

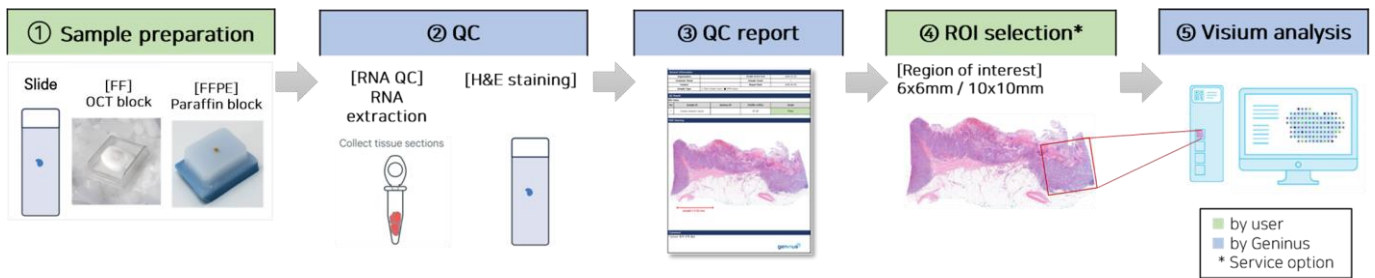
1. Sample preparation protocol for Visium spatial transcriptome analysis (p.2 ~ 5)

2. Sample preparation protocol for Xenium spatial transcriptome analysis (p.6)

For spatial transcriptome analysis			
Visium 6.5 x 6.5 mm	FF OCT block	Embedded in mold & freeze with dry ice	-80 °C (dry ice O)
	FFPE Paraffin block	Embedded in paraffin & store at 4 °C	4 °C (ice pack O)
Visium CytAssist 6.5 x 6.5 mm 10.5 x 10.5 mm	FF Slide (Section: 10 μm)	Slide size: 75 mm x 25 mm x 1 mm A total of 5 slides are required	-80 °C : store the slides in 50 ml conical tube (dry ice O)
	FFPE Slide (Section: 5 μm)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 3 slides for QC (H&E staining + RNA QC + Extra) ▶ 2 slides for main (2 Positively Charged slides: Main + Extra) 	4 °C : store the slides in 50 ml conical tube (ice pack O)
Xenium 10 x 10 mm 10 x 22 mm	FF OCT block	Tissue embedding (OCT) & freeze with dry ice	-80 °C (dry ice O)
	FFPE Paraffin block	Tissue embedding (Paraffin) & store at 4 °C	4 °C (ice pack O)

1. Sample preparation protocol for Visium CytAssist spatial transcriptome analysis

1. Service process overview



2. Sample condition

2.1 Sample type 1: Slide (권장)

- 수량 : 총 2장 (1장 : 본실험, 1장 : 여분)
- 사이즈 : 75 mm x 25 mm x 1 mm (Length x Width x Thickness)
 - 최소 : 24.8 x 74.4 mm (가로x세로)
 - 최대 : 25.3 x 76.2 mm (가로x세로)
- Slide 종류 : positively charged slide (Ex. table 1)
 - Unstained slide, H&E stain slide are available
- Slide 제작 방법은 3 page 참고

Table 1. Positively charged slides validated for Visium CytAssist

Item	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)
EpreDia Shandon ColorFrost Plus	75.0	25.0	1.0
Fisher SuperFrost/ColorFrost	75.0	25.0	1.0
Sigma-Aldrich Poly Prep Slides	75.0	25.0	1.0
VWR SuperFrost Plus	75.0	25.0	1.0

2.2 Sample type 2: Block

- Block으로 입고 시, 지니너스에서 section 및 slide 제작
 - FF(Fresh Frozen) OCT embedding 방법은 page 4 참고
- ※ 의뢰자께서 보고자하시는 영역을 명확히 section 하기 위해서는 slide를 제작하시어 보내시길 권장 드립니다.

2.3 QC criteria

Sample Type	DV200*	RIN* value
Fresh Frozen	-	≥4
Fixed Frozen	≥ 50%	-
FFPE	≥ 30%	-

*DV200 : Percentage of RNA fragments > 200 nucleotides

*RIN : RNA Integrity Number

1. Sample preparation protocol for Visium CytAssist spatial transcriptome analysis

3. Sample preparation

3.1 Slide 제작

(1) Sectioning 진행 후, 규격에 맞는 slide에 조직을 올림

a. Section 두께

- ① FFPE : 5 μ m
- ② Fresh Frozen, Fixed Fresh frozen : 10 μ m

(2) 42°C에 3시간 **incubation (FFPE slide Only)** *FF slide, Fixed FF slide는 (2) 과정 생략, 바로 (4) 과정 진행

Incubation 방법은 아래의 방법 중 한 가지로 진행

a. Incubation using a Section Dryer Oven

- ① Place the slides in a slide drying rack.
- ② Close the lid when incubating the slide in the oven.

b. Incubation using a Thermocycler

- ① Position a Low Profile Thermocycler Adapter on a thermal cycler that is set at the incubation temperature.
- ② Ensure that the Low Profile Thermocycler Adapter is in contact with the thermal cycler surface uniformly.
- ③ When incubating a slide, position the slide on the Low Profile Thermocycler Adapter with the side with tissue facing up.
- ④ Ensure that the entire bottom surface of the slide is in contact with Low Profile Thermocycler Adapter.
- ⑤ DO NOT close the thermal cycler lid when incubating the slide.
- ⑥ Allow Low Profile Thermocycler Adapter to cool down before removing from thermal cycler.



[a] Place in a Rack



[b] Incubation on a Thermal Cycler

(3) FFPE slide는 desiccator 또는 50ml tube에 상온 보관 (최대 2주까지 가능)

FF slide는 50ml tube에 넣고 -80도에 보관 (최대 2주까지 가능)

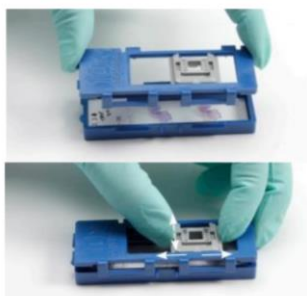
(4) 발송 시, 코니칼 튜브 50ml에 slide를 넣고 튜브 입구를 파라필름을 동봉하여

FFPE slide는 상온(또는 ice pack)으로, FF slide는 dry ice 포장하여 발송

※ 주의사항

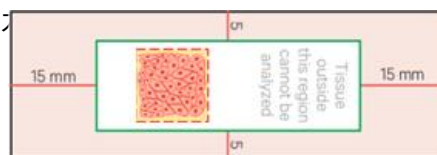
상하좌우로 조정 가능한 Slide cassette가 장착되기 때문에,

ROI가 아래



[Cassette 장착 모습]

들어



[Slide glass (실물 size)]

3. Sample preparation

3.2 Fresh frozen tissue OCT block

- 채취 즉시 Embedding이 가능한 경우
- 채취한 샘플을 이동해야 하는 경우 (30분 이내)
 - a. PBS로 적신 거즈로 fresh tissue를 감싸고 ice와 함께 이동
 - b. PBS나 media를 담은 tube에 샘플을 넣고 ice와 함께 이동

- (1) OCT compound와 소독한 Forcep을 ice에 30분 이상 둔다.
- (2) Tissue를 Petri dish에 놓은 후, Laboratory wipe를 이용하여 Tissue 표면의 blood나 solution를 모두 제거한다. (검사 시 ice crystal 발생 방지를 위함)
- (3) Tissue를 mold의 사이즈에 맞게 잘라준다.
- (4) Petri dish에 있는 fresh tissue를 OCT로 조심스럽게 코팅한다.
※ OCT를 사용할 때에는 기포가 생기지 않도록 주의하고, 특히 tissue 주변에 기포가 없는지 꼭 확인한다.
(🔴 기포 발생 시 Tip을 이용하여 반드시 제거)
- (5) Mold에 유성 펜으로 샘플 명, 상하방향(↓)을 표기하고 ice에 놓는다.
- (6) ice에 놓은 mold에 OCT를 반 정도 조심스럽게 붓는다.
- (7) Forcep을 이용하여 tissue를 5번의 mold에 넣고 자리를 잡아준다.
(보고자 하는 면을 바닥에 놓거나 바닥과 수평으로 심는 것이 좋음 - section 방향 : 수평면)
- (8) Mold의 홈에 OCT를 가득 채워 덮는다.
- (9) Mold를 dry ice에 옮기고 바닥부터 서서히 굳힌다. (하얗게 불투명해짐)
- (10) 얼린 mold(샘플)는 -80°C에 보관 후, 이동할 때에는 dry ice에 담아서 이동한다.



- Block으로 보낼 경우, 원하는 조직 Section 방향 (검사의뢰서 작성 시 참고)



- Reference

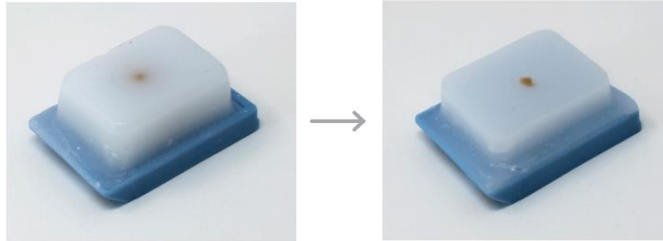
Video : <https://www.youtube.com/watch?v=Wiq96lFyu6s>

3. Sample preparation

3.3 Formalin-fixed paraffin-embedded block

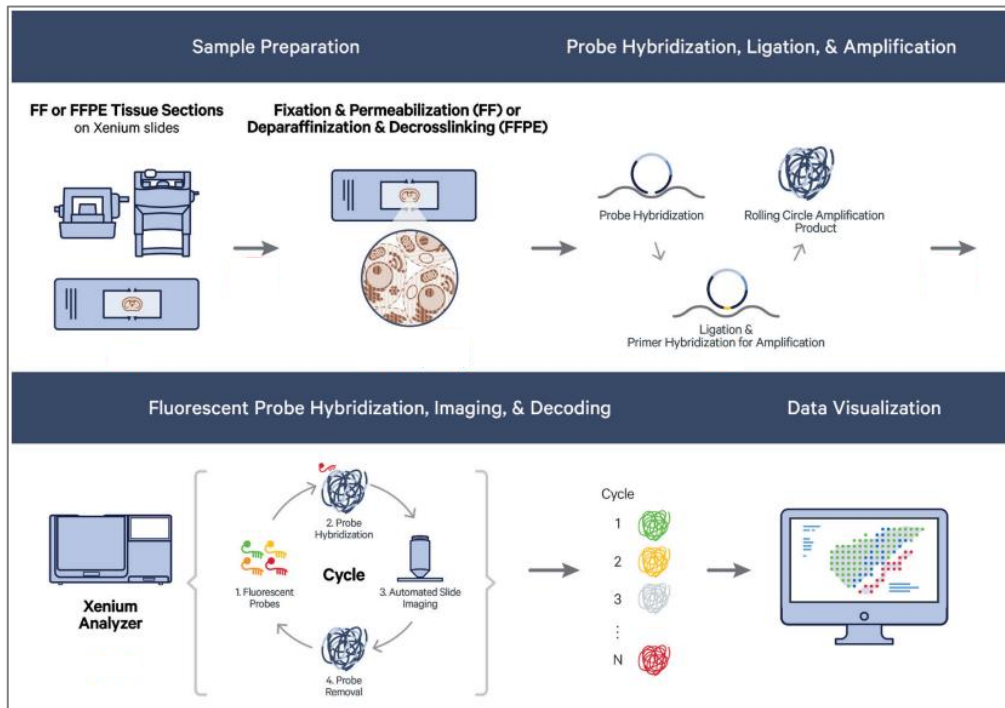
- (1) Collect sample and fix in 10 % formalin or 4 % PFA
- (2) Process the tissue as following (Ethanol → Xylene → Wax)
- (3) Proceed paraffin embedding
- (4) Store at 4 °C or send with ice pack

Exposing the Tissue Block



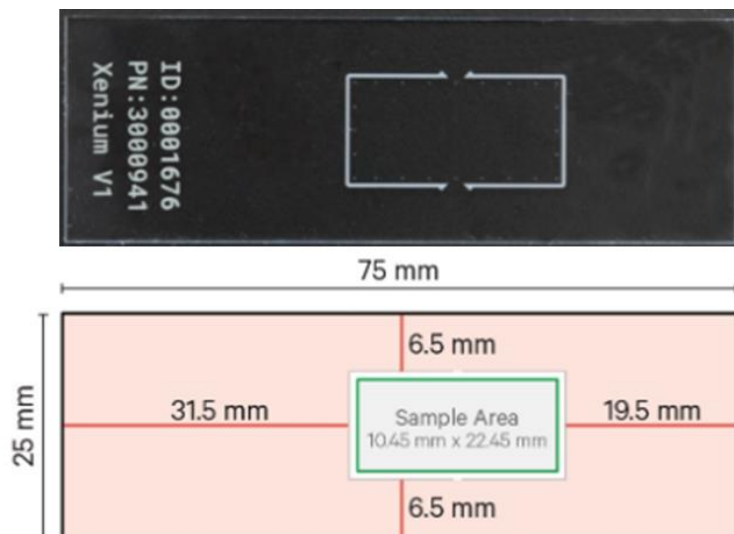
2. Sample preparation protocol for Xenium spatial transcriptome analysis

1. Service process overview



2. Slide information

- Slide area 10.45 x 22.45 mm
- ROI must be within the green colored area



3. Sample preparation

- FF OCT block & FFPE paraffin block are prepared as above (see Visium CytAssist sample preparation p.4~5)