时空组学
STOmics

时空转录组 FF V1.3
转录组实验操作说明书

货号： 201ST13114 (4RXNs)
试剂盒版本号：V1.3
文档编号：STOG01013
说明书版本号：B

版本历史

说明书版本： A
试剂盒版本： V 1.3
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： V1.3
修订日期： 2025 年 4 月
描述：

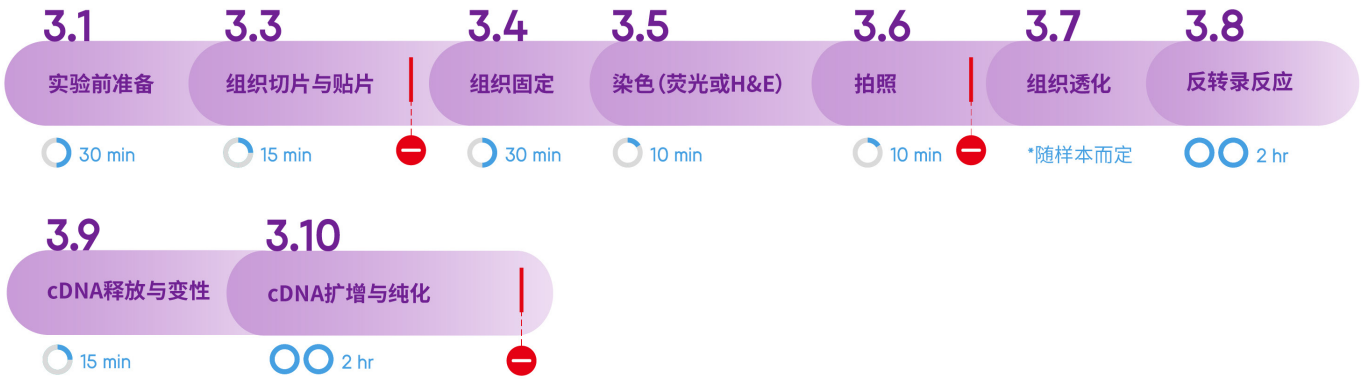
- 修订说明书名称；
- 优化部分实验操作描述；
- 格式勘误。

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。

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


3.1
实验前准备
30 min
3.3
组织切片与贴片
15 min
3.4
组织固定
30 min
3.5
染色(荧光或H&E)
10 min
3.6
拍照
10 min
3.7
组织透化
*随样本而定
3.8
反转录反应
2 hr
3.9
cDNA释放与变性
15 min
3.10
cDNA扩增与纯化
2 hr

总耗时: ~ 1 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 4
1.5. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍 7
1.6. 注意事项 7

第二章 样本准备 8

第三章 时空转录组 FF V1.3 转录组实验标准操作流程

3.1. 实验前准备 11
3.2. 切片准备 13
3.3. 芯片处理与组织贴片 14
3.4. 组织固定 17
3.5. 荧光染色 18
3.6. 荧光拍照 20
3.7. 组织透化 22
3.8. 反转录反应 23
3.9. cDNA 释放与变性 24
3.10. cDNA 扩增与纯化 26
3.10.1. cDNA 扩增 26
3.10.2. cDNA 纯化 27

附录

附录 A 兼容 H&E 染色操作流程 30
附录 B Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书 36

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 转录组试剂套装 V1.3(载体版)**。

STOmics Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3（载体版）是用于构建新鲜冷冻样本的组织切片全转录本 3' 端文库的试剂套装。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、具有高分辨大视场特点的原位全转录组信息捕获技术。Stereo-seq 芯片 T（时空 poly-T 芯片）上载有具有空间坐标信息的捕获探针，与组织切片结合后通过探针原位抓取组织内的 mRNA 分子并进行 cDNA 合成。研究人员通过 DNBSEQ 测序和 STOmics 配套的可视化分析工具，可获取特定样本超高分辨率下的空间转录组信息。

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

使用本产品构建的测序文库可使用 DNBSEQ 测序平台进行测序。详情请参考**时空转录组 FF V1.3（含兼容 mIF）建库实验操作说明书**。

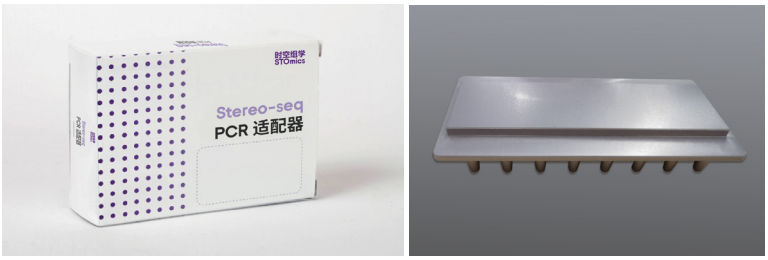
1.3. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成：

- Stereo-seq 转录组试剂盒 T *1（4 RXN）
- Stereo-seq 芯片 T 载体（1cm*1cm）*1（4 EA）
- STOmics Accessory Kit *2（5 PCS）

辅助性耗材：

- （需单独订购）Stereo-seq PCR 适配器 *1（2 EA）



*Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 V1.0 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 1-4。

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 转录组试剂盒 T 货号：201KT13114			
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
Glycerol	1000047910	紫色	100 µL × 1
H&E Mounting Medium*	1000041969	紫色	50 µL × 1
RT Buffer Mix	1000047911	透明	731 µL × 1
RT Plus	1000047912	黄色	18 µL × 1
RT Oligo	1000047913	透明	44 µL × 1
RT Enzyme Mix	1000047914	透明	88 µL × 1
Elute Additive	1000048030	绿色	22 µL × 1
Neutralization Solution	1000047915	绿色	102 µL × 1
4× cDNA PCR Mix	1000047916	蓝色	337 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			

* 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 T 载体（1 cm * 1 cm） 货号：200CT13114		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 T 载体（1 cm * 1 cm）	-	4 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

1.4. 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	-
-	荧光显微镜（拼接功能）	-
-	金属浴（或同等功能仪器）	-
-	离心机	-
-	移液器	-
-	漩涡混匀仪	-
Bio-Rad *	T100 ™ PCR 仪	1861096
Thermo Fisher Scientific *	ProFlex ™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636
Labnet	Slide Spinner (可选)	C1303-T
NEB	NEBNext® Magnetic Separation Rack	S1515S
Thermo Fisher Scientific	DynaMag-2 磁力架	12321D
	Qubit ™ 3.0 荧光定量仪	Q33216 (或同等功能仪器)
Agilent	Agilent 2100 Bioanalyzer	G2939AA (或同等功能仪器)

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
-	无水乙醇（分析纯）	-
Ambion	Nuclease-Free Water	AM9937
	1X TE Buffer, pH 8.0	AM9858
	20X SSC	AM9770
Agencourt [1]	AMPure® XP	A63882
Beckman Coulter[1]	SPRIselect	B23317/B23318/B23319
Vazyme[1]	VAHTS DNA Clean Beads	N411-02
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
	甲醇	34860-1L-R
Invitrogen	Qubit ssDNA Assay Kit	Q10212
	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854
Aladdin[2]	氢氧化钾溶液，8M	P291842
Millipore Sigma[2]	Potassium Hydroxide Solution, 8M（氢氧化钾溶液，8M）	P4494-50ML
Agilent	安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒	5067-4626
	安捷伦高灵敏度 RNA 分析试剂盒	5067-1513
Sakura	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583

从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

耗材		
品牌	描述	产品编号
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	载玻片	-
-	显微镜盖玻片 (尺寸 : 18 mm × 18 mm, 厚度 :0.13 - 0.16 mm)	-
Corning	Corning® 100mm 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
	0.2 mL PCR 管 [1]	PCR-02-C
	PCR 八连管 [1]	PCR-0208-CP-C
	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
Invitrogen	Qubit Assay Tubes	Q32856

从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

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）

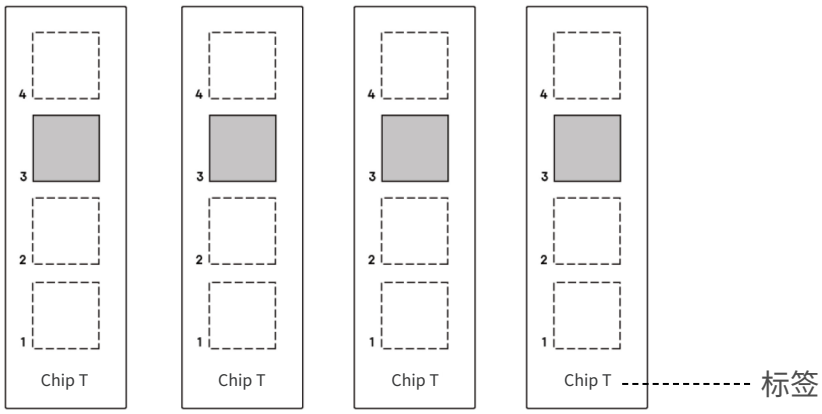
试剂		
品牌	描述	产品编号
Sangon Biotech	伊红 Eosin Y, free Acid	A600190-0025
Sigma [1]	苏木素 Hematoxylin solutionSigma	51275
Solarbio（国产备选）[2]	天青石蓝苏木素	G4470
Agilent [3]	返蓝试剂 Bluing Buffer	CS702
DAKEWE（国产备选）[4]	返蓝试剂 Bluing Buffer	4960311-5
耗材		
-	一次性无菌注射器	-
津腾 [5]	针筒式过滤器	JTSF0303
Millipore [5]	Millex 针式过滤器	SLGV033N

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。

1.5. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍

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



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（P/T）载体保存方法

Stereo-seq 芯片 P/T 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。

1.6. 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

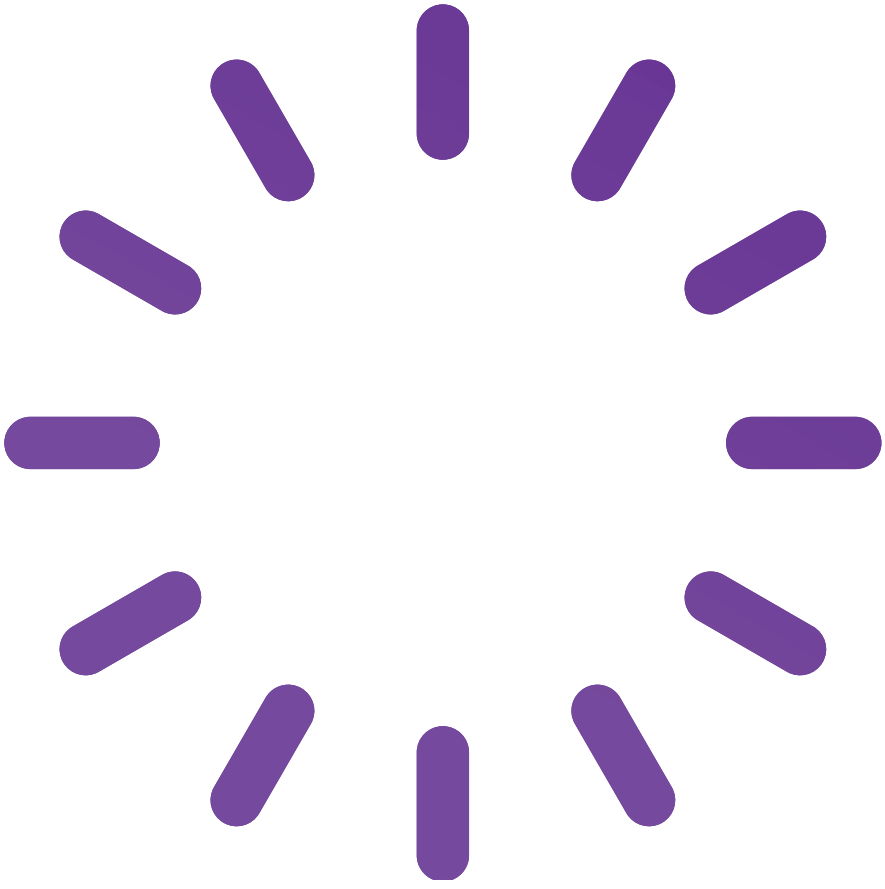
请参照**《时空实验 FF 样本准备操作指南》**进行样本准备。

建议对 RIN ≥ 4 的样本进行后续实验。

第三章

时空转录组 FF V1.3

转录组实验标准操作流程



3.1. 实验前准备

在进行标准操作流程之前，组织的最佳透化时间需要通过透化试剂套装预先确定。详情请参考 《时空转录组 FF V1.3 透化测试操作说明书》。

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

第一天

准备试剂	准备流程	暂存条件
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 稀释到 20 mL	室温
甲醇	提前－ 20°C中预冷	－ 20°C
0.1X SSC	取 20X SSC 100 µL 稀释到 20 mL	室温
Wash Buffer	取 15 µL RI 加入 285 µL 0.1X SSC 中，用量至少为 300 µL/ 样本 Stereo-seq 兼容 H&E 染色：取 30 µL RI 加入 570 µL 0.1X SSC 中，用量至少 600 µL/ 样本	冰上备用
0.01N HCl	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值约为 2（至少 2 mL/ 样本）	室温 48 hr
0.01N HCl 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 1 mL 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 10X 透化试剂储存液 15 µL 稀释到 150 µL（至少 150 µL/ 芯片）	冰上备用 6 hr
0.1M KOH	取 10 µL 8M KOH 稀释到 800 µL，每张芯片用量 195µL	室温 48 hr
0.1M KOH 需现配现用。对于新购买的 KOH，实验前请检查 pH 值（稀释到 1M，pH 值为 14±0.3）。 请在使用前再进行配置。		
Glycerol	提前 5 min 取出平衡至室温，每张芯片用量 5 µL	室温
Elute Additive	提前 5 min 取出放于冰上备用 , 每张芯片用量 5 µL	冰上备用
Neutralization Solution	提前 5 min 取出放于常温备用 , 每张芯片用量 23 µL	室温
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 24 hr
磁珠	提前取出，室温放置 30 min 平衡	室温 6 hr

准备仪器	设置程序	备注
冷冻切片机	箱体预冷至－ 20°C，样本头预冷至－ 15°C ~ － 10°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 (热盖 60° C) 45° C Hold，用于反转录 (热盖 60° C) 55° C Hold，用于 cDNA 释放 (热盖 60° C) 95° C Hold，用于 变性 (热盖 105° C)	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	FITC 通道（荧光染色） 落射明场 BF-EPi 通道 (H&E 染色)	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 μm 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 μL	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 μL	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。

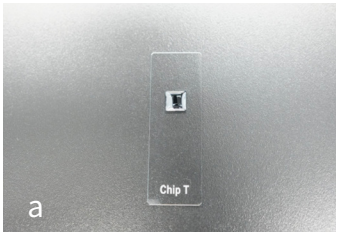
3.3. 芯片处理与组织贴片

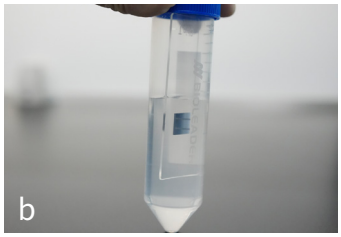
有关组织切片到 Stereo-seq 芯片载体上的演示视频，请参阅以下链接或扫描二维码：
https://www.stomics.tech/resources/Videos

a. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出 Stereo-seq 芯片 T 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的 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。

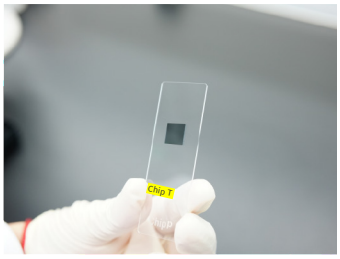
b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 µL Nuclease-Free Water 清洗 2 次，可参考图 a；或在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中清洗 2 次，可参考图 b；





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. 如芯片表面无杂质、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

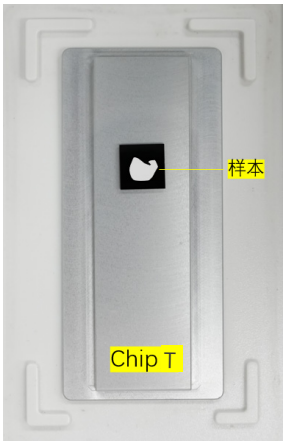
1）连续切取组织切片，将切片移到切片台右侧靠近边缘处，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，每张切片放置间隔距离大于载体宽度；

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。



B. 冷贴

1）将玻片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；

预冷时间不可过长，以免玻片表面产生水雾；预冷时间不可太短，以免玻片无法达到预冷温度。

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；

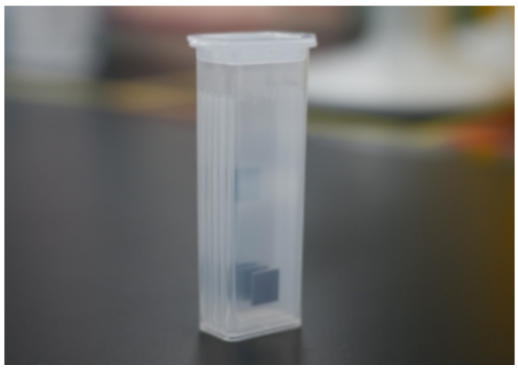
4）重复上述操作，直至所有切片贴片完成，建议组织切片贴片控制在 **5 min** 内；

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，间隔时间太大，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

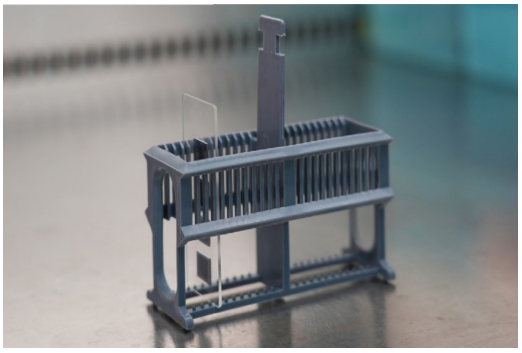
Stereo-seq 兼容 H&E 染色的产品方案包含 H&E 染色工作流程，包含组织固定与伊红染色、苏木素及返蓝染色、H&E 封片和拍照的操作，具体操作步骤参考**附录 A**。如后续不需要使用 **Stereo-seq 兼容 H&E 染色的产品方案**，可以直接进行下面的**步骤 a**。

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. 固定期间参考 **3.5. 荧光染色**表格 3-1 提前配置组织荧光染色液，**室温避光保存备用**；

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，将载体转移至实验台上进行下一步。

3.5. 荧光染色

a. 将组织荧光染色液加到芯片上，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，室温避光染色 **5 min**；

提前将 Glycerol 置于室温平衡 5 min。

表格 3-1 组织荧光染色液

组分	1X (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	94.5	207.9	311.9	415.8
Qubit ssDNA Reagent	0.5	1.1	1.6	2.2
RI	5	11	16.5	22
Total	100	220	330	440

b. 染色期间配制 **300 μL/ 芯片**的 Wash Buffer；

c. 染色期间参考 3.7. 组织透化 表格 3-2 提前准备好 1X 透化试剂工作液；

d. 提前将一个金属浴或其他同等功能仪器温度设置到 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书》将垫圈与夹具组装成载具（不含芯片载体）；

在组装载具时避免接触到芯片正面。

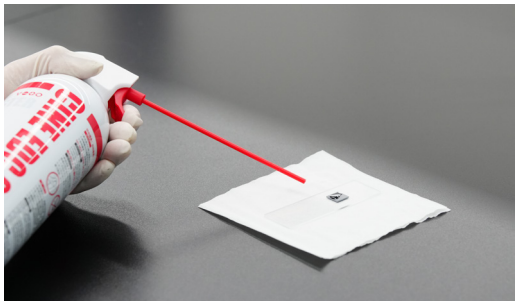
f. 将载具放置于 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，37°C孵育 **10 min**。1X 透化试剂工作液使用前置于金属浴或者其他同等功能仪器中 37°C孵育 **10 min**（最长时间不超过 **30 min**）；

g. 倾斜载体，用移液器从芯片一角吸去组织荧光染色液，尽量减少表面液体；

h. 向芯片加入 Wash Buffer，用量为 **100 μL/ 芯片**；

i. 倾斜载体，用移液器从芯片一角吸弃 Wash Buffer，尽量减少表面液体；

j. 将载体转移至无尘纸上，一手固定载体，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°倾角缓慢吹气，从芯片角落起始顺序推进，吹干芯片表面液体，勿使气流过猛；

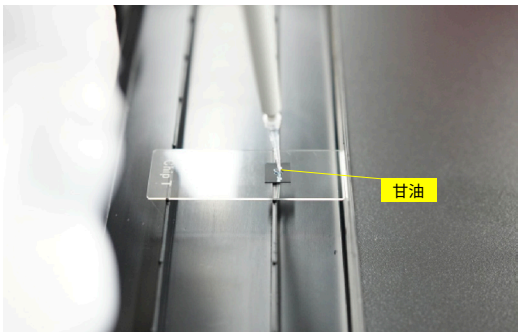


k. （**可选操作**）使用载玻片离心机（微型玻片离心机 LX-700）离心 **10 s** 甩干芯片上液体；

确保芯片上没有残留的染色液。

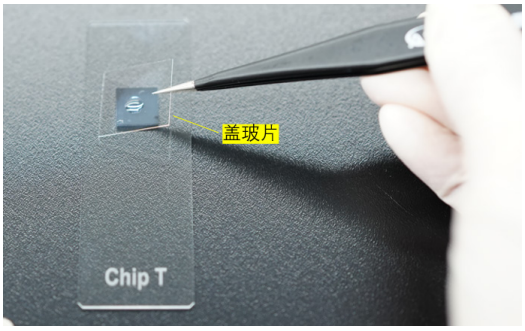
确保已将 Glycerol 提前置于室温平衡 5min。

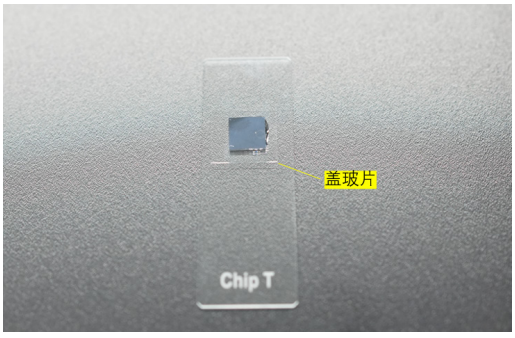
l. Glycerol 使用前离心，确保甘油中无气泡，用移液器缓慢吸取 5 μL Glycerol 甘油滴加到组织中央，避免产生气泡；



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。

m. 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，立即拍照，避免荧光猝灭。





3.6. 荧光拍照

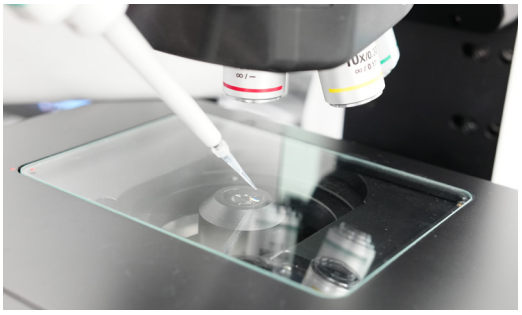
成像过程需要保证染色通道的 Track 线和组织区域同时清晰且组织区域不过曝。

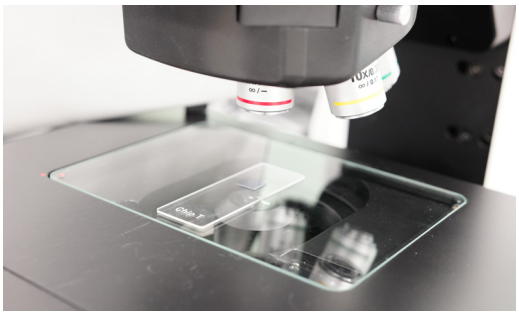
a. 在显微镜控制软件中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；

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

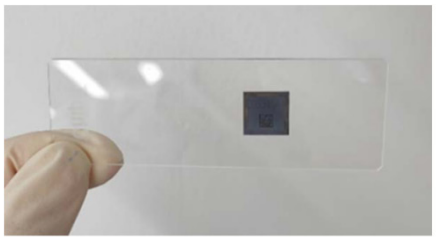
b. 用显微镜的玻片夹将载玻片固定，如没有玻片夹，则在载物台上滴加 1-2 μL 水，将载玻片置于水滴上以起到固定作用如下图；



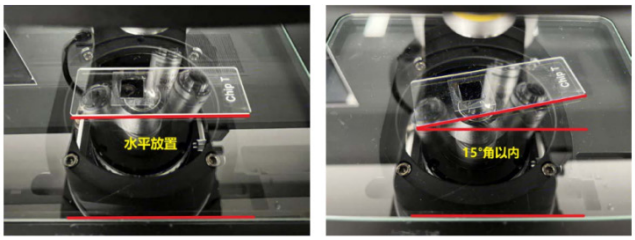


c. 载玻片轻放在载物台上，尽量与载物台平行；

要求芯片边缘水平角度小于 15°，芯片位置 chip T 手柄始终在右侧。



芯片放置图 (背面): 芯片号在上，二维码在下



芯片放置图（正图）：手柄在右侧

d. 打开荧光显微镜，选择落射荧光模式（FITC 通道 (ssDNA)）；

e. 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，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）；

f. 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 4X 物镜下扫描地图，以便确定正式扫描区域；

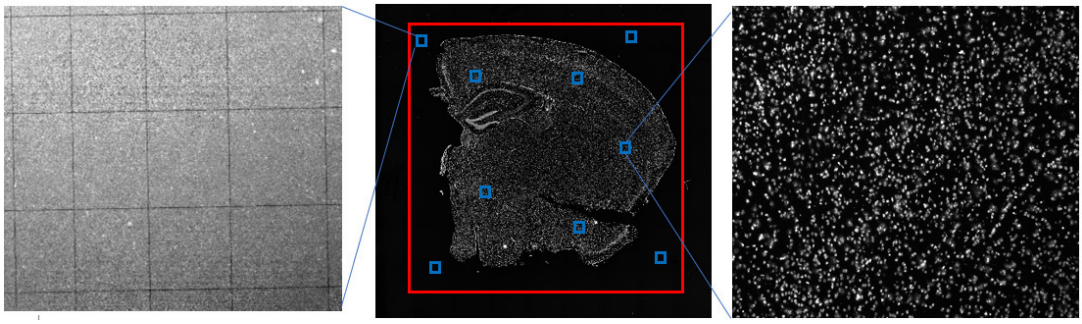
如果显微镜无扫描地图功能，直接跳过该步骤。

g. 调整显微镜倍数：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；

h. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

i. 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）；

对于仅支持自动对焦策略的显微镜无需考虑本策略。



j. 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；

k. 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；

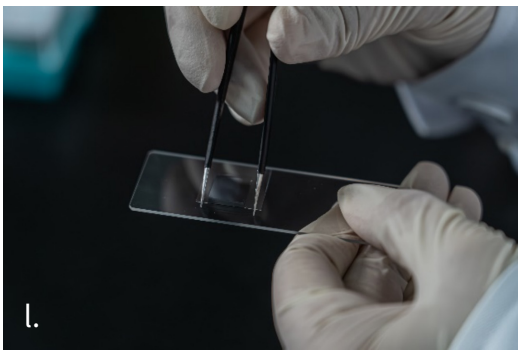
⊙ 更为详细的注意事项请参考**《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》**。

QC 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）。

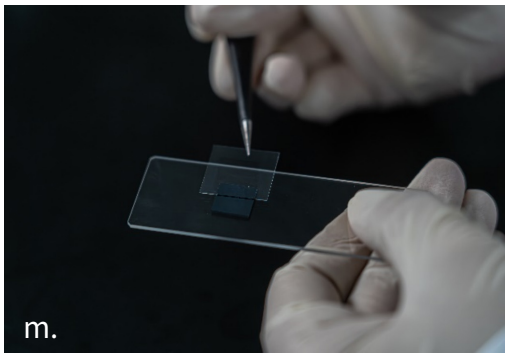
如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，可以继续实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 手动图像处理。

拍照完成后，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。

l. 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；



m. 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；



n. 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。

o. 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。

3.7. 组织透化

a. 提前取出 RT Buffer Mix， RT Plus 和 RT Oligo 置于室温解冻，RT Oligo 解冻后置于冰上备用；

表格 3-2 1X 透化试剂工作液配制

组分	1X (µL)	2X + 10% (µL)	3X + 10% (µL)	4X + 10% (µL)
0.01N HCl	135	297	445.5	594
10X 透化试剂储存液	15	33	49.5	66
Total	150	330	495	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；

c. 将手持载具转移到 PCR 适配器上，加入 1X 透化试剂工作液，用量为 **150 µL/ 芯片**，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，将封板膜（不要撕开，包含白底）放置于载具上覆盖反应孔，盖上 PCR 仪盖，37°C孵育；

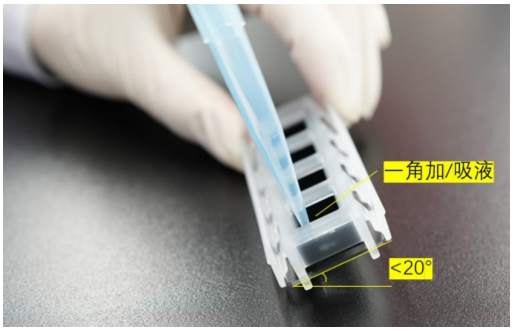
确保芯片被 1X 透化试剂工作液完全覆盖。

最佳透化时间通过 Stereo-seq 透化测试实验预先确定，详情请参考**《时空转录组 FF V1.3 透化测试操作说明书》**。

d. 在等待透化期间，参考 **3.8. 反转录反应**表格 3-3 配制 RT Mix, 放置于冰上待用；

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. 倾斜角度小于 20°，用移液器从反应孔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，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片湿润。

避免芯片完全干燥。

3.8. 反转录反应

a. 取出配制好的 RT Mix 吹打混匀后瞬时离心，在芯片一角加入 RT Mix，用量为 **200 µL/ 芯片**，确保 RT Mix 均匀覆盖全芯片；

表格 3-3 RT Mix

组分	1X (µL)	2X + 10% (µL)	3X + 10% (µL)	4X + 10% (µL)
RT Buffer Mix	166	365.2	547.8	730.4
RT Plus	4	8.8	13.2	17.6
RT Oligo	10	22	33	44
RT Enzyme Mix	20	44	66	88
Total	200	440	660	880

b. 使用封板膜密封载具，将手持载具放置于 PCR 仪（45°C）的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪热盖，反应 **2 hr** 或以上，最长不超过 **5 hr**。

3.9. cDNA 释放与变性

a. 提前 **5 min** 配制，按照表格 3-4 配制 cDNA Release Mix，室温放置；

表格 3-4 cDNA Release Mix 配制

组分	1X（μL）	2X（μL）	3X（μL）	4X（μL）
0.1M KOH	195	390	585	780
Elute Additive	5	10	15	20
Total	200	400	600	800

b. 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 ∞。

c. 微微倾斜手持载具，用移液器从反应孔的一角吸弃芯片表面的 RT Mix；

d. 加入 0.1X SSC，用量为 **200 μL/ 芯片**；

e. 微微倾斜手持载具，用移液器在芯片一角吸弃 0.1X SSC；

f. 加入 cDNA Release Mix，用量为 **180 μL/ 芯片**；

注意用量为 180 μL/ 芯片，而不是 200 μL/ 芯片。

g. 用封板膜对手持载具进行封口，压紧反应孔边缘，防止反应液挥发，置于 PCR 仪（55°C）的 PCR 适配器上反应，计时器计时 **10 min**；

h. 反应 **10 min** 后，从 PCR 仪中取出手持载具，置于桌面上，小心撕掉封板膜；

注意不要让液体溅出。

i. 用移液器在芯片表面吸打 10 次，芯片表面的组织会脱落，请勿用枪头触碰组织。若吸打完 10 次后仍有少量组织残留，可不用处理继续进行后续步骤；

请注意不要把 cDNA Release Mix 吹打到垫圈上。

j. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，再从芯片一角吸出 cDNA Release Mix，转移至一个 1.5 mL 离心管中， 若芯片与垫圈间的缝隙有液体也一并吸出到同一离心管中；

k. 在离心管中直接加入 23 μL Neutralization Solution，涡旋混匀；混匀后测量体积不够 198 μL，可直接用 Nuclease-Free Water 补足；

l. 把上步的溶液分装到 3 个 PCR 管中，每管约 66 μL，放入 PCR 仪中，按如下程序反应。

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	-
95°C	5 min	1
12°C	∞	1

此步骤后，请再次确认载体上所有芯片背面的编号，并确保所有芯片编号与产物收集管标号准确对应。

请将释放后的芯片放置 4°C冰箱暂存，待整个实验和分析流程完成后再丢弃。

3.10. cDNA 扩增与纯化

3.10.1. cDNA 扩增

a. 按照表格 3-5 配制 PCR Mix，吹打混匀后瞬时离心，冰上保存；

表格 3-5 PCR Mix

组分	1X (µL)	2X + 10% (µL)	3X + 10% (µL)	4X + 10% (µL)
4× cDNA PCR Mix	76.5	168.3	252.5	336.6
cDNA Primer	12	26.4	39.6	52.8
Nuclease-Free Water	13.5	29.7	44.5	59.4
Total	102	224.4	336.6	448.8

b. 在 3.9-l. 步骤 的 3 个 PCR 管的 66 µL cDNA 中分别分装 34 µL PCR mix，涡旋混匀；

c. 瞬时离心，按照表格 3-6 PCR 程序进行扩增；

表格 3-6 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	13
58° C	20 s	
72° C	3 min	
72° C	5 min	1
12° C	∞	-

停止点：此步骤可 PCR 过夜或者此步骤产物可在 4°C下暂存，最长不超过 16 hr。

d. 按照表格 3-7 配制 Qubit dsDNA Mix；

表格 3-7 Qubit dsDNA Mix

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

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）；

e. 振荡混匀后取 1 µL PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录；

QC DNA 浓度通常高于 5 ng/µL。

QC 若浓度低于 5 ng/µL，并且确认前面步骤无误的情况下，参考 3.10.2. 纯化 进行 1X 磁珠纯化，溶于 72 µL TE，回收 70.5 µL，加入 25.5 µL 4X PCR mix 和 4 µL cDNA primer，混匀离心后再 PCR 8 个循环（参考表格 3-6 PCR 扩增程序），继续参考 3.10.2. 纯化 步骤进行 0.8X 磁珠纯化完成操作。

3.10.2. cDNA 纯化

背景信息

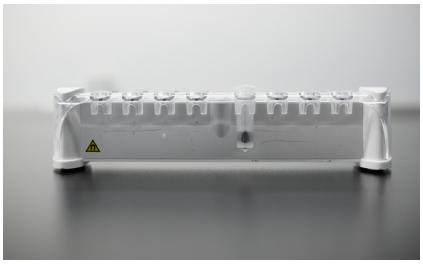
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP（Agencourt, Cat. No. A63882）进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

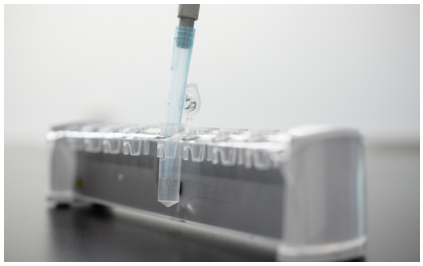
- 提前 **30 min** 从 4°C取出，涡旋混匀且平衡至室温，有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吸打，确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高，纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

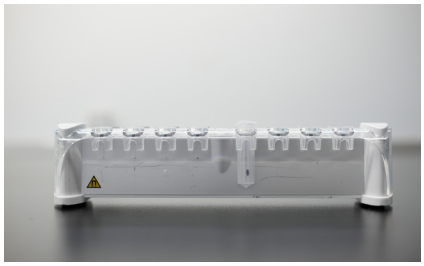
磁珠操作注意事项

- 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。

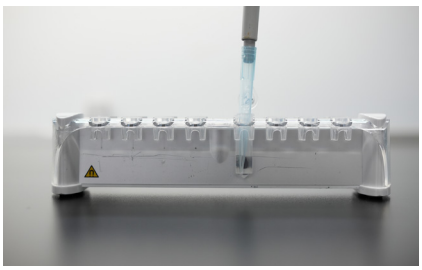


- 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留 2-3 µL 液体，以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。

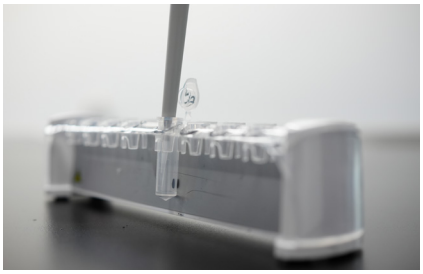




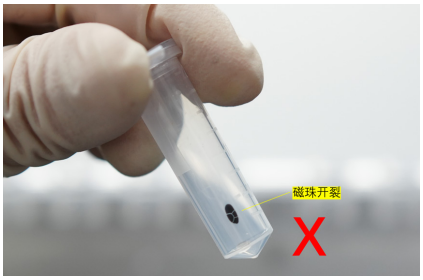
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠。

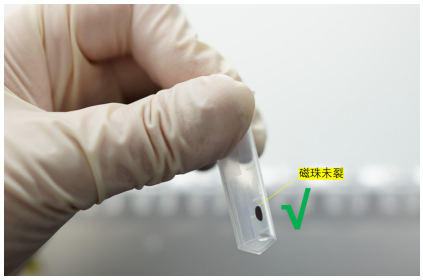


- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。

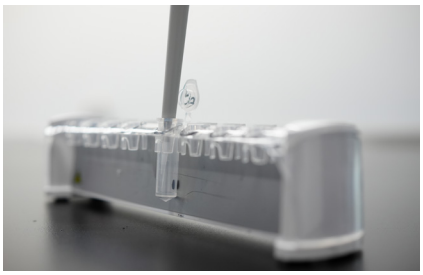


- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成乙醇残留，影响后续反应，过度干燥（磁珠开裂）会降低回收得率。通常情况下，室温干燥需要 **5-10 min**，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察。直至磁珠表面无反光，即可用 TE Buffer 或 Nuclease-Free Water 进行产物洗脱。

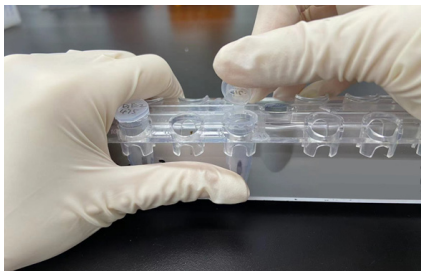




- 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应。所以，最终吸取的上清可比用于洗脱的 TE Buffer 或 Nuclease-Free Water 的体积少 ~2 µL。



- 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。



a. 对 PCR 产物进行 0.8X 磁珠纯化：

1）将同一个 cDNA 的 3 管 PCR 产物混合到一起（300 µL），与室温平衡好的磁珠按照 1 : 0.8 混合，震荡混匀，室温孵育 **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 600 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**；

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 100 µL 的 TE Buffer 回溶，震荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清（~98 µL）转移到新的 1.5 mL 离心管中。

停止点：

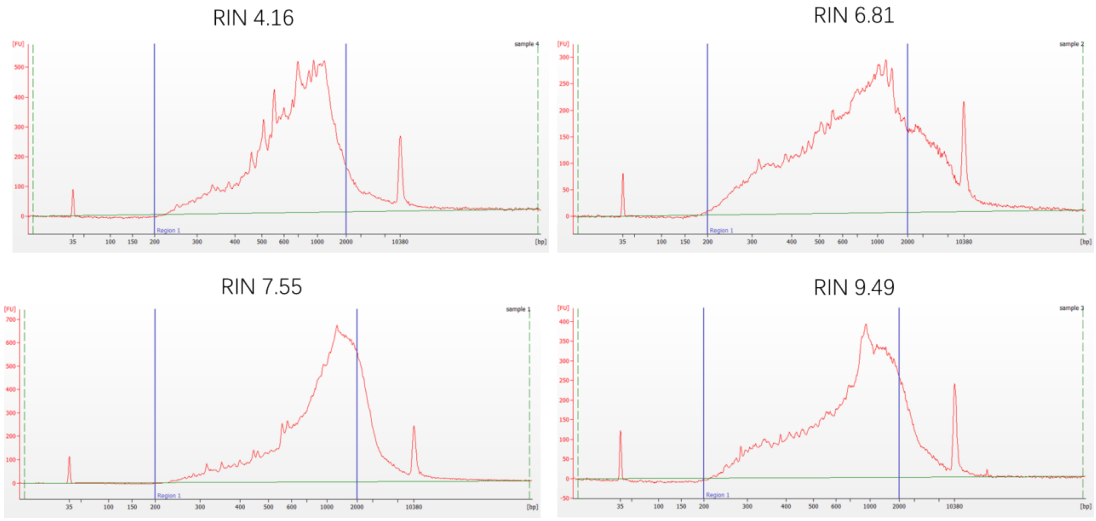
· cDNA 纯化产物可在 − 20°C下保存 1 个月。

QC 纯化后，可用 40 µL Nuclease-Free Water 在 4°C保存磁珠，直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

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

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。

QC 片段分布在 200-2000 bp 左右（如图二），纯化后产量通常大于 100 ng。



图二 . cDNA 扩增产物 2100 峰图

⊙ 后续文库构建具体操作参考《时空转录组 FF V1.3(含兼容 mlF) 建库实验操作说明书》。

注意：**《时空转录组 FF V1.3 转录组实验操作说明书》** 只能搭配 **《时空转录组 FF V1.3(含兼容 mlF) 建库实验操作说明书》**。

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**）；

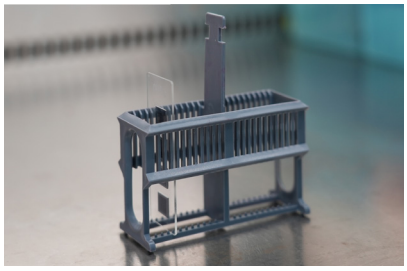
b. 将芯片转移到 -20°C预冷的醇溶伊红溶液中染色 **3 min**，确保伊红溶液浸没过所有芯片（可根据组织着色均匀情况调整，染色时间控制在 **3-5 min** 的范围内）；

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。此时可检查显微镜已经打开并切换到（落射明场（彩色拍照），BF-Epi 通道模式）。

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；

在提前分装好的染液中加入 5% 体积的 RI，振荡混匀，请勿置于冰上，并控制在 **5 min** 内使用。如果同时做多张芯片载体，则需要按单张芯片载体的试剂用量现用现配。

试剂配制

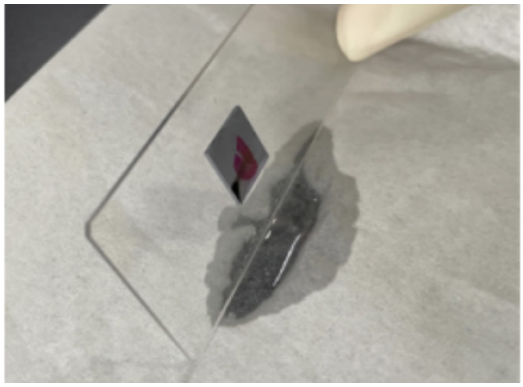
准备试剂	准备流程	储存
苏木素染色液（含 5%RI）	每张芯片至少准备 100 µL（95 µL 滤后苏木素 + 5 µL RI）	室温避光 5 min
Bluing Buffer（含 5%RI）	每张芯片至少准备 100 µL（95 µL Bluing Buffer + 5 µL RI）	室温 5 min

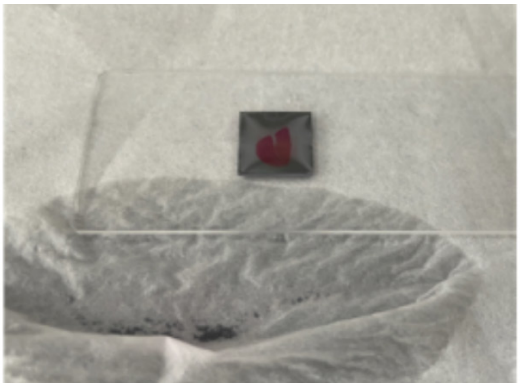
b. 在芯片表面滴加苏木素染色液 100 µL（含 5% RI）。先在芯片的每个角加入一滴染色液，然后将其余染色液加到芯片中央，使所有染色液融合，确保染色液均匀覆盖全芯片，室温孵育时间根据选择苏木素不同品牌调整；

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 Wash Buffer 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，含 5% RI）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 Wash Buffer 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；

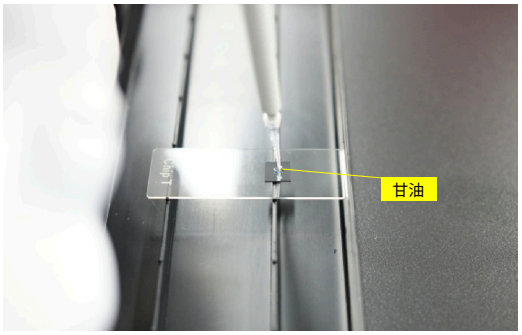
i. 将芯片转移至无尘间的缝隙，一只手固定载体，另一只手持空气罐，出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30°倾角快速吹干芯片，注意吹干载玻片表面以及芯片与载玻片缝隙间的液体，可用无尘纸擦掉芯片周围的液体；

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；

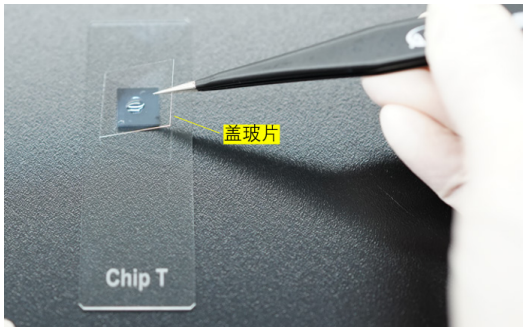
滴加 H&E Mounting Medium 以后，建议立刻封片。

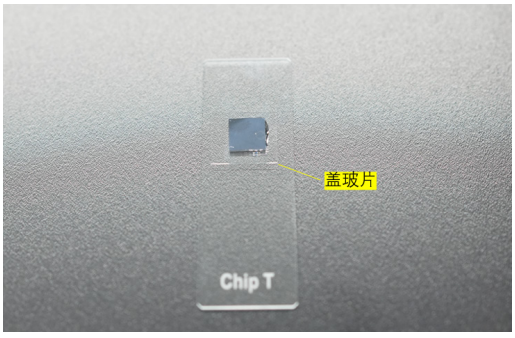
H&E Mounting Medium 管盖颜色与 Glycerol 相同，使用时请注意区分。



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。

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，立即安排拍照。





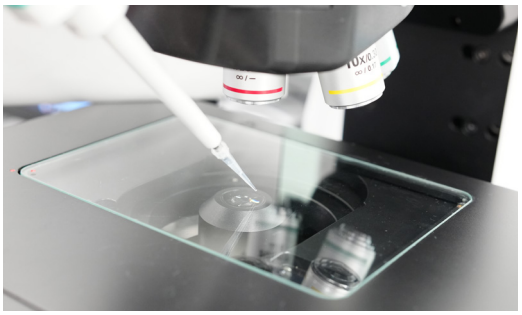
3.6. H&E 染色拍照

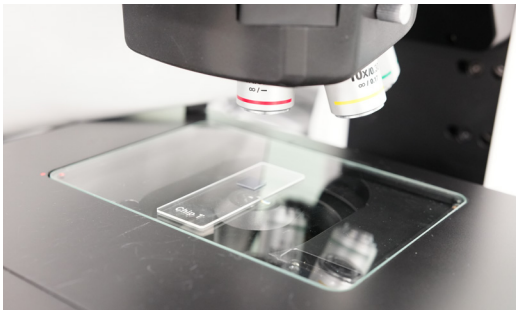
a. 在显微镜控制软件中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；

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

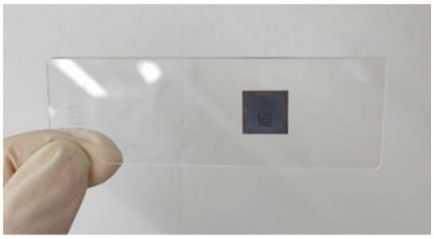
b. 用显微镜的玻片夹将载玻片固定，如没有玻片夹，则在载物台上滴加 1-2 μL 水，将载玻片置于水滴上以起到固定作用如下图；



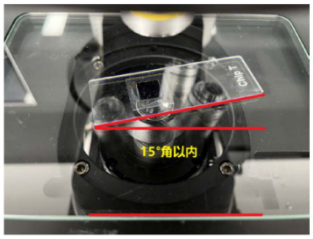


c. 载玻片轻放在载物台上，尽量与载物台平行；

要求芯片边缘水平角度小于 15°，芯片位置 chip T 手柄始终在右侧。



芯片放置图 (背面): 芯片号在上，二维码在下



芯片放置图（正图）：手柄在右侧

d. 打开荧光显微镜，选择落射明场（彩色相机）模式；

e. 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，调整亮度和曝光，调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

f. 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 4X 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。

g. 调整显微镜倍数：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；

h. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

i. 白平衡：判断组织区域颜色是否正确，如果有问题，选择无组织区域和干净无杂质的区域，进行白平衡校正；

j. 背景平衡：将视野移至芯片空白区域，进行背景平衡。选择无组织区域和干净无杂质的区域，调整细准焦螺旋 / 鼠标滚轮进行散焦（z 轴浮动 ±200 以内），如果先前选择的区域中有小杂质，散焦后应该几乎不可见，区域内的 Track 线也不可见，最后选择“背景平衡”；

k. 再次定焦：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

l. 对焦策略：将视野移至芯片空白区域，视情况微调亮度 / 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，视情况微调亮度 / 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）；对于仅支持自动对焦策略的显微镜无需考虑本策略；

m. 最终成像：完成建模后，随即进行扫描；拍照完成后，保存整个文件夹；

n. 打开“StereoMap->Tools->imageQC“模块，拖入 H&E 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》。

QC 获得的 H&E 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）。

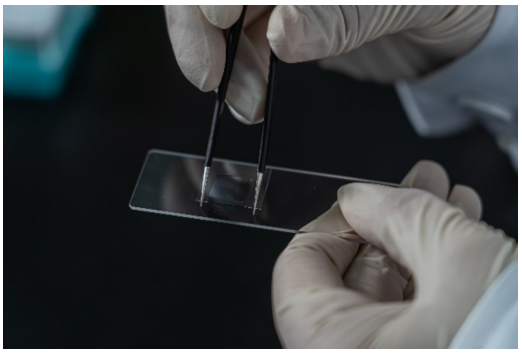
⚠ 如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，可以继续实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 手动图像处理。

⛔ 拍照完成后，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。

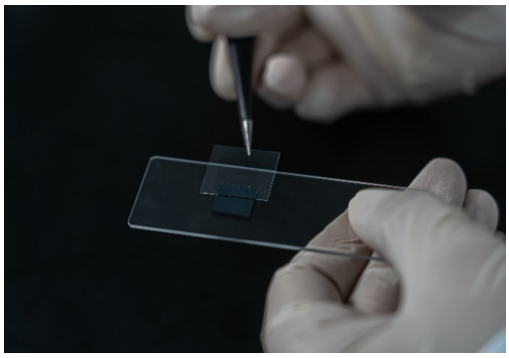
o. 参考附录 B《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》将垫圈与夹具组合成载具 (不含芯片载体)，将载具放置于 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，37° C 孵育 **10 min**；

p. 1X 透化工作液使用前置于 PCR 仪或者金属浴中 37° C 孵育 **10 min** (最长时间不超过 **30 min**) ；

q. 透化酶孵育结束前 **3 min** 左右，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹起盖玻片一角；



r. 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；



s. 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。

t. 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；

u. 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 ;

v. 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 。

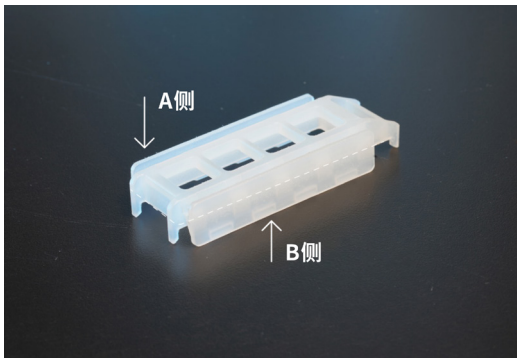
在组装载具时避免接触到芯片正面。

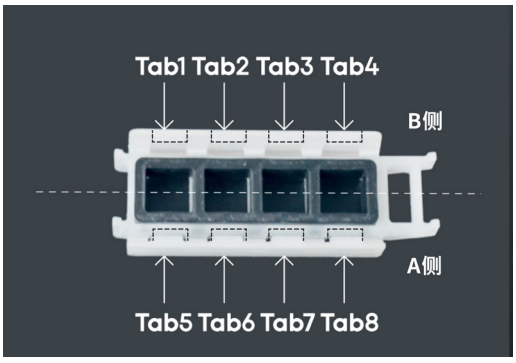
请返回参考 **3.7. 组织透化**，继续实验操作。

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。



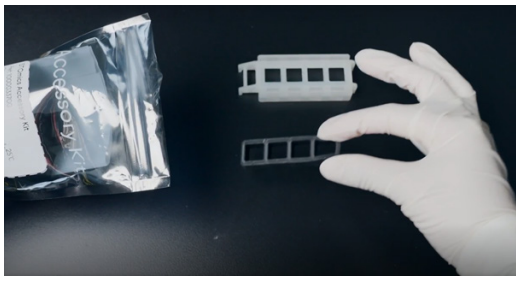


组装方法

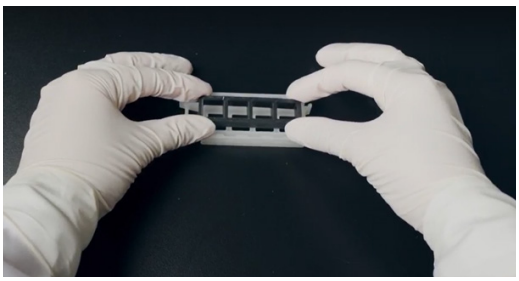
组装方法视频参考网址：

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

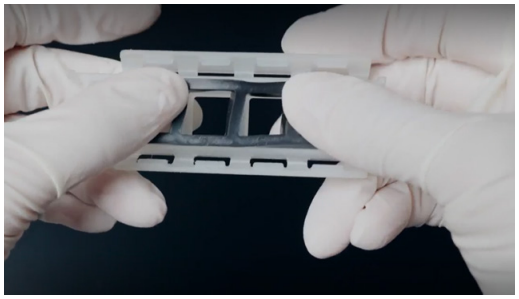
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



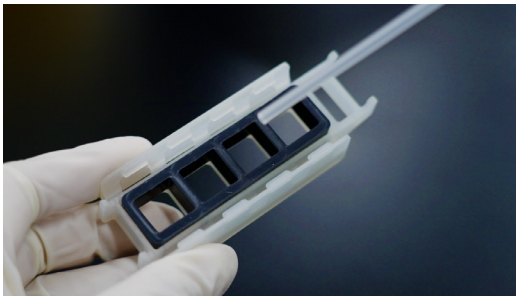
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



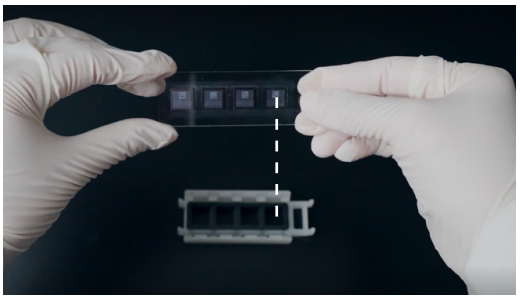
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



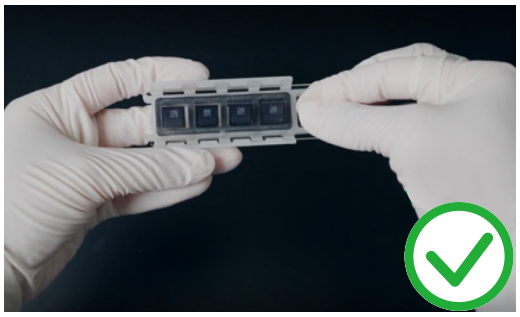
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；

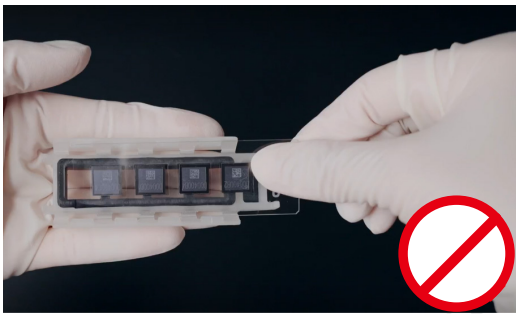


e. 拿起 Stereo-seq 芯片载体，芯片面朝下，将芯片载体标签朝夹具的长边卡扣方向；

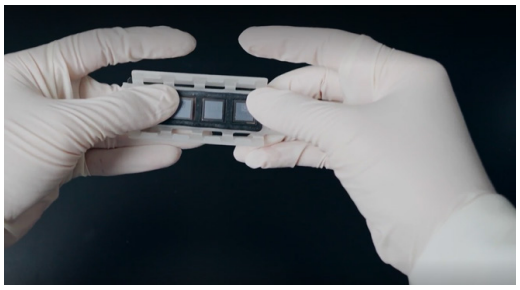


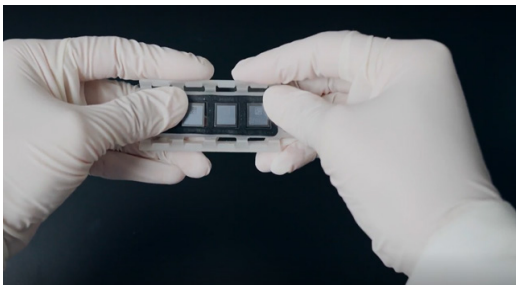
f. 芯片对准垫圈孔位，避免夹具和垫圈接触芯片表面；



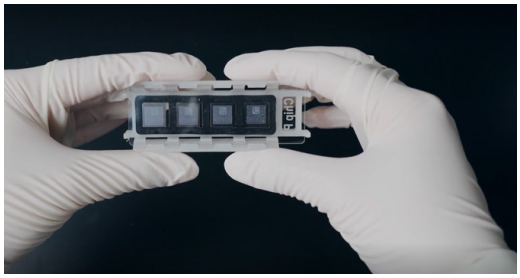


g. 先将芯片载体卡进夹具下方 4 个卡扣。双手中指支撑夹具的正面，左手拇指放在 tab 1 和 tab 2 之间，右手拇指放在 tab 3 和 tab 4 之间，拇指匀力向下按压芯片载体，直至听到“咔”的一声。双手食指用力向下按压夹具顶部边缘，将载体卡进夹具上方 4 个卡扣；

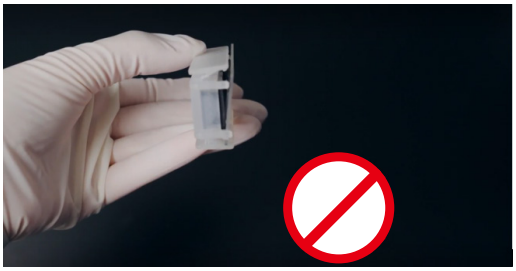




h. 沿着夹具卡带两侧按压，确保夹具与芯片载体稳固组装在一起；

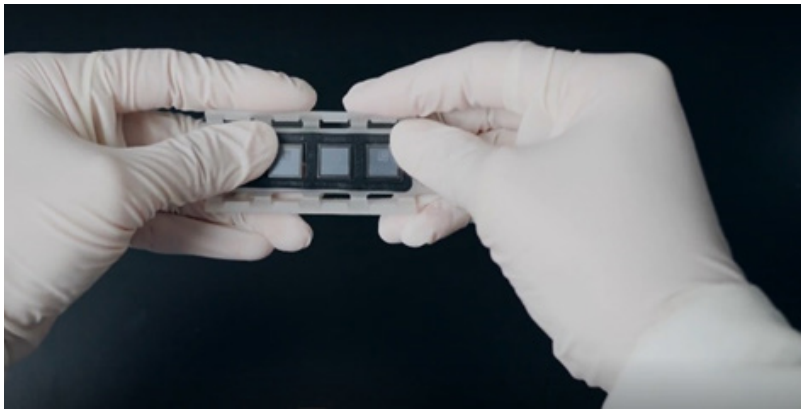
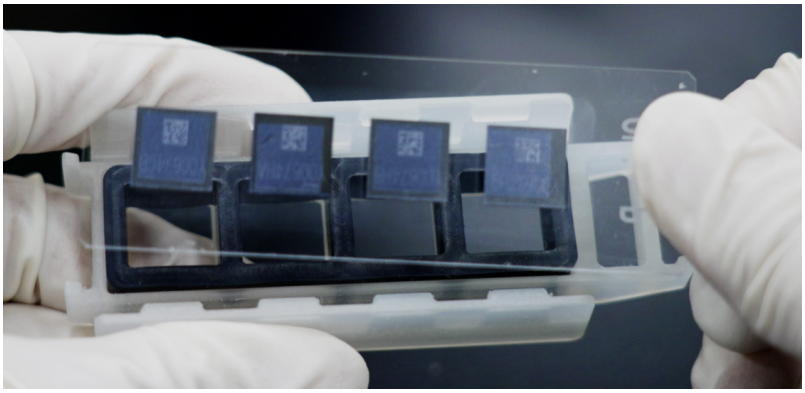


i. 最后检查组装好的夹具和芯片载体，确保位置正确。



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。