进行包埋，包埋操作程序见 5.2。

A.2 动物组织样本的处理方法

A.2.1 动物组织样本直接包埋前处理

动物组织样本包埋前处理步骤如下：

- a) 针对不同组织可采用不同方式获取新鲜组织样本，在新鲜组织离体 30 分钟内进行处理；
- b) 将新鲜组织放入清洗液中清洗 2~3 次，避免长时间浸泡，去除表面杂质。
- c) 使用无菌无纺布/无菌无尘纸将组织表面的血迹或黏液等液体擦拭干净；

- d) 如浸泡或清洗组织，需吸干组织表面液体，避免在组织表面形成冰块影响后续包埋切片。
- e) 使用酒精对工具进行消毒并擦干；
- f) 根据组织大小提前做好合适的包埋盒，将样本剪切至便于包埋的尺寸；
- g) 参照 5.2 进行包埋。

A. 2.2 动物组织样本固定处理（灌流取样法）

动物组织样本灌流取样法处理步骤如下：

- a) 根据动物类型选择合适的麻醉剂，对实验动物进行深度麻醉，确保对实验动物的四肢或肌肉进行动作时，无任何疼痛或应激反应；
- b) 将动物头部固定在立体定位仪上，沿胸骨柄剪开胸腔，剪开心包膜，暴露心脏。与心尖成 $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 夹角剪开左心室，随即剪开右心耳，将灌注针头从左心室插入主动脉，固定针头；
- c) 灌注常温通氧的人工脑脊液（ACSF，0.6 L/kg），并记录开始灌注时间；
- d) 常温 ACSF 灌注结束后，开始灌注提前预冷通氧的 ACSF，记录开始灌注时间；
- e) 预冷 ACSF 灌注 10 分钟后，观察灌注效果，准备取样本组织；
- f) 样本组织获取后立即进行包埋，处理过程需尽快完成，确保组织的新鲜度。

示例：以脑组织为例，在记录灌注时间时，同时剪去动物头部皮肤准备开颅。ACSF 灌注 10 分钟后，揭开硬脑膜观察灌注效果，准备取脑组织。取脑组织时，借助立体定位仪和显微操作器将脑组织沿正中矢状面分为左右半脑。先取下半脑进行矢状面包埋。随后，在左半脑 AP 方向中点的位置，沿冠状面将左半脑一分为二，并立即进行左半脑的冠状面包埋。

附 录 B
(资料性)
动物和植物组织切片厚度

B.1 动物和植物组织切片厚度

动物和植物组织切片厚度见表B.1。

表 B.1 动物和植物组织样本切片厚度

样本类型	组织	切片厚度
动物	脑	10 μm
	心脏	10 μm
	肾脏	10 μm
	肺	10 μm
	胃	10 μm
	大肠	10 μm
	小肠	10 μm
	脾脏	10 μm
	卵巢	10 μm
	睾丸	10 μm
	眼睛	10 μm
	甲状腺	10 μm
	股四头肌	10 μm
乳房	10 μm~20 μm	
植物	叶芽	10 μm
	叶、根、茎	10 μm~20 μm
	种子	20 μm

附录 C

(资料性)

FAA 固定液和蔗糖-PBS 溶液 (3%) 配制方法

C.1 FAA 固定液

福尔马林 (38%甲醛)	5 mL
冰醋酸	5 mL
70%乙醇	90 mL
甘油 (丙三醇)	5 mL

称取上述试剂, 进行混合摇匀。

C.2 蔗糖-PBS 溶液 (3%)

C.2.1 首先配制 $0.5 \times$ PBS缓冲液, 不同体积的缓冲液配制见表C.1。

表 C.1 $0.5 \times$ PBS 缓冲液配制表

组分名称	缓冲液体积所对应的组分取样量		
	5 mL	10 mL	100 mL
$10 \times$ PBS缓冲液	250 μ L	500 μ L	5 mL
无核酸酶水	补充至5 mL	补充至10 mL	补充至100 mL

C.2.2 根据不同体积称取相对应的蔗糖重量, 加入新的容器中, 蔗糖重量称取见表C.2。

表 C.2 蔗糖称取表

组分名称	缓冲液体积所对应的组分取样量		
	5 mL	10 mL	100 mL
蔗糖	0.15 g	0.3 g	3 g

C.2.3 称取蔗糖后, 加入配制好的 $0.5 \times$ PBS缓冲液定容至对应体积, 置于冰上预冷。 $0.5 \times$ PBS缓冲液加入蔗糖后体积会发生轻微变化, 建议最后以定容体积为准。

参 考 文 献

- [1] 潘建洪. 冷冻切片法改良及Sox2在鸡脑、肺和睾丸中的组织细胞定位与时空表达[D]. 广西大学, 2020. DOI:10.27034/d.cnki.ggxju.2020.000315.
- [2] 潘建洪, 陈秋玉, 邢青波, 李恭贺, 吴文德, 刘灵康, 郑喜邦. 动物组织冷冻切片法的改良及应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(12):5520-5525. DOI:10.13417/j.gab.039.005520.
- [3] Spatial Gene Expression-10x Genomics. (2022). From <https://www.10xgenomics.com/products/spatial-gene-expression>
- [4] Chen A, Liao S, Cheng M, et al. Large field of view-spatially resolved transcriptomics at nanoscale resolution[J]. bioRxiv, 2021.
- [5] Xia K, Sun H X, Li J, et al. Single-cell Stereo-seq enables cell type-specific spatial transcriptome characterization in Arabidopsis leaves[J]. bioRxiv, 2021.
- [6] Quesada-Calvo F, Bertrand V, Longuespée R, et al. Comparison of two FFPE preparation methods using label-free shotgun proteomics: Application to tissues of diverticulitis patients[J]. Journal of proteomics, 2015, 112: 250-261.
- [7] Vickovic S, Lötstedt B, Klughammer J, et al. SM-Omics is an automated platform for high-throughput spatial multi-omics[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1-13.
- [8] Lou R, Prasad C, Jean-Christophe T, Stephan R, Nicolas L, Ketty H, et al. Spatial transcriptomics of tumor microenvironment in formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer[J]. bioRxiv, 2020.
- [9] Liu X, Jiang Y, Song D, et al. Clinical challenges of tissue preparation for spatial transcriptome[J]. Clinical and Translational Medicine, 2022, 12(1): e669
-