

Stereo-seq

透化试剂套装（载体版兼容蛋白组）

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：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: ~ 7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	4
1.4. Stereo-seq 芯片 P 载体介绍	6
1.5. 注意事项	6

第二章 STOmics Stereo-seq 透化试剂套装（载体版兼容蛋白组）标准操作流程

2.1. 实验前准备	8
2.2. 切片准备	9
2.3. 芯片处理与组织贴片	9
2.4. 组织固定	11
2.5. 封闭和模拟抗体孵育	12
2.6. 组织解交联	13
2.7. 透化时间测试	14
2.8. 反转录反应	16
2.9. 组织去除	16
2.10. 荧光拍照	19
2.11. 组织透化判断	19

附录

附录 A Total RNA 阳性对照操作方法	20
附录 B 试剂配制总览表	21



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，若同时将蛋白检测技术融入标准 Stereo-seq 透化测试实验流程中，还可以快速判断兼容蛋白组的特定组织的最佳透化时间。

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. 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：

- （需配合使用）Decrosslinking Reagent



Decrosslinking Reagent 为 Stereo-seq 蛋白组辅助试剂盒（产品货号：202KA114）的组分之一，蛋白组辅助试剂盒的组分信息详见《Stereo-CITE 蛋白转录组试剂套装使用说明书》。

- （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	● 橙色	300 μ L \times 1
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg \times 1
RT QC Reagent	1000028501	● 棕色	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	● 绿色	71 μ L \times 1
TR Buffer	1000028505	● 绿色	1725 μ L \times 2
🔒 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 P 载体 (1 cm * 1 cm) 货号：200CP118		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 P 载体 (1 cm * 1 cm)	-	8 EA
🔒 储存温度：-25°C ~ 8°C		❄️ 冷链运输
⌚ 有效期：见标签		

表格 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

Decrosslinking Reagent（需配合使用） 货号：1000043549			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Decrosslinking Reagent	1000043549	 绿色	1725 μ L \times 5
Decrosslinking Reagent 为 Stereo-seq 蛋白组辅助试剂盒（产品货号：202KA114）的组分之一，蛋白组辅助试剂盒包含在蛋白转录组套装（产品货号：202ST114）中。蛋白组辅助试剂盒的组分信息可参考《Stereo-CITE 蛋白转录组试剂套装使用说明书》。			
 储存温度：- 25°C ~ - 18°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 1-6 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	-
-	离心机	-
-	移液器	-
-	金属浴 (或其他同等功能仪器)	-
-	荧光显微镜 (拼接功能)	-
-	漩涡混匀仪	-
Bio-Rad	T100™ PCR 仪 *	1861096
Thermo Fisher Scientific	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
	Nuclease-Free Water	AM9937
Ambion	20X SSC	AM9770
	1X TE buffer, pH 8.0	AM9858
	盐酸	2104-50ML
Sigma Aldrich	Triton X-100 Solution, 10%	93443-100ML
常州新一产生命科技有限公司 *	RNase Inhibitor (RI)	LS-EZ-E-00006P
Thermo Fisher Scientific *	RNase Inhibitor (RI)	EO0382
Boster	4% PFA 多聚甲醛 (组织固定液含 DEPC)	AR1069
Sigma Aldrich	Triton X-100 Solution, 10%	93443-100ML
Invitrogen	剪切鲑鱼精子 DNA (10 mg/mL)	AM9680
	Gibco™ 马血清	26050070
Thermo Fisher Scientific	Gibco™ 山羊血清	16210064
Sakura	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. compound	4583

从所列品牌 (带 * 号) 中任选其一。

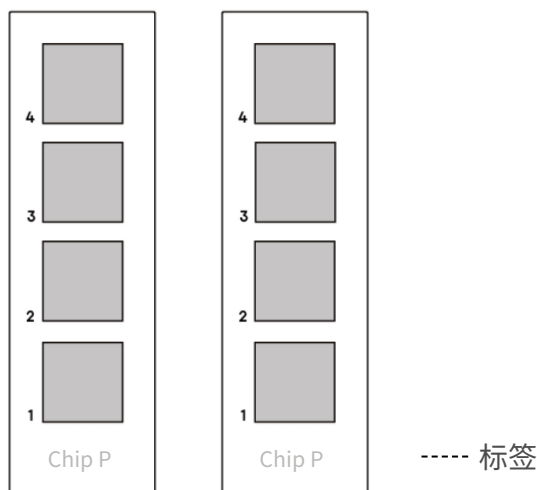
耗材		
品牌	描述	产品编号
-	锡箔纸	-
-	金属包埋盒	-
-	镊子	-
Beyotime	玻片盒	FBX003
BBI	5.0 mL 离心管	F611888-0001
Corning	Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	353003
	50 mL 离心管	430829
	15 mL 离心管	430791
Kimtech	Kimwipes™ 无尘纸	34155
Matin	Power Dust Remover (空气罐)	M-6318
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	2.0 mL 离心管	MCT-200-C
	1000 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
Biosharp	金属块	BC032
-	一次性无菌注射器	-
津腾 *	针筒式过滤器	JTSF0303
Millipore*	Millex 针式过滤器	SLGV033N



从所列品牌 (带 * 号) 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。

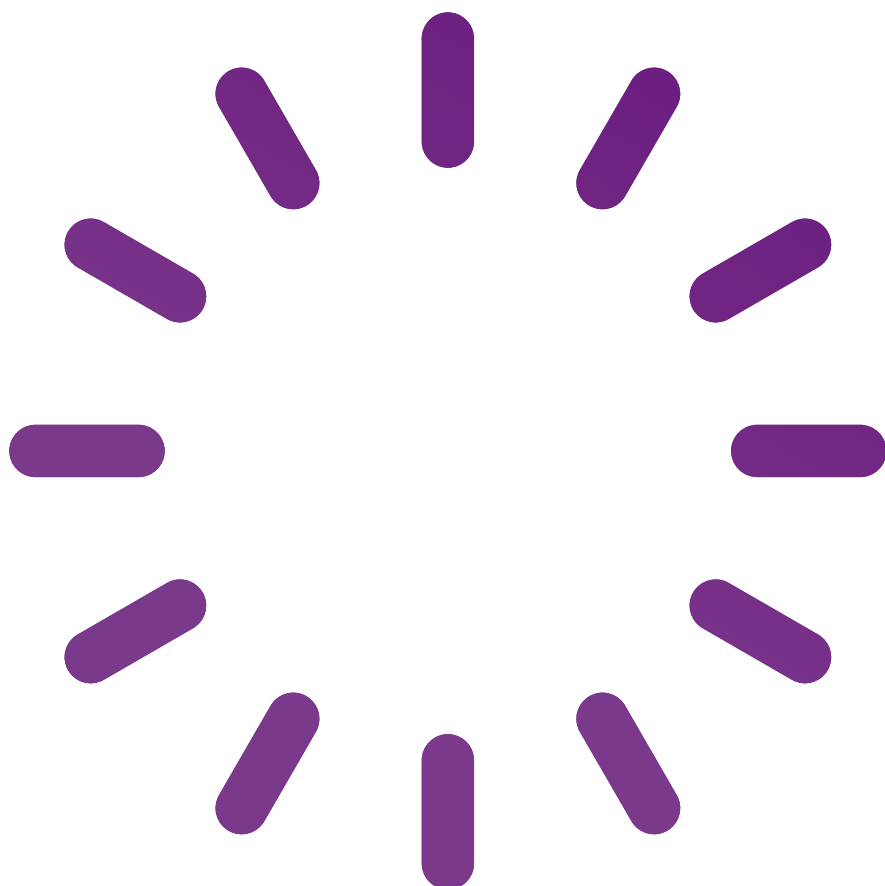
1.5. 注意事项

- 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，并将其他组分子置于室温解冻。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-seq

透化试剂套装（载体版兼容蛋白组）标准操作流程



2.1. 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
4% PFA	- 20°C取出融化后混匀，再分装每管 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 100 μ L 用 Nuclease-Free Water 稀释到 20 mL	室温
Wash Buffer	取 105 μ L RI 加入 1995 μ L 0.1X SSC 中（一张芯片至少用量 2100 μ L）	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 μ m 滤膜（针筒式过滤器配套一次性无菌注射器）进行过滤后分装，建议分装 200 μ L/ 管（一轮的透化 + 蛋白转染组），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。	- 20°C
RI	- 20°C取出冰上备用	- 20°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
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	PR Enzyme（红盖、粉末状）短暂离心，加入 1 mL 新鲜配制的 0.01N HCl，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 15 μ L 10X 透化试剂储存液稀释到 150 μ L（至少 150 μ L/ 芯片）	冰上备用 6 hr
Decrosslinking Reagent	- 20°C取出恢复至室温	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） 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（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）	37°C用于透化酶预热 70°C用于解交联试剂预热	-
荧光显微镜	TRITC 通道	-
离心机	提前将离心机温度调节到 4°C	离心血清

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	-

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. 组织平衡等待期间，参考 2.5. 封闭和模拟抗体孵育中的表格 2-1 准备下一步封闭以及模拟抗体孵育步骤需要的封闭液（需制备 5 片组织的用量，含阳参），置于冰上备用；

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；

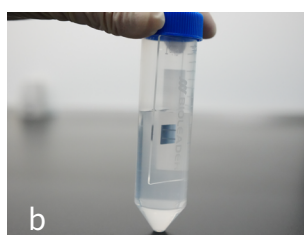
i. 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

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 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。

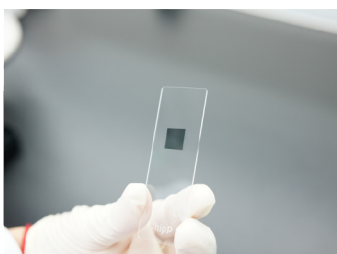
b. 将载体置于桌面上复温 1 min，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 μL Nuclease-Free Water 清洗 2 次，可参考图 a（或在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中清洗 2 次，可参考图 b）；



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. 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. 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）。根据需求选择切片厚度，通常为 10 μm 。

A. 热贴

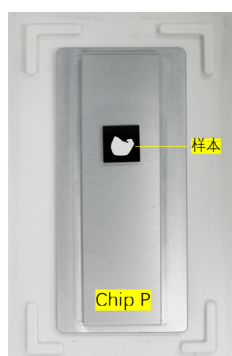
1) 连续切取组织切片，将切片移到切片台右侧靠近边缘处，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，每张切片放置间隔距离大于载体宽度；

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) 将载体芯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

a. 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；

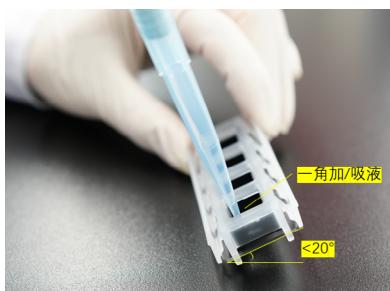
b. 将上一步孵育完成的芯片载体固定于载具上，组合成手持载具，确保夹具 8 个卡扣扣紧并且载体两侧贴紧夹具两侧；



避免载具接触芯片正面。

c. 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；

d. 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；



- e. 立即加入 Wash Buffer，用量为 400 μL / 芯片，室温孵育 **1 min**；
f. 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；

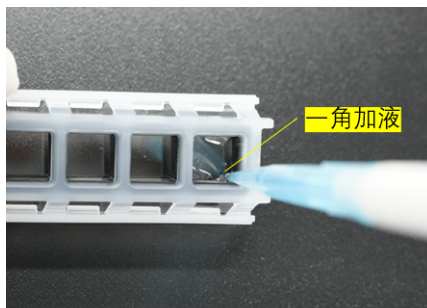


换液过程中避免组织干燥，避免移液器和枪头碰触到组织和芯片。

- g. 重复步骤 e.-f. 一次，共计清洗 2 次。

2.5. 封闭和模拟抗体孵育

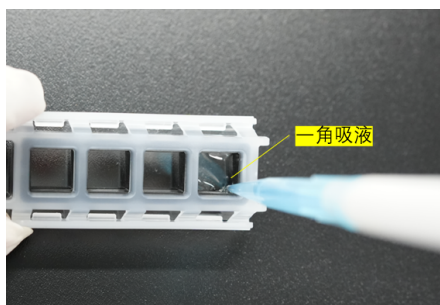
- a. **封闭**：此时可将载具转移至通风橱外实验桌操作，立即将已配制好的封闭液滴加到组织表面，用量为 **150 μL / 芯片**，室温孵育 **20 min**；



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
RI	15	16.5	31.5	46.5	61.5
滤后血清	30	33	63	93	123
Nuclease-Free Water	72	79.2	151.2	223.2	295.2
Total	300	330	630	930	1230

- b. **模拟一抗孵育**：用移液器在芯片一角吸弃封闭液，保持芯片组织湿润，立即加入封闭液，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。

c. **模拟二抗孵育**：一抗孵育等待期间，按照 [2.5. 封闭和模拟抗体孵育](#) 中的表格 2-2 配制模拟二抗孵育液，涡旋混匀后瞬时离心，放于冰盒上备用；

表格 2-2 模拟二抗孵育液配制

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
Nuclease-Free Water	52.5	57.75	110.25	162.75	215.25
Total	150	165	315	465	615

- d. 用移液器在芯片一角吸弃封闭液，保持芯片组织湿润；
- e. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 200 μL/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- f. 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；
- g. 重复步骤 e.-f. 一次；
- h. 往芯片加入模拟二抗孵育液，用量为 **150 μL/ 芯片**，室温避光孵育 **15 min**；
- i. 二抗孵育期间进行下一步组织解交联步骤的准备。

2.6. 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，模块提前放置 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** 以上（最长不超过 **30 min**）；

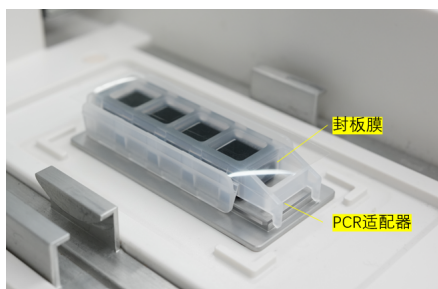
 **Decrosslinking Reagent 使用多少预热多少，请勿反复预热。**

- d. 用移液器在芯片一角吸弃模拟二抗孵育液，保持芯片组织湿润；
- e. 往芯片加入 Wash Buffer，用量为 200 μL/ 芯片，室温孵育 **1 min**；
- f. 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；



g. 重复清洗步骤 e.-f. 一次；

h. 清洗结束后，往带芯片的孔内加入 Decrosslinking Reagent，用量为 **400 μL /芯片**，用封板膜封口，放置于 PCR 仪（70 $^{\circ}\text{C}$ ）的 PCR 适配器上，关闭 PCR 仪模块盖子，70 $^{\circ}\text{C}$ 解交联 **15 min**；



i. 解交联期间，参考 [2.7. 透化时间测试](#) 中的表格 2-3，提前配制好 1X 透化试剂工作液；并将 PCR 仪的温度设置到 37 $^{\circ}\text{C}$ ，热盖温度设置为 42 $^{\circ}\text{C}$ ，放置 PCR 适配器平衡温度；

温度	时间	循环数
42 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	on	-
37 $^{\circ}\text{C}$	根据实际时间设定	1
37 $^{\circ}\text{C}$	Hold	-
42 $^{\circ}\text{C}$	1-16 hr	1
42 $^{\circ}\text{C}$	Hold	-

j. 透化工作液使用前置于金属浴或其他同等功能仪器中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 **10 min**（最长时间不超过 **30 min**）；

k. 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**。

2.7. 透化时间测试

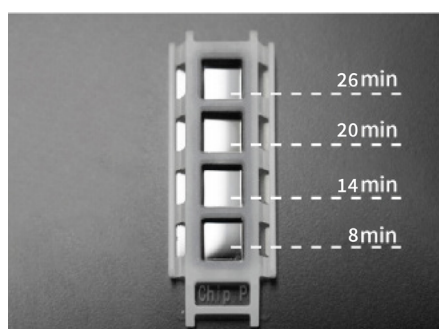
表格 2-3 1X 透化试剂工作液配制

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

- a. 根据【实验前准备】，提前解冻 RT QC Reagent, RT Additive 和 RT QC Enzyme, 解冻后冰上放置备用；
- b. 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 $400\ \mu\text{L}$ / 芯片；
- c. 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；



- d. 组织透化时间范围是 **0-30 min**，初次实验建议设置 **8 min**、**14 min**、**20 min**、**26 min** 等 4 个组进行测试；



图一. 透化时间测试（分钟）

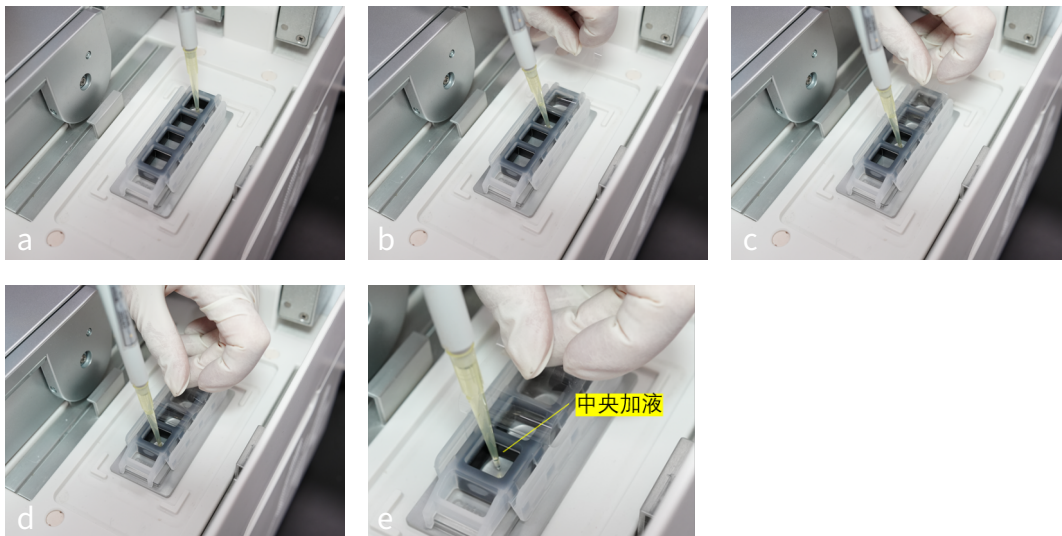
- 1) 先在透化时间为 **26 min** 的芯片添加 **$150\ \mu\text{L}$** 1X 透化试剂。在芯片的每个角加入一滴透化试剂（移液器接近芯片加液，注意不要划伤组织），然后将其余透化试剂加到芯片中央，使所有液体融合，**确保透化试剂覆盖全芯片**；
- 2) 将手持载具转移到 PCR 适配器上，将新的封板膜（撕掉封板膜上的白膜）放置于载具上覆盖反应孔，盖上 PCR 仪盖， 37°C 孵育；
- 3) **6 min** 后，打开 PCR 仪盖，掀开未加液孔上的封板膜，在透化时间为 **20 min** 的芯片添加 **$150\ \mu\text{L}$** 1X 透化试剂；
- 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孵育, 加液过程和注意事项见图 a-e。



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。



e. 透化时可提前参考 [2.8. 反转录反应](#) 中的表格 2-4 配制 RT QC Mix, 用铝箔纸包裹避光, 冰上放置, 使用前室温平衡 **5 min**;

f. 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;

g. 加入 Wash Buffer, 用量为 100 μL / 芯片;

h. 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。



步骤 h. 结束之后应立即加入 RT QC Mix, 以避免 RNA 降解, 加液方法及试剂用量参考 [2.8. 反转录反应](#) 步骤 a。

· 阳性对照 * 为小鼠胸腺, 37°C, 透化 14 min 或者 Total RNA, 阳性对照操作方法详见附录 A。

2.8. 反转录反应

a. 取出配制好的 RT QC Mix 吹打混匀后瞬时离心, 立即在芯片一角缓慢加入 RT QC Mix, 用量为 **100 μL / 芯片**, 确保 RT QC Mix 均匀覆盖全部芯片;

表格 2- 4 RT QC Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
RT QC Reagent	85	93.5	178.5	263.5	348.5
RT Additive	5	5.5	10.5	15.5	20.5
RT QC Enzyme	5	5.5	10.5	15.5	20.5
RI	5	5.5	10.5	15.5	20.5
Total	100	110	210	310	410

- b. 使用封板膜密封载具；
- c. 盖上 PCR 仪盖子，按照 [2.6. 组织解交联](#) 步骤 i 中设定的程序进行反应，反应时间为 **1 hr** 或以上，最长不超过 **16 hr**。

2.9. 组织去除

准备试剂	准备流程	保存条件
TR Buffer	提前取出放于 55°C 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°C 溶解，再恢复至室温。

- a. 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；

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

- b. 按照 [2.9. 组织去除](#) 中的表格 2-5 配制组织移除试剂 Mix，室温放置；

表格 2-5 组织移除试剂 Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
TR Buffer	392	431.2	823.2	1215.2	1607.2
TR Enzyme	8	8.8	16.8	24.8	32.8
Total	400	440	840	1240	1640

- c. 反转录步骤完成后，将手持载具从 PCR 仪（42°C）中取出，撕开封板膜；



撕开封板膜时不能按压夹具卡扣两侧上部，避免载体松落。

- d. 微微倾斜手持载具，用移液器吸弃芯片表面的 RT QC Mix；
- e. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μL/ 芯片；
- f. 在芯片一角将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右；
- g. 微微倾斜手持载具，用移液器从反应孔的一角吸弃 0.1X SSC 溶液；
- h. 重复步骤 e.-g. 一次；
- i. 往芯片加入组织移除试剂 Mix，用量为 **400 μL/ 芯片**，使用封板膜密封载具，将手持载具放置 PCR 仪（55°C）的 PCR 适配器上，盖上 PCR 仪盖，按照 [2.9. 组织去除](#) 步骤 a 中设定的程序进行反应，反应时间为 **1 hr**；



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），必须保证移除完全。

k. 加入 0.1X SSC 溶液，用量为 400 μ L/ 芯片；

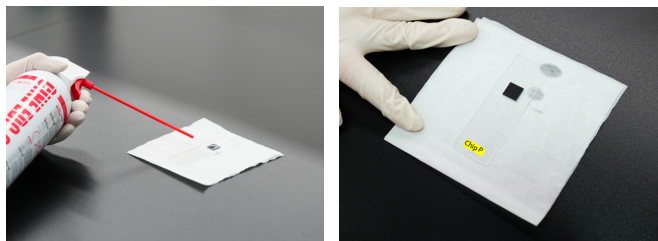
l. 在芯片四周将 0.1X SSC 溶液上下轻轻地吸打 5 次左右，然后从反应孔的一角吸弃 0.1X SSC 溶液；

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；

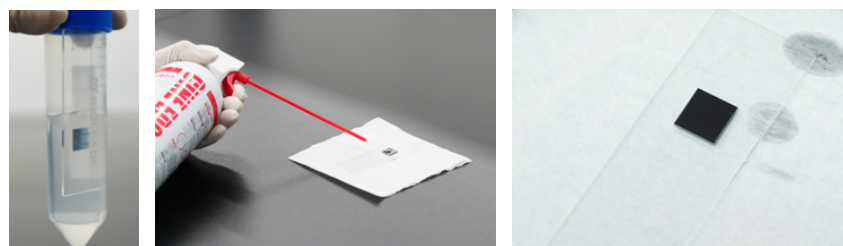
p. 参考《Stereo-seq 芯片载体及配件使用说明书》第三章拆卸手持载具，将芯片载体放在无尘纸上，用空气罐 (Matin, M-6318) 将芯片表面完全吹干；



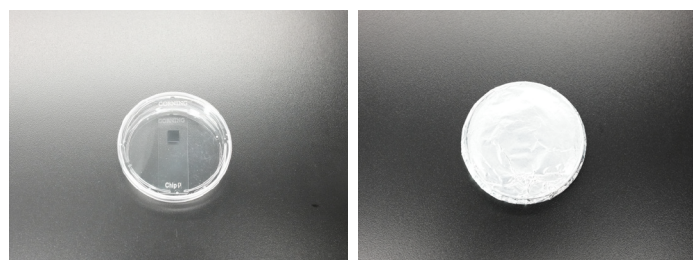
⊙ 如芯片表面残留明显痕迹，加入 100 μ L Nuclease - Free Water，用空气罐将芯片四周及表面完全吹干（该步骤可重复，直至芯片表面无明显痕迹残留）。



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。



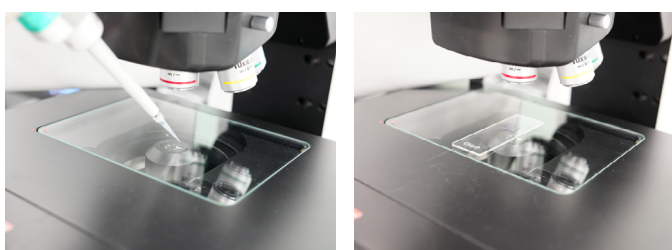
2.10. 荧光拍照

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

⋯ 文件夹名称只使用字母、数字、下划线，禁止使用空格等特殊字符。
例：B00249A1

b. 使用荧光显微镜（具备拼接功能），选择落射荧光扫描模式，手动选择 TRITC 通道，选择 4 倍镜或 10 倍镜；

c. 在载物台上滴加 1-2 μL 水，小心地将芯片转移到显微镜载物台上，取下遮光罩，选择感兴趣的芯片区域；



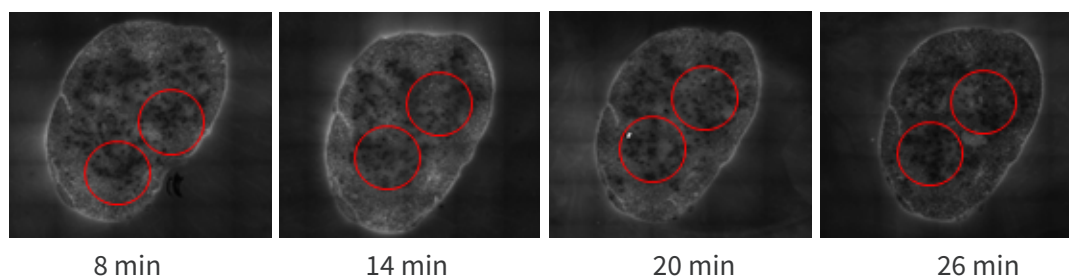
d. 先用 4 倍镜找到目标区域，然后切换到 10 倍镜，扫描整张芯片。

⋯ 同一组织不同透化时间的芯片要在相同成像条件下扫描，包括亮度和曝光等条件。

2.11. 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、荧光值较强且无弥散为最佳透化时间的判断标准。

如图二所示，小鼠胸腺组织在 8 min 透化时间下，组织呈现中间亮度不均匀的情况，说明透化不充分；14 min 和 20 min 透化时间下，细节清晰，信号均匀，亮度最大；26 min 透化时间下的信号最弱；因此，较合适的透化时间有 14 min 和 20 min，但建议选用短时间 14min 作为最佳透化时间，便于减少扩散。



图二 . 小鼠胸腺

附录 A Total RNA 阳性对照操作方法

a. 按照附表 1 配制 Total RNA 杂交 Mix；

附表 1 Total RNA 杂交 Mix 配制

组分	1X (μL)	1X + 10% (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
Total RNA X (2 μg)	X(2 μg)	1.1×X(2 μg)	2.1 × X(2 μg)	3.1 × X(2 μg)	4.1 × X(2 μg)
Nuclease-Free Water	70-X	1.1× (70-X)	2.1× (70-X)	3.1× (70-X)	4.1 × (70-X)
20X SSC	25	27.5	52.5	77.5	102.5
RI	5	5.5	10.5	15.5	20.5
Total	100	1.1× 100	2.1× 100	3.1 × 100	4.1× 100



⋯ Total RNA 投入量： $X(\mu\text{L}) = 2 \mu\text{g} / \text{Total RNA 浓度} (\mu\text{g}/\mu\text{L})$ 。

b. 将 Total RNA 杂交 Mix 使用前置于 PCR 中 37°C 孵育 **3 min** 以上；

c. 将手持载具转移到 PCR 仪适配器上，往芯片表面滴加 100 μL Total RNA 杂交 Mix，37° C 杂交 **15-20 min**；

⋯ Total RNA 无需进行透化和组织去除步骤。

d. 微微倾斜手持载具，用移液器从芯片一角吸掉 Total RNA 杂交 Mix；

e. 加入 Wash Buffer，用量为 **100 μL/ 芯片**；

f. 微微倾斜手持载具，用移液器从芯片一角吸掉芯片表面液体。

⋯ 步骤 f. 结束之后应立即加入 RT QC Mix，以避免 RNA 降解，加液方法及试剂用量参考 [2.8. 反转录反应](#) 中的步骤 a。

附录 B 试剂配制总览表

表格 2-1 封闭液配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
5X SSC	180	198	378	558	738
10% Triton X-100	3	3.3	6.3	9.3	12.3
RI	15	16.5	31.5	46.5	61.5
滤后血清	30	33	63	93	123
Nuclease-Free Water	72	79.2	151.2	223.2	295.2
Total	300	330	630	930	1230

表格 2-2 模拟二抗孵育液配制

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
RI	7.5	8.25	15.75	23.25	30.75
Nuclease-Free Water	52.5	57.75	110.25	162.75	215.25
Total	150	165	315	465	615

表格 2-3 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

表格 2-4 RT QC 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 QC Reagent	85	93.5	178.5	263.5	348.5
RT Additive	5	5.5	10.5	15.5	20.5
RT QC Enzyme	5	5.5	10.5	15.5	20.5
RI	5	5.5	10.5	15.5	20.5
Total	100	110	210	310	410

表格 2-5 组织移除试剂 Mix 配制

组分	1X (μ L)	1X + 10% (μ L)	2X + 10% (μ L)	3X + 10% (μ L)	4X + 10% (μ L)
TR Buffer	392	431.2	823.2	1215.2	1607.2
TR Enzyme	8	8.8	16.8	24.8	32.8
Total	400	440	840	1240	1640