

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



试剂套装货号及名称：

101ST13122 (2 RXNs) Stereo-seq 转录组试剂套装 (1 cm*2 cm)

101ST13221 (1 RXNs) Stereo-seq 转录组试剂套装 (2 cm*2 cm)

101ST13231 (1 RXNs) Stereo-seq 转录组试剂套装 (2 cm*3 cm)

试剂盒版本号：V1.3

文档编号：STOG01022

说明书版本号：A

版本历史

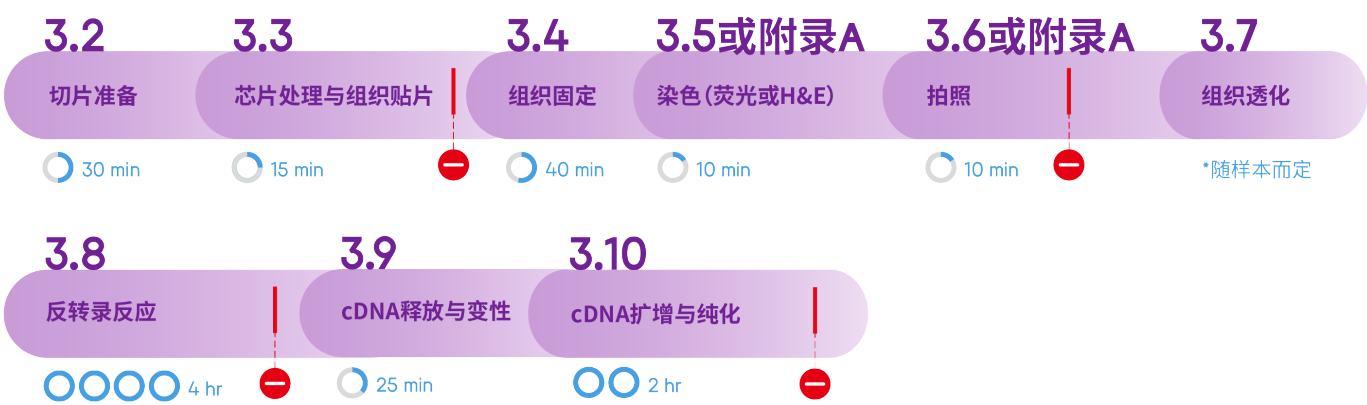
说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.3
修订日期：2025 年 5 月
描述：首次发布

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: ~ 1.5 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 大芯片 T 介绍	8
1.6. 注意事项	8

第二章 样本准备 9

第三章 时空转录组 FF V1.3 大尺寸芯片转录组实验标准操作流程

3.1. 实验前准备	12
3.2. 切片准备	15
3.3. 芯片处理与组织贴片	16
3.4. 组织固定	19
3.5. 荧光染色	20
3.6. 荧光拍照	22
3.7. 组织透化	25
3.8. 反转录反应	26
3.9. cDNA 释放与变性	27
3.10. cDNA 扩增与纯化	29
3.10.1. cDNA 扩增	29
3.10.2. cDNA 纯化	31

附录

附录 A 兼容 H&E 染色操作流程	35
--------------------	----



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 转录组试剂套装 ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$)**。

STOmics Stereo-seq 转录组试剂套装 ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 2\text{ cm}/2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 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) 上装载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》](#)。

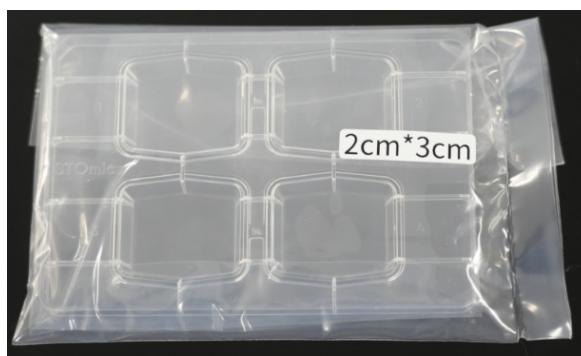
1.3. 产品组成

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 (2 RXN/1 RXN/1 RXN)
- Stereo-seq 芯片 T ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) * 1 (2 EA)
或者 Stereo-seq 芯片 T ($2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) * 1 (1 EA)
或者 Stereo-seq 芯片 T ($2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) * 1 (1 EA)
- Stereo-seq Chip Reaction Plate ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) * 1 (2 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)



转录组试剂套装 (示意图)



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

*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 与表格 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 转录组试剂盒 T 货号: 101KT13002 (2 RXN) /101KT13001 (1 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	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

芯片种类	货号	规格及数量
Stereo-seq 芯片 T (1 cm*2 cm)	100CT13122	2 EA ×1
Stereo-seq 芯片 T (2 cm*2 cm)	100CT13221	1 EA ×1
Stereo-seq 芯片 T (2 cm*3 cm)	100CT13231	1 EA ×1
 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

芯片反应容器种类	货号	规格及数量
Stereo-seq Chip Reaction Plate(1 cm*2 cm)	1000059464	2 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°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 1-4 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	-
Thermo Fisher Scientific*	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636
Bio-Rad *	T100™ PCR 仪	1861096
Thermo Fisher Scientific	DynaMag-2 磁力架	12321D
NEB	磁力架 (0.2 mL)	S1515S
Thermo Fisher Scientific	Qubit™ 3.0 荧光定量仪	Q33216 (或同等功能仪器)
Agilent Technologies™	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）使用。



试剂		
品牌	描述	产品编号
-	无水乙醇（分析纯）	-
	Nuclease-Free Water	AM9937
Ambion	1X TE Buffer, pH 8.0	AM9858
	20X SSC	AM9770
Agencourt ¹	AMPure® XP	A63882
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
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
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
	0.2 mL PCR 管 ¹	PCR-02-C
	PCR 八联管 ¹	PCR-0208-CP-C
	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
Invitrogen	Qubit Assay Tubes	Q32856
-	5 mL 离心管	-
Parafilm	封口膜	PM996
-	锡箔纸	-
-	载玻片	-



从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

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。

1.5. Stereo-seq 大芯片 T 介绍

- $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 尺寸的芯片盒中包含 2 张 Stereo-seq T 芯片；
- $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 和 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 尺寸的芯片盒中各包含 1 张 Stereo-seq T 芯片。

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。

1.6. 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 $\text{RIN} \geq 6$ 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 ($\leq 2\text{cm} \times 3\text{cm}$) 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 大尺寸芯片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	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
5X SSC	取 20X SSC 1 mL 稀释到 4 mL			室温
0.1X SSC	取 20X SSC 250 μL 稀释到 50 mL			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°C
甲醇使用前在 -20°C 预冷 5-30 min。				
RI	-20°C 取出冰上备用			冰上备用
Wash Buffer	取 27.5 μL RI 加入 522.5 μL 0.1X SSC 中， 用量至少为 550 μL/ 芯片	取 45 μL RI 加入 855 μL 0.1X SSC 中， 用量至少为 900 μL/ 芯片	取 75 μL RI 加入 1425 μL 0.1X SSC 中， 用量至少为 1500 μL/ 芯片	冰上备用
Glycerol	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温			室温
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 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°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 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
0.1M KOH	取 10 μL 8M KOH 稀释到 800 μL	取 10 μL 8M KOH 稀释到 800 μL	取 11 μL 8M KOH 稀释到 880 μL	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制。				
Elute Additive	提前 5 min 取出，用 量至少为 15 μL/ 芯 片	提前 5 min 取出，用 量至少为 20 μL/ 芯 片	提前 5 min 取出， 用量至少为 22.5 μL/ 芯片	冰上备用
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%			室温 24 hr

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
Neutralization Solution	提前 5 min 取出放于室温备用			室温
磁珠	提前取出，室温放置 30 min 平衡			室温 6 hr

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°C ~ -10°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 cDNA 释放	检查培养箱温度是否准确，及时调整
PCR 仪	95°C Hold，用于变性 (热盖 105°C)	检查仪器是否有异常，必要时更换
荧光显微镜	FITC 通道 (ssDNA 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

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
ssDNA 染色	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)
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
cDNA 释放	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
cDNA 释放	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. 提前将烤片机温度调节到 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



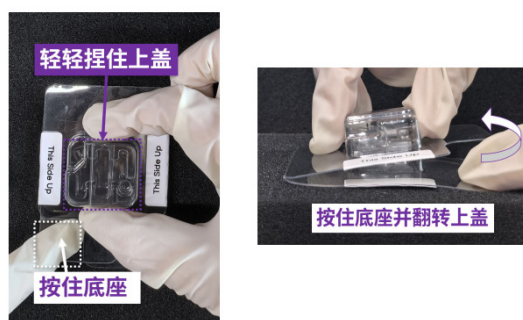
- a. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出 Stereo-seq 芯片 T，记录芯片背面的编号；注意不要触碰芯片正面；

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。该信息用于后续图像 QC 及下游分析，请务必准确记录。

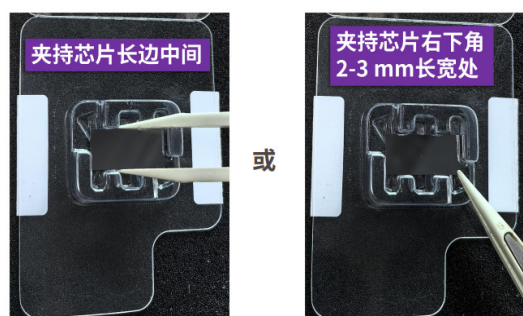
- 1) 从真空干燥铝箔袋中取出芯片盒，将芯片盒放置在桌面，并将写有 “This Side Up” 的方向朝上；
- 2) 将刀片伸入芯片盒中间缝隙，切开两边标签纸（如需拿起芯片盒寻找切入口，请轻轻捏住芯片腔室，以防芯片松脱移位）；



- 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。

— (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，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。



☰ 固定期间可参考 3.5. 荧光染色 表格 3-2 提前配置组织荧光染色液，室温避光保存备用。

- a. 将上一步烤干的芯片立即放于 -20℃ 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. 荧光染色

- a. 按照表格 3-2 配制 ssDNA 荧光染色液，室温避光保存备用；

表格 3-2 组织荧光染色液配制

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
5X SSC	189	378	756
Qubit ssDNA Reagent	1	2	4
RI	10	20	40
Total	200	400	800

- b. 将组织荧光染色液加到芯片上，用量参考表格 3-2。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。

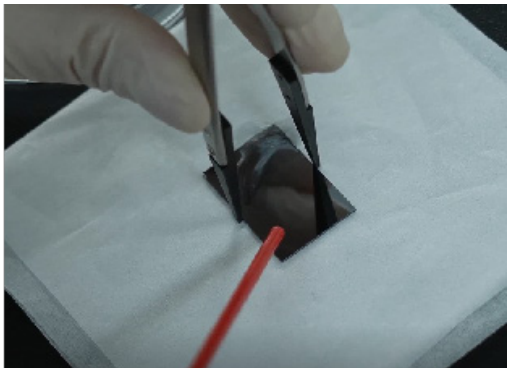
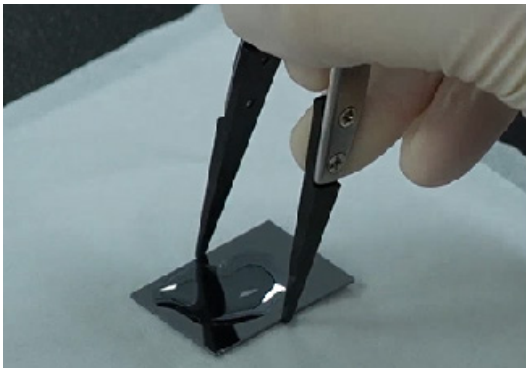
- c. 染色结束前配制 Wash Buffer，用量如表格 3-3，冰上放置待用；
- d. 提前配制 0.01N HCl，染色期间参考 [3.7 组织透化](#) 表格 3-7 提前准备好 1X 透化试剂工作液；
- e. 提前将一个金属浴或其他同等功能仪器温度设置到 37℃，1X 透化试剂工作液使用前置于金属浴或者其他同等功能仪器中 37℃ 孵育 **10 min**（最长时间不超过 **30 min**）；

表格 3-3 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	150 μL/ 一张芯片	300 μL/ 一张芯片	700 μL/ 一张芯片

- f. 用移液器从芯片一角吸去组织荧光染色液，可稍稍倾斜芯片吸液，尽量减少表面液体；
- g. 向芯片加入 Wash Buffer，加液量参考表格 3-3；
- h. 用移液器从芯片一角吸弃 Wash Buffer，可稍稍倾斜芯片吸液，尽量减少表面液体；

- i. 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；



确保芯片上没有残留的染色液。

- j. 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；
- k. Glycerol 使用前离心，用移液器缓慢吸取 Glycerol 甘油滴加到组织中央，Glycerol 可均匀分 2-3 滴，滴加在芯片表面，加液量参考表格 3-4；

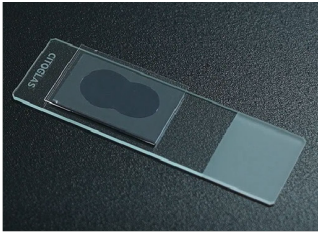
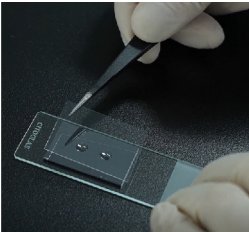
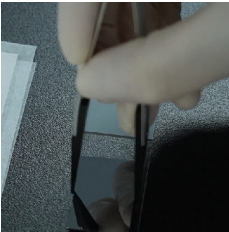
样本较大，可适量多加甘油，甘油不必均分过多滴，容易出现覆盖不全、产生气泡的问题，确保甘油浸润整张芯片，避免产生气泡。

表格 3-4 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。

- l. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时夹住另一端，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。



3.6. 荧光拍照

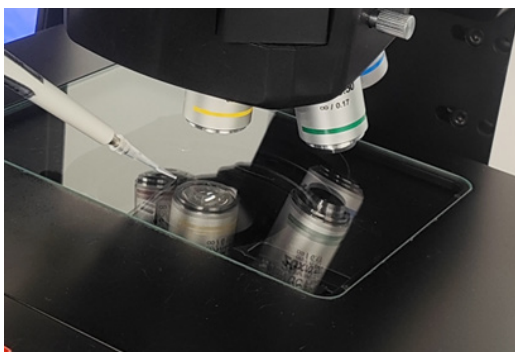
成像过程需要保证染色通道的 Track 线和组织区域同时清晰且组织区域不过曝。

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

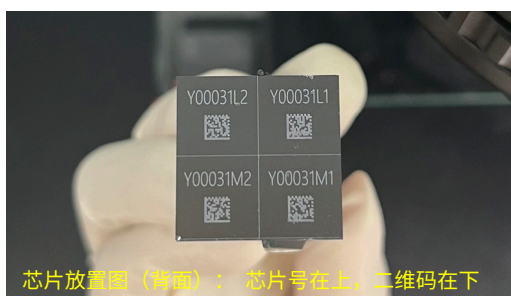
b. 用显微镜的玻片夹将载玻片固定，如没有玻片夹，则在载物台上滴加 1-2 μL 水，小心地将放有芯片的载玻片转移到显微镜载物台上，将载玻片置于水滴上以起到固定作用。如下图；



c. 载玻片轻放在载物台上，芯片尽量与载物台平行；

要求芯片边缘水平角度小于 15° 。

d. 芯片放置时，确保芯片的方向正确，使得背面的芯片号 (SN) 位于上方，而二维码位于下方，如下图所示：



芯片放置图（背面）：芯片号在上，二维码在下

e. 打开荧光显微镜，选择落射荧光模式 (FITC 通道 (ssDNA)) ；

f. 确定组织位置：选择 4 倍物镜，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）；

g. 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 4 倍物镜下扫描地图，以便确定正式扫描区域；

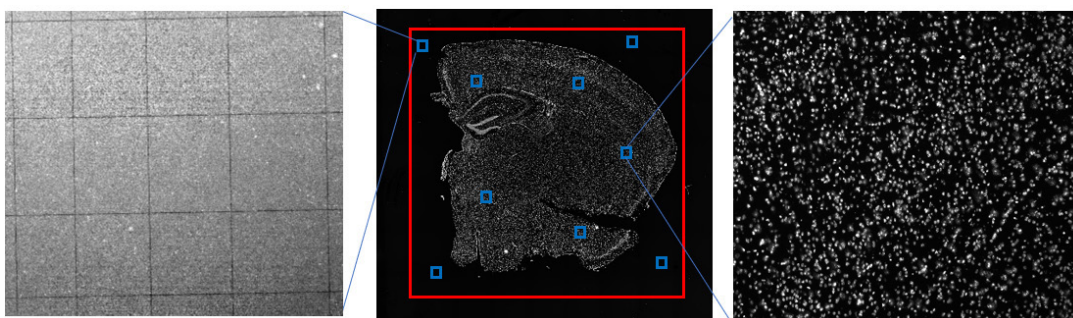
如果显微镜无扫描地图功能，直接跳过该步骤。

h. 调整显微镜倍数：将物镜调整至 10 倍，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；

- i. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；
- j. 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。



- k. 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；
- l. 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](#)》。



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）。

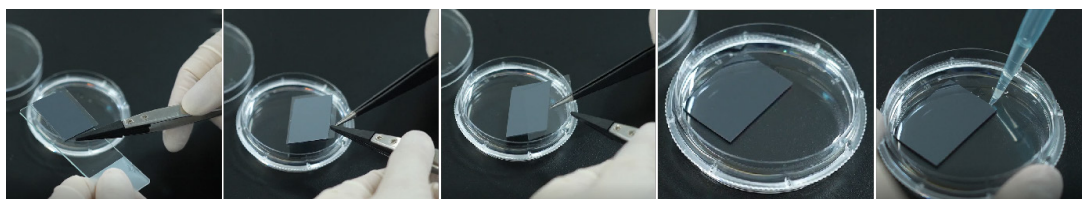


如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，可以继续实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 手动图像处理。



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。

- m. 拍照后，将芯片从载玻片取下，用镊子夹住盖玻片边缘，将芯片转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），用镊子轻轻地平行移动盖玻片，直到芯片和盖玻片完全分离；



- n. 向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量如表格 3-5 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）；
- o. 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 3-5 所示）；

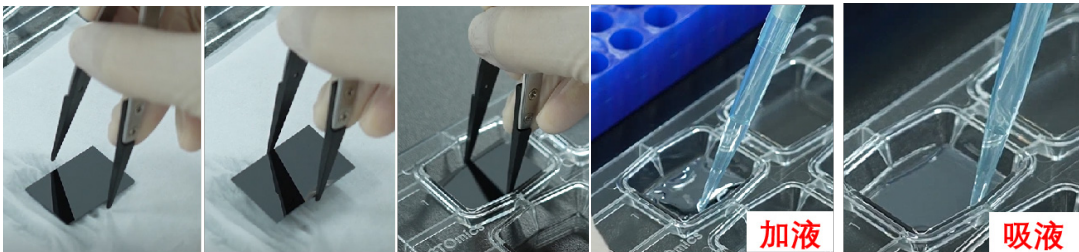
表格 3-5 各尺寸大芯片甘油清洗溶液加液量

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



⋯ 确保液体浸没芯片。

- p. 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；



- q. 在芯片上缓缓滴加 0.01N HCl 溶液，各尺寸加液量如表格 3-6 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 3-6 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

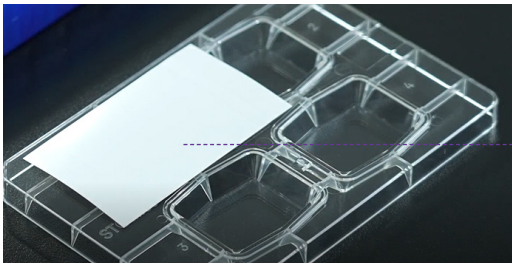
3.7. 组织透化

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

表格 3-7 各尺寸大芯片透化工作液加液量

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. 1X 透化试剂工作液孵育结束后，在芯片四角缓慢加入 1X 透化试剂工作液，用量参考表格 3-7；
- c. 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，将芯片反应容器置于 37℃ 恒温培养箱中进行透化反应；



封板膜（含白底）



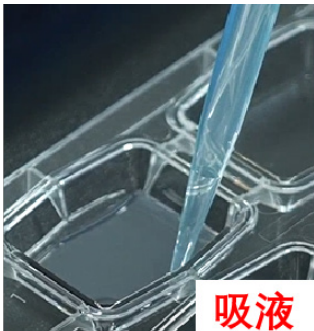
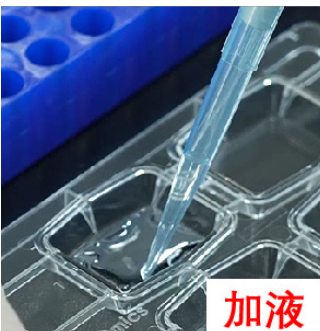
最佳透化时间通过 STOmics Stereo-seq 透化试剂套装预先确定。详情请参考 [《时空转录组 FF V1.3 大尺寸芯片透化测试操作说明书》](#)。

- d. 在等待透化期间，参考表格 3-9 配制 RT Mix，冰上放置待用；
- e. 透化结束后，将芯片反应容器从 37℃ 恒温培养箱中取出；
- f. 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；
- g. 向芯片加入 Wash Buffer（用量参考表格 3-8）；

表格 3-8 各尺寸大芯片透化后清洗溶液加液量

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

- h. 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；



避免芯片完全干燥。



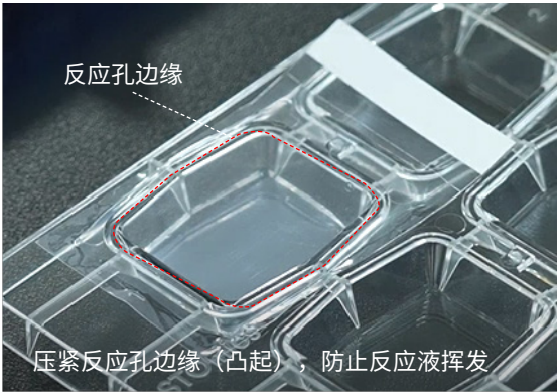
3.8. 反转录反应

a. 取出配制好的 RT Mix 吹打混匀后瞬时离心，在芯片四角缓慢加入 RT Mix，用量参考表格 3-9，确保 RT Mix 均匀覆盖整张芯片，确保液面无气泡；

表格 3-9 RT 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 Buffer Mix	373.5	539.5	705.5
RT Plus	9	13	17
RT Oligo	22.5	32.5	42.5
RT Enzyme Mix	45	65	85
Total	450	650	850
加液量	400	600	800

b. 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，反应 4 hr 或以上，最长不超过 16 hr。



封板膜密封，避免反应液蒸发！

3.9. cDNA 释放与变性

- a. 提前 **5 min**，按照表格 3-10 配制 cDNA Release Mix（需多配置 150 μL, 便于后续回收液补充），吹打混匀瞬时离心后室温放置；

表格 3-10 各尺寸大芯片 cDNA Release Mix 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
0.1 M KOH	585	780	877.5
Elute Additive	15	20	22.5
Total	600	800	900
加液量	450	650	750

- b. 反转录反应结束后，将芯片反应容器从 45℃ 恒温培养箱中取出，小心撕开封板膜，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 Mix，尽量减少表面液体；
- c. 向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量参考表格 3-11），均匀覆盖整张芯片；

表格 3-11 RT 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	400 μL/ 一张芯片	600 μL/ 一张芯片	800 μL/ 一张芯片

- d. 不用吸弃 0.1X SSC，用镊子将芯片从 0.1X SSC 溶液中取出，置于无尘纸上，吸干芯片背面液体；
- e. 将芯片转移至芯片反应容器的新反应孔内，向芯片加入 cDNA Release Mix（加液量参考表格 3-10，未使用的 cDNA Release Mix 可放室温备用，以便后续回收液补充），用封板膜对芯片反应容器进行封口，压紧反应孔边缘（凸起），防止反应液挥发，放置 55℃恒温培养箱反应 **20 min**，每间隔 **5 min** 吹打 20 下；
- 1) 在 55℃恒温培养箱反应 **5 min** 后，计时器暂停（吹打芯片时不用记时）；

2) 从 55℃恒温培养箱取出芯片反应容器，置于桌面上，

3) 小心撕开封板膜，用移液器在芯片表面吸打 20 下（在组织的中心和四角分别吹打 4 次）（1 cm * 2 cm 芯片推荐用 200 μL 枪头吹吸，其他尺寸芯片使用 200 μL 或 1000 μL 枪头吹吸，此步操作注意确认，吹打完后枪头上无残留液体）；



注意撕开封板膜不要让液体溅出，用枪头吹打时不要带走液体造成损失。

- 4) 再用封板膜对反应孔进行密封后放置 55℃ 恒温培养箱反应 **5 min**；
- 5) 重复步骤 1) -4) 三次，直至完成反应 **20 min**；

- f. **20 min** 反应结束后，将芯片反应容器置于桌面上，小心撕开封板膜，用移液器在芯片表面吸打之后，芯片表面的组织会脱落，请勿用枪头触碰芯片表面。若吸打之后仍有组织残留，可不用处理继续后续步骤；
- g. 用移液器从反应孔的一角吸出芯片表面的 cDNA Release Mix，转移至 1.5 mL 离心管中，可稍稍倾斜反应容器吸液，尽量将反应孔内的液体回收；
- h. 用移液器量取吸出的液体体积，若洗脱实际回收体积低于目标回收体积（可参考表格 3-12），根据实际回收体积，按照表格 3-12 中 **cDNA Release Mix 加液量 - 实际回收体积**，计算出需要补充的芯片润洗体积 X，然后向芯片加入 X (μL) 的 cDNA Release Mix 到芯片中进行润洗，润洗后再次回收，参考表格 3-12，确保实际回收体积不少于目标回收体积；
- i. 根据最终量取的回收体积，按照**回收体积：Neutralization Solution = 180：23**的比例，向回收液中加入 Neutralization Solution，涡旋混匀（回收体积和 Neutralization Solution 加液量可参考表格 3-12）；

表格 3-12 分管 PCR 管数预计

芯片尺寸	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
cDNA Release Mix 目标回收体积	370	570	670
Neutralization Solution	47.3	72.8	85.6
预计 PCR 管数	6 管	10 管	12 管

- j. 把上一步混匀的溶液按每管约 66 μL 的体积分装到 PCR 管中，预计分管 PCR 管数参考表格 3-12；

若最后一管体积不足 66 μL 但大于 20 μL，待 95℃反应 5 min 后可直接用 Nuclease-Free Water 补足，若不足 20 μL 则可平均分到每个管中。

- k. 放入 PCR 仪中，按如下程序反应：

温度	时间	循环数
105℃热盖	on	-
95℃	5 min	1
12℃	∞	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在芯片反应容器中，使用封板膜密封后放置在 4℃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 3-13 配制 PCR Mix，吹打混匀后瞬时离心，冰上暂存；

表格 3-13 PCR Mix

组分	1X (μL)	6X + 10% (μL)	10X + 10% (μL)	12X + 10% (μL)
4× cDNA PCR Mix	25.5	168.3	280.5	336.6
cDNA Primer	4	26.4	44	52.8
Nuclease-Free Water	4.5	29.7	49.5	59.4
Total	34	224.4	374	448.8

- b. 在 95°C 反应 **5 min** 后，在 3.9-k 步骤的 PCR 管的 66 μL cDNA 中分别加入 34 μL PCR mix，涡旋混匀；
- c. 瞬时离心，按照表格 3-14 PCR 程序进行扩增；

表格 3-14 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 3-15 配制 Qubit dsDNA Mix；

表格 3-15 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. 将同一个 cDNA 的 PCR 产物合并至对应的离心管中 ($1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 芯片大约 $600\text{ }\mu\text{L}$, 合并至 1.5 mL 离心管中; $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 芯片大约 $1000\text{ }\mu\text{L}$, 合并至 5 mL 离心管中; $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 芯片大约 $1200\text{ }\mu\text{L}$, 合并至 5 mL 离心管中), 振荡混匀后取 $1\text{ }\mu\text{L}$ PCR 产物, 用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录。



QC DNA 浓度通常高于 $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

QC 先确认前面步骤准确无误的情况下, 若 PCR 产物浓度低于 $5\text{ ng}/\mu\text{L}$, 参考 [3.10.2 纯化](#) 进行 1X 磁珠纯化, 具体而言, $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 的 PCR 产物先混合成 1 管再进行纯化, 纯化后最终回溶 1 管; $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 或 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 的 PCR 产物先混合, 再均分为 2 管进行磁珠纯化, 纯化后最终回溶 2 管。回溶时, 每管加入 $72\text{ }\mu\text{L}$ TE Buffer 进行回溶, 然后回收 $70.5\text{ }\mu\text{L}$, 再加入 $25.5\text{ }\mu\text{L}$ $4\times$ cDNA PCR Mix 和 $4\text{ }\mu\text{L}$ cDNA Primer, 充分混匀离心后再进行 8 个循环的 PCR 扩增 (参考 [表格 3-14 PCR 扩增程序](#)), 扩增完成后, 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

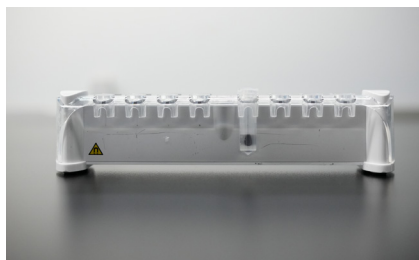
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠, 纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

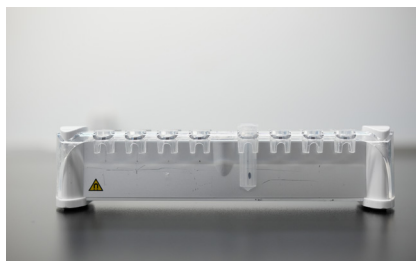
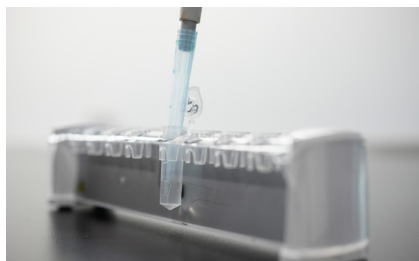
- 提前 **30 min** 从 4°C 取出, 涡旋混匀且平衡至室温, 有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前, 需振荡或用移液器上下吸打, 确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高, 纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

磁珠操作注意事项

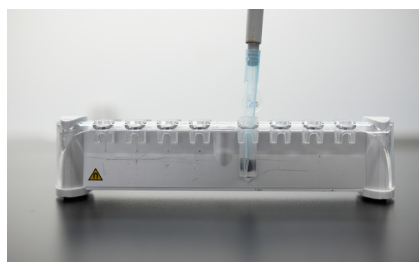
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 一般需要 **2-3 min**。但由于磁力架吸力不同等原因, 推荐分离时间有时可能需要延长, 以液体彻底澄清为准。



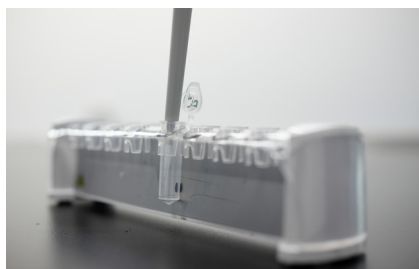
- 在分离磁珠与液体时, 注意吸头不可碰到磁珠, 最后可余留 2-3 μL 液体, 以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠, 可将磁珠与液体全部打回管内, 再次分离后再吸取上清。



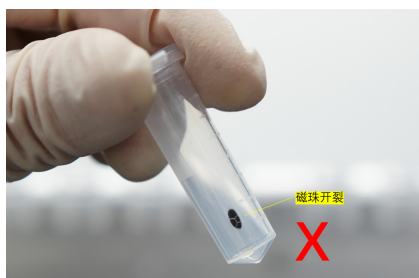
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上, 移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作, 请勿吸打、搅动磁珠。



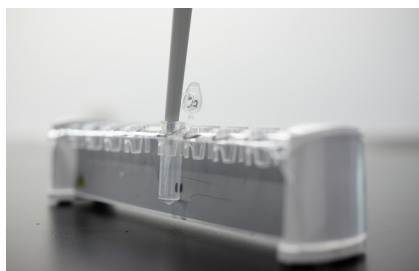
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。



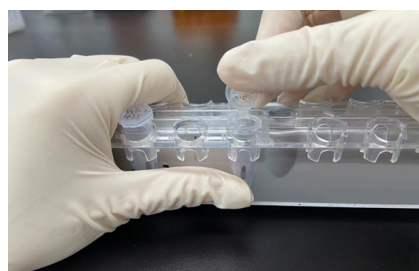
- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成乙醇残留，影响后续反应，过度干燥（磁珠开裂）会降低回收得率。通常情况下，室温干燥需要 **5-10 min**，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察。直至磁珠表面无反光，即可用 TE Buffer 或 Nuclease-Free Water 进行产物洗脱。



- 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 $\sim 2\text{ }\mu\text{L}$ 。



- 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：（磁力架 1.5 mL 或 2 mL）

- 1) 将同一个 cDNA 的 PCR 产物与室温平衡好的磁珠按照 1:0.8 混合，振荡混匀（其中 2 cm * 2 cm 或 2 cm * 3 cm 混合均匀后分装 2 管于 1.5 mL 离心管中），再室温孵育 **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，用移液器小心去除上清；
- 3) 将离心管保持在磁力架上，加入 1-2 mL 80% 乙醇漂洗（新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇、80% 乙醇应淹没到磁珠吸附最高点，若 1 mL 不够可适量增加）。旋转磁力架上的离心管，待磁珠全部吸附到靠磁力架一侧的管壁，再次旋转离心管，让磁珠重新吸附到另一侧来漂洗磁珠。静置 **30 s**。**小心吸取并丢弃上清。移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠；**
- 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) 每管加 100 μ L 的 TE Buffer 回溶，振荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清（~98 μ L）转移到新的 1.5 mL 离心管中（2 cm * 2 cm 芯片或 2 cm*3 cm 芯片的上清合并大约 196 μ L）。

 **停止点：**

- cDNA 纯化产物可在 **-20°C** 下保存 **1 个月**。

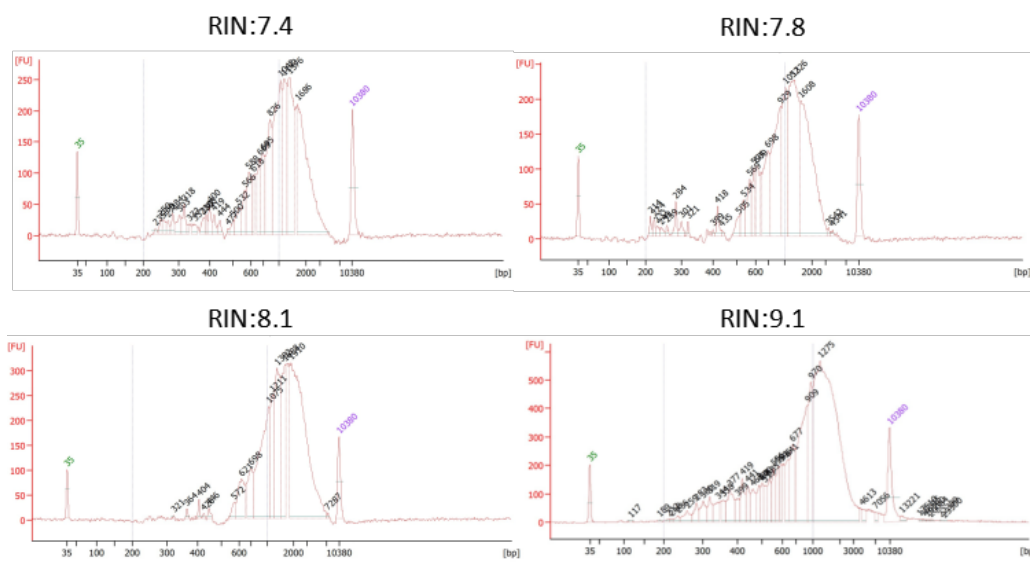


- 纯化后，可用 40 μ L Nuclease-Free Water 在 **4°C** 保存磁珠，直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

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

c. 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 片段主要分布在 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\(含兼容 mIF\) 建库实验操作说明书》](#)。



! 注意：《时空转录组 FF V1.3 大尺寸芯片 ($\leq 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 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 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。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

- 根据【实验前准备】，提前配制 0.01N HCl；染色期间参考 [3.7 组织透化](#) 表格 3-7 提前做好 1X 透化试剂工作液；
- 参考下表提前做好染色试剂；



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

- 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。

- 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；
- 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；
- 重复步骤 e. 两次，共计清洗三次；
- 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。

- 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；
- 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；
- 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；
- 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；

- l. 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。
- 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



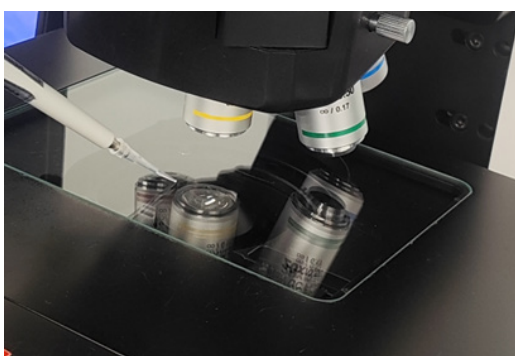
a. 在显微镜控制软件中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；



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：C05479C3D3。

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，小心地将放有芯片的载玻片转移到显微镜载物台上，将载玻片置于水滴上以起到固定作用。如下图；

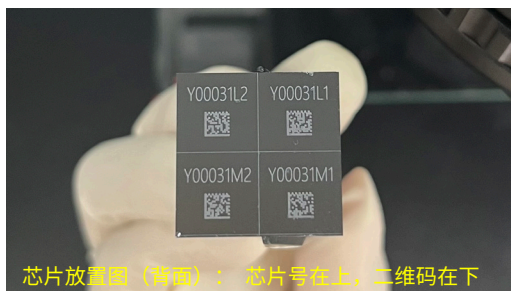


c. 载玻片轻放在载物台上，芯片尽量与载物台平行；



要求芯片边缘水平角度小于 15° 。

d. 芯片放置时，确保芯片的方向正确，使得背面的芯片号（SN）位于上方，而二维码位于下方，如下图所示：



芯片放置图（背面）：芯片号在上，二维码在下

e. 打开荧光显微镜，选择落射明场（彩色相机）模式；

f. 确定组织位置：选择 4 倍物镜，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；

g. 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 4 倍物镜下扫描地图，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。

h. 调整显微镜倍数：将物镜调整至 10 倍，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；

- i. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；
- j. 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；
- k. 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”；
- l. 再次定焦：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；
- m. 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；
- n. 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；
- o. 打开“StereomMap->Tools->imageQC”模块，拖入 H&E 染色图，并参考软件内置的《StereomMap 用户手册》来进行图像质控；

◎ 更为详细的注意事项请参考《[Stereom-seq 空间多组学技术成像指南](#)》。



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 StereomMap 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。

- p. 提前将一个金属浴或其他同等功能仪器温度设置到 37°C，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. 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；
- r. 将芯片放置于新的反应孔内，向芯片加入 0.1X SSC 溶液（用量如下表所示），吸打芯片 5 次（沿芯片长边从左到右，清洗 3 次，芯片短边吸打 2 次）；

各尺寸大芯片 H&E Mounting Medium 封片清洗溶液加液

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



确保液体全部浸没于溶液中。

- s. 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 r. 中的清洗溶液加液表格）；
- t. 吸弃 0.1X SSC 溶液后，在芯片上缓缓滴加 0.01N HCl 溶液，各尺寸加液量如下表所示，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 [3.7. 组织透化](#)，继续实验操作。