

Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 使用说明书



货号：201SN114
试剂盒版本号：V1.0
文档编号：STOG02002
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 6 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 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

- 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。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司和 / 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。
- 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司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。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不做任何保证，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: ~ 3 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	3
1.5. Stereo-seq 芯片 N 载体介绍	4
1.6. 注意事项	4

第二章 Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装标准操作流程

2.1. 实验前准备	6
2.2. 切片准备与组织切片、捞片	8
2.3. 染色、拍照和解交联 (H&E/ssDNA)	12
2.3.1 H&E 染色、拍照和解交联	12
2.3.2 ssDNA 染色、拍照和解交联	17
2.4. 固定	23
2.5. 透化	24
2.6. FFPE MIX 反应	25
2.7. cDNA 释放与回收	26
2.8. cDNA 纯化与扩增	28
2.8.1 cDNA 纯化	31
2.8.2 cDNA 扩增	32



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

Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装是用于获取 FFPE（福尔马林固定石蜡包埋）样本组织切片全转录本的试剂套装。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、具有高分辨大视场的原位全转录组信息捕获技术。利用带有空间坐标信息的“随机探针”对 FFPE 样本中组织细胞内的 Total RNA 分子进行原位捕获并进行 cDNA 合成与连接，通过空间条形码（Coordinate ID, CID）还原回空间位置，实现单细胞分辨率全转录组空间表达图谱的构建。

利用同一试剂盒套装，可根据研究需求选择同一张组织切片上进行 H&E 染色或细胞核染色，结合强大的分析工具，以单细胞级分辨率灵活开展多模态数据分析。

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



使用本产品构建的文库可使用 DNBSEQ 测序平台进行测序。



时空转录组 FFPE 适配的 SAW 分析流程的入参为：

- `kit-version='Stereo-seq N FFPE V1.0'`
- `sequencing-type='PE75_25+59'`

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 N *1 (4 RXN)
- Stereo-seq 芯片 N 载体 (1cm*1cm) *1 (4 EA)
- STOmics FFPE Accessory Kit *3 (6 PCS)

辅助性耗材：

- (需单独订购) Stereo-seq PCR 适配器 *1 (2 EA)



*Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 V1.0 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。

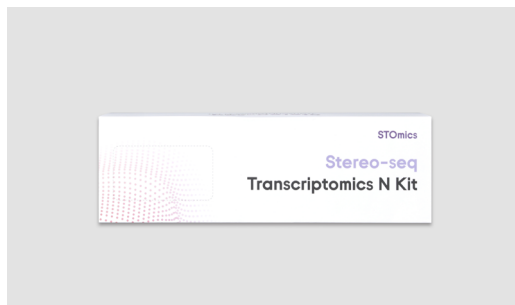


收到 Stereo-seq 芯片载体后，请参照《Stereo-seq 芯片载体保存操作指南》对产品进行正确地保存。

<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 N 试剂组分信息

Stereo-seq 转录组试剂盒 N 货号：201KN114

组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
RI	1000028499	● 橙色	300 μ L × 1
FFPE Mounting Medium	1000047466	● 紫色	100 μ L × 1
FFPE Decrosslinking Reagent	1000047464	● 绿色	1725 μ L × 2
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg × 1
FFPE RT Buffer Mix	1000047460	○ 透明	700 μ L × 1
FFPE RT Oligo	1000047461	○ 透明	44 μ L × 1
FFPE RT Enzyme Mix	1000047462	○ 透明	132 μ L × 1
FFPE Dimer	1000047463	● 黄色	10 μ L × 1
cDNA Release Buffer	1000028512	● 黑色	1725 μ L × 2
cDNA Release Enzyme	1000028511	● 黑色	88 μ L × 1
cDNA Amplification Mix	1000028514	● 蓝色	220 μ L × 1
FFPE cDNA Primer Mix	1000047465	● 蓝色	36 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 N 载体信息

Stereo-seq 芯片 N 载体 (1 cm * 1 cm) 货号: 200CN114		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 N 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 STOmics FFPE Accessory Kit 信息

STOmics FFPE Accessory Kit 货号: 310AK002		
组分信息	货号	规格
夹具	10000033699	3 EA
垫圈	10000033698	3 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

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

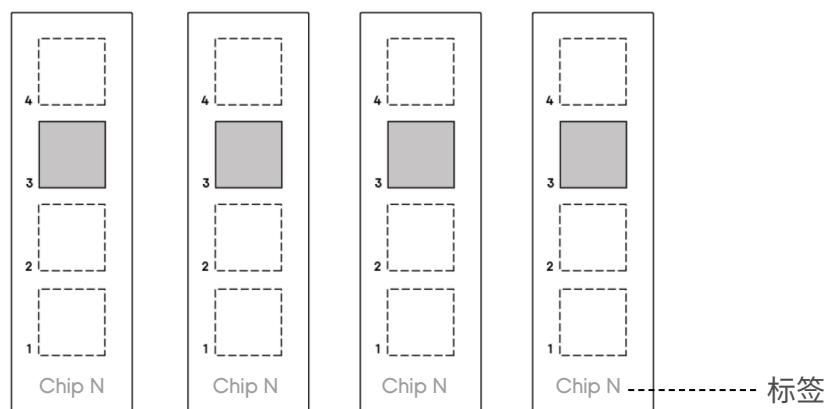
1.4. 需自备物料清单

本实验所需的第三方设备和物料参考《时空转录组 FFPE 生化流程第三方物料需求表》。该表格中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 显微镜评估参考册》。

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

1.5. Stereo-seq 芯片 N 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 N (1 cm*1 cm)。



Stereo-seq 芯片 (N) 载体保存方法

Stereo-seq 芯片 N 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 N 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。



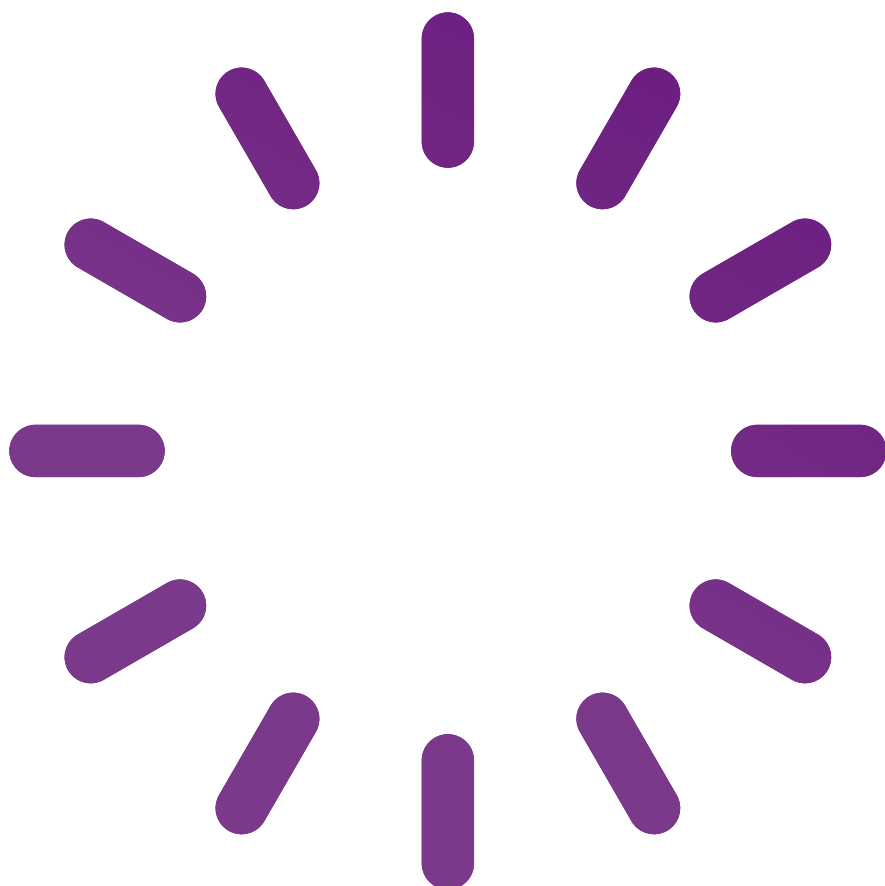
⚠ 需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。

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

Stereo-seq FFPE 转录组 试剂套装标准操作流程



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 (NF-H₂O)。

第一天

准备试剂	准备流程	保存条件
400 mL 30% 乙醇	无水乙醇稀释到 30% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天

第二天

准备试剂	准备流程	保存条件
------	------	------

100 mL 96% 乙醇	无水乙醇稀释到 96% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天
---------------	-------------------------------------	--------

50 mL 90% 乙醇	无水乙醇稀释到 90% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天
--------------	-------------------------------------	--------

50 mL 80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天
--------------	-------------------------------------	--------

50 mL 70% 乙醇	无水乙醇稀释到 70% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天
--------------	-------------------------------------	--------

50 mL 50% 乙醇	无水乙醇稀释到 50% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天
--------------	-------------------------------------	--------

50 mL 30% 乙醇	无水乙醇稀释到 30% (使用 ddH ₂ O)	室温 1 天
--------------	-------------------------------------	--------

苏木素 (索莱宝, G4470) ^H	提前从 4°C 取出, 平衡至室温	室温 ≤ 2 hr
-------------------------------	-------------------	-----------

稀释伊红 ^H	用 70% 乙醇以 2:1 体积比稀释伊红 (2 volume 70% 乙醇: 1 volume 伊红)	室温
-------------------	--	----

50 mL 5X SSC ^H	12.5 mL 20X SSC 加入到 37.5 mL ddH ₂ O 中, 混匀	室温 1 周
---------------------------	--	--------

200 mL 0.1X SSC ^H	1 mL 20X SSC 加入到 199 mL ddH ₂ O 中, 混匀	室温 1 周
------------------------------	--	--------

200 μL 5X SSC ^S	50 μL 20X SSC 加入到 150 μL ddH ₂ O 中, 混匀	室温 1 周
----------------------------	---	--------

50 mL 0.1X SSC ^S	250 μL 20X SSC 加入到 49.75 mL ddH ₂ O 中, 混匀	室温 1 周
-----------------------------	--	--------

FFPE Mounting Medium ^{H/S}	提前从 -20°C 取出待其融化, 后建议保存于室温	室温
-------------------------------------	----------------------------	----

ssDNA 染色液 ^S	189 μL 5X SSC、加 Qubit ssDNA Reagent 1 μL、加 RI 10 μL, 混匀	现配现用, 室温放置
------------------------	---	------------

TE Buffer (pH9.0) ^H	提前从 4°C 取出, 平衡至室温	室温 ≤ 2 hr
--------------------------------	-------------------	-----------

FFPE Decrosslinking Reagent	提前从 -20°C 取出, 平衡至室温并摇匀至无沉淀 (可于 > 50°C 环境溶解沉淀, 再恢复至室温)	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 1 mL 每次实验)	室温 48 hr
-----------	--	----------



所列试剂中, 上标 “H” 的试剂适用于 H&E 染色 / 脱色, 上标 “S” 的试剂适用于 ssDNA 染色, 上标 “H/S” 的试剂为两种染色方案都需要。



第二天

准备试剂	准备流程	保存条件
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, 于 -20°C 冻存一个月)	-20°C 一个月
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, 不超过 6 hr
0.1X SSC	10 μ L 20X SSC 加入到 1990 μ L NF-H ₂ O 中, 混匀	室温 1 周
0.1X SSC (含 5% RI)	取 190 μ L NF-H ₂ O 配制的 0.1X SSC, 添加 10 μ L RI, 混匀	使用期间置于冰上
FFPE RT Buffer Mix	提前从 -20°C 取出, 室温融化并摇匀至无沉淀后, 置于冰上	使用期间置于冰上
FFPE Dimer	提前从 -20°C 取出, 在冰上融化, 置于冰上	使用期间置于冰上
FFPE RT Oligo	提前从 -20°C 取出, 在冰上融化, 置于冰上	使用期间置于冰上

第三天

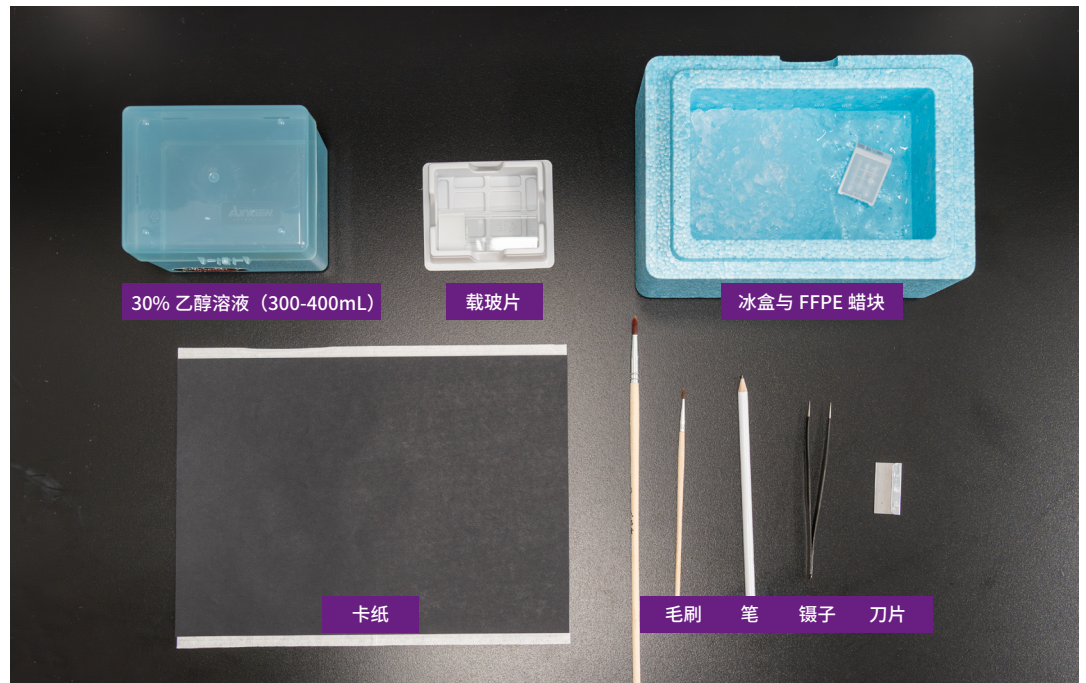
准备试剂	准备流程	保存条件
cDNA Release Buffer	提前取出放于 55°C 溶解, 摇匀至无沉淀, 再恢复至室温, 后可保存于室温	室温
磁珠	提前取出, 室温放置 30 min 平衡	4°C
10 mL 80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80% (使用 NF-H ₂ O)	室温 1 天
cDNA Amplification Mix	提前从 -20°C 取出, 在冰上融化, 置于冰上	使用期间置于冰上
FFPE cDNA Primer Mix	提前从 -20°C 取出, 在冰上融化, 置于冰上	使用期间置于冰上
TE Buffer pH8.0	室温保存, 直接取用	室温

准备仪器

准备仪器	准备流程	备注
PCR 仪	85°C 用于 H&E 脱色 (热盖 85°C)	检查 PCR 仪是否有异常, 必要时更换
	95°C 用于解交联 (热盖 85°C)	
	37°C 用于烤片和透化步骤 (热盖 42°C)	
	42°C 用于烤片和 FFPE MIX 反应步骤 (热盖 45°C)	
	55°C 用于 cDNA 释放 (热盖 60°C)	
	95°C、98°C、58°C、72°C 反应温度用于 PCR 扩增程序 (105°C 热盖)	

2.2. 切片准备与组织切片、捞片

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 30% 乙醇	120 mL 无水乙醇加入到 280 mL ddH ₂ O 中，混匀，加入容器中	捞片，现配现用



 该流程建议由具有丰富经验的石蜡切片技术人员操作。

a. 提前开启摊烤片一体机，设置水浴温度 40~48°C（医院病理科可按照各自常用的水浴温度温度设置），烤片温度 42°C；




 如无摊烤片一体机，可采用摊片水浴锅配合 PCR 仪替代，提前装置 PCR 适配器 (adaptor) 到 PCR 仪上，设置程序如下并点击运行：

表格 2-1 烤片程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
45°C热盖	on
42°C	∞
42°C	3 hr
37°C	∞

- b. 准备好石蜡切片机，准备毛刷、镊子以及新的刀片；准备 30% 乙醇（300~400 mL），装于 1 mL 或 200 μ L 枪头盒内（或其他可以承装液体的宽口容器）；
- c. 取出 FFPE 蜡块，置于冰水混合物中 **10-30 min**；或将组织面贴在冷却台上冷敷 **5-10 min**；


 当蜡块是脂肪含量高的组织（如乳腺组织）时，可以将蜡块置于 -20°C 冷冻 10 min 再切片。

- d. 切片前擦拭蜡块表面及周围水迹，固定在切片机上准备切片，若组织包埋较深，可以先用旧刀片修除多余的蜡，切到组织暴露后，锁住刀头，换新的刀片进行切片；



- e. 调整切片厚度，普通组织建议 5 μm 、脂肪含量高的组织（如乳腺组织）建议 4 μm （为降低后续操作中的脱片风险）进行切片；
- f. 正式切片时，首先将第 1 片丢弃（厚度不符合要求）；
- g. 在随后的切片过程中选出需要的目标切片，用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体；




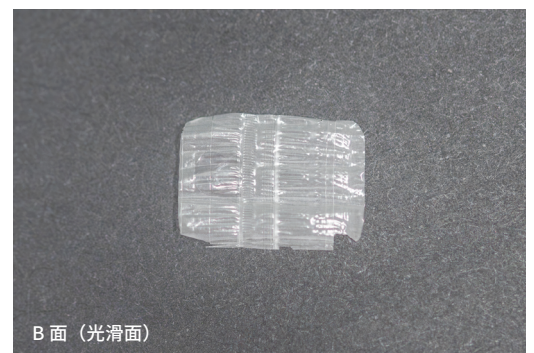
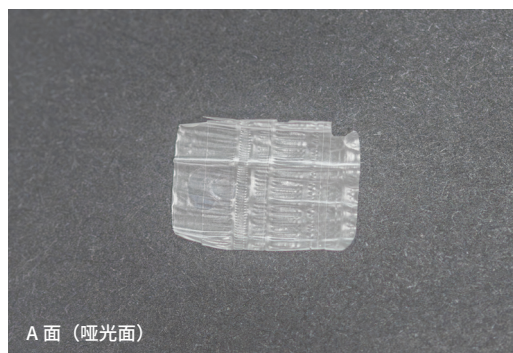
 如需保留相邻切片，则可连续切 3 片，将第 1 片和第 3 片贴于粘附载玻片用于后续 H&E 染色；小心分割出第 2 片用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体；



 蜡片样本可以直接寄送，注意事项见《时空实验样本准备操作指南》- 第五章 时空转录组 FFPE 样本准备流程（STOG00004）。



 一张石蜡切片分 AB 面，正对切片操作人员的一面为 A 面（哑光面），贴于刀刃的面为 B 面（光滑面）；后续操作始终保持 B 面朝下，贴于液体、芯片和玻片，以防脱片。



- h. 将目标切片修剪至芯片大小合适的尺寸（以 1 cm × 1cm 芯片为例，修剪至切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），将修剪后的蜡片用毛刷或镊子小心转移至 30% 乙醇中预展片，注意保持 B 面朝下贴于 30% 乙醇；

⋯ 如需保留严格相邻切片，则建议两张邻片分开转移至 30% 乙醇和水浴锅，后续捞片时分别贴于两张粘附载玻片，做好标记便于区分。

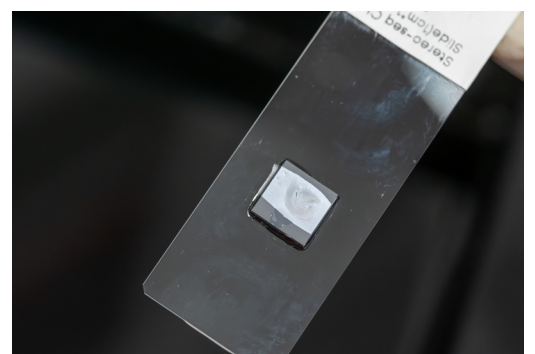
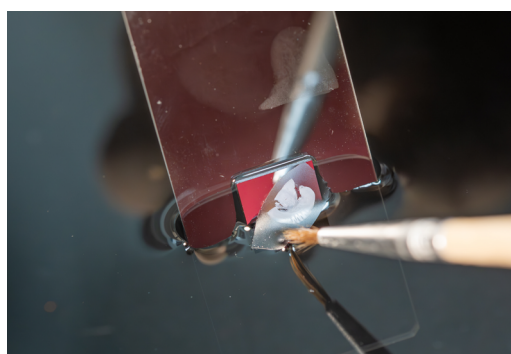
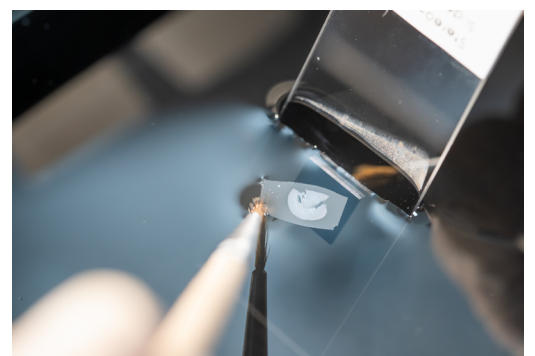
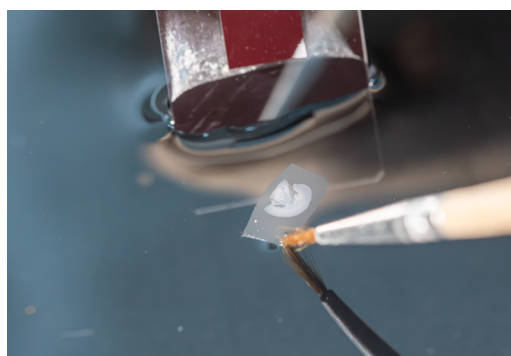
☰ 该步骤用于辅助转移切片至水浴锅中，可确保展片顺利，若由经验丰富的实验师操作，可跳过该步骤。

- i. 确认水浴锅预热到目标温度（40~48℃），用干净的普通载玻片将蜡片从 30% 乙醇溶液捞起，转移至预热好的水浴锅中，保持 B 面朝下接触水面；

☰ 建议切片新手注意观察切片组织在水浴锅中的状态。

组织状态	原因	操作
组织部分完全展平无褶皱	正常	按实验说明开展下一步
组织部分一直有褶皱	温度过低	调高水浴锅温度 0.5 -1℃，继续观察，直到组织完全展平
组织周围的蜡有融化迹象	温度过高	停止加热并添加少量冷水，并准备立即捞片

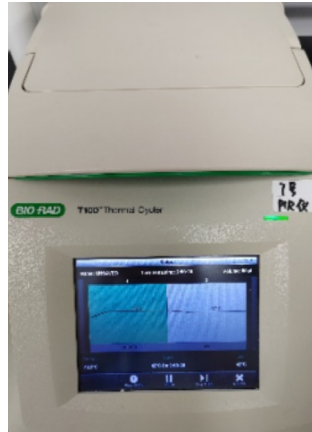
- j. 组织切片完全展平后，取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，记录芯片编号，注意不要触碰芯片表面；
- k. 用毛刷轻轻抵住已展平的切片一角，将芯片载体靠近组织，使组织切片的 B 面能够覆盖到 Stereo-seq 芯片 N 载体上的芯片，离开水面完成贴片（捞片）。如需保留邻片做 H&E 等，将邻片用粘附载玻片捞片即可；





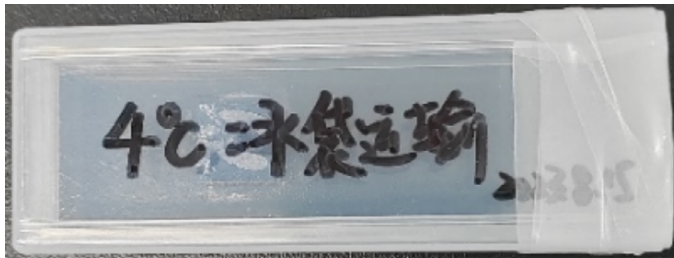
! 贴到 Stereo-seq 芯片 N 载体的组织区域，需要有明显的组织特征（如肠绒毛结构、免疫细胞明显聚集等），以便于获得捕获矩阵后，同 H&E 图像进行配准；若所选区域组织特征不明显，建议组织在贴芯片时留出约 15% 的留白区域，以便进行 H&E 图像配准。

- l. 用无尘纸小心擦去载体背面及芯片四周的水迹，平放在 PCR 适配器 (adaptor) 上，点击 edit 并点击 next step，跳过 42°C ∞，42°C 烤 3 hr 后 37°C 烤过夜。如需保留邻片，将捞片后的粘附载玻片按常规 H&E 染色流程进行操作即可；



停止点：

- 将烤干的 Stereo-seq 芯片 N 载体放入玻片保存盒中，盖上盖子，置于 25°C 或 37°C 烘箱中，可存放 48 hr；或置于 4°C 并添加干燥剂保存 1 周。



☰ 蜡片样本可以直接寄送，注意事项见《时空实验样本准备操作指南》- 第五章 时空转录组 FFPE 样本准备流程 (STOG00004)。



- ① 具有丰富切片经验的技师可按照自己的习惯进行切片和贴片操作，贴芯片操作与贴玻片相同；
- ② 注意贴片后，贴到芯片的切片表面应避免出现气泡；
- ③ 烤片也可以使用金属浴，或其他能够准确恒定加热的模块做替代。

2.3. 染色、拍照和解交联 (H&E/ssDNA)

如选择 **H&E 染色**，请按照 **2.3.1** 章节进行实验操作，忽略 **2.3.2** 章节；
如选择 **ssDNA 染色**，请忽略 **2.3.1** 章节，按照 **2.3.2** 章节进行实验操作。

2.3.1. H&E 染色、拍照和解交联

(1) 脱蜡

试剂	准备方法	备注
<input type="checkbox"/> Histo-clear	直接取用，装入 2 个染色缸中 (Histo-clear ① & ②)，体积以插入载体后液体完全没过芯片为宜 (5 片装染色缸需要约 30 mL/ 个)	脱蜡
<input type="checkbox"/> 100% 乙醇	直接取用无水乙醇，装入 2 个染色缸中 (100% 乙醇 ① & ②)，装量同上	脱蜡
<input type="checkbox"/> 96% 乙醇	96 mL 无水乙醇加入 4 mL ddH ₂ O，混匀，装入 2 个染色缸中 (96% 乙醇 ① & ②)，装量同上	脱蜡
<input type="checkbox"/> 90% 乙醇	45 mL 无水乙醇加入 5 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 80% 乙醇	40 mL 无水乙醇加入 10 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 70% 乙醇	35 mL 无水乙醇加入 15 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 50% 乙醇	25 mL 无水乙醇加入 25 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 30% 乙醇	15 mL 无水乙醇加入 35 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> ddH ₂ O	直接从纯水仪取 ddH ₂ O，装入 1 个染色缸中	脱蜡

- 提前开启摊烤片一体机 (或烤片机、金属浴等；或可以使用 PCR 仪 +PCR 适配器 (adaptor))，设置烤片温度 60°C；
- 取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，置于 60°C 烤片机，烤 **1 hr** (斜烤平烤均可)；
- 在通风橱中用染色缸准备：脱蜡试剂 Histo-clear × 2 个、100% 乙醇 × 2 个、96% 乙醇 × 2 个、90% 乙醇 × 1 个、80% 乙醇 × 1 个、70% 乙醇 × 1 个、50% 乙醇 × 1 个、30% 乙醇 × 1 个、ddH₂O × 1 个；
- 将烤好的 Stereo-seq 芯片 N 载体放置到 Histo-clear ① 中，室温 **20 min**；然后取出放到 Histo-clear ② 中，室温 **20 min**；
- 取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，用无尘纸吸掉多余的 Histo-clear，依次放置到

100% 乙醇①中 **5 min**、100% 乙醇②中 **5 min**、96% 乙醇①中 **5 min**、96% 乙醇②中 **5 min**、90% 乙醇中 **2 min**、80% 乙醇中 **2 min**、70% 乙醇中 **2 min**、50% 乙醇中 **2 min**、30% 乙醇中 **2 min**、ddH₂O 中 **1 min**，取出用无尘纸吸掉多余水分；

- f. 脱蜡开始时，可提前从 4°C 取出苏木素，平衡至室温。

(2) H&E 染色

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 苏木素 (索莱宝, G4470)	提前从 4°C 取出，平衡至室温	-
<input type="checkbox"/> 5X SSC	12.5 mL 20X SSC 加入 37.5 mL ddH ₂ O, 装入染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中，体积以插入载体后液体完全没过芯片为宜	清洗苏木素
<input type="checkbox"/> 返蓝试剂	取约 30-40 mL 返蓝试剂，装入染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中	-
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC	取 0.1X SSC 30-40 mL，分别装入 2 个染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中	清洗返蓝、伊红
<input type="checkbox"/> 70% 乙醇	14 mL 无水乙醇加入 6 mL ddH ₂ O，混匀，总计 20 mL	稀释伊红
<input type="checkbox"/> 100% 乙醇	取适量无水乙醇加入到 6 cm 或 9 cm 培养皿中	清洗盖玻片
<input type="checkbox"/> 稀释伊红	20 mL 70% 乙醇加入 10 mL 伊红 (Abcam 「AB246824」)，混匀，装入染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中	-
<input type="checkbox"/> FFPE Mounting Medium	提前从 -20°C 取出平衡至室温	封片

- a. 用适量 NF-H₂O 润洗芯片一遍，使芯片湿润有利于染色，然后滴加 1 mL 平衡至室温的苏木素到芯片上，覆盖住芯片，室温染色 **2 min**，然后倾斜载体倒掉苏木素；



苏木素平衡至室温才能在芯片上达到理想染色效果。

- b. 将载体浸入装有 5X SSC 的染色缸 (或玻片盒、或 50 mL 离心管)，上下涮洗 5 下，至芯片周围的苏木素洗净；
- c. 将载体浸入装有返蓝试剂的染色缸 (或玻片盒、或 50 mL 离心管)，室温 **2 min**；
- d. 将载体浸入装有 0.1X SSC 的染色缸 (或玻片盒、或 50 mL 离心管) 上下涮洗 5 下；
- e. 将载体浸入装有稀释伊红的染色缸 (或玻片盒、或 50 mL 离心管)，室温染伊红 **1 min** (稀释伊红可重复使用)；


- f. 将玻片浸入装有 0.1X SSC 的染色缸（或玻片盒、或 50 mL 离心管）中，上下涮洗 3 下；
- g. 用气瓶轻轻吹干芯片；将盖玻片放入装有 100% 乙醇的培养皿中，清洗后吹干备用（用气瓶或风扇），此步骤为了减少后续拍照时由盖玻片带入的杂质；
- h. 滴加 5 μ L FFPE Mounting Medium（1000047466）到芯片中间，用清洗晾干后的盖玻片封片（注意不要带入气泡），准备拍照。

(3) H&E 拍照（以 Motic 为例）

- a. 使用荧光显微镜，选择落射荧光（彩色）模式，选择 BF-Epi 通道，将彩色 / 黑白推拉杆推入机器，将光源散射片推入；
- b. 在载物台上滴加 1-2 μ L 水，小心地将载玻片放在载物台上；
- c. 在连接荧光显微镜的电脑中新建文件夹，可以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；
- d. 将芯片调至镜头正下方，调节合适的灯光和增益和曝光，通过调节粗准焦螺旋和微调细准焦螺旋进行对焦，框选芯片所在区域，在 4X 物镜下扫描地图；
- e. 扫描地图完成后，将物镜调至 10X，调节灯光（通常 30 左右）、增益（拉到最小）和曝光（注意不要过曝）等参数，可看清组织形态与 track 线；
- f. 白平衡：将视野移动到空白区域，点击自动白平衡按钮进行白平衡，如果没有完整的区域，可点击“自定义”手动圈选一块白色背景区域；
- g. 背景平衡：用鼠标滚轮调整 Z 轴至 200 μ m 左右，用机械旋钮对焦后，进行虚焦：找到一块无组织覆盖、无明显杂质的芯片视野，用鼠标滚轮上调焦距使 Z 轴至 250-400 μ m 进行虚焦，若上一步选择的区域有细小杂质，虚焦后杂质基本看不清楚，最后点击“背景平衡”；
- h. 点击回组织区域内，选择手动扫描 - 手动建模，框选所需组织区域，移动并使用鼠标滚轮进行对焦，并选择 4-6 个建模点（尽量分散在组织各个方向，如果组织不平整起伏较大，可以酌情增加建模点），完成以后点击扫描切片，保存图像。
- i. 打开 StereoMap 软件的 Tools->ImageQC 模块，上传 H&E 染色图，并参考《StereoMap 用户手册》来进行图像 QC。



 获得的 H&E 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。



 如果有多张芯片需要进行拍照，一般不需要重新进行背景平衡。

 成像效果不佳时也可重新进行拍照。

(4) H&E 脱色和解交联

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC	取 0.1X SSC 30-40 mL, 装入 1 个染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中	浸泡、取盖玻片
<input type="checkbox"/> TE Buffer (pH9.0)	提前从 4°C取出平衡至室温	H&E 脱色
<input type="checkbox"/> FFPE Decrosslinking Reagent	提前从 -20°C取出平衡至室温并摇匀至无沉淀 (可于 > 50°C环境溶解沉淀, 再恢复至室温)	解交联

- 拍照后, 将盖有盖玻片的载体浸于 30-40 mL 0.1X SSC 的染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中, 使盖玻片自然脱落, 上下移动载体以清洗芯片表面, 用无尘纸擦拭芯片周围液体, 芯片无需吹干;
- 按照《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;
- 提前装载 PCR 适配器 (adaptor) 到 PCR 仪上, 设置程序如下并点击运行:

表格 2-2 脱色和解交联程序设置

程序选择: Incubate	
温度	时间
85°C热盖	on
85°C	∞
85°C	20 min
30°C	5 min
30°C	∞
95°C	30 min
4°C	∞

- 将 Stereo-seq 芯片 N 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;
- 在载具芯片的孔中加入平衡至室温的 400 μ L TE Buffer (pH9.0), 室温放置 **1 min** 进行润洗, 然后吸弃液体;
- 在载具芯片的孔中再加入平衡至室温的 400 μ L TE Buffer (pH9.0), 贴好封板膜, 封住孔位;
- 当 PCR 仪运行至 85°C ∞ 步骤时, 将手持载具置于 PCR 适配器 (adaptor) 上, 点击 edit 并点击 next step, 跳过 85°C ∞ ;



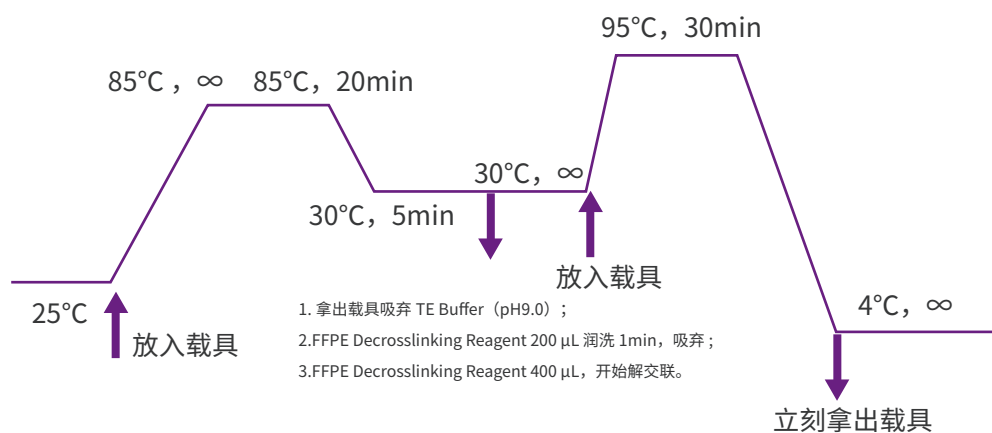
 不要预热 TE buffer, 否则易造成脱片。

- h. 当 PCR 仪运行至 30°C ∞ 步骤时，取下载具，吸弃 TE Buffer (pH9.0) ；
- i. 在载具芯片的孔中加入 200 μL FFPE Decrosslinking Reagent (1000047464) ，润洗芯片 **30 s -1 min**，吸弃液体；
- j. 在载具芯片的孔中加入 400 μL FFPE Decrosslinking Reagent (1000047464) ，贴好封板膜，封住孔位；
- k. 将手持载具置于 PCR 适配器 (adaptor) 上，点击 edit 并点击 next step，跳过 30°C ∞；
- l. 此时将甲醇加入染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管内，置于 -20°C 预冷 **5-30 min**；
- m. 待反应结束后，小心移动带有载具的 Stereo-seq 芯片 N 载体至就近实台上并撕掉封板膜（或在 PCR 适配器 (adaptor) 上撕掉贴膜），吸弃 FFPE Decrosslinking Reagent；
- n. 卸下载具，丢弃垫圈和夹具。



 夹具 95°C 加热后会变形，无法夹紧，易造成漏液，需丢弃，后续步骤更换新的使用。

 该步骤结束后，立刻按照 **2.4 固定** 开展后续实验。



2.3.2. ssDNA 染色、拍照和解交联

(1) 脱蜡

试剂	准备方法	备注
<input type="checkbox"/> Histo-clear	直接取用，装入 2 个染色缸中 (Histo-clear ① & ②)，体积以插入载体后液体完全没过芯片为宜 (5 片装染色缸需要约 30 mL/ 个)	脱蜡
<input type="checkbox"/> 100% 乙醇	直接取用无水乙醇，装入 2 个染色缸中 (100% 乙醇 ① & ②)，装量同上	脱蜡
<input type="checkbox"/> 96% 乙醇	96 mL 无水乙醇加入 4 mL ddH ₂ O，混匀，装入 2 个染色缸中 (96% 乙醇 ① & ②)，装量同上	脱蜡
<input type="checkbox"/> 90% 乙醇	45 mL 无水乙醇加入 5 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 80% 乙醇	40 mL 无水乙醇加入 10 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 70% 乙醇	35 mL 无水乙醇加入 15 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 50% 乙醇	25 mL 无水乙醇加入 25 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> 30% 乙醇	15 mL 无水乙醇加入 35 mL ddH ₂ O，混匀，装入 1 个染色缸中	脱蜡
<input type="checkbox"/> ddH ₂ O	直接从纯水仪取 ddH ₂ O，装入 1 个染色缸中	脱蜡

- 提前开启摊烤片一体机 (或烤片机、金属浴等；或可以使用 PCR 仪 +PCR 适配器 (adaptor))，设置烤片温度 60°C；
- 取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，置于 60°C 烤片机，烤 **1 hr** (斜烤平烤均可)；
- 在通风橱中用染色缸准备：脱蜡试剂 Histo-clear × 2 个、100% 乙醇 × 2 个、96% 乙醇 × 2 个、90% 乙醇 × 1 个、80% 乙醇 × 1 个、70% 乙醇 × 1 个、50% 乙醇 × 1 个、30% 乙醇 × 1 个、ddH₂O × 1 个；
- 将烤好的 Stereo-seq 芯片 N 载体放置到 Histo-clear ① 中，室温 **20 min**；然后取出放到 Histo-clear ② 中，室温 **20 min**。
- 取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，用无尘纸吸掉多余的 Histo-clear，依次放置到 100% 乙醇 ① 中 **5 min**、100% 乙醇 ② 中 **5 min**、96% 乙醇 ① 中 **5 min**、96% 乙醇 ② 中 **5 min**、90% 乙醇中 **2 min**、80% 乙醇中 **2 min**、70% 乙醇中 **2 min**、50% 乙醇中 **2 min**、30% 乙醇中 **2 min**、ddH₂O 中 **1 min**，取出用无尘纸吸掉多余水分，在通风橱中晾干芯片。

(2) ssDNA 染色

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 5X SSC	100 μ L 20X SSC 加入到 300 μ L ddH ₂ O 中, 混匀	配制 ssDNA 染色液用
<input type="checkbox"/> ssDNA 染色液	189 μ L 5X SSC、加 Qubit ssDNA Reagent 1 μ L、加 RI 10 μ L, 混匀	染细胞核
<input type="checkbox"/> FFPE Mounting Medium	提前从 -20°C 取出平衡至室温	-
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC	250 μ L 20X SSC 加入到 49.75 mL ddH ₂ O 中, 混匀	清洗、浸泡、取盖玻片

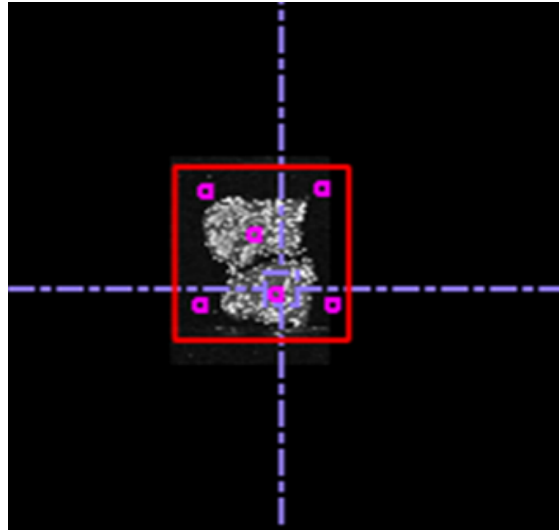
- 滴染 ssDNA 染色液: 不上载具, 从芯片四角滴染 ssDNA 染色液 150 μ L 到芯片上, 常温避光染色 **5 min**;
- 清洗: 吸弃 ssDNA 染色液, 滴加 150 μ L 0.1X SSC 到芯片上, 清洗芯片, 重复 2 次;
- 封片拍照: 吹干芯片, 准备盛有 100% 的酒精培养皿用于清洗盖玻片, 盖玻片清洗后吹干备用。然后滴加 3-5 μ L FFPE Mounting Medium 封片拍照 (注意组织不要有气泡);

(3) 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。

- 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;
- 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, 模式选择: 选择落射荧光, 选择 10 倍镜、指定染色通道 ssDNA 染色 (FITC 通道);
- 框选视野: 框选芯片, 减少芯片外区域;
- 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，将增益调至最小，参考拍照注意事项 e 确定最终拍照参数，点击扫描切片，待拍照完成，保存图像；
- f. 打开 StereoMap 软件的 Tools->ImageQC 模块，上传 ssDNA 染色图，并参考《StereoMap 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)。

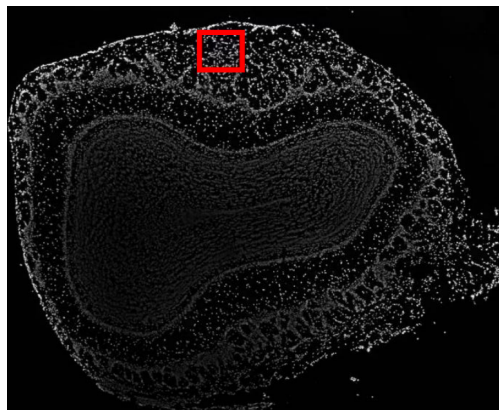
⚠ 如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，继续实验。实验结束可联系 FAS 帮助排查问题。

拍照注意事项

- a. 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；
- b. 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；



- c. 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；
- d. 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；
- e. 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；



- f. 如果在封片过程中，存在较大区域 (超过 4 个视野大小) 未被 FFPE Mounting Medium 浸润，则需要对此区域增加建模点；
- g. 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：

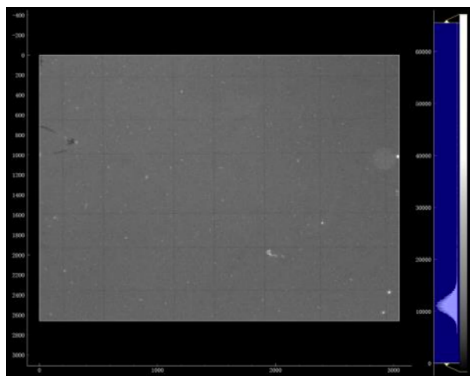


图 a

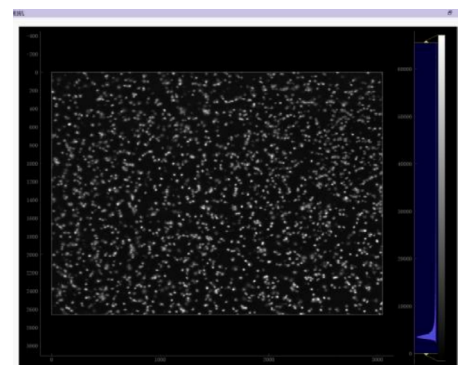
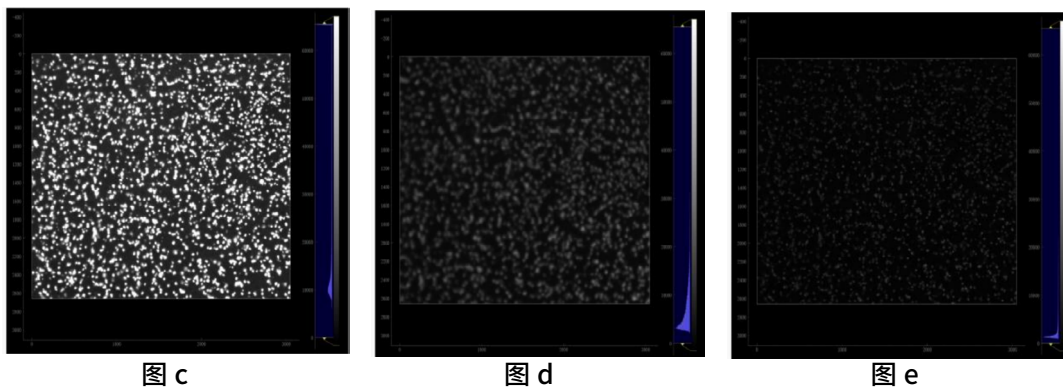


图 b

- 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 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）。

(4) 解交联

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC	使用 ssDNA 染色时配制的 0.1X SSC 即可	清洗、浸泡、取盖玻片
<input type="checkbox"/> FFPE Decrosslinking Reagent	提前从 -20°C 取出平衡至室温并摇匀至无沉淀 (可于 > 50°C 环境溶解沉淀, 再恢复至室温)	解交联

- 清洗封片剂: 拍照后, 将盖有盖玻片的载体浸于 30-40 mL 0.1X SSC 的染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中, 使盖玻片自然脱落, 上下移动载体以清洗芯片表面, 用无尘纸擦拭芯片周围液体, 芯片无需吹干;
- 按照《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; 提前将 FFPE Decrosslinking Reagent 平衡至室温;
- 提前装载 PCR 适配器 (adapter) 到 PCR 仪上, 设置程序如下并点击运行:

表格 2-3 解交联程序设置

程序选择: Incubate	
温度	时间
85°C 热盖	on
30°C	∞
95°C	30 min
4°C	∞

- 在载具芯片的孔中加入 400 μ L FFPE Decrosslinking Reagent, 贴好封板膜, 封住孔位;
- 将手持载具置于 PCR 适配器 (adaptor) 上, 点击 edit 并点击 next step, 跳过 30°C ∞ ;
- 此时将甲醇加入玻片盒或 50 mL 离心管内, 置于 -20°C 预冷 **5-30 min**;
- 待反应结束后, 小心移动带有载具的 Stereo-seq 芯片 N 载体至就近实验台上并撕掉封板膜 (或在 PCR 适配器 (adaptor) 上撕掉贴膜), 吸弃 FFPE Decrosslinking Reagent;
- 卸掉载具, 丢弃垫圈和夹具。

 夹具 95°C 加热后会变形, 无法夹紧, 易造成漏液, 需丢弃, 后续步骤更换新的使用。

 该步骤结束后, 立刻按照 **2.4 固定** 开展后续实验。



2.4. 固定

试剂	准备方法（1片用量）	备注
<input type="checkbox"/> 甲醇	取 30-40 mL，装入 1 个染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中，放入 -20°C 预冷	-

- 待 Stereo-seq 芯片 N 载体冷却至室温后（取下后约 **1 min** 即可冷却至室温），放入在 -20°C 预冷的甲醇染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中，固定 **20 min**；
- 固定好后，将染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管转移到通风橱中；
- 将芯片载体取出，用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的甲醇，确保芯片间缝隙无液体残留；
- 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。

2.5. 透化

试剂	准备方法 (1片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 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 1 mL 每次实验)	-
<input type="checkbox"/> 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, 于 -20°C 冻存一个月)	-
<input type="checkbox"/> 1X 透化试剂工作液	10X 透化试剂储存液 20 μ L 用 0.01N HCl 稀释到 200 μ L (至少 200 μ L/ 芯片)	-
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC	10 μ L 20X SSC 加入到 1990 μ L NF-H ₂ O 中, 混匀	-
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC (含 5% RI)	取 190 μ L NF-H ₂ O 配制的 0.1X SSC, 添加 10 μ L RI, 混匀	-

- 在固定期间, 根据 **【2.1 实验前准备】**, 提前配制 2 mL 0.01N HCl, 准备好 10X 透化试剂储存液;
- 配制 1X 透化试剂工作液 (现用现配): 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), 置于冰上;
- 提前装载 PCR 适配器 (adaptor) 到 PCR 仪上, 设置程序如下并点击运行:

表格 2-4 透化程序设置

程序选择: Incubate	
温度	时间
42°C 热盖	on
37°C	∞
37°C	30 min
25°C	∞

- 更换新的垫圈和夹具, 组合成手持载具;
- 加 1X 透化试剂工作液, 200 μ L/ 孔, 从芯片的一角加入 1X 透化试剂工作液, 保证液体完全盖住芯片, 用封板膜对手持载具进行封口;
- 在 PCR 仪运行至 37°C ∞ 时, 将载具放置在 PCR 适配器 (adaptor) 上, 点击 edit 并点击 next step, 跳过 37°C ∞ , 37°C 反应 **30 min**;
- 待反应结束后, 小心移动带有载具的 Stereo-seq 芯片 N 载体至就近实验台并撕掉贴膜 (或在 PCR 适配器 (adaptor) 上撕掉贴膜), 吸弃 1X 透化试剂工作液;
- 用 0.1X SSC (含 5% RI) 洗一次, 200 μ L/ 孔。

2.6. FFPE MIX 反应

- a. 在等待透化期间，提前按照表格 2-5 配制 FFPE MIX 反应液：

表格 2-5 FFPE MIX 反应液配制

组分	单个反应体积
FFPE RT Buffer mix	158 μ L
FFPE RT Enzyme mix	30 μ L
FFPE RT Oligo	10 μ L
FFPE Dimer	2 μ L
Total	200



- FFPE RT Oligo 和 FFPE Dimer 提前置于冰上融化。

- b. 提前装载 PCR 适配器 (adaptor) 到 PCR 仪上，按照表格 2-6 设置程序如下并点击运行：

表格 2-6 杂交程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
45°C热盖	on
42°C	∞

- c. 加入 FFPE MIX 反应液，200 μ L / 孔，贴封板膜封孔；
- d. 在 PCR 仪运行至 42°C ∞ 时，将载具放置在 PCR 适配器 (adaptor) 上，42°C 孵育过夜 (5-24 hr) ；

2.7. cDNA 释放与回收

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 0.1X SSC	使用透化时配制的 0.1X SSC 即可	-
<input type="checkbox"/> cDNA Release Buffer	提前取出放于 55°C 溶解, 摇匀至无沉淀, 再恢复至室温, 后可保存于室温	室温
<input type="checkbox"/> NF-H ₂ O	取 500 μL NF-H ₂ O, 在回收开始时放入 55°C 预热	-

- 从 PCR 适配器 (adaptor) 上取下载体, 吸弃 FFPE MIX 反应液, 用 0.1X SSC 洗一次, 200 μL/ 孔;
- 按照表格 2-7 配制 cDNA Release Mix, 室温放置;

表格 2-7 cDNA Release Mix 配制方法及反应条件

组分	单个反应体积
cDNA Release Enzyme	20 μL
cDNA Release Buffer	380 μL
Total	400

- 提前装载 PCR 适配器 (adaptor) 到 PCR 仪上, 按照表格 2-8 设置程序并点击运行:

表格 2-8 cDNA Release 反应程序设置

程序选择: Incubate	
温度	时间
60°C 热盖	on
55°C	5-24 hr
55°C	∞

- 加入 cDNA Release Mix (用量为 400 μL / 孔), 封板膜封好孔, 然后放置于 PCR 适配器 (adaptor) 上, 55°C **5 hr** (最长可放置 **24 hr**); 同时取 NF-H₂O 置于 55°C 预热, 每张芯片准备 500 μL;



停止点: cDNA 释放步骤可反应过夜。如果反应过夜, 应确保封板膜的密封性。



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。

- e. 反应结束后，将反应孔内液体完全回收到新的 2.0 mL 离心管内；
- f. 加入 55°C 预热的 NF-H₂O 清洗反应孔芯片（用量为 350 μL/孔），并收集到同一个 2.0 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 NF-H₂O 350 μL，合并后进行下一个步骤。

2.8. cDNA 纯化与扩增

试剂	准备方法 (1 片用量)	备注
<input type="checkbox"/> 磁珠	提前取出，室温放置 30 min 平衡	4°C 保存
<input type="checkbox"/> 80% 乙醇	使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇	-
<input type="checkbox"/> NF-H ₂ O	使用 cDNA 释放与回收时的 NF-H ₂ O	-
<input type="checkbox"/> TE Buffer pH8.0	直接取用	室温

背景信息

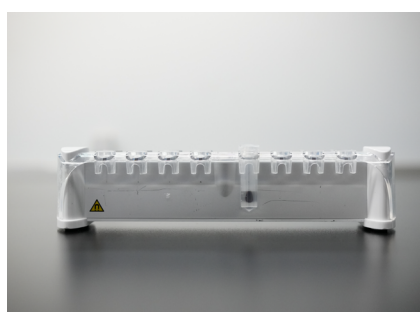
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

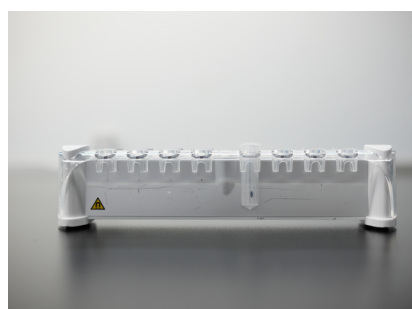
- 提前 **30 min** 从 4°C 取出，涡旋混匀且平衡至室温，有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吸打，确保充分混匀。
- 磁珠用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高，纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

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 pH8.0 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 pH8.0 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。



2.8.1. 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，室温平衡；
- b. 1.0X 磁珠 cDNA 纯化步骤；
 - 1) 将上一步回收液（约 750 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**，至液体澄清；
 - 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 1.5 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) 重复一次步骤 4) ；
 - 6) 将离心管保持在磁力架上，室温风干 **5-15 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
 - 7) 加 44 μL NF-H₂O 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（~42 μL cDNA）转移至新的 0.2 mL PCR 管中；
- c. 如果上述回收样品不足 42 μL ，用 NF-H₂O 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）。

2.8.2. cDNA 扩增

- a. 按照表格 2-9 配制 PCR Mix, 共 100 μL ;

表格 2-9 PCR Mix

组分	单个反应体积
回收样本	42 μL
cDNA Amplification Mix	50 μL
FFPE cDNA Primer Mix	8 μL
Total	100

- b. 瞬时离心, 按照表格 2-10 PCR 程序进行扩增;

表格 2-10 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	∞	-

- c. 按照表格 2-11 准备 Qubit dsDNA HS Kit 测定 PCR 产物浓度并记录;

表格 2-11 Qubit dsDNA HS Kit

组分	1X (μL)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	198
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1
PCR 产物	1
Total	200

- 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 10 ng/ μL 。

- e. 对 PCR 产物进行 1.0X 磁珠纯化:

- 1) 将 PCR 产物 (100 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 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 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;

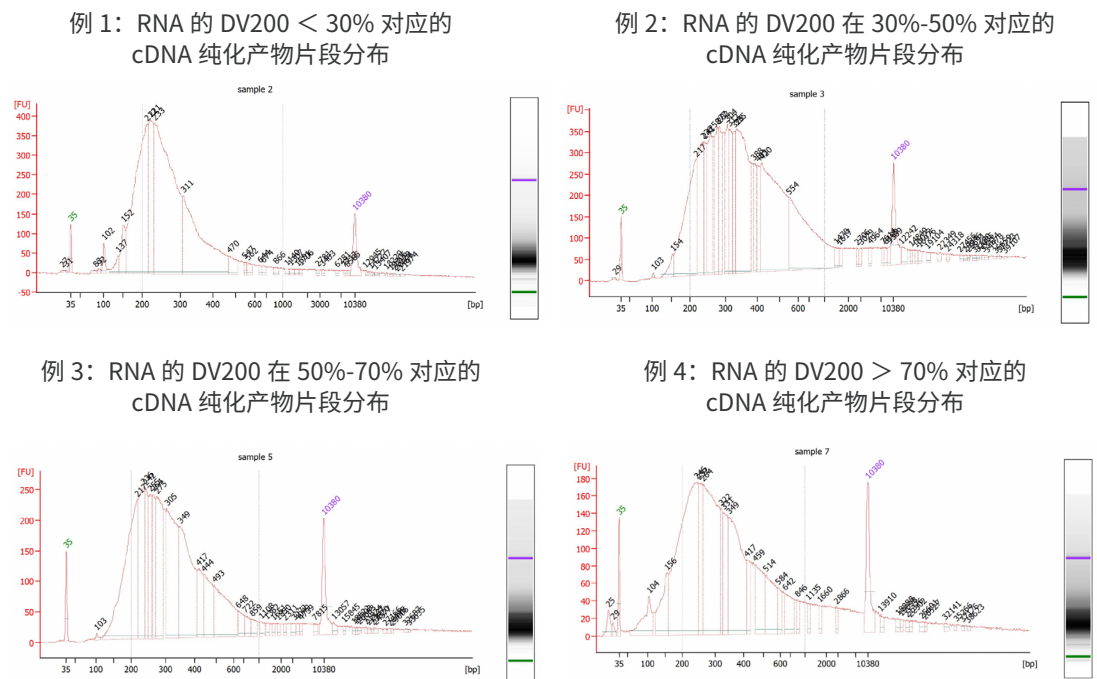
6) 加 42 μL 的 TE Buffer pH8.0 回溶, 震荡混匀后室温静置 **5 min**, 瞬时离心, 磁力架静置 **3-5 min**, 待液体澄清后将上清 (~40 μL) 转移到新的 1.5 mL 离心管中。

— 此步骤可停止, 样本 -20°C 下可保存 1 个月。

f. 取 1 μL 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。

QC cDNA 纯化产物片段分布主峰一般在 150-350 bp (如图一), 纯化后产量通常大于 300 ng。



图一 . cDNA 纯化产物片段分布图

— 停止点:

- cDNA 纯化产物可在 -20°C 下保存 1 个月。

◎ 后续文库构建具体操作参考《Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 V1.0 使用说明书》。