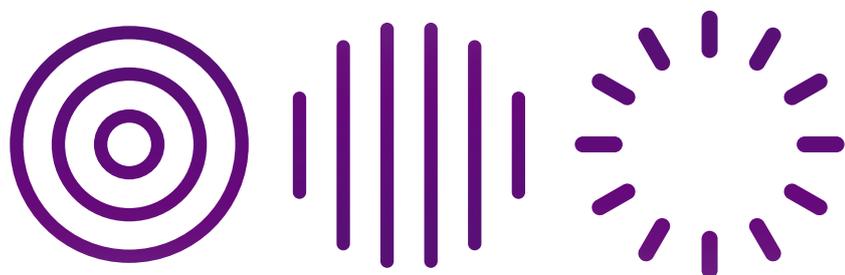


Stereo-seq 透化试剂套装 (载体版兼容 H&E) 使用说明书



货号：201SP118 (8 RXNs)

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：2023 年 11 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。

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: ~ 4.5 小时**



目录

第一章 产品介绍

1.1. 产品描述	1
1.2. 产品组成	1
1.3. 需自备物料清单	3
1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍	5
1.5. Stereo-seq 芯片载体及配件的使用技巧	5
1.6. 注意事项	8

第二章 样本准备

2.1. 样本要求	10
2.2. 样本包埋	11
2.3. 样本的保存和运输	14

第三章 STOmics® Stereo-seq 透化试剂套装（载体版兼容 H&E）标准操作流程

3.1. 实验前准备	16
3.2. 切片准备	17
3.3. 芯片处理与组织贴片	17
3.4. 组织固定及伊红染色（-20°C下操作）	19
3.5. 苏木素及返蓝染色	19
3.6. 透化时间测试	21
3.7. 反转录反应	23
3.8. 组织去除	24
3.9. 荧光拍照	25
3.10. 组织透化判断	26



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 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。

结合 H&E 染色，研究人员可以更清晰地观察到组织形态学信息，在时空病理研究与应用中更准确地判断组织分型及获取特定组织区域的表达信息，针对选定区域进行下游差异分析和富集分析。

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

1.2. 产品组成

每个试剂套装由以下三个部分组成：

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

辅助性试剂与耗材：

- （需单独订购）H&E Mounting Medium *1 (50 μ L)
- （需单独订购）Stereo-seq PCR 适配器 *1 (2 EA)



关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 至表格 1-5。



 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 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 \times 1
PR Enzyme	1000028500	●	10 mg \times 1
RT QC Reagent	1000028501	●	748 μ L \times 1
RT Additive	1000028502	○ (透明)	44 μ L \times 1
RT QC Enzyme	1000028503	○ (透明)	44 μ L \times 1
TR Enzyme	1000028504	●	71 μ L \times 1
TR Buffer	1000028505	●	1725 μ L \times 2
🧊 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim -18^{\circ}\text{C}$		❄️ 冷链运输	🕒 有效期: 见标签

表格 1-2

Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm) 货号: 200CP118

组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm)	-	8 EA
🧊 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$		❄️ 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

表格 1-5

H&E Mounting Medium (需单独订购) 货号: 1000041969		
组分信息	货号	规格及数量
H&E Mounting Medium	-	50 μ L \times 1
 储存温度: 常温	 常温运输	 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 1-6 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 1-6

仪器		
品牌	描述	产品编号
-	冰冻切片机	-
-	离心机	-
-	移液器	-
-	荧光显微镜 (拼接功能)	-
-	漩涡混匀仪	-
Bio-Rad*	T100™ PCR 仪	1861096
ABI*	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636



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
Ambion	Nuclease-Free Water	AM9937
	20X SSC	AM9770
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
	甲醇	34860-1L-R
	苏木素 ¹	51275
Solarbio	天青石蓝苏木素 ²	G4470（国产备选）
Sangon Biotech	伊红	A600190-0025
Agilent	Bluing Buffer	CS70230-2
SAKURA	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. compound	4583

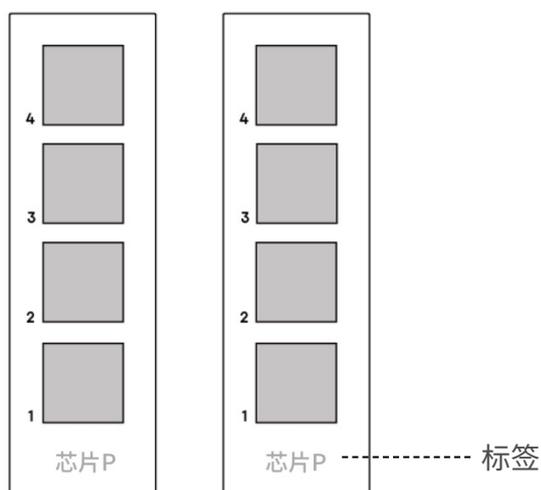
 苏木素优先使用推荐品牌 1，品牌 2 为国产备选。

耗材		
品牌	描述	产品编号
-	锡箔纸	-
-	金属包埋盒	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
-	载玻片	-
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
	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 ¹	PCR-05-C
Invitrogen	Qubit Assay Tubes ¹	Q32856
BIOSHARP	金属块	-
-	一次性无菌注射器	-
津腾	针筒式过滤器 ²	JTSF0303
Millipore	Millex 针式过滤器 ²	SLGV033N

 从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍

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



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

Stereo-seq 芯片载体保存方法

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

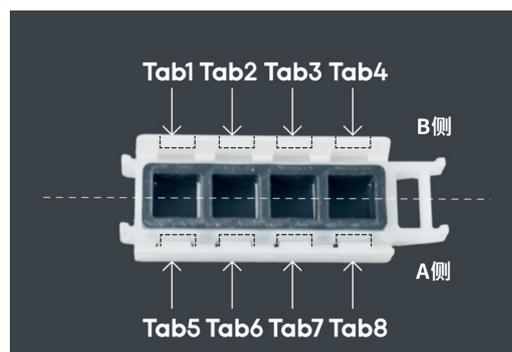
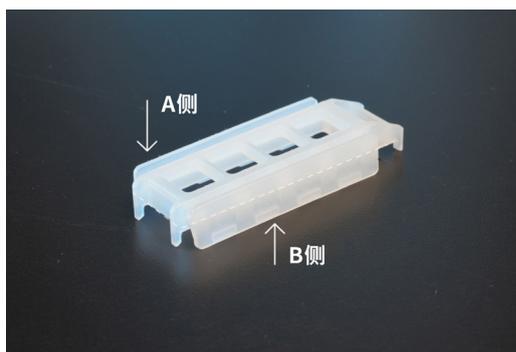


需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

1.5. 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>

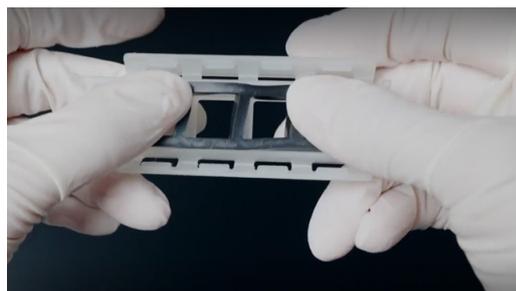
a. 从 Stereo-seq 载体配件包中取出夹具和垫圈；



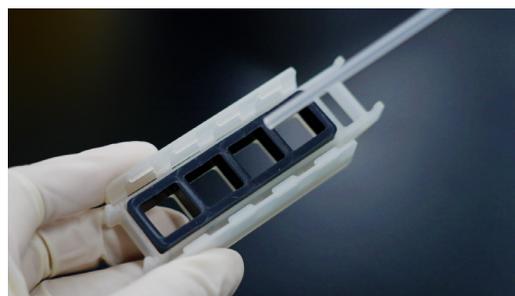
b. 夹具反面朝上，将垫圈插入夹具中，确保夹具和垫圈的孔位切口对齐。按压垫圈，使垫圈和夹具契合在一起；



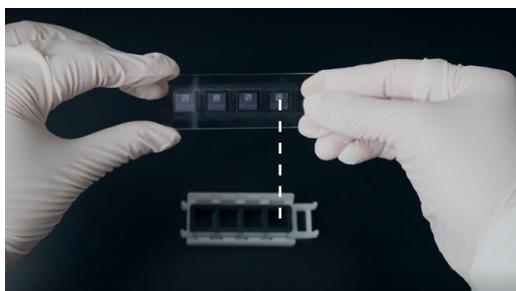
c. 用手指微调垫圈边缘位置，使垫圈与夹具更紧密地契合；



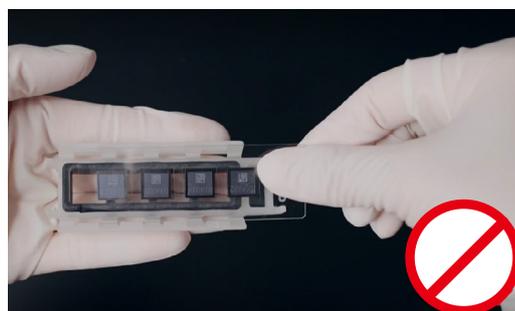
d. 使用空气罐尽可能地吹去表面的杂质或碎屑；



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；



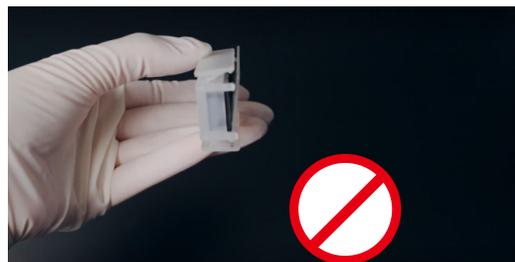
g. 先将芯片载体卡进夹具下方 4 个卡扣。双手中指支撑夹具的正面，左手拇指放在 tab 1 和 tab 2 之间，右手拇指放在 tab 3 和 tab 4 之间，拇指匀力向下按压芯片载体，直至听到“咔”的一声。双手食指用力向下按压夹具顶部边缘，将载体卡进夹具上方 4 个卡扣；



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。

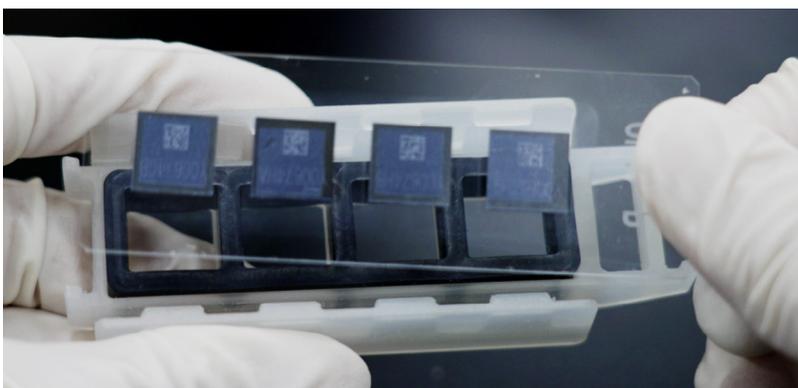


拆卸方法

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。



1.6. 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

样本准备

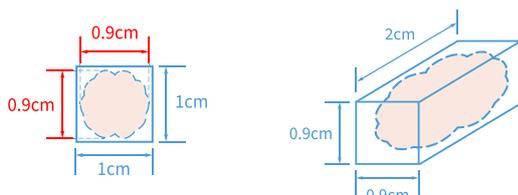


2.1. 样本要求



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 $0.9\text{ cm} \times 0.9\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ ，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/>

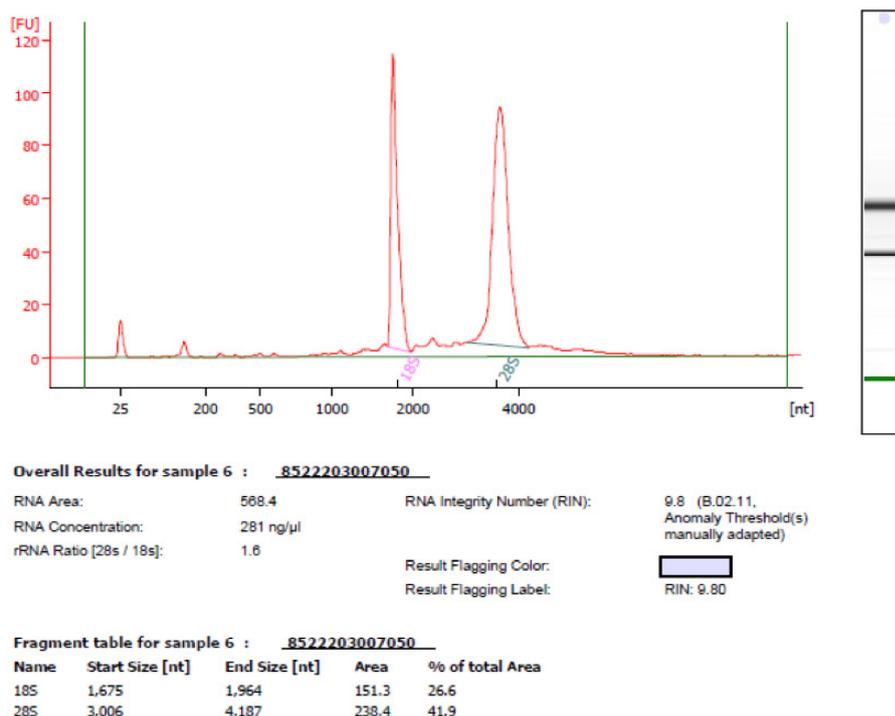
样本包埋组织 RNA 完整值 RIN

为保证样本质量，降低实验风险，建议切取 10-20 片 $10\ \mu\text{m}$ 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。



强烈建议只对 $\text{RIN} \geq 7$ 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/col113/606>

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;



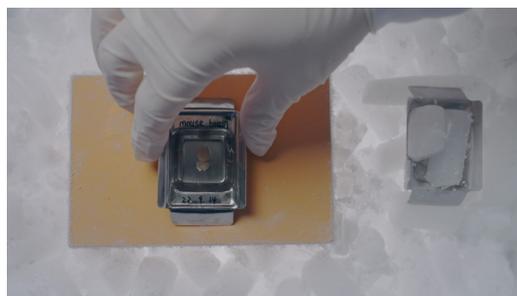
- c. 将组织放入在冰上预冷的 OCT 中，在不产生气泡的前提下用药匙使组织被 OCT 包裹（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



- 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。



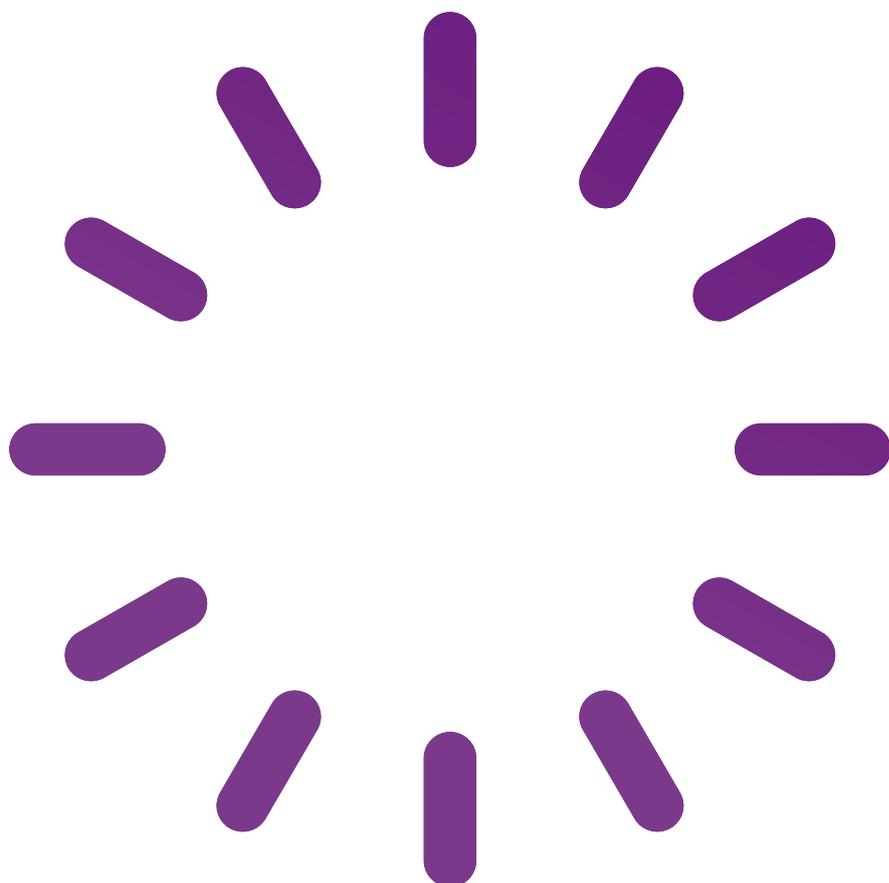
2.3. 样本的保存和运输

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

透化试剂套装（载体版兼容 H&E）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	准备流程	储存
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μ L 稀释到 20 mL	室温
Wash Buffer	取 5 μ L RI 加入 95 μ L 0.1X SSC 中，用量至少为 100 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 15 μ L 稀释到 150 μ L（至少 150 μ L/ 芯片）	冰上备用 6 hr
醇溶伊红溶液	取 0.013 g Eosin Y 粉末溶于 25 mL 甲醇中，封口膜封口保存	室温 1 个月
H&E 封片剂 (H&E Mounting Medium)	每张芯片用量 3.5 μ L	室温
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	TRITC 通道	-

3.2. 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。

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 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. 预冷甲醇和醇溶伊红溶液：准备 3 个玻片盒或者 50 mL 离心管作为固定容器，在其中两个容器中加入足量甲醇，另外一个容器中加入足量醇溶伊红溶液，确保液体体积足够浸没过所有芯片（可将一张普通载玻片放入容器中，查看加入液体的体积是否足够）。盖紧上盖，提前预冷（-20°C）时间 **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。



3.4 组织固定及伊红染色（-20℃ 下操作）

a. 将上一步烤干的芯片立即放于-20℃下预冷的第一个存放甲醇的容器中固定 **17 min**，确保甲醇浸没过所有芯片（可根据实验调整固定时间，固定时间控制在 **17-27 min** 的范围内）；

b. 将芯片转移到-20℃预冷的醇溶伊红溶液中染色 **3 min**，确保伊红溶液浸没过所有芯片（可根据组织着色均匀情况调整，染色时间控制在 **3-5 min** 的范围内）；

⋯ 同一组织建议保持染色时间统一。

c. 醇溶伊红染色结束以后，将芯片转移回第一个存放甲醇的容器中，继续-20℃固定 **10 min**；

☰ 准备步骤 3.5 所需要的试剂，计算好用量备用，在使用前再加入 RI，混匀后再使用。

d. 再次固定结束以后，将芯片转移到-20℃预冷的新的存放甲醇的容器中继续固定 **1 min**；

e. 将容器转移到通风橱中，从容器中取出载体，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；

f. 将载体竖立放在载玻片染色架上，在通风柜中通风 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；



g. 甲醇挥发干后，肉眼可见组织表面变干，将载体转移至实验台上，准备下一步染色。

3.5 苏木素及返蓝染色

a. 根据【实验前准备】，提前配制 2 mL 0.01N HCl；参考表格 3-1 提前配置好试剂；

⋯ 苏木素在使用前需要使用 0.22 μm 的滤膜（即为针筒式过滤器配套一次性无菌注射器）过滤。

⋯ 先提前分装好染液的用量，染色前 5min 加入 5% 体积的 RI，震荡混匀以后即可使用。

表格 3-1 染液及 Bluing Buffer 用量

准备试剂	准备流程	储存
苏木素染色液（含 5%RI）	每张芯片至少准备 100 μL（95 μL 苏木素 + 5 μL RI）	室温 5 min
Bluing Buffer（含 5%RI）	每张芯片至少准备 100 μL（95 μL Bluing Buffer + 5 μL RI）	室温 5 min

b. 在芯片表面滴加苏木素 100 μL （含 5% RI）。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，室温孵育时间根据选择苏木素不同品牌调整；

⋯ 推荐的 Sigma 苏木素染色时间为 7 min，Solarbio 苏木素染色时间为 3 min。

c. 倾斜载体，用移液器从芯片一角吸弃苏木素染色液，尽量减少表面液体残留；

d. 用 100 μL Wash Buffer 清洗 3 次，每次清洗时可以轻微倾斜芯片（倾斜角度小于 60° ），直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上，最后一次清洗尽量减少芯片表面液体残留（可用无尘纸吸去流出芯片的液体）；

e. 将 Bluing Buffer（返蓝染色液，含 5% RI）滴加在到芯片上，用量为 100 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，室温孵育 **2 min**；

f. 倾斜载体，用移液器从芯片一角吸弃返蓝染色液，尽量减少表面液体残留；

g. 向芯片加入 Wash Buffer 进行清洗，用量为 100 μL / 芯片，清洗后直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上，尽量减少芯片表面液体残留；

h. 将芯片转移至无尘纸上，一只手固定载体，另一只手持空气罐，出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30° 倾角快速吹干芯片，注意吹干载玻片表面以及芯片与载玻片缝隙的液体，可用无尘纸擦掉芯片周围的液体（为了避免伊红晕开，这一步要保障尽可能吹干芯片上的组织及芯片与载玻片缝隙的液体）；

⋯ 请保证芯片与载玻片缝隙无液体残留，否则滴加 H&E Mounting Medium 后可能引起伊红晕开。

i. 用移液器缓慢吸取 3.5 μL H&E Mounting Medium 滴加到组织中央，避免产生气泡；

⋯ 滴加 H&E Mounting Medium 以后，建议立刻封片。

j. 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；

⋯ 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。

k. 不需要拍摄 H&E 图像，封片后等待 **10 min**；

☰ 等待期间，按照教程或示意图将垫圈与夹具组合成载具。

l. 参考步骤 1.5. 将垫圈与夹具组合成载具（不含芯片载体）。将载具放置于 PCR 适配器等上，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**）；

m. 步骤 k. 结束后，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹起盖玻片一角；

n. 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；

o. 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**；

⋯ 确保液体浸没芯片。

p. 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；

q. 在芯片上缓缓滴加 100 μL 0.01N HCl 溶液，从芯片的一角吸弃液体；

r. 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。

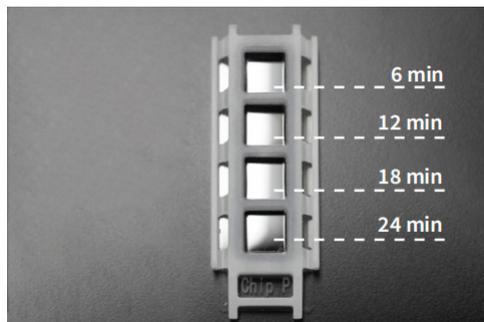
⋯ 避免载具接触芯片正面。

3.6. 透化时间测试

- a. 根据【实验前准备】，提前准备好 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	-

- 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；



图二. 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 3-3 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。

- ⋯ 需立即加入 RT QC Mix，以避免 RNA 降解。

• **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 3-2 配制 Total RNA 杂交 Mix;

表格 3-2 Total RNA 杂交 Mix

组分	1X (μ L)
Total RNA	X (2 μ g)
Nuclease-free water	70-X
20X SSC	25
RI	5
Total	100

b. 参考步骤 1.5. 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**, Total RNA 杂交 Mix 使用前置于 PCR 仪中 37°C 孵育 **3 min** 以上;

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 μ L 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 μ L/ 芯片;

g. 微微倾斜手持载具, 用移液器从芯片一角吸掉芯片表面溶液。

⋯ 需立即加入 RT QC Mix, 以避免 RNA 降解。



3.7. 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 3-3 配制 RT QC Mix，平衡至室温（避光）；

表格 3-3 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

- c. 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；
- d. 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	-

3.8. 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 3-4 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 3-4 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

- 将手持载具从 42°C PCR 仪中取出，撕开封板膜；
- 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；
- 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μ L/ 芯片；
- 在芯片一角将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右；
- 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；
- 重复步骤 e.-g.；
- 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. （参考步骤 1.5.）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。

3.9. 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 μ L 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；

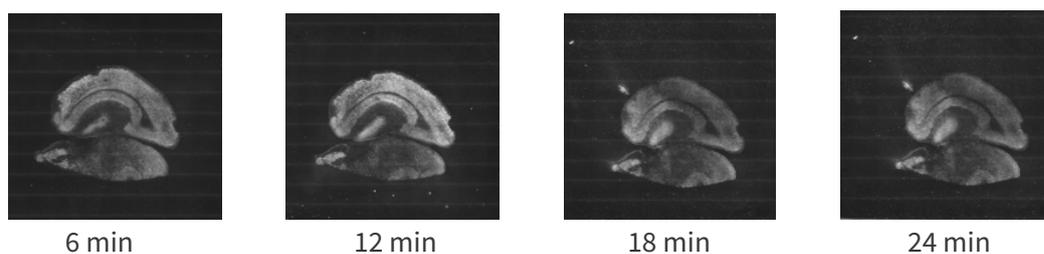
d. 先用 4 倍镜找到目标区域，然后切换到 10 倍镜，扫描整张芯片。

⋯ 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。

3.10. 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。

如图三所示，透化 **6 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 **18min** 和 **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**。



图三 . 小鼠大脑（半脑）