

# 时空转录组 FF V1.3 兼容 mIF 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：STOG01018

说明书版本号：A

# 版本历史

说明书版本：A  
试剂盒版本：V 1.3  
修订日期：2025 年 3 月  
描述：首次发布

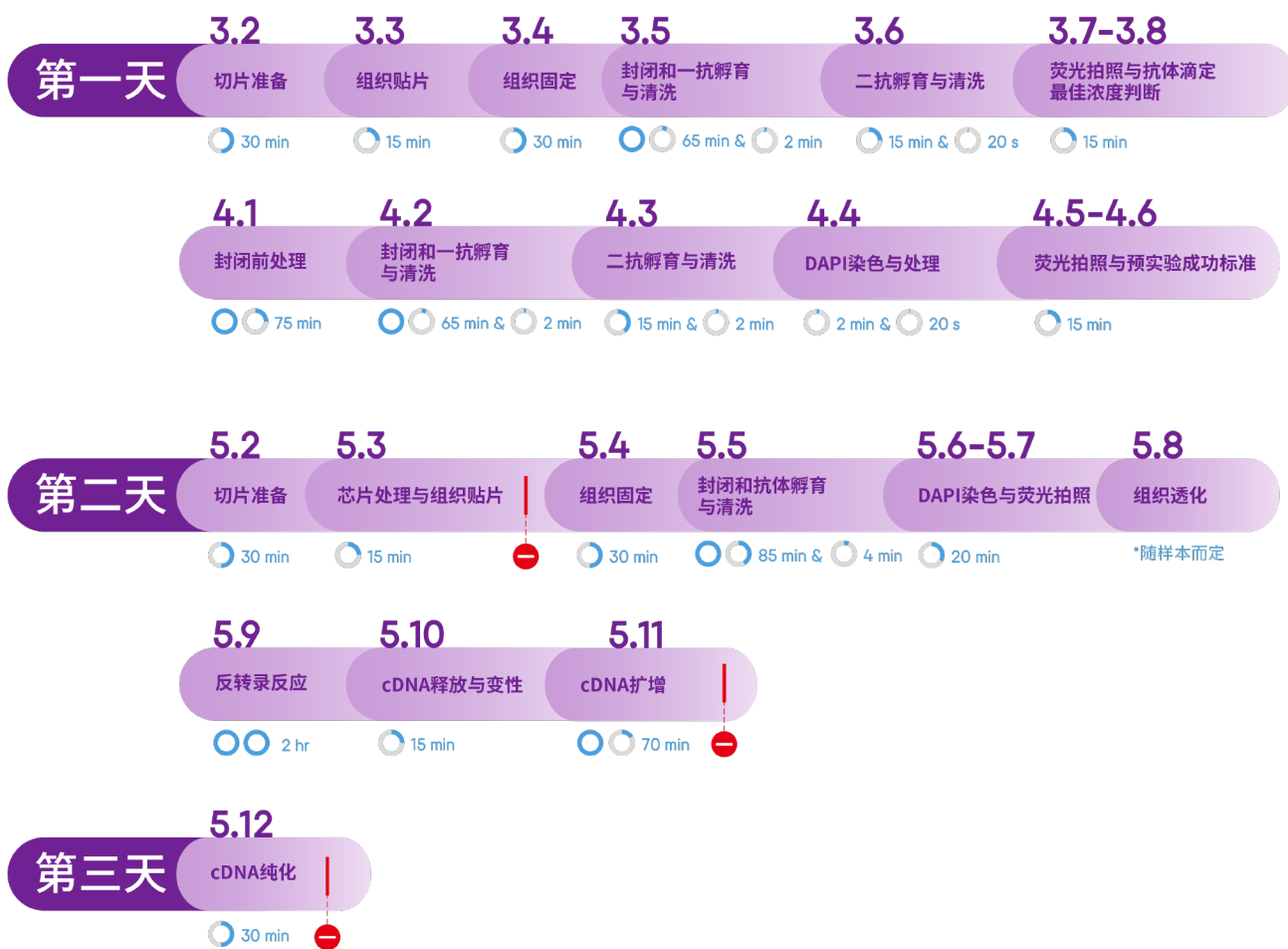
**提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。**

©法律声明。

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



🕒 总耗时: ~ 3 天

# 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	3
1.4. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍	4
1.5. 注意事项	4

## 第二章 样本准备

## 第三章 抗体滴定

3.1. 实验前准备	8
3.2. 切片准备	9
3.3. 组织贴片	9
3.4. 组织固定	10
3.5. 封闭与一抗孵育	11
3.6. 孵育二抗	12
3.7. 荧光拍照	12
3.8. 抗体滴定最佳浓度选择标准	13

## 第四章 mIF 预实验

4.1. 封闭前处理	15
4.2. 封闭与一抗孵育	15
4.3. 孵育二抗	17
4.4. DAPI 染色	17
4.5. 荧光拍照	18
4.6. mIF 预实验成功标准	18

## 第五章 时空转录组 FF V1.3 兼容 mIF 转录组 实验标准操作流程

5.1. 实验前准备	20
5.2. 切片准备	22
5.3. 芯片处理与组织贴片	23
5.4. 组织固定	25
5.5. 封闭和抗体孵育	26
5.6. DAPI 染色	28
5.7. 荧光拍照	30
5.8. 组织透化	34
5.9. 反转录反应	35
5.10. cDNA 释放与变性	36
5.11. cDNA 扩增	38
5.12. cDNA 纯化	40

## 附录 Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书

Stereo-seq 载体配件包	43
组装方法	43
拆卸方法	45



**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**

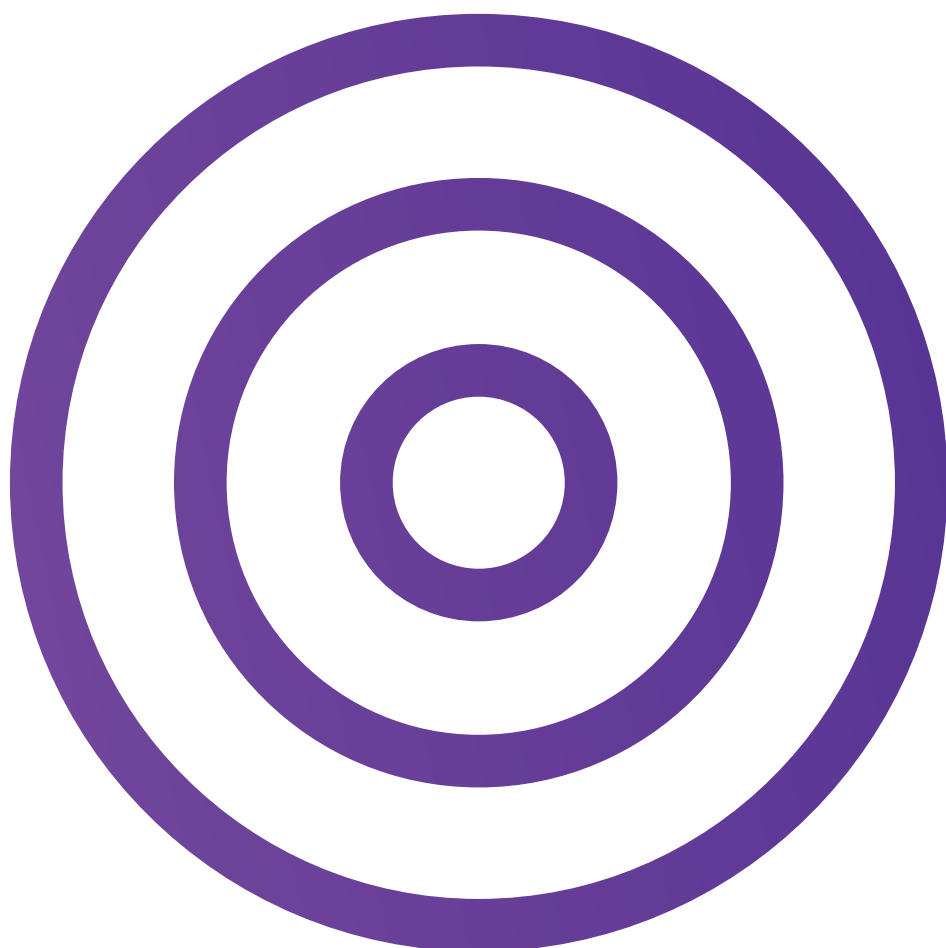


**注意：**特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。



**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组 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，可获得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多重免疫荧光 (mIF) 染色，研究人员可以实现在同一张组织切片上获得多个蛋白的免疫荧光照片和全转录组信息。在不影响转录组捕获的前提下，额外获得的蛋白检测信息，能与基因表达数据相整合，更深入、更完整地评估宝贵的样本，解析复杂的病理或生理过程。检测的目标蛋白数量取决于抗体选择和成像配置，目前可支持 DAPI+ 多达 3 个 IF 靶标的检测。

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. 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 (1 cm\*1 cm) \*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 文库试剂盒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

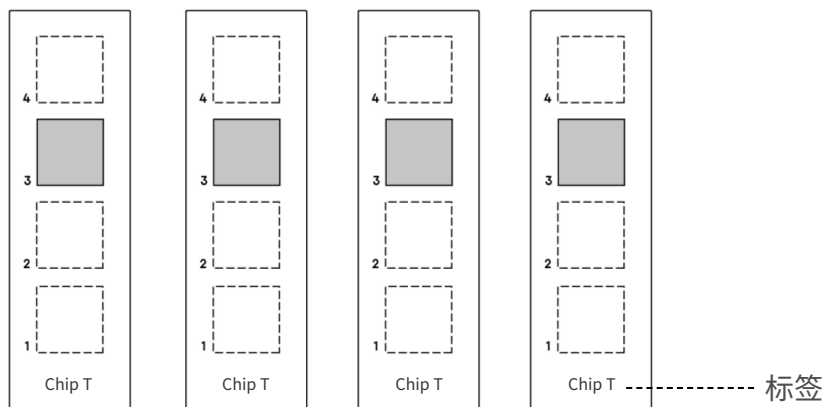
### 1.3. 需自备物料清单

本实验所需的设备和物料请参考 [《时空转录组 FF V1.3 兼容 mIF 生化流程第三方物料需求表》](#)，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。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/>

## 1.4. 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



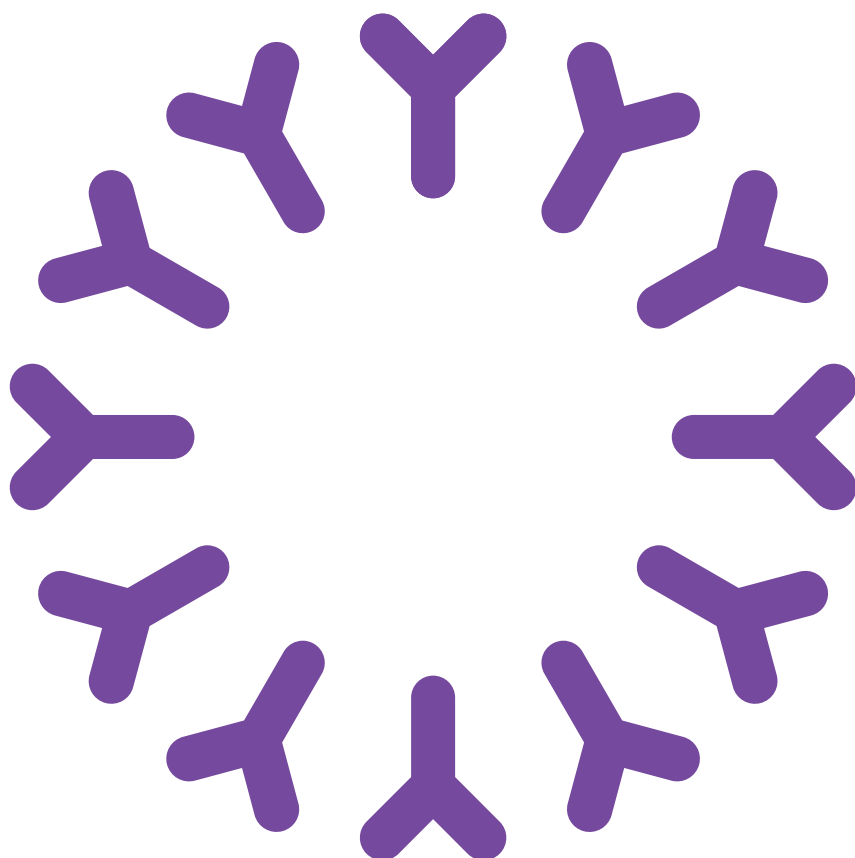
请参照 [《时空实验 FF 样本准备操作指南》](#) 进行样本准备。



 建议对  $RIN \geq 4$  的样本进行后续实验。

# 第三章

## 抗体滴定



常规多重免疫荧光 (mIF) 技术通过使用不同种属来源的一抗识别不同的靶标, 并通过不同荧光标记的二抗来检测相应的一抗, 从而实现多个靶标的空间定位。抗体的选择对于 mIF 实验的成功至关重要, 因为它们的性能直接影响到数据的质量。抗体的选择遵循常规 mIF 的选择原则, 需要考虑加入抗体的宿主来源、特异性、种属反应性等。我们建议首先在感兴趣组织切片上进行抗体滴定后, 选择最合适的抗体浓度进行 mIF 预实验, 再进行 STOmics 多重免疫荧光 (mIF) 与空间转录组共检测实验。

### 3.1. 实验前准备

准备试剂	准备流程	暂存条件
甲醇	提前-20°C中预冷	-20°C
0.1X SSC	取 20X SSC 350 μL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 70 mL	室温
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 20 mL	室温
滤后分装血清	提前取出马血清, 冰上融化后, 用 0.22 μm 滤膜 (针筒式过滤器配套一次性无菌注射器) 进行过滤后分装, 建议分装 200 μL/管, <b>分装后不可反复冻融超过 3 次</b> 。实验之前, -20°C 取出分装血清冰上融化, 4°C, 14000g 离心 10 min, 冰上备用。 <b>* 滤后血清长期保存条件: -20°C。</b>	冰上备用
10% TritonX-100	若无 10%Triton X-100, 可将 100% Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温
一抗、二抗	根据说明书提示从 4°C或-20°C取出, 4°C, 14000g 离心 10 min 后置于冰上备用	冰上备用
稀释后的一抗、二抗 (可选)	可根据实验需求, 预先进行抗体稀释	冰上备用
FcR Blocking Reagent	根据组织种属选择, 人源组织用 Human TruStain FcX™ (Cat. No. 422301), 小鼠的组织用 TruStain FcX™ PLUS (anti- mouse CD16/32) Antibody (Cat. No. 156604), 置于冰上备用。	冰上备用
Glycerol	提前 5 min 取出平衡至室温, 每张芯片用量 5 μL	室温
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	检查 PCR 仪是否有异常, 必要时更换
低温离心机	提前将离心机温度调节到 4°C	4°C用于离心血清、一抗、二抗
荧光显微镜	DAPI/FITC/ TRITC/CY5 通道	可根据二抗选择不同的荧光通道

## 3.2. 切片准备

- a. 冷冻切片机箱体预冷和样本头预冷（根据实际操作过程调整）；
- b. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；
- c. 将组织块从  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 **30 min**；
- d. 对组织块进行修理，切面小于  $0.9\text{ cm} \times 0.9\text{ cm}$ ，切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- e. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- f. 根据需要对组织块做最后的修剪，随后进行切片。

## 3.3. 组织贴片

- a. 预冷甲醇：在玻片盒中装入 2/3 体积以上的甲醇，提前放入切片机中 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) 预冷，甲醇预冷时间 **5-30 min**；
- b. 组织贴片：根据需求选择切片厚度，通常为  $10\ \mu\text{m}$ ，建议一张玻片只贴一片组织。组织贴片有两种操作方式可选：冷贴（A）和热贴（B）；



- ⋯ 切片数量：滴定测试需要的组织切片数量与拟测试的抗体稀释梯度设置相关。例如，本示例测试中，设置 NeuN 抗体的稀释比例为 1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000 及阴性对照（不加入一抗）共需 6 张组织切片进行滴定测试。

### A. 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) 切片后，将冷冻切片小心覆盖在玻片正中央，尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，没有褶皱。用指腹加温玻片反面，使切片更好地贴附在玻片上；
- 3) 贴片完成后需立即进行烤片。快速将玻片置于 PCR 适配器上  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 **5 min**。

### B. 热贴

- 1) 切片后，将冷冻切片移到切片台右侧靠近边缘处，用细毛刷将冷冻切片轻轻展开铺平整；
- 2) 用手拿住玻片一角，将其翻转，使玻片正面朝下，尽量使玻片中央对准贴片；
- 3) 轻轻一压，肉眼可见切片已经吸附到玻片表面；
- 4) 再次翻转玻片，使其正面朝上，快速将玻片置于 PCR 适配器上  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 **5 min**。

### 3.4. 组织固定

- a. 玻片孵育结束后，立即放于  $-20^{\circ}\text{C}$  下预冷的甲醇中固定 **30 min**，**确保甲醇浸没玻片上的组织切片**。组织固定期间，参考表格 3-1 制备封闭液，涡旋混匀并瞬时离心，置于冰上备用；

表格 3-1 封闭液配制 ( 抗体滴定 )

组分	1X ( $\mu\text{L}$ )	6X ( $\mu\text{L}$ )+10%
5X SSC	120	732
10% TritonX-100	2	12.2
FcR Blocking Reagent *	10	61
滤后血清	20	122
Nuclease-Free Water	48	292.8
Total	200	1220



- ⋯ \* FcR Blocking Reagent 为封闭细胞膜表面 FC 受体，可根据实验组织的种属选择购买。例如组织为人源性组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No.422301)，小鼠的组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604) 但若在小鼠组织使用的一抗源性是大鼠则建议不加 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody，即封闭液内不加 FcR Blocking Reagent，用 Nuclease Free Water 补齐至总体积。



- ☰ 1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭和一抗孵育液配制。

- b. 在 **30 min** 固定完成后，将玻片盒转移到通风橱中；
- c. 将玻片从玻片盒中取出，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. 将玻片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，将玻片转移至实验台上；
- f. 在玻片上使用免疫组化笔在组织周围画一圈，产生疏水隔离区，防止后续加入的液体流出；
- g. 将处理好的玻片转移到免疫组化湿盒中。



### 3.5. 封闭与一抗孵育

- a. 将已配制好的封闭液，涡旋混匀后滴加到组织表面疏水隔离区内，用量不超过 **100  $\mu\text{L}$ / 玻片**，需结合疏水圈的大小适当调整体积用量（比如圈大小为  $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ ，则用量为  $30\ \mu\text{L}/\text{玻片}$ ），室温封闭 **20 min**；
- b. 封闭等待过程中，参考表格 3-2，配制不同比例稀释一抗孵育液。例如，本示例测试中，设置 NeuN 抗体的稀释比例为 1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000 及阴性对照（不加入一抗）共 6 种抗体的稀释比例进行滴定测试。将一抗孵育液涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上待用；

表格 3-2 一抗孵育液配制（抗体滴定）

组分	1X ( $\mu\text{L}$ )
一抗 或 稀释后的一抗 *	V #
封闭液	100-V
Total	100



- ⚠ \* 若一抗剂量低于使用的移液器的精度要求，则需用封闭液提前稀释一抗。
- ⚠ # 一抗加入量 V 根据拟采用的抗体稀释比例决定。

- c. 吸弃封闭液
  - 实验组从非组织区域缓慢加入不同稀释比例的一抗孵育液，用量应不超过 **100  $\mu\text{L}$ / 玻片**，并在玻片上标记好所测试的抗体稀释比例，室温下进行一抗孵育 **45 min**；
  - 阴性对照组吸弃封闭液后，滴加等量的封闭液，室温孵育 **45 min**；

⚠ **注意：**换液过程注意组织不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

- d. 一抗孵育结束前，参考表格 3-3 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上避光待用。

⋯ 请根据一抗滴定数量配制相应数量的二抗孵育液 ( $100\ \mu\text{L}/\text{玻片}$ )；

表格 3-3 二抗孵育液配制（抗体滴定）

组分	1X ( $\mu\text{L}$ )
5X SSC	60
二抗 *	0.2
Nuclease-Free Water	39.8
Total	100

⚠ **注意：**二抗推荐使用 Thermo 公司 Alexa Fluor™ Plus 系列荧光二抗，浓度可选择 1:500 进行配制。若使用其他公司的荧光二抗请结合自身经验确定比例。



### 3.6. 孵育二抗



- a. 吸弃实验组一抗孵育液及阴性对照组封闭液，加入 0.1X SSC 清洗，用量为 **100  $\mu$ L / 玻片**，室温孵育 **1 min** 后吸弃，此步骤重复 1 次，共计清洗 2 次；

 **注意：换液过程注意组织不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。**

- b. 缓慢滴加二抗孵育液（用量应不超过 **100  $\mu$ L / 玻片**），避光室温孵育 **15 min**；
- c. 吸弃二抗孵育液，用无尘纸擦干疏水圈后，将玻片置于装有适量 0.1x SSC（确保能覆盖住组织即可）的玻片盒中浸泡 2 次，每次 **10 s**。注意每次浸泡前需要换液；

 **注意：换液过程注意组织不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。**

- d. 吸弃液体，玻片表面无液体残留，玻片表面自然晾干或使用空气罐吹干，滴加 **5  $\mu$ L** 甘油于组织中央，盖上盖玻片，准备拍照。

### 3.7. 荧光拍照



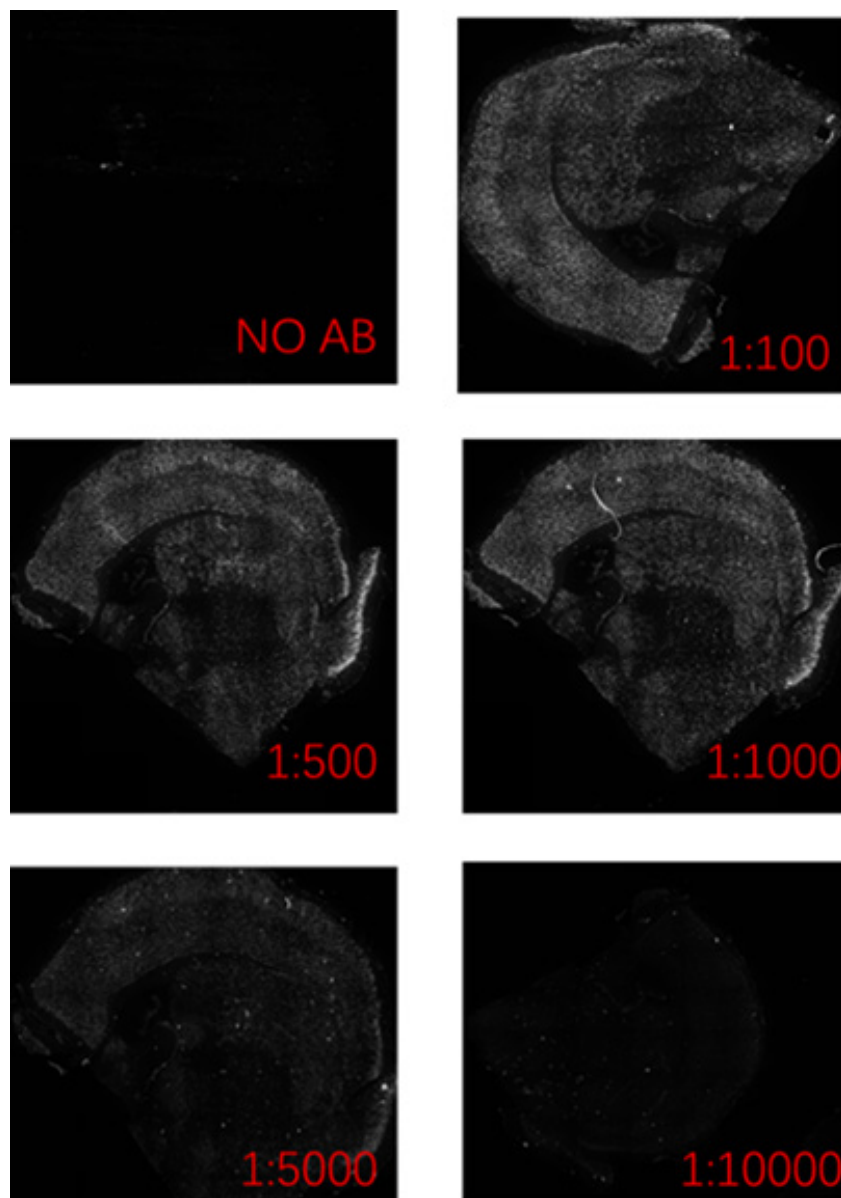
- a. 使用荧光显微镜（具备拼接功能）；
- b. 选择落射荧光扫描模式，荧光通道根据购买的荧光激发光调节，选择 10 倍镜，扫描玻片。

 **注意：同一实验组保证拍照参数一致，以利于比对差异。**

 **注意：若 IF 拍照后出现明显高亮点，建议将玻片置于装有适量 0.1x SSC（确保能覆盖住组织即可）的玻片盒中浸泡 2 次，每次 10 s。注意每次浸泡需要换液。**

### 3.8. 抗体滴定最佳浓度选择标准

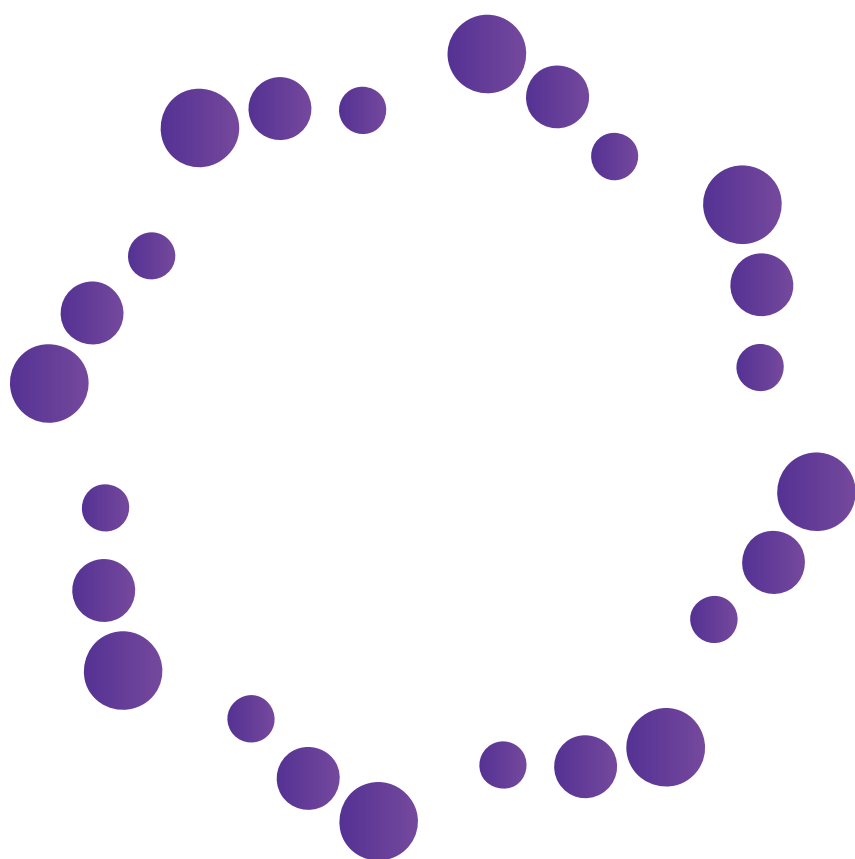
抗体最佳浓度选择原则为，在保持荧光信号最佳的同时，最大程度减少背景染色。以 NeuN 抗体（abcam, ab104224）滴定示例数据为例，如图一所示，根据荧光信号选择荧光强度不显著减低的最低浓度，应选择 1:1000 作为最佳抗体稀释浓度，用于后续 mIF 预实验以及正式实验。



图一 小鼠大脑（半脑）IF 滴定图

# 第四章

## mIF 预实验



在确定每个抗体的最佳稀释比例后，建议按照每个抗体的最佳稀释浓度，在玻片上进行 mIF 的预实验。确定每个抗体匹配的荧光二抗和荧光拍照通道符合要求后，在芯片上进行 STOmics 多重免疫荧光（mIF）与空间转录组共检测的正式实验。

## 4.1 封闭前处理

实验前准备、切片准备、组织贴片、组织固定步骤请参考第三章中 3.1 至 3.4 步骤，需要用到 DAPI 溶液 (Thermo 62248)，需提前 50 倍稀释 DAPI。

准备仪器	设置程序	暂存条件
50 倍稀释 DAPI	用 5X SSC 稀释 DAPI (1 mg/mL) 溶液 50 倍，混匀后瞬离并避免吸到底层沉淀，置于冰上备用	避光，冰上备用 6 hr

## 4.2. 封闭与一抗孵育

- a. 按照表格 4-1 配制封闭液。将已配制好的封闭液，涡旋混匀后滴加到组织表面疏水隔离区内，用量不超过 **100 μL/ 玻片**，需结合疏水圈的大小适当调整体积用量（比如圈大小为 0.5 cm×0.5 cm，则用量为 30 μL/ 玻片），室温封闭 **20 min**；

表格 4-1 封闭液配制 (mIF 预实验)

组分	1X ( μL)	1X+10%( μL)
5X SSC	120	132
10% TritonX-100	2	2.2
FcR Blocking Reagent *	10	11
滤后血清	20	22
Nuclease-Free Water	48	52.8
Total	200	220

⋯ \* FcR Blocking Reagent 为封闭细胞膜表面 FC 受体，可根据实验组织的种属选择购买。例如组织为人源性组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No.422301)，小鼠的组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604) 但若在小鼠组织使用的一抗源性是大鼠则建议不加 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody，即封闭液内不加 FcR Blocking Reagent，用 Nuclease Free Water 补齐至总体积。

⋯ 1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭和一抗孵育液配制。

- b. 封闭等待过程中，参考表格 4-2，按照抗体滴定实验中摸索的最佳稀释比例，配制一抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上待用；



表格 4-2 一抗孵育液配制 (mIF 预实验)

组分	1X ( $\mu$ L )
封闭液	100-(V1+V2+V3+....+Vn )
一抗 1	V1
一抗 2	V2
一抗 3	V3
.....	.....
一抗 n	Vn
Total	100



**注意：**多个抗体混合前需各自进行抗体滴定实验，且添加的抗体 1 到抗体 n 要求是不同源性的抗体。

c. 吸弃封闭液，实验组从非组织区域缓慢加入一抗孵育液，用量不超过 **100  $\mu$ L/ 玻片**，进行一抗孵育，室温孵育 **45 min**；

**注意：**换液过程注意组织不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

d. 一抗孵育结束前，按照二抗的最佳稀释比例，参考表格 4-3 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上避光待用。

表格 4-3 二抗孵育液配制 (mIF 预实验)

组分	1X ( $\mu$ L )
5X SSC	60
二抗 1	V1
二抗 2	V2
二抗 3	V3
.....	.....
二抗 n	Vn
Nuclease Free Water	40-(V1+V2+V3+....+Vn )
Total	100



**注意：**二抗推荐使用 Thermo 公司 Alexa Fluor™ Plus 系列荧光二抗，浓度可选择 1: 500 进行配制。若使用其他公司的荧光二抗请结合自身经验确定比例。

### 4.3. 孵育二抗



- a. 吸弃一抗孵育液，加入 0.1X SSC 清洗，用量为 **100  $\mu$ L / 玻片**，室温孵育 **1 min** 后吸弃，此步骤重复 1 次，共计清洗 2 次；

**注意：换液过程注意玻片不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。**

- b. 缓慢滴加二抗孵育液（用量不超过 **100  $\mu$ L / 玻片**），**避光室温孵育 15 min**。

### 4.4. DAPI 染色

- a. 二抗孵育结束前，可提前参考表格 4-4 配制 DAPI 工作液，混匀后放于冰盒上避光待用；

表格 4-4 DAPI 工作液配制

组分	1X ( $\mu$ L )	1X+10%( $\mu$ L )
5X SSC	60	66
50 倍稀释 DAPI	1	1.1
Nuclease Free Water	39	42.9
Total	100	110

- b. 吸弃二抗孵育液，加入 0.1X SSC 清洗，用量 **100  $\mu$ L / 玻片**，室温孵育 **1 min** 后吸弃，此步骤重复 1 次，共计清洗 2 次；



**注意：换液过程注意玻片不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。**

- c. 缓慢滴加 DAPI 工作液（用量为 **100  $\mu$ L / 玻片**），**避光室温孵育 2 min**；
- d. 吸弃 DAPI 工作液吸弃二抗孵育液，用无尘纸擦干疏水圈后，将玻片置于装有适量 0.1X SSC（确保能覆盖住组织即可）的玻片盒中浸泡 2 次，每次 **10 s**。注意每次浸泡前需要换液；
- e. 吸弃液体，使玻片表面无液体残留，表面自然晾干或使用空气罐吹干，滴加 **5  $\mu$ L** 甘油于组织中央，盖上盖玻片，准备拍照。

## 4.5. 荧光拍照

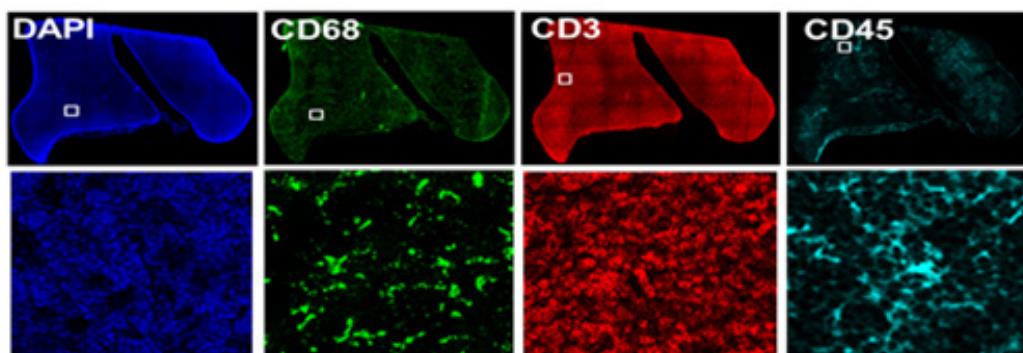
- 使用荧光显微镜（具备拼接功能）；
- 选择落射荧光扫描模式，荧光通道根据购买的荧光激发光调节，选择 10 倍镜，扫描玻片。



注意：若 IF 拍照后出现明显高亮点，建议将玻片置于装有适量 0.1x SSC（确保能覆盖住组织即可）的玻片盒中浸泡 2 次，每次 10 s。注意每次浸泡需要换液。

## 4.6. mIF 预实验成功标准

如图二所示，以小鼠胸腺组织的染色为例，应保证每个通道得到符合预期的特异染色结果且信噪比保持在合理强度，不同通道之间的串色不会影响后续分析。

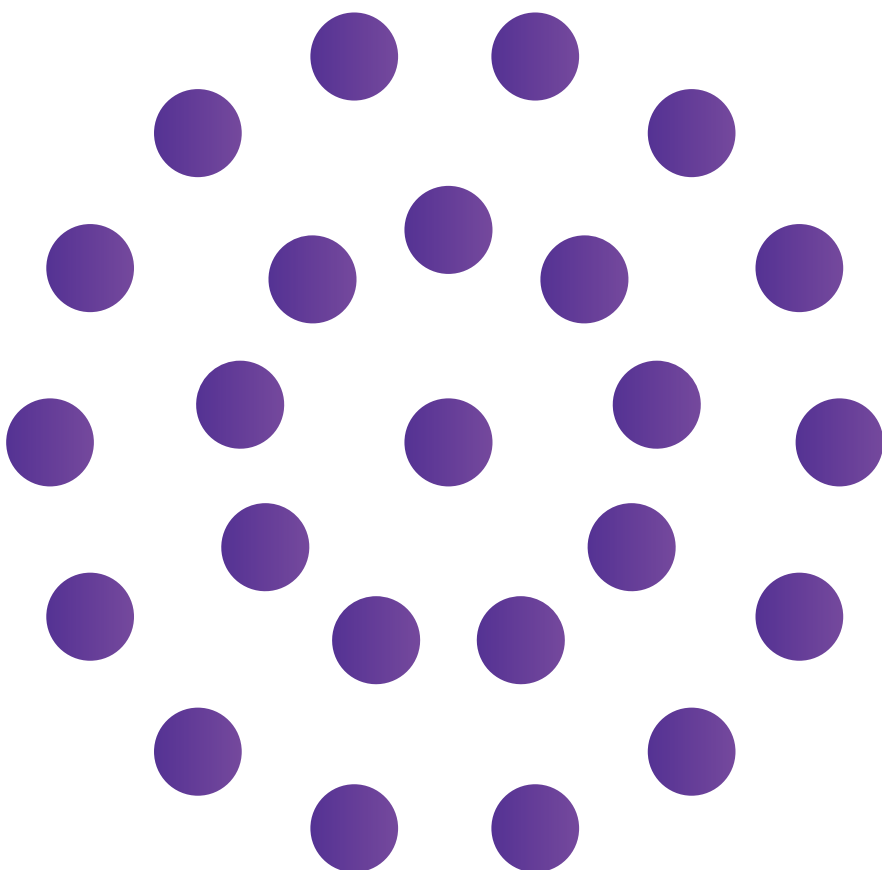


图二 小鼠胸腺 mIF 染色



# 第五章

## 时空转录组 FF V1.3 兼容 mIF 转录组实验标准操作流程



## 5.1. 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 兼容 mIF 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。

准备试剂	准备流程	暂存条件
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 110 μL RI 加入 2090 μL 0.1X SSC 中 (一张芯片至少用量 2200μL)	冰上备用
5X SSC	取 20X SSC 1 mL 稀释到 4 mL	室温
分装滤后血清	提前取出马血清，冰上融化后，用 0.22 μm 滤膜 (针筒式过滤器配套一次性无菌注射器) 进行过滤后分装，建议分装 200 μL/管， <b>分装后不可反复冻融超过 3 次</b> 。实验之前，-20°C 取出分装血清融化，4°C，14000g 离心 10 min，冰上备用。 <b>* 滤后血清长期保存条件：-20°C。</b>	冰上备用
RI	-20°C 取出冰上备用。	冰上备用
10% TritonX-100	若无 10% Triton X-100，可将 100% Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温
一抗、二抗	根据说明书提示从 4°C 或 -20°C 取出，4°C，14000g 离心 10 min 后置于冰上备用，一抗含有对应的同型对照抗体	冰上备用
稀释后的一抗、二抗 (可选)	可根据实验需求，预先进行抗体稀释	冰上备用
FcR Blocking Reagent	根据组织种属选择，人源组织用 Human TruStain FcX™ (Cat. No. 422301)，小鼠的组织用 TruStain FcX™ PLUS (anti- mouseCD16/32) Antibody (Cat. No. 156604)，置于冰上备用。	冰上备用
50 倍稀释 DAPI	用 5X SSC 稀释 DAPI (1 mg/mL) 溶液 50 倍，混匀后瞬离并避免吸到底层沉淀，置于冰上备用	避光，冰上备用 6 hr
Glycerol	提前 5 min 取出平衡至室温，每张芯片用量 5μL	室温
0.01N HCl	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 (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 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)	冰上备用 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 $\mu$ L 10X 透化试剂储存液稀释到 150 $\mu$ L (至少 150 $\mu$ L/ 芯片)	冰上备用 6 hr
------------	--	-----------

0.1M KOH	取 10 $\mu$ L 8M KOH 稀释到 800 $\mu$ L	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  $14 \pm 0.3$ )。

请在使用前再进行配置。

Elute Additive	提前 5 min 取出放于冰上备用, 每张芯片用量 5 $\mu$ L	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 $\mu$ L	室温
-------------------------	--------------------------------------	----

磁珠	提前取出, 室温放置 30 min 平衡	室温
----	----------------------	----

80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 d
--------	-------------	--------

准备仪器	设置程序	备注
冷冻切片机	箱体预冷至 $-20^{\circ}\text{C}$ , 样本头预冷至 $-15^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$	温度根据实际操作过程调整
PCR 仪	37 $^{\circ}\text{C}$ Hold, 用于烤片和透化 (热盖 60 $^{\circ}\text{C}$ ) 45 $^{\circ}\text{C}$ Hold, 用于反转录 (热盖 60 $^{\circ}\text{C}$ ) 55 $^{\circ}\text{C}$ Hold, 用于 cDNA 释放 (热盖 60 $^{\circ}\text{C}$ ) 95 $^{\circ}\text{C}$ Hold, 用于变性 (热盖 105 $^{\circ}\text{C}$ )	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 $^{\circ}\text{C}$ 用于透化酶预热	检查仪器是否有异常, 必要时更换
低温离心机	提前将离心机温度调节到 4 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$ 用于离心血清、一抗、二抗
荧光显微镜	DAPI/FITC/TRITC/CY5 通道	可根据二抗选择不同的荧光通道

## 5.2. 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的修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

## 5.3. 芯片处理与组织贴片



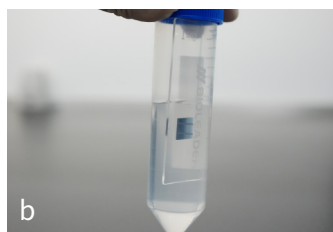
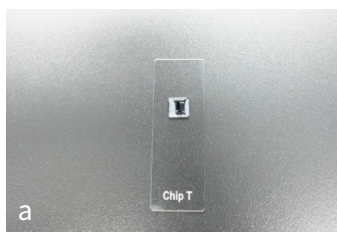
有关组织切片到 Stereo-seq 芯片载体上的演示视频，请参阅以下链接或扫描二维码：<https://www.stomics.tech/resources/Videos>



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  $\mu$ L 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）；

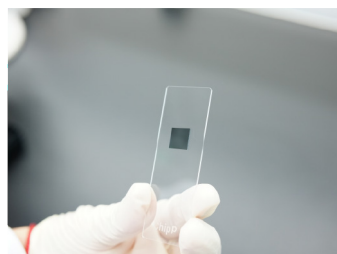


☰ 请将未使用的时空芯片密封干燥储存于  $-25^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ：可将芯片放回原包装的玻片盒后，放入有干燥剂的铝袋中密封保存。

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（ $-20^{\circ}\text{C}$ ）预冷 **5-30 min**；

f. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；

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  $\mu\text{m}$ 。

### 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。

⋯ 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。

⋯ 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。

⋯ 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。

⋯ 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。

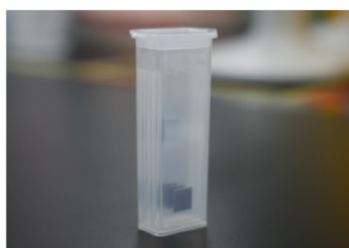
⋯ 进行冷贴时需控制好每张切片贴片时间，间隔时间太大，组织贴片会皱缩。

⋯ 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。

#### — 停止点：

（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袋密封。用干冰快速转移到  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱，最长可于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存 21 天。

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**。



## 5.4. 组织固定

- a. 孵育结束后，立即将芯片载体置于- 20℃预冷的甲醇中，确保甲醇浸没载体上的所有芯片，固定 **30 min**；
- b. 组织固定期间，参考表格 5-1 制备封闭液，涡旋混匀并瞬时离心，置于冰上备用；

表格 5-1 封闭液配制

组分	1X ( μL)	1X + 10% ( μL)	2X + 10% ( μL)	3X + 10% ( μL)	4X + 10% ( μL)
5X SSC	180	198	396	594	792
10% TritonX-100	3	3.3	6.6	9.9	13.2
FcR Blocking Reagent *	15	16.5	33	49.5	66
RI	15	16.5	33	49.5	66
滤后血清	30	33	66	99	132
Nuclease Free Water	57	62.7	125.4	188.1	250.8
Total	300	330	660	990	1320



... \* FcR Blocking Reagent 为封闭细胞膜表面 FC 受体，可跟据实验组织的种属选择购买。例如组织为人源性组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No. 422301)，小鼠的组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)，但若在小鼠组织使用的一抗源性是大鼠则建议不加 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody，即封闭液内不加 FcR Blocking Reagent，用 Nuclease Free Water 补齐至总体积。

... 1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭和一抗孵育液配制。

c. 将载体从玻片盒中取出，用无尘纸擦去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，再按照[《附录 Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》](#) 组装方法组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧。



请先用常规空白玻片练习夹具装载

... 避免载具接触芯片正面。

## 5.5. 封闭和抗体孵育

- 将已配制好的封闭液滴加到组织表面，用量为 **150  $\mu\text{L}$ / 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，室温孵育 **20 min**；
- 封闭等待期间，根据试剂情况配制一抗孵育液。请根据实际加入一抗数量  $n$ ，参考表格 5-2 配制一抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用。

表格 5-2 一抗孵育液配制

组分	1X ( $\mu\text{L}$ )
封闭液	150- (V1+V2+V3+....+Vn)
一抗 1	V1
一抗 2	V2
一抗 3	V3
.....	.....
一抗 n	Vn
Total	150



- 所用一抗需不同源性的抗体，具体加入多少体积根据 IF 滴定结果确定，务必根据实验前准备，进行抗体的离心；吸取抗体时，尽量避免枪头直接从管底部吸取。
- 用移液器在芯片一角吸弃封闭液，保持芯片组织湿润，立即从非组织区域缓慢加入一抗体孵育液，用量为 **150  $\mu\text{L}$ / 芯片**，室温孵育 **45 min**；
- 换液过程中严格避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。建议一个孔位一个孔位进行操作。
- 一抗孵育等待期间，参考表格 5-3 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上**避光备用**；

表格 5-3 二抗孵育液配制

组分	1X ( $\mu\text{L}$ )
5X SSC	90
RI	7.5
二抗	0.3
Nuclease-Free Water	52.2
Total	150





- ☹️ 二抗孵育液注意避光保存。二抗推荐使用 Thermo Fisher Scientific 公司 Alexa Fluor™ Plus 系列荧光二抗，可选择 1: 500 进行配制。若使用其他公司的荧光二抗请结合自身经验确定比例。
  - e. 用移液器在芯片一角吸弃一抗孵育液，保持芯片组织湿润；
  - f. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 **200 μL/ 芯片**，室温孵育 **1 min**；
  - g. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；
  - h. 重复步骤 f.-g. 一次；
- ☹️ 换液过程中严格避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。
  - i. 往芯片加入二抗孵育液，用量为 **150 μL/ 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，**室温避光孵育 15 min**；

## 5.6.DAPI 染色

准备试剂	准备流程	暂存条件
50 倍稀释 DAPI	用 5X SSC 稀释 DAPI (1 mg/mL) 溶液 50 倍，混匀后瞬间离心并避免吸到底层沉淀，置于冰上备用	避光，冰上备用 6 hr

- a. 二抗孵育等待期间，可参考表格 5-4 配制 DAPI 工作液，涡旋混匀后瞬时离心并避免吸到底层沉淀，放于冰盒上**避光备用**；

表格 5-4 DAPI 工作液配制

组分	1X ( $\mu$ L )	1X + 10% ( $\mu$ L )	2X + 10% ( $\mu$ L )	3X + 10% ( $\mu$ L )	4X + 10% ( $\mu$ L )
5X SSC	90	99	198	297	396
50 倍稀释 DAPI	1.5	1.7	3.3	5	6.6
RI	7.5	8.3	16.5	24.8	33
Nuclease-Free Water	51	56	112.2	168.2	224.4
Total	150	165	330	495	660

- b. 用移液器在芯片一角吸弃二抗孵育液，保持芯片组织湿润；  
 c. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 **200  $\mu$ L / 芯片**，室温孵育 **1 min**；  
 d. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；  
 e. 重复清洗步骤 c.-d. 一次；



换液过程注意芯片不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

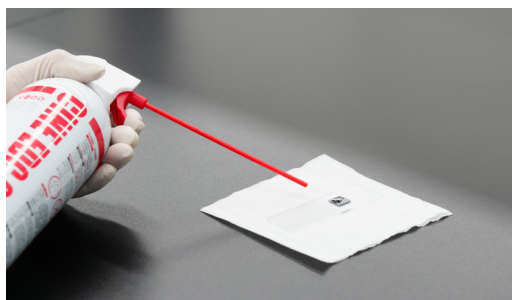
- f. 从非组织区域缓慢滴加 DAPI 工作液，用量为 **150  $\mu$ L / 芯片**，将封板膜（不要撕开，包含白底）放置于载具上覆盖反应孔，**室温避光孵育 2 min**；  
 g. 拿开含白底的封板膜并放置于实验台备用，用移液器在芯片一角吸弃 DAPI 工作液，保持芯片组织湿润；  
 h. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 **200  $\mu$ L / 芯片**，室温孵育 **1 min**；  
 i. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；  
 j. 重复清洗步骤 h.-i. 一次；

- k. 吸弃 Wash Buffer 后，参考《附录 Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》拆卸方法将载体从手持载具上拆卸下来，将拆卸下来的垫圈丢掉，而将拆卸下来的夹具放置在实验台上备用；



拆卸时用手托住载体背面，避免载具接触芯片正面。

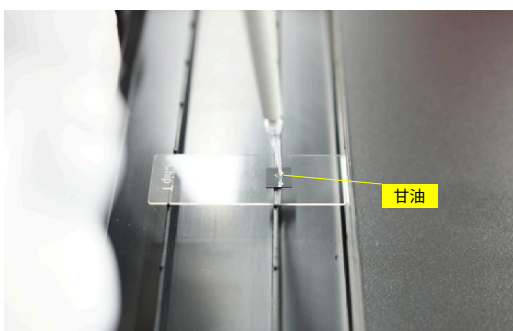
- l. 将载体转移至无尘纸上，一只手固定载体，另一只手拿空气罐，在出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30° 倾角缓慢吹气。从芯片角落开始顺序推进，吹干芯片表面液体，勿使气流过猛；



(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。

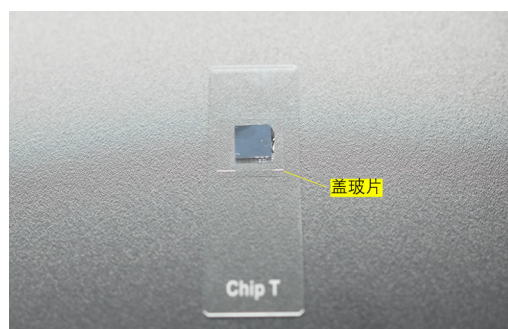
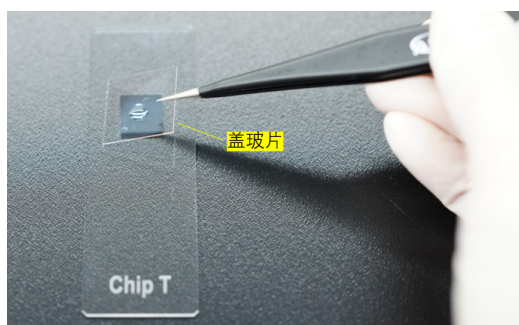
提前将 Glycerol 置于室温平衡 5 min。

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



- n. 用镊子夹取盖玻片或 24 孔板圆形细胞爬片，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，立即安排拍照，避免荧光淬灭。

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。



## 5.7. 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。

本部分以通用型显微镜为例，进行成像操作的描述。关于显微镜的具体要求，请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)

拍照时，需要使用具有拼接功能的荧光显微镜拍摄荧光图像，推荐荧光配置：

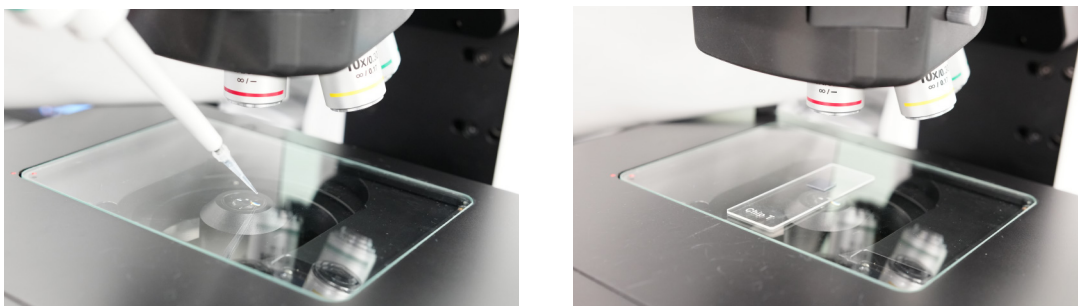
- 光源波长范围：380-680 nm
- 黑白相机 ( $\geq 8$  bit)
- DAPI filtercube (参考：Excitation 375/28nm, Emission 460/50nm)
- FITC filtercube (参考：Excitation 480/30nm, Emission 525/50nm)
- TRITC filtercube (参考：Excitation 545/25nm, Emission 605/70nm)
- CY5 filtercube (参考：Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
- 最大像元尺寸：5  $\mu\text{m}/\text{pixel}$
- 曝光时间：1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)

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  $\mu\text{L}$  水 ( $\sim 2\mu\text{L}/\text{滴}$ )，将载玻片至于水滴上以起到固定作用如下图所示；



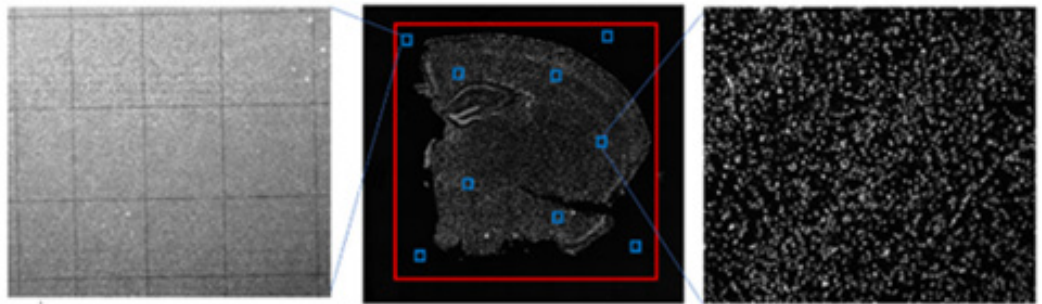
c. 载玻片轻放在载物台上，尽量与载物台平行（要求芯片边缘水平角度小于  $15^\circ$ ，芯片位置 chipT 手柄始终在右侧）；



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，选择落射荧光扫描模式，DAPI 通道；
- 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：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：在芯片四角方向（如图：组织外有 Track 线的区域）分别记录焦点，对 Track 线定焦。组织区域内每平方厘米选择 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；



- j. 最终成像：建模点完成后，将增益（Gain）调至最小，随即进行扫描；拍照完成后，保存整个文件夹（原始 FOV 小图与拼接大图）；
- k. 接下来进行 IF 的图像拍摄，在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，以芯片号\_蛋白名称\_IF 格式命名并保存，根据二抗偶联的荧光染料选择合适的荧光通道（FITC 通道、TRITC 通道或 CY5 通道）进行下一步 IF 的拍照。保持芯片不动，不重新扫描地图，不重新添加对焦点，不改变红框选中组织区域，直接切换所选的荧光通道，随后可调节曝光直至组织内染色图像清晰，10 倍镜下扫描 IF 图片。扫描完成后继续下一个通道拍摄直至所有通道 IF 图片拍摄完成；保存整个文件夹（拼接大图和小图文件夹）；



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\_NeuN\_IF



若二抗与一抗结合不成功，请联系 FAS 协助排查问题。

- l. 打开“StereoMap-> Tools-> imageQC”模块拖入核染色图（DAPI）和 IF 图，并参考软件内置的《StereoMap 用户手册》来进行图像质控；



获得的核染色图（DAPI）和 IF 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，客户仍对转录组结果感兴趣，可以继续往下实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 手动图像处理。

从封片到拍照结束控制在 1 hr 内完成，并在拍照过程中请勿将贴有组织的芯片长时间照射荧光，非拍照时间关闭激光，避免长时间照射。



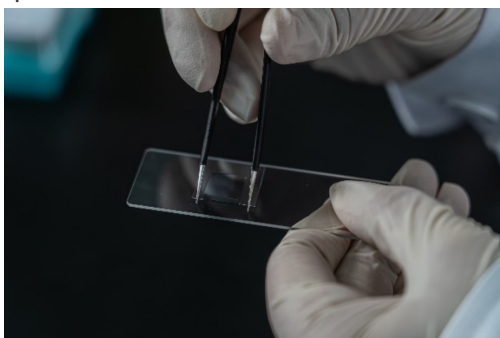
**⋯** 更为详细的注意事项请参考《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》。

- m. 拍照后，从显微镜卸下载体芯片，暂时保持封片，进行下一步的准备；
- n. 根据表格 5-5 提前准备好 1X 透化试剂工作液；

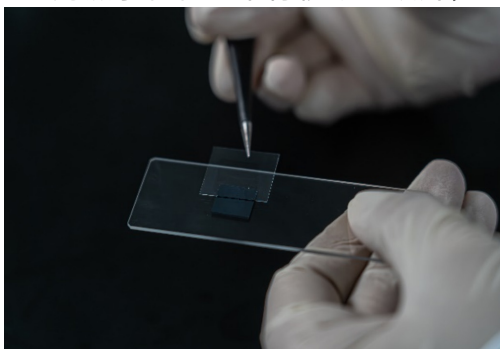
表格 5-5 1X 透化试剂工作液配制

组分	1X ( $\mu\text{L}$ )	1X + 10% ( $\mu\text{L}$ )	2X + 10% ( $\mu\text{L}$ )	3X + 10% ( $\mu\text{L}$ )	4X + 10% ( $\mu\text{L}$ )
0.01N HCl	135	148.5	297	445.5	594
10X 透化试剂 储存液	15	16.5	33	49.5	66
Total	150	165	330	495	660

- o. 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 $\infty$ ；
- p. 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**）；
- q. 待孵育 **8 min** 后，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹在盖玻片一角；



- 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. 无尘纸擦去载体背面及芯片四周的液体，确保无液体残留；
- t. 更换新垫圈，按照[《附录 Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》](#) 组装方法组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；

 避免载具接触芯片正面。

- u. 组合载具后，往芯片加入 Wash Buffer，用量为 **400  $\mu$ L/ 芯片**，室温孵育 **1 min**；
- v. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于  $20^\circ$ ，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；
- w. 重复清洗步骤 u.-v. 一次；

## 5.8. 组织透化

- 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;
- 确定 PCR 仪已设置如下程序:

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

- 将手持载具转移到 PCR 仪 (37°C) 的 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 (移液器接近芯片加液, 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 仪盖子, 37°C 下进行透化反应 (透化时间根据实际情况调整);



最佳透化时间通过透化测试实验预先确定, 操作步骤参考《[时空转录组 FF V1.3 兼容 miF 透化测试操作说明书](#)》。

- 透化期间, 可先参考表格 5-6 配制 RT Mix, 冰上放置待用;

表格 5-6 RT Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
RT Buffer Mix	166	182.6	365.2	547.8	730.4
RT Plus	4	4.4	8.8	13.2	17.6
RT Oligo	10	11	22	33	44
RT Enzyme Mix	20	22	44	66	88
Total	200	220	440	660	880

- 透化结束后, 在 PCR 仪上先拿开含白底的封板膜, 将手持载具从 PCR 仪中取出, 微微倾斜载具 (倾斜角度小于 20°), 再用移液器从芯片的一角吸掉透化试剂, 避免接触芯片正面;
- 加入 Wash Buffer, 用量为 **200 μL/ 芯片**;
- 用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer, 保持芯片组织湿润;

避免芯片完全干燥





## 5.9. 反转录反应

- a. 取出配制好的 RT Mix 吹打混匀后瞬时离心，立即在芯片一角缓慢加入 RT Mix，用量为 **200  $\mu$ L/ 芯片**，确保 RT Mix 均匀覆盖全部芯片；
- b. 将 PCR 程序跳过 37°C，进入 45°C  $\infty$ ；

温度	时间	循环数
60°C热盖	on	-
37°C	$\infty$	1
45°C	$\infty$	1
55°C	$\infty$	1

- c. 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 **2 hr** 或以上，最长不超过 **5 hr**。

## 5.10. cDNA 释放与变性

- a. 提前 **5 min**，按照表格 5-7 配制 cDNA Release Mix，室温放置；

表格 5-7 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. 撕开透明的封板膜，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 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。

- d. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 **200 μL/ 芯片**；
- e. 微倾斜手持载具，用移液器在芯片一角吸弃 0.1XSSC；
- 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. 用透明的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。若吸打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	∞	-



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！

## 5.11. cDNA 扩增

按照表格 5-8 配制 PCR Mix;

表格 5-8 PCR Mix 配制

组分	1X ( $\mu$ L )	1X + 10% ( $\mu$ L )	2X + 10% ( $\mu$ L )	3X + 10% ( $\mu$ L )	4X + 10% ( $\mu$ L )
4X cDNA PCR Mix	76.5	84.15	168.3	252.5	336.6
cDNA Primer	12	13.2	26.4	39.6	52.8
Nuclease-Free Water	13.5	14.85	29.7	44.5	59.4
Total	102	112.2	224.4	336.6	448.8

在 **5.10-I. 步骤** 的 3 个 PCR 管的 66  $\mu$ L cDNA 中分别分装 34  $\mu$ L PCR mix, 涡旋混匀; 瞬时离心, 按照如下 PCR 程序进行扩增;

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	$\infty$	-

### — 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.

按照表格 5-9 准备 Qubit dsDNA Mix;

表格 5-9 Qubit dsDNA Mix


组分	1X ( $\mu$ L )	2X ( $\mu$ L )	3X ( $\mu$ L )	4X ( $\mu$ L )
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	199	398	597	796
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1	2	3	4
Total	200	400	600	800



配制完成后，振荡混匀，取 199  $\mu\text{L}$  至新的检测管（Qubit dsDNA HS Assay Kit 配套检测管）；

振荡混匀后取 1  $\mu\text{L}$  PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，DNA 浓度通常高于 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ；



 若浓度低于 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，参考 5.12. 进行 1x 磁珠纯化，溶于 72  $\mu\text{L}$  TE，回收 70.5  $\mu\text{L}$ ，加入 25.5  $\mu\text{L}$  4x PCR mix 和 4  $\mu\text{L}$  cDNA primer，混匀离心后再 PCR 8 个循环（参考 5.11 cDNA 扩增中的 PCR 扩增程序），继续按照 5.12. 步骤进行 0.8x 磁珠纯化完成操作。

## 5.12. cDNA 纯化

### 背景信息

本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA CleanBeads (Vazyme, Cat. No. N411-02) 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

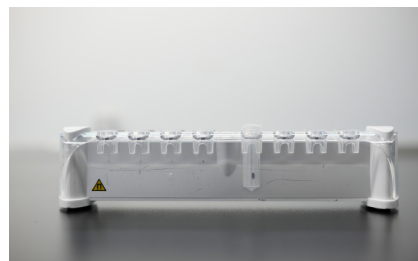
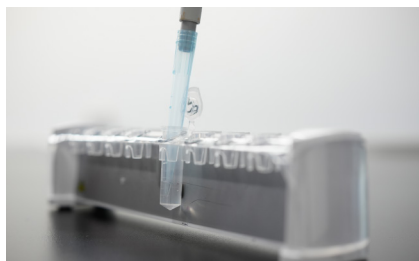
- 提前 **30 min** 从 4°C 取出, 涡旋混匀且平衡至室温, 有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前, 需振荡或用移液器上下吸打, 确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高, 纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

### 磁珠操作注意事项

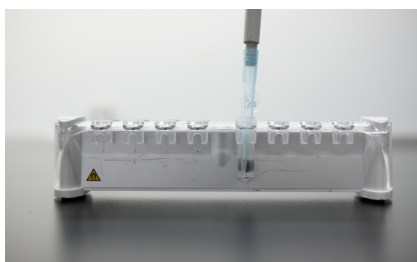
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 一般需要 **2-3 min**。但由于磁力架吸力不同等原因, 推荐分离时间有时可能需要延长, 以液体彻底澄清为准。



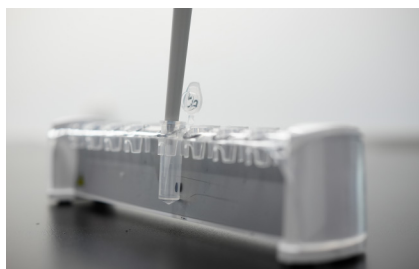
- 在分离磁珠与液体时, 注意吸头不可碰到磁珠, 最后可余留 2-3  $\mu\text{L}$  液体, 以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠, 可将磁珠与液体全部打回管内, 再次分离后再吸取上清。



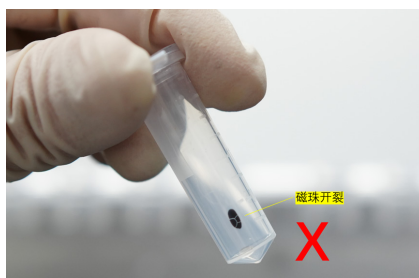
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上, 移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作, 请勿吸打、搅动磁珠。



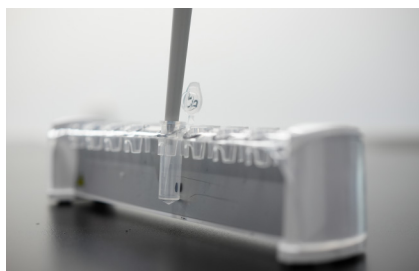
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。



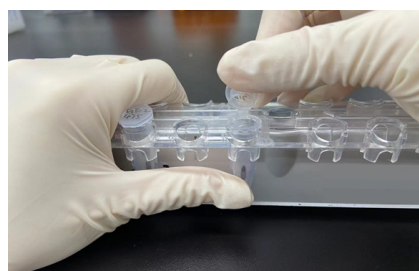
- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成乙醇残留，影响后续反应，过度干燥（磁珠开裂）会降低回收得率。通常情况下，室温干燥需要 **5-10 min**，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察。直至磁珠表面无反光，即可用 TE Buffer 或 Nuclease-Free Water 进行产物洗脱。



- 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  $\sim 2 \mu\text{L}$ 。



- 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  $\mu$ L) ，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  $\mu$ L 80% 乙醇漂洗（新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇）。通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清。**移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠**；
- 4) 重复一次步骤 3)；
- 5) 将离心管保持在磁力架上，打开盖子，室温风干 **5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- 6) 加 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L) 转移到新的 1.5 mL 离心管中。



**— 停止点：**

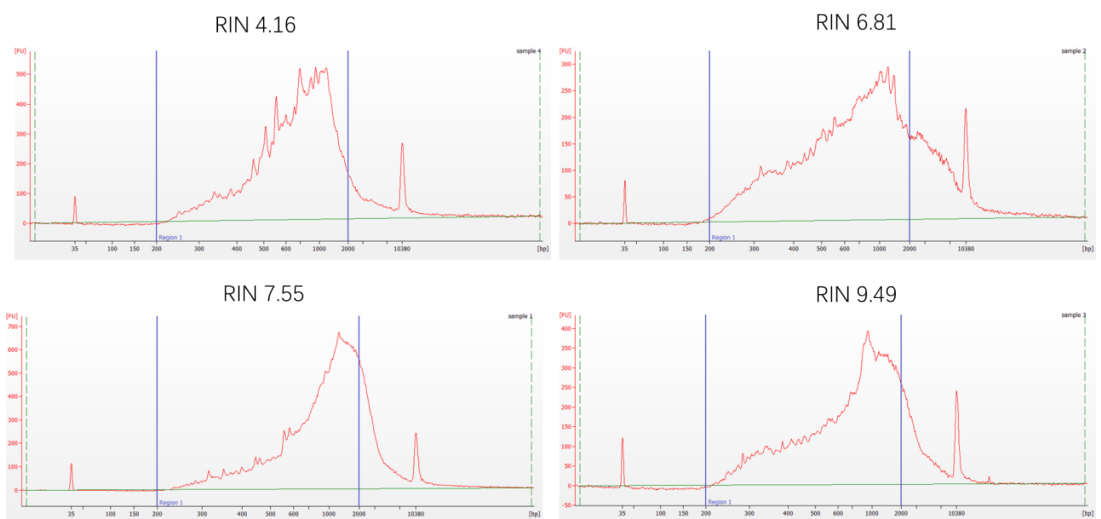
- cDNA 纯化产物可在 **-20 $^{\circ}$ C** 下保存 1 个月。

**QC** 纯化后，可用 40  $\mu$ L Nuclease-Free Water 在 4 $^{\circ}$ C 保存磁珠，直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

b. 取 1  $\mu$ L cDNA 样品，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录；

c. 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip<sup>®</sup> GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer<sup>™</sup> (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（如图三），纯化后产量通常大于 100 ng。



图三. 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 \(含兼容 miF\) 建库实验操作说明书》](#)。



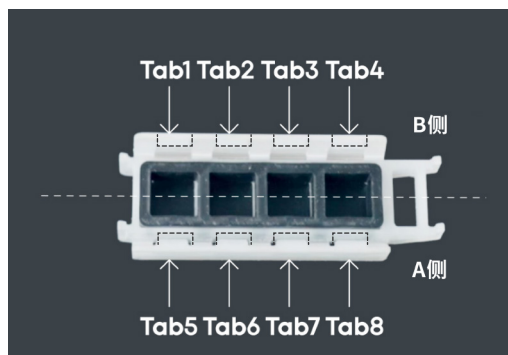
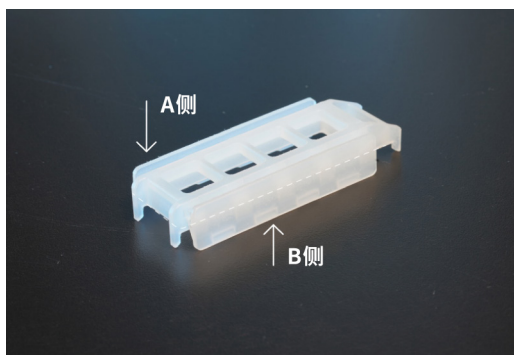
**⚠ 注意：**《时空转录组 FF V1.3 兼容 miF 转录组实验操作说明书》只能搭配《时空转录组 FF V1.3 (含兼容 miF) 建库实验操作说明书》



## 附录 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



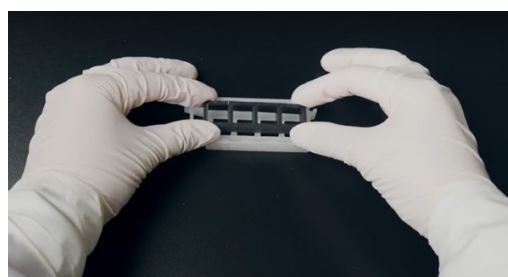
组装方法视频参考网址：

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

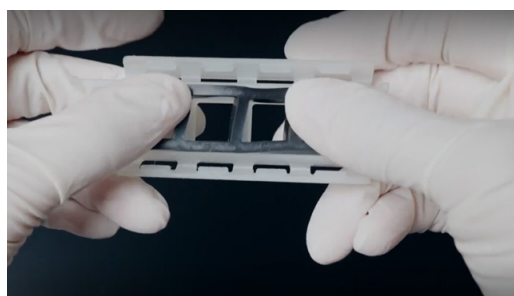
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



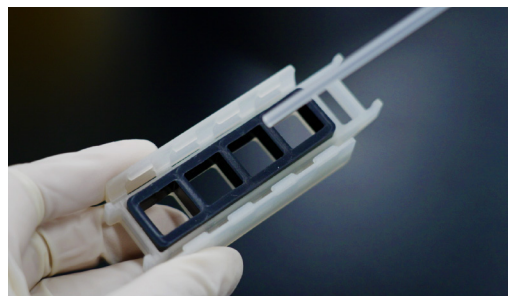
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



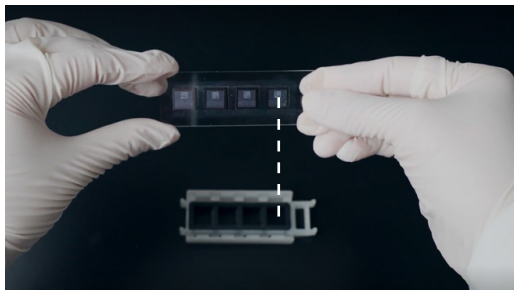
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



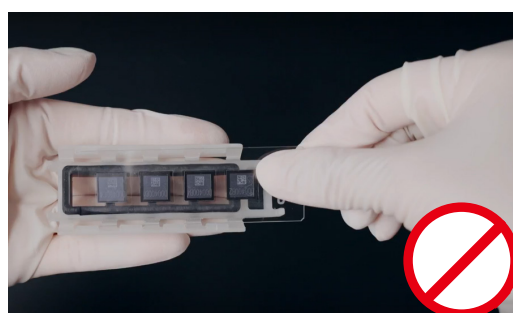
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；



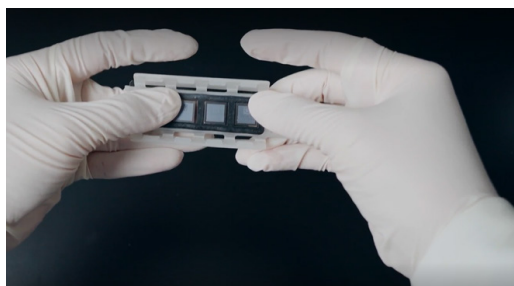
- e. 拿起 Stereo-seq 芯片载体，芯片面朝下，将芯片载体标签朝夹具的长边卡扣方向；



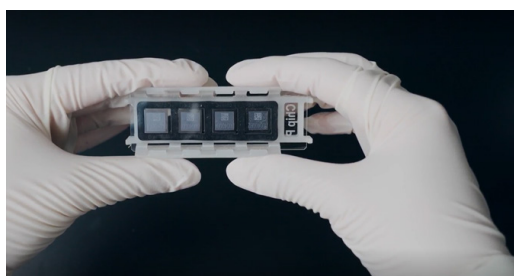
- f. 芯片对准垫圈孔位，避免夹具和垫圈接触芯片表面；



- 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。

