

Stereo-seq 定制化芯片透化试剂套装 ($\leq 2\text{cm} \times 3\text{cm}$) 使用说明书

试剂套装货号及名称:

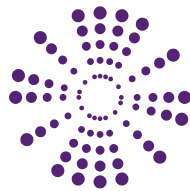
101SP124 (4 RXNs) Stereo-seq 透化试剂套装 (1cm*2cm)

101SP224 (4 RXNs) Stereo-seq 透化试剂套装 (2cm*2cm)

101SP234 (4 RXNs) Stereo-seq 透化试剂套装 (2cm*3cm)

试剂盒版本号: V1.0

说明书版本号: B



版本历史

说明书版本: A
试剂盒版本: V1.0
修订日期: 2023年6月
修订内容摘要: 首次发布

说明书版本: B
试剂盒版本: V1.0
修订日期: 2023年11月
修订内容摘要:

- 试剂盒和芯片运输变更为冷链运输;
- 增加样本处理视频参考网址;
- 修改金属包埋盒 A 和 B 的尺寸选择;
- 删除组织移除结束后的 " 将芯片从 PCR 仪内取出 ";
- 修改拍照前放置芯片的培养皿规格;
- 格式勘误;

提示: 请下载最新版说明书, 与相应版本的试剂盒配套使用。

© 法律声明。

2023 深圳华大生命科学研究院保留所有权利。

1. 本产品仅用于研究, 不用于诊断。
2. 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。
3. 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)。
4. 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 HRS**

目录



第一章 产品介绍	01
1.1 产品描述	02
1.2 试剂套装组成	02
1.3 需自备物料清单	03
1.4 注意事项	04
第二章 样本准备	05
2.1 包埋说明	06
2.2 样本准备	06
2.3 样本要求	06
2.3.1 样本类型	06
2.3.2 样本包埋组织 RNA 完整值 RIN	06
2.4 样本包埋	07
2.5 样本的保存和运输	10
第三章 STOmics® Stereo-seq 定制化芯片透化试剂套装标准 操作流程	
3.1 实验前准备	12
3.2 切片准备	13
3.3 芯片处理与组织贴片	13
3.4 组织固定	14
3.5 透化时间测试	14
3.6 反转录反应	15
3.7 组织去除	16
3.8 荧光拍照	18
3.9 组织透化判断	18



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



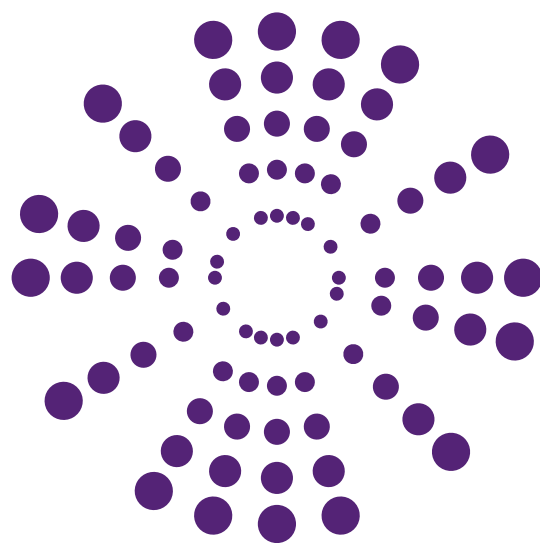
注意： 特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。



停止点： 您可以在此暂停实验并存储样品。

01

产品介绍



1.1 产品描述

STOmics® Stereo-seq 定制化芯片透化试剂套装是用于摸索组织透化时间的预实验试剂盒套装。本试剂套装采用的 Stereo-seq 时空转录组技术，是一种基于 DNBSEQ 高通量测序技术开发的、具有高分辨大视场的原位全转录组信息捕获技术。Stereo-seq 芯片 P (透化测试芯片) 上载有核苷酸捕获探针，探针与组织切片结合后，在芯片上原位抓取组织内的 mRNA 分子，再利用带有荧光标记的核苷酸进行 cDNA 合成后，通过荧光成像可以清晰判断实验条件是否适宜，快速选择最佳的透化时间。

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 试剂套装组成

每个试剂套装由以下两个部分组成：

- Stereo-seq 透化试剂盒 * 1 (4 RXN)
- Stereo-seq 芯片 P (1 cm * 2 cm) * 2 (2 EA) 或者 Stereo-seq 芯片 P (2 cm * 2 cm) * 2 (2 EA) 或者 Stereo-seq 芯片 P (2 cm * 3 cm) * 2 (2 EA)

关于产品货号、试剂组分等信息进一步信息见表格 1-1 与表格 1-2。



收到 Stereo-seq 芯片后，请参照《Stereo-seq 定制化芯片保存操作指南》对产品进行正确地保存。

<https://www.stomics.tech/resources/Documents/list>

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

试剂盒种类	组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Stereo-seq 透化试剂盒 货号：101KP004	RI	1000028499	●	300 μL × 2
	PR Enzyme	1000028500	●	10 mg × 1
	RT QC Reagent	1000035168	●	3900 μL × 1
	RT Additive	1000035169	○ (透明)	250 μL × 1
	RT QC Enzyme	1000035260	○ (透明)	250 μL × 1
	TR Enzyme	1000035261	●	350 μL × 1
	TR Buffer	1000039987	○ (透明)	3458 μL × 5
储存温度：-25°C ~ -18°C		冷链运输		有效期：见标签

表格1-2

试剂盒种类	组分信息	规格及数量
Stereo-seq 芯片 P (1 cm * 2 cm) 货号: 100CP122	Stereo-seq 芯片 P (1 cm * 2 cm)	2 EA × 2
Stereo-seq 芯片 P (2 cm * 2 cm) 货号: 100CP222	Stereo-seq 芯片 P (2 cm * 2 cm)	2 EA × 2
Stereo-seq 芯片 P (2 cm * 3 cm) 货号: 100CP232	Stereo-seq 芯片 P (2 cm * 3 cm)	2 EA × 2


储存温度: -25°C ~ 8°C


冷链运输


有效期: 见标签

1.3 需自备物料清单

此清单列出了本实验所需的设备和物料。表格 1-3 不包括标准实验室设备, 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》。

表格 1-3 客户自备物料清单推荐

仪器	
冰冻切片机	漩涡混匀仪
小型离心机	恒温培养箱
移液器	烤片机
荧光显微镜 (拼接功能)	
PCR 仪 (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad*; ProFlex 3 x 32-well PCR System, ABI*)	



可从所列品牌中任选一个 (带 * 标记) 使用。

试剂
Nuclease Free Water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
20X SSC (AMBION, AM9770)
甲醇 (SIGMA, 34860-1L-R)
盐酸 (SIGMA, 2104-50ML)
SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound (SAKURA, 4583)

耗材	
1.5 mL、15 mL、50 mL 离心管	锡箔纸
Kimwipes 无尘纸 (Kimtech, 34155)	镊子
Power Dust remover (空气罐) (MATIN, M-6318)	封板膜
10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL 带滤芯吸头	封口膜
一次性培养皿 (6 cm) (赛默飞, 150462)	保鲜膜
细胞培养板 (6 孔板) (CORNING, 3516)	一次性培养皿 (9 cm)
铁氟龙镊子 (JONOSTICK, 815F-ST)	

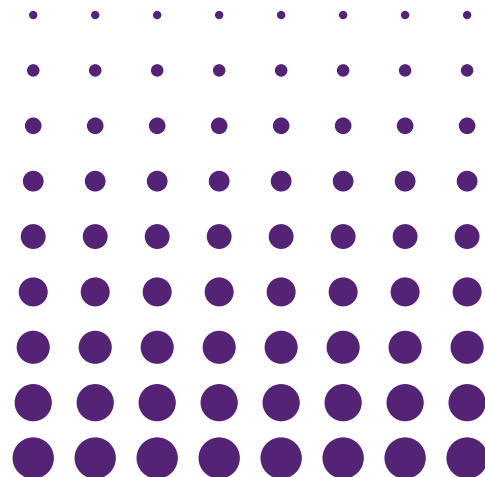
1.4 注意事项

- ◆ 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。
- ◆ 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。

02

样本准备

定制化大芯片样本包埋建议



2.1 包埋说明

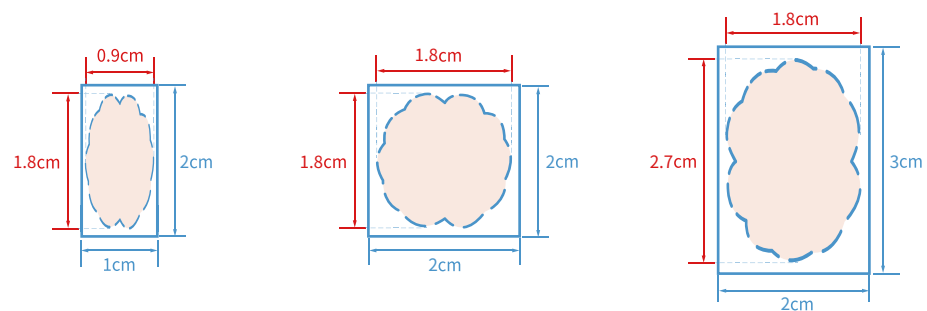
此包埋方式适用于尺寸 $< 2\text{cm} \times 3\text{cm} \times 0.7\text{cm}$ 的组织。

2.2 样本准备



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 $0.9\text{cm} \times 1.8\text{cm} \times 0.7\text{cm}$ (Stereo-seq 芯片 $1\text{cm} \times 2\text{cm}$)， $1.8\text{cm} \times 1.8\text{cm} \times 0.7\text{cm}$ (Stereo-seq 芯片 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$)， $1.8\text{cm} \times 2.7\text{cm} \times 0.7\text{cm}$ (Stereo-seq 芯片 $2\text{cm} \times 3\text{cm}$)，组织切片占芯片面积不应超过 80%。



- 同一样本进行多个实验（质检、透化、建库），每步重新封存后进行下次实验时总量会有大约 10 张切片的损耗；
- 在样本制备时，除考虑自身项目需求外，需要考虑样本 Z 轴是否可满足消耗量需要。

2.3 样本要求

2.3.1 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》。

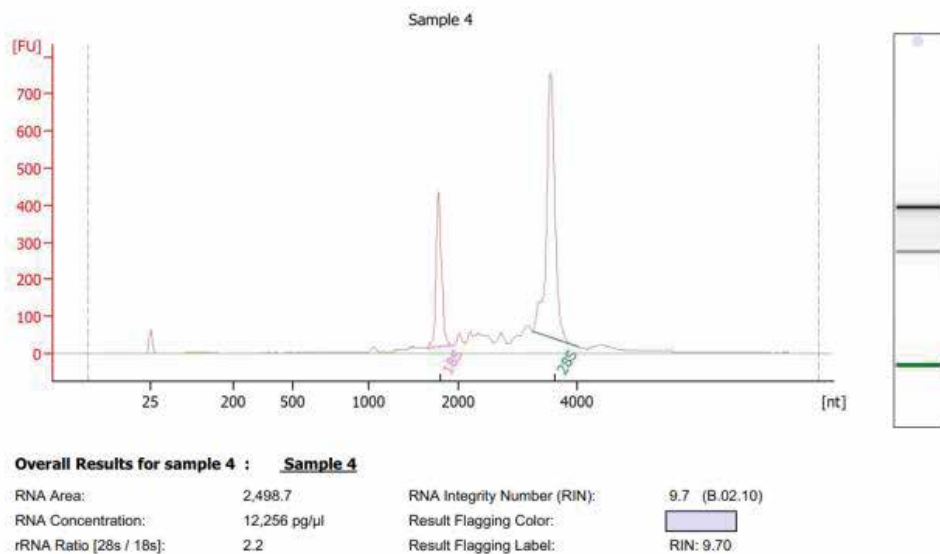
<https://www.stomics.tech/resources/Documents/list.html>

2.3.2 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 $10\ \mu\text{m}$ 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。



QC 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

2.4 样本包埋

样本处理视频参考网址:

https://www.bilibili.com/video/BV1pG411j7Qi/?share_source=copy_web&vd_source=7ab9a931fcec35988b8b9f18f8f170

<https://www.stomics.tech/col113/701>

a. 样本包埋所需耗材或试剂列表格

*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。

名称	推荐品牌/名称/货号	规格	数量
碎冰	/	泡沫箱	1
干冰	/	泡沫箱	1
锡箔纸	/	卷	1
自封袋	/	个	1
金属块	BIOSHARP/BC032	块	1
无菌无纺布	/	张	2
平皿	/	个	1
OCT	Sakura/Base Molds/ 4583	瓶	1
金属包埋盒 A	4132/4133 或其他品牌合适尺寸的包埋盒	个 (按组织大小决定)	1
金属包埋盒 B	Sakura/Base Molds/4133/41565/4124 或其他品牌合适尺寸的包埋盒	个(尺寸略大于金属包埋盒A)	1
钝头镊子	/	支	1
注射器	/	支	1
药匙或抹刀	/	个	1
剪刀	/	把	1
钢尺	/	把	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适量合适大小的**金属包埋盒 A** 和 **B**;
- 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. 将钢尺和**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;



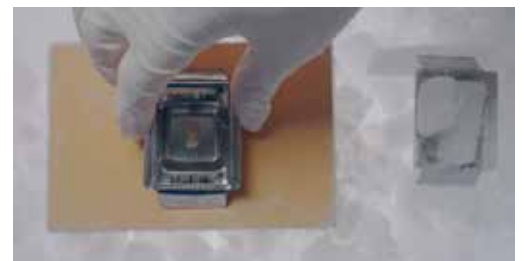
c. 将组织放入在冰上预冷的 OCT 中, 在不产生气泡的前提下用药匙使组织被 OCT 包裹 (可使用注射器吸弃产生的气泡);



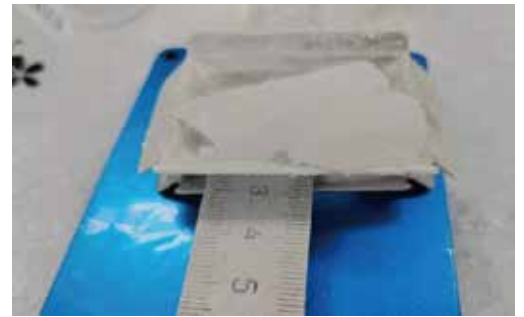
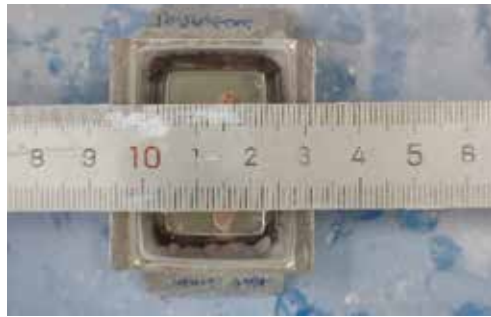
d. 将组织的拟切面朝下, 放入冰上预冷的 **金属包埋盒 A** 中 (根据组织大小选择 **包埋盒 A** 的尺寸), 使组织接触到 **金属包埋盒 A** 的底部。在不产生气泡的前提下用预冷的 OCT 填满 **金属包埋盒 A**, 直至将组织完全覆盖 (可使用注射器吸弃产生的气泡);



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. 先将预冷的钢尺放在 **金属包埋盒 A** 的长高边上 (防止组织被压变形), 然后将 **金属包埋盒 B** 开口向上, 轻轻加盖于装有组织块的 **金属包埋盒 A** 的上方, 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;



g. 冷冻 5 min 后, 移去**金属包埋盒 B** 和钢尺, 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。

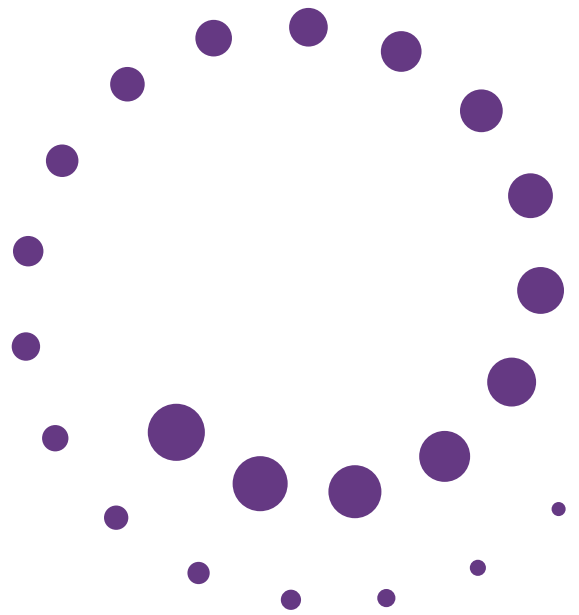


2.5 样本的保存和运输

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。

03

STOmics[®] Stereo-seq 定制化芯片透化试剂套装 标准操作流程



3.1 实验前准备



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

准备试剂	1 * 2 芯片 准备流程	2 * 2 芯片 准备流程	2 * 3 芯片 准备流程	储存
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μL 稀释到 20 mL	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	常温
wash buffer	取 7.5 μL RI 加入 142.5 μL 0.1X SSC 中，用量至少为 150 μL / 芯片	取 15 μL RI 加入 285 μL 0.1X SSC 中，用量至少为 300 μL / 芯片	取 20 μL RI 加入 380 μL 0.1X SSC 中，用量至少为 400 μL / 芯片	冰上 备用
0.01 N HCl ^{△1}	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 3 mL / 样本）	同 1*2 芯片	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 5 mL / 样本）	室温 48 hr ^{△2}
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）	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	-20°C
1X 透化试剂工作液	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 25 μL 稀释到 250 μL（至少 200 μL / 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 45 μL 稀释到 450 μL（至少 400 μL / 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 85 μL 稀释到 850 μL（至少 800 μL / 芯片）	冰上 备用 6 hr



¹ 0.01N HCl 需现配现用。对于预制的 0.1N HCl 和新购买的 HCl，实验前请检查 pH 值。



² 0.01N HCl 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。

显微镜准备

仪器	设定	备注
荧光显微镜	TRITC 通道	-

其他准备

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
芯片清洗	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿
放置芯片	9 cm 培养皿 (贴有封口膜)	9 cm 培养皿 (贴有封口膜)	9 cm 培养皿 (贴有封口膜)
甲醇固定	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿
组织移除	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿

3.2 切片准备



- a. 提前将烤片机温度调节到 37°C;
- b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20°C, 样本头预冷至 -15°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至适合温度;



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

- e. 将组织块修剪成合适的尺寸 (1 cm * 2 cm 芯片切面小于 0.9 cm × 1.8 cm、2 cm * 2 cm 芯片切面小于 1.8 cm × 1.8 cm、2 cm * 3 cm 芯片切面小于 1.8 cm × 2.7 cm), 切去组织块周围过多的 OCT, 保留一部分 OCT, 方便转移组织;
- f. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上;
- g. 根据需要对组织块做最后地修剪, 以确保组织切片能更好地适配芯片, 随后可进行冷冻切片。

3.3 芯片处理与组织贴片



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

⋯ 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. 将芯片置于 9 cm 培养皿 (底部铺有封口膜) 中复温 **1 min**, 观察芯片表面是否有杂质, 如芯片上存在杂质, 1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片在六孔板中使用 3000 μL Nuclease Free Water 清洗 2 次 (2 cm * 3 cm 大芯片在 6 cm 培养皿中使用 4000 μL Nuclease Free Water 清洗 2 次), 清洗后气瓶吹干芯片四周及表面; 如芯片表面无杂质、无明显痕迹, 无任何液体残留、无波纹状纹理, 即可准备贴片;
- c. 预冷甲醇: 1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片在六孔板中加入 2-4 mL 甲醇, 2 cm * 3 cm 芯片在 6 cm 培养皿中加入 3-5 mL 甲醇, 确保甲醇能将芯片完全覆盖, 预冷 (-20°C) 时间 **5-30 min**;
- d. 将组织包埋块固定至冻头上, 修片;
- e. 组织贴片有两种操作方式可选: 热贴 (A) 和冷贴 (B)。

A. 热贴

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

表格 3-1 各尺寸大芯片烤片时间

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

B. 冷贴

1) 将芯片正面朝上置于切片机中, 预冷 **3-10 min**;

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

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



3.4 组织固定

- 将上一步烤干的芯片立即放于 -20°C 下预冷的甲醇中固定 **40 min**, 确保甲醇浸没过所有芯片;
- 固定好后, 将 6 孔板 /6 cm 培养皿转移到通风橱中;
- 将芯片从 6 孔板 /6 cm 培养皿中取出, 用无尘纸吸干芯片背面和周围多余的甲醇,;
- 将芯片放于贴有封口膜的 9 cm 培养皿中, 在通风柜中通风 **4-6 min**, 让甲醇充分挥发;
- 甲醇挥发干后, 肉眼可见组织变白, 将芯片转移至实验桌上。

3.5 透化时间测试

- 根据【实验前准备】, 提前配制 0.01N HCl, 准备好 1X 透化试剂工作液, 各尺寸所需透化工作液的量如表格 3-2 (若每张芯片切片时间间隔较长, 建议按照流程单张透化);

表格 3-2 各尺寸大芯片透化工作液加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
1X 透化工作液加液量	200 μL /一张芯片	400 μL /一张芯片	800 μL /一张芯片

- 透化工作液使用前 37°C 恒温培养箱孵育 **10 min**;
- 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** 及阳性对照 * 等 5 个组进行测试。透化时间最长的芯片先添加透化试剂, 从芯片四角加液, 每隔一定时间 (如 **6 min**), 依次加入透化试剂;

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

⋯ 透化时可提前配制 RT QC Mix, 用铝箔纸包裹避光, 冰上放置。

- 将芯片从 37°C 恒温培养箱取出;
- 微微倾斜芯片, 用移液器从芯片的一角吸掉透化试剂;
- 加入 wash buffer, 用量如表格 3-3;



表格 3-3 各尺寸大芯片清洗溶液加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
wash buffer	150 μL/一张芯片	300 μL/一张芯片	400 μL/一张芯片

- g. 微微倾斜芯片，用移液器从芯片一角吸掉芯片上表面溶液；
- h. 立即加入 RT QC Mix，以避免 RNA 降解。

Total RNA 阳性对照操作方法

- a. 按照表格 3-4 配制 Total RNA 杂交 Mix；

表格 3-4 Total RNA 杂交 Mix

组分	1 * 2 芯片/ 单个反应体积	2 * 2 芯片/ 单个反应体积	2 * 3 芯片/ 单个反应体积
Total RNA	X μL	X μL	X μL
RI	7.5 μL	15 μL	20 μL
20X SSC	37.5 μL	75 μL	100 μL
NF water	105-X μL	210-X μL	280-X μL
Total	150 μL	300 μL	400 μL

- b. 根据芯片尺寸，往芯片表面滴加表格 3-4 中对应体积的 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。

- c. 微微倾斜芯片，用移液器从芯片一角吸掉 Total RNA 杂交 Mix；
- d. 加入 wash buffer 溶液，加液量为表格 3-3 所示；
- e. 微微倾斜芯片，用移液器从芯片一角吸掉芯片表面液体；
- f. 立即加入 RT QC Mix，以避免 RNA 降解。

3.6 反转录反应

- a. RT QC Reagent、RT Additive 和 RT QC Enzyme 在冰上提前解冻；
- b. 按照表格 3-5 配制 RT QC Mix，平衡至室温（避光）；

表格 3-5 RT QC Mix

组分	1 * 2 芯片/ 单个反应体积	2 * 2 芯片/ 单个反应体积	2 * 3 芯片/ 单个反应体积
RT QC Reagent	144.5 μL	272 μL	357 μL
RT Additive	8.5 μL	16 μL	21 μL
RT QC Enzyme	8.5 μL	16 μL	21 μL
RI	8.5 μL	16 μL	21 μL
Total	170 μL	320 μL	420 μL
加液量/单个反应体积	150 μL	300 μL	400 μL

c. 根据芯片尺寸，往芯片轻柔地加入表格 3-5 所对应量的 RT QC Mix，从芯片四角缓慢加入 RT QC Mix，确保 RT QC Mix 均匀覆盖全部芯片，将放有芯片的培养皿封口膜封口，42℃ 温箱内孵育 **1 hr** (也可反应更长时间，但不能超过 **16 hr**)。

3.7 组织去除

表格 3-6 组织去除前试剂准备

准备试剂	准备流程	储存
TR Buffer	提前取出放于 55℃ 5 min 溶解沉淀，再恢复至室温	室温



⋯ 如果观察到 buffer 中有白色沉淀析出，可放于 55℃ 溶解，再恢复至室温。

- 将芯片从 42℃ 温箱中取出；
- 微微倾斜芯片，用移液器吸弃芯片表面的 RT QC Mix；
- 加入 0.1X SSC 溶液 (用量参考表格 3-7)；

表格 3-7 各尺寸大芯片清洗溶液加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
0.1X SSC 溶液	150 μL/一张芯片	300 μL/一张芯片	400 μL/一张芯片

- 微微倾斜芯片，用移液器吸弃 0.1X SSC 溶液；
- 重复步骤 c.d.；
- 将芯片转移至 6 孔板 / 6 cm 培养皿中；
- 按照表格 3-8 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 3-8 组织移除试剂 Mix

组分	1 * 2 芯片/ 单个反应体积	2 * 2 芯片/ 单个反应体积	2 * 3 芯片/ 单个反应体积
TR Buffer	1470 μL	1960 μL	2940 μL
TR Enzyme	30 μL	40 μL	60 μL
Total	1500 μL	2000 μL	3000 μL
反应器皿	6 孔板	6 孔板	6 cm 培养皿

h. 往每张芯片加入表格 3-8 所示组织移除试剂 mix (6 孔板使用封板膜密封, 6 cm 培养皿使用封口膜在外圈封口), 再用保鲜膜包裹 6 孔板 /6cm 培养皿, 将芯片放置在 55°C 温箱反应 **1 hr** 以上, 最长不超过 **16 hr**;

i. 组织移除结束后, 用移液器吸弃组织移除试剂 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)。

j. 加入 0.1X SSC 溶液 (用量参考表格 3-9);

表格 3-9 各尺寸大芯片组织移除后清洗溶液加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
0.1X SSC 溶液/Nuclease free water	1500 μL/一张芯片	1500 μL/一张芯片	3000 μL/一张芯片

k. 在芯片四周将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右, 然后吸弃 0.1X SSC 溶液;

l. 重复步骤 j.-k.;

m. 加入 Nuclease free water (用量参考表格 3-9);

n. 上下吸打冲洗芯片表面以洗掉表面盐分;

o. 用镊子将芯片转移到无尘纸上, 吸干芯片背面和周围的液体;

p. 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 150 μL (1 cm * 2 cm) /300 μL (2 cm * 2 cm) /400 μL (2 cm * 3 cm) Nuclease - Free Water, 用空气罐将芯片四周及表面完全吹干 (该步骤可重复, 直至芯片表面无明显痕迹残留)。

q. 将芯片放置于干燥的 9 cm 培养皿中, 用锡箔纸包裹孔板以避光, 等待拍照。



3.8 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。

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。

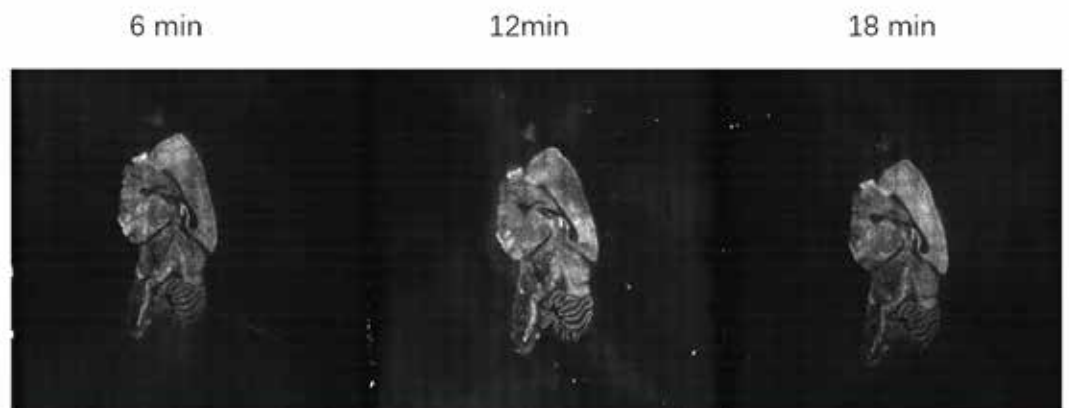


⋯ 同一组织不同透化时间的芯片要在相同曝光条件下扫描。

3.9 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。

如图二所示，**6 min** 透化时间下，组织呈现同一皮层亮度不均匀的情况，说明透化不充分；**12 min** 下，细节清晰，信号均匀，亮度最大；**18 min** 下的信号弱于 **12 min** 下的信号；因此，最佳的透化时间是 **12 min**。



图二. 大鼠脑（正中矢状面）