

Stereo-CITE

蛋白转录组试剂套装

使用说明书



货号：202ST114
试剂盒版本号：V1.0
说明书版本号：A

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.0
修订日期：2024 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。

2024 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: ~ 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 芯片 T 载体介绍	8
1.6. 注意事项	8

第二章 STOmics Stereo-CITE 蛋白转录组试剂套装标准操作流程 (新鲜冷冻样本)

2.1. 实验前准备	11
2.2. 切片准备	13
2.3. 芯片处理与组织贴片	14
2.4. 组织固定	16
2.5. 封闭与抗体孵育	16
2.6. DAPI 染色	19
2.7. 荧光拍照	21
2.8. 组织解交联	24
2.9. 组织透化	25
2.10. 反转录反应	26
2.11. 组织去除	27
2.12. cDNA&ADT 释放与回收	27
2.13. 磁珠操作注意事项	28
2.14. 转录组 cDNA 纯化	31
2.15. 转录组 cDNA 扩增	32
2.16. 抗体衍生标签 (ADT) 产物纯化	34
2.17. 抗体衍生标签 (ADT) 产物扩增	34

附录 A 试剂配制总览表	37
--------------	----



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

STOmics Stereo-CITE 蛋白转录组试剂套装能够在同一张组织切片上，实现全转录本和超高重蛋白的共同检测，并且蛋白检测不影响转录组的捕获。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，通过一系列生化流程，探针能够原位抓取组织内的 mRNA 分子和抗体衍生标签（ADT），并进行 cDNA 合成，通过测序和配套的可视化系统，获取全视场样本的转录组和多蛋白空间分布信息。

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 [《Stereo-seq 建库试剂盒使用说明书》](#)。

1.3. 产品组成

每个试剂套装由以下四个部分组成：

- Stereo-seq 转录组试剂盒 T *1 (4 RXN)
- Stereo-seq 蛋白组辅助试剂盒 *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 1-1 至表格 1-5。



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

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

收到产品后

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



表格 1-1

Stereo-seq 转录组试剂盒 T 货号：101KT114

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
PR Rinse Buffer	1000042897	● 红色	880 μ L × 1
Glycerol	1000031615	● 紫色	50 μ L × 1
RT Reagent	1000042898	○ 透明	720 μ L × 1
RT Oligo	1000028508	○ 透明	1 OD × 1
RT Additive	1000028502	○ 透明	44 μ L × 1
ReverseT Enzyme	1000042899	○ 透明	44 μ L × 1
TR Buffer	1000028505	● 绿色	1725 μ L × 2
cDNA Release Enzyme	1000028511	● 黑色	88 μ L × 1
cDNA Release Buffer	1000028512	● 黑色	1725 μ L × 2
cDNA Primer	1000028513	● 蓝色	36 μ L × 1
cDNA Amplification Mix	1000028514	● 蓝色	220 μ L × 1

 储存温度：-25°C ~ -18°C

 冷链运输

 有效期：见标签

表格 1-2

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 1-3

Stereo-seq 蛋白组辅助试剂盒 货号: 202KA114			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Blocking Reagent	1000044666	○ 透明	60 μL × 1
ADT Amplification Mix	1000043547	● 蓝色	220 μL × 1
ADT Primer Mix	1000043548	● 蓝色	36 μL × 1
Decrosslinking Reagent	1000043549	● 绿色	1725 μL × 5
 储存温度: -25°C ~ -18°C	 冷链运输	 有效期: 见标签	

表格 1-4

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 1-5

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

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 1-6 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《[STOmics 显微镜评估参考手册](#)》。<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

表格 1-6

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	-
Thermo Fisher Scientific	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统 *	4483636
Bio-Rad	T100™ PCR 仪 *	1861096
-	金属浴 (或其他同等功能仪器)	-
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	-
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
Thermo Fisher Scientific	RNase Inhibitor (RI) ¹	EO0382
常州新一产生命科技有限公司	RNase Inhibitor (RI) ¹	LS-EZ-E-00006P

☰ 从含有相同序号上标的品牌中任选其一。



试剂		
品牌	描述	产品编号
Agencourt	AMPure® XP ²	A63882
Beckman Coulter	SPRIselect ²	B23317/B23318/ B23319
Vazyme	VAHTS DNA Clean Beads ²	N411-02
Boster	4% PFA 多聚甲醛 (组织固定液含 DEPC)	AR1069
Invitrogen	剪切鲑鱼精子 DNA (10 mg/mL)	AM9680
Thermo Fisher Scientific	Gibco™ 马血清	26050070
	Gibco™ 山羊血清	16210064
Sigma Aldrich	Triton X-100 Solution, 10%	93443-100ML
Thermo Fisher Scientific	DAPI 溶液 (1 mg/mL)	62248
Biolegend	TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody	156604
	Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)	422301
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)。		
	TotalSeq™-A 一抗 (自由组合抗体)	-
Biolegend	TotalSeq™ -A Mouse Universal Cocktail, V1.0	199901
	TotalSeq™ -A Human Universal Cocktail, V1.0	399907
本试剂盒已经验证, 可以搭配 TotalSeq™-A 一抗 (已混合抗体): TotalSeq™ -A Mouse Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 199901, 119 重抗体, 用于小鼠样本) 和 TotalSeq™ -A Human Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 399907, 154 重抗体, 用于人类样本) 使用。另外, 本产品也支持用户自己选择感兴趣的靶标蛋白, 自由组合 TotalSeq™-A 一抗进行蛋白和转录组的检测。目前 Biolegend 公司 TotalSeq™-A 一抗只涵盖了针对人和鼠两种物种靶标的抗体, 具体抗体的选择可参考此网站 https://www.biolegend.com/en-us/search-results?PageSize=25&Format=TOTALSEQ_A		
Thermo Fisher Scientific	Alexa Fluor™ Plus 系列 anti-Rat 二抗 (用于小鼠样本, 其它等同抗体需要自行验证)	A48270
	Alexa Fluor™ Plus 系列 anti-mouse 二抗 (用于人类样本, 其它等同抗体需要自行验证)	A32773
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
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。

试剂

品牌	描述	产品编号
Invitrogen	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854
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



从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

特别说明：

同型对照抗体 (Isotype control antibody)

同型对照抗体是与一抗保持相似特性但缺乏特异性靶标的抗体。同型对照抗体常被作为阴性对照，用来帮助分辨非特异性背景信号和特异的抗体信号。同型对照抗体的选择应与一抗的种属和类别相同，包括轻链。

例如，如图一，TotalSeq™ -A0007 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) 抗体的同种型 (Isotype) 为 Mouse IgG2b κ，那么进行此种抗体的检测时，就需要加入 TotalSeq™ -A0092 Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl Antibody。具体加入同型对照抗体的种类需要参考所加入的 TotalSeq™-A 一抗的种类来确定。另外需要注意，如果试剂盒搭配 TotalSeq™ -A Mouse Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 199901) 和 TotalSeq™ -A Human Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 399907) 使用，则无需加入同型对照抗体，因为这两款 Cocktail 中已经加入了同型对照抗体。

同型对照抗体的选择可参考此网址：

https://www.biolegend.com/en-us/search-results?PageSize=25&Category=ISO_CTRL&Format=TOTALSEQ_A

Products Learn Support Quality About Us Contact Us Custom Solutions [Login/Register](#) [Cart \(0\)](#)

BioLegend
Enabling Legendary Discovery™

Search for: [United States](#)

Home > Products

TotalSeq™ -A0007 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody

Pricing & Availability

Product Details Antigen Details Documentation Reviews Related Protocols Related Products Related Pages & Pathways Related FAQs Other Formats Concentration & Expiration Lookup Certificate of Analysis

Clone 29E.2A3 (See other available formats) [Compare all formats](#)

Regulatory Status RUO

Other Names Programmed cell death ligand 1 (PD-L1), B7 homolog 1 (B7-H1)

Isotype Mouse IgG2b, κ

Barcode Sequence GTTGTCGACAATAC

Ave. Rating [Submit a Review](#)

Cat #	Size	Price	Quantity	Check Availability	Save
329743	10 µg	\$358	<input type="text" value="1"/>	Add to cart	Save

图一 . TotalSeq™ -A0007 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) 抗体的同种型 (Isotype) 举例

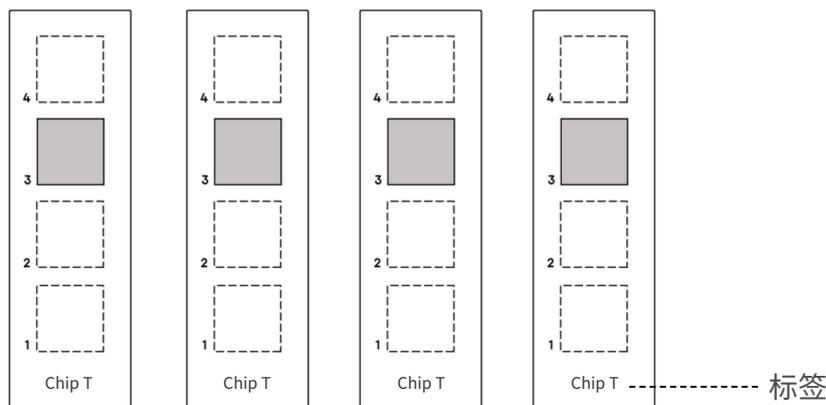
耗材		
品牌	描述	产品编号
-	金属包埋盒	-
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	粘附载玻片	-
-	显微镜盖玻片 (尺寸: 18 mm × 18 mm, 厚度: 0.13 - 0.16 mm) ¹	-
晶安生物	24 孔板圆形细胞爬片 ¹	J24001
	Corning® 35mm TC-treated Culture Dish	353001
Corning	50 mL 离心管	430829
	15 mL 离心管	430791
BBI	5.0 mL 离心管	F611888-0001
Kimtech	Kimwipes™ 无尘纸	34155
Matin	Power dust remover (空气罐)	M-6318
	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	2.0 mL 离心管	MCT-200-C
	0.2 mL PCR 管 ²	PCR-02-C
	96 孔板 ²	PCR-96M2-HS-C
Axygen	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
-	金属包埋盒	-
Beyotime	玻片盒	FBX003
-	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	免疫组化笔	BC004 (或同等替代)

 从含有相同序号上标的品牌中任选其一。



1.5. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍

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



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

Stereo-seq 芯片 (P/T) 载体保存方法

Stereo-seq 芯片 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。

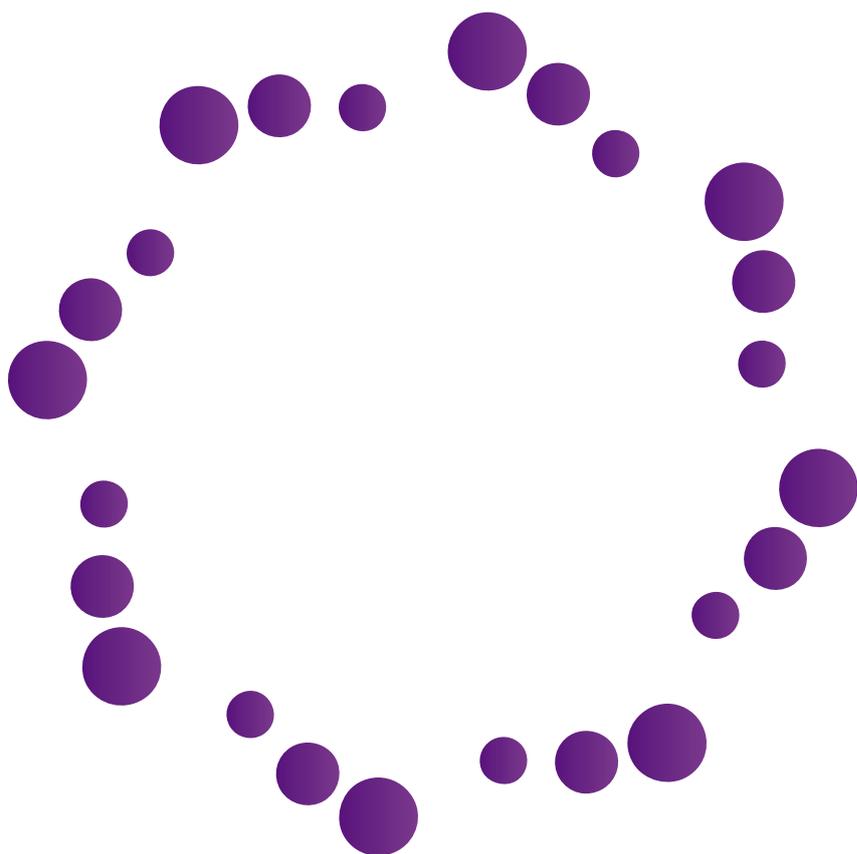
1.6. 注意事项

- 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

STOmics Stereo-CITE

蛋白转录组试剂套装标准操作流程 (新鲜冷冻样本)



抗体是 IF 实验的关键成分，其性能可直接影响到数据质量。

对于选择 TotalSeq™-A 自由组合抗体的用户，我们建议首先在感兴趣组织切片上进行抗体滴定 /IF 预实验，选择最合适的抗体浓度后，再进行标准操作流程。

如果试剂盒搭配 TotalSeq™ -A Mouse Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No.199901) 和 TotalSeq™ -A Human Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No.399907) 使用，则可以跳过抗体滴定 /IF 预实验，直接按照我们推荐的稀释比例，进行标准操作流程。

2.1. 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《Stereo-seq 透化试剂套装（载体版兼容蛋白组）使用说明书》。



 本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 **Nuclease - Free Water**。

准备试剂	准备流程	储存
4% PFA	-20°C取出融化后混匀，分装每管 2 mL	-20°C
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 20 mL	室温
0.1X SSC	取 20X SSC 200 μL 用 Nuclease-Free Water 稀释到 40 mL	室温
Wash Buffer	取 160 μL RI 加入 3040 μL 0.1X SSC 中（一张芯片用量）	冰上备用
滤后血清	提前取出血清，融化后，马血清与山羊血清按 1: 1 混合，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°C取出分装血清融化，4°C，14000g 离心 10 min，冰上备用。一张芯片用量 30 μL	-20°C
Blocking Reagent	-20°C取出融化，一张芯片用量 15μL，冰上备用	-20°C
剪切鲑鱼精子 DNA	-20°C取出融化，一张芯片用量 30 μL，冰上备用	-20°C
RI	-20°C取出，一张芯片用量 210 μL，冰上备用	-20°C
一抗、二抗	根据说明书提示从 4°C或-20°C取出，4°C，14000g 离心 10 min 后置于冰上备用，一抗含有对应的同型对照抗体	4°C或-20°C
稀释后的一抗、二抗（可选）	可根据实验需求，预先进行抗体稀释	冰上备用
TotalSeq™-A Mouse Universal Cocktail, V1.0 或 TotalSeq™-A Human Universal Cocktail, V1.0（可选）	a. 将冻干粉管室温平衡 5 min； b. 将冻干粉管放在空的 2 mL EP 管中，在室温下 10000g 离心 30 s； c. 加入 27.5 μL 的 1X PBS，室温孵育 5 min； d. 震荡涡旋并在室温下 10000g 离心 30 s； e. 将整个体积（27.5 μL）回溶好的抗体 Cocktail 溶液转移到新的 EP 管中，4°C，14000g 离心 10 min； f. 吸取 25 uL 的上清，转移到新的 EP 管中，置于冰上备用。	4°C
10% Triton X-100	若无 10% Triton X-100，可将 100% Triton X-100 用 Nuclease-Free Water 稀释	室温

准备试剂	准备流程	储存
FcR Blocking Reagent	根据组织种属选择，人源组织用 Human TruStain FcX™ (Cat. No. 422301)，小鼠的组织用 TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) Antibody (Cat. No. 156604)，置于冰上备用	4°C
50 倍稀释 DAPI	用 5X SSC 50 倍稀释 DAPI 溶液，置于冰上备用	4°C 避光 1 天
Glycerol	- 20°C 取出恢复至室温	室温
Decrosslinking Reagent	- 20°C 取出恢复至室温	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 值在 1.9-2.1 范围内；至少 2 mL/ 样本）	室温 48 hr
<p>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。</p> <p>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。</p>		
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，溶解后通过移液器吹打混匀（可分装成若干份）	- 20°C
<p>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。</p>		
1X 透化试剂工作液	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 15 μL 稀释到 150 μL（至少 150 μL/ 芯片）	冰上备用 6 hr
RT Oligo	短暂离心，加入 79 μL TE buffer 重悬。盖紧盖子后最大速度涡旋 15 s，然后短暂离心	- 80°C
<p>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。</p>		
PR Rinse Buffer	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温	室温
1X 透化试剂工作液	在组织透化步骤前新鲜配制；用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 15 μL 稀释到 150 μL（至少 150 μL/ 芯片）	冰上备用 6 hr
PR Rinse Buffer (含 5% RI)	在组织透化步骤前新鲜配制；每张芯片至少准备 200 μL（190 μL PR Rinse Buffer + 10 μL RI）	冰上备用

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	37°C用于烤片和透化（热盖 42°C） 70°C用于解交联（热盖 75°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（或其他同等功能仪器）	70°C用于解交联试剂预热 37°C用于透化酶预热	-
荧光显微镜	DAPI/FITC/ TRITC/CY5 通道	可根据二抗选择不同的荧光通道
离心机	室温用于离心 Cocktail 冻干粉 提前将离心机温度调节到 4°C 4°C用于离心血清、一抗、二抗和回溶好的抗体 Cocktail	-

2.2. 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；

温度	时间	循环数
42°C热盖	on	-
37°C	5 min	1
37°C	Hold	-



⋯ 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。

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）；

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. 组织温度平衡过程，可参考 [2.5. 封闭与抗体孵育](#) 中的表格 2-1 提前配制封闭液，放于冰上备用；

f. 组织温度平衡过程，提前从 4°C 冰箱取出足量 4% PFA 溶液于离心管内平衡至室温；

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。

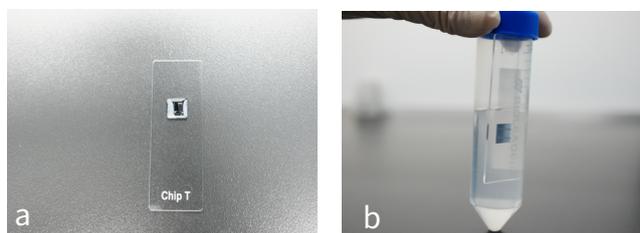
2.3. 芯片处理与组织贴片



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。

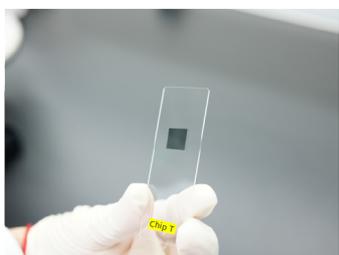
b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 μ L Nuclease-Free Water 清洗 2 次，可参考图 a（或在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中清洗 2 次可参考图 b）；



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；



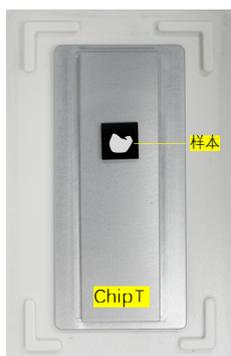
d. 如芯片表面无杂质、无明显痕迹，无任何液体残留、无波纹状纹理，即可准备贴片；



- 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）

A. 热贴

- 1) 连续切取组织切片（根据载体上的芯片数量进行调整），用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，然后将冷冻切片移到切片台右侧靠近边缘处，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) 重复步骤 2) -3) 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。



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。

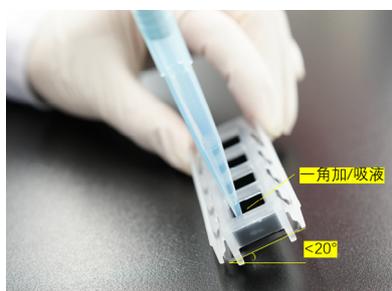
2.4. 组织固定

- 参考《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》第二章将垫圈与夹具组合成载具；
- 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。

- 将载具置于通风橱内操作，加入 4% PFA 溶液，用量为 **400 μ L/ 芯片**，撕掉封板膜上的白膜，用透明的封板膜封口，固定 **10 min**；
- 固定完成后，撕开封板膜，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；



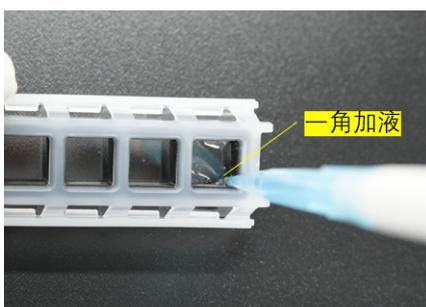
- 立即加入 Wash Buffer，用量为 400 μ L/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20° ，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer 溶液，保持芯片组织湿润；

⋯ 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。

- 重复步骤 e.-f. 一次，共计清洗 2 次。

2.5. 封闭与抗体孵育

- 此时可将载具转移至通风橱外实验桌操作，立即将已配制好的封闭液滴加到组织表面，用量为 **150 μ L/ 芯片**，室温孵育 **20 min**；



表格 2-1 封闭液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	180	198	378	558	738
10% Triton X-100	3	3.3	6.3	9.3	12.3
Blocking reagent	15	16.5	31.5	46.5	61.5
剪切鲑鱼精子 DNA	30	33	63	93	123
FcR Blocking Reagent *	15	16.5	31.5	46.5	61.5
RI	15	16.5	31.5	46.5	61.5
滤后血清	30	33	63	93	123
Nuclease-Free Water	12	13.2	25.2	37.2	49.2
Total	300	330	630	930	1230

* 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)。



1X 封闭液的量足够用于单张组织切片的组织封闭和一抗孵育液配制。

b. 封闭等待期间，根据试剂情况配制一抗孵育液。若自由组合 TotalSeq™-A 抗体，请根据实际检测蛋白数量 n，参考 [2.5. 封闭与抗体孵育](#) 中的表格 2-2 配制一抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用。若搭配 TotalSeq™-A Mouse Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 199901) 和 TotalSeq™-A Human Universal Cocktail, V1.0 (Biolegend, Cat. No. 399907) 使用，请参考 [2.5. 封闭与抗体孵育](#) 中的表格 2-3 配制一抗孵育液。

表格 2-2 一抗孵育液配制 (自由组合抗体)

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
封闭液	150-(0.6 × n)	165-(0.66 × n)	315-(1.26 × n)	465-(1.86 × n)	615-(2.46 × n)
一抗 1	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
一抗 2	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
一抗 3	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
.....
一抗 n	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
Total	150	165	315	465	615

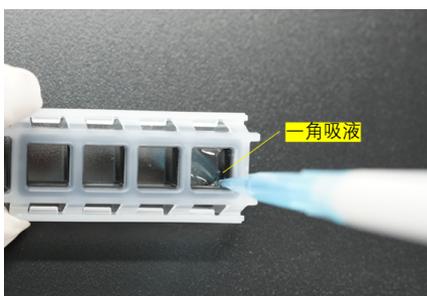


一抗 1-n 需含有对应的同型对照抗体，务必根据实验前准备，进行 TotalSeq™-A 抗体的离心；吸取 TotalSeq™-A 抗体时，尽量避免枪头直接从管底部吸取。

表格 2-3 一抗孵育液配制 (抗体 Cocktail)

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
封闭液	137.5	151.25	288.75	426.25	563.75
抗体 Cocktail 溶液	12.5	13.75	26.25	38.75	51.25
Total	150	165	315	465	615

c. 用移液器在芯片一角吸弃封闭液，保持芯片组织湿润，立即从非组织区域缓慢加入一抗孵育液，用量为 **150 μL / 芯片**，室温孵育 **45 min**；



换液过程中严格避免组织干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。建议一个孔位一个孔位进行操作。

d. 一抗孵育等待期间，参考 [2.5. 封闭与抗体孵育](#) 中的表格 2-4 配制二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上避光备用；

表格 2-4 二抗孵育液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	90	99	189	279	369
RI	7.5	8.25	15.75	23.25	30.75
二抗	0.3	0.33	0.63	0.93	1.23
Nuclease-Free Water	52.2	57.42	109.62	161.82	214.02
Total	150	165	315	465	615

二抗孵育液注意避光保存。二抗推荐使用 Thermo Fisher Scientific 公司 Alexa Fluor™ Plus 系列荧光二抗，可选择 1: 500 进行配制。若使用其他公司的荧光二抗请结合自身经验确定比例。

e. 用移液器在芯片一角吸弃一抗孵育液，保持芯片组织湿润；

f. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 200 μL / 芯片，室温孵育 **1 min**；

g. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；

h. 重复步骤 f.-g. 一次，总共清洗 2 次；

换液过程注意芯片不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

i. 从非组织区域缓慢滴加二抗孵育液，用量为 **150 μL / 芯片**，室温避光孵育 **15 min**。

2.6. DAPI 染色

准备试剂	准备流程	保存条件
50 倍稀释 DAPI	用 5X SSC 50 倍稀释 DAPI 溶液，冰上备用	4°C 避光 1 天

a. 二抗孵育等待期间，可参考 [2.6. DAPI 染色](#) 中的表格 2-5 配制 DAPI 工作液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上避光备用；

表格 2-5 DAPI 工作液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
5X SSC	90	99	189	279	369
50 倍稀释 DAPI	1.5	1.65	3.15	4.65	6.15
RI	7.5	8.25	15.75	23.25	30.75
Nuclease-Free Water	51	56.1	107.1	158.1	209.1
Total	150	165	315	465	615

b. 用移液器在芯片一角吸弃二抗孵育液，保持芯片组织湿润；

c. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 200 μ L / 芯片，室温孵育 **1 min**；

d. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；

e. 重复清洗步骤 c.-d. 一次；

 换液过程注意芯片不可干燥，若组织干燥易产生非特异性信号。

f. 从非组织区域缓慢滴加 DAPI 工作液，用量为 **150 μ L / 芯片**，室温避光孵育 **2 min**；

g. 用移液器在芯片一角吸弃 DAPI 工作液，保持芯片组织湿润；

h. 缓慢加入 Wash Buffer 清洗，用量为 200 μ L / 芯片，孵育 **1 min**；

i. 倾斜载体，用移液器从芯片一角吸弃 Wash Buffer，尽量减少液体残留；

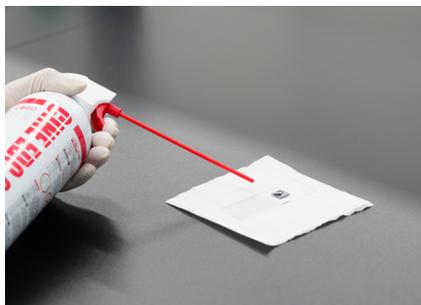
j. 重复清洗步骤 h.-i. 一次；

k. 吸弃 Wash Buffer 后，参考《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》第三章将载体从手持载具上拆卸下来，将拆卸下来的夹具放置在实验台上备用；

 拆卸时用手托住载体背面，避免载具接触芯片正面。

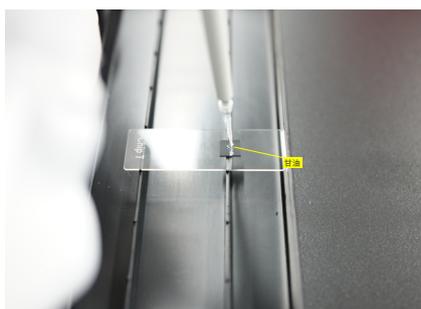


l. 将载体转移至无尘纸上，一只手固定载体，另一只手拿空气罐，在出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30° 倾角缓慢吹气。从芯片角落开始顺序推进，吹干芯片表面液体，勿使气流过猛；



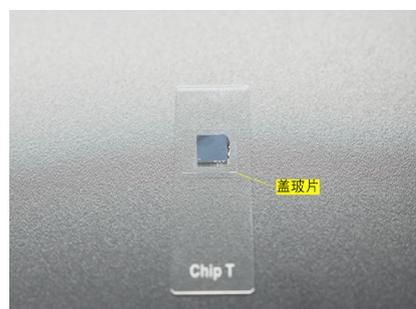
(可选操作) 使用载玻片离心机 (微型玻片离心机 LX-700) 离心 10 s 甩干芯片上液体；

m. 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；



n. 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，然后逐渐将盖玻片或爬片放低到芯片上，直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，立即安排拍照，避免荧光淬灭。

ⓘ 请保证盖玻片使用前干净无灰尘，可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。



2.7. 荧光拍照

本部分以 Motic 显微镜为例，进行拍照操作的描述。另外，本试剂套装也兼容其它品牌的显微镜，关于显微镜的具体要求，请参考《STOmics 显微镜评估手册》。其它显微镜操作可能不同，但需要保证 DAPI 通道的 Track 线清晰和各个荧光通道所获得的图像之间无串色。

拍照时，需要使用具有拼接功能的荧光显微镜拍摄荧光图像，推荐荧光配置：

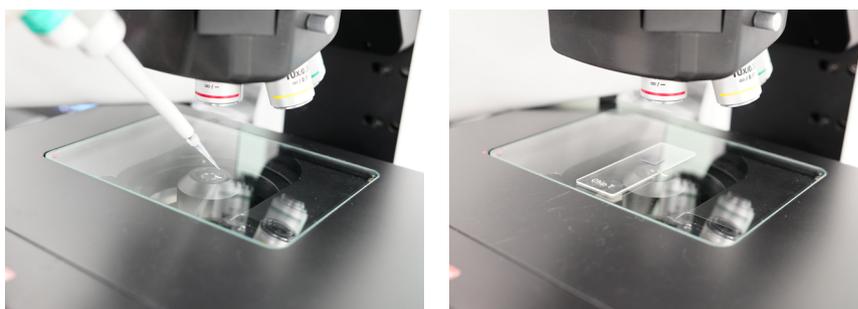
- 光源波长范围：380-680 nm
- 黑白相机 (≥ 12 bit)
- DAPI filter cube (参考：Excitation 375/28 nm, Emission 460/50 nm)
- FITC filter cube (参考：Excitation 480/30 nm, Emission 525/50 nm)
- TRITC filter cube (参考：Excitation 545/25 nm, Emission 605/70 nm)
- CY5 filter cube (参考：Excitation 620/50 nm, Emission 690/50 nm)
- 最大像元尺寸：5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$
- 曝光时间：1 ms~2 s (取决于使用抗体的特性)

a. 首先进行 DAPI 染色的拍照，在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，以芯片号（例：Y00035N1）命名，也可适当注明其他相关信息；



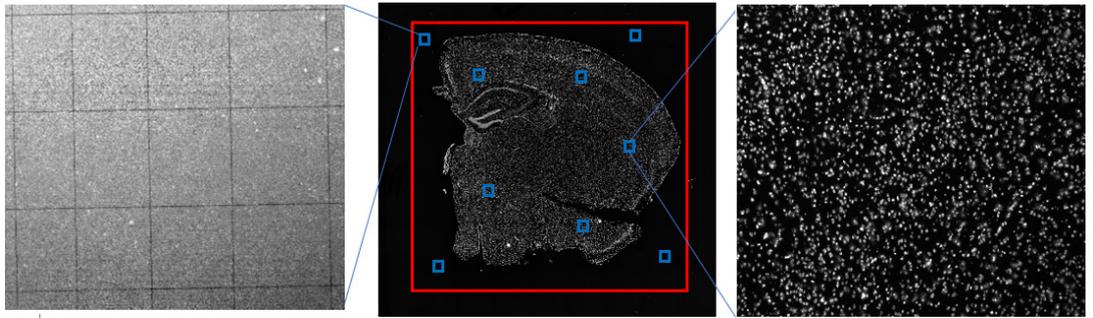
文件夹名称只使用字母、数字、下划线，禁止使用空格等特殊字符。

b. 在载物台上滴加 1-2 μL 水 ($\sim 2\mu\text{L}/\text{滴}$)，可避免载体在扫描过程中发生位移，然后小心地将芯片载体放置在载物台的水上；



c. 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；

d. 用 4 倍镜扫描完成后，切换到 10 倍镜，扫描整张芯片；如图二所示，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；



图二 . 小鼠半脑 DAPI 染色图

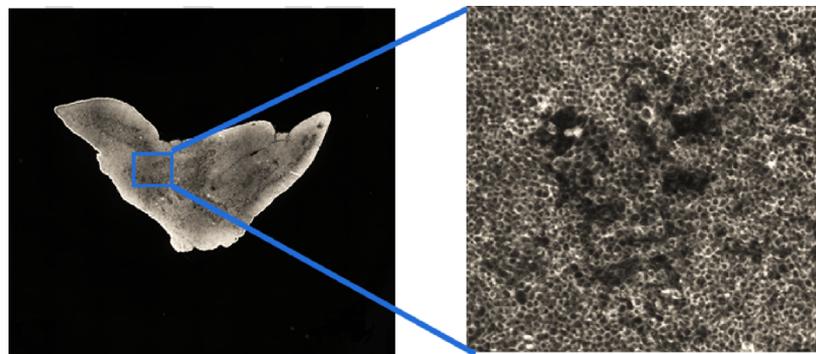
e. 待成像完成后，保存图像并保持芯片不动；

f. 接下来进行 IF 的图像拍摄，在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，以芯片号_IF 格式命名（例：Y00035N1_IF）并保存，根据二抗偶联的荧光染料选择合适的荧光通道（FITC 通道、TRITC 通道或 CY5 通道）进行下一步 IF 的拍照。保持芯片不动，不重新扫描地图，不重新添加对焦点，不改变红框选中组织区域，直接切换所选的荧光通道，随后可调节曝光直至组织内染色图像清晰，10 倍镜下扫描 IF 图片；



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。

g. 可根据此步荧光染色结果，来判断 TotalSeq™-A 一抗是否成功结合。判断标准与所加入的抗体种类有关，所获得的图像应与 IF 染色的先验知识相符。比如，以图三为例，由于加入了很多种一抗，胸腺组织基本全部都有信号（左图），具体放大来看（右图），因为投入的都是识别细胞膜的一抗，放大后能够清晰的看到细胞膜染色。证明抗体的结合没有问题；



图三 . 小鼠胸腺组织 IF 染色情况示例



二抗的染色情况可以用来判断一抗是否成功结合，不成功不建议继续后续实验。

h. 保存整个文件夹（拼接大图和小图文件夹）；

i. 打开 ImageStudio 软件内的图像 QC 模块。上传核染色图（DAPI），然后参考软件内置的 ImageStudio 用户手册来进行图像 QC；



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



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，从显微镜卸下载体芯片，暂时保持封片，进行下一步的准备。

2.8. 组织解交联

- a. 根据【实验前准备】，提前解冻 Decrosslinking Reagent 并恢复到室温；
- b. 提前将 PCR 仪的温度设置到 70°C，热盖温度为 75°C，放置 PCR 适配器平衡温度；

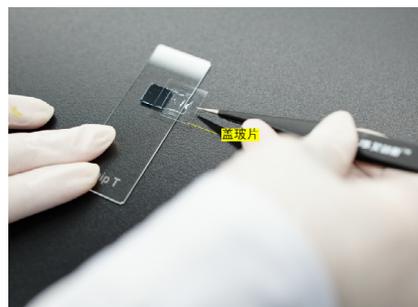
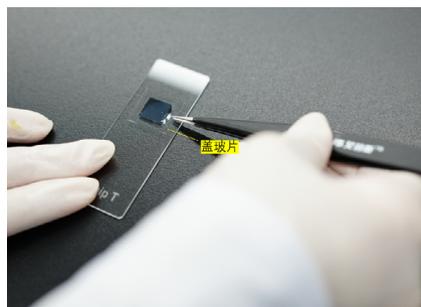
温度	时间	循环数
75°C热盖	on	-
70°C	15 min	1
70°C	Hold	-

- c. Decrosslinking Reagent 使用前置于金属浴或其他同等功能仪器中 70°C 孵育 10 min（最长不超过 30 min）；



⋯ Decrosslinking Reagent 使用多少预热多少，请勿反复预热。

- d. 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；



- e. 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；
- f. 更换新垫圈，按照《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》第二章组合成手持载具，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。

- g. 组合载具后，往芯片加入 Wash Buffer，用量为 400 μ L/ 芯片，室温孵育 1 min；
- h. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，保持芯片组织湿润；
- i. 重复清洗步骤 g.-h. 一次；
- j. 清洗结束后，往带芯片的孔内加入 Decrosslinking Reagent，用量为 400 μ L/ 芯片，用封板膜封口，放置于 PCR 仪（70°C）的 PCR 适配器上，关闭 PCR 仪模块盖子，70°C 解交联 15 min；
- k. 解交联期间，参考 [2.9. 组织透化](#) 中的表格 2-6，提前配制好 1X 透化试剂工作液；

并将 PCR 仪的温度设置到 37°C，热盖温度设置为 42°C，放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
42°C热盖	on	-
37°C	根据实际时间设定	1
37°C	Hold	-
42°C	3-16 hr	1
42°C	Hold	-

l. 透化工作液使用前置于金属浴或其他同等功能仪器中 37°C 孵育 **10 min**（最长时
间不超过 **30 min**）；

m. 解交联结束之后，将手持载具转移到实验桌面上，取下封板膜并丢弃，室温缓慢
降温 **10 min**。

2.9. 组织透化

表格 2-6 1X 透化试剂工作液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
0.01N HCl	135	148.5	283.5	418.5	553.5
10X 透化试剂储存液	15	16.5	31.5	46.5	61.5
Total	150	165	315	465	615

- 提前解冻 RT Reagent, RT Additive 和 RT Oligo，RT Oligo 解冻后冰上放置备用；
- 降温结束后，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
弃解交联试剂，保持芯片组织湿润，往芯片加入 Wash Buffer，用量为 400 μ L/
芯片；
- 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 Wash Buffer，
保持芯片组织湿润；
- 往芯片四角加入平衡好的 1X 透化试剂工作液，用量为 **150 μ L/ 芯片**，使透化工
作液均匀覆盖芯片；
- 用新的封板膜（撕掉封板膜上的白膜）对手持载具进行封口，放置于 PCR 仪（37°C）
的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖子。37°C 下进行透化反应（透化时间根据实际情
况调整）；



最佳透化时间通过透化测试实验预先确定，操作步骤参考 Stereo-seq 透化试剂套装（载体兼容蛋白组）使用说明书。



透化结束后，请勿将手持载具从 PCR 仪（37°C）中取出。透化到 RT 期间均在 PCR 仪中操作，期间不移动载具。

f. 在等待透化期间，参考 [2.10. 反转录反应](#) 中的表格 2-7 提前配制 RT Mix，混匀后瞬时离心，放置于冰上备用，使用前需提前置于室温平衡 **5 min**。并根据【实验前准备】，提前配制 PR Rinse Buffer 溶液放置于冰上备用；

表格 2-7 RT Mix 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
RT Reagent	160	176	336	496	656
RT Additive	10	11	21	31	41
RI	10	11	21	31	41
RT Oligo	10	11	21	31	41
ReverseT Enzyme	10	11	21	31	41
Total	200	220	420	620	820

g. 在 PCR 仪上撕开封板膜，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弃透化试剂，避免接触芯片正面；



撕开封板膜时不能按压夹具卡扣两侧上部，避免载体松落。

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

i. 微微倾斜手持载具，倾斜角度小于 20°，用移液器在芯片一角吸弃 PR Rinse Buffer 溶液，保持芯片组织湿润。



步骤 i 结束之后应立即加入 RT Mix，以避免 RNA 降解，加液方法及试剂用量参考 [2.10. 反转录反应](#) 步骤 a。

2.10. 反转录反应

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

b. 使用封板膜密封载具，盖上 PCR 仪盖子，按照 [2.8. 组织解交联](#) 步骤 a 中设定的程序进行反应，反应 **3 hr** 或以上，最长不超过 **16 hr**。

2.11. 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

a. 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；

温度	时间	循环数
60°C 热盖	on	-
55°C	20 min	1
55°C	Hold	-

b. 反转录反应结束后，将手持载具从 PCR 仪（42°C）中取出；

c. 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；

d. 加入 TR Buffer，用量为 **400 μL / 芯片**，使用封板膜密封载具，将手持载具放置于 PCR 仪（55°C）的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，按照 [2.11. 组织去除](#) 步骤 a 中设定的程序进行反应，反应时间为 **20 min**。

2.12. cDNA&ADT 释放与回收

a. 组织移除过程中，可按照参考 [2.12. cDNA&ADT 释放与回收](#) 中的表格 2-8 提前配制 cDNA Release Mix，室温放置；

表格 2-8 cDNA Release Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
cDNA Release Enzyme	20	22	42	62	82
cDNA Release Buffer	380	418	798	1178	1558
Total	400	440	840	1240	1640



b. 组织移除完成后，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；

... 如组织移除不干净，加入 400 μL 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 试剂；如吸打后仍未移除干净，直接进行后续流程。

c. 立即加入 cDNA Release Mix，用量为 400 μL / 芯片；

d. 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，放置于 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：

- cDNA 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。

e. 反应结束后，将反应孔内液体完全回收至新的 1.5 mL 离心管内；

f. 加入 Nuclease-Free Water 清洗反应孔内芯片，用量为 100 μL / 芯片，并收集到步骤 e. 同一个 1.5 mL 离心管内。

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

2.13. 磁珠操作注意事项

背景信息

本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme, Cat. No. N411-02) 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

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

磁珠操作注意事项

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



- 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留 2-3 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 $\sim 2 \mu\text{L}$ 。



- 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。



2.14. 转录组 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；提前准备新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇；
- b. 转录组 1.0X 磁珠 cDNA 纯化步骤；
 - 1) 将上一步回收液（450-490 μL ）与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合加入 1.5 mL 离心管内，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，用移液器小心转移上清至另一 2.0 mL 离心管内。**此部分包含 ADT 产物，可暂时存于室温，参考步骤 2.16 进行 ADT 产物纯化；**
 - 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；
 - 5) 重复步骤 4) 一次；
 - 6) 将 1.5 mL 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 μL 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 μL cDNA）转移至新的 0.2 mL PCR 管中；
 - 9) 再将 22 μL 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 μL cDNA）转移至步骤 8) 的 PCR 管中，合并总体积 ~42 μL 。
- c. 如果上述回收样品不足 42 μL ，用 Nuclease-Free Water 补足。



 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）。



 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。

2.15. 转录组 cDNA 扩增



a. 按照 [2.15. 转录组 cDNA 扩增](#) 中的表格 2-9 配制 cDNA PCR Mix, 共 100 μL ;

表格 2-9 cDNA PCR Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
cDNA Amplification Mix	50	55	105	155	205
cDNA Primer	8	8.8	16.8	24.8	32.8
回收 cDNA 样本	42	46.2	88.2	130.2	172.2
Total	100	110	210	310	410

b. 瞬时离心, 按照 [2.15. 转录组 cDNA 扩增](#) 中的表格 2-10 转录组 cDNA PCR 扩增程序进行扩增;

表格 2-10 转录组 cDNA 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	15
58°C	20 s	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
12°C	Hold	-



转录组 cDNA PCR 等待过程中可参考步骤 2.16 和 2.17 进行抗体衍生标签 (ADT) 文库纯化与扩增。

c. 按照 [2.15. 转录组 cDNA 扩增](#) 中的表格 2-11 准备 Qubit dsDNA Mix;

表格 2-11 Qubit dsDNA Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	198	217.8	415.8	613.8	811.8
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1	1.1	2.1	3.1	4.1
Total	199	218.9	417.9	616.9	815.9

d. 取 1 μL PCR 产物加入 199 μL Qubit dsDNA Mix 中。震荡混匀后用 Qubit 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. 对转录组 cDNA PCR 产物进行 1X 磁珠纯化:

- 1) 将 cDNA PCR 产物 (100 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 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 μ L 80% 乙醇漂洗 (新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇)。通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**, 小心吸取并丢弃上清。**移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作, 请勿吸打、搅动磁珠**;
- 4) 重复步骤 3) 一次;
- 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 μ L 的 TE Buffer 回溶, 震荡混匀后室温静置 **5 min**, 瞬时离心, 磁力架静置 **3-5 min**, 待液体澄清后将上清 (~40 μ 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。



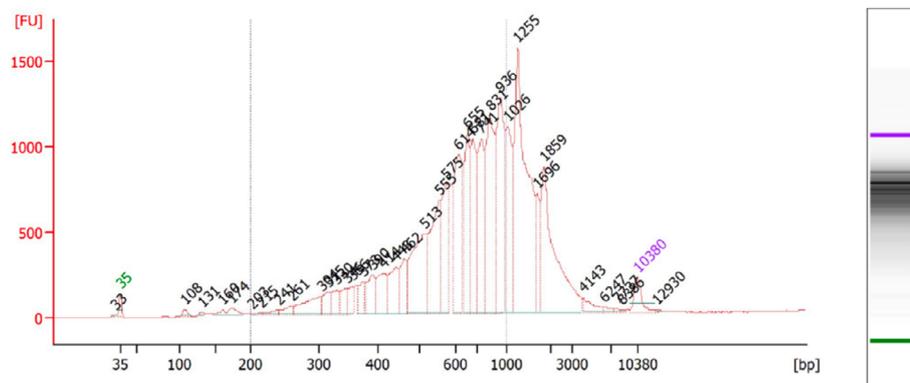
- 
- 纯化后, 可用 40
- μ
- L Nuclease-free Water 在
- 4°C
- 保存磁珠, 直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

f. 取 1 μ L 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 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。



- 
- 要求主峰片段分布在 500-1200 bp (如图四), 纯化后产量通常大于 20 ng。**



2.16. 抗体衍生标签 (ADT) 产物纯化

- a. 提前 **30 min** 取出磁珠，平衡至室温；提前准备新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇；
- b. ADT 产物 2.0X 磁珠纯化步骤
 - 1) 在 4.14 步骤 2.0 mL 离心管内上清中，加入额外的 500 μL 室温平衡好的磁珠混合，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 **5 min**；
 - 3) 待液体澄清后，用移液器小心去除上清；
 - 4) 将 2.0 mL 离心管保持在磁力架上，加入 1.5 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；
 - 5) 重复步骤 4) 一次；
 - 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 μL 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 μL cDNA) 转移到新的 0.2 mL PCR 管中；
 - 9) 再将 22 μL Nuclease-Free Water 加入步骤 7) 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 μL cDNA) 转移至步骤 8) 所示的 PCR 管中，合并总体积 ~42 μL 。
- c. 如果上述回收样品不足 42 μL ，用 Nuclease-Free Water 补足。



 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% 乙醇清洗并将液体加回离心管。

2.17. 抗体衍生标签 (ADT) 产物扩增

- a. 按照 [2.17. 抗体衍生标签 \(ADT\) 产物扩增](#) 中的表格 2-12 配制 ADT PCR Mix，共 100 μL ；

表格 2-12 ADT PCR Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
ADT Amplification Mix	50	55	105	155	205
ADT Primer Mix	8	8.8	16.8	24.8	32.8
回收样本	42	46.2	88.2	130.2	172.2
Total	100	110	210	310	410

b. 瞬时离心，按照 [2.17. 抗体衍生标签 \(ADT\) 产物扩增](#) 中的表格 2-13 ADT PCR 扩增程序进行扩增；

表格 2-13 ADT 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	18
58°C	20 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
12°C	Hold	-

c. 按照 [2.17. 抗体衍生标签 \(ADT\) 产物扩增](#) 中的表格 2-14 准备 Qubit dsDNA Mix 测定 PCR 产物浓度并记录；

表格 2-14 Qubit dsDNA Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	198	217.8	415.8	613.8	811.8
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1	1.1	2.1	3.1	4.1
Total	199	218.9	417.9	616.9	815.9

d. 取 1 μL PCR 产物加入 199 μL Qubit dsDNA Mix 中。震荡混匀后用 Qubit 检测浓度并记录；

QC DNA 浓度通常高于 5 ng/ μL 。

e. 对 ADT PCR 扩增产物进行 2.0 X 磁珠纯化：

- 1) 将 ADT 扩增 PCR 产物 (100 μL) 转移到新的 1.5 mL 离心管中，再与室温平衡好的磁珠按照 1: 2 混合，震荡混匀，室温孵育 **10 min**；
- 2) 瞬时离心后，将 PCR 管放在磁力架上静置 **5 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 300 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) 重复步骤 3) 一次；
- 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 (~40 μL) 转移到新的 1.5 mL 离心管中。

— 停止点：

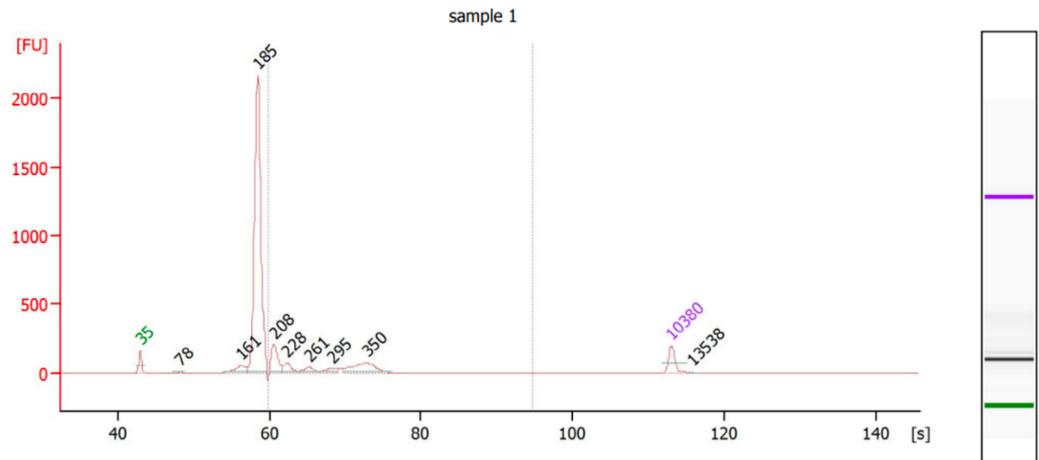
- ADT 扩增产物可在 -20°C 下保存 1 个月。



- f. 取 1 μL ADT 扩增产物，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 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 要求片段分布在 170-220 bp (如图五)，浓度通常大于 10 ng/ μL 。



图五 . ADT 文库纯化产物 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 试剂配制总览表

表格 2-1 封闭液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	180	198	378	558	738
10% Triton X-100	3	3.3	6.3	9.3	12.3
Blocking reagent	15	16.5	31.5	46.5	61.5
剪切鲑鱼精子 DNA	30	33	63	93	123
FcR Blocking Reagent *	15	16.5	31.5	46.5	61.5
RI	15	16.5	31.5	46.5	61.5
滤后血清	30	33	63	93	123
Nuclease-Free Water	12	13.2	25.2	37.2	49.2
Total	300	330	630	930	1230

表格 2-2 一抗孵育液配制 (自由组合抗体)

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
封闭液	150-(0.6 \times n)	165-(0.66 \times n)	315-(1.26 \times n)	465-(1.86 \times n)	615-(2.46 \times n)
一抗 1	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
一抗 2	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
一抗 3	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
.....
一抗 n	0.6	0.66	1.26	1.86	2.46
Total	150	165	315	465	615

表格 2-3 一抗孵育液配制 (抗体 Cocktail)

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
封闭液	137.5	151.25	288.75	426.25	563.75
抗体 Cocktail 溶液	12.5	13.75	26.25	38.75	51.25
Total	150	165	315	465	615

表格 2-4 二抗孵育液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	90	99	189	279	369
RI	7.5	8.25	15.75	23.25	30.75
二抗	0.3	0.33	0.63	0.93	1.23
Nuclease-Free Water	52.2	57.42	109.62	161.82	214.02
Total	150	165	315	465	615

表格 2-5 DAPI 工作液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	90	99	189	279	369
50 倍稀释 DAPI	1.5	1.65	3.15	4.65	6.15
RI	7.5	8.25	15.75	23.25	30.75
Nuclease-Free Water	51	56.1	107.1	158.1	209.1
Total	150	165	315	465	615

表格 2-6 1X 透化试剂工作液配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
0.01N HCl	135	148.5	283.5	418.5	553.5
10X 透化试剂储存液	15	16.5	31.5	46.5	61.5
Total	150	165	315	465	615

表格 2-7 RT Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
RT Reagent	160	176	336	496	656
RT Additive	10	11	21	31	41
RI	10	11	21	31	41
RT Oligo	10	11	21	31	41
ReverseT Enzyme	10	11	21	31	41
Total	200	220	420	620	820

表格 2-8 cDNA Release Mix 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
cDNA Release Enzyme	20	22	42	62	82
cDNA Release Buffer	380	418	798	1178	1558
Total	400	440	840	1240	1640

表格 2-9 cDNA PCR Mix 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
cDNA Amplification Mix	50	55	105	155	205
cDNA Primer	8	8.8	16.8	24.8	32.8
回收 cDNA 样本	42	46.2	88.2	130.2	172.2
Total	100	110	210	310	410

表格 2-11 Qubit dsDNA Mix 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	198	217.8	415.8	613.8	811.8
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1	1.1	2.1	3.1	4.1
Total	199	218.9	417.9	616.9	815.9

表格 2-12 ADT PCR Mix

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
ADT Amplification Mix	50	55	105	155	205
ADT Primer Mix	8	8.8	16.8	24.8	32.8
回收样本	42	46.2	88.2	130.2	172.2
Total	100	110	210	310	410

表格 2-14 Qubit dsDNA Mix 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	198	217.8	415.8	613.8	811.8
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1	1.1	2.1	3.1	4.1
Total	199	218.9	417.9	616.9	815.9