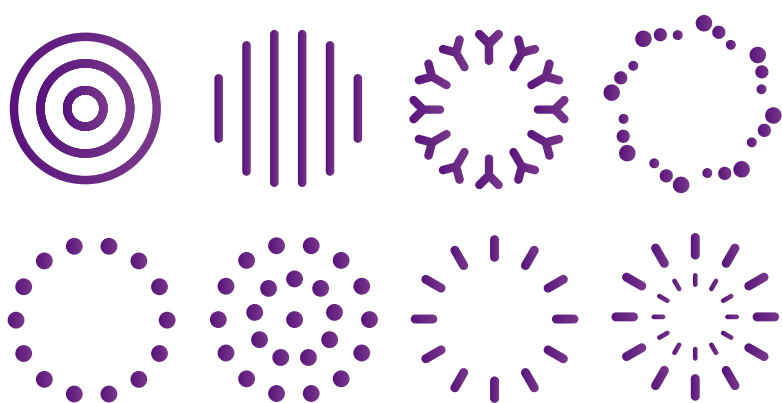


STOmics[®] 时空转录组与多重免疫 荧光 (mIF) 共检测技术 操作指南



透化试剂盒版本号: V1.0

转录组试剂盒版本号: V1.2.1

说明书版本号: C.

版本历史

透化试剂盒版本： V1.0
转录组试剂盒版本： V 1.2.1
说明书版本号： A0
修订日期： 2023 年 5 月
描述： 首次发布

透化试剂盒版本： V1.0
转录组试剂盒版本： V 1.2.1
说明书版本号： B
修订日期： 2023 年 7 月
描述：

【物料准备】

- 病理级显微镜载玻片修改为粘附载玻片

【抗体滴定】

- 血清分装后不可反复冻融超过 3 次

【Stereo-seq 透化试剂套装标准操作流程（兼容 mIF）】

- 血清分装后不可反复冻融超过 3 次
- 封闭液用量由 55 μL / 芯片修改为 60 μL / 芯片
- 透化工作液孵育时间由 3 min 变更为 10 min
- 组织移除不完全可延长移除时间，不超过 16 hr
- 荧光拍照步骤增加操作，在载物台上滴加 1-2 μL 水，再将芯片载体转移到载物台

【Stereo-seq 转录组试剂套装】

- 试剂盒组分装量增加，详见表格 7-1

【Stereo-seq 转录组试剂套装标准操作流程（兼容 mIF）】

- 血清分装后不可反复冻融超过 3 次
- 50 倍稀释 DAPI 存储由 5 天改为 1 天
- Wash Buffer 的保存条件修改为冰上备用
- 封闭液、一抗孵育液和二抗孵育液的用量统一改为 60 μL
- 删除“甘油封片后，荧光拍照流程需控制在 4 hr 内完成”，需尽快完成拍照
- 透化工作液孵育时间由 3 min 变更为 10 min
- 反转录反应中 RT Mix 体积变更为 200 μL
- cDNA 纯化步骤更新
- 格式勘误

透化试剂盒版本： V1.0
转录组试剂盒版本： V 1.2.1
说明书版本号： C
修订日期： 2023 年 11 月
描述：

- 试剂盒和芯片运输变更为冷链运输，更改封板膜规格
- 透化前孵育步骤修改为载具 (夹具 + 垫圈，不包含载玻片)，37°C 孵育 10 min

- DAPI 荧光染色 Wash Buffer 清洗次数改为两次
- PR Rinse Buffer 溶液 (含 5%RI) 体积统一改为 200 μL
- 磁珠纯化体积修改
- 删除文库构建、文库结构和测序、以及附录 B 章节
- 格式勘误

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

©法律声明。

2023 深圳华大生命科学研究院保留所有权利。

- 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。深圳华大生命科学研究院和 / 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。
- 深圳华大生命科学研究院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。深圳华大生命科学研究院不做任何保证，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: ~ 4 天

目录



第一章 物料准备	1
第二章 样本准备	
2.1. 样本要求	6
2.2. 样本包埋	7
2.3. 样本的保存和运输	10
第三章 抗体滴定 (新鲜冷冻样本)	
3.1. 实验前准备	12
3.2. 切片准备	12
3.3. 组织贴片	13
3.4. 组织固定	14
3.5. 封闭与一抗孵育	15
3.6. 二抗孵育	16
3.7. 荧光拍照	17
3.8. 抗体滴定最佳浓度判断	17
第四章 mIF 预实验 (新鲜冷冻样本)	
4.1. 封闭前处理	19
4.2. 封闭与一抗孵育	19
4.3. 二抗孵育	21
4.4. DAPI 染色	21
4.5. 荧光拍照	22
4.6. mIF 预实验结果	22
第五章 Stereo-seq 透化试剂套装 (载体版)	
5.1. 产品描述	24
5.2. 产品组成	24
5.3. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍	26
5.4. 注意事项	27
第六章 Stereo-seq 透化试剂套装标准操作流程 (兼容 mIF)	
6.1. 实验前准备	29
6.2. 切片准备	30
6.3. 芯片处理与组织贴片	30
6.4. 组织固定	31

6.5. 封闭和模拟抗体孵育	32
6.6. 透化时间测试	33
6.7. 反转录反应	35
6.8. 组织去除	35
6.9. 荧光拍照	37
6.10. 组织透化判断	37

第七章 Stereo-seq 转录组试剂套装 (载体版)

7.1. 产品描述	39
7.2. 测序指南	39
7.3. 产品组成	39
7.4. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍	42
7.5. 注意事项	42

第八章 Stereo-seq 转录组试剂套装标准操作流程 (兼容 mIF)

8.1. 实验前准备	44
8.2. 切片准备	45
8.3. 芯片处理与组织贴片	45
8.4. 组织固定	47
8.5. 封闭与一抗孵育	48
8.6. 二抗孵育	49
8.7. DAPI 染色	49
8.8. 荧光拍照	50
8.9. 组织透化	52
8.10. 反转录反应	53
8.11. 组织去除	54
8.12. cDNA 释放与回收	55
8.13. cDNA 纯化与扩增	56
8.13.1 cDNA 纯化	57
8.13.2 cDNA 扩增	57

附录

附录 A: Stereo-seq 芯片载体及配件使用技巧	60
------------------------------	----

 **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

物料准备



此章节列出了 STOmics® 时空转录组与多重免疫荧光 (mIF) 共检测技术实验流程所需的设备和物料。下表不包括拟采用的一抗, 标准实验室设备, 如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱等。

关于显微镜的要求, 请参考《STOmics® 显微镜评估参考手册》。

仪器		
品牌	描述	产品编号
-	冰冻切片机	-
Eppendorf	低温离心机	5418R
-	小型离心机	-
-	移液器	-
Bio-Rad*	T100™ PCR 仪	1861096
ABI*	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636
NEB	NEBNext® Magnetic Separation Rack	S1515S
-	荧光显微镜 (拼接功能)	-
Thermo Fisher Scientific	DynaMag-2 磁力架	12321D
	Qubit™ 3.0 荧光定量仪	Q33216 (或同等功能仪器)
-	漩涡混匀仪	-
-	金属浴	-
Agilent	Agilent 2100 bioanalyzer	G2939AA (或同等功能仪器)



可从所列品牌中任选一个 (带 * 标记) 配合 PCR 适配器使用。

试剂		
品牌	描述	产品编号
-	无水乙醇 (分析纯)	-
	Nuclease-Free Water	AM9937
Ambion	1X TE buffer, pH 8.0	AM9858
	20X SSC	AM9770
*Agencourt	AMPure® XP	A63882
*Beckman Coulter	SPRIselect	B23317/B23318/ B23319
*Vazyme	VAHTS DNA Clean Beads	N411-02
	盐酸	2104-50ML
Sigma Aldrich	甲醇	34860-1L-R
	Triton X-100 Solution, 10%	93443-100ML
Thermo Fisher Scientific	Gibco™ 马血清	26050070
	Gibco™ 山羊血清	16210064
	Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)	422301
Biolegend	TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody	156604
<p>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。若为人源组织, 选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No.422301); 小鼠组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)。但若小鼠组织的一抗源性是大鼠则建议不加 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody。</p>		
Invitrogen	Alexa Fluor Plus 系列荧光二抗	-
SAKURA	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583
Invitrogen	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854
	安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒	5067-4626
Agilent	安捷伦高灵敏度 RNA 分析试剂盒	5067-1513
Thermo Fisher Scientific	DAPI 溶液	62248
*Thermo Fisher Scientific	Rnase inhibitor (RI)	EO0382
*常州新一产生命科技有限公司	Rnase inhibitor (RI)	LS-EZ-E-00006P



从所列品牌 (带 * 号) 中任选其一。



耗材		
品牌	描述	产品编号
-	金属包埋盒	-
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	粘附载玻片	-
-	显微镜盖玻片 (尺寸: 18 mm × 18 mm, 厚度: 0.13 - 0.16 mm) ¹	-
晶安生物	24 孔板圆形细胞爬片 ¹	J24001
Beyotime	玻片盒	FBX003
Corning	Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	353003
	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	5 mL 离心管	-
	50 mL 离心管	430829
	15 mL 离心管	430791
Kimtech	Kimwipes™ 无尘纸	34155
MATIN	Power dust remover (空气罐)	M-6318
Axygen	0.2 mL PCR 管 ²	PCR-02-C
	96 孔板 ²	PCR-96M2-HS-C
	1000 µL 带滤芯枪头	TF-1000-L-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
	0.5 mL 透明薄壁管 ³	PCR-05-C
Invitrogen	Qubit Assay Tubes ³	Q32856
PARAFILM	封口膜	PM996
-	一次性无菌注射器	-
津腾	针筒式过滤器 ⁴	JTSF0303
Millipore	Millex 针式过滤器 ⁴	SLGV033N
Sangon Biotech	免疫组化湿盒	E678019
BIOSHARP	Super Pap Pen 超级免疫组化油笔	BC004
	金属块	BC032



从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

第二章

样本准备

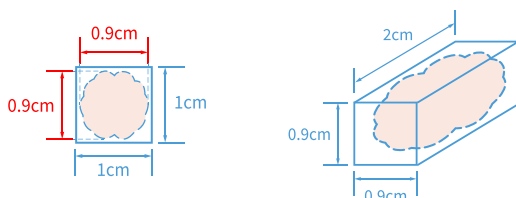


2.1. 样本要求



实验室条件下严格保证新鲜样本在离体 **30 min** 内进行直接包埋处理，以最大程度避免组织内部 RNA 降解。

组织尺寸不应超过 0.9 cm × 0.9 cm × 2 cm，组织切片 / 芯片面积不应超过 80%。



样本类型

适用于常见动物物种的时空转录组研究，包括但不限于人、猴、鼠等样本，详情可参考《Stereo-seq 试剂套装推荐样本》及《时空测试目录》。

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

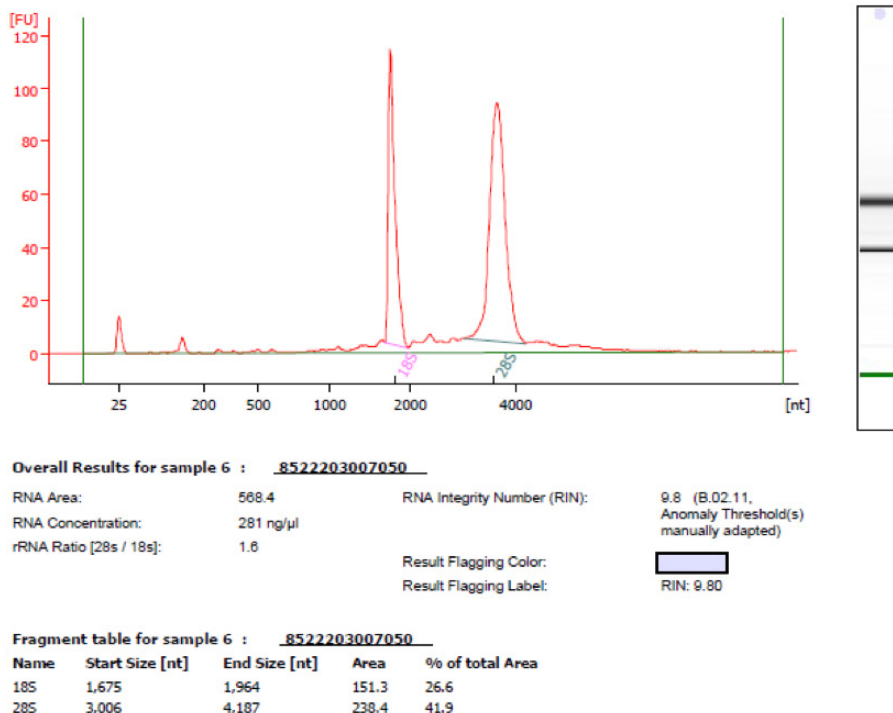
样本包埋组织 RNA 完整值 RIN

为保证样本质量，降低实验风险，建议切取 10-20 片 10 μm 厚的组织片，存放至 -20°C 下预冷的 1.5 mL EP 管中，然后进行 Total RNA 的提取和质量检测。

参考图一. 小鼠大脑组织切片 RNA RIN 值峰图。



强烈建议只对 RIN ≥ 7 的组织样本进行后续实验操作。



图一. 小鼠大脑组织切片 RNA RIN 值峰图

2.2. 样本包埋



样本处理视频参考网址：

https://www.bilibili.com/video/BV1pG411j7Qi/?spm_id_from=333.999.list.card_archive.click&vd_source=bd22715407a1c1cff7e8401f5d973218
<https://www.stomics.tech/col113/701>

a. 样本包埋所需耗材或试剂列表：

* 以下为一个样本包埋所需耗材或试剂，如需包埋多个样本，需适量增加。



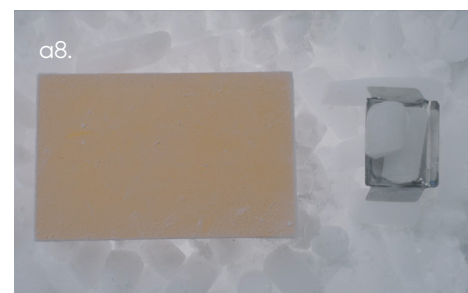
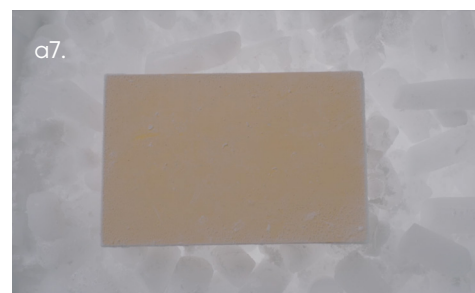
准备材料

品牌	描述	数量
-	碎冰	1
-	干冰	1
-	铝箔纸	1
-	自封袋	1
BIOSHARP/Metal Coolbox/BC032	金属块	1
-	无菌无纺布	2
Corning/353001	Corning® 35 mm TC-treated Culture Dish	1
Sakura/Base Molds/4583	O.C.T	1
Sakura/Base Molds/4162	金属包埋盒 A	1
Sakura/Base Molds/7055	金属包埋盒 B	1
-	钝头镊子	1
-	注射器	1
-	药匙或抹刀	1
-	剪刀	1

- a1. 提前准备一泡沫箱碎冰并将 OCT 放在冰上预冷 **10 min**;
- a2. 根据组织大小提前准备两个合适大小的**金属包埋盒 A** 和 **B** (**B** 的尺寸需略大于 **A**) ;
- a3. 提前将预冷好的 OCT 填充**金属包埋盒 A** 的 2/3 左右, 并放置在冰上预冷 **10 min** 以上 (可使用注射器吸弃产生的气泡) ;
- a4. 在平皿中加满 OCT, 提前预冷 **10 min** (可使用注射器吸弃产生的气泡) ;



- a5. 准备一泡沫箱干冰;
- a6. 准备具有平整面的金属块, 金属块面积需大于**金属包埋盒 A**, 用于平放金属包埋盒;
- a7. 将金属块平整面向上放置到干冰中, 预冷 **5 min** 以上;
- a8. 将**金属包埋盒 B** 放置于干冰中预冷 **5 min** 以上。



- b. 新鲜组织离体 **30 min** 内, 用无菌无纺布或无尘纸擦干组织表面液体, 以避免在组织表面形成冰块, 影响后续包埋切片;



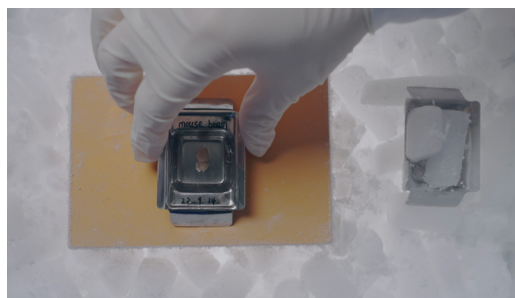
- c. 将组织放入在冰上预冷的 OCT 中，在不产生气泡的前提下用药匙使组织被 OCT 包裹（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



- d. 将组织的拟切面朝下，放入冰上预冷的**金属包埋盒 A** 中，使组织接触到**金属包埋盒 A** 的底部。在不产生气泡的前提下用预冷的 OCT 填满**金属包埋盒 A**，直至将组织完全覆盖（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



- e. 将装有组织的**金属包埋盒 A**，水平放置在干冰预冷的金属块上；



- f. 预冷的**金属包埋盒 B**（作为盖子）开口向上，轻轻加盖于装有组织块的**金属包埋盒 A** 上方，并在其开口中放置碎干冰，使干冰尽可能充分覆盖金属包埋盒表面，形成较为封闭的速冻空间；



g. 冷冻 5 min 后, 移去**金属包埋盒 B**, 检查 OCT 是否完全凝固且变成白色不透明状, 若未完全冷冻好, 则重复 f;



h. 如果组织块完全凝固并变成白色不透明状, 用手轻掰**金属包埋盒 A** 两侧, 即可使 OCT 包埋组织块从**金属包埋盒 A** 中脱模;



i. 检查包埋块底部是否被完全覆盖, 如未完全覆盖, 则将组织块放置在金属块上, 底部向上, 在表面涂上少量 OCT, 待 OCT 完全凝固且不透明, 在包埋块切面位置做好标记。

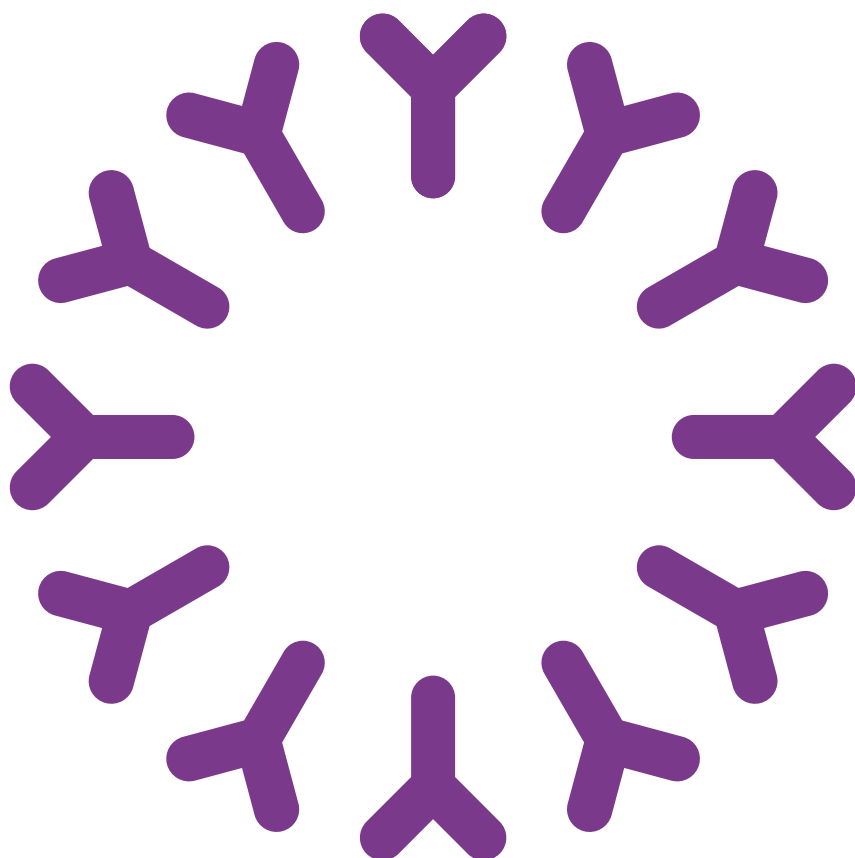


2.3. 样本的保存和运输

将组织包埋块使用锡纸包裹, 并做好标记放入自封袋, 在自封袋上做好记录, 放入 -80°C 冰箱长期保存。如需邮寄, 可选干冰邮寄。

第三章

抗体滴定 (新鲜冷冻样本)



常规多重免疫荧光 (mIF) 是混合识别不同靶标的不同种属来源的一抗进行靶标的识别, 然后通过不同荧光标记二抗来检测相应的一抗的位置, 实现多个靶标的空间定位。抗体是 mIF 实验的关键成分, 其性能会直接影响数据质量。

抗体的选择遵循常规 mIF 的选择原则, 需要考虑所使用抗体的宿主来源、特异性及种属反应性等因素。我们建议首先在感兴趣的组织切片上进行抗体滴定后, 判断出特定组织切片中特定抗体的最佳稀释浓度并进行 mIF 预实验。

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 / 耗材	准备流程	保存条件
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 稀释到 20 mL	室温
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μ L 稀释到 20 mL	室温
滤后血清	提前取出血清, 融化后, 将适量马血清与山羊血清 1: 1 混合, 用 0.22 μ m 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 μ L/ 管, - 20°C 储存, 分装后不可反复冻融超过 3 次	- 20°C
显微镜载玻片	每个抗体准备 6 张玻片	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
PCR 仪	提前将 PCR 仪温度设置到 37°C	-
荧光显微镜	DAPI/FITC/ TRITC/CY5 通道	可根据二抗的不同, 选择不同的荧光通道
离心机	提前将离心机温度调节到 4°C	-

3.2. 切片准备

- 提前将 PCR 仪温度设置到 37°C, 热盖温度为 42°C, 放置 PCR 适配器平衡温度;
- 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 $0.9\text{ cm} \times 0.9\text{ cm}$ ），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- 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. 组织贴片

预冷甲醇：在玻片盒或 50 mL 离心管中加入 2/3 体积以上的甲醇。扣紧盖子，提前放入切片机中 (-20°C) 预冷 **5-30 min**；

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 $10\text{ }\mu\text{m}$ ，建议一张玻片只贴一片组织。



单张玻片贴片数量可根据实际情况调整。

A. 热贴

- 1) 进行冷冻切片，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；
- 2) 拿起玻片一角，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（贴片时间控制在 **1 min** 以内）；
- 4) 再次翻转玻片使其正面朝上，快速将玻片置于提前平衡好温度的 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。

B. 冷贴

- 1) 将玻片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；



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

- 2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在玻片正中央并铺平，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) 立即拿起玻片，用指腹加温玻片背面，直至切片贴合在玻片上；
- 4) 快速将玻片置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。

切片数量：滴定测试中需要的组织切片数量与拟测试抗体的稀释梯度设置相关。建议在抗体使用说明书推荐的稀释比例前后各设置 2 个浓度进行测试。例如，一抗 NeuN 抗体 (abcam, Cat. No. ab104224)，如果说明书推荐 1: 1000 的稀释比例，则建议设置实验组 (1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000) 及阴性对照（不加入一抗孵育液，其他操作步骤与实验组一样）；**共 6 张玻片进行滴定测试。**

3.4. 组织固定

a. 玻片孵育结束后, 立即放于- 20°C预冷的甲醇中, 确保甲醇浸没玻片上的组织切片, 固定 **30 min**。固定等待时间, 按照表格 3-1 准备下一步封闭和抗体孵育步骤需要的试剂;

表格 3-1 封闭和抗体孵育准备试剂 (抗体滴定)

准备试剂	准备流程	保存条件
10% Triton X-100	若无 10%Triton X-100, 可将 100%Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温
离心后血清	从- 20°C取出滤后血清, 融化后 4°C, 14000g 离心 10 min	冰上备用
一种抗体的滴定大致需要 200 μ L, 剩余血清可以重复利用		
FcR Blocking Reagent	根据组织种属选择。若为人源组织, 则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No.422301); 小鼠组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)	冰上备用
一抗	根据说明书提示从 4°C或- 20°C取出, 4°C, 14000g 离心 10 min	冰上备用
稀释后的一抗 (可选)	根据实验需求, 可用封闭液先进行一抗稀释	冰上备用
二抗	根据说明书提示从 4°C或- 20°C取出, 4°C, 14000g 离心 10 min	冰上备用
Glycerol	- 20°C取出恢复至室温	室温

b. 固定结束后, 将玻片盒或 50 mL 离心管转移至通风橱中;

c. 将玻片从玻片盒或 50 mL 离心管中取出, 用无尘纸吸干玻片背面和周围多余的甲醇;

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, 在玻片上使用免疫组化笔在组织周围画一个封闭的圈, 产生疏水隔离区, 防止后续加入的液体流出;

f. 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. 按照表格 3-2 配制封闭液，涡旋混匀（可置于冰上备用）。将封闭液滴加到组织切片表面（疏水隔离区内），用量不超过 100 μL / 切片，室温封闭 **15 min**；

- ⋯ 需结合疏水圈的大小适当调整封闭液用量，如圈大小为 0.5 cm \times 0.5 cm，则用量为 30 μL / 切片。
- ⋯ 后续的换液操作均在疏水隔离区内进行。

表格 3-2 封闭液（抗体滴定）

组分	1X (μL)	6X (μL)
5X SSC	198	1188
血清	33	198
10% Triton X-100	3.3	19.8
FcR Blocking Reagent	16.5	99
Nuclease-Free Water	79.2	475.2
Total	330	1980

- ⋯ 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。若为人源组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No.422301)；小鼠组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)，但若小鼠组织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 330 μL 。



- 1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭、一抗孵育液配制和二抗孵育液配制。

b. 封闭等待期间，按照表格 3-3 配制不同稀释比例的一抗孵育液。本示例测试中，针对 NeuN 抗体设置了 5 个实验组（稀释比例分别为 1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000）及阴性对照（不加入一抗孵育液）进行滴定测试。一抗孵育液配制完成后涡旋混匀，瞬时离心，置于冰上备用；

表格 3-3 一抗孵育液（抗体滴定）

组分	1X (μL)
一抗或稀释后的一抗	V1 a.
封闭液	V2—V1
Total	V2 b.

- 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。

- ⋯ a. 一抗加入量 V1 根据拟采用的抗体稀释比例决定。
- ⋯ b. 需结合疏水圈的大小适当调整一抗孵育液总体积 V2。

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进行孵育，用量应不超过 100 μL / 切片，然后在玻片上标记对应的抗体稀释比例；（**阴性对照**）加入等量的封闭液；室温孵育 **45 min**；



⋯ 换液过程中需避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

d. 一抗孵育结束前，按照表格 3-4 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，置于冰上备用（**避光**）。

表格 3-4 二抗孵育液（抗体滴定）

组分	1X (μL)	6X (μL)
二抗	0.2	1.2
封闭液	99.8	598.8
Total	100	600



⋯ 推荐使用 Thermo Fisher Scientific Alexa Fluor Plus 系列荧光二抗，选择 1: 500 的稀释比例进行配制。若使用其他品牌的荧光二抗，请结合历史经验确定浓度。

3.6. 二抗孵育

⋯ 清洗过程中需避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

⋯ 需结合疏水圈的大小适当调整二抗孵育液和 0.1X SSC 的用量。

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，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；

b. 再次加入 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；

c. 重复步骤 b.，总共清洗 3 次；

d. 从非组织区域缓慢滴加二抗孵育液，用量应不超过 100 μL / 切片，室温孵育 **25 min**（**避光**）；

e. 吸弃二抗孵育液，缓慢滴加 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；

f. 再次加入 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；

g. 重复步骤 f.，总共清洗 3 次；

h. 尽量减少表面液体，玻片表面自然风干或使用空气罐吹干玻片表面液体，确保玻片表面无液体残留。滴加 5 μL 甘油于组织切片中央，盖上盖玻片，准备拍照。

⋯ 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。

3.7. 荧光拍照

- a. 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 (≥ 12 bit)
 - DAPI filter cube (参考：Excitation 375/28 nm, Emission 460/50 nm)
 - FITC filter cube (参考：Excitation 480/30 nm, Emission 525/50 nm)
 - TRITC filter cube (参考：Excitation 545/25 nm, Emission 605/70 nm)
 - CY5 filter cube (参考：Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
 - 最大像元尺寸：5 μm /pixel
 - 曝光时间：1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)
- b. 将玻片转移到显微镜载物台上，取下遮光罩；
- c. 选择落射荧光扫描模式，根据所使用二抗的荧光激发光调节荧光通道，选择 10 倍镜，扫描玻片上贴有切片的区域，保存图片。

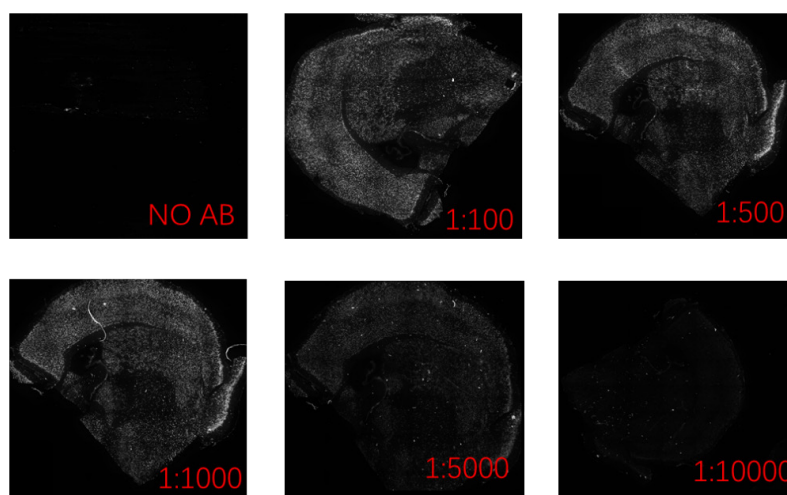


不同玻片要在相同成像条件下扫描，包括亮度和曝光等条件。

3.8. 抗体滴定最佳浓度判断

在相同成像条件下，以荧光信号最佳、背景信号最少为抗体最佳稀释浓度的判断标准。如果有两个类似的结果，则选择更低的浓度。

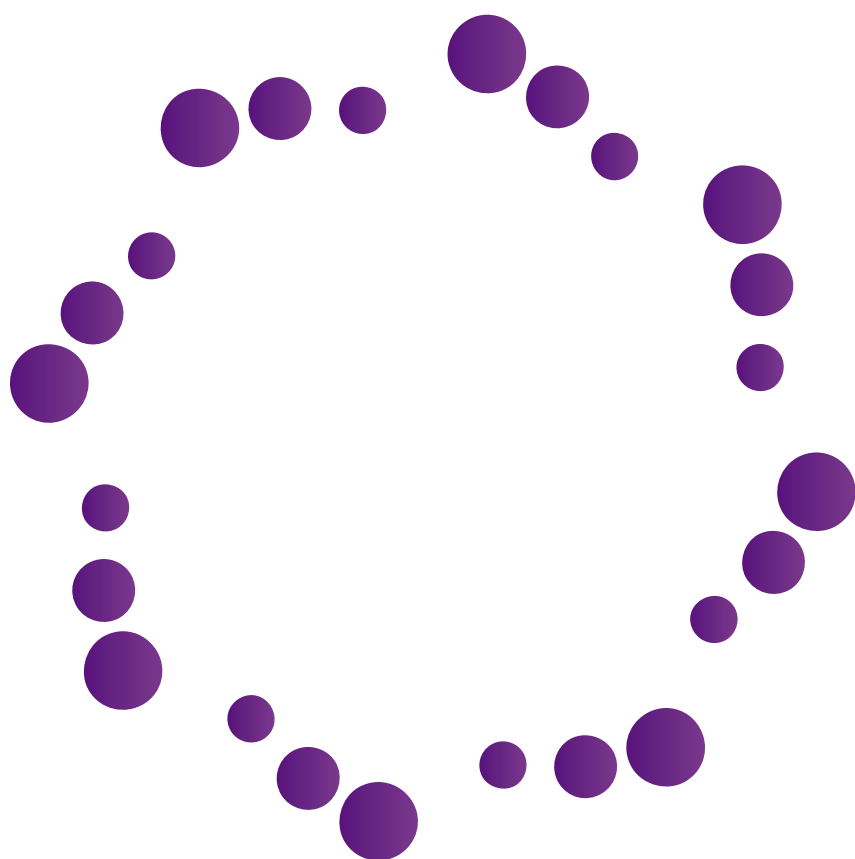
以 NeuN 抗体 (abcam, Cat. No. ab104224) 为例，如图二所示，应选择 1: 1000 作为最佳抗体稀释比例，并用于后续 mIF 预实验以及 Stereo-seq 转录组实验。



图二. 小鼠大脑 (半脑) - NeuN 抗体滴定结果

第四章

mIF 预实验（新鲜冷冻样本）



在确定每个抗体的最佳浓度后，建议按照此稀释比例在玻片上进行 mIF 预实验。mIF 预实验的目的是确保同一组织切片上所有抗体的共染色结果在每个相应的荧光通道下能够清晰成像。

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本手册第三章中的 3.1 至 3.4 步骤。

需提前用 5X SSC 将 DAPI 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 62248) 稀释 50 倍，可 4°C 避光保存 1 d。

4.2. 封闭与一抗孵育

a. 按照表格 4-1 配制封闭液，涡旋混匀（可置于冰上备用）。将封闭液滴加到组织切片表面（疏水隔离区内），用量不超过 100 μL / 切片，室温封闭 **15 min**；





需结合疏水圈的大小适当调整封闭液用量，如圈大小为 0.5 cm \times 0.5 cm，则用量为 30 μL / 玻片。



后续的换液操作均在疏水隔离区内进行。

表格 4-1 封闭液 (mIF 预实验)

组分	1X (μL)
5X SSC	198
血清	33
10% Triton X-100	3.3
FcR Blocking Reagent 	16.5
Nuclease-Free Water	79.2
Total	330 



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。若为人源组织，则选择 Human TruStain FcX™ (Biolegend, Cat. No.422301)；小鼠组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Biolegend, Cat. No.156604)，但若小鼠组织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 330 μL 。



1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭、一抗孵育液配制和二抗孵育液配制。

b. 封闭等待期间，按照表格 4-2 配制一抗孵育液（按照抗体滴定实验中摸索的最佳稀释比例），涡旋混匀后瞬时离心，置于冰上备用；

表格 4-2 一抗孵育液 (mIF 预实验)

组分	1X (μ L)
封闭液	$100-(V1+V2+\dots+Vn)$
抗体 1	V1
抗体 2	V2
.....
抗体 n	Vn
Total	100



 若要混合多个抗体，每个抗体需各自进行滴定实验；同时，抗体要求是不同源性的抗体。

c. 吸弃封闭液，从非组织区域缓慢加入一抗孵育液进行孵育，用量不超过 100 μ L/切片，室温孵育 **45 min**；



 换液过程中需避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

 需结合疏水圈的大小适当调整一抗孵育液用量。

d. 一抗孵育结束前，按照表格 4-3 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，置于冰上备用 (**避光**)。

表格 4-3 二抗孵育液 (mIF 预实验)

组分	1X (μ L)
封闭液	$100-(V1+V2+\dots+Vn)$
二抗 1	V1
二抗 2	V2
.....
二抗 n	Vn
Total	100



 推荐使用 Thermo Fisher Scientific Alexa Fluor Plus 系列荧光二抗，选择 1: 500 的稀释比例进行配制。若使用其他品牌的荧光二抗，请结合历史经验确定浓度。

4.3. 二抗孵育



⋯ 清洗过程中需避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

⋯ 需结合疏水圈的大小适当调整二抗孵育液和 0.1X SSC 的用量。

- a. 吸弃一抗孵育液，加入 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；
- b. 再次加入 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；
- c. 重复步骤 b.，总共清洗 3 次；
- d. 从非组织区域缓慢滴加二抗孵育液，用量不超过 100 μL / 切片，室温孵育 **25 min** (**避光**)。

4.4. DAPI 染色

- a. 二抗孵育结束前，可按照表格 4-4 配制 DAPI 工作液，涡旋混匀后瞬时离心，置于冰上备用 (**避光**)；

表格 4-4 DAPI 工作液

组分	1X (μL)
5X SSC	60
50 倍稀释 DAPI	1
Nuclease Free Water	39
Total	100

- b. 吸弃二抗孵育液，加入 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；
- c. 再次加入 0.1X SSC，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；
- d. 重复步骤 c.，总共清洗 3 次；

⋯ 需结合疏水圈的大小适当调整 0.1X SSC 的用量；清洗过程中需避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

- e. 从非组织区域缓慢滴加 DAPI 工作液，用量为 100 μL / 切片，室温孵育 **2 min** (**避光**)；
- f. 吸弃 DAPI 工作液，缓慢滴加 0.1X SSC 清洗两次，用量为 100 μL / 切片；
- g. 吸弃 0.1X SSC，尽量减少表面液体；
- h. 将玻片转移至无尘纸上，使玻片表面自然风干或使用空气罐吹干玻片表面液体，确保玻片表面无液体残留；
- i. 用移液器缓慢吸取 5 μL 甘油滴加到组织切片中央，盖上盖玻片，准备拍照。

⋯ 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。

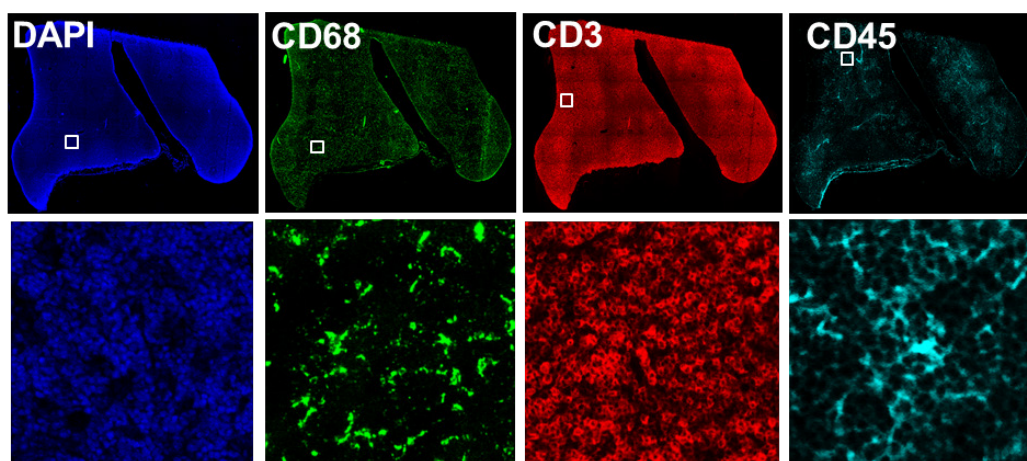


4.5. 荧光拍照

- a. 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 (≥ 12 bit)
 - DAPI filter cube (参考：Excitation 375/28 nm, Emission 460/50 nm)
 - FITC filter cube (参考：Excitation 480/30 nm, Emission 525/50 nm)
 - TRITC filter cube (参考：Excitation 545/25 nm, Emission 605/70 nm)
 - CY5 filter cube (参考：Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
 - 最大像元尺寸：5 μm /pixel
 - 曝光时间：1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)
- b. 将玻片转移到显微镜载物台上，取下遮光罩；
- c. 选择落射荧光扫描模式，根据所使用二抗的荧光激发光调节荧光通道，选择 10 倍镜，扫描玻片上贴有切片的区域，保存图片。

4.6. mIF 预实验结果

如图三所示，以小鼠胸腺组织染色为例，应保证每个通道得到的特异染色结果符合预期、信噪比保持在合理强度且避免不同通道之间的串色，否则会影响后续分析。

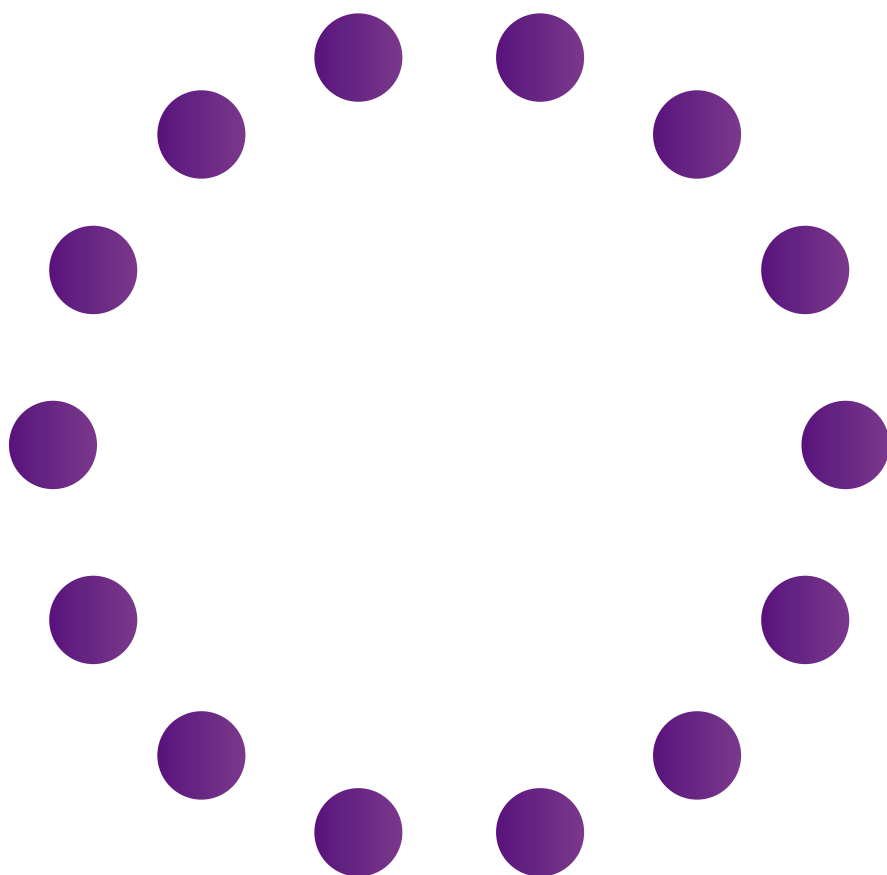


图三 . 小鼠胸腺 -CD68 抗体、CD3 抗体和 CD45 抗体共染色结果

第五章

Stereo-seq

透化试剂套装（载体版）



5.1. 产品描述

STOmics® Stereo-seq 透化试剂套装 (载体版) 是用于摸索组织切片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、具有高分辨大视场特点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; 若同时将多重免疫荧光 (mIF) 染色方法融入标准 Stereo-seq 透化测试实验流程中, 还可以快速判断兼容 mIF 的特定组织的最佳透化时间。

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。

5.2. 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

辅助性耗材:

- (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 5-1 至表格 5-4。



 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 5-1

Stereo-seq 透化试剂盒 货号: 101KP118			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
RI	1000028499	●	300 μ L × 1
PR Enzyme	1000028500	●	10 mg × 1
RT QC Reagent	1000028501	●	748 μ L × 1
RT Additive	1000028502	○ (透明)	44 μ L × 1
RT QC Enzyme	1000028503	○ (透明)	44 μ L × 1
TR Enzyme	1000028504	●	71 μ L × 1
TR Buffer	1000028505	●	1725 μ L × 2
🔒 储存温度: -25°C ~ -18°C		❄️ 冷链运输	⌚ 有效期: 见标签




表格 5-2

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: -25°C ~ 8°C		❄️ 冷链运输
⌚ 有效期: 见标签		

表格 5-3

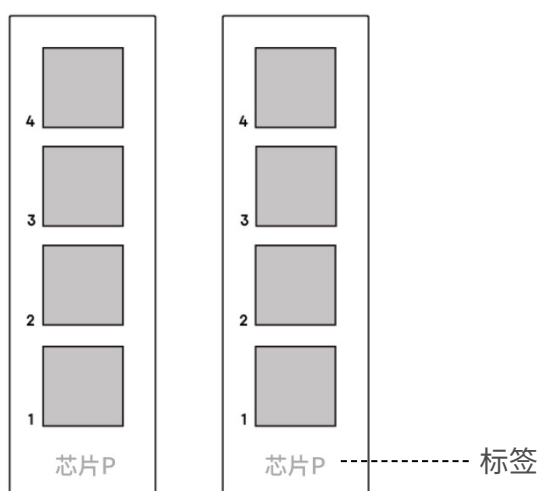
STOmics® Accessory Kit 货号: 1000033700		
组分信息	货号	规格
夹具	10000033699	1 EA
垫圈	10000033698	4 EA
封板膜	-	6 EA
 储存温度: 常温  常温运输  有效期: 见标签		

表格 5-4

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: 常温  常温运输  有效期: 见标签		

5.3. 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 (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 -20°C 或 4°C 。若拆袋后未使用，需重新干燥密封并储存在 -20°C 或 4°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。

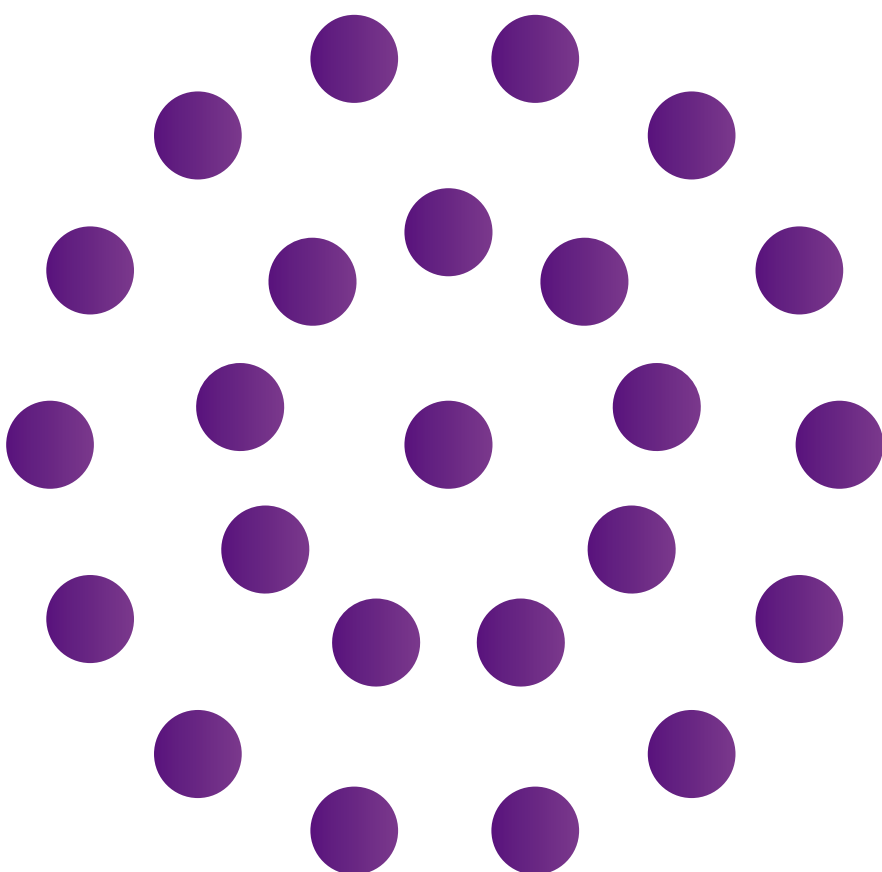
关于 Stereo-seq 芯片载体及配件的使用技巧，请参考本手册附录 A。

5.4. 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。

第六章

Stereo-seq 透化试剂套装标准操作流程 (兼容 mIF)



6.1. 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	准备流程	保存条件
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 稀释到 20 mL	室温
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μ L 稀释到 20 mL	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	用 1 mL 新鲜配制的 0.01N HCl 将 PR Enzyme (红盖，粉末状) 溶解后，通过移液器吹打混匀 (可分装成若干份)	- 20°C
不要涡旋透化酶，可通过移液器吹打混匀。建议对配制好的 10X 透化试剂储存液进行分装，避免反复冻融。		
1X 透化试剂工作液	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 15 μ L 稀释到 150 μ L (至少 150 μ L/ 芯片)	冰上备用 6 hr
滤后血清	提前取出血清，融化后，将适量马血清与山羊血清 1: 1 混合，用 0.22 μ m 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 μ L/ 管，- 20°C 储存，分装后不可反复冻融超过 3 次	- 20°C

准备仪器	准备流程	备注
低温离心机	提前将离心机温度调节到 4°C	-
PCR 仪	按顺序依次设定： 37°C 用于烤片和透化 (热盖 42°C) 42°C 用于反转录 (热盖 47°C) 55°C 用于组织移除 (热盖 60°C)	检查 PCR 仪是否有异常，必要时更换
金属浴	37°C 用于透化酶预热	-
荧光显微镜	TRITC 通道	-

6.2. 切片准备

- a. 提前将 PCR 仪温度设置到 37°C，热盖温度为 42°C，放置 PCR 适配器平衡温度；
- b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20°C，样本头预冷至 -15°C ~ -10°C（根据实际操作过程调整）；



⋯ 样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

- c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；
- d. 将 OCT 包埋的组织块从 -80°C 冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 **30 min**；
- e. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- f. 将组织块修剪成合适的尺寸（切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- g. 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

6.3. 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 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向上。芯片的正面向亮光面，正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。

- b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 μL Nuclease-Free Water 清洗 2 次（或在含 40-50 mL NF 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. 预冷甲醇：在玻片盒或 50 mL 离心管中加入足量甲醇，确保甲醇足够浸没所有芯片（可将一张普通载玻片放入容器中，查看甲醇的体积是否足够）。扣紧盖子，提前放入切片机中（-20°C）预冷 **5-30 min**；
- f. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- g. 组织贴片有两种操作方式可选：热贴（A）和冷贴（B）。根据需求选择切片厚度，通常为 10 μm。

A. 热贴

- 1) 连续切取组织切片，将切片移到切片台右侧靠近边缘处，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，每张切片放置间隔距离大于载体宽度；
- 2) 拿起载体的一边，使芯片正面朝下，对准切片；
- 3) 轻轻一压，肉眼可见切片已经吸附到芯片表面；
- 4) 重复 2) -3) 步骤操作，直至全部组织切片吸附到芯片表面（贴片时间控制在 **1 min 以内**）；
- 5) 将芯片正面朝上，快速将载体置于提前平衡温度的 PCR 适配器上，**37°C 孵育 5 min**，无需盖 PCR 热盖。



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) 将玻片正面朝上置于切片机中，预冷 **1-6 min**；



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

- 2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平，注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，无褶皱；
- 3) 立即拿起芯片载体，用指腹放在载体背面加温几秒钟，直至切片贴合；
- 4) 重复上述操作，直至所有切片贴片完成，建议组织切片贴片控制在 **5 min** 内；
- 5) 快速将载体置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**，无需盖 PCR 热盖。



进行冷贴时需控制好每张切片贴片时间，间隔时间太大，组织贴片会皱缩。



（可选暂停点）将孵育好的芯片载体放于玻片盒或者 50 mL 离心管，用干冰快速转移到 -80°C 冰箱，最长可于 -80°C 保存一个月。

继续实验时，使用干冰将玻片盒或者 50 mL 离心管转移，取出贴有组织的芯片载体，快速置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 5 min。

6.4. 组织固定

- a. 孵育结束后，立即将芯片载体置于 -20°C 预冷的甲醇中，确保甲醇浸没载体上的所有芯片，固定 **30 min**。在固定等待时间，可按照表格 6-1 准备下一步封闭和模拟抗体孵育步骤需要的试剂；

表格 6-1 封闭和模拟抗体孵育准备试剂

准备试剂	准备流程	保存条件
RI	- 20°C取出	冰上备用
Wash Buffer	取 40 μ L RI 加入 760 μ L 0.1X SSC 中, 透化测试全流程实验中用量至少为 800 μ L/ 芯片	冰上备用
10% Triton X-100	若无 10%Triton X-100, 可将 100%Triton X-100 用 Nuclease Free Water 稀释	室温
离心后血清	从- 20°C取出滤后血清, 融化后 4°C, 14000g 离心 10 min	冰上备用

- b. 固定结束后, 将玻片盒或 50 mL 离心管转移至通风橱中;
- c. 将载体从玻片盒或 50 mL 离心管中取出, 用无尘纸吸干载玻片背面和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。

6.5. 封闭和模拟抗体孵育

- a. 【封闭】按照表格 6-2 配制封闭液, 涡旋混匀后将封闭液滴加到芯片表面, 用量为 60 μ L/ 芯片, 室温孵育 **15 min**;

表格 6-2 封闭液

组分	1X (μ L)
5X SSC	120
血清	20
10% Triton X-100	2
RI	10
Nuclease Free Water	48
Total	200

- b. 【模拟一抗孵育】吸弃封闭液，缓慢滴加封闭液，用量为 60 μ L / 芯片，室温孵育 **45 min**；
- c. 加入 Wash Buffer，用量为 100 μ L / 芯片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；
- d. 重复两次步骤 c.；
- e. 【模拟二抗孵育】缓慢滴加封闭液，用量为 60 μ L / 芯片，室温孵育 **25 min**；
- f. 加入 Wash Buffer，用量为 100 μ L / 芯片，室温孵育 **3 min** 后吸弃；
- g. 重复两次步骤 f.。

6.6. 透化时间测试

- a. 根据【实验前准备】，提前配制 2 mL 0.01N HCl，准备好 1X 透化试剂工作液；
- b. 提前将 2 个 PCR 仪（或一个 PCR 仪、一个金属浴）温度设置到 37°C，热盖温度为 42°C，其中一个 PCR 仪提前 **3 min** 放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
42°C热盖	on	-
37°C	60 min	1
37°C	Hold	-

- c. (参考附录 A) 将垫圈与夹具组合成载具（不含芯片载体）。将载具放置于 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，37°C孵育 **10 min**，透化工作液使用前置于 PCR 仪或者金属浴中 37°C孵育 **10 min**（最长时间不超过 **30 min**）；

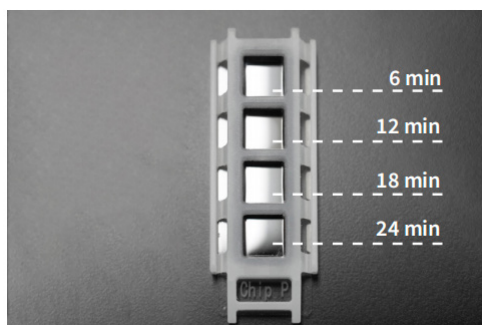


⋯ 可提前将 RT QC Reagent、RT Additive 和 RT QC Enzyme 放置在冰上解冻。

- d. 载具孵育完成后，将载体固定于载具上，组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；

⋯ 在组装载具时避免接触到芯片正面。

- e. 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；



图四. 透化时间测试 (分钟)

- 1) 先在透化时间为 **24 min** 的芯片添加 150 μL 1X 透化试剂。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**;
- 2) 将手持载具转移到 PCR 适配器上, 将封板膜 (不要撕开) 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, 拿开封板膜, 在透化时间为 **18 min** 的芯片添加 150 μL 1X 透化试剂;
- 4) 将封板膜重新放置于载具上, 盖上 PCR 仪盖, 37°C 孵育;
- 5) 重复以上步骤至透化时间最短的芯片开始孵育。



透化时可提前参考表格 6-4 配制 RT QC Mix, 用铝箔纸包裹避光, 冰上放置, 使用前室温平衡 5 min, 并将另一台 PCR 仪温度调节至 42°C, 热盖温度为 47°C, 提前放置 PCR 适配器平衡温度。

- f. 将手持载具从 PCR 仪中取出;
- g. 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;
- h. 加入 Wash Buffer, 用量为 100 μL / 芯片;
- i. 微微倾斜手持载具, 用移液器从芯片一角吸掉芯片表面溶液。

• 阳性对照 * 为小鼠大脑, 37°C, 透化 12 min 或者 Total RNA

Total RNA 阳性对照操作方法

- a. 按照表格 6-3 配制 Total RNA 杂交 Mix;

表格 6-3 Total RNA 杂交 Mix

组分	1X (μL)
Total RNA	X (2 μg)
Nuclease-free water	70-X
20X SSC	25
RI	5
Total	100

- b. (参考附录 A) 将垫圈与夹具组合成载具 (不含芯片载体)。将载具放置于 PCR 适配器上, 盖上 PCR 仪盖, 37°C 孵育 **10 min**, 透化工作液使用前置于 PCR 仪或者金属浴中 37°C 孵育 **10 min** (最长时间不超过 **30 min**) ;
- c. 载具孵育完成后, 将载体固定于载具上, 组合成手持载具, 确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧;
- d. 往芯片表面滴加 100 μL Total RNA 杂交 Mix, 37°C 杂交 **15-20 min**;

Total RNA 无需进行透化和组织去除步骤。

- e. 微微倾斜手持载具, 用移液器从芯片一角吸掉 Total RNA 杂交 Mix;
- f. 加入 Wash Buffer, 用量为 100 μL / 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溶液。



6.7. 反转录反应

- RT QC Reagent、RT Additive 和 RT QC Enzyme 在冰上提前解冻；
- 按照表格 6-4 配制 RT QC Mix，平衡至室温（避光）；

表格 6-4 RT QC Mix

组分	1X (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
RT QC Reagent	85	187	280.5	374
RT Additive	5	11	16.5	22
RT QC Enzyme	5	11	16.5	22
RI	5	11	16.5	22
Total	100	220	330	440

- 从反应孔的一角往芯片轻柔地加入 100 μ L RT QC Mix，确保 RT QC Mix 均匀覆盖全部芯片，使用封板膜密封载具；
- 将手持载具放置在 PCR 适配器上，按照下表设置程序，42°C 孵育 **1 hr**（也可反应更长时间，但不能超过 **16 hr**）。

温度	时间	循环数
47°C 热盖	on	-
42°C	1-16 hr	1
42°C	Hold	-

6.8. 组织去除

准备试剂	准备流程	保存条件
TR Buffer	提前取出，如果观察到 buffer 中有白色沉淀析出，可放于 55°C 溶解，再恢复至室温。	室温

- 提前将 PCR 仪温度设置到 55°C，热盖温度为 60°C，放置 PCR 适配器平衡温度；
- 按照表格 6-5 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 6-5 组织移除试剂 Mix

组分	1X (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
TR Buffer	392	862.4	1293.6	1724.8
TR Enzyme	8	17.6	26.4	35.2
Total	400	880	1320	1760

- c. 将手持载具从 42°C PCR 仪中取出，撕开封板膜；
- d. 微微倾斜手持载具，用移液器从反应孔的一角吸弃芯片表面的 RT QC Mix，避免触碰到芯片表面；
- e. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μ L/ 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.；
- i. 往每个芯片加入 400 μ L 组织移除试剂 Mix，使用封板膜密封载具，将手持载具放置 PCR 适配器上，按照下表设置程序，盖上 PCR 仪盖；

温度	时间	循环数
60°C热盖	on	-
55°C	60 min	1
55°C	Hold	-

- j. 组织移除结束后将手持载具从 PCR 仪内取出，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）。

- k. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μ L/ 芯片；
- l. 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；
- m. 重复步骤 k.-l.；
- n. 加入 Nuclease-Free Water，用量为 400 μ L/ 芯片；
- o. 上下吸打冲洗芯片表面以洗掉表面盐分；
- p. (参考附录 A) 拆卸手持载具，将芯片载体放在无尘纸上，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，加入 100 μ L 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 k-p 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 (MATIN, M-6318) 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）。

- q. 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。



6.9. 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：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；

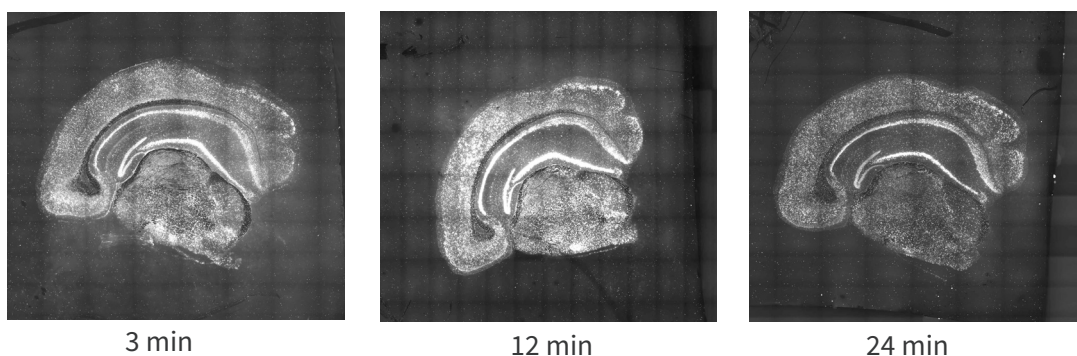
d. 先用 4 倍镜找到目标区域，然后切换到 10 倍镜，扫描整张芯片。

⋯ 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。

6.10. 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、荧光值最强且无弥散为最佳透化时间的判断标准。

如图五所示，透化 3 min 时，组织呈现同一皮层亮度不均匀的情况，说明透化不充分；透化 12 min 时，细节清晰，信号均匀，亮度最大；透化 24 min 时的信号弱于透化 12 min 的信号；因此，最佳的透化时间是 12 min。

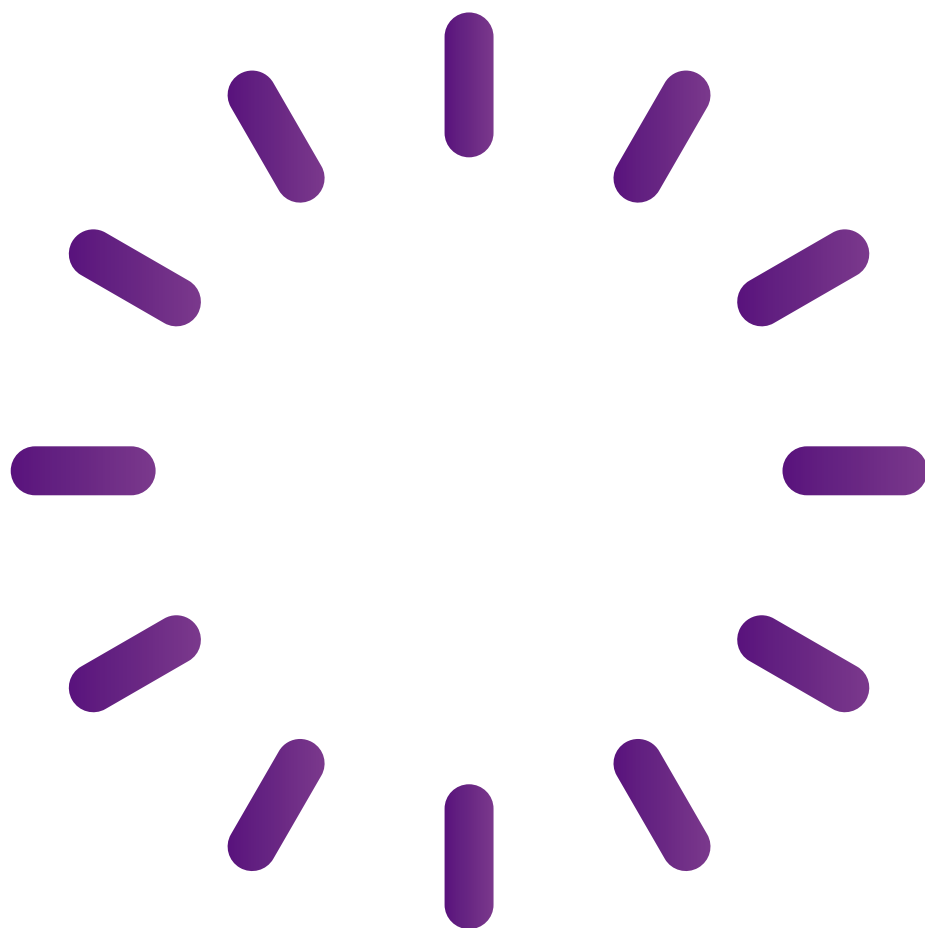


图五. 小鼠大脑 (半脑)

第七章

Stereo-seq

转录组试剂套装（载体版）



7.1. 产品描述

STOmics® Stereo-seq 转录组试剂套装 (载体版) 是用于构建组织切片全转录本 3' 端文库的试剂套装。本试剂套装采用的 Stereo-seq 时空转录组技术, 是一种基于 DNBSEQ 高通量测序技术开发的、具有高分辨大视场特点的原位全转录组信息捕获技术。Stereo-seq 芯片 T (时空 poly-T 芯片) 上载有具有空间坐标信息的捕获探针, 与组织切片结合后通过探针原位抓取组织内的 mRNA 分子并进行 cDNA 合成。研究人员通过 DNBSEQ 测序和 STOmics® 配套的可视化分析工具, 可获取特定样本超高分辨率下的空间转录组信息。

STOmics® 多重免疫荧光 (mIF) 与时空转录组共检测技术, 通过将 mIF 染色方法融入标准 Stereo-seq 转录组实验流程中, 在不影响 mRNA 捕获的前提下, 可实现在同一张组织切片上同时开展多个蛋白的免疫荧光和全转录组共检测。基于蛋白检测信息与基因表达数据的整合, 研究人员可完成更深入、更完整的样本检测, 解析复杂的病理、生理过程。其中可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 (时空用) 与 3 个 IF 靶标的共检测。

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。

7.2. 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《Stereo-seq 建库试剂盒使用说明书》。

7.3. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成:

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

辅助性耗材:

- (需单独订购) Stereo-seq PCR 适配器 *1 (2 EA)



*Stereo-seq 建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 7-1 至表格 7-4。



 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 7-1




Stereo-seq 转录组试剂盒 T 货号: 101KT114			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
RI	1000028499	●	300 μL × 1
PR Enzyme	1000028500	●	10 mg × 1
PR Rinse Buffer	1000042897	●	880 μL × 1
Glycerol	1000031615	●	50 μL × 1
RT Reagent	1000042898	○ (透明)	720 μL × 1
RT Oligo	1000028508	○ (透明)	1 OD × 1
RT Additive	1000028502	○ (透明)	44 μL × 1
ReverseT Enzyme	1000042899	○ (透明)	44 μL × 1
TR Buffer	1000028505	●	1725 μL × 2
cDNA Release Enzyme	1000028511	●	88 μL × 1
cDNA Release Buffer	1000028512	●	1725 μL × 2
cDNA Primer	1000028513	●	36 μL × 1
cDNA Amplification Mix	1000028514	●	220 μL × 1

 储存温度: -25°C ~ -18°C

 冷链运输

 有效期: 见标签




表格 7-2

Stereo-seq 芯片 T 载体 (1 cm * 1 cm) 货号: 200CT114		
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: -25°C ~ 8°C	 冷链运输	 有效期: 见标签

表格 7-3

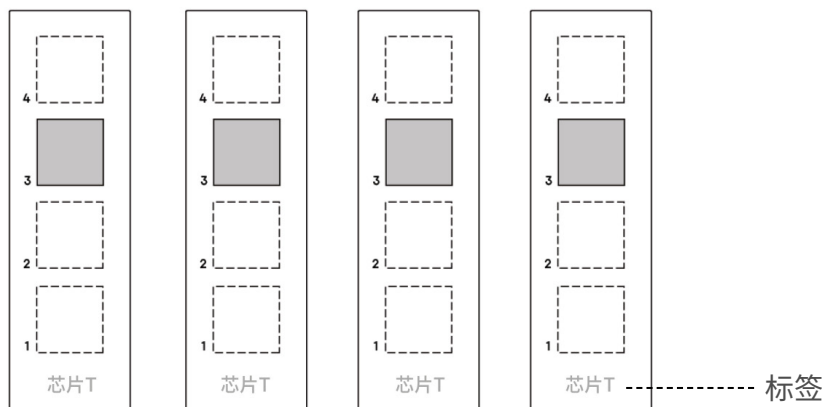
STOmics® Accessory Kit 货号: 1000033700		
组分信息	货号	规格
夹具	10000033699	1 EA
垫圈	10000033698	4 EA
封板膜	-	6 EA
 储存温度: 常温	 常温运输	 有效期: 见标签

表格 7-4

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: 常温	 常温运输	 有效期: 见标签

7.4. 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)。



Stereo-seq 芯片 (P/T) 载体保存方法

Stereo-seq 芯片 P/T 载体装于真空密封的铝袋中，冷链运输。收到产品后须立即将未开封的 Stereo-seq 芯片 P/T 载体储存在 -20°C 或 4°C 。若拆袋后未使用，需重新干燥密封并储存在 -20°C 或 4°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。

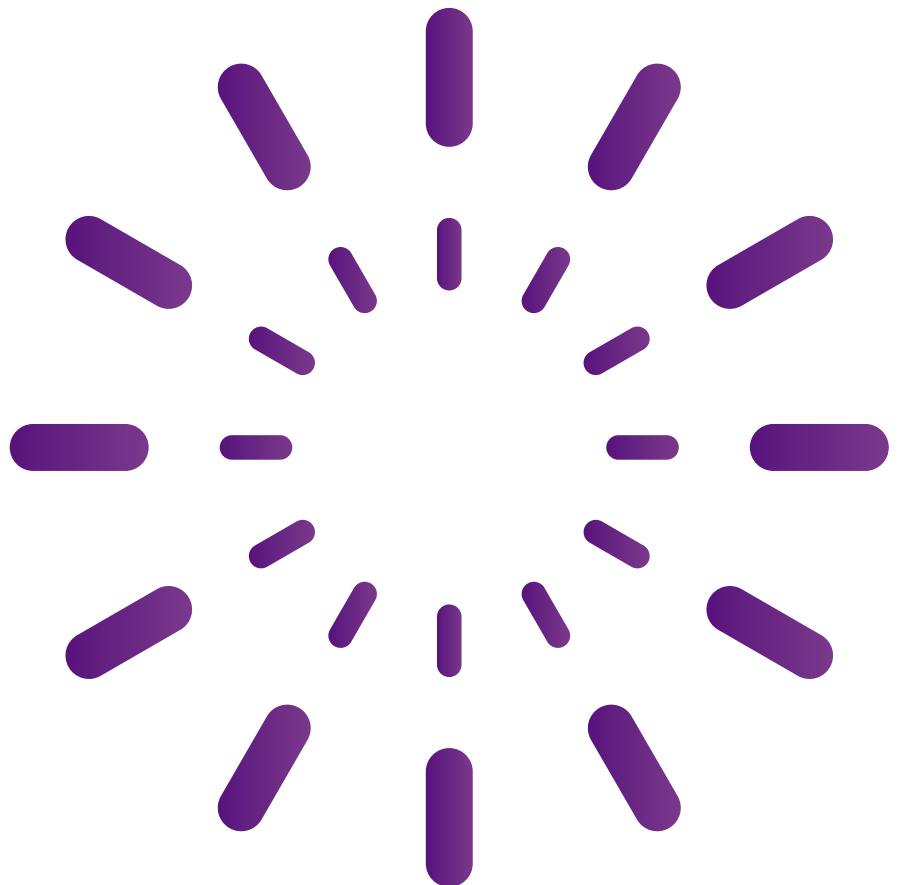
关于 Stereo-seq 芯片载体及配件的使用技巧，请参考本手册附录 A。

7.5. 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。

第八章

Stereo-seq 转录组试剂套装 标准操作流程（兼容 mIF）



8.1. 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	准备流程	保存条件
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 稀释到 20 mL	室温
0.1X SSC	取 20X SSC 250 μ L 稀释到 50 mL	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	用 1 mL 新鲜配制的 0.01N HCl 将 PR Enzyme（红盖，粉末状）溶解后，通过移液器吹打混匀（可分装成若干份）	- 20°C
不要涡旋透化酶，可通过移液器吹打混匀。建议对配制好的 10X 透化试剂储存液进行分装，避免反复冻融。		
1X 透化试剂工作液	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 15 μ L 稀释到 150 μ L（至少 150 μ L/ 芯片）	冰上备用 6 hr
RT Oligo	短暂离心，加入 79 μ L TE buffer 重悬。盖紧盖子后最大速度涡旋 15 s，然后短暂离心	分装后 - 80°C
建议将未使用的 RT Oligo 进行分装，并保存于 - 80°C，避免反复冻融。		
PR Rinse Buffer (含 5% RI)	每张芯片至少准备 200 μ L（190 μ L PR Rinse Buffer + 10 μ L RI）。配制后置于冰上备用，使用前室温平衡 5 min	冰上备用，使用前室温平衡 5 min
滤后血清	提前取出血清融化后，将适量马血清与山羊血清 1: 1 混合，用 0.22 μ m 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 μ L/ 管，- 20°C 储存，分装后不可反复冻融超过 3 次	- 20°C
RI	- 20°C 取出	冰上备用
50 倍稀释 DAPI	用 5X SSC 将 DAPI 溶液稀释 50 倍	4°C 保存 1 d（避光）

准备仪器	准备流程	备注
低温离心机	提前将离心机温度调节到 4°C	-
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
PCR 仪	按顺序依次设定: 37°C 用于烤片和透化 (热盖 42°C) 42°C 用于反转录 (热盖 47°C) 55°C 用于组织移除、cDNA 释放 (热盖 60°C)	检查 PCR 仪是否有异常, 必要时更换
金属浴	37°C 用于透化酶预热	-
荧光显微镜	DAPI/FITC/ TRITC/CY5 通道	根据二抗选择不同的荧光通道

8.2. 切片准备

- a. 提前将 PCR 仪温度设置到 37°C, 热盖温度为 42°C, 放置 PCR 适配器平衡温度;
- b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20°C, 样本头预冷至 -15°C ~ -10°C (根据实际操作过程调整);



⋯ 样本头温度过低会导致切片出现裂纹, 样本头温度过高会导致切片出现褶皱, 请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

- c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷;
- d. 将 OCT 包埋的组织块从 -80°C 冰箱取出, 放在冷冻切片机内平衡 **30 min**;
- e. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上;
- f. 将组织块修剪成合适的尺寸 (切面小于 0.9 cm × 0.9 cm), 切去组织块周围过多的 OCT, 保留一部分 OCT, 方便转移组织;
- g. 根据需要对组织块做最后地修剪, 以确保组织切片能更好地适配芯片, 随后可进行冷冻切片。

8.3. 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 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 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向上。芯片的正面向亮光面, 正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。

- b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**, 观察芯片表面是否有杂质, 如芯片上存在杂质, 使用 100 μL Nuclease-Free Water 清洗 2 次 (或在含 40-50 mL NF 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. 预冷甲醇: 在玻片盒或 50 mL 离心管中加入足量甲醇, 确保甲醇足够浸没所有芯片 (可将一张普通载玻片放入容器中, 查看甲醇的体积是否足够)。扣紧盖子, 提前放入切片机中 (-20°C) 预冷 **5-30 min**;
- f. 将组织包埋块固定至冻头上, 修片;
- g. 组织贴片有两种操作方式可选: 热贴 (A) 和冷贴 (B)。根据需求选择切片厚度, 通常为 10 μm。

A. 热贴

- 1) 连续切取组织切片, 将切片移到切片台右侧靠近边缘处, 然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平, 每张切片放置间隔距离大于载体宽度;
- 2) 拿起载体的一边, 使芯片正面朝下, 对准切片;
- 3) 轻轻一压, 肉眼可见切片已经吸附到芯片表面;
- 4) 重复 2) -3) 步骤操作, 直至全部组织切片吸附到芯片表面 (贴片时间控制在 **1 min** 以内);
- 5) 将芯片正面朝上, 快速将载体置于提前平衡温度的 PCR 适配器上, 37°C 孵育 **5 min**, 无需盖 PCR 热盖。

B. 冷贴

- 1) 将玻片正面朝上置于切片机中, 预冷 **1-6 min**;

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

- 2) 进行冷冻切片, 然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平, 注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功, 确保组织切片完整, 无褶皱;
- 3) 立即拿起芯片载体, 用指腹放在载体背面加温几秒钟, 直至切片贴合;
- 4) 重复上述操作, 直至所有切片贴片完成, 建议组织切片贴片控制在 **5 min** 内;
- 5) 快速将载体置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 **5 min**, 无需盖 PCR 热盖。

 进行冷贴时需控制好每张切片贴片时间, 间隔时间太大, 组织贴片会皱缩。

 (可选暂停点) 将孵育好的芯片载体放于玻片盒或者 50 mL 离心管, 用干冰快速转移到 -80°C 冰箱, 最长可于 -80°C 保存一个月。

继续实验时, 使用干冰将玻片盒或者 50 mL 离心管转移, 取出贴有组织的芯片载体, 快速置于 PCR 适配器上 37°C 孵育 5 min。



8.4. 组织固定

a. 载体孵育结束后, 立即置于 -20°C 预冷的甲醇中, 确保甲醇浸没载体上的所有芯片, 固定 **30 min**。在固定等待时间, 按照表格 8-1 准备下一步封闭以及抗体孵育步骤需要的试剂;

表格 8-1 封闭和抗体孵育准备试剂

准备试剂	准备流程	保存条件
Wash Buffer	取 35 μL RI 加入 665 μL 0.1X SSC 中, 转录组全流程实验中用量至少为 700 μL / 芯片	冰上备用
10% Triton X-100	若无 10% Triton X-100, 可将 100% Triton X-100 用 Nuclease Free Water 稀释	室温
离心后血清	从 -20°C 取出滤后血清, 融化后 4°C , 14000g 离心 10 min	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)。小鼠的组织则选择 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Cat. No.156604)	冰上备用
一抗	根据说明书提示从 4°C 或 -20°C 取出, 4°C , 14000g 离心 10 min	冰上备用
稀释后的一抗 (可选)	根据实验需求, 可用封闭液先进行一抗稀释	冰上备用
二抗	根据说明书提示从 4°C 或 -20°C 取出, 4°C , 14000g 离心 10 min	冰上备用
稀释后的二抗 (可选)	根据实验需求, 可用封闭液先进行二抗稀释	冰上备用
Glycerol	-20°C 取出恢复至室温	室温

b. 固定结束后, 将玻片盒或 50 mL 离心管转移至通风橱中;

c. 将载体从玻片盒或 50 mL 离心管中取出, 用无尘纸吸干载玻片背面和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。

8.5. 封闭与一抗孵育

a. 按照表格 8-2 配制封闭液，涡旋混匀后将封闭液滴加到组织表面，用量为 60 μL / 芯片，室温 **15 min**；

表格 8-2 封闭液

组分	1X (μL)
5X SSC	120
血清	20
10% Triton X-100	2
FcR Blocking Reagent *	10
RI	10
Nuclease Free Water	38
Total	200



⋯ 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)，但若小鼠组织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 200 μL 。



☰ 1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭、一抗孵育液配制和二抗孵育液配制。

b. 封闭等待期间，按照表格 8-3 配制一抗孵育液（按照抗体滴定实验中摸索的最佳稀释比例），涡旋混匀后瞬时离心，置于冰上用；

表格 8-3 一抗孵育液

组分	1X (μL)
封闭液	$60 - (V_1 + V_2 + \dots + V_n)$
抗体 1 或稀释后的抗体 1	V_1
抗体 2 或稀释后的抗体 2	V_2
.....
抗体 n 或稀释后的抗体 n	V_n
Total	60



⚠ 若要混合多个抗体，每个抗体需各自进行滴定实验；同时，抗体 1-n 要求是不同源性的抗体。

c. 吸弃封闭液，从非组织区域缓慢加入一抗孵育液，用量为 60 μL / 芯片，室温孵育 **45 min**；

⋯ 换液过程中需避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

d. 一抗孵育结束前, 按照表格 8-4 配制二抗孵育液, 涡旋混匀后瞬时离心, 置于冰上备用 (**避光**)。

表格 8-4 二抗孵育液

组分	1X (μL)
封闭液	60-(V1+V2+...+Vn)
二抗 1	V1
二抗 2	V2
.....
二抗 n	Vn
Total	60



推荐使用 Thermo Fisher Scientific Alexa Fluor Plus 系列荧光二抗, 选择 1: 500 的稀释比例进行配制。若使用其他品牌的荧光二抗, 请结合历史经验确定浓度。

8.6. 二抗孵育

- 吸弃一抗孵育液, 加入 Wash Buffer, 用量为 100 μL / 芯片, 室温孵育 **3 min** 后吸弃;
- 再次加入 Wash Buffer, 用量为 100 μL / 芯片, 室温孵育 **3 min** 后吸弃;
- 重复步骤 b., 总共清洗 3 次;



换液过程中需避免组织干燥, 若组织干燥易产生非特异性信号。

- 从非组织区域缓慢滴加二抗孵育液, 用量为 60 μL / 芯片, 室温孵育 **25 min (避光)**。

8.7. DAPI 染色

- 二抗孵育结束前, 可按照表格 8-5 配制 DAPI 工作液, 涡旋混匀后瞬时离心, 置于冰上备用 (**避光**) ;

表格 8-5 DAPI 工作液

组分	1X (μL)
5X SSC	60
50 倍稀释 DAPI	1
RI	5
Nuclease Free Water	34
Total	100

- b. 吸弃二抗孵育液, 加入 Wash Buffer, 用量为 100 μ L / 芯片, 室温孵育 **3 min** 后吸弃;
 c. 再次加入 Wash Buffer, 用量为 100 μ L / 芯片, 室温孵育 **3 min** 后吸弃;
 d. 重复步骤 c., 总共清洗 3 次;



换液过程中需避免组织干燥, 若组织干燥易产生非特异性信号。

- e. 从非组织区域缓慢滴加 DAPI 工作液, 用量为 100 μ L / 芯片, 室温孵育 **2 min (避光)** ;
 f. 吸弃 DAPI 工作液, 缓慢滴加 Wash Buffer 清洗两次, 用量为 100 μ L / 芯片;
 g. 倾斜载体用移液器从芯片一角吸弃 Wash Buffer, 尽量减少表面液体;
 h. 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;
 i. **(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
 j. 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;
 k. 用镊子夹取盖玻片或 24 孔板圆形细胞爬片的一端, 小心将盖玻片或爬片的另一端放在芯片边上, 然后将盖玻片或爬片逐渐放低, 直至完全覆盖芯片; 待甘油浸润整张芯片后, 立即安排拍照, 避免荧光猝灭。

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。

8.8. 荧光拍照

- a. 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 (≥ 12 bit)
 - DAPI filter cube (参考: Excitation 375/28 nm, Emission 460/50 nm)
 - FITC filter cube (参考: Excitation 480/30 nm, Emission 525/50 nm)
 - TRITC filter cube (参考: Excitation 545/25 nm, Emission 605/70 nm)
 - CY5 filter cube (参考: Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
 - 最大像元尺寸: 5 μ m/pixel
 - 曝光时间: 1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)
- b. 在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹:
- 对于 IF 图像, 以“芯片号_蛋白名称_IF”格式命名文件夹 (例: Y00035N1_NeuN_IF)
 - 对于 DAPI 图像, 仅以“芯片号”命名文件夹 (例: Y00035N1)

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。



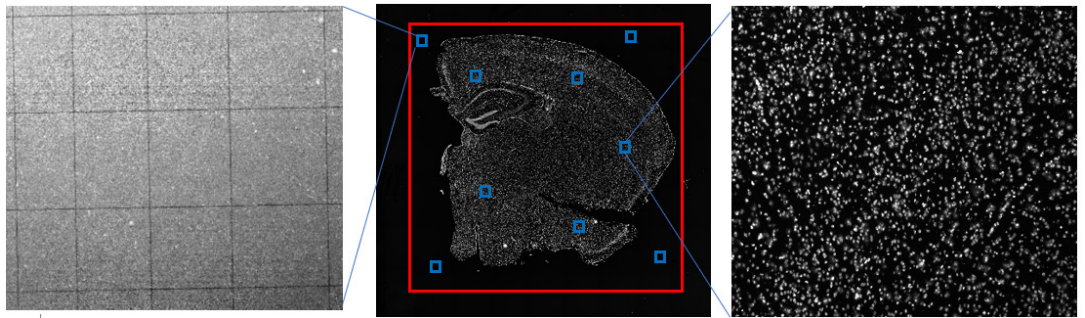
- c. 将 Stereo-seq 芯片载体放置在载物台上。需避免载体在扫描过程中发生位移 (可向载物台上滴加几滴水 (~2 μ L/ 滴), 然后将载体放置在水上);
- d. 取下遮光罩, 选择落射荧光扫描模式, 选择 4 倍镜、DAPI 通道并找到目标区域。设置亮度与增益。具体参数取决于不同的显微镜型号。在组织能清晰成像的前提下, 需选择更低的光强以避免荧光淬灭;



若要进行多通道成像, 拍照前需分别调整每个通道的成像参数。

- e. 用 4 倍镜扫描完成后, 切换到 10 倍镜, 扫描整张芯片;

如图六所示, 以小鼠半脑组织的 DAPI 通道扫描图像为例, 中间图片红框内为选中的目标组织区域, 蓝色小方框为添加的对焦点; 左图为组织外选取的一个对焦点视野窗口截图, 应确保 Track 线清晰且分明; 右图为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图, 应确保组织轮廓清晰;



图六. 小鼠半脑 DAPI 染色图

- f. 扫描 (DAPI 通道) 完成后, 直接切换至下一个荧光通道 (根据二抗偶联的荧光染料选择合适的荧光通道); 不要移动芯片载体, 无需重新扫描地图, 无需重新添加对焦点, 无需改变红框选中组织区域。新建文件夹, 按照步骤 b. 中的规则命名并保存。调节焦距与曝光直至组织染色图像清晰呈现, 随后 10 倍镜下扫描整张芯片;
- g. 扫描完成后继续切换下一个通道扫描直至所有通道 IF 图像拍摄完成;
- h. 保存整个文件夹 (原始 FOV 小图与拼接大图);
- i. 打开 ImageStudio 软件内的图像 QC 模块。上传核染色图 (DAPI) 和 IF 图, 然后参考软件内置的 ImageStudio 用户手册来进行图像 QC;



获得的核染色图 (DAPI) 需要通过 QC 才能开展进一步的图像分析 (register)。

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, 继续实验。实验结束可联系 FAS 帮助排查问题。

- j. 拍照后, 用镊子将盖玻片轻轻推至载体边缘;
- k. 用镊子夹住盖玻片一角, 轻轻地平行移动盖玻片, 直到芯片与盖玻片完全分离;
- l. 将载体置于装有至少 30 mL 0.1X SSC 的 50 mL 离心管中浸泡 3-5 s;

确保芯片全部浸没于溶液中。

- m. 取出芯片载体, 用无尘纸擦去载体背面及芯片四周的液体, 确保无液体残留。

8.9. 组织透化

- a. 根据【实验前准备】，提前配制 2 mL 0.01N HCl，准备好 1X 透化试剂工作液；
- b. 提前将 2 台 PCR 仪（或 1 个 PCR 仪、1 个金属浴）温度设置到 37°C，热盖温度为 42°C，其中一个 PCR 仪提前放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
42°C热盖	on	-
37°C	60 min	1
37°C	Hold	-

- c. 提前取出 RT Reagent, RT Additive 和 RT Oligo 置于室温解冻，RT Oligo 解冻后置于冰上备用；
- d. (参考附录 A) 将垫圈与夹具组合成载具（不含芯片载体）。将载具放置于 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，37°C 孵育 **10 min**，透化工作液使用前置于 PCR 仪或者金属浴中 37°C 孵育 **10 min**（最长不超过 **30 min**）；



⋯ 在组装载具时避免接触到芯片正面。

e. 载具孵育完成后，将载体固定于载具上，组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；

f. 从反应孔的一角加入 1X 透化试剂工作液，用量为 150 μL/ 芯片，用封板膜对手持载具进行封口，无需撕开封板膜粘到载具上，盖上 PCR 仪盖，37°C 孵育；☰

⋯ 确保芯片被 1X 渗透试剂工作液完全覆盖。



☰ 最佳透化时间通过 Stereo-seq 透化测试实验预先确定。

f. 在等待透化期间, 参考表格 8-6 配制 RT Mix, 放置于冰上, 使用前需提前置于室温平衡 **5 min**;

表格 8-6 RT Mix

组分	1X (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
RT Reagent	160	352	528	704
RT Additive	10	22	33	44
RI	10	22	33	44
RT Oligo	10	22	33	44
ReverseT Enzyme	10	22	33	44
Total	200	440	660	880

g. 将另一 PCR 仪反应温度调节至 42°C, 热盖温度为 47°C, 放置另一个 PCR 适配器平衡温度;

h. 透化结束后, 将手持载具从 PCR 仪 (37°C) 中取出;

i. 倾斜角度小于 20°, 用移液器从反应孔的一角吸掉透化试剂, 避免接触芯片正面;

j. 加入 PR Rinse Buffer 溶液 (含 5%RI, 用量为 200 μ L/ 芯片);

k. 微微倾斜手持载具, 用移液器在芯片一角吸弃 PR Rinse Buffer 溶液, 保持芯片湿润。



避免芯片完全干燥。

8.10. 反转录反应

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

b. 使用封板膜将手持载具封口, 放置于 PCR 仪 (42°C) 的 PCR 适配器上, 盖上 PCR 仪盖子, PCR 仪设定以下程序, 反应 **3 hr** 或以上, 最长不超过 **16 hr**。

温度	时间	循环数
47°C热盖	on	-
42°C	3-16 hr	1
42°C	Hold	-

8.11. 组织去除

准备试剂	准备流程	储存
TR buffer	提前取出, 如果观察到 buffer 中有白色沉淀析出, 可放于 55°C 溶解, 再恢复至室温。	室温
cDNA Release Buffer	提前取出, 如果观察到 buffer 中有白色沉淀析出, 可放于 55°C 溶解, 再恢复至室温。	室温

- 提前将另一台 PCR 仪反应温度调节至 55°C, PCR 仪热盖温度为 60°C, 放置 PCR 适配器平衡温度;
- 反转录反应结束后, 将手持载具从 PCR 仪 (42°C) 中取出;
- 微微倾斜手持载具, 用移液器从反应孔的一角吸弃芯片表面的 RT Mix;
- 加入 TR Buffer (用量为 400 μ L / 芯片), 然后放置于 PCR 仪 (55°C) 的 PCR 适配器上反应 **10 min**;
- 微微倾斜手持载具, 用移液器在从反应孔的一角吸弃 TR Buffer, 避免接触到芯片正面。



此步反应时可参考表格 8-7 提前配制 cDNA Release Mix。

如组织移除不干净, 加入 400 μ L 0.1X SSC, 用移液器轻轻吸打, 除去芯片上组织, 然后微微倾斜手持载具, 用移液器吸弃 0.1X SSC。

温度	时间	循环数
60°C热盖	on	-
55°C	10 min	1
55°C	Hold	-

8.12. cDNA 释放与回收

- a. 按照表格 8-7 配制 cDNA Release Mix, 室温放置;

表格 8-7 cDNA Release Mix

组分	1X (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
cDNA Release Buffer	380	836	1254	1672
cDNA Release Enzyme	20	44	66	88
Total	400	880	1320	1760

- b. 加入 cDNA Release Mix (用量为 400 μL / 芯片) ;
- c. 用封板膜对手持载具进行封口, 压紧反应孔边缘, 防止反应液挥发, 置于 PCR 仪 (55°C) 的 PCR 适配器上反应 **3 hr** 或以上, 最长不超过 **18 hr**;

温度	时间	循环数
60°C热盖	on	-
55°C	3-18 hr	1
55°C	Hold	-



停止点:

- DNA 收集步骤在此可反应过夜。如果反应过夜, 应确保封板膜的密封性。

- d. 反应结束后, 将反应孔内液体完全回收到新的 1.5 mL 离心管内;
- e. 加入 Nuclease-Free Water 清洗反应孔内的芯片 (用量为 100 μL / 芯片), 并收集到上一步的离心管中。



此步骤需要回收 cDNA Release Mix 400 μL (体积可能小于 400 μL) 和 Nuclease-Free Water 100 μL , 合并后进行下一个步骤。



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。

8.13. cDNA 纯化与扩增

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 的体积小 $\sim 2 \mu\text{L}$ 。
- 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。

8.13.1. cDNA 纯化

a. cDNA 回收液如果观察到有白色沉淀析出, 可放于 55°C 溶解, 恢复至室温后进行纯化。提前 **30 min** 取出磁珠, 平衡至室温;

b. 1X 磁珠 cDNA 纯化步骤:

- 1) 将上一步回收液 (450-490 μ L) 与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合, 震荡混匀, 室温孵育 **10 min**;
- 2) 瞬时离心后, 将离心管放在磁力架上静置 **3 min**;
- 3) 待液体澄清后, 用移液器小心去除上清 (如果管盖上有泡沫, 吸弃泡沫);
- 4) 将离心管保持在磁力架上, 加入 1 mL 80% 乙醇 (使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇), 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 (如果管盖上有泡沫, 建议用 80% 乙醇清洗干净)。

- 5) 重复一次步骤 4) ;
- 6) 将离心管保持在磁力架上, 室温风干 **5-8 min**, 直至磁珠表面无反光、无开裂;
- 7) 先加 22 μ L Nuclease-Free Water 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**, 直至液体变澄清;
- 8) 将上清 (~21 μ L cDNA) 转移至新的 0.2 mL PCR 管中;
- 9) 再将 22 μ L Nuclease-Free Water 加入步骤 7 的磁珠中二次回溶, 震荡混匀后室温静置 **5 min**, 瞬时离心, 磁力架静置 **3-5 min**, 直至液体变澄清;
- 10) 将上清 (~21 μ L cDNA) 转移至步骤 8 的 PCR 管中, 合并总体积 ~42 μ L。

c. 如果上述回收样品不足 42 μ L, 用 Nuclease-Free Water 补足。



收集了洗脱的 cDNA 后, 可用 40 μ L Nuclease-free Water 在 4°C 保存磁珠, 直至 cDNA 最终产品 QC 通过。

8.13.2. cDNA 扩增

a. 按照表格 8-8 配制 PCR Mix, 共 100 μ L;

表格 8-8 PCR Mix

组分	1X (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
cDNA Amplification Mix	50	110	165	220
cDNA Primer	8	17.6	26.4	35.2
回收 cDNA 样本	42	2 \times 42	3 \times 42	4 \times 42
Total	100	2 \times 100	3 \times 100	4 \times 100

b. 瞬时离心，按照表格 8-9 PCR 程序进行扩增；

表格 8-9 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 sec	15
58°C	20 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
12°C	Hold	-

c. 按照表格 8-10 配制 Qubit dsDNA Mix

表格 8-10 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)；

d. 震荡混匀后取 1 μL PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，DNA 浓度通常高于 5 ng/ μL ；



为后续 troubleshooting 考虑，我们建议保留 2 μL PCR 产物。

e. 对 PCR 产物进行 1X 磁珠纯化：

- 1) 将 PCR 产物 (100 μL) 与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合，振荡混匀，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 200 μL 80% 乙醇漂洗 (新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇)。通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清。**移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠；**
- 4) 重复一次步骤 3)；

5) 将离心管保持在磁力架上, 打开盖子, 室温风干 **5-8 min**, 直至磁珠表面无反光、无开裂;

6) 加 42 μL 的 TE Buffer 回溶, 震荡混匀后室温静置 **5 min**, 瞬时离心, 磁力架静置 **3-5 min**, 待液体澄清后将上清 ($\sim 40 \mu\text{L}$) 转移到新的 1.5 mL 离心管中。



— 停止点:

- cDNA 纯化产物可在 -20°C 下保存 1 个月。

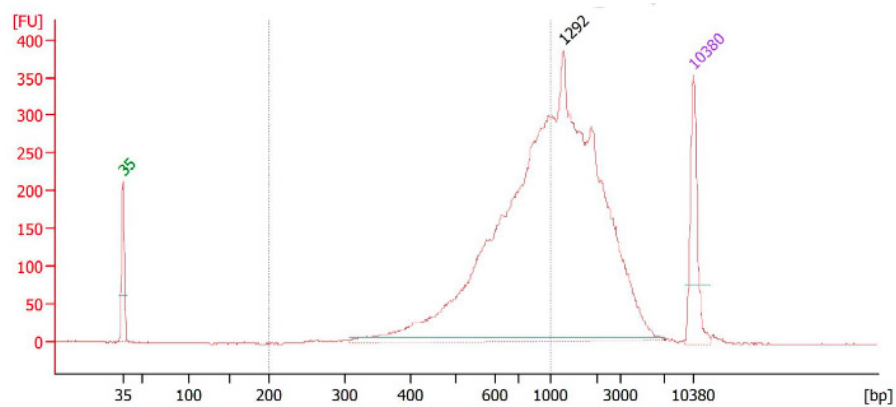


QC 纯化后, 可用 40 μL Nuclease-free Water 在 4°C 保存磁珠, 直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

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

g. 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip[®] GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment AnalyzerTM (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 要求片段分布主峰在 1000-1500 bp (如图六), 纯化后产量通常大于 20 ng。



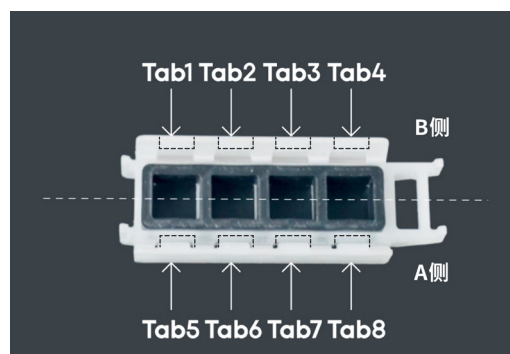
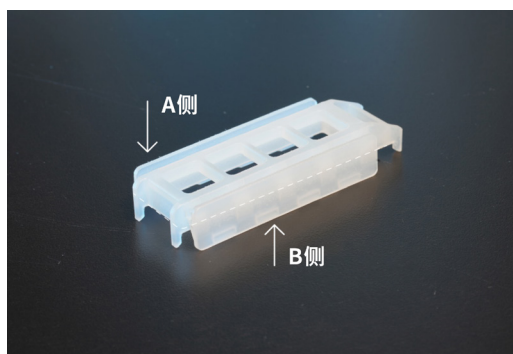
图六. cDNA 扩增产物 2100 峰图

◎ 后续文库构建具体操作参考《Stereo-seq 建库试剂盒使用说明书》。

附录 A: Stereo-seq 芯片载体及配件使用技巧

Stereo-seq 载体配件包

Stereo-seq 载体配件包中包含芯片载体的夹具和可装卸的垫圈。

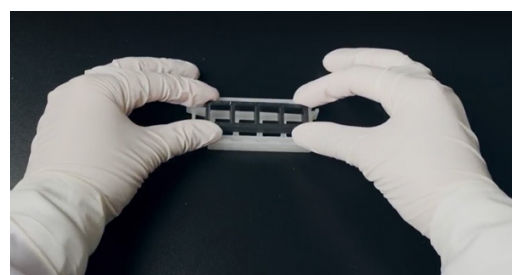


组装方法

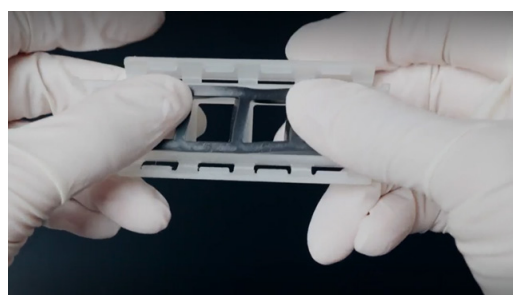
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



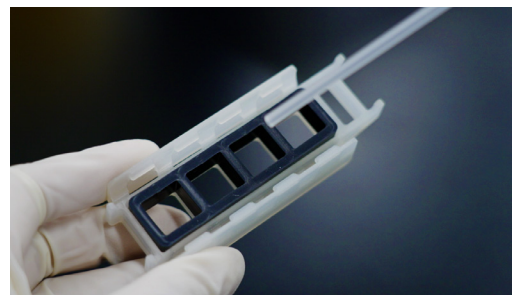
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



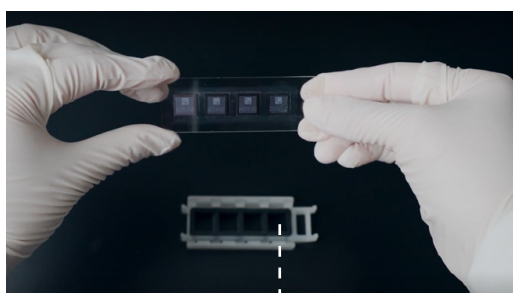
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



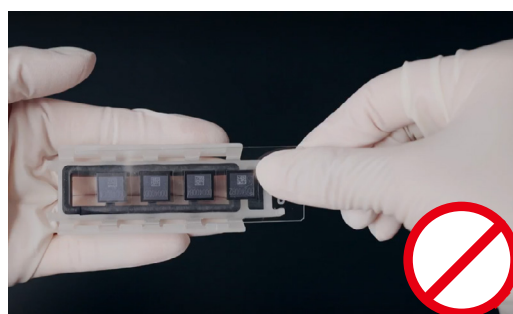
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；



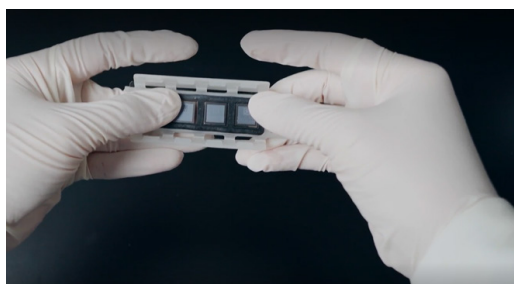
e. 拿起 Stereo-seq 芯片载体，芯片面朝下，将芯片载体标签朝夹具的长边卡扣方向；



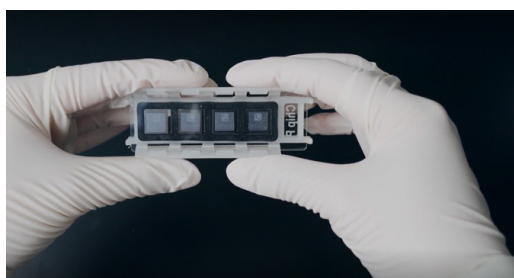
f. 芯片对准垫圈孔位，避免夹具和垫圈接触芯片表面；



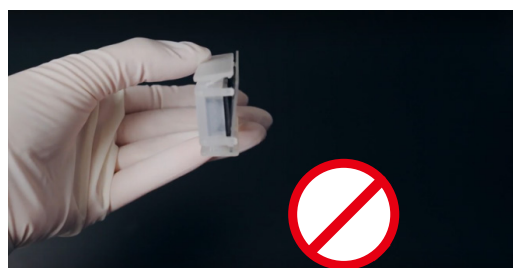
g. 先将芯片载体卡进夹具下方 4 个卡扣。双手中指支撑夹具的正面，左手拇指放在 tab 1 和 tab 2 之间，右手拇指放在 tab 3 和 tab 4 之间，拇指匀力向下按压芯片载体，直至听到“咔”的一声。双手食指用力向下按压夹具顶部边缘，将载体卡进夹具上方 4 个卡扣；



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。

