

时空转录组 FF V1.3 透化测试操作说明书



货号：201SP11118 (8 RXNs)

试剂盒版本号：V1.1

文档编号：STOG01012

说明书版本号：B

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V1.1
修订日期：2024年9月
描述：首次发布

说明书版本：B
试剂盒版本：V1.1
修订日期：2025年4月
描述：

- 修订说明书名称；
- 优化部分实验操作描述；
- 附录A兼容H&E染色操作流程中去掉RI试剂的使用；
- 格式勘误。

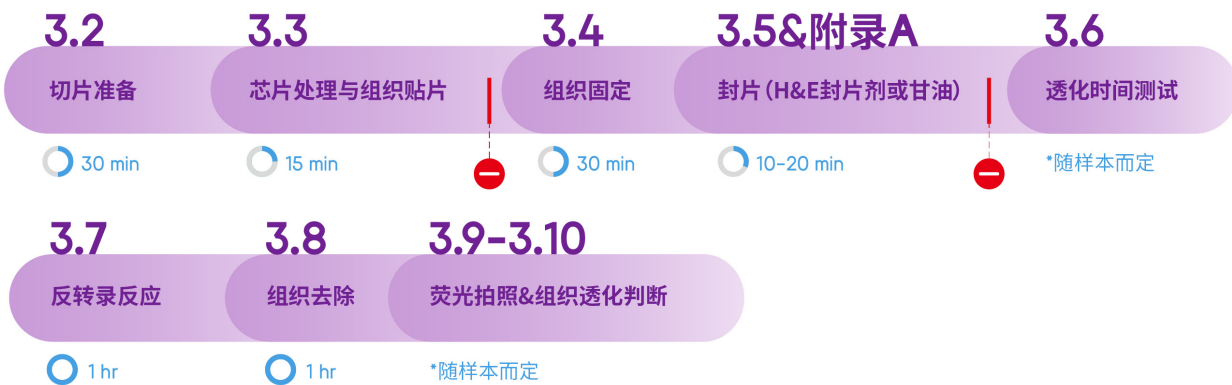
提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

©法律声明。

2025 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

- 本产品仅用于研究，不用于诊断。
- 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。
- 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）。
- 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: ~ 5小时**



目录

第一章 产品介绍	
1.1. 产品描述	1
1.2. 产品组成	1
1.3. 需自备物料清单	4
1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍	6
1.5. 注意事项	6
第二章 样本准备	7
第三章 时空转录组 FF V1.3 透化测试标准操作流程	
3.1. 实验前准备	10
3.2. 切片准备	11
3.3. 芯片处理与组织贴片	12
3.4. 组织固定	14
3.5. 甘油封片	15
3.6. 透化时间测试	16
3.7. 反转录反应	18
3.8. 组织去除	19
3.9. 荧光拍照	21
3.10. 组织透化判断	22
附录	
附录 A 兼容 H&E 染色操作流程	23
附录 B Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书	26



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 透化试剂套装 V1.1(载体版)**。

STOmics Stereo-seq 透化试剂套装 V1.1 (载体版) 是用于摸索新鲜冷冻 (Fresh Frozen, FF) 样本最佳透化时间的预实验试剂套装, FF 样本要求参考 [《时空实验 FF 样本准备操作指南》](#)。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。Stereo-seq 芯片 P (透化测试芯片) 上载有核苷酸捕获探针, 与组织切片结合后通过探针原位抓取组织内的 mRNA 分子, 再利用带有荧光标记的核苷酸进行 cDNA 合成。研究人员通过荧光显微成像可以快速判断特定组织的最佳透化时间。

此试剂盒套装可结合 H&E 染色, 研究人员可以更清晰地观察到组织形态学信息, 在时空病理研究与应用中更准确地判断组织分型及获取特定组织区域的表达信息, 针对选定区域进行下游差异分析和富集分析。

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, 最大程度上保证了产品性能的稳定性和重复性。

1.2. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成:

- Stereo-seq 透化试剂盒 *1 (8 RXN)
- Stereo-seq 芯片 P 载体 (1cm*1cm) *1 (8 EA)
- STOmics Accessory Kit *2 (5 PCS)



辅助性试剂与耗材:

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



关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 至表格 1-4。




 收到 Stereo-seq 芯片载体后，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

Stereo-seq 透化试剂盒 货号：201KP1118			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
RI	1000028499	 橙色	300 μL × 1
PR Enzyme	1000028500	 红色	10 mg × 1
RT QC Buffer Mix	1000047918	 棕色	792 μL × 1
Glycerol	1000047910	 紫色	100 μL × 1
H&E Mounting Medium *	1000041969	 紫色	50 μL × 1
RT QC Enzyme Mix	1000047919	 透明	88 μL × 1
TR Enzyme	1000028504	 绿色	71 μL × 1
TR Buffer	1000028505	 绿色	1725 μL × 2



 储存温度：- 25°C ~ - 15°C  运输温度：- 25°C ~ - 15°C  有效期：见标签



 * 此试剂用于 H&E 染色封片，若不开展 Stereo-seq 兼容 H&E 染色产品方案，不需要用到此试剂。

表格 1-2




Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm) 货号：200CP118		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm)	-	8 EA

 储存温度：2°C ~ 8°C  运输温度：- 25°C ~ - 15°C  有效期：见标签

表格 1-3

STOmics Accessory Kit 货号: 1000033700		
组分信息	货号	规格
夹具	10000033699	1 EA
垫圈	10000033698	4 EA
封板膜	-	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 1-4

Stereo-seq PCR 适配器 (需单独订购) 货号: 301AUX001		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 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

1.3. 需自备物料清单

此清单列出了本实验所需的设备和物料。表格 1-5 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》](#)。

表格 1-5

仪器		
品牌	描述	产品编号
-	冰冻切片机	-
-	离心机	-
-	移液器	-
-	荧光显微镜（拼接功能）	-
-	漩涡混匀仪	-
-	金属浴（或其他同等功能仪器）	-
Bio-Rad*	T100™ PCR 仪	1861096
Thermo Fisher Scientific*	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636



可从所列品牌中任选一个（带 * 标记）配合 PCR 适配器使用。

试剂		
品牌	描述	产品编号
Ambion	Nuclease-Free Water	AM9937
	20X SSC	AM9770
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
	甲醇	34860-1L-R
Sakura	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. compound	4583

耗材		
品牌	描述	产品编号
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	载玻片	-
Corning	Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	353003
	50 mL 离心管	430829
	15 mL 离心管	430791
Kimtech	Kimwipes™ 无尘纸	34155
Matin	Power Dust Remover (空气罐)	M-6318
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	1000 µL 带滤芯枪头	TF-1000-L-R-S
	200 µL 带滤芯枪头	TF-200-L-R-S
	100 µL 带滤芯枪头	TF-100-R-S
	10 µL 带滤芯枪头	TXLF-10-L-R-S
-	显微镜盖玻片 (尺寸: 24 mm × 32 mm)	-

表格 1-6 Stereo-seq 兼容 H&E 染色产品方案自备试剂及耗材 (可选)

试剂		
品牌	描述	产品编号
Sangon Biotech	伊红	A600190-0025
Sigma ¹	苏木素	51275
Solarbio (国产备选) ²	天青石蓝苏木素	G4470
Agilent ³	Bluing Buffer (返蓝试剂)	CS702
DAKEWE (国产备选) ⁴	Bluing Buffer (返蓝试剂)	4960311-5
耗材		
-	一次性无菌注射器	-
津腾 ⁵	针筒式过滤器	JTSF0303
Millipore ⁵	Millex 针式过滤器	SLGV033N

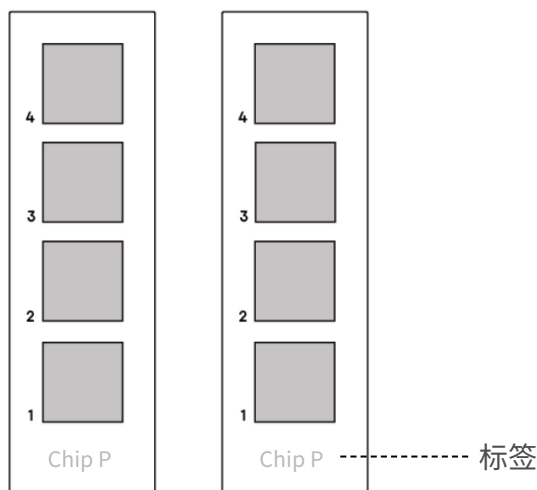


苏木素优先使用品牌 1，品牌 2 为国产备选。返蓝试剂优先使用品牌 3，品牌 4 为国产备选。

从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍

芯片盒中包含 2 张芯片载体，2 张载体上均贴有 4 张 Stereo-seq 芯片 P (1 cm * 1 cm)。



可通过载体末端光刻的标签区分 Stereo-seq 芯片 P 载体和 Stereo-seq 芯片 T 载体。

Stereo-seq 芯片载体保存方法

Stereo-seq 芯片载体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 Stereo-seq 芯片 P/T 载体储存在 2°C ~ 8°C。若拆袋后未使用，需重新干燥密封并储存在 2°C ~ 8°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。

1.5. 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，并将其他组分子置于室温解冻。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 FF 样本准备操作指南》](#) 进行样本准备。

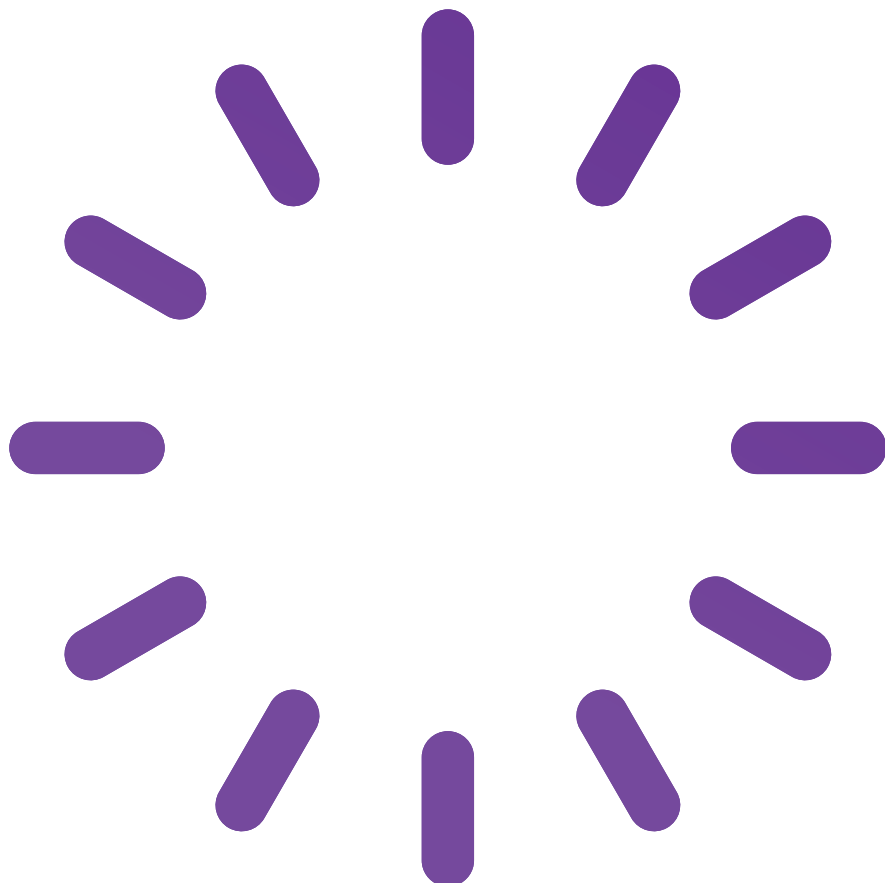


 建议对 $RIN \geq 4$ 的样本进行后续实验。

第三章

时空转录组 FF V1.3

透化测试标准操作流程



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。

准备试剂	准备流程	暂存条件
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μ L 稀释到 20 mL	室温
甲醇	提前 - 20°C 中预冷	- 20°C
Wash Buffer	取 10 μ L RI 加入 190 μ L 0.1X SSC 中，用量至少为 200 μ L/ 样本 Stereo-seq 兼容 H&E 染色：取 10 μ L RI 加入 190 μ L 0.1X SSC 中，用量至少 200 μ L/ 样本	冰上备用
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 mL/ 样本）	室温 48 hr
0.01N HCl (pH = 2.0)	需现配现用。对于预制的 0.1N HCl 和新购买的 HCl，实验前请检查 pH 值。 储存时间超过 48 hr 将影响预期 pH 值，请在配制后 48 hr 内使用。	
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。	冰上暂存 1 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	用 0.01N HCl 将 15 μ L 10X 透化试剂储存液稀释到 150 μ L (至少 150 μ L/ 芯片)	冰上备用 6 hr
Glycerol	提前 5 min 取出平衡至室温，每张芯片用量 5 μ L	室温
准备仪器	准备流程	备注
冷冻切片机	箱体预冷至 - 20°C，样本头预冷至 - 15°C ~ - 10°C 热盖 60°C	温度根据实际操作过程调整
PCR 仪	37°C Hold，用于烤片和透化 45°C Hold，用于反转录 55°C Hold，用于组织移除	检查 PCR 仪是否有异常，必要时更换
金属浴 (或其他同等功能仪器)	37°C 用于透化酶预热	检查仪器是否有异常，必要时更换
荧光显微镜	TRITC 通道	检查显微镜是否有异常，必要时更换
兼容 H&E 染色 准备试剂 (可选)	准备流程	暂存条件
醇溶伊红溶液	取 0.026 g 伊红 (Eosin Y) 粉末溶于 50 mL 甲醇中，用封板膜封口保存	室温 1 个月
苏木素 (过滤)	使用 0.22 μ m 的滤膜 (即针筒式过滤器，配套一次性无菌注射器) 过滤苏木素后用封板膜密封保存，每张芯片至少准备 100 μ L	室温避光 (不超过 7 d)
H&E Mounting Medium	提前 5 min 取出平衡至室温，每张芯片用量 3.5 μ L	室温

3.2. 切片准备

- a. 提前将 PCR 仪温度设置到 37°C，放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
60°C热盖	on	-
37°C	∞	1
45°C	∞	1
55°C	∞	1

- b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20°C，样本头预冷至 -15°C ~ -10°C（根据实际操作过程调整）；



☹️ 样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

- c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；
- d. 将 OCT 包埋的组织块从 -80°C 冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 **30 min**；
- e. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- f. 将组织块修剪成合适的尺寸（切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- g. 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

3.3. 芯片处理与组织贴片



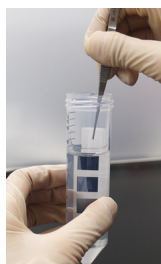
有关组织切片到 Stereo-seq 芯片载体上的演示视频，请参阅以下链接或扫描二维码：
<https://www.stomics.tech/resources/Videos>

- a. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出 Stereo-seq 芯片 P 载体，记录芯片背面的编号；注意不要触碰芯片正面；

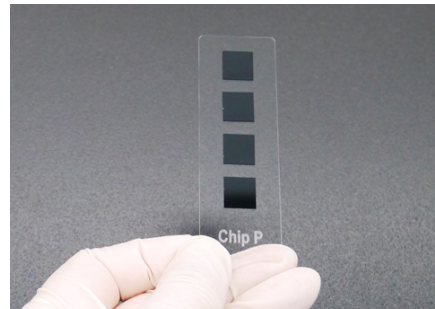


- ⋯ 打开后，请检查玻片盒中的所有 Stereo-seq 芯片载体是否正确定位在插槽中，载体上的芯片是否正面朝上。芯片的正面为亮光面，正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。

- b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 μ L Nuclease-Free Water 清洗 2 次（或在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中清洗 2 次）；



- c. 清洗后用气瓶吹干芯片四周及表面，再用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的液体；



- d. 当芯片表面无杂质、无明显痕迹、无任何液体残留、无波纹状纹理，即可准备贴片；

- e. 预冷甲醇：在玻片盒或 50 mL 离心管中加入足量甲醇，确保甲醇足够浸没所有芯片（可将一张普通载玻片放入容器中，查看甲醇的体积是否足够）。扣紧盖子，提前放入切片机中（ -20°C ）预冷 **5-30 min**；

- ⋯（可选操作）此步骤适用于 Stereo-seq 兼容 H&E 染色的产品方案。

预冷醇溶伊红溶液：在玻片盒或 50 mL 离心管中加入足量醇溶伊红溶液，确保醇溶伊红溶液足够浸没所有芯片（可将一张普通载玻片放入容器中，查看醇溶伊红溶液的体积是否足够）。扣紧盖子，提前放入切片机中（ -20°C ）预冷 **5-30 min**。

- f. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- g. 组织贴片有两种操作方式可选：热贴（A）和冷贴（B）。根据需求选择切片厚度，通常为 10 μm 。

A. 热贴

- 1) 连续切取组织切片，将切片移到切片台右侧靠近边缘处，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，每张切片放置间隔距离大于载体宽度；
- 2) 拿起载体的一边，使芯片正面朝下，对准切片；
- 3) 轻轻一压，肉眼可见切片已经吸附到芯片表面；
- 4) 重复 2) -3) 步骤操作，直至全部组织切片吸附到芯片表面（贴片时间控制在 **1 min 以内**）；
- 5) 将芯片正面朝上，快速将载体置于提前平衡温度的 PCR 适配器上，37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。



如需在同一个载体的不同芯片上贴 2 个不同组织的切片，建议将两个组织都修好片后，先对一个组织切片，使用热贴方式贴片，将载体放至 PCR 适配器上 37°C 等待贴下一个组织，等待时间控制在 **5 min 以内**；然后换另外一个组织切片，使用热贴方式贴片，快速将载体置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**。

B. 冷贴

- 1) 将载体芯片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；
- 2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平，注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，无褶皱；
- 3) 立即拿起芯片载体，用指腹放在载体背面加温几秒钟，直至切片贴合；
- 4) 重复上述操作，直至所有切片贴片完成，建议组织切片贴片控制在 **5 min 内**；
- 5) 快速将载体置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。

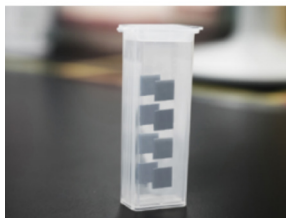


进行冷贴时需控制好每张切片贴片时间，间隔时间太长，组织贴片会皱缩。



（可选暂停点）将孵育好的芯片载体放于玻片盒或者 50 mL 离心管，然后将其放入可密封的塑料袋中，同时放入干燥剂包，尽可能多地挤出空气并将塑料袋密封。用干冰快速转移到 -80°C 冰箱，最长可于 -80°C 保存一个月。

继续实验时，使用干冰将玻片盒或者 50 mL 离心管转移，取出贴有组织的芯片载体，快速置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**。

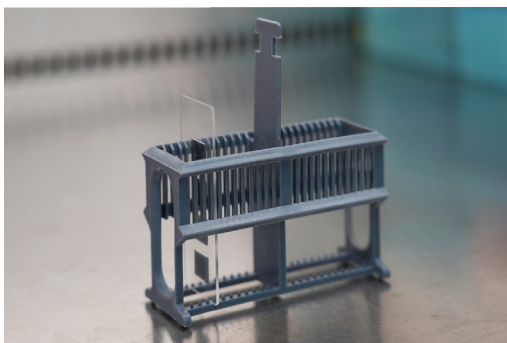


3.4 组织固定



⋯ Stereo-seq 兼容 H&E 染色的产品方案包含 H&E 染色工作流程，透化测试环节增加了 H&E 染色工作流程，包含组织固定与伊红染色、苏木素及返蓝染色、H&E 封片剂封片的操作，目的是需要在组织透化测试之前进行 H&E 染色以获得更准确的透化时间，具体操作步骤参考附录 A。如后续不需要使用 Stereo-seq 兼容 H&E 染色的产品方案，可以直接进行下面的步骤 a。

- a. 孵育结束后，立即将芯片载体置于 -20°C 预冷的甲醇中，确保甲醇浸没载体上的所有芯片，固定 **30 min**（固定时间最长不超过 **1 hr**）；
- b. 固定结束后，将玻片盒或 50 mL 离心管转移至通风橱中；
- c. 将载体从玻片盒或 50 mL 离心管中取出，用无尘纸吸干载玻片背面和芯片周围多余的甲醇，确保无液体残留；
- d. 将载体竖立放在载玻片染色架上，置于通风橱中晾干 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；



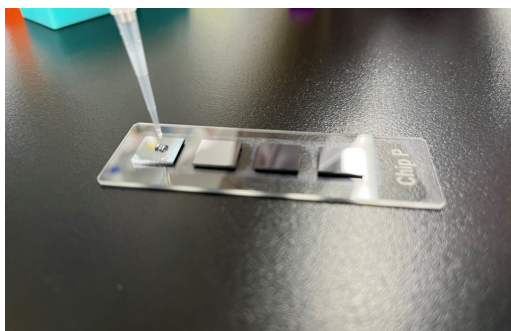
- e. 甲醇挥发完全后，肉眼可见组织变白，将载体转移至实验桌上进行下一步。

3.5. 甘油封片

- a. Glycerol 使用前离心，确保甘油中无气泡，用移液器缓慢吸取 5 μ L Glycerol 甘油滴加到组织中央，避免产生气泡；



- ⋯ 确保已将 Glycerol 提前置于室温平衡 5min。



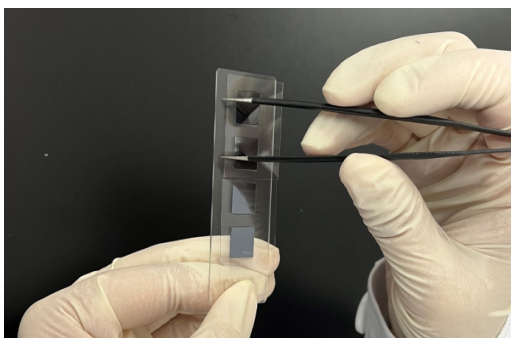
- ⋯ 请保证盖玻片使用前干净无灰尘，可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。

- b. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时握住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，静置至少 10 min；



- ⊖ 甘油封片的组织在常温最长可以存放 2 hr，针对 RNA 容易降解的组织，如胰腺，立即进行后续操作以避免 RNA 降解。

- c. 根据 [3.6. 透化时间测试](#) 表格 3-1 提前准备好 1X 透化试剂工作液；
 d. 将一个金属浴或者其他同等功能仪器的温度设置到 37°C，PCR 仪程序依然为 37°C ∞ ；
 e. 使用空气罐吹去载具上杂质，参考 [附录 B 《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明》](#) 将垫圈与夹具组装成载具（不含芯片载体）；
 f. 将载具放置于 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，37°C 孵育 10 min。1X 透化试剂工作液使用前置于金属浴或者其他同等功能仪器中 37°C 孵育 10 min（最长不超过 30 min）；
 g. 步骤 b. 静置结束后，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹在盖玻片一角；
 h. 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；



- i. 将载体置于装有 30 mL 0.1X SSC 的 50 mL 离心管中浸泡 3-5 s；

- ⋯ 确保芯片全部浸没于溶液中。

- j. 取出载玻片，用无尘纸擦去载玻片背面及芯片四周的残液，确保无液体残留。

3.6. 透化时间测试

- a. RT QC Buffer Mix 在冰上提前解冻，并将 RT QC Enzyme 放于冰上待用；

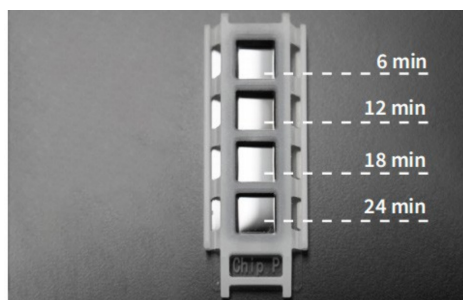
表格 3-1 1X 透化试剂工作液配制

组分	1X (μL)	4X + 10% (μL)
0.01N HCl	135	594
10X 透化试剂工作液	15	66
Total	150	660

- b. 载具孵育完成后，将载体固定于载具上，组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；

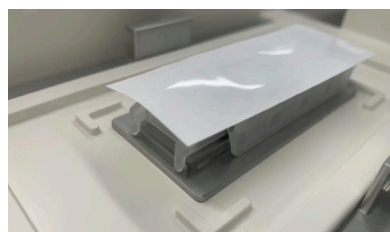
 在组装载具时避免接触到芯片正面。

- c. 组织透化时间范围是 **0-30 min**，初次实验建议设置 **6 min**、**12 min**、**18 min**、**24 min** 等 4 个组进行测试；



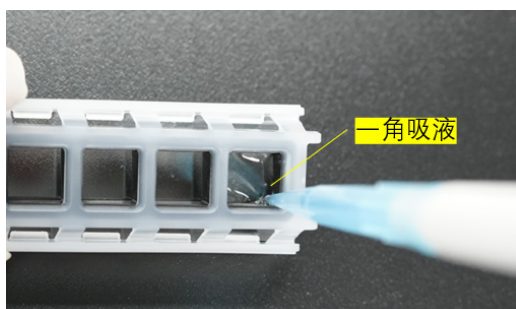
图一. 透化时间测试 (分钟)

- 1) 将手持载具转移到 PCR 适配器上；
- 2) 先在透化时间为 **24 min** 的芯片添加 **150 μL** 1X 透化试剂工作液。在芯片的每个角加入一滴透化试剂（移液器挨近芯片加液，注意不要划伤组织），然后将其余透化试剂加到芯片中央，使所有液体融合，**确保透化试剂覆盖全芯片**；
- 3) 将封板膜（不要撕开，包含白底，其中白底朝上，透明膜朝载具）放置于载具上覆盖反应孔，盖上 PCR 仪盖，**37°C** 孵育；

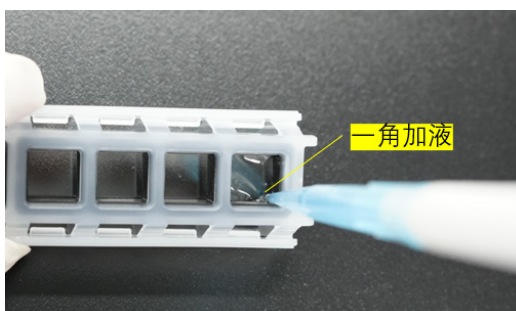


- 4) **6 min** 后，打开 PCR 仪盖，拿开封板膜，在透化时间为 **18 min** 的芯片添加 **150 μL** 1X 透化试剂工作液；
- 5) 将封板膜重新放置于载具上，盖上 PCR 仪盖，**37°C** 孵育；
- 6) 重复步骤 2) - 5) 至透化时间最短的芯片开始孵育。

- d. 透化期间，可先参考 [3.7. 反转录反应](#) 中的表格 3-2 配制 RT QC Mix，用锡箔纸包裹避光，冰上放置待用；
- e. 透化结束后，将手持载具从 PCR 仪（37°C）中取出，PCR 仪程序跳过 37°C，进入 45°C ∞；
- f. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器从芯片的一角吸掉透化试剂，避免接触芯片正面；



- g. 加入 Wash Buffer，用量为 200 μL/ 芯片；



- h. 微微倾斜手持载具，用移液器从芯片一角吸掉芯片表面溶液。



- 步骤 h. 结束之后应立即加入 RT QC Mix，以避免 RNA 降解，加液方法及试剂用量参考 [3.7. 反转录反应](#) 步骤 a。

3.7. 反转录反应

- a. 取出配制好的 RT QC Mix 吹打混匀后瞬时离心，立即在芯片的一角往芯片缓慢加入 RT QC Mix，用量为 **100 μ L/ 芯片**，确保 RT QC Mix 均匀覆盖全部芯片；

表格 3-2 RT QC Mix

组分	1X (μ L)	4X + 10% (μ L)
RT QC Buffer Mix	90	396
RT QC Enzyme Mix	10	44
Total	100	440

- b. 撕掉封板膜上的白底，用透明的封板膜将手持载具封口，放置于 PCR 仪 (45°C) 的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖子，反应 **1 hr** 或以上，最长不超过 **5 hr**。

3.8. 组织去除



a. 提前取出 TR Buffer 放于 55°C **5 min** 溶解沉淀，再恢复至室温，室温放置备用。

⋯ 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. 按照表格 3-3 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 3-3 组织移除试剂 Mix 配制

组分	1X (μL)	4X + 10% (μL)
TR Buffer	392	1724.8
TR Enzyme	8	35.2
Total	400	1760

c. 反转录反应结束后，将手持载具从 PCR 仪 (45°C) 中取出；PCR 仪程序跳过 45°C，进入 55°C ∞ ；

d. 撕开封板膜，微微倾斜手持载具，用移液器从芯片的一角吸弃芯片表面的 RT QC Mix，避免触碰到芯片表面；

⋯ 撕开封板膜时不能按压夹具卡扣两侧上部，避免载体松落。

e. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 **400 μL / 芯片**；

f. 在芯片一角将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右；

g. 微微倾斜手持载具，用移液器从反应孔的一角吸弃 0.1X SSC 溶液；

h. 重复步骤 d.-f. 一次；

i. 往每个芯片加入组织移除试剂 Mix，用量为 **400 μL / 芯片**，使用封板膜密封载具；

j. 将手持载具放置在 PCR 仪 (55°C) 的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，反应时间为 **1 hr**；

k. 组织移除结束后，将手持载具从 PCR 仪 (55°C) 取出，移除封板膜，微微倾斜手持载具，用移液器从反应孔的一角吸弃组织移除试剂 Mix；

⋯ 若发现组织移除不完全，有残留组织存在，可延长移除时间，以保证完全移除（不超过 **16 hr**）。

l. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 **400 μL / 芯片**；

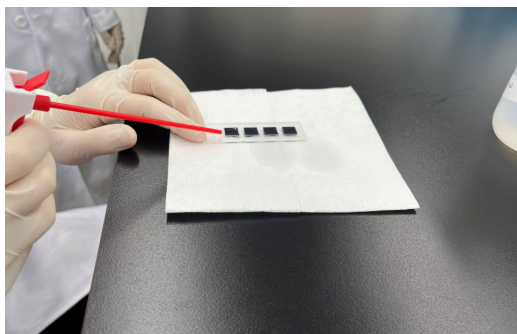
m. 在芯片四周将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右，然后从反应孔的一角吸弃 0.1X SSC 溶液；

n. 重复步骤 l.-m. 一次；

o. 加入 Nuclease-Free Water，用量为 **400 μL / 芯片**；

p. 上下吸打冲洗芯片表面以洗掉表面盐分；

- q. 参考附录 B 《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》拆卸手持载具，将芯片载体放在无尘纸上，用空气罐将芯片表面完全吹干；

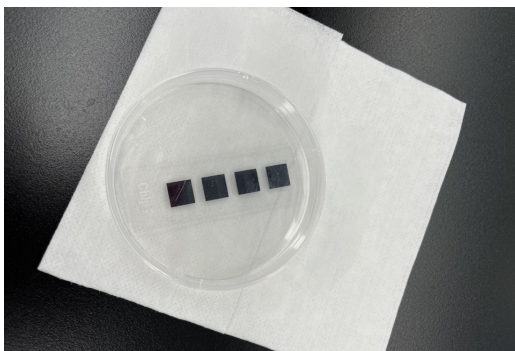


- ☹️ 如芯片表面残留明显痕迹，加入 100 μ L Nuclease - Free Water，用空气罐将芯片四周及表面完全吹干（该步骤可重复，直至芯片表面无明显痕迹残留）。



- ☰ 可选操作：操作步骤 l.-q. 可替换为将载体从手持载具上拆下，置于 50 mL 离心管（0.1X SSC 试剂足量且保证所有芯片能完全浸没）中上下移动载体涮洗 10 次，然后将载体置于 50 mL 离心管（Nuclease -Free Water 足量且保证所有芯片能完全浸没）内上下移动载体涮洗 10 次，用空气罐将芯片表面完全吹干（该步骤可重复，直至芯片表面无明显痕迹残留）。

- q. 将芯片载体放置于干燥的培养皿中，用锡箔纸包裹孔板以避光，等待拍照。



3.9. 荧光拍照

- a. 在显微镜控制软件中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；



- ⋯ 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：B00249A1

- b. 使用荧光显微镜 (具备拼接功能)，选择落射荧光扫描模式，手动选择 TRITC 通道，选择 4 倍镜或 10 倍镜；
- c. 在载物台上滴加 1-2 μL 水，小心地将芯片转移到显微镜载物台上，取下遮光罩，选择感兴趣的芯片区域；



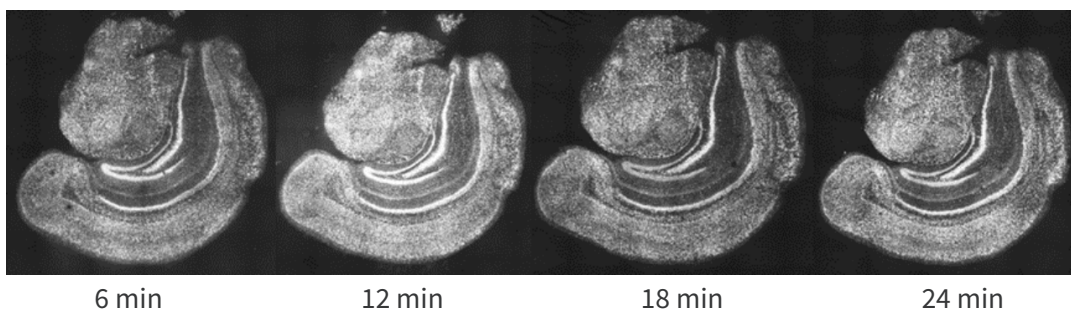
- d. 先用 4 倍镜找到目标区域，然后切换到 10 倍镜，扫描整张芯片。

- ⋯ 同一组织不同透化时间的芯片要在相同成像条件下扫描，包括亮度和曝光等条件。

3.10. 组织透化判断

在组织移除干净且保持相同成像条件（包括亮度和曝光等条件）的情况下，以组织形态完整、荧光值较强且无弥散为最佳透化时间的判断标准。

如图二所示，透化 6 min 时，组织呈现同一皮层亮度不均匀的情况，说明透化不充分；透化 12 min 时，细节清晰，信号均匀，亮度最大；透化 24 min 时的信号弱于透化 12 min 的信号；因此，最佳的透化时间是 12 min。



图二 . 小鼠大脑（半脑）

附录 A 兼容 H&E 染色操作流程

3.4. 组织固定与伊红染色 (− 20°C 下操作)

- a. 孵育结束后，立即将芯片载体置于 − 20°C 预冷的甲醇中，确保甲醇浸没载体上的所有芯片，固定 **30 min**（固定时间最长不超过 **1 hr**）；
- b. 将芯片转移到 − 20°C 预冷的醇溶伊红溶液中染色 **3 min**，确保伊红溶液浸没过所有芯片（可根据组织着色均匀情况调整，染色时间控制在 **3-5 min** 的范围内）；

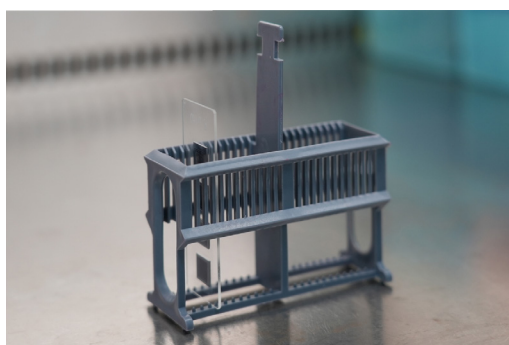


同一组织建议保持染色时间统一。

- c. 醇溶伊红染色结束以后，将芯片转移回刚刚固定的甲醇的容器中，继续 − 20°C 放置 **1 min**；
- d. 将容器转移到通风橱中，从容器中取出载体，用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的甲醇，确保无液体残留；
- e. 将载体竖立放在载玻片染色架上，在通风柜中通风 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；



准备步骤 3.5. 所需要的试剂，计算好用量备用并提前分装试剂，分装试剂请勿加入 RI。



- f. 甲醇挥发干后，肉眼可见表面变干，将载体转移至实验台上，准备下一步染色。

3.5. 苏木素及返蓝染色



a. 根据【实验前准备】，提前配制 2 mL 0.01N HCl; 参考下表提前配制好试剂;

⋯ 使用前注意把分装好的染液振荡混匀，请勿置于冰上，并控制在 5 min 内使用。

试剂配制

准备试剂	准备流程	储存
苏木素染色液	每张芯片至少准备 100 μL	室温避光 5 min
Bluing Buffer	每张芯片至少准备 100 μL	室温 5 min

b. 在芯片表面滴加苏木素染色液，用量为 **100 μL/ 芯片**。先在芯片的每个角加入一滴染色液，然后将其余染色液加到芯片中央，使所有染色液融合，确保染色液均匀覆盖全芯片，室温孵育时间根据选择苏木素不同品牌调整;

⋯ 推荐的 Sigma 苏木素染色时间为 7 min，Solarbio 苏木素染色时间为 1-2 min。

⋯ 提前将 H&E Mounting Medium 置于室温平衡 5 min。

c. 直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60°），并用无尘纸吸去流出芯片的液体，尽量减少芯片表面液体残留;

d. 向芯片加入 0.1X SSC 进行清洗，用量为 **100 μL/ 芯片**，清洗后直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60°），并用无尘纸吸去流出芯片的液体，尽量减少芯片表面液体残留;

e. 额外重复步骤 d. 2 次;

f. 将 Bluing Buffer（返蓝染色液）滴加在到芯片上，用量为 **100 μL/ 芯片**。先在芯片的每个角加入一滴染色液，然后将其余染色液加到芯片中央，使所有染色液融合，确保染色液均匀覆盖全芯片，室温孵育时间根据选择返蓝染色液不同品牌调整;

⋯ 推荐的 Agilent 返蓝试剂染色时间为 2 min，DAKEWE 返蓝试剂染色时间为 10 s。

g. 直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60°），并用无尘纸吸去流出芯片的液体，尽量减少芯片表面液体残留;

h. 向芯片加入 0.1X SSC 进行清洗，用量为 **100 μL/ 芯片**，清洗后直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60°），尽量减少芯片表面液体残留，并用无尘纸吸去流出芯片的液体;

i. 将芯片转移至无尘纸上，一只手固定载体，另一手持空气罐，出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30°倾角快速吹干芯片，注意吹干载玻片表面以及芯片与载玻片缝隙间的液体，可用无尘纸擦掉芯片周围的液体;

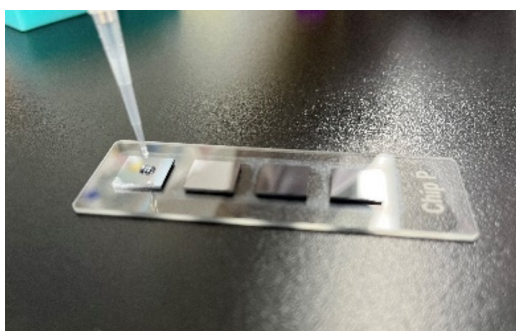
⋯ 请保证芯片与载玻片间的缝隙无液体残留，否则滴加 H&E Mounting Medium 后可能引起伊红晕开。

j. 用移液器缓慢吸取 3.5 μL H&E Mounting Medium 滴加到组织中央，避免产生气泡;

⋯ 滴加 H&E Mounting Medium 以后，建议立刻封片。



 H&E Mounting Medium 管盖颜色与 Glycerol 相同，使用时请注意区分。



k. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时握住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片，待 H&E Mounting Medium 浸润整张芯片后，不需要拍摄 H&E 图像，封片后等待 10 min；

 请保证盖玻片使用前干净无灰尘，可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。



 H&E Mounting Medium 封片的组织在常温最长可以存放 2 hr，针对 RNA 容易降解的组织，如胰腺，立即进行后续操作以避免 RNA 降解。

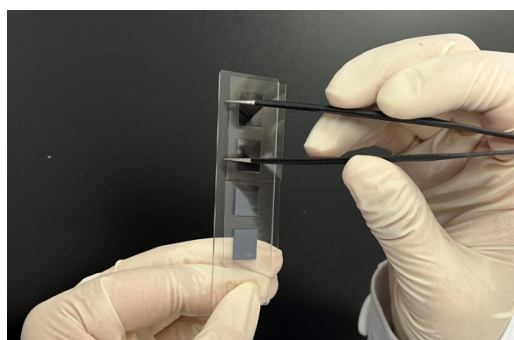
l. 等待期间，将一个金属浴或者其他同等功能仪器的温度设置到 37°C，PCR 仪程序依然为 37°C ∞；

m. 等待期间，使用空气罐吹去载具上杂质，参考附录 B 《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》将垫圈与夹具组装成载具（不含芯片载体）；将载具放置于 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，37°C 孵育 10 min；

n. 等待期间，根据 3.1. 实验前准备 提前准备好 1X 透化试剂工作液；1X 透化试剂工作液使用前置于金属浴或者其他同等功能仪器中 37°C 孵育 10 min（最长不超过 30 min）；

o. 步骤 k. 结束后，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹起盖玻片一角；

p. 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；



q. 将载体置于装有 30 mL 0.1X SSC 的 50 mL 离心管中浸泡 3-5 s；

 确保芯片全部浸没于溶液中。

r. 取出载玻片，用无尘纸擦去载玻片背面及芯片四周的残液，确保无液体残留；

s. 在芯片上缓缓滴加 100 μL 0.01N HCl 溶液，从芯片的一角吸弃液体。

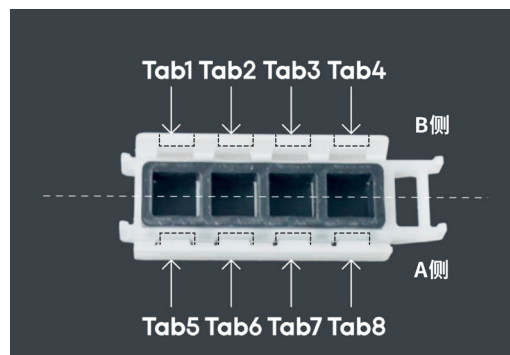
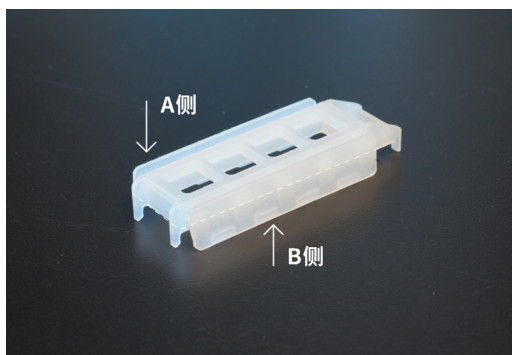
 请返回参考 3.6 透化时间测试，继续实验操作。



附录 B Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书

Stereo-seq 载体配件包

Stereo-seq 载体配件包中包含芯片载体的夹具、可装卸的垫圈以及封板膜。



组装方法



组装方法视频参考网址：

<https://www.stomics.tech/col113/607>

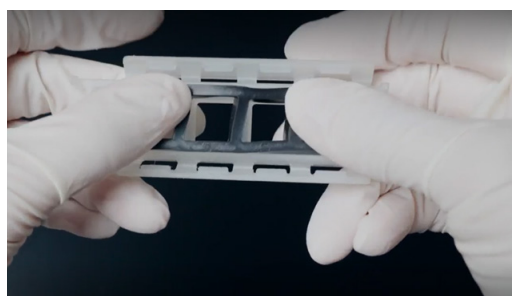
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



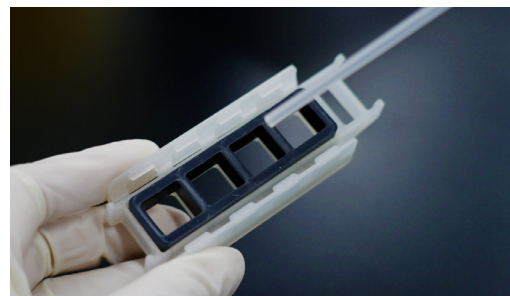
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



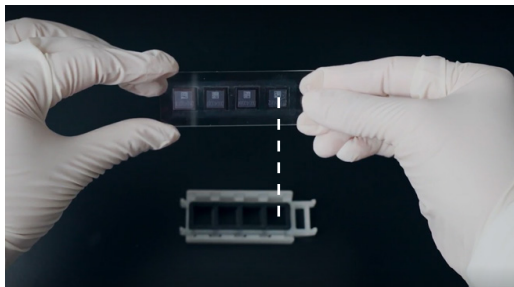
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



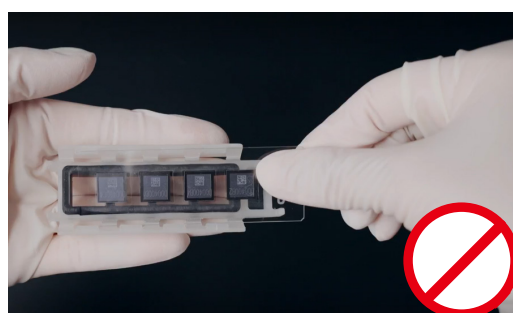
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；



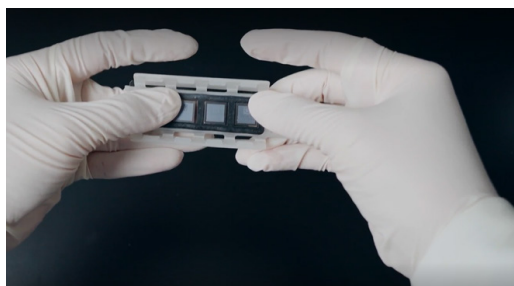
- e. 拿起 Stereo-seq 芯片载体，芯片面朝下，将芯片载体标签朝夹具的长边卡扣方向；



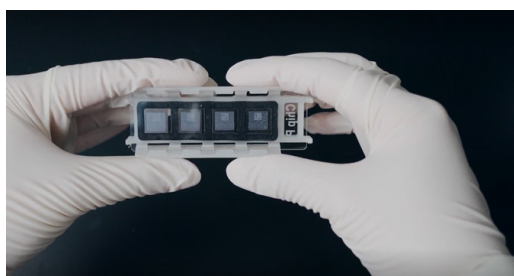
- f. 芯片对准垫圈孔位，避免夹具和垫圈接触芯片表面；



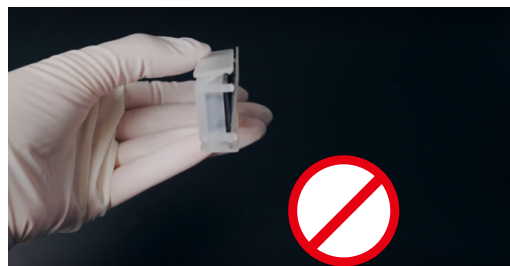
- g. 先将芯片载体卡进夹具下方 4 个卡扣。双手中指支撑夹具的正面，左手拇指放在 tab 1 和 tab 2 之间，右手拇指放在 tab 3 和 tab 4 之间，拇指匀力向下按压芯片载体，直至听到“咔”的一声。双手食指用力向下按压夹具顶部边缘，将载体卡进夹具上方 4 个卡扣；



- h. 沿着夹具卡带两侧按压，确保夹具与芯片载体稳固组装在一起；



- i. 最后检查组装好的夹具和芯片载体，确保位置正确。



拆卸方法

- a. 将夹具翻转过来，用力按压夹具上方卡带，使芯片载体从夹具中脱离。用大拇指稍微挡住载体背面，避免载体弹出；



- b. 将芯片载体从带有刻字标签一侧抬起拿出。

