

时空蛋白转录组 Stereo-CITE V 1.1 透化测试操作说明书



货号：201SP11118（8 RXNs）

试剂盒版本号：V1.1

文档编号：STOG03007

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 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。

- 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: ~ 6.5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	3
1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍	7
1.5. 注意事项	8
第二章 样本准备	10
第三章 时空蛋白转录组 Stereo-CITE V1.1 透化测试标准操作流程	
3.1. 实验前准备	12
3.2. 切片准备	14
3.3. 芯片处理与组织贴片	15
3.4. 组织固定	17
3.5. 封闭和模拟抗体孵育	18
3.6. 甘油封片	19
3.7. 组织清洗	21
3.8. 透化前组织固定	22
3.9. 透化时间测试	23
3.10. 反转录反应	25
3.11. 组织去除	26
3.12. 荧光拍照	28
3.13. 组织透化判断	29
附录	
附录 A Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书	30

-  **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 V1.1（载体版）**。

STOmics Stereo-seq 透化试剂套装 V1.1（载体版）是用于摸索新鲜冷冻（Fresh Frozen, FF）样本最佳透化时间的预实验试剂套装。FF 样本要求参考 [《时空实验 FF 样本准备操作指南》](#)。本试剂套装采用的 Stereo-seq 时空转录组技术，是一种基于 DNBSEQ 高通量测序技术开发的、具有高分辨大视场的原位全转录组信息捕获技术。Stereo-seq 芯片 P（透化测试芯片）上载有核苷酸捕获探针，与组织切片结合后通过探针原位抓取组织内的 mRNA 分子，再利用带有荧光标记的核苷酸进行 cDNA 合成。研究人员通过荧光显微成像可以快速判断特定组织的最佳透化时间。本说明书提供兼容 Stereo-CITE 蛋白转录组试剂套装 V1.1 的透化时间摸索的详细方法。

本试剂套装中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了产品性能的稳定性和重复性。

1.2. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成：

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



辅助性试剂与耗材：

- （需单独订购）Stereo-seq PCR 适配器 *1（2 EA）



关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 至表格 1-4。

 收到 Stereo-seq 芯片载体后，请参照《Stereo-seq 芯片载体保存操作指南》对产品进行正确地保存。

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

收到产品后

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

表格 1-1

Stereo-seq 透化试剂盒 货号：201KP11118			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
RI	1000028499	● 橙色	300 μ L × 1
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg × 1
RT QC Buffer Mix	1000047918	● 棕色	792 μ L × 1
Glycerol	1000047910	● 紫色	100 μ L × 1
H&E Mounting Medium*	1000041969	● 紫色	50 μ L × 1
RT QC Enzyme Mix	1000047919	○ 透明	88 μ L × 1
TR Enzyme	1000028504	● 绿色	71 μ L × 1
TR Buffer	1000028505	● 绿色	1725 μ L × 2
 储存温度：-25°C ~ -15°C  运输温度：-25°C ~ -15°C  有效期：见标签			



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

表格 1-2

Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm) 货号：200CP118		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm)	-	8 EA
 储存温度：2°C ~ 8°C  运输温度：-25°C ~ -15°C  有效期：见标签		

表格 1-3

STOmics Accessory Kit 货号：1000033700		
组分信息	货号	规格
夹具	10000033699	1 EA
垫圈	10000033698	4 EA
封板膜	1000042970	6 EA
 储存温度：18℃ ~25℃  运输温度：0℃ ~30℃  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℃ ~25℃  运输温度：0℃ ~30℃  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见下方表格，也可参考 [《时空蛋白转录组 Stereo-CITE V1.1 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、天平等。关于显微镜的要求，请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)。

表格 1-5

仪器		
品牌	仪器	货号
STOmics ¹	荧光显微镜	Go Optical
Leica ¹	荧光显微镜	DM6M
Leica	冰冻切片机	CM1950
Thermo Fisher Scientific ²	PCR 仪 *	4483636
Bio-Rad ²	PCR 仪 *	1861096
其林贝尔 ³	小型离心机	LX-200B
莫纳 ³	小型离心机	IG0331
其林贝尔	漩涡混匀仪	QL-901
Eppendorf	低温离心机	5418R
Eppendorf ⁴	移液器	5 种量程为一套
Rainin ⁴	移液器	5 种量程为一套
VOLAB	通风橱	1500*850*2350
上海一恒 ⁵	恒温培养箱 #	DHP-9082
VWR ⁵	恒温培养箱 #	VWRI390-0999
其林贝尔 ⁶	玻片离心机 #	LX-700
Labnet ⁶	玻片离心机 #	C1303-T
金华科迪 ⁷	烤片机 #	KD-HI
Leica ⁷	烤片机 #	HI 1220
Eppendorf	金属浴	5382000074



从含有相同序号上标的品牌中任选其一，含有 * 上标的仪器除推荐品牌货号，不建议更换其他品牌货号。

含有 # 上标的仪器可根据实验室实际情况选择使用。

试剂		
品牌	试剂	货号
Ambion ¹	Nuclease free water	AM9937
Invitrogen ¹	Nuclease free water	2186768
BOSTER	4% 多聚甲醛（组织固定液含 DEPC）	AR1069
Sigma Aldrich ²	盐酸 *	SAFS2104-50ML
国药 / 东江 ²	盐酸 *	7647-01-0
Qiagen ³	RNeasy mini Kit	74104
天根 ³	RNeasy mini Kit	DP451
Agilent	安捷伦高灵敏度 RNA 分析试剂盒 *	5067-1513
Ambion ⁴	20X SSC	AM9770
BBI ⁴	20X SSC	B548109-0200
SAKURA ⁵	OCT（冷冻切片包埋剂） *	4583
达优 ⁵	OCT（冷冻切片包埋剂） *	4081511
Invitrogen	剪切鲑鱼精子 DNA	AM9680
Thermo	马血清	26050070
Sigma Aldrich	Triton X-100 Solution	93443-100ML
Gibco™ PBS, pH 7.4 ⁶	1xPBS	10010031
生工 ⁶	1xPBS	E607008-0500
Sigma Aldrich ⁷	二甲基亚砷	D4540
Greagent ⁷	二甲基亚砷	G75927B
Sigma Aldrich ⁸	甲醇	34860-1L-R
西陇化工 ⁸	甲醇	12801001-500ML



从含有相同序号上标的品牌中任选其一，含有 * 上标的试剂除推荐品牌货号，不建议更换其他品牌货号。

耗材

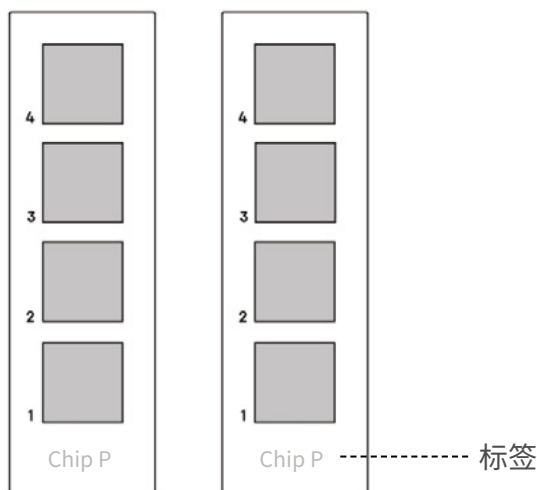
品牌	耗材	货号
-	锡箔纸	38 cm*65 m*20 μm 宽度: 38 cm
得力	镊子	DL396003
Corning	Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	353003
Corning	15 mL 离心管	430791
Corning	50 mL 离心管	430829
-	立式载玻片染色架	-
Kimtech	无尘纸	34155
MATIN ¹	Power Dust Remover (空气罐)	M-6318
BEXIN ¹	空气罐 (压缩空气除尘罐、高压空气罐)	CT2062940465 89370625
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
Axygen	2 mL 离心管	MCT-200-C
Axygen	10 μL 盒装带滤芯灭菌短吸头	TXLF-10-L-R-S
Axygen	100 μL 盒装带滤芯灭菌吸头	TF-100-R-S
Axygen	200 μL 盒装带滤芯灭菌吸头	TF-200-L-R-S
Axygen	1000 μL 盒装带滤芯灭菌吸头	TF-1000-L-R-S
新华安得	一次性无菌注射器	根据待过滤的剂量进行选择
津腾 ²	针筒式过滤器	JTSF0303
Millipore ²	Millex 针式过滤器	SLGV033N
CITOGlas 世泰	24 mm*32 mm 盖玻片	10212432C
CITOGlas 世泰	载玻片	80360-0004
飞鹰牌	刀片	137011
FEATHER	日本羽毛切片刀	C35
蒙马特	毛刷	MCG0122/ MCG0123/ MCG0124 /MCG0125 / MCG0126 /MCG0127
Beyotime	玻片盒	FBX003

从含有相同序号上标的品牌中任选其一。



1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍

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



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

Stereo-seq 芯片载体保存方法

Stereo-seq 芯片载体装于真空密封的铝袋中，冷链运输。收到产品后须立即将未开封的 Stereo-seq 芯片 P 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。



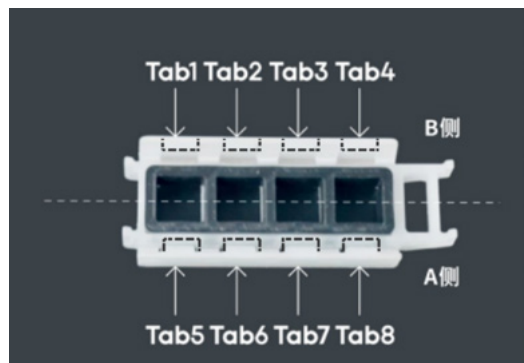
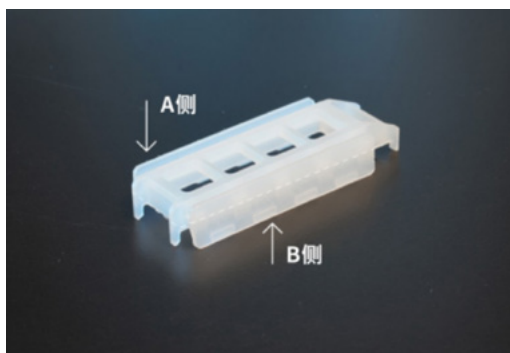
需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。



Stereo-seq 芯片载体夹具

有关 Stereo-seq 芯片载体夹具组装和拆卸的详细说明，请参考 [《附录 A Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》](#)

有关 Stereo-seq 芯片载体夹具组装和拆卸的演示视频，请参阅以下链接或扫描二维码：<https://www.stomics.tech/col113/607>



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



关于样本包埋请参照 [《时空实验 FF 样本准备操作指南》](#) 文档进行样本准备。

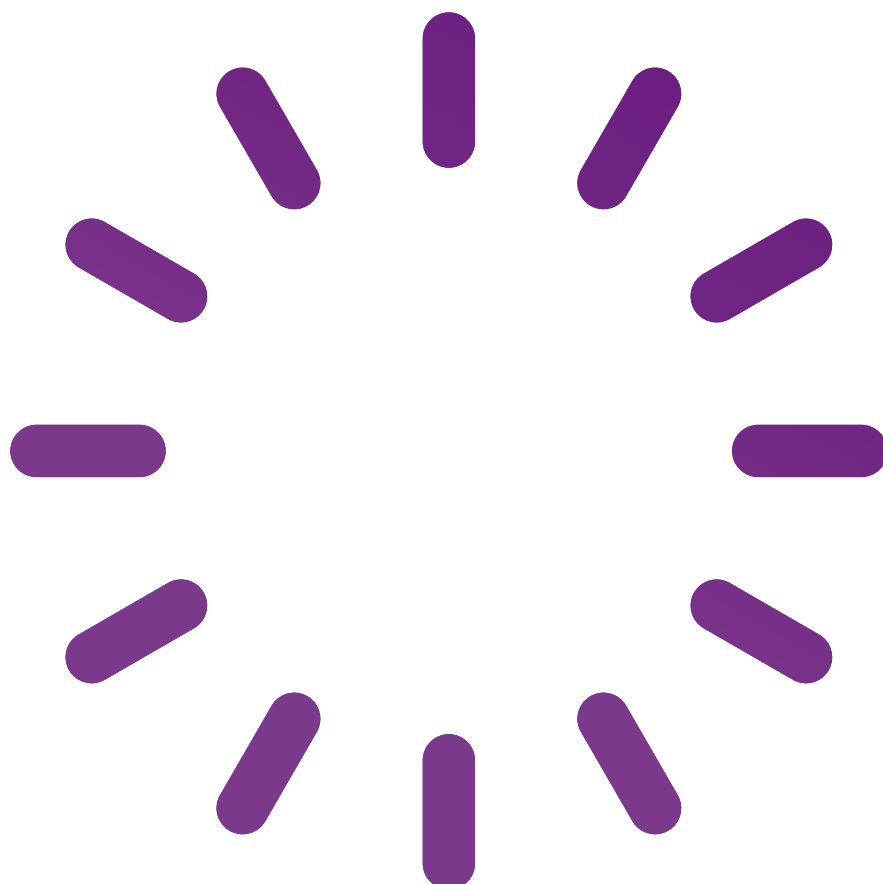


建议对 $RIN \geq 4$ 的样本进行后续实验。

第三章

时空蛋白转录组

Stereo-CITE V1.1 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**。

表格 3-1 实验前准备

准备试剂	准备流程	暂存条件
4% PFA	提前从 - 20℃取出于 4℃解冻融化后混匀，分装为 2 mL/ 管，- 20℃长期保存。一张芯片至少用量 400 μL，需取出平衡至室温	4℃ 1 周
0.1X SSC	取 20X SSC 300μL 稀释到 60mL	室温
5X SSC	取 20X SSC 1 mL 稀释到 4 mL	室温
甲醇	提前- 20℃中预冷	- 20℃
Wash Buffer	取 10 μL RI 加入 190 μL 0.1X SSC 中 (一张芯片至少用量 200 μL)	冰上备用 12 hr
滤后分装血清	提前取出马血清，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 (一轮的透化 + 蛋白转录组)， 分装后不可反复冻融超过 3 次 ，实验之前，- 20℃取出分装血清融化，4℃，14000g 离心 10 min * 滤后血清长期保存条件：- 20℃	冰上备用 6 hr
剪切鲑鱼精子 DNA	- 20℃取出冰上融化，一张芯片用量 15 μL，冰上备用	冰上备用 6 hr
RI	- 20℃取出冰上备用	冰上备用 12 hr
10% Triton X-100	若无 10%Triton X-100，可将 100% Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温
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 2.0 (确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内；至少 2 mL/ 样本)	室温 2 d
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)，- 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。		
0.5X 透化试剂工作液	用 0.01N HCl 将 7.5 μL 10X 透化试剂储存液稀释到 150 μL (至少 150 μL/ 芯片)	冰上备用 6 hr

准备仪器	准备流程	备注
冷冻切片机	箱体预冷至- 20℃，样本头预冷至- 15℃ ~ - 10℃	温度根据实际操作过程调整
PCR 仪	热盖 60℃： 37℃ Hold，用于烤片和透化 45℃ Hold，用于反转录 55℃ Hold，用于组织移除	检查 PCR 仪是否有异常，必要时更换
金属浴 (或其他同等功能仪器)	37℃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℃	离心血清
荧光显微镜	TRITC 通道	检查仪器是否有异常，必要时更换

3.2. 切片准备

a. 提前将 PCR 仪温度设置到 37℃，放置 PCR 适配器平衡温度；

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

b. 冷冻切片机箱体预冷至- 20℃，样本头预冷至- 15℃ ~ - 10℃（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℃冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 30 min；
- e. 组织平衡等待期间，提前复温 4%PFA 溶液：取出适量的 4% PFA 溶液（400 μL/ 芯片），提前放置在通风处复温；
- f. 组织平衡等待期间，参考表格 3-2 提前制备封闭液，涡旋混匀并瞬时离心，置于冰上备用；

表格 3-2 封闭液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	90	99	396
10% Triton X-100	1.5	1.65	6.6
剪切鲑鱼精子 DNA	15	16.5	66
RI	7.5	8.25	33
滤后分装血清	15	16.5	66
Nuclease-Free Water	21	23.1	92.4
Total	150	165	660

- g. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- h. 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；
- i. 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。

3.3. 芯片处理与组织贴片



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

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

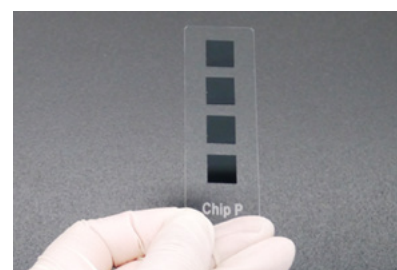
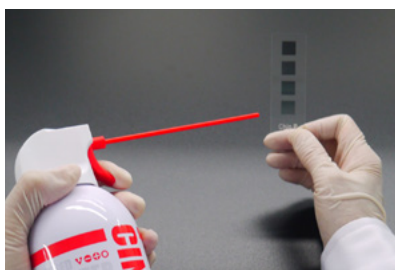


- 打开后，请检查玻片盒中的所有的 Stereo-seq 芯片载体是否正确定位在插槽中，载体上的芯片是否正面朝上。芯片的正面为亮光面，正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。

- 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 μ L Nuclease-Free Water 清洗 2 次（或在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中清洗 2 次）；



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



- d. 当芯片表面无杂质、无明显痕迹、无任何液体残留、无波纹状纹理，即可准备贴片；
- e. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- f. 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 μ 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 仪热盖。



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

B. 冷贴

1) 将载体芯片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；



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

2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平，注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，无褶皱；

3) 立即拿起芯片载体，用指腹放在载体背面加温几秒钟，直至切片贴合；

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

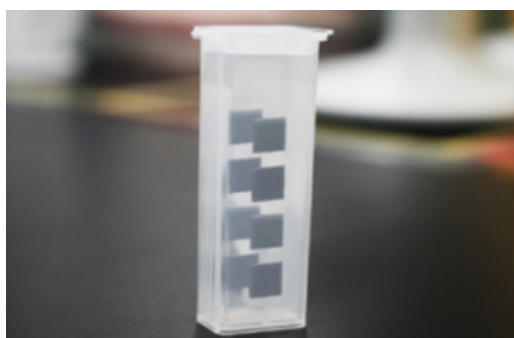
5) 快速将载体置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。



进行冷贴时需控制好每张切片贴片时间，间隔时间太大，组织贴片会皱缩。



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

3.4. 组织固定

- a. 使用空气罐吹去载具上杂质，参考《附录 A Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》组装方法将垫圈与夹具组合成载具；
- b. 将上一步孵育完成的芯片载体固定于载具上，组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；

⋯ 避免载具接触芯片正面。

- c. 将载具置于通风橱内操作，加入复温的 4% PFA 溶液，用量为 400 μ L/ 芯片，取一张封板膜（不要撕开，包含白底）放置于载具上覆盖反应孔，室温固定 **5 min**；
- d. 固定完成后，拿开封板膜并置于实验台备用；
- e. 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 4% PFA 溶液，注意保持芯片组织湿润；



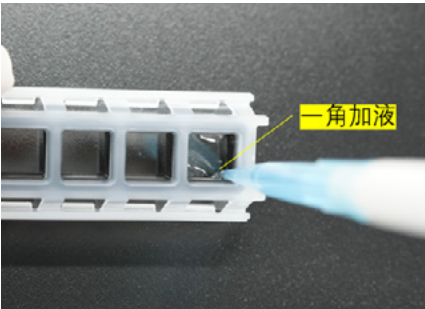
- f. 立即加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μ L/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- g. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 0.1X SSC，保持芯片组织湿润；

⋯ 换液过程中避免组织干燥，避免移液器和枪头碰触到组织和芯片。

- h. 重复步骤 f. 一次。
- i. 孵育期间，将载具转移至通风橱外实验桌操作，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 0.1X SSC，保持芯片组织湿润；

3.5. 封闭与抗体孵育

- a. 封闭和模拟一抗孵育：将已配制好的封闭液从芯片一角加入到孔位里，用量为 150 μ 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 **65 min**；

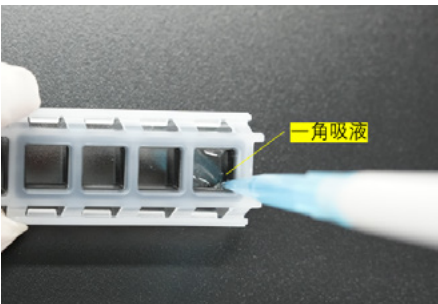


- b. 一抗孵育等待期间，按照表格 3-3 配制模拟二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用；

表格 3-3 模拟二抗孵育液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
5X SSC	90	99	396
RI	7.5	8.25	33
Nuclease-Free Water	52.5	57.75	231
Total	150	165	660

- c. 孵育结束后，拿开含白底的封板膜并放置于实验台备用；
- d. 用移液器在芯片一角吸弃封闭液，保持芯片组织湿润；



- e. 往芯片加入 0.1X SSC 溶液，用量为 200 μ L/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- f. 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 0.1X SSC 溶液，保持芯片组织湿润；
- g. 重复步骤 e.-f. 一次；
- h. 往芯片加入模拟二抗孵育液，用量为 150 μ 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 **15 min**；

3.6. 甘油封片

- 孵育结束后，用移液器在芯片一角吸弃二抗孵育液，保持芯片组织湿润；
- 往芯片加入 0.1X SSC 溶液，用量为 200 μ L/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- 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 0.1X SSC 溶液，保持芯片组织湿润；
- 重复清洗步骤 **b.** 和 **c.** 一次；
- 参考《附录 A 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，将拆卸下来的垫圈和夹具放置在实验台上备用；

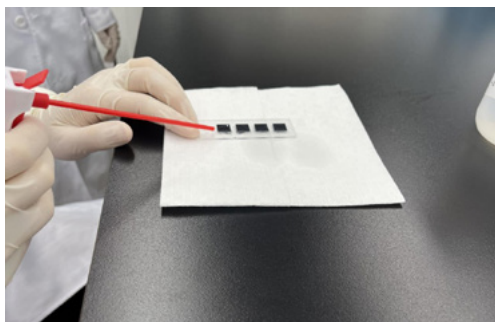


拆卸时用手托住载体背面，避免载具接触芯片正面。



注意：若同时操作次多张载体时，需标注好哪个载具对应哪一张载体。

- 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；



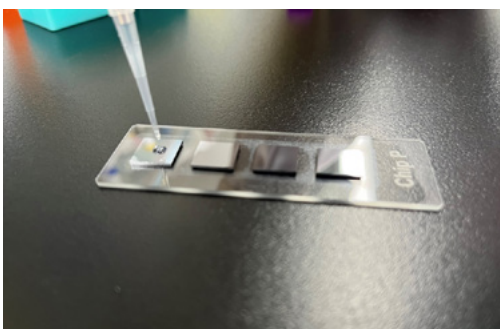
(可选操作) 使用载玻片离心机 (微型玻片离心机 LX-700) 离心 10 s 甩干芯片上液体。



提前将 Glycerol 置于室温平衡 5 min。

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。

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



-
- h. 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 **1 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。**

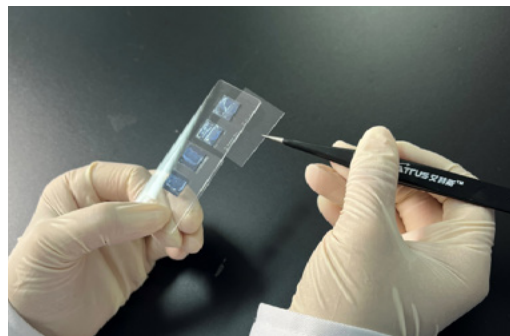
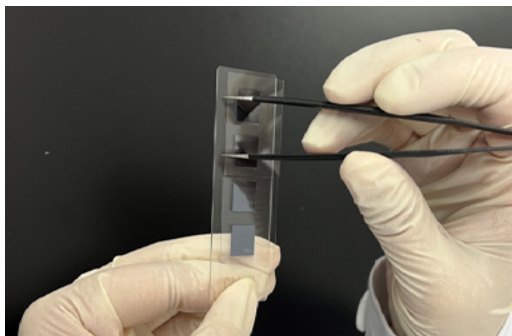
- i. 甘油静置期间，根据表格 3-4 制备 70% DMSO 溶液。轻轻漩涡充分混匀，使用之前将溶液平衡至室温。每次实验前新鲜制备，配制后 **30 min** 内使用。

表格 3-4 70% DMSO 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
1X PBS	120	132	528
DMSO	280	308	1232
Total	400	440	1760

3.7. 组织清洗

- a. 用镊子将盖玻片轻轻推至载体边缘，夹住盖玻片一角，轻轻地平行移动盖玻片，直到芯片与盖玻片完全分离；



- b. 无尘纸擦去芯片四周的液体，确保无液体残留；
- c. 无需换垫圈，按照《附录 A 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。

- d. 往芯片加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μ L/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- e. 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 0.1X SSC 溶液，保持芯片组织湿润；
- f. 重复清洗**步骤 d.** 一次；
- g. 将载具置于通风橱内操作，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 0.1X SSC 溶液，保持芯片组织湿润；
- h. 往芯片加入 70% DMSO，用量为 400 μ 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 **5 min**；
- i. 孵育期间，提前预冷甲醇：在玻片盒中加入足量甲醇，确保甲醇足够浸没所有芯片（可将一张普通载玻片放入容器中，查看甲醇的体积是否足够）。扣紧盖子，提前放入切片机中（-20°C）预冷 **5-30 min**；

3.8. 透化前组织固定

- a. 孵育结束后，丢掉封板膜并吸弃 70% DMSO；
- b. 参考《附录 A Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》将载体从手持载具上拆卸下来，将拆卸下来的垫圈丢掉，但将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。

- c. 将载体置于装有适量 0.1X SSC 的玻片盒中浸泡 5 s，确保 0.1XSSC 能覆盖组织即可；
- d. 清洗结束后，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 20 min；
- e. 组织固定期间，将 3.1 实验前准备中配制的 2 mL 0.01N HCl 和 0.5X 透化试剂工作液备用。

表格 3-5 0.5X 透化试剂工作液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
0.01N HCl	142.5	156.75	627
10X 透化试剂储存液	7.5	8.25	33
Total	150	165	660

- f. 透化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（最长不超过 30 min）；
- g. 固定结束后，将载体从玻片盒中取出，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；
- h. 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；



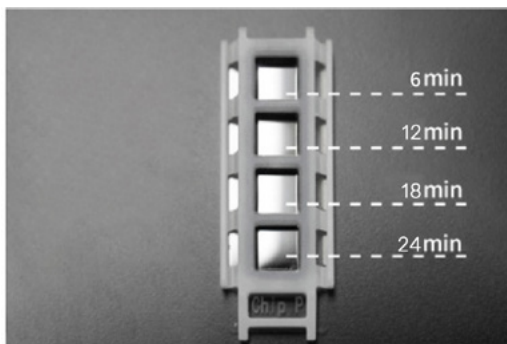
- i. 甲醇挥发完全后，肉眼可见组织变白，更换新垫圈，按照《附录 A Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；

避免载具接触芯片正面。

- j. 直至甲醇挥发完全后，肉眼可见组织变白即进行下一步的组织透化操作。

3.9. 透化时间测试

- RT QC Buffer Mix 在冰上提前解冻；
- 组织透化时间范围是 **0-30 min**，初次实验建议设置 **6 min**、**12 min**、**18 min**、**24 min** 等 4 个组进行测试；



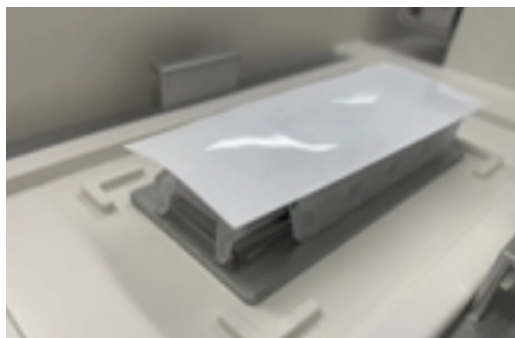
图一 . 透化时间测试（分钟）

1) 先将手持载具转移到 PCR 适配器上，再在透化时间为 **24 min** 的芯片添加 150 μL 0.5X 透化试剂工作液。在芯片的每个角加入一滴透化试剂（移液器挨近芯片加液，注意不要划伤组织），然后将其余透化试剂加到芯片中央，使所有液体融合；



确保透化试剂覆盖全芯片。

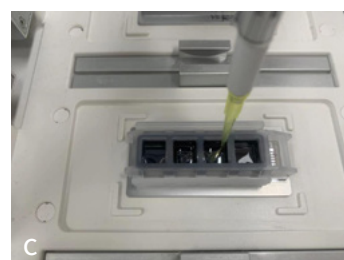
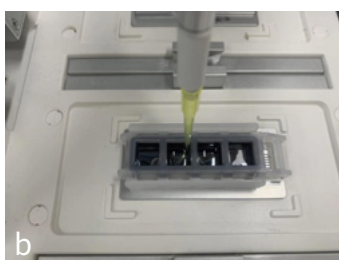
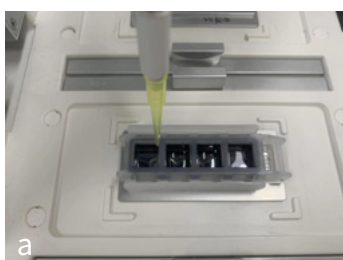
2) 取一张新的封板膜（不要撕开，包含白底，其中白底朝上，透明膜朝载具）放置于载具上覆盖反应孔，盖上 PCR 仪盖，37°C 孵育；

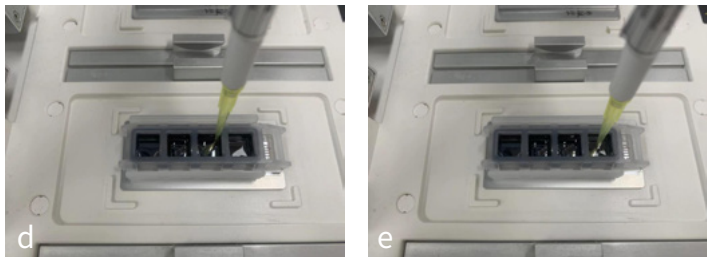


3) **6 min** 后，打开 PCR 仪盖，拿开含白底的封板膜，在透化时间为 **18 min** 的芯片添加 150 μL 0.5X 透化试剂工作液；

4) 将封板膜（含白底）重新放置于载具上，盖上 PCR 仪盖，37°C 孵育；

5) 重复以上**步骤 1) -4)** 至透化时间最短的芯片开始孵育，加液过程请确保每个孔操作均是先在芯片四角各加入一滴透化试剂，然后将其余透化试剂加到芯片中央，使所有液体融合，见图 a-e。





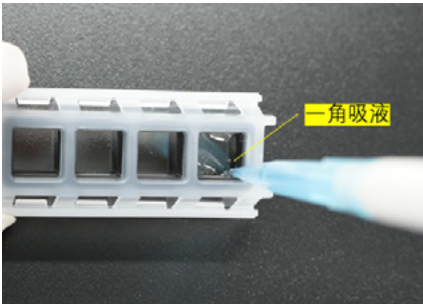
c. 透化期间，可先参考表格 3-6 配制 RT QC Mix，用锡箔纸包裹避光，冰上放置待用；

表格 3-6 RT QC Mix 配制

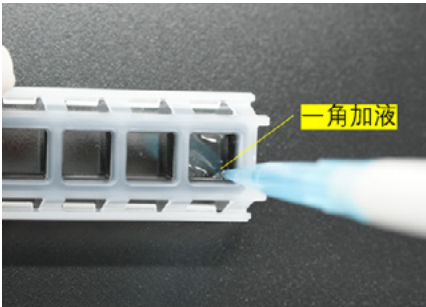
组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
RT QC Buffer Mix	90	99	396
RT QC Enzyme Mix	10	11	44
Total	100	110	440

d. 透化结束后，拿开含白底的封板膜，将手持载具从 PCR 仪（37℃）中取出，PCR 仪程序跳过 37℃，进入 45℃ ∞；

e. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器从芯片的一角吸掉透化试剂，避免接触芯片正面；



f. 立即加入 Wash Buffer，用量为 200 μ L/ 芯片；



g. 微微倾斜手持载具，用移液器从芯片一角吸掉芯片表面 Wash Buffer 溶液，保持芯片表面湿润。



- 透化后清洗操作建议一个孔位一个孔位进行操作。避免芯片完全干燥。
- 结束之后应立即加入 RT QC Mix，以避免 RNA 降解。

3.10. 反转录反应

- a. 取出配制好的 RT QC Mix 吹打混匀后瞬时离心，立即在芯片一角缓慢加入 RT QC Mix，用量为 100 μ L/ 芯片，确保 RT QC Mix 均匀覆盖全部芯片；
- b. 撕掉封板膜上的白底，用透明的封板膜将手持载具封闭紧密；
- c. 将载具放置于 PCR 仪（45℃）的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖子，反应 **1 hr** 或以上，最长不超过 **5 hr**。

3.11. 组织去除



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

⋯ 如果观察到 TR Buffer 中有白色沉淀析出，可放于 55°C 溶解，再恢复至室温。

b. 按照表格 3-7 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 3-7 组织移除试剂 Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
TR Buffer	392	431.2	1724.8
TR Enzyme	8	8.8	35.2
Total	400	440	1760

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

d. 撕开透明的封板膜，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 QC Mix，避免触碰到芯片表面；

⋯ 撕开封板膜时不能按压夹具卡扣两侧上部，避免载体松落。

e. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μL/ 芯片；

f. 在芯片一角将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右；

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

h. 重复步骤 e.-g. 一次；

i. 往芯片加入组织移除试剂 Mix，用量为 400 μL/ 芯片，使用透明的封板膜密封载具；

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

k. 组织移除结束后将手持载具从 PCR 仪（55°C）取出，移除封板膜；

l. 微微倾斜手持载具，用移液器从反应孔的一角吸弃组织移除试剂 Mix；

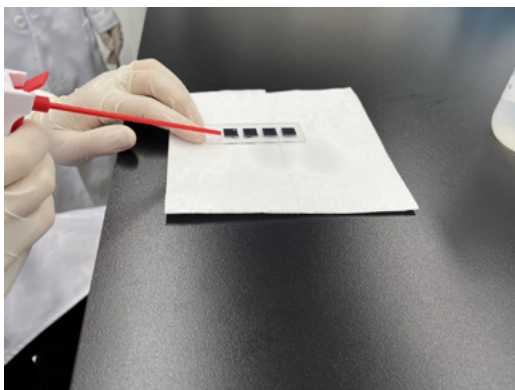
⋯ 若发现组织移除不完全，有残留组织存在，可延长移除时间，以保证完全移除（不超过 16 hr）。

m. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μL/ 芯片；

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

o. 重复步骤 m.-n. 一次；

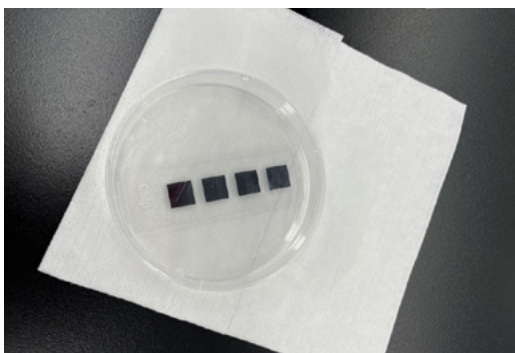
- p. 加入 Nuclease-Free Water, 用量为 400 μL / 芯片;
- q. 上下吸打冲洗芯片表面以洗掉表面盐分;
- r. 参考 [《附录 A Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》](#) 拆卸手持载具;
- s. 将芯片载体放在无尘纸上, 用空气罐将芯片表面完全吹干;



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

📋 可选操作: 操作步骤 m.-s. 可替换为将载体从手持载具上拆下, 置于 50 mL 离心管 (50 mL 0.1X SSC 试剂) 中上下冲洗 10 次, 然后将载体置于 50 mL 离心管 (50 mL Nuclease - Free Water) 内上下冲洗 10 次, 用空气罐将芯片表面完全吹干 (该步骤可重复, 直至芯片表面无明显痕迹残留)。

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



3.12. 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：B00249A1

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

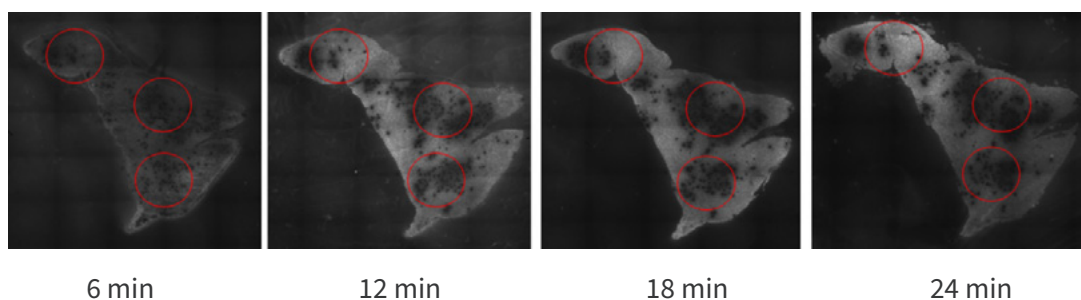


- ⋯ 同一组织不同透化时间的芯片要在相同成像条件下扫描，包括亮度和曝光等条件。
- d. 先用 4 倍镜找到目标区域，然后切换到 10 倍镜，扫描整张芯片。

3.13. 组织透化判断

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

如图二所示，小鼠胸腺组织 **6 min** 透化时间下的信号最弱，说明透化不充分；**12 min** 透化时间下，细节清晰，信号均匀，亮度最大；在 **18 min** 和 **24 min** 透化时间下，组织呈现信号不均匀及亮度较弱；因此，较合适的透化时间有 **12 min**。



图二 . 小鼠胸腺透化实验摸索

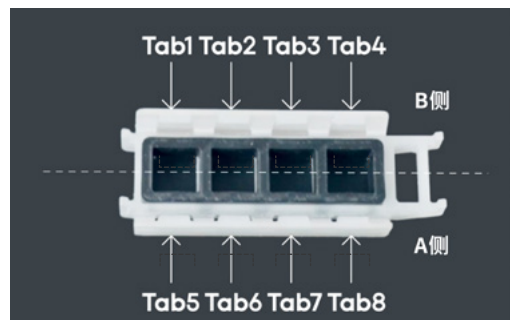
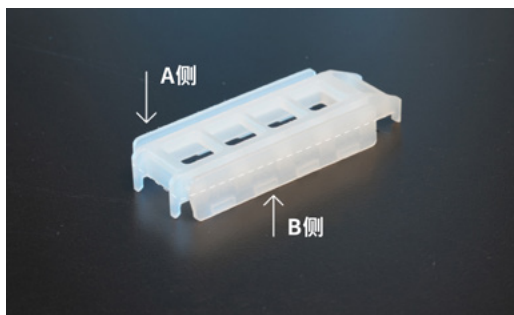


根据第一次试验的结果，可能需要第二次试验测定透化时间。如果所有测试时间点信号较暗但出现明显梯度变化，建议进行第二次摸索适当增加透化酶浓度（比如：1X 透化试剂工作液）。如果多个时间点显示相似的荧光信号，并且有比较严重的信号扩散，我们建议选择更短的时间进行第二次试验。

附录 A 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>

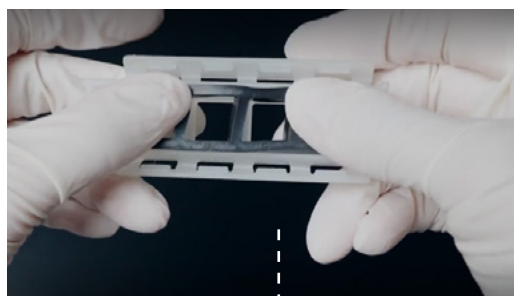
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



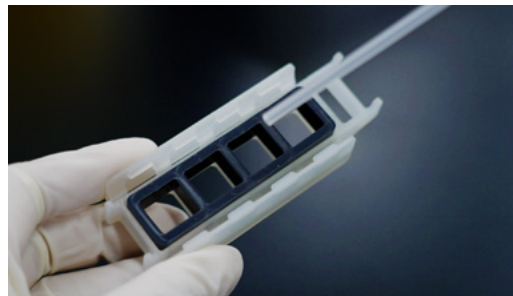
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



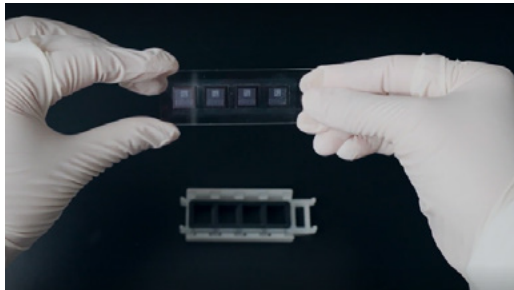
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



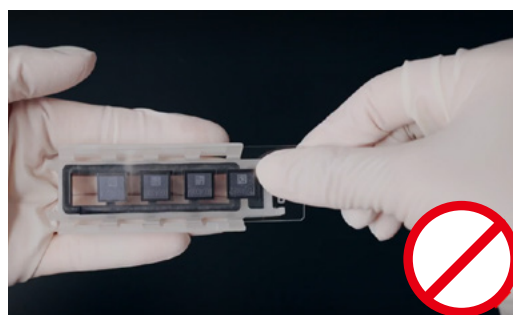
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；



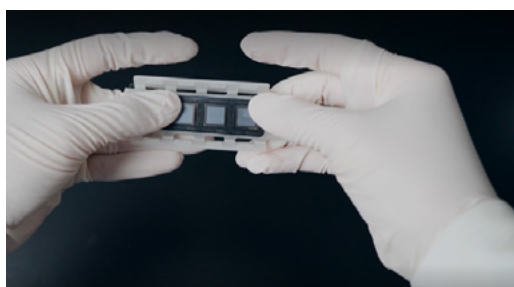
e. 拿起 Stereo-seq 芯片载体，芯片面朝下，将芯片载体标签朝夹具的长边卡扣方向；



f. 芯片对准垫圈孔位，避免夹具和垫圈接触芯片表面；



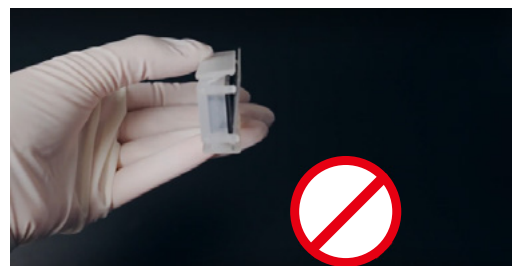
g. 先将芯片载体卡进夹具下方 4 个卡扣。双手中指支撑夹具的正面，左手拇指放在 tab 1 和 tab 2 之间，右手拇指放在 tab 3 和 tab 4 之间，拇指匀力向下按压芯片载体，直至听到“咔”的一声。双手食指用力向下按压夹具顶部边缘，将载体卡进夹具上方 4 个卡扣；



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。

