

Stereo-seq 转录组试剂套装

(载体版 0.5 cm*0.5 cm)

使用说明书



货号：201ST004 (4 RXNs)

试剂盒版本号：V1.2.1

说明书版本号：B

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.2.1
修订日期：2023 年 6 月
描述：首次发布

说明书版本：B
试剂盒版本：V 1.2.1
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
- PR Rinse Buffer 溶液（含 5%RI）体积统一改为 200 μ L
- 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。

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: ~ 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	6
1.6. Stereo-seq 芯片载体及配件的使用技巧	6
1.7. 注意事项	9

第二章 样本准备

2.1. 样本要求	11
2.2. 样本包埋	12
2.3. 样本的保存和运输	15

第三章 STOmics® Stereo-seq 转录组试剂套装（载体版）

标准操作流程（新鲜冷冻样本）

3.1. 实验前准备	17
3.2. 切片准备	18
3.3. 芯片处理与组织贴片	19
3.4. 组织固定	20
3.5. 荧光染色	21
3.6. 荧光拍照	22
3.7. 组织透化	24
3.8. 反转录反应	26
3.9. 组织去除	26
3.10. cDNA 释放与回收	27
3.11. cDNA 纯化与扩增	28
3.11.1 cDNA 纯化	29
3.11.2 cDNA 扩增	30



提示：额外的操作提示和指导。



关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。



质量检查点



注意：特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。



停止点：您可以在此暂停实验并存储样品。

第一章

产品介绍



1.1. 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。

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 (0.5 cm*0.5cm) *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 1-4。

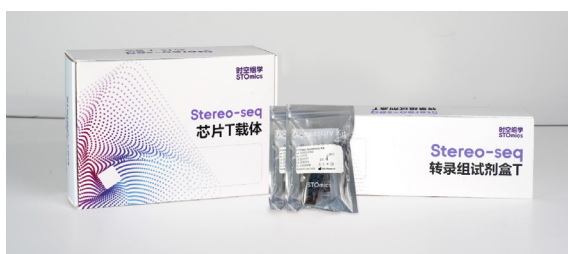


 收到 Stereo-seq 芯片载体后，请参照《Stereo-seq 芯片载体保存操作指南》对产品进行正确地保存。

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

收到产品后


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




表格 1-1

Stereo-seq 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 1-2

Stereo-seq 芯片 T 载体 (0.5 cm * 0.5 cm) 货号: 200CT004		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 T 载体 (0.5 cm * 0.5 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

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 1-4

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

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 1-5 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**》。<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

表格 1-5

仪器		
品牌	描述	产品编号
-	冰冻切片机	-
-	荧光显微镜 (拼接功能)	-
-	金属浴	-
-	离心机	-
-	移液器	-
-	漩涡混匀仪	-
Bio-Rad*	T100™ PCR 仪	1861096
ABI*	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636
Labnet	Slide Spinner (可选)	C1303-T
NEB	NEBNext® Magnetic Separation Rack	S1515S
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)
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



从所列品牌 (带 * 号) 中任选其一。



试剂

品牌	描述	产品编号
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
	甲醇	34860-1L-R
SAKURA	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583
Invitrogen	Qubit ssDNA Assay Kit	Q10212
	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

耗材

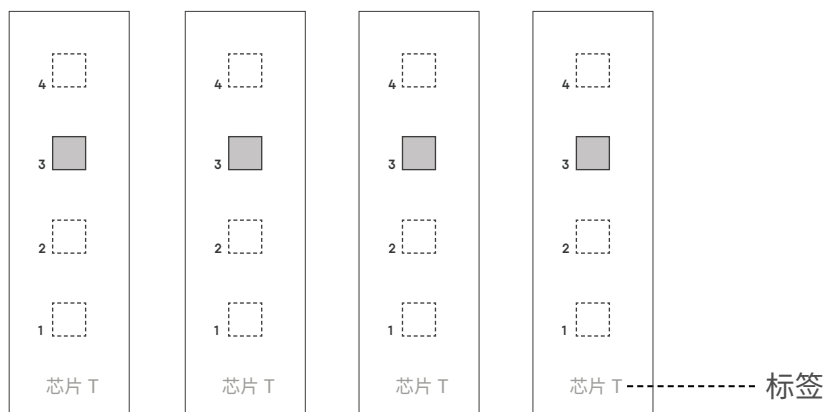
品牌	描述	产品编号
-	金属包埋盒	-
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	载玻片	-
-	显微镜盖玻片 (尺寸 : 18 mm × 18 mm, 厚度 : 0.13 - 0.16 mm)	-
Corning	Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	353003
	50 mL 离心管	430829
	15 mL 离心管	430791
Kimtech	Kimwipes™ 无尘纸	34155
MATIN	Power dust remover (空气罐)	M-6318
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	0.2 mL PCR 管 *	PCR-02-C
	96 孔板 *	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†	PCR-05-C	
Invitrogen	Qubit Assay Tubes†	Q32856
BIOSHARP	金属块	BC032



从所列品牌 (带 * 号 / 带 † 号) 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（0.5 cm*0.5cm）。



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 。

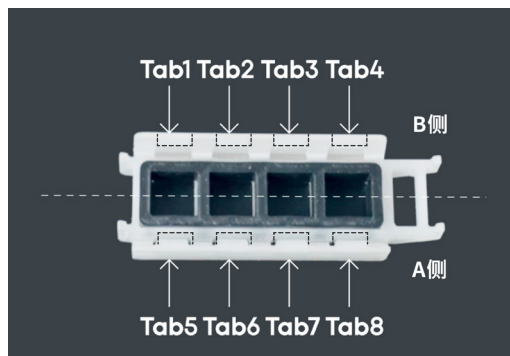
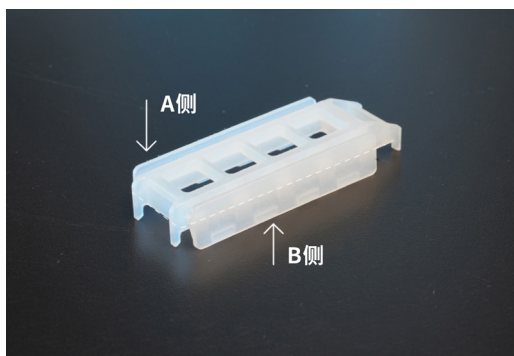


需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

1.6. Stereo-seq 芯片载体及配件的使用技巧

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



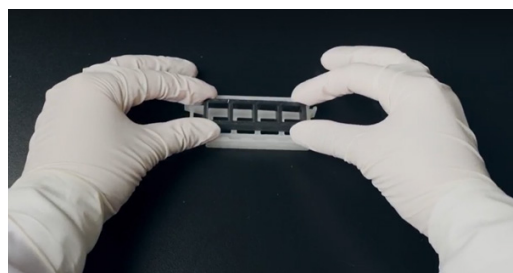
组装方法视频参考网址：

<https://www.stomics.tech/col113/607>

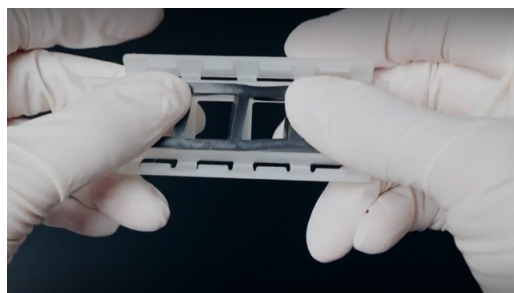
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



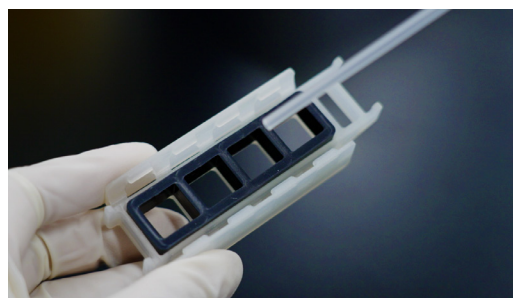
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



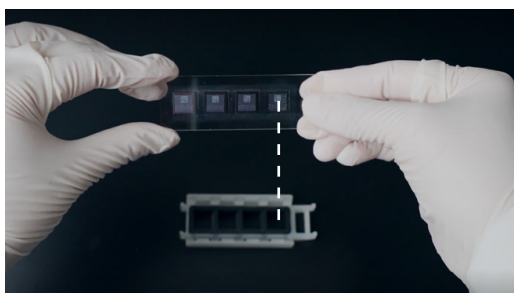
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



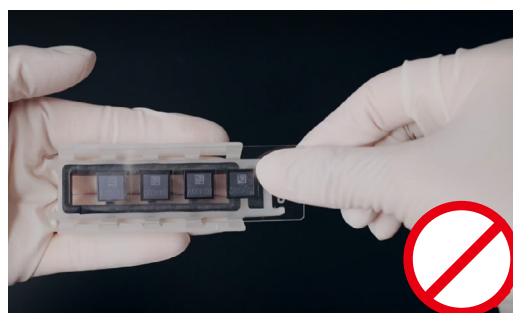
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；



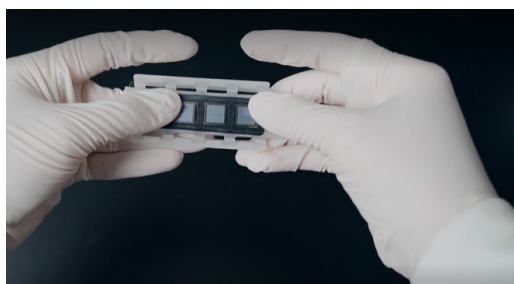
e. 拿起 Stereo-seq 芯片载体，芯片面朝下，将芯片载体标签朝夹具的长边卡扣方向；



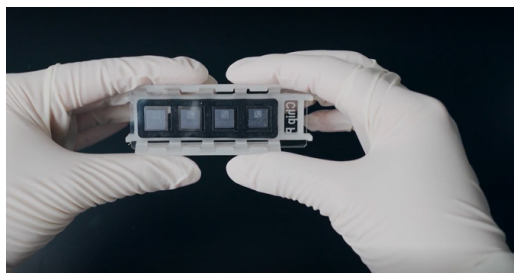
f. 芯片对准垫圈孔位，避免夹具和垫圈接触芯片表面；



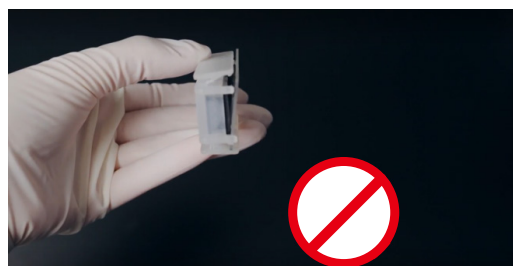
g. 先将芯片载体卡进夹具下方 4 个卡扣。双手中指支撑夹具的正面，左手拇指放在 tab 1 和 tab 2 之间，右手拇指放在 tab 3 和 tab 4 之间，拇指匀力向下按压芯片载体，直至听到“咔”的一声。双手食指用力向下按压夹具顶部边缘，将载体卡进夹具上方 4 个卡扣；



h. 沿着夹具卡带两侧按压，确保夹具与芯片载体稳固组装在一起；



i. 最后检查组装好的夹具和芯片载体，确保位置正确。

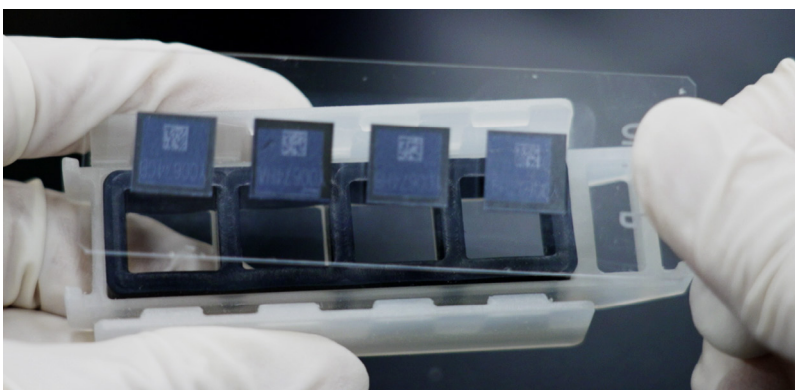


拆卸方法

a. 将夹具翻转过来，用力按压夹具上方卡带，使芯片载体从夹具中脱离。用大拇指稍微挡住载体背面，避免载体弹出；



b. 将芯片载体从带有刻字标签一侧抬起拿出。



1.7. 注意事项

- 本产品仅适用于科研用途，不可用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际操作中可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 推荐使用前将各试剂组分提前取出，将酶类组分瞬时离心后置于冰上备用，并将其他组分置于室温解冻。解冻后轻柔地上下颠倒数次使其充分混匀，瞬时离心后置于冰上备用。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 推荐把 PCR 仪温度预热至反应温度。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

第二章

样本准备

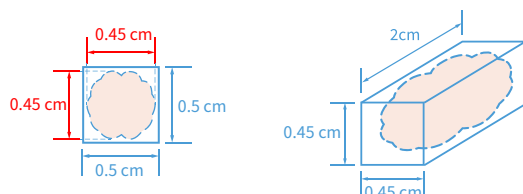


2.1. 样本要求



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 0.45 cm × 0.45 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/>

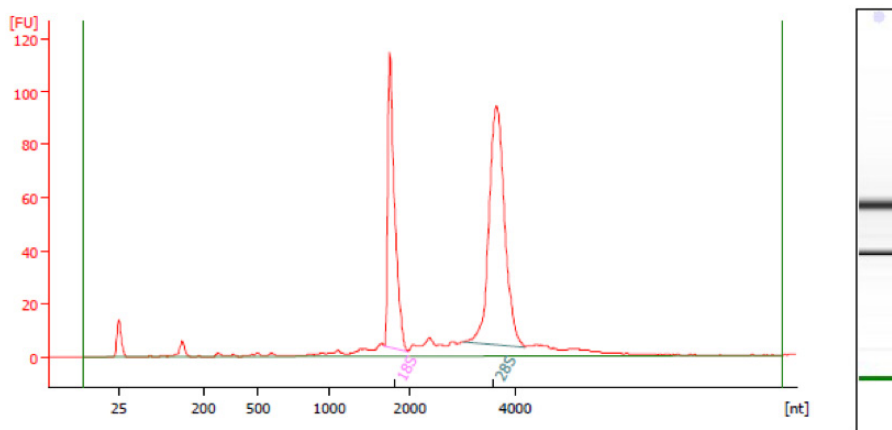
样本包埋组织 RNA 完整值 RIN

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。



Overall Results for sample 6 : 8522203007050

RNA Area:	568.4	RNA Integrity Number (RIN):	9.8 (B.02.11, Anomaly Threshold(s) manually adapted)
RNA Concentration:	281 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.6	Result Flagging Label:	RIN: 9.80

Fragment table for sample 6 : 8522203007050

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,675	1,964	151.3	26.6
28S	3,006	4,187	238.4	41.9

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/col113/606>

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。



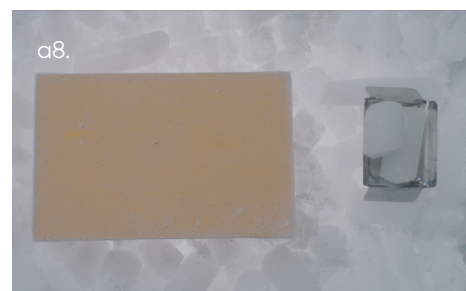
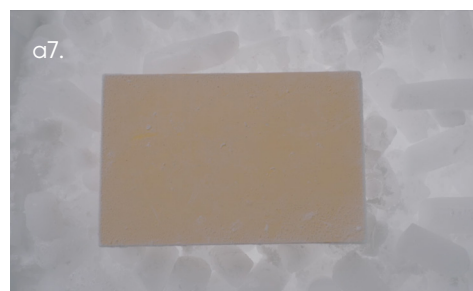
准备材料

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

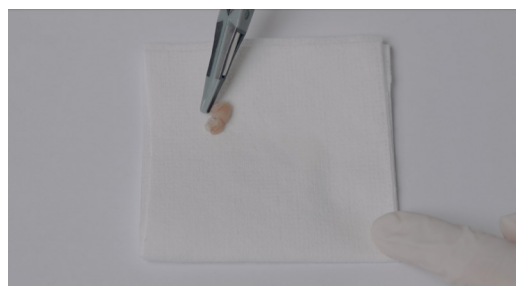
- a1. 提前准备一泡沫箱碎冰并将 OCT 放在冰上预冷 **10 min**；
- a2. 根据组织大小提前准备两个合适大小的**金属包埋盒 A** 和 **B**（**B** 的尺寸需略大于 **A**）；
- a3. 提前将预冷好的 OCT 填充**金属包埋盒 A** 的 2/3 左右，并放置在冰上预冷 **10 min** 以上（可使用注射器吸弃产生的气泡）；
- a4. 在平皿中加满 OCT，提前预冷 **10 min**（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



- 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。



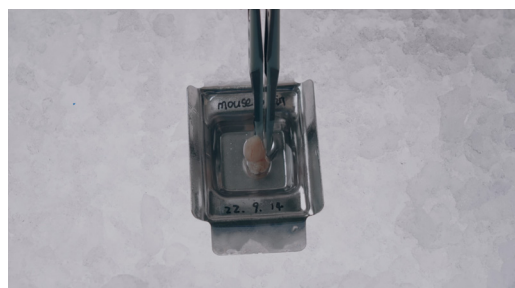
- b. 新鲜组织离体 **30 min** 内，用无菌无纺布或无尘纸擦干组织表面液体，以避免在组织表面形成冰块，影响后续包埋切片；



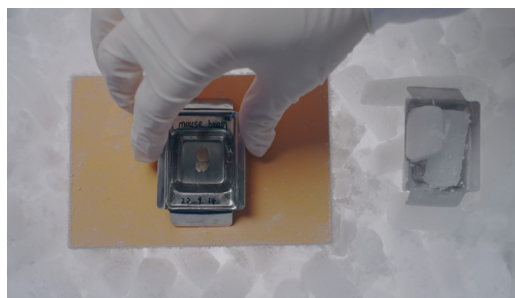
- c. 将组织放入在冰上预冷的 OCT 中，在不产生气泡的前提下用药匙使组织被 OCT 包裹（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



- 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

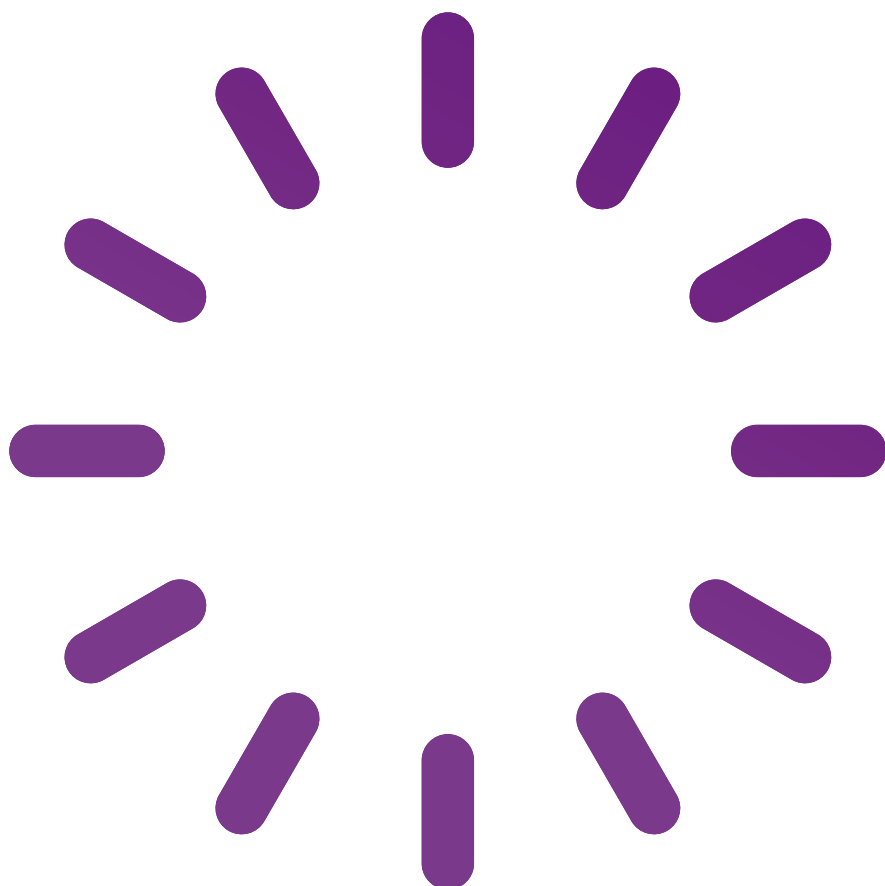
将组织包埋块使用锡纸包裹，并做好标记放入自封袋，在自封袋上做好记录，放入 -80°C 冰箱长期保存。如需邮寄，可选干冰邮寄。

第三章

STOmics[®] Stereo-seq

第三章转录组试剂套装(载体版)

标准操作流程 (新鲜冷冻样本)



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。

第一天

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 取 20X SSC 250 μ L 稀释到 50 mL	室温
Wash Buffer	取 5 μ L RI 加入 95 μ L 0.1X SSC 中，用量至少为 30 μ L/ 芯片	冰上备用
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 20 μ L 稀释到 200 μ L（至少 200 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	- 80°C
可分装未使用的 RT Oligo，并保存于 - 80°C，以避免反复冻融。		
Glycerol	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温	室温
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

第二天

准备试剂	准备流程	保存条件
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 天
磁珠	提前取出，室温放置 30 min 平衡	4°C
准备仪器	准备流程	备注
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	FITC 通道	-

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。

- 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；
- 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**；
- 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- 将组织块修剪成合适的尺寸（切面小于 0.45 cm × 0.45 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

3.3. 芯片处理与组织贴片



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

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

b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 μ L Nuclease-Free Water 清洗 2 次（或在含 40-50 mL 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：冷贴（A）和热贴（B）。根据需求选择切片厚度，通常为 10 μ m。

A. 冷贴（推荐）

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。



B. 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。



（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。

3.4. 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**；



固定期间可参考表格 3-1 提前配置组织荧光染色液，**室温避光保存备用**。

表格 3-1 组织荧光染色液

组分	1X (μL)
5X SSC	94.5
Qubit ssDNA Reagent	0.5
RI	5
Total	100

- 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，将载体转移至实验台上进行下一步。

3.5. 荧光染色



- a. 将组织荧光染色液加到芯片上，用量为 30 μL / 芯片。先在芯片的每个角加入一滴染色液，然后将其余染色液加到芯片中央，使所有染色液融合，确保染色液均匀覆盖全芯片，室温避光染色 **5 min**；

⋯ 提前将 Glycerol 置于室温平衡 5 min，确保芯片完全被组织荧光染色液覆盖。

- b. 染色期间分别配置 30 μL / 芯片的 Wash Buffer 和 200 μL / 芯片的 PR Rinse Buffer (含 5% RI) ；
- c. 倾斜载体，用移液器从芯片一角吸去组织荧光染色液，尽量减少表面液体；
- d. 向芯片加入 Wash Buffer，用量为 30 μL / 芯片；
- e. 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；
- f. 将载体转移至无尘纸上，一手固定载体，另一手持空气罐，出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30° 倾角缓慢吹气，从芯片角落起始顺序推进，吹干芯片表面液体，勿使气流过猛；
- g. （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；

⋯ 确保芯片上没有残留的染色液。

- h. Glycerol 使用前离心，用移液器缓慢吸取 1.2 μL Glycerol 甘油滴加到组织中央，避免产生气泡；
- i. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时握住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，立即拍照，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。

3.6. 荧光拍照

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



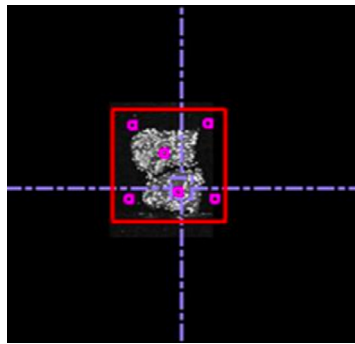
a. 在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；

⋮ 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. 在载物台上滴加 1-2 μL 水，将 Stereo-seq 芯片载体转移到显微镜载物台上，取下遮光罩。选择落射荧光扫描模式，FITC 通道，10 倍镜；

c. 框选视野：框选芯片，减少芯片外区域；

d. 对焦策略：在芯片四角方向（如图：组织外有 track 线的区域）分别记录焦点，对 Track 线定焦。组织区域内每平方厘米选择 2-4 个点对组织定焦（如果组织起伏较大，可以酌情增加定焦点）；对于仅支持自动对焦策略的显微镜无需考虑本策略；



e. 最终成像：Track 建模点完成后，将增益（Gain）调至最小，参考拍照注意事项 e 确定最终拍照参数后开始成像，待成像完成，保存整个文件夹（原始 FOV 小图与拼接大图）；

f. 打开 ImageStudio 软件的图像 QC 模块，上传 ssDNA 染色图，并参考软件内置的《ImageStudio 用户手册》来进行图像 QC；

⚠ 获得的 ssDNA 染色图需要通过 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。

g. 拍照后，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹在盖玻片一角；

h. 用镊子轻轻地平行移动盖玻片，直到芯片与盖玻片完全分离；

i. 将载体置于装有 30 mL 0.1X SSC 的 50 mL 离心管中浸泡 3-5 s；

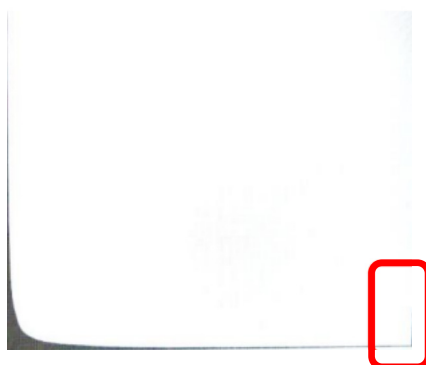
⋮ 确保芯片全部浸没于溶液中。

j. 取出载玻片，用无尘纸擦去载玻片背面及芯片四周的残液，确保无液体残留。

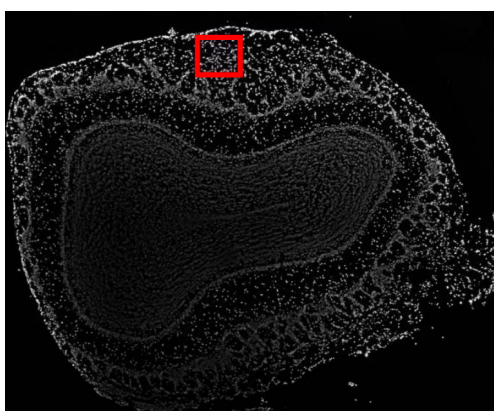


拍照注意事项

- 显微镜扫片时请勿触碰显微镜所在平面，周边不能有包括行走的震源；
- 显微镜扫描荧光染色图像时，尽量避免过曝，可通过图像像素统计情况（如：直方图）来判断，刚好不过曝情况为：直方图曲率适中不贴边，既直方图横坐标最大值处仅有微小突起；



- 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；
- 推荐使用手动对焦，按照上文策略在芯片四角和组织内分别定焦，以此同时获得清晰的 Track 线和染色图像；
- 手动定焦拍照过程中有多次曝光和灯光强度参数调整，为进行 Track 线对焦，可以拉高增益（Gain）和灯光强度。Track 线选点之后，对组织进行对焦时，将增益降到最低，灯光强度降低到组织区域不过曝（参考注意事项 b）。在整体扫描前，选择图像上占据较大面积，又较亮的区域（如图红色框内区域），调节曝光时间（不超过 500 ms）和灯光强度（在 500 ms 曝光不能满足需求时增大光强）使该区域刚好不过曝（参考注意事项 b），以保证在能够获取 Track 线情况下仅有少量区域过曝；



- 如果在甘油封片过程中，存在较大区域（超过 4 个视野大小）未被甘油浸润，则需要对此区域增加建模点；
- 谨慎使用自动对焦模式，大部分自动对焦策略无法对 Track 线精确定焦，容易造成 QC 失败，同时还有可能造成荧光淬灭。

正确示例：

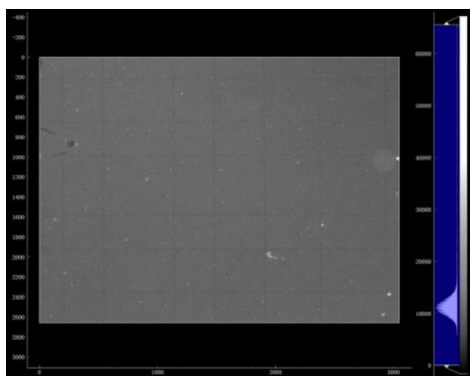


图 a

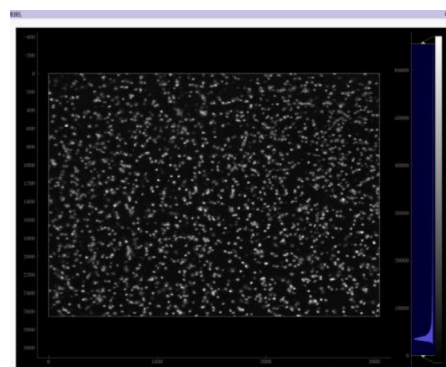


图 b

- 图 a 为组织外选取的一个对焦点视野窗口截图，应保证 Track 线清晰分明；
- 图 b 为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，应保证核染色图像清晰不过曝。

错误示例：

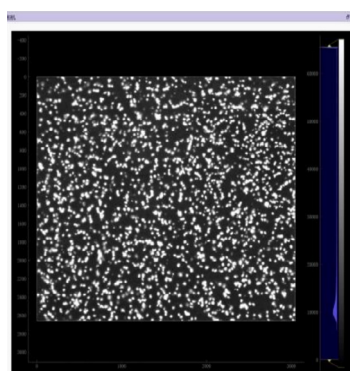


图 c

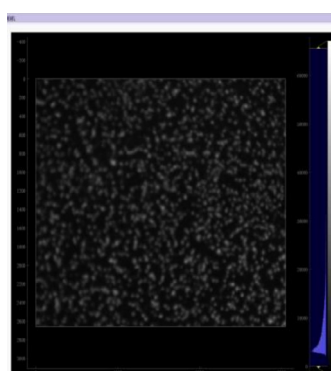


图 d

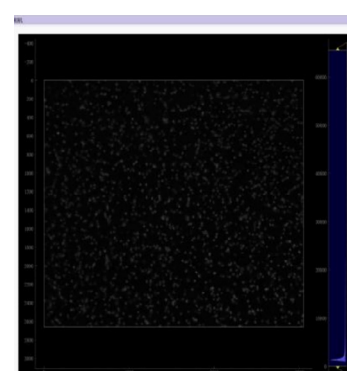


图 e

- 图 c 为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，过曝时图像及像素统计状态（图右侧）；
- 图 d 为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，欠曝时图像及像素统计状态（图右侧）；
- 图 e 为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，失焦时图像状态（图右侧）。

3.7. 组织透化

- 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；
- 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. 参考步骤 1.6. 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 200 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, 详情请参考使用说明书。

g. 在等待透化期间, 参考表格 3-2 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 3-2 RT Mix

组分	1X (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
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

h. 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;

i. 透化结束后, 将手持载具从 PCR 仪 (37°C) 中取出;

j. 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;

k. 加入 PR Rinse Buffer 溶液 (含 5%RI, 用量为 200 μL / 芯片);

l. 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。

3.8. 反转录反应

- 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 μL / 芯片的 RT Mix，确保 RT Mix 均匀覆盖全芯片；
- 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	-

3.9. 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 μL / 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 3-3 提前配制 cDNA Release Mix。

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。

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

3.10. cDNA 释放与回收

- 按照表格 3-3 配制 cDNA Release Mix，室温放置；
- 加入 cDNA Release Mix（用量为 400 μL / 芯片）；
- 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**；

表格 3-3 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

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。

- 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；
- 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。

3.11. 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。

3.11.1. 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 μL ）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 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。



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

3.11.2. cDNA 扩增

a. 按照表格 3-4 配制 PCR Mix, 共 100 μL ;

表格 3-4 PCR Mix

组分	1X (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
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 3-5 PCR 程序进行扩增;

表格 3-5 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 3-6 配制 Qubit dsDNA Mix

表格 3-6 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 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 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。

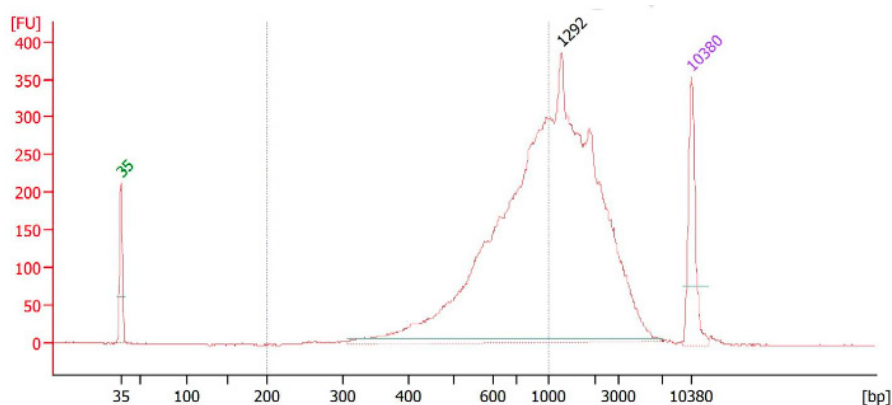


纯化后, 可用 40 μ L Nuclease-free Water 在 4°C 保存磁珠, 直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

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 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。

要求片段分布主峰在 1000-1500 bp (如图二), 纯化后产量通常大于 20 ng。



图二 . 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》。