

时空转录组 FF V1.3 大尺寸芯片 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 透化测试操作 说明书



试剂套装货号及名称：

101SP11124 (4 RXNs) Stereo-seq 透化试剂套装 (1 cm*2 cm)

101SP11224 (4 RXNs) Stereo-seq 透化试剂套装 (2 cm*2 cm)

101SP11234 (4 RXNs) Stereo-seq 透化试剂套装 (2 cm*3 cm)

试剂盒版本号：V1.1

文档编号：STOG01021

说明书版本号：A

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.1
修订日期：2025 年 5 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。

- 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 大芯片 P 介绍	6
1.5. 注意事项	6

第二章 样本准备 8

第三章 时空转录组 FF V1.3 大尺寸芯片 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 透化测试标准操作流程

3.1. 实验前准备	10
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. 甘油封片	18
3.6. 透化时间测试	20
3.7. 反转录反应	22
3.8. 组织去除	23
3.9. 荧光拍照	25
3.10. 组织透化判断	26

附录

附录 A 兼容 H&E 染色操作流程	27
--------------------	----

 **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：**您可以在这里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 ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$)**。

STOmics Stereo-seq 透化试剂套装 ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 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。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。

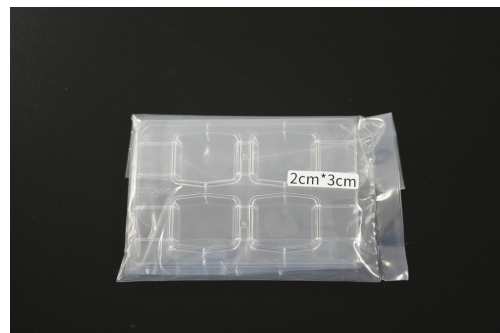
1.2. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成:

- Stereo-seq 透化试剂盒 *1 (4 RXN)
- Stereo-seq 芯片 P ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) *2 (2 EA)
或者 Stereo-seq 芯片 P ($2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) *2 (2 EA)
或者 Stereo-seq 芯片 P ($2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) *2 (2 EA)
- Stereo-seq Chip Reaction Plate ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$)*1 (1 EA)
或者 Stereo-seq Chip Reaction Plate($2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$)*1 (1 EA)
或者 Stereo-seq Chip Reaction Plate($2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$)*1 (1 EA)



透化试剂套装 (示意图)



芯片反应容器 (以 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 为例)

关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 至表格 1-3。

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

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

收到产品后

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

表格 1-1

Stereo-seq 透化试剂盒 货号：101KP11004（4 RXN）			
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	1000035269	 紫色	500 μL × 1
H&E Mounting Medium *	1000058944	 紫色	500 μL × 1
RT QC Buffer Mix	1000048870	 棕色	4150 μL × 1
RT QC Enzyme Mix	1000048871	 透明	500 μL × 1
TR Enzyme	1000035261	 绿色	350 μL × 1
TR Buffer	1000045420	 透明	3900 μL × 5
 储存温度：－ 25℃ ~ － 15℃  运输温度：－ 25℃ ~ － 15℃  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

芯片种类	货号	规格及数量
Stereo-seq 芯片 P（1 cm*2 cm）	100CP122	2 EA × 2
Stereo-seq 芯片 P（2 cm*2 cm）	100CP222	2 EA × 2
Stereo-seq 芯片 P（2 cm*3 cm）	100CP232	2 EA × 2
 储存温度：2℃ ~ 8℃  运输温度：－ 25℃ ~ － 15℃ 有效期：见标签		

表格 1-3

芯片反应容器种类	货号	规格及数量
Stereo-seq Chip Reaction Plate(1 cm*2 cm)	1000059152	1 EA ×1
Stereo-seq Chip Reaction Plate(2 cm*2 cm)	1000059153	1 EA ×1
Stereo-seq Chip Reaction Plate(2 cm*3 cm)	1000059154	1 EA ×1
 储存温度：18℃ ~ 25℃	 运输温度：0℃ ~ 30℃	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 1-4 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 1-4

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（或其他同等功能仪器）	-
-	小型离心机	-
-	移液器	-
-	漩涡混匀仪	-
-	烤片机	-
-	恒温培养箱	-

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
Thermo Fisher Scientific	一次性培养皿（6 cm）	150462
	封板膜	AB-1170
Corning	细胞培养板（6 孔板）	3516
	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
Jonostick	铁氟龙镊子	815F-ST

耗材		
品牌	描述	产品编号
Matin	Power Dust Remover（空气罐）	M-6318
-	显微镜盖玻片（尺寸：24 mm × 32 mm） 厚度：0.13 mm-0.16 mm）（2 cm*3 cm 芯片使用）	-
-	显微镜盖玻片（尺寸：24 mm × 24 mm） 厚度：0.13 mm-0.16 mm）（1 cm*2 cm 和 2 cm*2 cm 芯片使用）	-
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	1000 μL 带滤芯枪头	TF-1000-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
Parafilm	封口膜	PM996
-	载玻片	-
-	锡箔纸	-
-	5 mL 离心管	-

表格 1-5 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 solution Sigma	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 大芯片 P 介绍

每个芯片盒中包含 2 张 Stereo-seq 芯片 P ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 或 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 或 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$)，每个透化试剂套装中包含 2 盒芯片盒，共 4 张芯片 P。

Stereo-seq 芯片 (T/P) 保存方法

Stereo-seq 大芯片装于真空密封的铝箔袋中，冷链运输。收到产品后，请及时确认铝箔袋是否完好并处于真空密封状态，随后须立即将未开封的 Stereo-seq 芯片 T/P 储存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 。若拆袋后未使用，参照《[Stereo-seq 大芯片保存操作指南](#)》- [重新封装操作指引](#) 将大芯片正确放入芯片盒并与干燥剂一起重新密封。再次确认铝箔袋是否完好并处于密封状态，随后立即将铝箔袋储存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 。未真空密封的芯片不可放置超过两周，开封后请尽快使用。



需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

1.5. 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。
- 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。

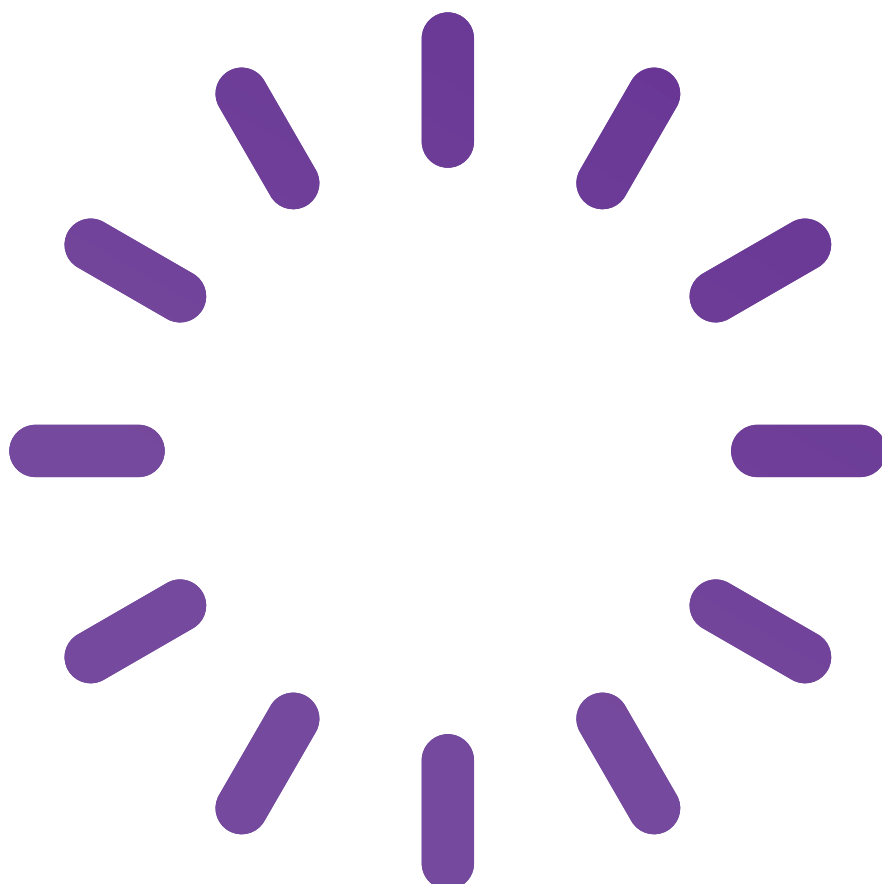


 建议对 $\text{RIN} \geq 6$ 的样本进行后续实验。

第三章

时空转录组 FF V1.3

大尺寸芯片 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 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	1 cm * 2 cm 芯片 准备流程	2 cm * 2 cm 芯片 准备流程	2 cm * 3cm 芯片 准备流程	储存
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μL 稀释到 20 mL，用量至少为 8 mL/ 芯片	取 20X SSC 100 μL，稀释到 20 mL，用量至少为 13 mL/ 芯片	取 20X SSC 100 μL，稀释到 20 mL，用量至少为 19 mL/ 芯片	室温
甲醇	在 6 孔板加入 3 - 4 mL/ 芯片	在 6 孔板加入 3 - 4 mL/ 芯片	在 6 cm 培养皿加入 4-5 mL/ 芯片	- 20℃
甲醇使用前在 - 20℃ 预冷 5-30 min。				
Glycerol	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温			室温
Wash Buffer	取 20 μL RI 加入 380 μL 0.1X SSC 中，用量至少为 400 μL / 芯片	取 30 μL RI 加入 570 μL 0.1X SSC 中，用量至少为 600 μL / 芯片	取 40 μL RI 加入 760 μL 0.1X SSC 中，用量至少为 800 μL / 芯片	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 值范围在 1.9-2.1 范围内；至少 1805 μL/ 芯片）	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 2（确保 pH 值范围在 1.9-2.1 范围内；至少 2185 μL/ 芯片）	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 2（确保 pH 值范围在 1.9-2.1 范围内；至少 2565 μL/ 芯片）	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 2-3 s, 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℃ 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 45 μL 稀释到 450 μL（至少 400 μL/ 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 65 μL 稀释到 650 μL（至少 600 μL/ 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 85 μL 稀释到 850 μL（至少 800 μL/ 芯片）	冰上备 用 6 hr
TR Enzyme	每张芯片用量 16 μL	每张芯片用量 20 μL	每张芯片用量 30 μL	冰上备用
TR Buffer	提前取出放于 55℃ 5 min 溶解白色沉淀，再恢复至室温			室温

兼容 H&E 染色 准备试剂 (可选)	准备流程	储存
醇溶伊红溶液	取 0.026 g 伊红 (Eosin Y) 粉末溶于 50 mL 甲醇中, 用封口膜封口保存	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) 过滤苏木素后用封口膜密封保存	室温避光 (不超过 7 d)
H&E Mounting Medium	提前 5 min 取出平衡至室温	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 $-15^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$	温度根据实际操作过程调整
烤片机	37°C 用于烤片	-
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
恒温培养箱	37°C , 用于透化 45°C , 用于反转录 55°C , 用于组织移除	检查培养箱温度是否准确, 及时调整
荧光显微镜	TRITC 通道	检查显微镜是否有异常, 必要时更换

其他准备	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
放置芯片	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)
芯片清洗	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿
甲醇固定	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿
甘油清洗	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿
透化	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器
反转录	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器
组织移除	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器

兼容 H&E 染色 其他准备 (可选)	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
放置芯片	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)	10 cm 培养皿 (贴有封口膜)
芯片清洗	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿
甲醇固定	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿
伊红染色	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿
苏木素染色和清洗	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器
透化	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器
反转录	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器
组织移除	1 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*2 cm 芯片反应容器	2 cm*3 cm 芯片反应容器

3.2. 切片准备



- a. 提前将烤片机温度设置到 37°C ;
- b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20°C , 样本头预冷至 $-15^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ (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至适合温度;



组织大小不同, 平衡时间不一致, 以组织切片时较丝滑、不跳刀、不颤片为准, $2\text{ cm} \times 3\text{ cm} \times 0.7\text{ cm}$ 组织平衡 1 hr 以供参考。

- e. 将组织块修剪成合适的尺寸 ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 芯片切面小于 $0.9\text{ cm} \times 1.8\text{ cm}$ 、 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 芯片切面小于 $1.8\text{ cm} \times 1.8\text{ cm}$ 、 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 芯片切面小于 $1.8\text{ cm} \times 2.7\text{ cm}$), 切去组织块周围过多的 OCT, 保留一部分 OCT, 方便转移组织;
- f. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上;
- 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

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

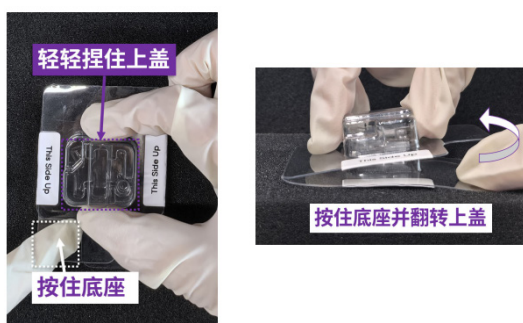


确认芯片背面与芯片包装上的编号是否一致，并准确记录芯片编号。

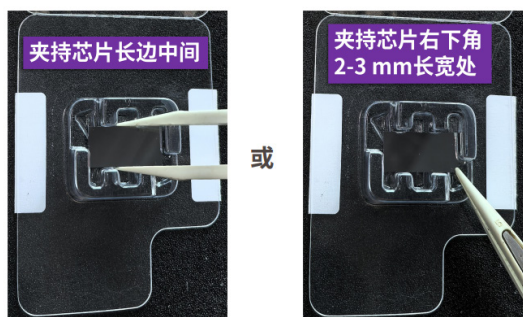
- 1) 从真空干燥铝箔袋中取出芯片盒，将芯片盒放置在桌面，并将写有 “This Side Up” 的方向朝上；
- 2) 将刀片伸入芯片盒中间缝隙，切开两边标签纸（如需拿起芯片盒寻找切入口，请轻轻捏住芯片腔室，以防芯片松脱移位）；



- 3) 按住底座露出部分，轻轻捏住上盖并翻转打开；



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



全文中涉及到大尺寸芯片的夹取都参考该步骤操作进行。

芯片的正面为亮光面，正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。若芯片拆袋后未使用，可参考 [《Stereo-seq 大芯片保存操作指南》- 重新封装操作指引](#)，芯片需重新干燥密封并储存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 。需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

- b. 将芯片置于 10 cm 培养皿（底部铺有封口膜）中复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，1 cm*2 cm 和 2 cm*2 cm 芯片在 6 孔板中使用 3000 μL Nuclease-Free Water 清洗 2 次（2 cm*3 cm 大芯片在 6 cm 培养皿中使用 4000 μL Nuclease-Free Water 清洗 2 次），清洗后气瓶吹干芯片四周及表面；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，重新将芯片置于 10 cm 培养皿中（底部铺有封口膜）即可准备贴片；



芯片夹出前，建议留有一定液体在皿内，以便芯片夹取。



- c. 预冷甲醇：1 cm*2 cm 和 2 cm*2 cm 芯片在 6 孔板中加入 3-4 mL 甲醇，2 cm*3 cm 芯片在 6 cm 培养皿中加入 4-5 mL 甲醇，确保甲醇能将芯片完全覆盖，预冷（- 20℃）时间 **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：1 cm*2 cm 和 2 cm*2 cm 芯片在 6 孔板中加入 3-4 mL 醇溶伊红溶液，2 cm*3 cm 芯片在 6 cm 培养皿中加入 4-5 mL 醇溶伊红溶液，确保醇溶伊红溶液能将芯片完全覆盖。预冷（- 20℃）时间 **5-30 min**。

- d. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- e. 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) 切取组织切片，用细毛刷将冷冻切片轻轻展开铺平整，将冷冻切片移到切片台右侧靠近边缘处；
- 2) 反手持尖镊子夹起芯片一角，使芯片正面朝下，对准切片；
- 3) 轻轻一压，避免芯片接触台面，肉眼可见切片已经吸附到芯片表面（贴片时间控制在 **1 min** 以内）；
- 4) 将芯片正面朝上，快速将芯片置于 37℃烤片机上，烤片时间如表格 3-1；

表格 3-1 各尺寸大芯片烤片时间

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
烤片时间	8 min	8 min	10 min

B. 冷贴



1) 将芯片正面朝上置于切片机中，预冷 **3-10 min**;

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

2) 切下一张切片，将冷冻切片小心覆盖在芯片正中央，尽量一次贴片成功，用指腹加温芯片背面使切片贴合，建议组织切片贴片控制在 **5 min** 内。快速将芯片置于 37°C 烤片机上，烤片时间如表格 3-1。



⋯ 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) 将烤片完成的芯片放于底部贴有封口膜的 6 孔板或 6 cm 培养皿中，用封口膜密封然后将其放入可密封的自封袋中，同时放入干燥剂包，尽可能多地挤出空气并将自封袋密封。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 6 孔板或 6 cm 培养皿转移，取出贴有组织的芯片，快速置于 37°C 烤片机上孵育，烤片时间如表格 3-1。

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. 将上一步烤干的芯片立即放于 -20°C 预冷的甲醇中固定 **40 min**（容易脱片的组织建议延长固定时间，不超过 **1 hr**），确保甲醇浸没过所有芯片；
- b. 固定结束后，将 6 孔板 /6 cm 培养皿转移至通风橱中；
- c. 将芯片从 6 孔板 /6 cm 培养皿中取出，置于无尘纸上，用无尘纸吸干芯片背面和周围多余的甲醇；
- d. 将芯片放于底部贴有封口膜的 10 cm 培养皿中，在通风橱中通风 **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，将芯片转移至实验台上进行下一步。

3.5. 甘油封片

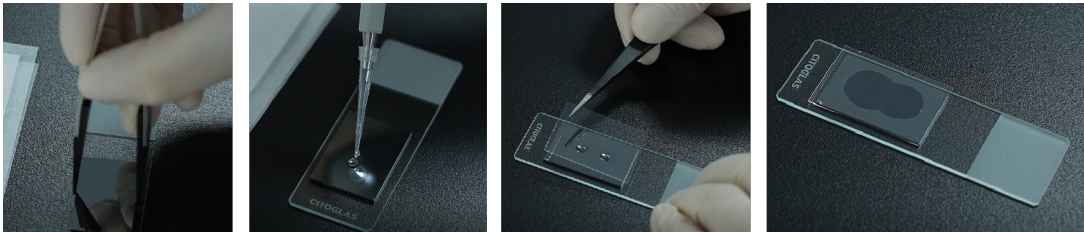


- 提前将 Glycerol 置于室温平衡 5min。
 - 将芯片放置于表面滴加 1~2 μL 水的载玻片上，将芯片置于水滴上以起到固定作用；Glycerol 使用前离心，用移液器缓慢吸取 Glycerol 甘油滴加到组织中央，可均匀分 2-3 滴，滴加在芯片表面，加液量参考表格 3-2；
- 样本较大，可适量多加甘油，甘油不必均分过多滴，容易出现覆盖不全、产生气泡的问题，确保甘油浸润整张芯片，避免产生气泡；

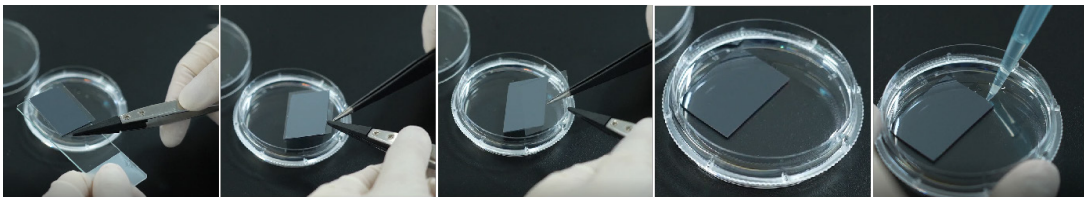
表格 3-2 各尺寸大芯片甘油封片加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
甘油	10-15 μL/ 一张芯片	20-28 μL/ 一张芯片	30-40 μL/ 一张芯片

- 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。
 - 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。
 - 根据【实验前准备】，提前配制 0.01N HCl，将一个金属浴或其他同等功能仪器温度设置到 37℃，配制 1X 透化试剂工作液（用量如表格 3-5 所示），1X 透化试剂工作液使用前置于金属浴或其他同等功能仪器中 37℃ 孵育 10 min（最长时间不超过 30 min）；
 - 静置结束后，用镊子夹住盖玻片边缘，将芯片移至培养皿或孔板内边缘（1 cm*2 cm 和 2 cm*2 cm 芯片放置于 6 孔板，2 cm*3 cm 芯片放置于 6 cm 培养皿），用镊子轻轻地移动盖玻片，直到芯片与盖玻片完全分离；

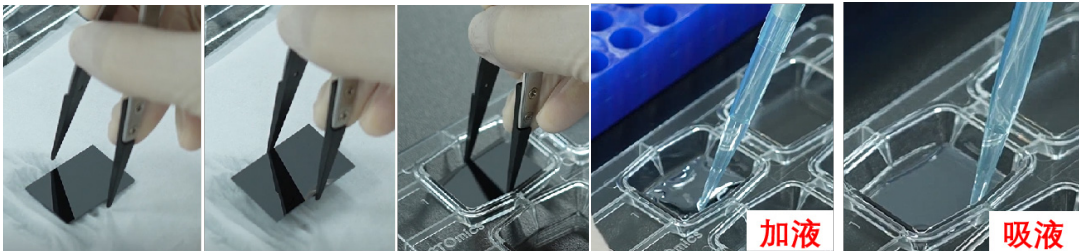


- 向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量如表格 3-3 所示），吹打芯片 5 次（沿芯片长边从左到右，清洗 3 次，芯片短边吹打 2 次）；
- 吸弃 0.1X SSC 溶液，再向芯片加入 0.1X SSC 溶液浸泡 3-5 s（用量如表格 3-3 所示）；



⋯ 确保芯片全部浸没于溶液中。

- g. 将芯片取出放置于无尘纸上，吸干背面液体，然后将芯片放置于对应尺寸的芯片反应容器中；
- h. 在芯片上缓缓滴加 0.01N HCl 溶液，各尺寸加液量如表格 3-4 所示，液体浸润整张芯片后，从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃液体。



表格 3-4 各尺寸大芯片 0.01N HCl 溶液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
0.01N HCl 溶液	400 μL/ 一张芯片	600 μL/ 一张芯片	800 μL/ 一张芯片

3.6. 透化时间测试

- a. 取出孵育好的 1X 透化试剂工作液，按照表格 3-5 进行加液（若每张芯片切片时间间隔较长，建议按照流程单张透化）；

表格 3-5 各尺寸大芯片透化试剂工作液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
1X 透化试剂工作液加液量	400 μL/ 一张芯片	600 μL/ 一张芯片	800 μL/ 一张芯片

- b. 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。时间梯度可根据样本实际情况做调整，透化时间最长的芯片先添加 1X 透化试剂工作液，从芯片四角缓慢加液，每隔一定时间（如 **6 min**），依次加入 1X 透化试剂工作液，将封板膜（不要撕开，包含白底）放置于芯片反应容器上覆盖反应孔，置于恒温培养箱 37℃孵育；



封板膜（含白底）



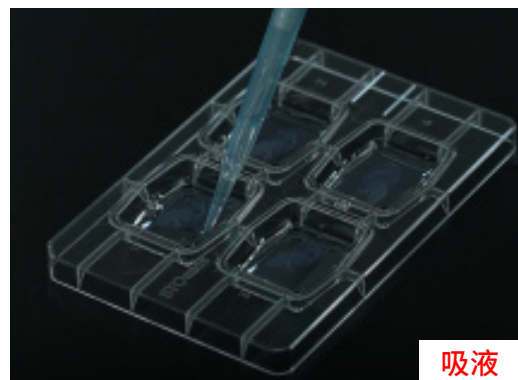
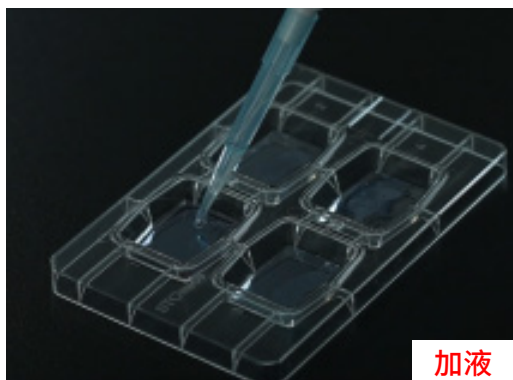
透化期间，将 RT QC Buffer Mix 和 RT QC Enzyme Mix 在冰上提前解冻，可先参考 [3.7. 反转录反应](#) 中的表格 3-7 配制 RT QC Mix，用锡箔纸包裹避光，冰上放置待用。

- c. 透化结束后，将芯片反应容器从 37℃恒温培养箱取出；
- d. 用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙缓慢吸掉透化试剂，避免接触芯片正面，尽量减少表面液体；
- e. 向芯片加入 Wash Buffer（用量如表格 3-6）；

表格 3-6 各尺寸大芯片清洗溶液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
Wash Buffer	400 μL/ 一张芯片	600 μL/ 一张芯片	800 μL/ 一张芯片

- f. 用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙缓慢吸弃 Wash Buffer，保持芯片湿润；
- g. 立即进行下一步操作，以避免 RNA 降解。



⋯ 步骤 g. 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](#)。

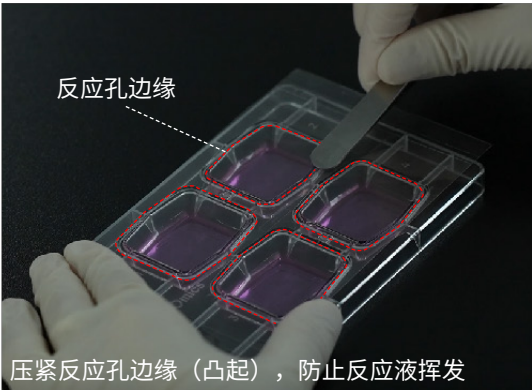
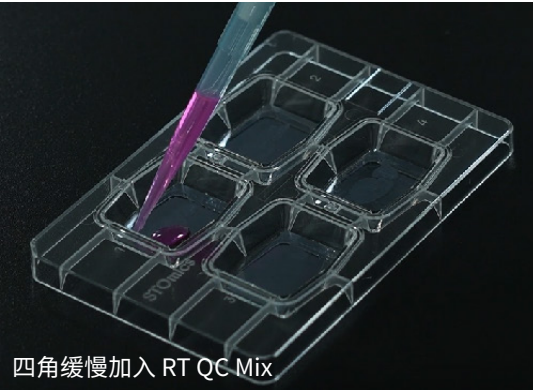
3.7. 反转录反应

a. 取出配制好的 RT QC Mix 吹打混匀后瞬时离心；

表格 3-7 RT QC Mix

组分	1 cm*2 cm 芯片 单个反应体积 /μL	2 cm*2 cm 芯片 单个反应体积 /μL	2 cm*3 cm 芯片 单个反应体积 /μL
RT QC Buffer Mix	360	540	720
RT QC Enzyme Mix	40	60	80
Total	400	600	800

- b. 在芯片四角缓慢加入 RT QC Mix，用量参考表格 3-7，确保 RT QC Mix 均匀覆盖整张芯片，确保液面无气泡；
- c. 使用封板膜密封反应孔，压紧反应孔边缘（凸起），防止反应液挥发，将芯片反应容器放置于 45℃恒温培养箱内避光孵育 **1 hr**（反应时间可延长，总时长不能超过 **16 hr**）。



 封板膜密封，避免反应液蒸发！

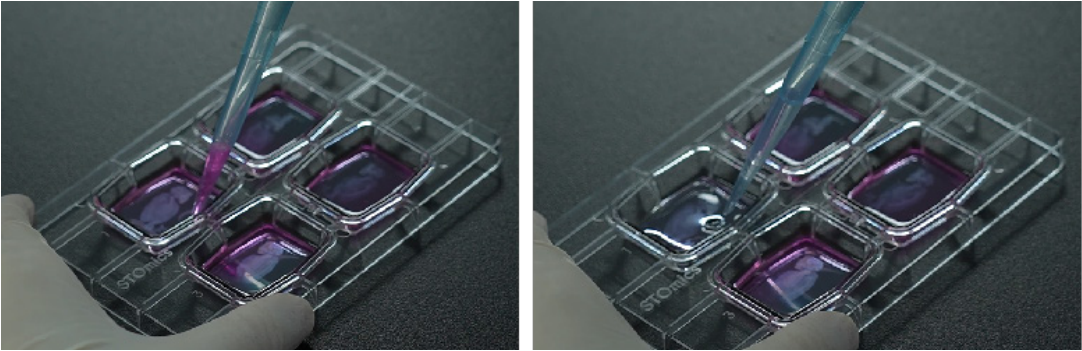
3.8. 组织去除

a. 按照表格 3-8 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 3-8 组织移除试剂 Mix

组分	1 cm*2 cm 芯片 单个反应体积 / μ L	2 cm*2 cm 芯片 单个反应体积 / μ L	2 cm*3 cm 芯片 单个反应体积 / μ L
TR Buffer	784	980	1470
TR Enzyme	16	20	30
Total	800	1000	1500

- b. 将芯片从 45℃恒温培养箱中取出；
- c. 用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃芯片表面的 RT QC Mix；

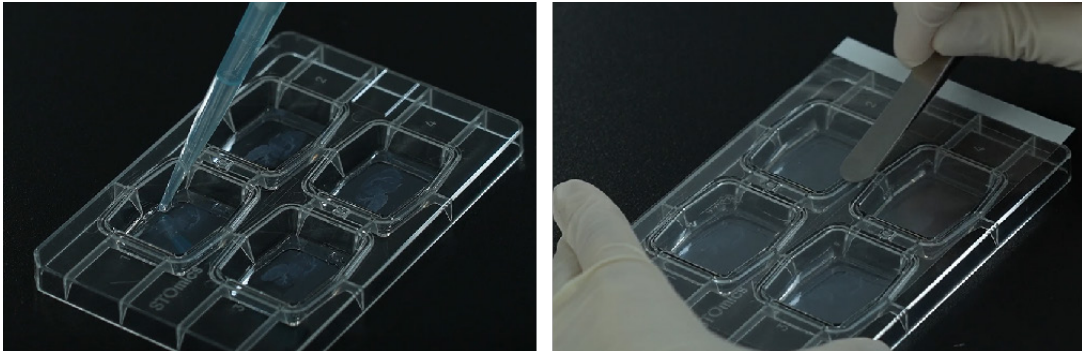


d. 向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量参考表格 3-9），尽量清洗掉芯片表面残留的 RT QC Mix（若观察到白色膜状物质，尽量将白色物质吹打干净）；

表格 3-9 各尺寸大芯片清洗溶液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
0.1X SSC 溶液	1000 μ L/ 一张芯片	2000 μ L/ 一张芯片	3000 μ L/ 一张芯片

- e. 用移液器吸弃 0.1X SSC 溶液；
- f. 重复步骤 d.-e. 一次，共计清洗两次；
- g. 往每张芯片加入表格 3-8 所示组织移除试剂 Mix，将放有芯片的反应孔使用封板膜密封，将芯片反应容器放置在 55℃恒温培养箱反应 **1 hr** 以上，最长不超过 **16 hr**；



h. 组织移除结束后，用组织移除试剂 Mix 吹打芯片表面 10 次后吸弃；

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

i. 向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量参考表格 3-10）；

表格 3-10 各尺寸大芯片组织移除后清洗溶液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
0.1X SSC 溶液 / Nuclease-Free Water	1000 μL/ 一张芯片	2000 μL/ 一张芯片	3000 μL/ 一张芯片

j. 在芯片四周将 0.1X SSC 溶液上下吸打 5 次左右，然后吸弃 0.1X SSC 溶液；

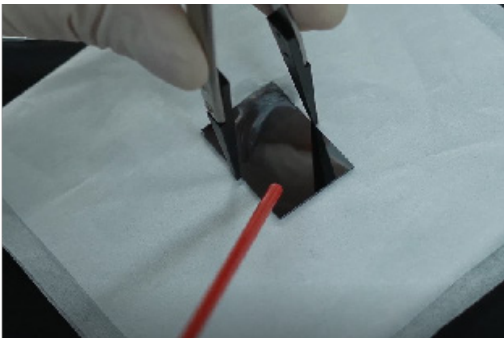
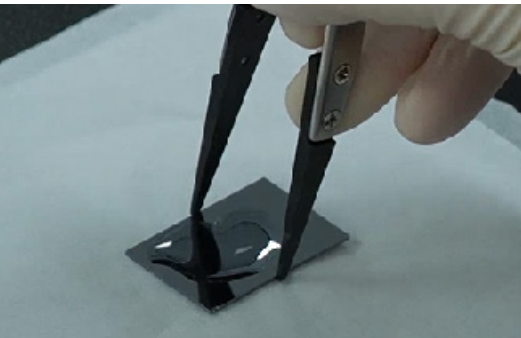
k. 重复步骤 i.-j. 一次，共计清洗两次；

l. 向芯片加入 Nuclease-Free Water（用量参考表格 3-10）；

m. 上下吸打冲洗芯片表面以洗掉表面盐分；

n. 用镊子将芯片转移到无尘纸上，吸干芯片背面和周围的液体；

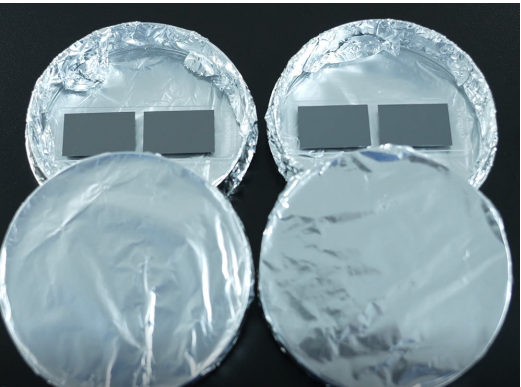
o. 用空气罐 (MATIN,M-6318) 将芯片表面完全吹干；



☹️ 如芯片表面残留明显痕迹，在芯片表面滴加 150 μL（1 cm*2 cm）/300 μL（2 cm*2 cm）/400 μL（2 cm*3 cm）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）。

p. 将芯片放置于表面滴加 1-2 μL 水的载玻片上，将芯片置于水滴上以起到固定作用；

q. 将载玻片放置于干燥的 10 cm 培养皿中，用锡箔纸包裹孔板以避光，等待拍照。



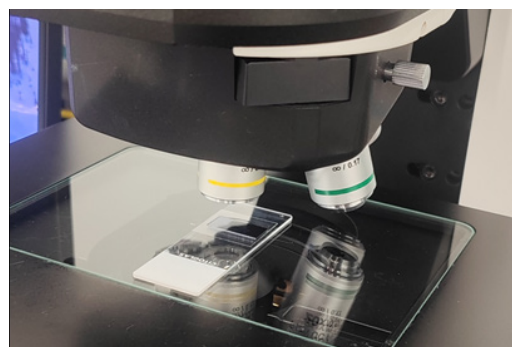
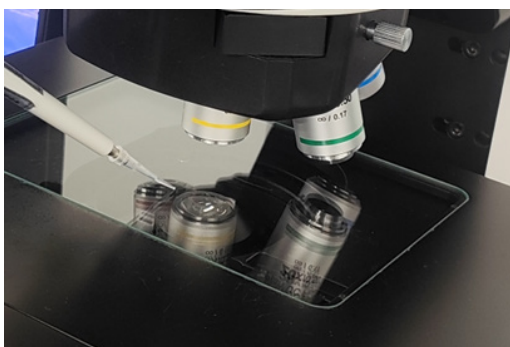
3.9. 荧光拍照

- a. 在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，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：C05479C3D3。

- 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. 用显微镜的玻片夹将载玻片固定，如没有玻片夹，则在载物台上滴加 1-2 μL 水，小心地将放有芯片的载玻片转移到显微镜载物台上，取下遮光罩，选择感兴趣的芯片区域；



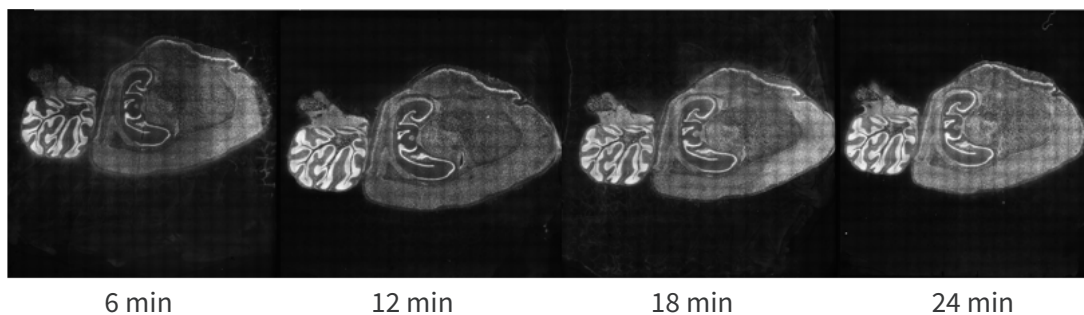
- d. 先用 4 倍镜找到目标区域，然后切换到 10 倍镜，扫描整张芯片。

- ⋯ 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。

如图一所示，**6 min** 和 **18 min** 透化时间下，组织呈现同一皮层亮度不均匀的情况，说明透化不充分；**24 min** 下，细节清晰，信号均匀，亮度最大；**12 min** 下的信号弱于 **24 min** 下的信号；因此，最佳的透化时间是 **24 min**。



图一 . 大鼠脑（正中矢状面）

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. 将上一步烤干的芯片立即放于 -20°C 下预冷的甲醇中固定 **40 min**，确保甲醇浸没过所有芯片（容易脱片的组织建议延长固定时间，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 6 孔板 / 6 cm 培养皿中，继续 -20°C 放置 **1 min**；
- d. 固定好后，将 6 孔板 / 6 cm 培养皿转移到通风橱中，从 6 孔板 / 6 cm 培养皿中取出芯片，用无尘纸吸干芯片背面和周围多余的甲醇，确保无液体残留；
- e. 将芯片放于底部贴有封口膜的 10 cm 培养皿中，在通风橱中通风 **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。

- f. 甲醇挥发干后，肉眼可见表面变干，将芯片转移至实验台上，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 0.01N HCl；染色期间参考 [3.6 透化时间测试](#) 表格 3-5 提前准备好 1X 透化试剂工作液；
- b. 参考下表提前配制好染色试剂；



使用前注意把分装好的染液振荡混匀，请勿置于冰上。

各尺寸大芯片染液及清洗加液量

组分	1 cm*2 cm 芯片 单个反应体积 / μL	2 cm*2 cm 芯片 单个反应体积 / μL	2 cm*3 cm 芯片 单个反应体积 / μL
苏木素	600	800	1000
0.1X SSC 溶液	500	700	800
Bluing Buffer	500	700	800

- c. 将芯片放置于对应尺寸的芯片反应容器中，滴加苏木素染色液，用量参考步骤 b. 中的加液量表格。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，确保染色液浸没过所有芯片，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。

- d. 用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃苏木素染色液（倾斜角度小于 60° ），尽量减少芯片反应容器中的液体残留；
- e. 向芯片反应容器中加入 0.1X SSC 进行清洗，用量参考步骤 b. 中的加液量表格，清洗后用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃 0.1X SSC（倾斜角度小于 60° ），尽量减少芯片反应容器中的液体残留；
- f. 重复步骤 e. 两次，共计清洗三次；
- g. 将 Bluing Buffer（返蓝染色液）滴加在芯片上，用量参考步骤 b. 中的加液量表格。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，确保染色液浸没过所有芯片，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。

- h. 用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃 Bluing Buffer 返蓝染色液（倾斜角度小于 60° ），尽量减少芯片反应容器中的液体残留；
- i. 向芯片反应容器中加入 0.1X SSC 进行清洗，用量参考步骤 b. 中的加液量表格，清洗后用移液器从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃 0.1X SSC（倾斜角度小于 60° ），尽量减少芯片反应容器中的液体残留；
- j. 将芯片转移至无尘纸上，一只手拿镊子固定芯片，另一只手拿空气罐，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；
- k. 用移液器缓慢吸取 H&E Mounting Medium 滴加到组织中央，避免产生气泡，加液量参考下述封片加液量表格；



各尺寸大芯片 H&E Mounting Medium 封片加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
H&E Mounting Medium	8-12 μL/ 一张芯片	16-24 μL/ 一张芯片	24-36 μL/ 一张芯片

- 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。

l.

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，室温孵育至少 10 min。

- 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。
- m.

提前将一个金属浴或其他同等功能仪器温度设置到 37℃，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℃ 孵育 10 min（最长时间不超过 30 min）；
- n.

1X 透化试剂工作液孵育结束前 3 min 左右，用镊子夹住盖玻片边缘，用镊子轻轻地平行移动盖玻片，直到芯片和盖玻片完全分离；
- o.

将芯片放置于对应尺寸的芯片反应容器中，向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量如下述表格所示），吹打芯片 5 次（沿芯片长边从左到右，清洗 3 次，芯片短边吹打 2 次）；

各尺寸大芯片 H&E Mounting Medium 封片清洗溶液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
0.1X SSC 溶液	1500 μL/ 一张芯片	2000 μL/ 一张芯片	3000 μL/ 一张芯片

- p.

吸弃 0.1X SSC 溶液，再向芯片加入 0.1X SSC 溶液浸泡 3-5 s（用量参考步骤 o. 中的清洗液加液量表格）；
- 确保芯片全部浸没于溶液中。
- q.

吸弃 0.1X SSC 溶液后，在芯片上缓缓滴加 0.01N HCl 溶液，各尺寸加液量如下述表格所示，液体浸润整张芯片后，从芯片反应孔长边中点的间隙吸弃液体。

各尺寸大芯片 0.01N HCl 溶液加液量

芯片尺寸	1 cm*2 cm 芯片	2 cm*2 cm 芯片	2 cm*3 cm 芯片
0.01N HCl 溶液	400 μL/ 一张芯片	600 μL/ 一张芯片	800 μL/ 一张芯片

- 请返回参考 [3.6 透化时间测试](#)，继续实验操作。

