

时空转录组 FFPE V1.1 大尺寸芯片 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 转录组实验操作 说明书



试剂套装货号及名称：

101SN11122 (2 RXN) Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (1 cm* 2 cm)

101SN11221 (1 RXN) Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (2 cm* 2 cm)

101SN11231 (1 RXN) Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (2 cm* 3 cm)

试剂盒版本号：V1.1

文档编号：STOG02014

说明书版本号：A

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.1
修订日期：2026 年 8 月
描述：首次发布

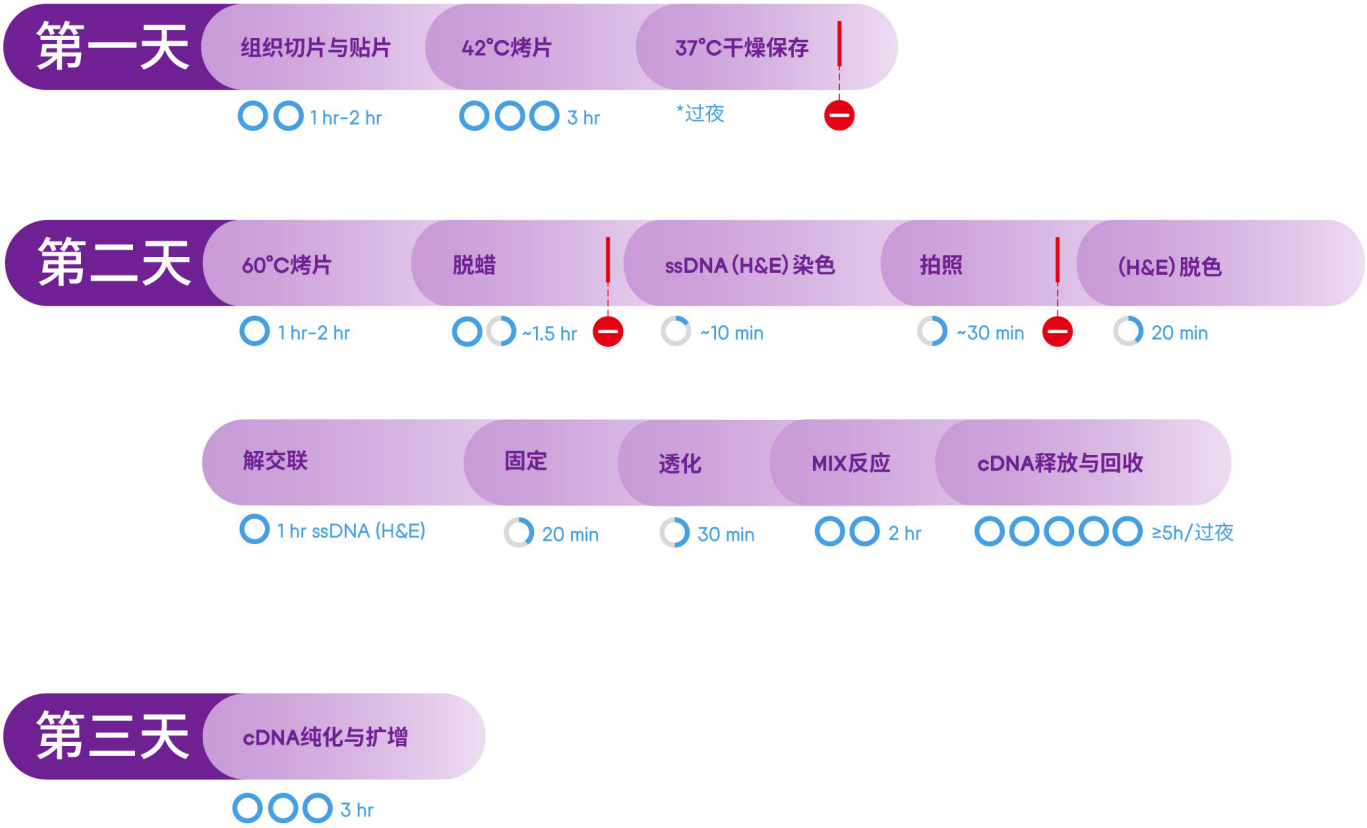
提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

©法律声明。
2026 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

- 1. 本产品仅用于研究，不用于诊断。
- 2. 本手册上的内容可能全部或部分受到适用的知识产权法的保护。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司和 /或相应权利主体依法拥有其知识产权，包括但不限于商标权、版权等。
- 3. 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不授予或暗示使用我们或任何第三方的任何版权内容或商标（注册或未注册）的权利或许可。未经本单位书面同意，任何人不得擅自使用、修改、复制、公开传播、更改、分发或发布本手册的程序或内容，不得使用或利用设计技巧使用或占有本单位或本单位关联方的商标、标识或其他专有信息（包括图像、文本、网页设计或形式）。
- 4. 此处的任何内容都无意于或应被理解为对此处列出或描述的任何产品的性能的任何保证、表达或暗示。适用于本文所列任何产品的任何和所有保证均载于购买该产品所附的适用销售条款和条件。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不做任何保证，并在此声明对本文所述任何第三方产品或协议的使用不做任何保证。



工作流程



🕒 总耗时: ~ 3 天



目录

第一章 产品介绍

1.1. 产品描述	1
1.2. 测序指南	1
1.3. 产品组成	1
1.4. 需自备物料清单	3
1.5. Stereo-seq 大芯片 N 介绍	4
1.6. 注意事项	4

第二章 样本准备 5

第三章 时空转录组 FFPE V1.1 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 转录组实验标准操作流程)

3.1. 实验前准备	8
3.2. 切片准备与组织切片、捞片	11
3.2.1. 芯片预处理	11
3.2.2. 组织切片与捞片	14
3.3. 脱蜡	18
3.4. ssDNA 染色与成像	20
3.4.1. ssDNA 染色	20
3.4.2. 荧光拍照	22
3.5. 解交联	24
3.6. 固定	26
3.7. 透化	27
3.8. FFPE MIX 反应	28
3.9. cDNA 释放与回收	29
3.10. cDNA 纯化与扩增	31
3.10.1. cDNA 扩增	34
3.10.2. cDNA 纯化	35



提示：额外的操作提示和指导。



关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。



质量检查点



注意：特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。



停止点：您可以在此暂停实验并存储样品。



第一章

产品介绍



1.1. 产品描述

本操作说明书适配于 **Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (1 cm*2 cm/2 cm*2 cm/2 cm*3 cm) V1.1**。

Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (1 cm*2 cm/2 cm*2 cm/2 cm*3 cm) V1.1 是用于获取福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本组织切片全转录本的试剂套装。本试剂套装采用的 Stereo-seq 时空转录组技术，是一种基于 DNBSEQ 高通量测序技术开发的、具有高分辨大视场的原位全转录组信息捕获技术。利用带有空间坐标信息的探针对 FFPE 样本中组织细胞内的 Total RNA 分子进行原位捕获并进行 cDNA 合成与连接，通过空间条形码 (Coordinate ID, CID) 还原回空间位置，实现单细胞分辨率全转录组空间表达图谱的构建。)

本试剂套装中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库制备的稳定性和重复性。

1.2. 测序指南

使用本产品构建的文库可使用 DNBSEQ 测序平台进行测序。文库构建详情请参考[《时空转录组 FFPE V1.1 建库实验操作说明书》](#)。

时空转录组 FFPE 适配的 SAW 分析流程的入参为：

- `kit-version='Stereo-seq N FFPE V1.1'`
- `Sequencing-type='PE75_50+100'`

1.3. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成：

- Stereo-seq 转录组试剂盒 N * 1 (2 RXN/1 RXN/1 RXN)
- Stereo-seq 芯片 N (1 cm * 2 cm) * 1 (2 EA)
或者 Stereo-seq 芯片 N (2 cm * 2 cm) * 1 (1 EA)
或者 Stereo-seq 芯片 N (2 cm * 3 cm) * 1 (1 EA)
- Stereo-seq Chip Reaction Plate (1 cm * 2 cm)* 1 (2 EA)
或者 Stereo-seq Chip Reaction Plate (2 cm * 2 cm)* 1 (1 EA)
或者 Stereo-seq Chip Reaction Plate (2 cm * 3 cm)* 1 (1 EA)



转录组试剂套装(示意图)



芯片反应容器 (以 2 cm*3 cm 为例)

*Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 V1.1 未包含在试剂套装中。关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 与表格 1-3。



收到 Stereo-seq 芯片后, 请参照《Stereo-seq 大芯片保存操作指南》对产品进行正确地保存。

<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

收到产品后

- 请尽快将产品按照指定条件保存。若转移时间较长, 建议使用控温容器运输。
- 若发现冷链箱温度异常, 可要求物流方现场打印温度实时监控记录表; 签收后也可联系当地销售, 以查询相关记录。
- 当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性。

表格 1-1 Stereo-seq 转录组试剂盒 N 试剂组分信息

Stereo-seq 转录组试剂盒 N 货号: 101KN1122 (2 RXN) /101KN11221 (1 RXN) /101KN11231 (1 RXN)			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Coating Buffer I	1000064221	● 绿色	220 μL × 1
Coating Buffer II	1000064222	● 绿色	10 μL × 1
Mounting Medium	1000064223	● 紫色	50 μL × 1
Decrosslinking Reagent	1000064224	● 绿色	1700 μL × 1
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg × 1
RI	1000069883	● 橙色	70 μL × 1
RT Buffer Mix	1000047911	○ 透明	731 μL × 1
RT Oligo	1000047913	○ 透明	44 μL × 1
RT Enzyme Mix	1000047914	○ 透明	88 μL × 1
RT Plus	1000047912	● 黄色	18 μL × 1
Elute Buffer	1000064226	● 黑色	1725 μL × 2
Elute Additive	1000064227	● 黑色	88 μL × 1
4X cDNA PCR Mix	1000069884	● 蓝色	110 μL × 1
cDNA Primer	1000047917	● 蓝色	53 μL × 1
储存温度: -25℃ ~ -15℃ 运输温度: -25℃ ~ -15℃ 有效期: 见标签			

表格 1-2

芯片种类	货号	规格及数量
Stereo-seq 芯片 N (1 cm*2 cm)	100CN11122	2 EA ×1
Stereo-seq 芯片 N (2 cm*2 cm)	100CN11221	1 EA ×1
Stereo-seq 芯片 N (2cm*3 cm)	100CN11231	1 EA ×1
 储存温度：- 25° C ~ - 15° C  运输温度：- 25° C ~ - 15° C 有效期：见标签		

表格 1-3

芯片反应容器种类	货号	规格及数量
Stereo-seq Chip Reaction Plate(1 cm*2 cm)	1000059464	2 EA ×1
Stereo-seq Chip Reaction Plate(2 cm*2 cm)	1000059153	1 EA ×1
Stereo-seq Chip Reaction Plate(2 cm*3 cm)	1000059154	1 EA ×1
 储存温度：18°C ~ 25°C  运输温度：0°C ~ 30°C 有效期：见标签		

1.4. 需自备物料清单

本实验所需的第三方设备和物料参考 [《时空转录组 FFPE V1.1 大尺寸芯片生化流程第三方物料需求表》](#)。该表格中不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱、天平等。关于显微镜的要求，请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)。

<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

1.5. Stereo-seq 大芯片 N 介绍

Stereo-seq 芯片 N

- 1 cm*2 cm 尺寸的芯片盒中包含 2 张 Stereo-seq N 芯片；
- 2 cm*2 cm 和 2 cm*3 cm 尺寸的芯片盒中各包含 1 张 Stereo-seq N 芯片。

Stereo-seq 芯片 N 保存方法

Stereo-seq 大芯片装于真空密封的铝箔袋中，冷链运输。收到产品后，请及时确认铝箔袋是否完好并处于真空密封状态，随后须立即将未开封的 Stereo-seq 芯片 N 储存在 $-15^{\circ}\text{C} \sim -25^{\circ}\text{C}$ 。若拆袋后未使用，参照《[Stereo-seq 大芯片保存操作指南](#)》- 重新封装操作指引将大芯片正确放入芯片盒并与干燥剂一起重新密封。再次确认铝箔袋是否完好并处于密封状态，随后立即将铝箔袋储存在 $-15^{\circ}\text{C} \sim -25^{\circ}\text{C}$ 。未真空密封的芯片不可放置超过两周，开封后请尽快使用。



 需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

1.6. 注意事项

- 本产品仅适用于科研用途，不可用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际操作中可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 推荐使用前将各试剂组分提前取出，将酶类组分瞬时离心后置于冰上备用，并将其他组分置于室温解冻。解冻后轻柔地上下颠倒数次使其充分混匀，瞬时离心后置于冰上备用。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 推荐把 PCR 仪温度预热至反应温度。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

第二章

样本准备



请参照 [《时空实验 FFPE 样本准备操作指南》](#) 进行样本准备。



 建议对 $DV200 \geq 30\%$ 的组织样本进行后续实验操作。

第三章

时空转录组 FFPE V1.1

($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 转录组实验标准
操作流程)



3.1. 实验前准备



本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 Nuclease-Free Water (NF-H₂O)。

第一天

准备试剂	用途	1cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*3cm 芯片 准备流程	暂存条件
400 mL 30% 乙醇	组织切片 与贴片	无水乙醇稀释到 30% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
Coating Buffer I	芯片 预处理	提前从 -20°C 取出置于冰上融化，若有结晶，涡旋振荡至结晶消失，后长期保存于 -20°C			4°C 1 天
Coating Buffer II	芯片 预处理	提前从 -20°C 取出，放于冰上			冰上 2 hr

第二天

准备试剂	用途	1cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*3cm 芯片 准备流程	暂存条件
100 mL 96% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 96% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
50 mL 90% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 90% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
50 mL 80% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 80% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
50 mL 70% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 70% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
50 mL 50% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 50% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
50 mL 30% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 30% (使用 ddH ₂ O)			室温 1 天
5X SSC	ssDNA 染色	110 μL 20X SSC 加入到 330μL NF- H ₂ O 中，混匀	165 μL 20X SSC 加入到 495μL NF- H ₂ O 中，混匀	220 μL 20X SSC 加入到 660μL NF- H ₂ O 中，混匀	室温 7 天
50 mL 0.1X SSC	ssDNA 染 色，清洗 封片剂， RT 后清洗	250 μL 20X SSC 加入到 49.75 mL NF-H ₂ O 中，混匀			室温 7 天
FFPE Mounting Medium	ssDNA 染色	提前从 -20°C 取出待其融化后建议保存于室温			室温
ssDNA 染 色液	ssDNA 染色	437.8μL 5X SSC、 加 Qubit ssDNA Reagent 2.2 μL/ 芯片，混匀	656.7μL 5X SSC、 加 Qubit ssDNA Reagent 3.3 μL/ 芯片，混匀	875.6μL 5X SSC、 加 Qubit ssDNA Reagent 4.4 μL/ 芯片，混匀	现配现用 室温避光 放置

第二天

准备试剂	用途	1cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*3cm 芯片 准备流程	暂存条件
Decrosslinking Reagent	解交联	提前取出，室温备用			室温
0.01N HCl	透化	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 2（确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内；至少 2.0 mL / 芯片）	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 2（确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内；至少 2.0 mL / 芯片）	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 2（确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内；至少 2.2 mL / 芯片）	室温 48 hr

第二天

准备试剂	用途	1cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*3cm 芯片 准备流程	暂存条件
10X 透化试剂 剂储存液	透化	用 1 mL 新鲜配制的 0.01N HCl 将 PR Enzyme（红盖，粉末状）溶解，并通过移液器吹打混匀。溶液可分装成若干份，于 -20℃长期保存			冰上暂存 2 hr
不要涡旋透化酶，可通过移液器吹打混匀。建议对配制好的 10X 透化试剂储存液进行分装，避免反复冻融。					
1X 透化试剂 工作液	透化	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 60 μL 稀释到 600μL（至少 600 μL/ 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 80 μL 稀释到 800μL（至少 800 μL/ 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 100 μL 稀释到 1000μL（至少 1000 μL/ 芯片）	冰上暂存 6 hr
5X SSC (5%RI)	透化后清洗	将 150 μL 20X SSC、30 μL RI、加入到 420 μL NF H ₂ O 中，混匀，置于冰上	将 200 μL 20X SSC、40 μL RI、加入到 560 μL NF H ₂ O 中，混匀，置于冰上	将 250 μL 20X SSC、50 μL RI、加入到 700 μL NF H ₂ O 中，混匀，置于冰上	冰上暂存 最长 1 天
RT Buffer Mix	RT	提前从 -20℃取出，在冰上融化，置于冰上，若发现有絮状沉淀，室温放置 5 min，振荡混匀，离心备用			使用期间 置于冰上
RT plus	RT	提前从 -20℃取出，在冰上融化，并暂存于冰上			使用期间 置于冰上
RT Oligo	RT	提前从 -20℃取出，在冰上融化，并暂存于冰上			使用期间 置于冰上
Elute Buffer	cDNA 释放	提前取出放于 55℃溶解，摇匀至无沉淀，再恢复至室温，后可保存于室温			室温

第三天

准备试剂	用途	1cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*2cm 芯片 准备流程	2 cm*3cm 芯片 准备流程	暂存条件
磁珠	cDNA 纯化	提前取出，42°C放置 30 min 平衡			室温 12 hr
30 mL 80% 乙醇	cDNA 纯化	无水乙醇稀释到 80%（使用 NF-H ₂ O）			室温 1 天
4X cDNA PCR Mix	cDNA 扩增	提前从 -20°C取出，在冰上融化，并暂存于冰上			使用期间 置于冰上
cDNA Primer	cDNA 扩增	提前从 -20°C取出，在冰上融化，并暂存于冰上			使用期间 置于冰上
TE Buffer pH 8.0	cDNA 纯化	提前准备，室温备用			室温

准备仪器	准备流程	备注
摊烤片一体机	设置水浴温度 40°C ~48°C，烤片温度 42°C	温度根据实际操作过程调整
烘箱 / 金属浴	37°C用于透化步骤 42°C用于 FFPE MIX 反应步骤 55°C用于 cDNA 释放	检查烘箱是否有异常，必要时更换
PCR 仪	37°C用于烤片和透化步骤 42°C用于烤片 95°C、98°C、58°C、72°C反应温度用于 PCR 扩增程序（105°C热盖）	检查 PCR 仪是否有异常，必要时更换
金属浴	90°C用于解交联	
荧光显微镜	FITC 通道（荧光染色）	检查显微镜是否有异常，必要时更换

其他准备	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
放置芯片	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)
封片剂清洗	玻片盒	玻片盒	玻片盒
解交联	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3cm 芯片反应容器
甲醇固定	6 孔板)	6 孔板	6 cm 培养皿
透化	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3cm 芯片反应容器
反转录	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器
cDNA 释放	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器

3.2. 切片准备与组织切片、捞片



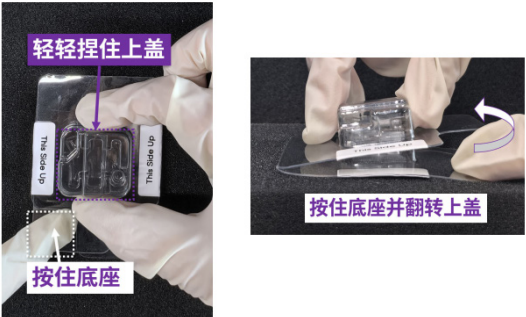
有关组织切片到 Stereo-seq 芯片上的操作演示视频，可参阅以下链接或扫描二维码：
[实验指南 | 时空 FFPE 样本切片与贴片操作指南 - 华大时空](#)

3.2.1. 芯片预处理

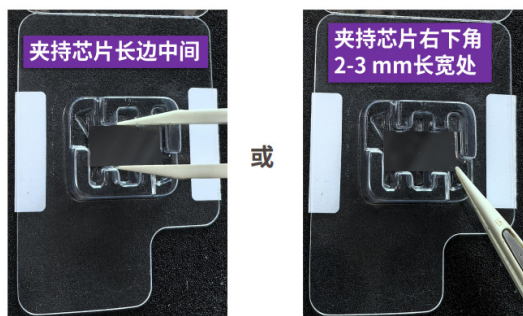
- a. 将包装盒中的 PSA 胶取出置于常温，必须恢复至室温才可使用；
 - b. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出 Stereo-seq 芯片 N，记录芯片背面的编号；
注意不要触碰芯片正面；
- 确认芯片背面与芯片包装上的编号是否一致，并准确记录芯片编号。该信息用于后续图像 QC 及下游分析，请务必准确记录。
- 1) 从真空干燥铝箔袋中取出芯片盒，将芯片盒放置在桌面，并将写有 “This Side Up” 的方向朝上；
 - 2) 将刀片伸入芯片盒中间缝隙，切开两边标签纸（如需拿起芯片盒寻找切入口，请轻轻捏住芯片腔室，以防芯片松脱移位）；



- 3) 按住底座露出部分，轻轻捏住上盖并翻转打开；



- 4) 用镊子夹持芯片长边中间位置取出芯片，或用钝头镊子夹持芯片右下角 2-3 mm 长宽处取出。

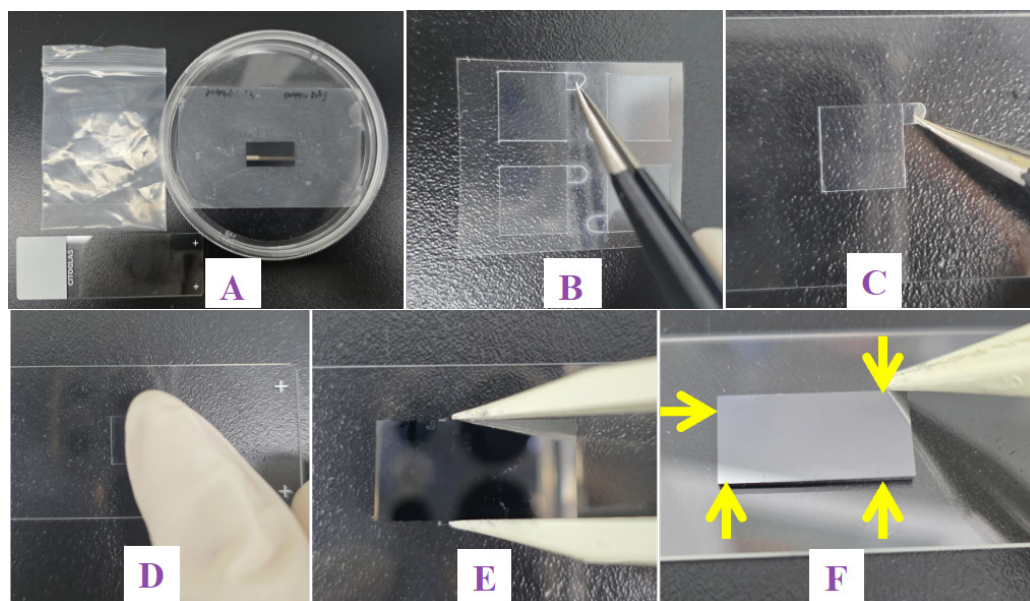


全文中涉及到大尺寸芯片的夹取都参考该步骤操作进行。



芯片的正面为亮光面，正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。若芯片拆袋后未使用，可参考《[Stereo-seq 大芯片保存操作指南](#)》- 重新封装操作指引，芯片需重新干燥密封并储存在 $-15^{\circ}\text{C} \sim -25^{\circ}\text{C}$ 。需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

- c. 将芯片置于 10 cm 培养皿（底部铺有封口膜）中复温 1 min；



- d. 准备一张载玻片，根据芯片大小选择合适的区域，使用尖头镊子夹取 PSA 胶，贴至载玻片中央，将 PSA 胶按压贴附，撕掉 PSA 上层保护膜，夹取培养皿中芯片，置于 PSA 胶上，使用铁氟龙镊子轻轻按压芯片四角，确保芯片黏附在玻片上不会掉落；

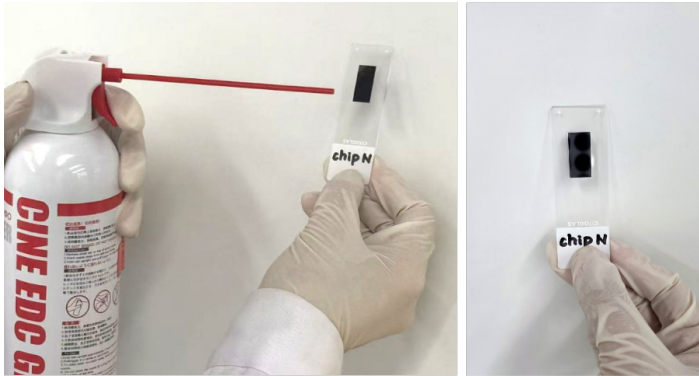
试剂	准备方法流程	暂存条件
30% 乙醇	120 mL 无水乙醇加入到 280 mL ddH ₂ O 中，混匀，加入容器中	捞片，现配现用
Coating Buffer I (1000064221)	提前从 -20℃取出置于冰上融化，若有结晶，涡旋振荡至结晶消失，后建议长期保存于 -20℃	4℃ 1 天
Coating Buffer II (1000064221)	提前从 -20℃取出，放于冰上	冰上 2 hr

- e. 从 Stereo-seq 转录组试剂盒 N（货号：101KN11122/101KN11221/101KN11231）中取出 Coating Buffer I 与 Coating Buffer II 试剂；
- f. 按照表格 3-1 配制芯片处理液，振荡混匀并置于冰上备用；

表格 3-1 芯片处理液配制

试剂	1 cm*2 cm 芯片 用量 1X (μL)	1 cm*2 cm 芯 片用量 2X (μL)	2 cm*2 cm 芯片 用量 1X (μL)	2 cm*3 cm 芯片 用量 1X (μL)
NF-H ₂ O	162.8	325.6	325.6	488.4
Coating Buffer I (1000064221)	55	110	110	165
Coating Buffer II (1000064222)	2.2	4.4	4.4	6.6
Total	220	440	440	660

- g. 将含有载玻片的芯片平放于试验台，按照 1 cm*2 cm 芯片 **200 μL/ 每张芯片**；2 cm*2 cm 芯片 **400 μL/ 每张芯片**；2 cm*3cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**的加液量，先在芯片的每个角加入一滴芯片处理液，然后将其余芯片处理液加到芯片中央，使所有液体融合，确保液体均匀覆盖全芯片，常温孵育 **30 min**；
- h. 持载玻片倾倒芯片处理液，按照 1 cm*2 cm 芯片 **200 μL/ 每张芯片**；2 cm*2cm 芯片 **400 μL/ 每张芯片**；2 cm*3 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**的加液量，使用 NF-H₂O 清洗芯片；
- i. 重复一次 **h 步骤**，倾倒 NF-H₂O 后，使用气瓶吹干芯片表面备用。



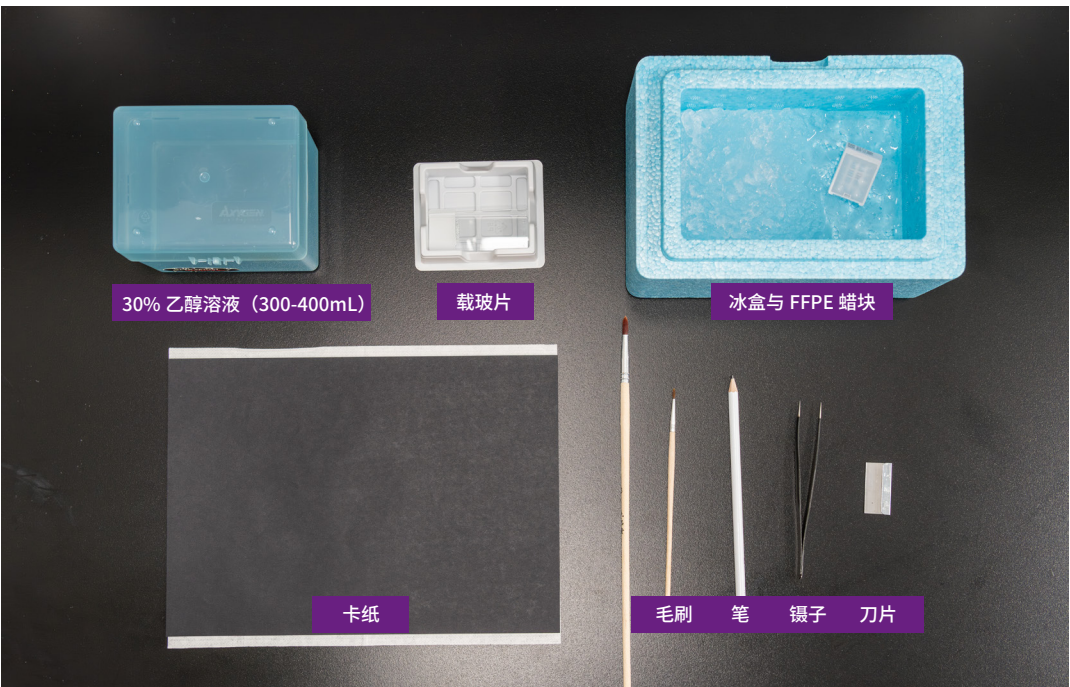
芯片预处理后，如果可以在 1 hr 内完成贴片使用，可常温暂存；如预处理后的芯片等待时间 > 1 hr，需要将芯片载体放入玻片盒，并添加干燥剂后置于 4℃ 暂存，并且须当天内将芯片使用。

3.2.2. 组织切片与捞片



有关组织切片与贴片的操作演示视频，可参阅以下链接或扫描二维码：
<https://www.stomics.tech/resources/Videos/1168.html>

试剂	准备方法流程	暂存条件
□ 30% 乙醇	120 mL 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。



- a. 提前开启摊烤片一体机，设置水浴温度 40℃ ~48℃（医院病理科可按照各自常用的水浴温度温度设置），烤片温度 42℃；
- 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，若 PCR 盖高受限，可不关上热盖，平置载片于 PCR 适配器 (adaptor) 上，倒扣≥ 9cm 尺寸培养皿，设置程序如下并点击运行：

表格 3-2 烤片程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
45℃热盖	on
42℃	∞
42℃	3 hr
37℃	∞

- b. a. 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);
- c. 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却 **5-10 min**;

⋯ 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°C 冷冻 10 min 再切片。

- d. 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;

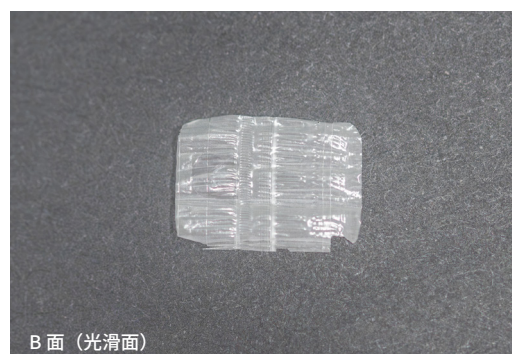
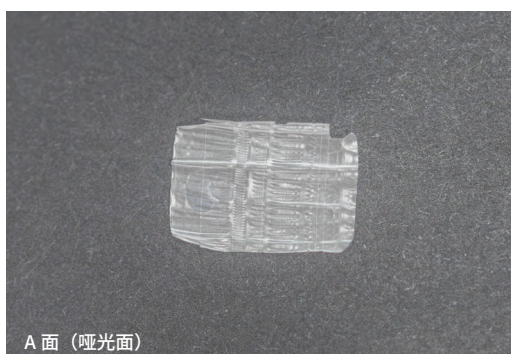


- e. 调整切片厚度, 普通组织建议 5 μm 、脂肪含量高的组织 (如乳腺组织等) 建议 4 μm (为降低后续操作中的脱片风险) 进行切片;
- f. 正式切片时, 首先将第 1 片丢弃 (厚度不符合要求);
- g. 在随后的切片过程中选出需要的目标切片, 用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体;

⋯ 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。

☰ 蜡片样本可以直接寄送, 注意事项见: 《时空实验 FFPE 样本准备操作指南》(STOG02004)。

⚠ 一张石蜡切片分 A、B 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。





h. 将目标切片修剪至芯片大小合适的尺寸（以 1 cm × 2cm 芯片为例，修剪至切面小于 0.9 cm × 1.8 cm；以 2cm × 2cm 芯片为例，修剪至切面小于 1.8 cm × 1.8 cm；以 2cm × 3cm 芯片为例，修剪至切面小于 1.8 cm × 2.7 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。

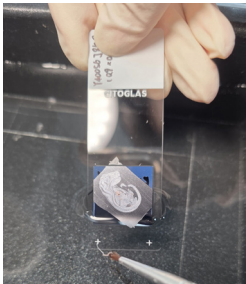
i. 确认水浴锅预热到目标温度（40℃ ~48℃），用干净的普通载玻片将蜡片从 30% 乙醇溶液捞起，转移至预热好的水浴锅中，保持 B 面朝下接触水面；

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

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

k. 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 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；



l. 用无尘纸小心擦去芯片四周及缝隙中的水迹，手持含有载玻片的芯片平放在烤片仪或者 PCR 适配器（adaptor）上，点击 edit 并点击 next step，跳过 42℃ ∞，42℃烤 3 hr 后 37℃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。



- 将烤片（42℃烤 3 hr 后）后的 Stereo-seq 芯片 N（在载玻片上）放入玻片盒中，盖上盖子，封口膜封口，置于 25℃或 37℃烘箱中，可存放 48 hr；或置于 4℃并添加干燥剂保存 3 周，注意芯片正面向上。



- 蜡片样本可以直接寄送，注意事项见 [《时空实验 FFPE 样本准备操作指南》\(STOG02004\)](#)。

- 注意事项：

- 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。

3.3. 脱蜡



脱蜡步骤实验流程图

- a. 提前开启摊烤片一体机（或烤片机、金属浴等；或可以使用 PCR 仪 +PCR 适配器（adaptor）），设置烤片温度 60°C；
- b. 取出含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N，置于 60°C烤片机，烤片 1 hr（斜烤平烤均可），对于易脱片样本建议适当延长烤片时间，不超过 2hr；
- c. 在通风橱中用染色缸准备以下试剂，每个染色缸至少 30 mL 试剂，以充分没过芯片载体；

试剂	数量
☐ Histo-clear ① & ②	2
☐ 100% 乙醇 ① & ②	2
☐ 96% 乙醇 ① & ②	2
☐ 90% 乙醇	1
☐ 80% 乙醇	1
☐ 70% 乙醇	1
☐ 50% 乙醇	1
☐ 30% 乙醇	1
☐ ddH ₂ O	1

 二甲苯可代替 Histo-clear。



- d. 完成烤片后，将含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N 放置到 Histo-clear ①中，室温 20 min；然后取出放到 Histo-clear ②中，室温 **20 min**；
- e. 取出含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N，用无尘纸吸掉多余的 Histo-clear；
- f. 将含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N 依次放置到以下试剂的染色缸中；
 - 1. 100% 乙醇①中 **5 min**
 - 2. 100% 乙醇②中 **5 min**
 - 3. 96% 乙醇①中 **5 min**
 - 4. 96% 乙醇②中 **5 min**
 - 5. 90% 乙醇中 **2 min**
 - 6. 80% 乙醇中 **2 min**
 - 7. 70% 乙醇中 **2 min**
 - 8. 50% 乙醇中 **2 min**
 - 9. 30% 乙醇中 **2 min**
 - 10. ddH₂O 中 **1 min**
- g. 取出含有 Stereo-seq 芯片 N 的载玻片，用无尘纸吸掉芯片四周的多余水分，注意请勿触碰芯片表面；
- h. 使用气瓶将芯片吹干。



将含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N 放入玻片保存盒中，盖上盖子，封口膜封口，装入自封袋并加入干燥剂，置于 4° C 密封保存不超过 72 hr。

3.4. ssDNA 染色与成像

3.4.1. ssDNA 染色

试剂	1 cm*2 cm/ 芯片准备方法	2 cm*2 cm/ 芯片准备方法	2 cm*3 cm/ 芯片准备方法	用途
☐ 5X SSC	110 μL 20X SSC 加入到 330μL NF-H ₂ O 中，混匀	165 μL 20X SSC 加入到 495μL NF-H ₂ O 中，混匀	220 μL 20X SSC 加入到 660μL NF-H ₂ O 中，混匀	配制 ssDNA 染色液用
☐ Mounting Medium (1000064223)	提前从 -20℃取出平衡至室温			封片剂
☐ 0.1X SSC	250 μL 20X SSC 加入到 49.75 mL NF H ₂ O 中，混匀			浸泡、清洗盖玻片

- a. 将适量 100% 乙醇置于培养皿中，乙醇需没过盖玻片，清洗盖玻片后，用镊子小心取出盖玻片吹干备用；
- b. 按照表格 3-3，配置 ssDNA 染色液，全程注意避光；

表格 3-3 ssDNA 染色试剂配制

试剂	1 cm*2 cm 芯片 用量 1X (μL)	1 cm*2 cm 芯片 用量 2X (μL)	2 cm*2 cm 芯片 用量 1X (μL)	2 cm*3 cm 芯片 用量 1X (μL)
5X SSC	437.8	875.6	656.7	875.6
Qubit ssDNA Reagent	2.2	4.4	3.3	4.4
Total	440	880	660	880

- c. 将含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N 平放在桌面，按照 1 cm*2 cm 芯片 **400 μL/ 每张芯片**；2 cm*2 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**；2 cm*3 cm 芯片 **800 μL/ 每张芯片**的加液量，从芯片四角滴染 ssDNA 染色液芯片上；
- d. 常温避光染色 **5 min**；
- e. 手持载玻片倾倒弃掉 ssDNA 染色液到无尘纸上；
- f. 滴加 1 cm*2 cm 芯片 **400 μL/ 每张芯片**；2 cm*2 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**；2 cm*3 cm 芯片 **800 μL/ 每张芯片**的 0.1X SSC 到芯片上，清洗芯片，手持载体倾倒弃掉 0.1X SSC；
- g. 重复**步骤 f.**；
- h. 使用气瓶小心吹干芯片；
- i. 用移液器缓慢吸取封片剂滴加到组织中央，封片剂可均匀分 2-3 滴，滴加在芯片表面，加液量参考表格 3-4，注意不要有气泡；为避免荧光淬灭，染色完成后请尽快拍照。



 样本较大，可适量多加封片剂，不超过最大建议加液量，不必均分过多滴，容易出现覆盖不全、产生气泡的问题，确保封片剂浸润整张芯片，避免产生气泡。

表格 3-4 各尺寸大芯片封片剂加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
Mounting Medium (1000064223)	10-15 μ L/ 一张芯片	20-28 μ L/ 一张芯片	30-40 μ L/ 一张芯片



封片状态下室温避光可放置 **4 hr**。

3.4.2. 荧光拍照



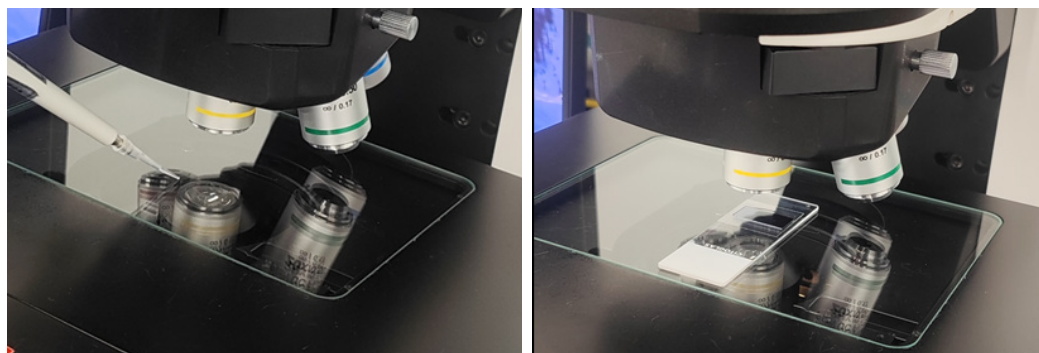
⚠ 成像过程需要保证染色通道的 Track 线和组织区域同时清晰且组织区域不过曝。



⋯ 文件夹名称只使用字母、数字、下划线，禁止使用空格等特殊字符。

例：C05479C3D3。

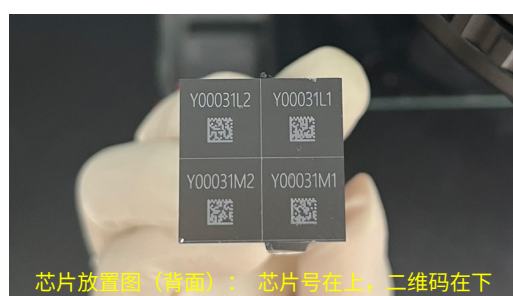
- b. 用显微镜的玻片夹将载玻片固定，如没有玻片夹，则在载物台上滴加 1-2 μL 水，小心地将放有芯片的载玻片转移到显微镜载物台上，将载玻片置于水滴上以起到固定作用。如下图；



- c. 载玻片轻放在载物台上，芯片尽量与载物台平行；

⋯ 要求芯片边缘水平角度小于 15° 。

- d. 芯片放置时，确保芯片的方向正确，使得背面的芯片号（SN）位于上方，而二维码位于下方，如下图所示：



芯片放置图（背面）：芯片号在上，二维码在下

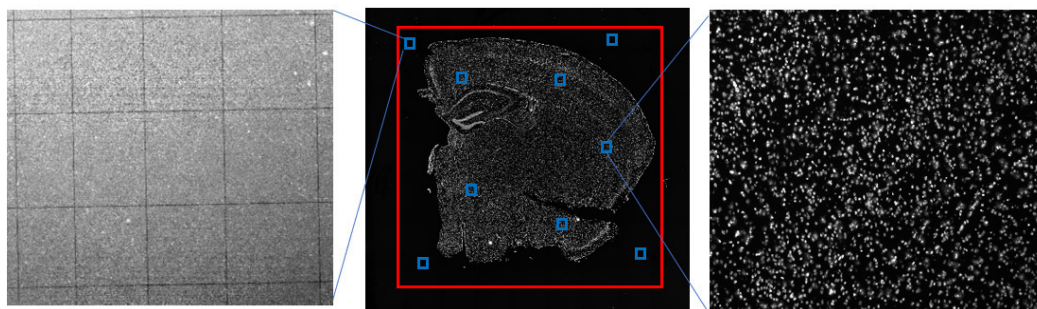
- e. 打开荧光显微镜，选择落射荧光模式（FITC 通道（ssDNA））；
f. 确定组织位置：选择 4 倍物镜，将视野移动至芯片上的组织区域，调整亮度、增益和曝光，调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态（光强应保持在较低范围内，以防荧光淬灭）；
g. 扫描地图：框选芯片区域，要求芯片完全在框选区域内且框选区域略微大于芯片，在 4 倍物镜下扫描地图，以便确定正式扫描区域；

☰ 如果显微镜无扫描地图功能，直接跳过该步骤。

- h. 调整显微镜倍数：将物镜调整至 10 倍，进一步调整框选区域，需确保芯片四个角在框选范围内，并尽量与芯片边缘重合；



- i. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；
- j. 对焦策略：将视野移至芯片空白区域，微调亮度 / 曝光和焦距，直至芯片上的 Track 线清晰，在芯片不同的空白区域（建议在芯片四个角）建立 3-5 个建模点；将视野移至组织区域，调整亮度 / 曝光和焦距，直至组织和细胞呈清晰状态且不过曝，选择组织中较关注的区域，设置建模点（建议组织区域内每平方厘米选择 3-5 个建模点，如果组织起伏较大，可以酌情增加建模点）；



- k. 最终成像：完成建模后，将增益调至最小，随即进行扫描；拍照完成后，保存整个文件夹；
- l. 打开 “StereoMap->Tools->imageQC” 模块，拖入 ssDNA 染色图，并参考软件内置的《StereoMap 用户手册》来进行图像质控；

◎ 更为详细的注意事项请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)。



获得的 ssDNA 染色图需要 Track 线质控通过才能自动化进行后续的数据分析（如，自动配准）。



如果 QC 失败，可以继续实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 手动图像处理。

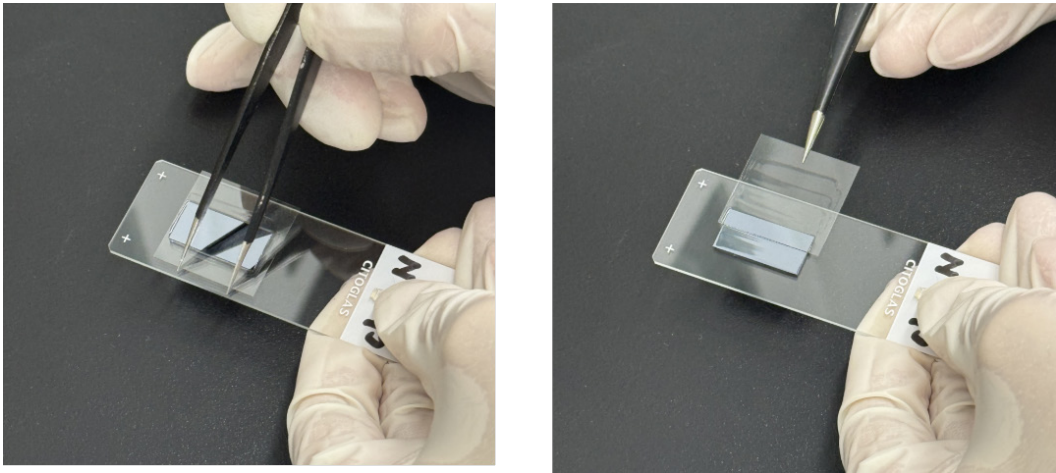


封片状态下室温可放置 4 hr。

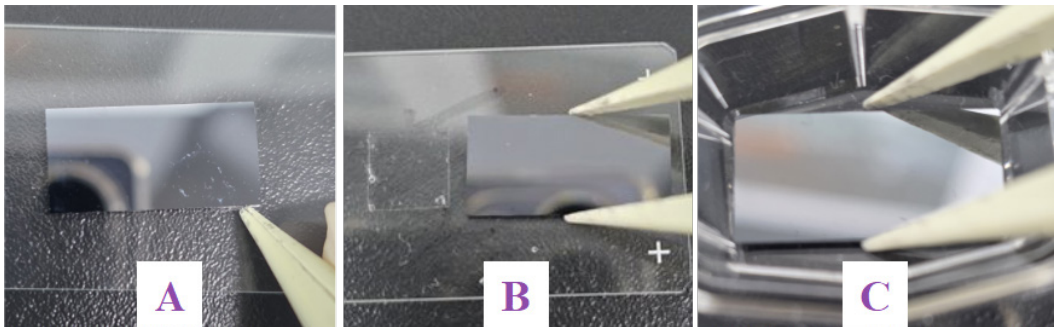
3.5. 解交联

试剂	准备方法	用途
Decrosslinking Reagent (1000064224)	提前从 -20℃取出，平衡至室温，确认无沉淀	解交联

- a. 将 Decrosslinking Reagent 从 -20℃取出，平衡到室温；同时将PCR仪（或同等功能仪器）按照表格 3-5 调节至 90 °C
- b. 拍照后，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹在盖玻片一角；
- c. 用镊子轻轻地平行移动盖玻片，直到芯片与盖玻片完全分离；



- d. 将含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N 置于 30-40 mL 0.1X SSC 的染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中浸泡 **3-5 S**，清洗芯片；
- e. 将含有载玻片的 Stereo-seq 芯片 N 取出，用无尘纸小心擦拭芯片周围液体，将芯片使用气瓶吹干；

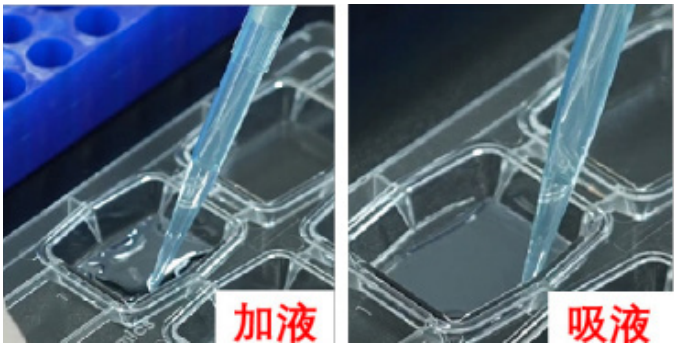


- f. 使用铁氟龙镊子从芯片四角侧面多次推动芯片，使其可以滑动，将其从载玻片上推到侧边，注意不能直接接触芯片正面；
- g. 用铁氟龙镊子夹取至对应尺寸的大芯片反应容器中；

表格 3-5 解交联程序设置

程序选择: Incubate	
温度	时间
90°C	∞

- h. 在含有 Stereo-seq 芯片 N 的反应容器中，按照表格 3-6 的加液量加入 Decrosslinking Reagent，贴好封板（Parafilm，PM996），封住孔位；



表格 3-6 各尺寸大芯片解交联加液量

试剂	1 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*3 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)
Decrosslinking Reagent (1000064224)	600	800	1000

- i. 将含有 Stereo-seq 芯片 N 的反应容器放置于 90 °C PCR仪上，盖上热盖，反应 1 hr；

也可使用金属浴作为反应容器，金属浴保温性能有限，无法有效维持恒定温度，需将其温度步骤度设置为97°C进行反应，以保证反应条件稳定。金属浴选用详情可查阅《时空转录组FFPE V1.1 大尺寸芯片生化流程第三方物料需求表》

- j. 将 3-4mL 甲醇加 6 孔板 /6 cm 培养皿内，置于 -20°C预冷 5-30 min；
- k. 待反应结束后，先关闭金属浴，等待 2 min 后，再将反应容器从金属浴中取出（注意温度是否过高，以防烫伤）。

该步骤结束后，立刻按照 3.6 固定开展后续实验。

3.6. 固定

表格 3-7 各尺寸大芯片固定加液量

试剂	1 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*3 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	备注
甲醇	取 3-4 mL，装入 6 孔板中，放入 -20℃预冷	取 3-4 mL，装入 6 孔板中，放入 -20℃预冷	取 4-5mL，装入 6cm 培养皿中，放入 -20℃预冷	固定

- a. 撕掉封口膜，将芯片从反应容器中取出，转移至预冷甲醇的 6 孔板 /6 cm 培养皿中，固定 **30 min**;
- b. 等待固定期间，可提前按照 **3.7. 步骤 a.** 准备组织透化步骤试剂 0.01N HCl 与 10X 透化试剂储存液；
- c. 固定好后，6 孔板 /6 cm 培养皿转移到通风橱中；



☹️ 芯片片夹出前，建议留有一定液体在皿内，以便芯片夹取。



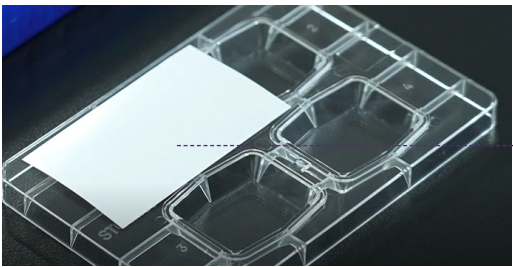
- d. 将芯片取出，用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的甲醇，转移至培养皿内，在通风橱中通风 **4-6 min**，让甲醇充分挥发。

3.7. 透化

表格 3-8 各尺寸大芯片透化加液量

试剂	1 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*3 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	备注
0.01N HCl	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N, pH 值准确到 2 (确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内; 至少 2.0 mL / 芯片)	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N, pH 值准确到 2 (确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内; 至少 2.0 mL / 芯片)	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N, pH 值准确到 2 (确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内; 至少 2.2 mL / 芯片)	透化
10X 透化试剂储存液	PR Enzyme(红盖、粉末状) 短暂离心, 加入 1mL 新鲜配制的 0.01N HCl, 通过移液器吹打混匀 (可分装成若干份), - 20° C 长期保存。			透化
1X 透化试剂工作液	10X 透化试剂储存液 60 μL 用 540μL 0.01N HCL 稀释到 600μL (至少 600 μL/ 芯片)	10X 透化试剂储存液 80 μL 用 720μL 0.01N HCL 稀释到 800μL (至少 800 μL/ 芯片)	10X 透化试剂储存液 100 μL 用 900μL 0.01N HCL 稀释到 1000μL (至少 1000 μL/ 芯片)	透化
5X SSC (5%RI)	将 150 μL 20X SSC、30 μL RI、加入到 420 μL NF H ₂ O 中, 混匀, 置于冰上	将 200 μL 20X SSC、40 μL RI、加入到 560 μL NF H ₂ O 中, 混匀, 置于冰上	将 250 μL 20X SSC、50 μL RI、加入到 700 μL NF H ₂ O 中, 混匀, 置于冰上	清洗

- a. 在固定期间, 提前准备 0.01N HCl 与 10X 透化试剂储存液; 按照上述表格配制 1X 透化试剂工作液, 现用现配, 置于冰上;
- b. 提前将恒温培养箱温度调至 37°C;
- c. 将固定好的芯片转移至芯片反应容器的新反应孔内, 按照表格 3-8 的加液量, 在芯片四角缓慢加入 1X 透化试剂工作液, 将封板膜 (不要撕开, 包含白底) 放置于芯片反应容器上覆盖反应孔, 将芯片反应容器置于 37°C 恒温培养箱中进行透化反应, 反应 **30 min**;



封板膜 (含白底)

- d. 在等待透化期间, 提前按照实验前准备中配制 5 X SSC (5%RI), 用来透化后清洗; 提前按照 **3.8 步骤 a. 表格 3-9** 配制 FFPE MIX 反应液, 并将 RT 反应需要的试剂提前置于冰上化冻; 提前将恒温培养箱温度调至 42°C;
- e. 透化结束后, 将芯片反应容器从 37°C 恒温培养箱中取出;
- f. 用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙缓慢吸掉透化试剂, 避免接触芯片正面, 尽量减少表面液体;
- g. 加入 5X SSC (5%RI) 洗 1 次, 清洗完成后吸弃 5X SSC (5%RI) 。

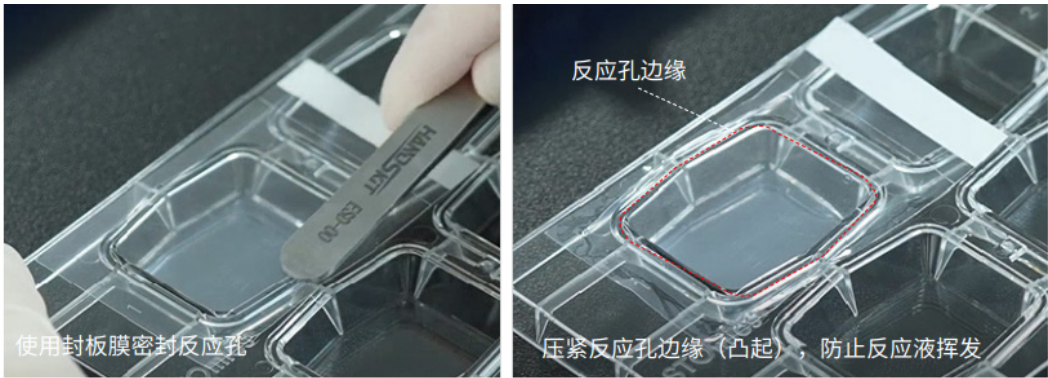
3.8. FFPE MIX 反应

- a. 在等待透化期间,提前按照表格 3-9 配制 FFPE MIX 反应液,盖上盖子后振荡混匀,短暂离心,置于冰上备用;

表格 3-9 FFPE MIX 反应液配制

试剂	1 cm*2 cm 芯片 用量 /1X (μL)	1 cm*2 cm 芯片 用量 /2X (μL)	2 cm*2 cm 芯片 用量 /1X (μL)	2 cm*3 cm 芯片 用量 /1X (μL)
RT Buffer Mix (1000047911)	365.2	730.4	547.8	730.4
RT Oligo (1000047913)	22	44	33	44
RT Enzyme (1000047914)	44	88	66	88
RT plus (1000047912)	8.8	17.6	13.2	17.6
Total	440	880	660	880

- b. 将 FFPE MIX 反应液,按照 1 cm*2 cm 芯片 **400 μL/ 每张芯片**; 2 cm*2 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**; 2 cm*3 cm 芯片 **800 μL/ 每张芯片**,加入到反应孔;
- c. 使用封板膜密封反应孔,压紧反应孔边缘(凸起),防止反应液挥发,将芯片反应容器放置于 42℃ 恒温培养箱,孵育 **2 hr**。



3.9. cDNA 释放与回收

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
0.1X SSC	使用染色时配制的 0.1X SSC 即可	-
Elute Buffer (1000064226)	提前取出放于 55°C 溶解, 摇匀至无沉淀, 再恢复至室温, 后可保存于室温	室温
NF-H ₂ O	取 NF-H ₂ O, 在回收开始时放入 55°C 预热	-

- a. 按照表格 3-10 配制 cDNA Release Mix, 室温放置; 提前将恒温培养箱温度调至 55°C;



如果观察到 Buffer 中有白色沉淀析出, 可放于 55°C 溶解, 再恢复至室温。

- b. 从烘箱中取出反应容器, 吸弃 FFPE MIX 反应液, 加入 0.1X SSC 清洗一次, 按照 1 cm*2 cm 芯片 **400 μL/ 每张芯片**; 2 cm*2 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**; 2 cm*3 cm 芯片 **800 μL/ 每张芯片**, 清洗完成后吸弃 0.1X SSC;

表格 3-10 cDNA Release Mix 反应液配制

试剂	1 cm*2 cm 芯片 用量 1X (μL)	1 cm*2 cm 芯片 用量 2X (μL)	2 cm*2 cm 芯片 用量 1X (μL)	2 cm*3 cm 芯片 用量 1X (μL)
Elute Additive (1000064227)	33	66	44	55
Elute Buffer (1000064226)	627	1254	836	1045
Total	660	1320	880	1100

- c. 加入 cDNA Release Mix, 按照 1 cm*2 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**; 2 cm*2 cm 芯片 **800 μL/ 每张芯片**; 2 cm*3 cm 芯片 **1000 μL/ 每张芯片**, 使用封板膜密封反应孔, 压紧反应孔边缘 (凸起), 防止反应液挥发, 然后放置于 55°C 恒温培养箱, 反应 **5 hr 或以上**, 最长不超过 **24 hr**; 同时取 NF-H₂O 置于 55°C 预热, 按照 1 cm*2 cm 芯片 **660 μL/ 每张芯片**; 2 cm*2 cm 芯片 **880 μL/ 每张芯片**; 2 cm*3 cm 芯片 **1100 μL/ 每张芯片** 准备;



封板膜密封, 避免反应液蒸发!



cDNA 释放步骤可反应过夜。如果反应过夜, 应确保封板膜的密封性。

- d. 反应结束后, 将反应孔内液体完全回收至新 1.5 mL 离心管内, 1 cm*2 cm 芯片 2 管, 每管 **~300 μL**; 2 cm*2 cm 芯片 3 管, 每管 **~266 μL**; 2 cm*3 cm 芯片 4 管, 每管 **~250 μL**;

表格 3-11 回收水洗体积

试剂	1 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*3 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)
NF-H ₂ O	600	800	1000

e. 按照表格 3-11 加入 55°C预热的 NF-H₂O 清洗反应孔芯片，按照 1 cm*2 cm 芯片 **600 μL/ 每张芯片**；2 cm*2 cm 芯片 **800 μL/ 每张芯片**；2 cm*3 cm 芯片 **1000 μL/ 每张芯片**，分装于以上 1.5 mL 离心管内，1 cm*2 cm 芯片每管 ~**300μL**；2 cm*2 cm 芯片每管 ~**266μL**；2 cm*3 cm 芯片每管 ~**250μL**。



 此步骤需要回收 cDNA Release Mix 和 NF-H₂O ，合并后进行下一个步骤。

3.10. cDNA 纯化与扩增

试剂	准备方法	备注
☐ 磁珠	提前取出，42°C 孵育 30 min 平衡	室温 12 hr
☐ 80% 乙醇	使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇	-
☐ NF-H ₂ O	直接取用	室温
☐ TE Buffer pH8.0	直接取用	室温

背景信息

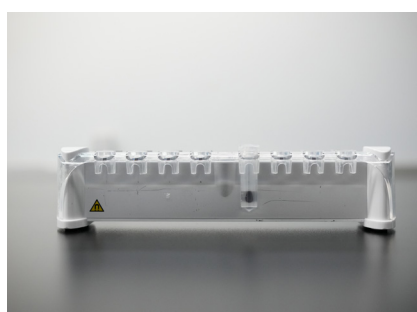
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

- 提前 30 min 从 4°C 取出，涡旋混匀且平衡至室温，有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吸打，确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高，纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

磁珠操作注意事项

- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，一般需要 2-3 min。但由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间有时可能需要延长，以液体彻底澄清为准。



- 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留 2-3 μ L 液体，以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。



- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠。



- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。



- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成乙醇残留，影响后续反应，过度干燥（磁珠开裂）会降低回收得率。通常情况下，室温干燥需要 5-10 min，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察。直至磁珠表面无反光，即可用 TE Buffer pH8.0 或 Nuclease-Free Water 进行产物洗脱。



- 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应。所以，最终吸取的上清可比用于洗脱的 TE Buffer pH8.0 或 Nuclease-Free Water 的体积少 $\sim 2\ \mu\text{L}$ 。



- 在 2.0 mL 磁力架上开关管盖应避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住 2.0 mL 离心管中下段，然后开盖。



3.10.1. cDNA 纯化

- a. cDNA 回收液如果观察到有白色沉淀析出，可放于 55°C 溶解，恢复至室温后进行纯化。提前取出磁珠，42°C 平衡 **30 min**；
- b. 1.0X 磁珠 cDNA 纯化步骤；
 - 1) 将上一步回收液（1 cm*2 cm 芯片 2 管，每管约 600 μL ；2 cm*2 cm 芯片 3 管，每管约 533 μL ；2 cm*3 cm 芯片 4 管，每管约 500 μL ）与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合，振荡混匀，42°C 孵育 **10 min**；
 - 2) 瞬时离心后，将离心管放在磁力架上静置 **3 min**，至液体澄清；
 - 3) 待液体澄清后，用移液器小心去除上清（如果管盖上有泡沫，吸弃泡沫）；
 - 4) 将离心管保持在磁力架上，加入 1.2 mL 80% 乙醇（使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇），旋转磁力架上的离心管，待磁珠全部吸附到靠磁力架一侧的管壁，再次旋转离心管，让磁珠重新吸附到另一侧来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清；
- 
 移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠（如果管盖上有泡沫，建议用 80% 乙醇清洗干净。
 - 5) 重复一次**步骤 4**）；
 - 6) 将离心管保持在磁力架上，室温风干 **5-15 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
 - 7) 每管加 **44 μL** NF- H_2O 回溶，振荡混匀后 42°C 静置 5 min，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，直至液体变澄清；
 - 8) 将上清（1 cm*2 cm 芯片 2 管上清；2 cm*2 cm 芯片 3 管上清；2 cm*3 cm 芯片 4 管上清）（~42 μL cDNA）转移至新的 0.2 mL PCR 管中。
- c. 如果上述回收样品不足 42 μL ，用 NF- H_2O 补足。

3.10.2. cDNA 扩增

- a. 按照表格 3-12 配制 PCR Mix，共 100 μL ；

表格 3-12 PCR Mix

试剂	1 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*2 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)	2 cm*3 cm 芯片用量 / 每张芯片 (μL)
4X cDNA PCR Mix (1000069884)	55	82.5	110
cDNA Primer (1000047917)	17.6	26.4	35.2
NF-H ₂ O	55	82.5	110
Total	127.6	191.4	255.2

- b. 将上一步回收的 42ul 产物 / 每管上清液中分别加入 **58 μL** PCR Mix，振荡混匀；
c. 瞬时离心，按照表格 3-13 PCR 程序进行扩增；

表格 3-13 PCR 扩增程序 (反应体系 100 μL)

温度	时间	循环数
105°C热盖	on	-
95°C	5 min	1
98°C	20 s	20
58°C	20 s	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
12°C	∞	-

- d. 按照表格 3-14 准备 Qubit dsDNA HS Kit 测定 PCR 产物浓度并记录；

表格 3-14 Qubit dsDNA HS Kit

组分	1X (μL)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	199
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1
Total	200

- e. 配制完成后，振荡混匀，取 199 μL 至新的检测管（Qubit dsDNA HS Assay Kit 配套检测管）；
f. 将 PCR 产物振荡混匀，取 1 μL 加入 199 μL Qubit dsDNA HS Kit 混匀，检测浓度并记录；

 DNA 浓度通常高于 10 ng/ μL 。



g. 对 PCR 产物进行 1.0X 磁珠纯化：

- 1) 将每管 PCR 产物 (100 μ L) 与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合，振荡混匀，42°C 孵育 **10 min**；
- 2) 瞬时离心后，将 PCR 管放在磁力架上静置 **3 min**，待液体澄清后去除上清；
- 3) 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80% 乙醇漂洗（新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇）。通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清；

移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠。

4) 重复一次步骤 3) ；

5) 将离心管保持在磁力架上，打开盖子，室温风干 5-8 min，直至磁珠表面无反光、无开裂；

6) 加 **25 μ L** 的 TE Buffer pH 8.0 回溶，振荡混匀后 42°C 孵育 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将同一 cDNA 上清合并（1 cm*2 cm 芯片 ~50 μ L；2 cm*2 cm 芯片 ~75 μ L；2 cm*3 cm 芯片 ~100 μ L；）转移到新的 1.5 mL 离心管中。

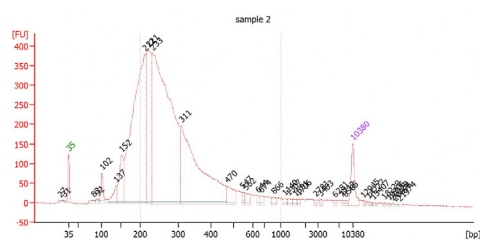
此步骤可停止，样本 -20°C 下可保存 1 个月。

h. 取 1 μ L cDNA 样品，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录；

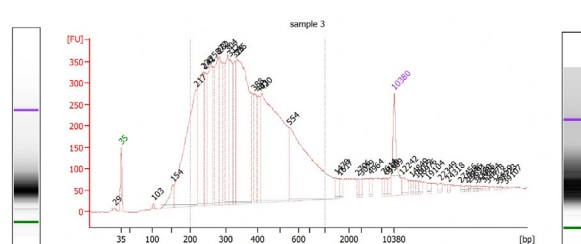
i. 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 cDNA 片段分布进行检测。

cDNA 纯化产物片段分布主峰一般在 150-350 bp（如图一），纯化后产量通常大于 300 ng。

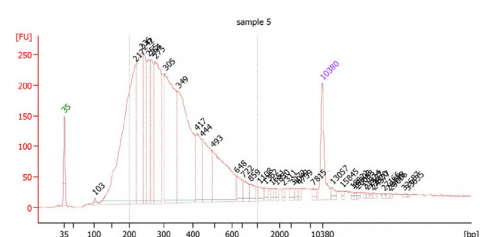
例 1：RNA 的 DV200 < 30% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



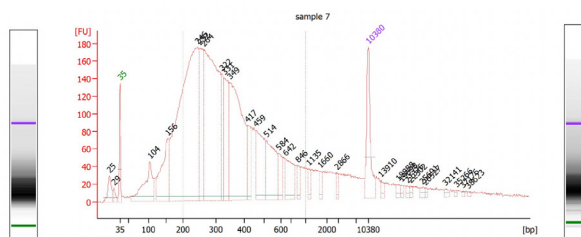
例 2：RNA 的 DV200 在 30%-50% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



例 3：RNA 的 DV200 在 50%-70% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



例 4：RNA 的 DV200 > 70% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



图一 . cDNA 纯化产物片段分布图



cDNA 纯化产物可在 -20°C 下保存 1 个月。

◎ 后续文库构建具体操作参考《时空转录 FFPE V1.1 建库实验操作说明书》。



《时空转录组 FFPE V1.1 大尺寸芯片 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 转录组实验操作说明书》只能搭配《时空转录组 FFPE V1.1 建库实验操作说明书》。