时空组学
STOmics

时空转录组 FFPE V1.1（适配转片）转录组实验操作说明书



货号：940-005156-00、930-002024-00
试剂盒版本号：V1.0
文档编号：STOG02016
说明书版本号：A

版本历史

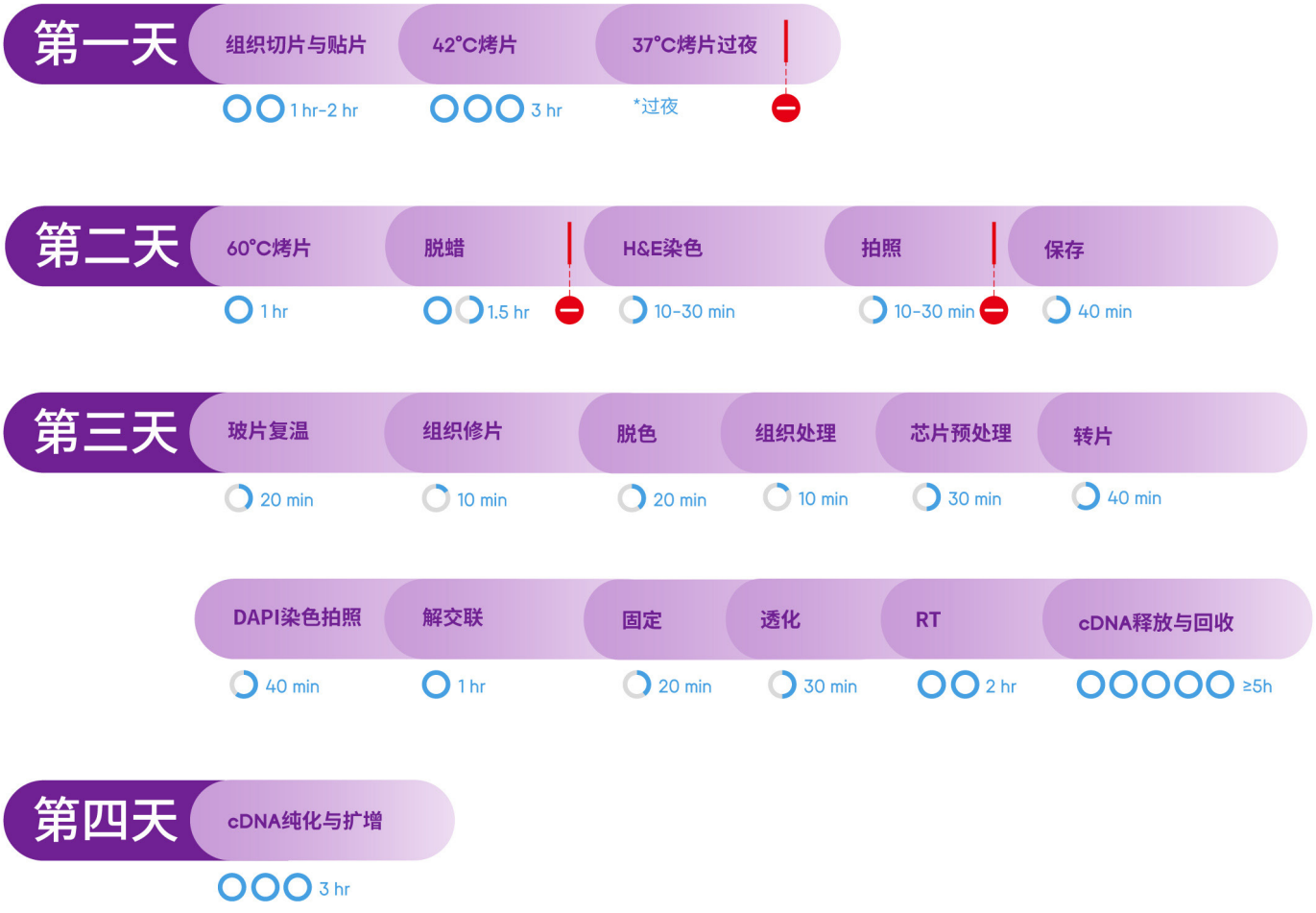
说明书版本：	A
试剂盒版本：	V 1.0
修订日期：	2026 年 10 月
描述：	首次发布

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


第一天
组织切片与贴片
1 hr-2 hr
42°C烤片
3 hr
37°C烤片过夜
*过夜
第二天
60°C烤片
1 hr
脱蜡
1.5 hr
H&E染色
10-30 min
拍照
10-30 min
保存
40 min
第三天
玻片复温
20 min
组织修片
10 min
脱色
20 min
组织处理
10 min
芯片预处理
30 min
转片
40 min
DAPI染色拍照
40 min
解交联
1 hr
固定
20 min
透化
30 min
RT
2 hr
cDNA释放与回收
≥5h
第四天
cDNA纯化与扩增
3 hr

总耗时: ~ 4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 5
1.5. Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 介绍 5
1.6. StereoLink 配件套装 - FFPE 转片介绍 6
1.7. StereoLink 转片工装套装介绍 6
1.8. 注意事项 7

第二章 样本制备和实验准备 8

第三章 时空转录组 FFPE V1.1（适配转片）转录组实验标准操作流程
3.1. 实验前准备 11
3.2. 脱蜡 14
3.3. H&E 染色与成像 16
3.3.1 H&E 染色 16
3.3.2 H&E 拍照 18
3.4. 组织玻片保存 19
3.5. 组织修片 21
3.6. 组织脱色及预处理 22
3.7. 芯片预处理 24
3.8. 转片 25
3.9. DAPI 染色 28
3.10. DAPI 拍照 29
3.11. 解交联 30
3.12. 固定 31
3.13. 组织透化 32
3.14. FFPE MIX 反应 33
3.15. cDNA 释放与回收 34
3.16. cDNA 纯化与扩增 35
3.16.1 cDNA 纯化 38
3.16.2 cDNA 扩增 39



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 **StereoLink FFPE 转片试剂套装 V1.0**。

StereoLink FFPE 转片试剂套装是用于将贴在普通病理玻片的 FFPE（福尔马林固定石蜡包埋）样本组织切片转移至 StereoLink chip N Slide（1cm*1cm）-Dual 载体的试剂套装。本试剂套装采用的组织切片转移技术，可将 H&E 染色后的目标组织区域完整转移至芯片 N 载体，结合 Stereo-seq FFPE 转录组试剂盒 V1.1 获得同切片的 H&E 染色、DAPI 染色和单细胞分辨率全转录组空间表达图谱的构建。

本试剂套装（货号：940-005156-00）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

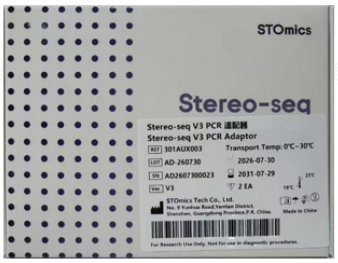
每个试剂套装由以下四个部分组成：

- StereoLink FFPE 转片试剂盒 *1（4 RXN/Kit）
- Stereo-seq 转录组试剂盒 N *1（4 RXN/Kit）
- Stereo-seq 芯片 N 载体（1 cm*1 cm）- Dual（4 EA/Kit）
- StereoLink 配件套装 -FFPE 转片 （10 PCS/Kit）



辅助性耗材：

- （需单独订购）Stereo-seq V3 PCR 适配器 *1（2 EA）





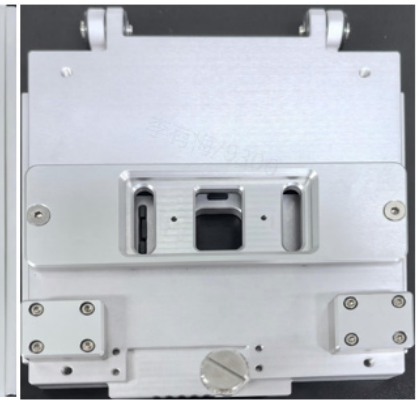
- （需单独订购）Stereo-seq V3 载具拆卸工具 *1（1 EA）





- （需单独订购）StereoLink 转片工装套装（1 EA）





*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 至表格 1-7。

收到 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 后，请参照《Stereo-seq 芯片载体保存操作指南》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科研合作代表，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 StereoLink FFPE 转片试剂盒试剂组分信息

StereoLink FFPE 转片试剂盒		货号：940-005158-00		
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量	
Enhance Reagent I	1000069669	黄色	18 μL	× 1
Enhance Reagent II	1000069880	黄色	1743 μL	× 1
Transfer Reagent	1000069881	白色	198 μL	× 1
Separate Reagent	1000067381	白色	880 μL	× 1
Coating Buffer I Pro	1000070001	绿色	220 μL	× 1
Coating Buffer II Pro	1000069882	绿色	27 μL	× 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 1-2 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：201KN11114		
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°C ~ – 15°C		运输温度：– 25°C ~ – 15°C	有效期：见标签	

表格 1-3 Stereo-seq 芯片 N 载体（1cm*1cm）- Dual 信息

Stereo-seq 芯片 N 载体（1 cm * 1 cm）- Dual 货号：930-002023-00		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 N 载体（1cm*1cm）- Dual	-	4 EA
储存温度：– 25°C ~ – 15°C	运输温度： – 25°C ~ – 15°C	有效期：见标签

表格 1-4 StereoLink 配件套装 - FFPE 转片信息

StereoLink 配件套装 - FFPE 转片 货号：310AK012		
组分信息	货号	规格
Stereo-seqV3 载具上盖	1000066738	2 EA
Stereo-seqV3 载具底座	1000066739	2 EA
Stereo-seqV3 载具垫圈	1000066760	6 EA
压敏膜	-	12 EA
修片贴纸	-	10 EA
回形软垫	-	6 EA
储存温度：18°C ~ 25°C	运输温度： 0°C ~30°C	有效期：见标签

表格 1-5 Stereo-seq V3 PCR 适配器

Stereo-seq V3 PCR 适配器 (需单独订购) 货号：301AUX003		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq V3 PCR 适配器	-	2 EA
储存温度：18°C ~ 25°C	运输温度： 0°C ~30°C	有效期：见标签

表格 1-6 Stereo-seq V3 载具拆卸工具

Stereo-seq V3 载具拆卸工具 货号：303TA30011		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq V3 载具拆卸工具	-	1 EA
储存温度：18°C ~ 25°C	运输温度： 0°C ~30°C	有效期：见标签

表格 1-7 StereoLink 转片工装套装

StereoLink 转片工装套装	货号：930-002024-00
组分信息	规格
工装主体	1 EA
手拧螺丝	1 EA
辅助玻片	1 EA
测试芯片	1 EA
储存温度：18°C ~25°C	运输温度：0°C ~30°C

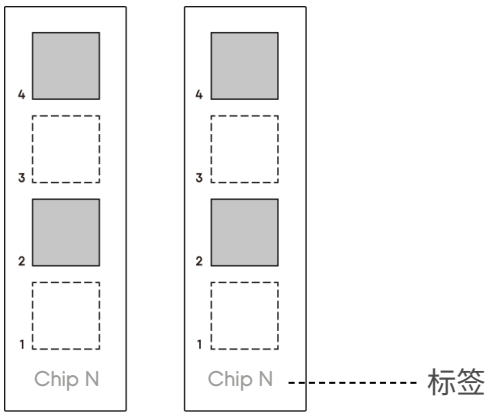
1.4. 需自备物料清单

本实验所需的第三方设备和物料参考《时空转录组 FFPE V1.1（适配转片）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 芯片 N 载体 - Dual 介绍

芯片盒中包含 2 个载体，每个载体上均贴有 2 张 Stereo-seq 芯片 N（1 cm*1 cm）。



StereoLink 芯片 N 载体（1 cm*1 cm）- Dual 保存方法

StereoLink 芯片 N 载体（1 cm*1 cm）- Dual 装于真空密封的铝袋中，冷链运输。收到产品后须立即将未开封的 StereoLink 芯片 N 载体（1 cm*1 cm）- Dual 储存在 -25°C ~-15°C。若拆袋后未使用，需重新干燥密封并储存在 -25°C ~-15°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。

1.6. StereoLink 配件套装 - FFPE 转片介绍

StereoLink 配件套装 - FFPE 转片中包含 Stereo-seq V3 载具上盖、Stereo-seq V3 载具底座、可装卸的 Stereo-seq V3 载具垫圈、压敏膜、修片贴纸以及回字形软垫。

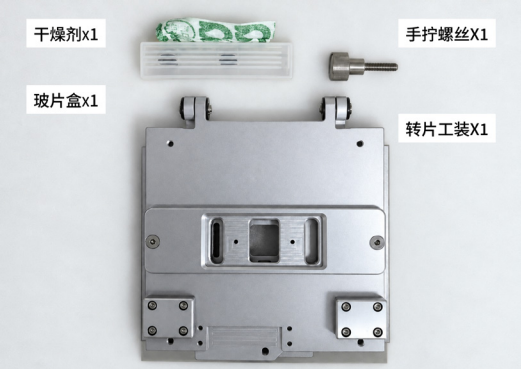
夹具使用前需要进行组装，可参考 V3 载具使用说明书《Stereo-seq V3 载具使用说明书》。

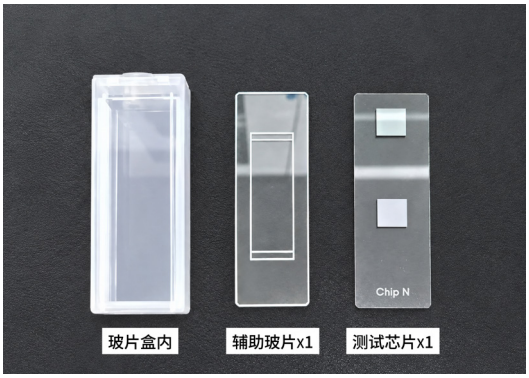
https://www.stomics.tech/resources/sop/

组织切片转片前需裁剪为 0.9 cm * 0.9 cm，修片贴纸使用方式详见《转片工装用户指引》，组织切片裁剪方法详见 3.5 章节。

1.7. StereoLink 转片工装套装介绍

StereoLink 转片工装中包含 1 个工装，1 个手拧螺丝，1 个辅助玻片和 1 个测试芯片。用于将 H&E 染色后的组织切片完整转移至芯片 N 载体，StereoLink 转片工装的具体安装使用方法见《转片工装用户指引》。





1.8. 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
样本制备和实验准备



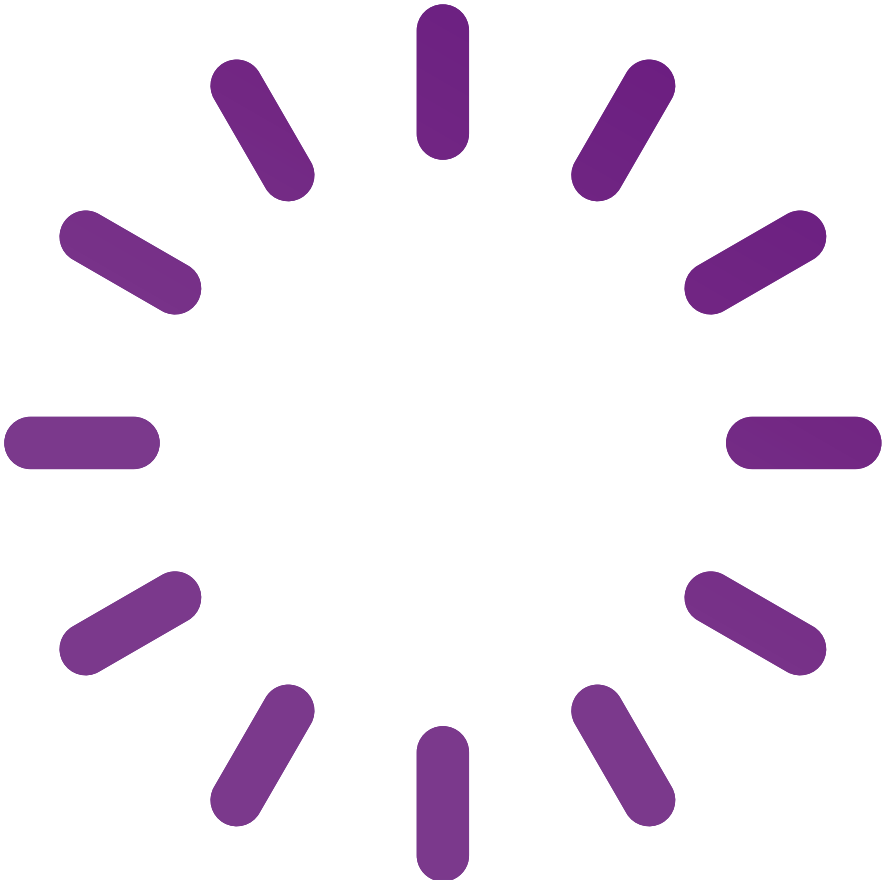
请参照《时空实验 FFPE （适配转片）样本准备操作指南》进行样本准备。

该说明书明确了 FFPE 组织质检方法及组织制备操作流程。

QC 建议针对 DV200 ≥ 30% 的组织进行后续实验流程。

第三章

时空转录组 FFPE V1.1 （适配转片）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-H_2O）。

第一天

准备试剂	用途	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_2O）	室温 1 天

第二天

准备试剂	用途	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_2O）	室温 1 天
50 mL 90% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 90%（使用 ddH_2O）	室温 1 天
50 mL 80% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 80%（使用 ddH_2O）	室温 1 天
50 mL 70% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 70%（使用 ddH_2O）	室温 1 天
50 mL 50% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 50%（使用 ddH_2O）	室温 1 天
50 mL 30% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 30%（使用 ddH_2O）	室温 1 天
苏木素染色液	H&E 染色	上下颠倒混匀后过滤	室温 1 周
Mounting Medium	H&E 染色	提前从 -20°C取出待其融化后建议保存于室温	室温

第三天

准备试剂	用途	准备流程	暂存条件
1M 醋酸	脱色	将冰醋酸稀释到 1M，按照至少 20 mL/ 玻片盒	室温 1 天，封口保存
Enhance Reagent I	组织预处理	使用前从 -20°C取出，室温化冻，立即使用	/
Enhance Reagent II	组织预处理	提前从 -20°C取出，室温化冻，室温放置	室温 1 天
Transfer Reagent	转片	提前从 -20°C取出，42°C化冻、放置备用	42°C 1 天
Separate Reagent	转片	提前从 -20°C取出，室温化冻，室温放置	室温 1 天
Coating Buffer I Pro	芯片预处理	提前从 -20°C取出置于冰上融化，冰上备用，若有结晶，涡旋振荡至结晶消失	4°C 1 天
Coating Buffer II Pro	芯片预处理	提前从 -20°C取出，放于冰上	冰上 2 hr
DAPI 染色液	DAPI 染色	将 1 μL DAPI 染液 加入 499 μL 5X SSC 并混匀	现配现用，室温放置不超 1 hr
5X SSC	DAPI 染色	将 250 μL 20X SSC 加入到 750 μL NF-H_2O 中并混匀	室温 1 周
1X SSC	DAPI 染色	将 100 μL 20X SSC 加入到 1900 μL NF-H_2O 中并混匀	室温 1 周
10X 透化试剂储存液	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°C长期保存	冰上 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 30μL 稀释到 300 μL。按照至少 300 μL/ 芯片	冰上备用，不超过 6 hr
0.1X SSC	透化	将 10 μL 20X SSC 加入到 1990 μL NF-H_2O 中并混匀	室温 1 周
5×SSC（5% RI）	透化后清洗	将 82.5μL 20×SSC、16.5μL RI、加入到 231μL NF H_2O 中，混匀，置于冰上	冰上 2 hr
Decrosslinking Reagent	解交联	提前取出，室温备用	室温
RT Buffer Mix	RT	提前从 -20°C取出，在冰上融化，置于冰上，若发现有絮状沉淀，室温放置 5min，振荡混匀，离心备用	使用期间置于冰上
RT plus	RT	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
RT Oligo	RT	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
Elute Buffer	cDNA 释放	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

第四天

准备试剂	用途	准备流程	暂存条件
磁珠	cDNA 纯化	提前取出，42°C 预热 30 min	4°C
30 mL 80% 乙醇	cDNA 纯化	无水乙醇稀释到 80%（使用 NF-H_2O）	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，pH8.0	cDNA 纯化	提前准备，室温备用	室温

准备仪器	准备流程	备注
PCR 仪	1. 90°C用于解交联（热盖 85°C） 2. 37°C用于烤片和透化步骤（热盖 42°C） 3. 60°C用于烤片（热盖 65°C） 4. 42°C用于烤片和 FFPE MIX 反应步骤（热盖 45°C） 5. 55°C用于 cDNA 释放（热盖 60°C） 6. 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
恒温干燥箱	1. 42°C用于预热 Transfer Reagent 2. 55°C用于脱色 3. 70°C用于转片	检查仪器是否有异常，必要时更换
荧光显微镜	透射明场（H&E 染色）、DAPI 通道（荧光染色）	检查显微镜是否有异常，必要时更换

3.2. 脱蜡

若组织玻片有油性记号笔标记，请在脱蜡前用 100% 乙醇擦拭干净。



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），并设置烤片温度 60°C；

b. 取出已经完成贴片的组织玻片，置于 60°C烤片机，烤 1 hr （斜烤平烤均可）；

c. 在通风橱中用染色缸准备以下试剂，每个染色缸至少 **50 mL** 试剂，以充分没过组织玻片；

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_2O	1

每次脱蜡前均需更换脱蜡剂及梯度乙醇。

d. 完成烤片后，将组织玻片放置到 Histo-clear ①中，室温 **20 min**；然后取出放到 Histo-clear ②中，室温 **20 min**；

e. 取出组织玻片，用无尘纸吸掉多余的 Histo-clear；

f. 将组织玻片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. ddH_2O 中 **1 min**

g. 取出组织玻片，用无尘纸吸掉芯片四周的多余水分，保持组织表面湿润，注意请勿触碰组织表面；

h. 准备进行 H&E 染色。

与直接贴片不同，完成脱蜡后，将组织玻片垂直或倾斜放置于桌面，可室温放置 2h。

3.3. H&E 染色与成像

3.3.1. H&E 染色

试剂	准备方法（1 张组织玻片用量）	用途
□苏木素染色液	上下颠倒混匀后过滤，根据组织切片大小确定用量	H&E 染色
□Mounting Medium (1000064223)	提前从 -20°C取出平衡至室温	H&E 染色

可根据实验需求选择滴加或浸润 H&E 染色液，下述流程中染色液滴加体积适用面积小于 1cm*1cm 的样本，请根据实际样本面积增加用量。

备注：若同时对两张组织切片进行染色，需确保孵育后**立即弃去苏木素染液**，避免染色过度。

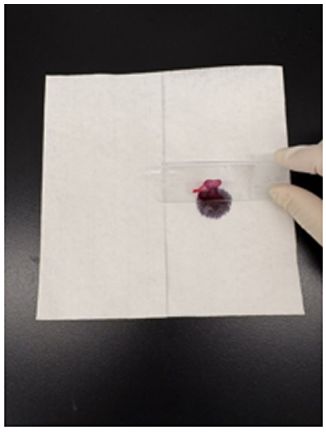
a. 将适量 100% 乙醇置于培养皿中，乙醇需没过盖玻片，清洗盖玻片后，用镊子小心取出盖玻片吹干备用；

b. 若染色前组织处于干燥状态，需要湿润组织，并擦去组织周围的多余液体，再进行染色；

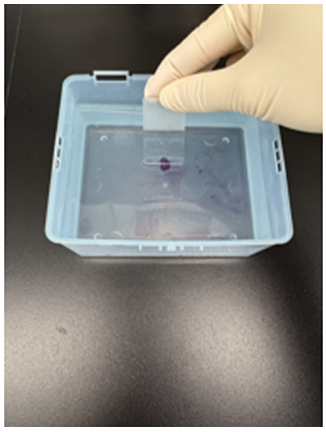
c. 每片组织玻片上滴加 200μL 苏木素染液，均匀覆盖组织切片，室温染色 1min，如下图 1：



① 滴加苏木素染液至完全覆盖组织，静置染色



②斜置玻片于吸水纸上，沥去苏木素染液



③ 组织玻片置于 ddH_2O 中，上下涮洗数次

图 1 苏木素染色示意图

d. 倾斜组织玻片倒掉苏木素，将组织玻片竖直放入装有 ddH_2O 的烧杯①中上下涮洗 20 次，直到玻片上没有残留苏木素；

e. 用无尘纸轻轻擦去组织玻片背面及组织周围多余液体，切勿触碰组织切片，将组织玻片放置在平整、洁净、非吸水性的实验台面上，组织表面保留少量液体；

f. 每张组织玻片上滴加 **200 μL** 分化试剂，均匀覆盖所有组织切片，室温孵育 **20 s**；

g. 倾斜组织玻片倒掉分化试剂，将组织玻片竖直放入装有 ddH_2O 的烧杯②中上下涮洗 10 次，直到玻片上没有残留分化试剂；

h. 用无尘纸轻轻擦去组织玻片背面及组织周围多余液体，切勿触碰组织切片，将组织玻片放置在平整、洁净、非吸水性的实验台面上，组织表面保留少量液体；

i. 每张组织玻片上滴加 **200μL 1×PBS**，均匀覆盖所有组织切片，室温孵育 **1 min**；

j. 倾斜组织玻片倒掉 1×PBS，将组织玻片竖直放入装有 ddH_2O 的烧杯②中上下涮洗 10 次，直到玻片上没有残留 1×PBS；

k. 用无尘纸轻轻擦去组织玻片背面及组织周围多余液体，切勿触碰组织切片，将组织玻片放置在平整、洁净、非吸水性的实验台面上，组织表面保留少量液体；

l. 每张组织玻片上滴加 **200 μL** 伊红染液，均匀覆盖所有组织切片，室温孵育 **30 s**；

m. 倾斜组织玻片倒掉伊红染液，将组织玻片竖直放入装有 ddH_2O 的烧杯③中上下涮洗 20 次，直到玻片上没有残留伊红染液；

n. 用无尘纸轻轻擦去组织玻片背面及组织周围多余液体，切勿触碰组织切片，将组织玻片倾斜放置，如下图 2，室温晾干，禁止使用空气罐吹干；

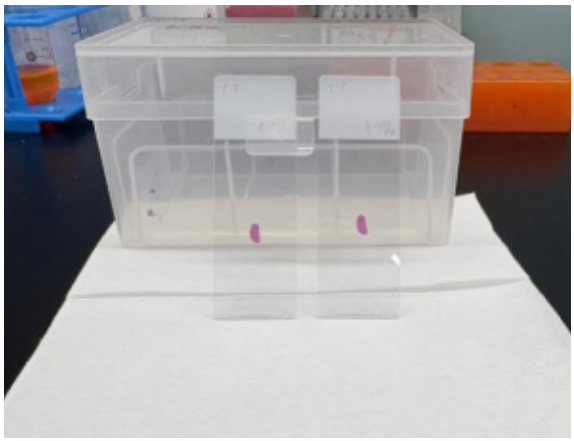


图 2 组织玻片 H&E 染色后倾斜晾干

完成 H&E 染色后，将组织玻片垂直或倾斜放置于桌面晾干后封片拍照，未封片状态最多可放置 2h，封片后需马上拍照。

o. 根据盖玻片大小，滴加 **3-10 μL** FFPE Mounting Medium 到组织中间，用清洗晾干后的盖玻片封片（注意不要带入气泡），立即拍照，防止伊红晕出。

3.3.2. H&E 拍照

a. 使用荧光显微镜，选择透射明场（彩色）模式，选择 BF-T 通道，将彩色 / 黑白推拉杆推入机器，将光源散射片推入；

b. 在载物台上滴加 **1-2 μL** 水，小心地将玻片放在载物台上；

c. 在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，可以以样本信息命名，也可适当注明其他相关信息；

d. 将组织调至镜头正下方，调节合适的灯光、增益和曝光，通过调节粗准焦螺旋和微调细准焦螺旋进行对焦，框选芯片所在区域，在 **4×** 物镜下扫描地图；

e. 扫描地图完成后，将物镜调至 **10×**，调节灯光、增益和曝光等参数，可看清组织形态；

f. 白平衡：将视野移动到空白区域，点击自动白平衡按钮进行白平衡，如果没有完整的区域，可以点击“自定义”手动圈选一块白色背景区域；

g. 背景平衡：用鼠标滚轮调整 Z 轴至 **200 μm** 左右，用机械旋钮对焦后，找到一块无组织覆盖、无明显杂质的玻片视野，用鼠标滚轮上调焦距使 Z 轴至 **230-250 μm** 进行虚焦，若上一步选择区域由细小杂质，虚焦后杂质基本看不清楚，最后点击“背景平衡”；

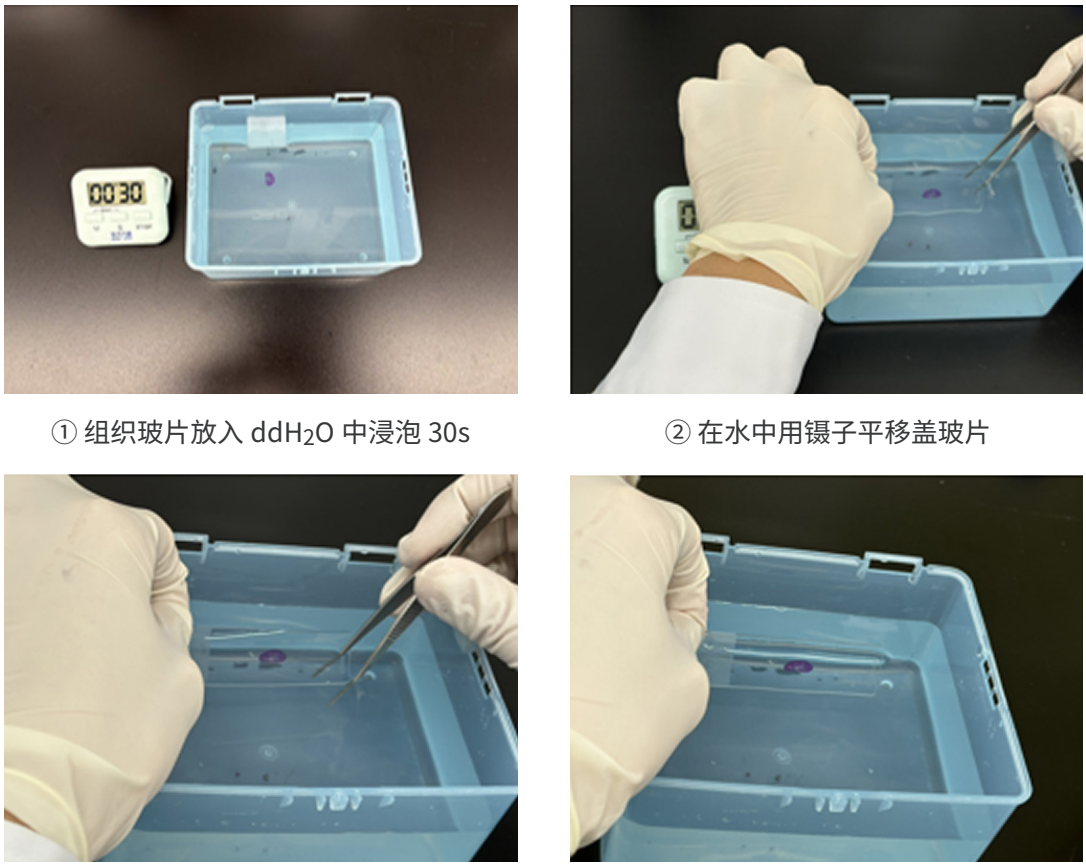
h. 点击回组织区域内，选择手动扫描 - 手动建模，框选所需组织区域，移动并使用鼠标滚轮进行对焦，并选择 **4-6** 个建模点（尽量分散在组织各个方向，如果组织不平整起伏较大，可以酌情增加建模点），完成以后点击扫描切片，保存图像。

3.4. 组织玻片保存

a. 提前开启金属浴（或烤片机等），设置烤片温度 37°C；

b. 拍照后，将盖有盖玻片的组织玻片竖直浸于装有干净 ddH_2O 的烧杯，完全浸没盖玻片，浸泡 30 s；

c. 组织玻片水平置于 ddH_2O 中，用镊子轻轻地平行沿一个方向移动盖玻片，直到组织玻片与盖玻片完全分离，如图 3：



① 组织玻片放入 ddH_2O 中浸泡 30s　② 在水中用镊子平移盖玻片

③ 盖玻片完全离开组织后，移除盖玻片　④ 上下涮洗组织玻片直至无封片剂残留

图 3 移除盖玻片示意图

d. 将组织玻片水平放入装有 ddH_2O 的烧杯中上下涮洗 20 次，确保彻底除去 FFPE Mounting Medium；

e. 用无尘纸擦拭组织周围及玻片背面，倾斜晾干组织；

f. 将组织玻片平放在预热的金属浴上，37°C烤片 **30 min**，确保组织完全干燥；

g. 将烤干的组织玻片放到玻片盒中，用封口膜密封后放入密封袋中，并加入干燥剂，4°C保存，最长不超过两周，如下图 4：



① 37°C 烤片结束后将组织玻片放入玻片盒并封口



② 将玻片盒放入装有干燥剂的空封袋中，4°C 保存最长不超过 2 周

图 4 组织玻片保存示意图

3.5. 组织修片

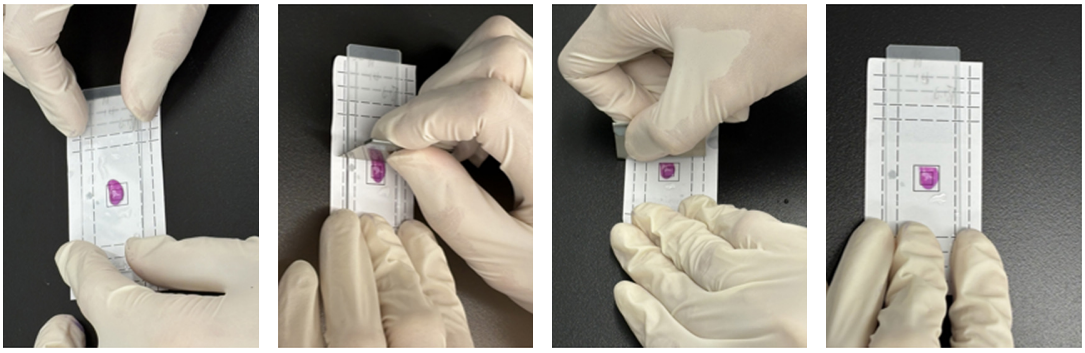
a. 提前开启金属浴（或烤片机等），设置烤片温度 37°C；

b. 从 4°C冰箱取出玻片盒，室温放置 1 min，待组织玻片表面无水汽后，将组织玻片平放在预热的金属浴上，37°C烤片 **20 min**；

c. 将复温后的组织玻片竖直放入装有 ddH_2O 的烧杯中上下涮洗 2 次润湿组织，用无尘纸擦拭组织玻片背面及组织周围液体，确保组织湿润；

该步骤需保存组织湿润，若组织风干需使用 ddH_2O 重新润湿组织，修片时刀片垂直立于修剪框线上，向下用力压断组织，防止组织拉扯、形变。

d. 将润湿的组织玻片放置在组织修片贴纸，调整玻片位置，玻片边缘与修片纸虚线保持平行，使目标区域处于 0.9 cm × 0.9 cm 裁剪框中央，用刀片沿裁剪框边缘将多余组织由内至外刮离玻片，如下图 5：



① 调整玻片，使目标区域至裁剪框中央　② 刀片沿裁剪框边缘将组织压断　③ 将多余组织由内至外刮离玻片　④ 得到裁剪好的目标区域

图 5 组织裁剪示意图

e. 若组织玻片有多余组织残留，将组织玻片放入装有 ddH_2O 的烧杯中轻柔涮洗组织，直至无组织残留，进入组织处理及转片流程，如下图 6：

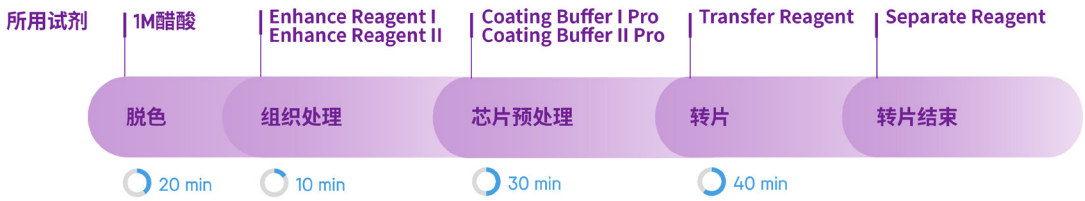


图 6 组织处理及转片流程图

3.6. 组织脱色及预处理

试剂	准备方法	用途
☐1M 醋酸	将冰醋酸稀释到 1M，按照至少 20 mL/ 玻片盒	脱色
☐Enhance Reagent I（1000069669）	使用前从 -20°C取出，室温化冻、立即使用	组织预处理
☐Enhance Reagent II（1000069880）	提前从 -20°C取出，室温化冻，室温放置	组织预处理

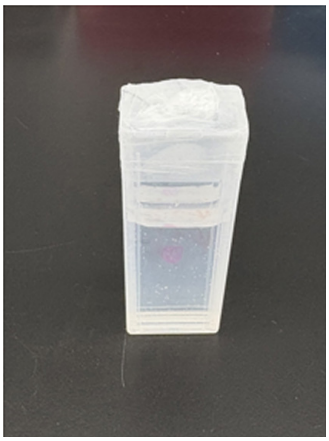
a. 将 Enhance Reagent II 从 -20°C取出，室温化冻、放置备用；

b. 配置 1M 醋酸；

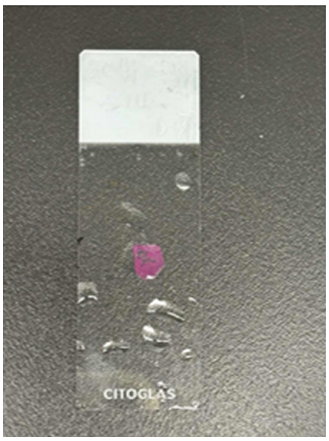
c. 取一洁净玻片盒，加入 **20 mL** 1 M 醋酸溶液，将裁剪后的组织玻片置于玻片盒，确保组织完全浸没于液体，用封口膜密封玻片盒，置于 55°C烘箱孵育 **20 min**；



① 组织切片完成修片，准备脱色



② 组织玻片放入装有 1M 醋酸的玻片盒中并封口



③ 脱色后，苏木素着色减少，组织切片为粉色

图 7 组织脱色示意图

d. 组织脱色结束前，取出 Enhance Reagent I 在室温化冻后，按照表格 3-1 配制 Enhance Mix 并震荡混匀，瞬时离心；

表格 3-1 组织预处理反应液配制

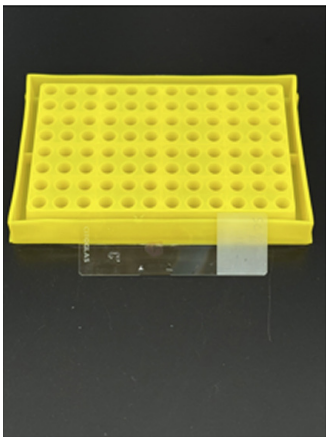
组分	1X + (10%) µL	2X + (10%) µL	3X + (10%) µL	4X + (10%) µL
Enhance Reagent I (1000069669)	2.2	4.4	6.6	8.8
Enhance Reagent II (1000069880)	217.8	435.6	653.4	871.2
Total	220	440	660	880

e. 取出组织玻片，放入装有 ddH_2O 的烧杯中轻轻上下漂洗 5 次，用无尘纸擦拭干净组织周围的液体，严禁触碰组织表面；

f. 将组织玻片放置在平整、洁净、非吸水性的实验台面上，从组织边缘缓慢加入 **200 µL** 室温平衡的预处理反应液，使其完全覆盖组织，室温孵育 **10 min**，组织预处理后组织应呈淡粉色，如下图 8：



① Enhance Mix 室温孵育 10min



② 倒掉 Enhance Mix，倾斜组织玻片直至晾干



③ 晾干后，伊红着色减少，组织切片为淡粉色

图 8 组织预处理示意图

g. 倾斜组织玻片，使底端边缘接触无纤维擦拭纸以吸弃液体，倾斜放置组织玻片，室温晾干。

请勿使用气瓶吹干组织，以免组织破损。

3.7. 芯片预处理

试剂	准备方法	用途
☐ Coating Buffer I Pro (1000070001)	提前从 -20°C取出置于冰上融化，冰上备用，若有结晶，涡旋振荡至结晶消失	芯片预处理
☐ Coating Buffer II Pro (1000069882)	提前从 -20°C取出，放于冰上	芯片预处理
☐ Transfer Reagent	提前从 -20°C取出，42°C化冻，放置备用	转片
☐ Separate Reagent	提前从 -20°C取出，室温化冻，室温放置备用	转片

a. 将 Transfer Reagent 提前从 -20°C取出，42°C化冻，放置备用；

b. 将 Separate Reagent 提前从 -20°C取出，室温化冻，放置备用；

c. 将 Coating Buffer I Pro、Coating Buffer II Pro 提前从 -20°C取出，冰上放置，备用；

d. 按照表格 3-2 配制芯片预处理反应液，震荡混匀并置于冰上备用；

表格 3-2 芯片处理液配制

组分	1X + (10%) μL	2X + (10%) μL	3X + (10%) μL	4X + (10%) μL
Coating Buffer I Pro (1000070001)	55	110	165	220
Coating Buffer II Pro (1000069882)	6.6	13.2	19.8	26.4
1×PBS	158.4	316.8	475.2	633.6
Total	220	440	660	880

e. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 从真空密封的铝袋中取出，记录贴片背面的 SN（Chip ID）号，注意不要触摸芯片的表面；

f. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 -Dual 平放在实验台 **1 min** ，平衡到室温；

g. 按照 V3 载具使用说明书 **《Stereo-seq V3 载具使用说明书》** 将垫圈与夹具组合成载具；全程注意请勿触碰芯片表面，以免损伤芯片，吸取 **300μL 1×PBS**，从芯片上下两侧加到反应槽内，润洗芯片，吸弃液体；

h. 吸取 **200 μL** 芯片处理液，从芯片上下两侧加入到反应槽内，室温孵育 **30 min**；

i. 等待过程中，请参照 **《转片工装用户指引》** 对工装软垫进行安装与更换；

j. 清洗芯片：吸弃芯片处理液，使用工具拆卸载具，从芯片四角加 200μL NF-H_2O 到芯片上，清洗芯片，重复 3 次，使用气体吹干芯片表面备用；

k. 若芯片表面有水波纹，从芯片四角加 200μL NF-H_2O 到芯片上，清洗芯片，使用气体吹干芯片表面至无水波纹。

3.8. 转片

a. 按住黑色旋钮（图 9 红色区域），将处理好的组织玻片以组织切片朝上放至回字软垫上，悬空移动玻片，确保组织处于软垫范围内，如图 9 所示：

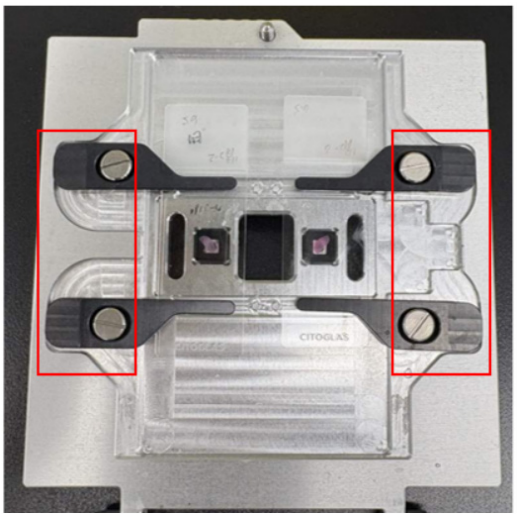


图 9 放置组织玻片示意图

注意：调整玻片位置时需注意悬空，不要触碰软垫导致其变形，否则可能导致转片失败。

b. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 安装到工装底端，检查卡槽是否对位并卡紧，如图 10 所示：

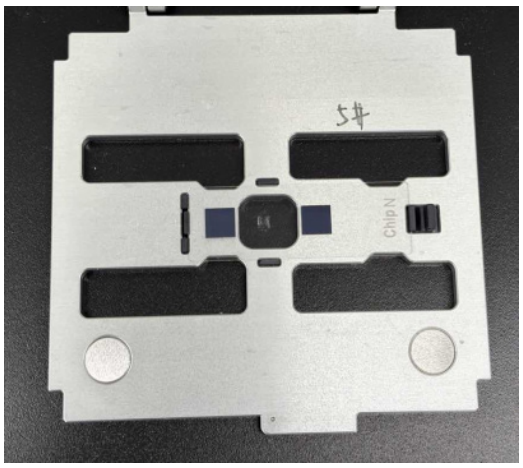


图 10 放置芯片载体示意图

芯片载体对位异常会导致转片失败。

c. 取出预热的 Transfer Reagent，用移液枪吸取 45 µL 悬空滴加到芯片中央，如图 11 左侧芯片，合上工装，逆时针旋转旋钮，直至将旋钮完全旋出：

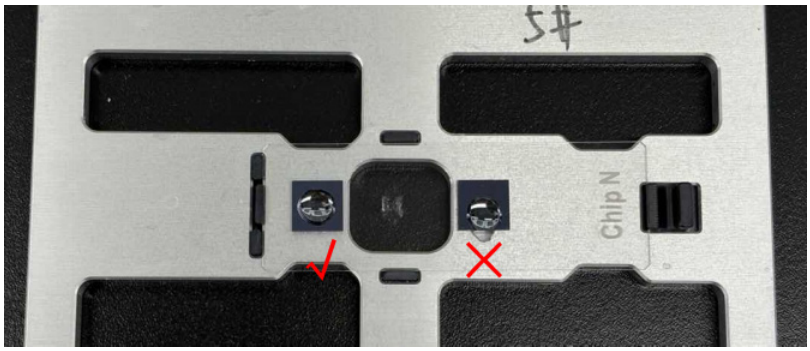


图 11 Transfer Reagent 滴加示意图

⚠ 请勿将 Transfer Reagent 滴加在芯片外，如图 11 右侧芯片。

d. 室温静置 10 min，如图 12，随后将工装转移至 70°C烘箱中，静置孵育 30 min，转移过程中尽量将工装平放，避免发生剧烈碰撞：

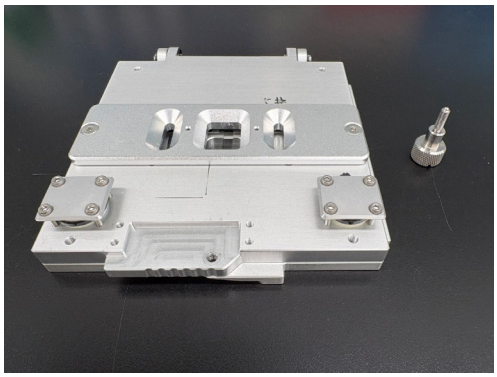


图 12 工装合盖后静置示意图

⚠ 注意：转移工装时注意不要通过观察窗口误触玻片，可能会因玻片位移导致转片失败。

e. 戴好防烫手套取出工装，平放在桌面上，用移液枪吸取 200 µL Separate Reagent，通过工装观察窗口在两个玻片间隙处分别向两边加入分离试剂，静置 2 min，如图 13：

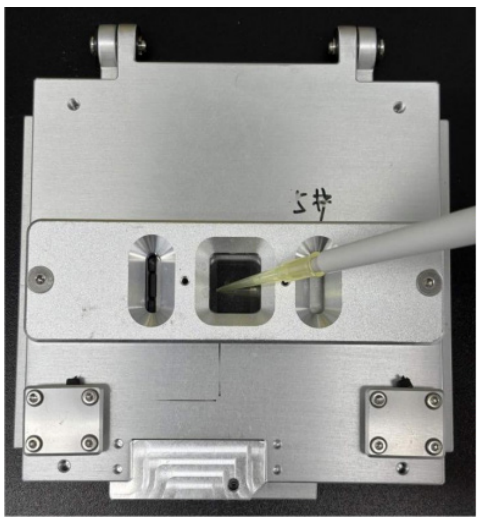


图 13 Separate Reagent 加液示意图

f. 将旋钮安装至工装上，匀速顺时针旋转，通过观察窗口观察液体是否随旋转逐渐位移，芯片是否自动与玻片分离，若旋钮已转至底部芯片和玻片仍未自动分离，请静置 1-2 min 待其分离，避免转速过快导致芯片和玻片被外力分开，可能导致组织破损、转片失败；

g. 分开工装并取下 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual，用无尘纸轻轻吸除芯片周边多余液体，严禁触碰芯片表面；

h. 肉眼初步判断转片结果：组织完整转移至 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual，无明显翻折和破损现象，且组织玻片无组织残留，如下图 14&15，初步表明转片成功，进行 DAPI 染色：



图 14 组织完整转移至芯片示意图

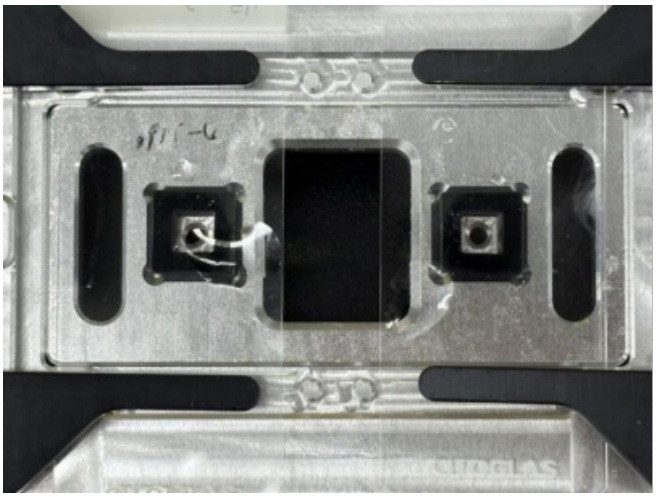


图 15 组织玻片无组织残留示意图

3.9. DAPI 染色

试剂	准备方法（1 张芯片用量）	用途
☐ 1X SSC	将 40 µL 20X SSC 加入到 760 µL NF H_2O 中并混匀	清洗芯片
☐ 5X SSC	将 100 µL 20X SSC 加入到 300 µL NF H_2O 中并混匀	稀释

a. 按照表格 3-3，配置 DAPI 染色液，**全程注意避光**；

表格 3-3 DAPI 染色试剂配制

试剂	1X (µL)	2X (µL)	3X (µL)	4X (µL)
☐ 5X SSC	199.6	399.2	598.8	798.4
☐ DAPI 染液	0.4	0.8	1.2	1.6
Total	200	400	600	800

b. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 平放在桌面，从芯片四角滴染 DAPI 染色液 **100 µL** 到每张芯片上（1 cm ×1 cm 芯片）进行润洗，将芯片倾斜置于无尘纸上，弃去染液，并用无尘纸轻轻拭去芯片周边残留液体；

c. 再次从芯片四角滴加 **100 µL** DAPI 染液，确保染色液均匀覆盖全芯片，避光染色 **2 min**；

d. 手持载体倾倒弃掉 DAPI 染色液到无尘纸上；

e. 滴加 **200 µL 1X SSC** 到芯片上，清洗芯片，手持载体倾倒弃掉 1X SSC,

f. 重复**步骤 e**；

g. 使用气瓶小心吹干芯片；

h. 为避免荧光淬灭，染色完成后请尽快拍照。

3.10. DAPI 拍照

本部分以长光显微镜为例，进行拍照操作的描述。另外，也兼容其它品牌的多通道荧光显微镜，其它显微镜操作可能不同，但需要保证 DAPI 通道的 Track 线清晰和各个荧光通道所获得的图像之间无串色。

拍照时，需要使用具有拼接功能的荧光显微镜，推荐荧光配置：

- 光源波长范围：380-680 nm
- 黑白相机（≥ 8 bit）
- DAPI filter cube（参考 : Excitation 375-404 nm, Emission 417-477 nm）

操作流程

a. 准备工作，按照电控柜上电 - 显微镜上电 - 电脑开机 - 打开软件 - 工件台回零的顺序进行拍照前的准备工作，创建切片，可设置存图路径，选择要使用的相机（荧光 - 黑白，HE- 彩色）在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，以芯片号命名；

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。

b. 调整光路拉杆，选取 10 倍物镜，将芯片放到物镜下，切换 DAPI 通道，打开落射光源 , 调整光强，调整曝光和增益；

c. 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（~2 μL/ 滴），将载体芯片置于水滴上以起到固定作用；

d. 确定组织位置：选择 4X 物镜，将视野移动至芯片上的组织区域，通过手轮粗调寻找焦面，通过 Z 轴细调确定焦面调节焦距，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，对焦时可以适当增加增益，以防荧光淬灭，非拍摄对焦时间尽量关闭荧光。

e. 扫描地图：要求芯片完全在框选区域内且框选区域略微大于芯片，在 4X 物镜下扫描地图，以便确定正式扫描区域，设置好扫描区域，点击开始粗扫，如果显微镜无扫描地图功能，直接跳过该步骤；

f. 调整显微镜倍数：粗扫后，将鼠标移动到粗扫图像上，control+ 鼠标滚轮可将粗扫图像放大，鼠标右键点击想要观察的位置，左侧的相机界面可以观察实时的画面，再通过调整 Z 轴寻找焦面，点击开启检焦，在点击开始扫描将物镜调整至 10X ，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；

g. 焦面确定：点击手动选点，开始选点，调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；对焦策略：在芯片四角方向，组织外有 Track 线的区域分别记录四个焦点，对 Track 线定焦。组织区域内选择 3-5 个点对组织定焦（如果组织起伏较大，可以酌情增加定焦点）；

对于仅支持自动对焦策略的显微镜无需考虑本策略。

h. 最终成像：建模点完成后，将增益（Gain）调至最小，调整合适的亮度，立即进行扫描；拍照完成后，保存整个文件夹（原始 FOV 小图与拼接大图）；

i. 打开 StereoMap 软件的 Tools -> ImageQC 模块，上传 DAPI 染色图，并参考《StereoMap 用户手册》来进行图像 QC；

j. 拍照后，从显微镜取下 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual，置于实验台备用，可室温放置 2h（建议放置在玻片盒，避免灰尘或组织划破）。

3.11. 解交联

试剂	准备方法	用途
☐ Decrosslinking Reagent (1000064224)	提前从 -20°C取出，平衡到室温，确认无沉淀	解交联

a. 将 Decrosslinking Reagent 从 -20°C取出，平衡到室温；

b. 按照《Stereo-seq V3 载具使用说明书》将垫圈与夹具组合成载具；全程注意请勿触碰芯片表面，以免损伤芯片；

c. 提前装载 V3 PCR 适配器（adapter）到 PCR 仪上，设置程序如下并点击运行：

表格 3-4 解交联程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
85°C热盖	on
25°C	∞
90°C	1 hr
25°C	∞

⚠ 注意：不要预热 Decrosslinking Reagent，否则易造成脱片。

d. 将 **350 µL** Decrosslinking Reagent 加入每张芯片的反应孔中，贴好封板膜，封住孔位；

e. 将手持载具置于 V3 PCR 适配器（adaptor）上，点击 edit 并点击 next step，跳过 25°C ∞；

f. 将约 30 mL 甲醇放入染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管内，置于 -20°C预冷 **5-30 min**，为后续固定步骤做准备；

g. 待解交联反应结束后，小心转移带有载具的 Stereo-seq 芯片 N 载体 -Dual 至就近实验台上并撕掉封板膜（或在 V3 PCR 适配器（adaptor）上撕掉贴膜），吸弃 Decrosslinking Reagent；

h. 拆卸载具，丢弃垫圈。

3.12. 固定

试剂	准备方法（1 张芯片用量）	用途
☐ 甲醇	取 30-40 mL，装入 1 个染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中，放入 -20°C预冷	固定

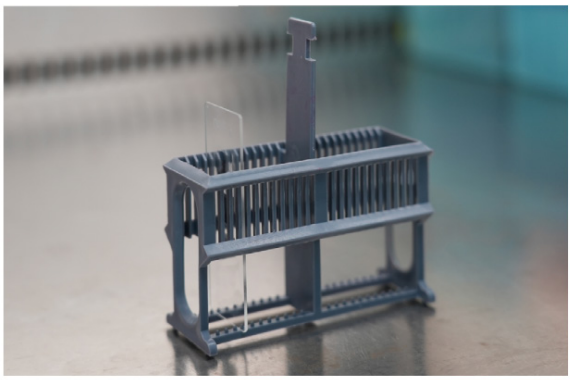
a. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 -Dual 边缘液体使用无尘纸擦拭干净，快速放入已经在 -20°C预冷的甲醇染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中，并放回 -20°C冰箱，固定 **20 min**；

b. 等待固定期间，可提前按照 **3.13. 步骤 a.** 准备组织透化步骤试剂 2 mL 0.01N HCl 与 10X 透化试剂储存液；

c. 完成固定后，将染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管转移到通风橱中；

d. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 取出，小心地用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的甲醇，确保芯片间缝隙无液体残留；

e. 将载体竖立放在载玻片染色架上，在通风橱中通风 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；



f. 待挥发完全后，将芯片载体转移到干净的实验台；

g. 小心更换新的垫圈，组合成手持载具备用，全程注意勿触碰芯片表面。

3.13. 组织透化

试剂	准备方法（1 张芯片用量）	用途
☐0.01N HCl	将 HCl 按照浓度梯度稀释到 0.01N，且 pH 值准确到 2（至少确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内），每次实验至少准备 2 mL	透化
☐10X 透化试剂储存液	用 1 mL 新鲜配制的 0.01N HCl 将 PR Enzyme（红盖，粉末状）溶解后，通过移液器吹打混匀（可分装成若干份，于 -20°C长期保存）	透化
☐1X 透化试剂储存液	【现用现配】将 10X 透化试剂储存液 30 µL 用 0.01N HCl 稀释到 300µL（至少 300 µL/ 芯片），置于冰上	透化
☐5X SSC（5%RI）	将 82.5µL 20×SSC、16.5µL RI、加入到 231µL NF H_2O 中，混匀，置于冰上	清洗

a. 在固定期间，提前准备 2 mL 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. 提前装载 V3 PCR 适配器（adaptor）到 PCR 仪上，设置程序如下并点击运行：

表格 3-5 透化程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
42°C热盖	on
37°C	∞
37°C	30 min
25°C	∞

a. 将 1X 透化试剂工作液，按照 **300 µL/ 孔**，从芯片的一角加入反应孔，确认液体完全覆盖住芯片，用封板膜对手持载具进行封口；

b. 在 PCR 仪运行至 37°C ∞时，将载具放置在 V3 PCR 适配器（adaptor）上，点击 edit 并点击 next step，跳过 37°C ∞，37°C 反应 **30 min**；

c. 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；将 RT 反应需要的试剂提前置于冰上融化，按照 **3.14. 步骤 a. 表格 3-6** 配制 FFPE MIX 反应液 ，置于冰上待用；

d. 待反应结束后，小心转移带有载具的 Stereo-seq 芯片 N 载体 -Dual 至就近实验台并撕掉贴膜（或在 V3 PCR 适配器（adaptor）上撕掉贴膜），吸弃 1X 透化试剂工作液；

e. 加入 5X SSC（5%RI）洗 1 次，按照 **300 µL/ 孔**；

f. 用移液枪小心吸弃 5X SSC（5%RI）。

3.14. FFPE MIX 反应

a. 在等待透化期间，提前按照表格 3-6 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 3-6 FFPE MIX 反应液配制

组分	1X + (10%) µL	2X + (10%) µL	3X + (10%) µL	4X + (10%) µL
RT Buffer Mix (1000047911)	182.6	365.2	547.8	730.4
RT plus (1000047912)	4.4	8.8	13.2	17.6
RT Oligo (1000047913)	11	22	33	44
RT Enzyme (1000047914)	22	44	66	88
Total	220	440	660	880

b. 将 FFPE MIX 反应液，按照 **200 µL / 孔**，加入反应孔，贴封板膜封孔；

c. 将手持载具置于 V3 PCR 适配器（adaptor）上，设置程序如下表格 3-7，点击 edit 并点击 next step，跳过 42°C ∞，42°C孵育 **2 hr**。

表格 3-7 FFPE MIX 反应程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
45°C热盖	on
42°C	∞
42°C	2 hr
25°C	∞

3.15. cDNA 释放与回收

试剂	准备方法（1 张芯片用量）	暂存条件
□0.1X SSC	2 μL 20×SSC 加入到 398 μL NF H_2O 中，混匀	室温
□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_2O	取 500 μL NF-H_2O，在回收开始时放入 55°C预热	-

a. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体 - Dual 从 V3 PCR 适配器（adaptor）上取下，吸弃 FFPE MIX 反应液，用 0.1X SSC ，按照 **300 μL/ 孔**，清洗 1 次；

b. 按照表格 3-8 配制 cDNA Release Mix，室温放置；

表格 3-8 cDNA Release Mix 配制方法及反应条件

组分	1X + (10%) μL	2X + (10%) μL	3X + (10%) μL	4X + (10%) μL
Elute Additive（1000064227）	16.5	33	49.5	66
Elute Buffer（1000064226）	313.5	627	940.5	1254
Total	330	660	990	1320

c. 提前装载 V3 PCR 适配器（adaptor）到 PCR 仪上，按照表格 3-9 设置程序并点击运行：

表格 3-9 cDNA Release 反应程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
60°C热盖	on
55°C	∞

d. 将 cDNA Release Mix，按照 **300 μL/ 孔**，加入反应孔中，用封板膜密封；

e. 置于 V3 PCR 适配器（adaptor）上，55°C 反应至少 **5 hr**，最长不超过 **24 hr**；

cDNA 释放步骤反应可过夜，但需要确保封板膜的密封性。
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。

f. 按照 **400 μL/ 芯片**，提前准备 NF-H_2O 并置于 55°C预热 **30 min**；

g. 反应结束后，将反应孔内液体完全回收到新的 2.0 mL 离心管内；

h. 用 55°C预热的 NF-H_2O, 按照 **300 μL/ 孔**，清洗反应孔芯片，并收集到同一个 2.0 mL 离心管内。

注意收集清洗后的反应液！

此步骤需要回收 cDNA Release Mix 300 µL（体积可能小于 300 µL）和 NF-H_2O 300 µL，合并后进行下一个步骤。

3.16. cDNA 纯化与扩增

试剂	准备方法（1 张芯片用量）	暂存条件
☐ 磁珠	提前取出，42°C放置 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_2O	使用 cDNA 释放与回收时的 NF-H_2O	-
☐ TE Buffer pH8.0	直接取用	室温

背景信息

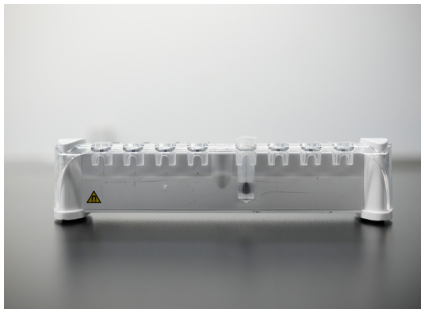
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP（Agencourt, Cat. No. A63882）进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

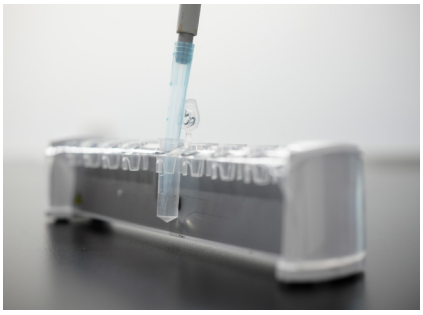
- 提前 30 min 从 4°C取出，涡旋混匀且在 42°C平衡 30 min，有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吸打，确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高，纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

磁珠操作注意事项

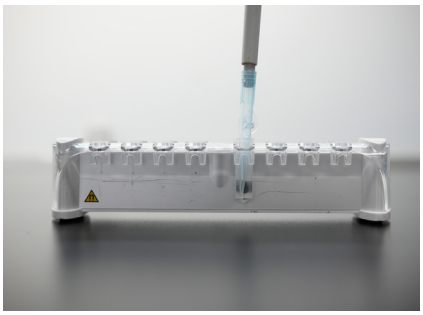
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，一般需要 **2-3 min**。但由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间有时可能需要延长，以液体彻底澄清为准。



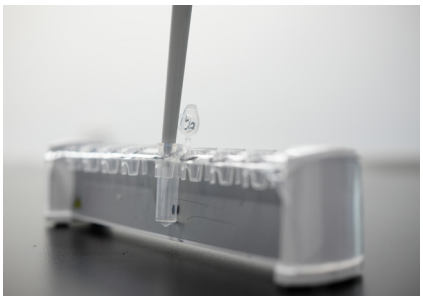
- 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留 2-3 μL 液体，以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。




- 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。

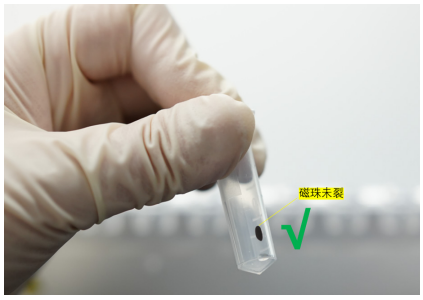


- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。

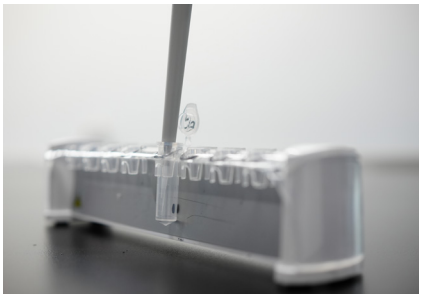


- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成乙醇残留，影响后续反应，过度干燥（磁珠开裂）会降低回收得率。通常情况下，室温干燥需要 **5-10 min**，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察。直至磁珠表面无反光，即可用 TE Buffer pH8.0 或 Nuclease-Free Water 进行产物洗脱。

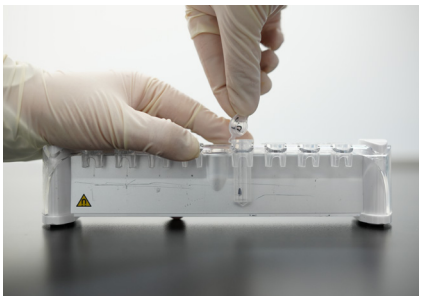




- 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应。所以，最终吸取的上清可比用于洗脱的 TE Buffer pH8.0 或 Nuclease-Free Water 的体积少 ~2 µL。



- 在 1.5 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 1.5 mL 离心管中下段，然后开盖。



3.16.1. 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（约 **600 µL**）与 42°C平衡好的磁珠按照 1 : 1 混合，振荡混匀，42°C室温孵育 **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 1.5 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）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（**~42 µL** cDNA）转移至新的 0.2 mL PCR 管中。

3.16.2. cDNA 扩增

a. 按照表格 3-10 配制 PCR Mix，共 100 μL；

表格 3-10 PCR Mix

试剂	1X+10%（μL）	2X+10%（μL）	3X+10%（μL）	4X+10%（μL）
☐ 4X cDNA PCR Mix(1000047916)	27.5	55	82.5	110
☐ cDNA Primer (1000047917)	8.8	17.6	26.4	35.2
☐ NF-H_2O	27.5	55	82.5	110
Total	63.8	127.6	191.4	255.2

b. 将 **58 μL** PCR Mix/ 每张芯片加入到上一步回收的 **42 μL** 产物中，振荡混匀；

c. 瞬时离心，按照表格 3-11 PCR 程序进行扩增；

表格 3-11 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 3-12 准备 Qubit dsDNA HS Kit ；

表格 3-12 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；

QC **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 PCR 产物（100 µL）与 42°C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**；

3）待液体澄清后去除上清；

4）将离心管保持在磁力架上，加入 200 µL 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。

5）重复一次步骤 **4）**；

6）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；

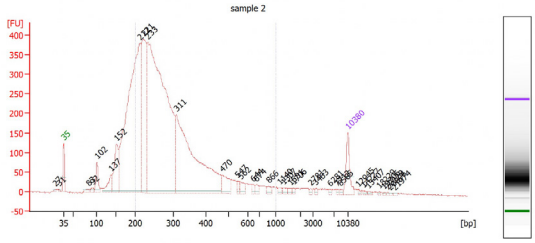
7）加 **42 µL** 的 TE Buffer pH8.0 回溶，震荡混匀后 42°C静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清（**~40 µL**）转移到新的 1.5 mL 离心管中。

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

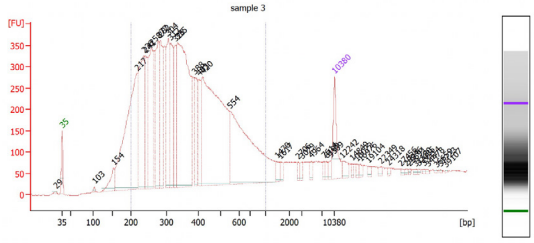
i. 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch(PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 cDNA 片段分布进行检测。

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。

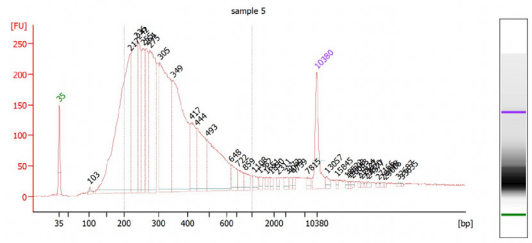
例 1：RNA 的 DV200 < 30% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



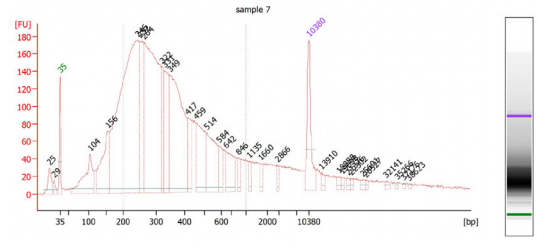
例 2：RNA 的 DV200 在 30%-50% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



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（适配转片）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》**