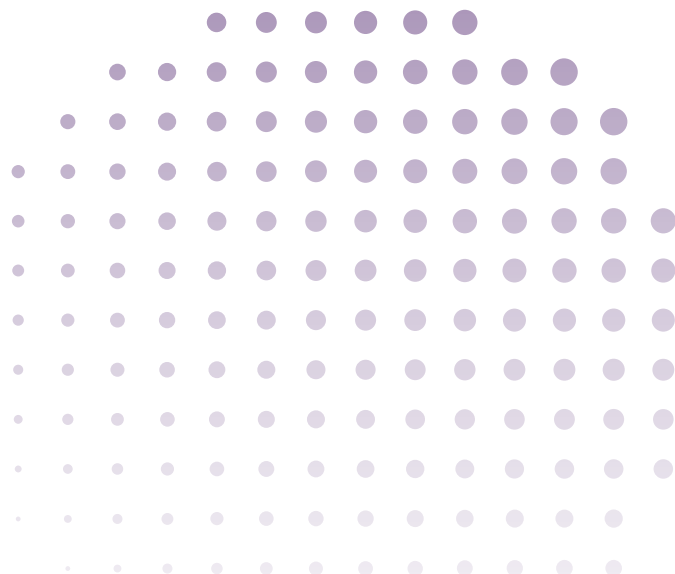




Stereo-seq 定制化芯片转录组试剂套装 ($\leq 2\text{cm} \times 3\text{cm}$) 使用说明书

试剂套装货号及名称：

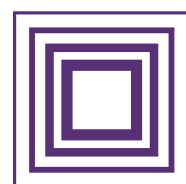
101ST122 (2 RXNs) Stereo-seq 转录组试剂套装 (1cm*2cm)

101ST221 (1 RXNs) Stereo-seq 转录组试剂套装 (2cm*2cm)

101ST231 (1 RXNs) Stereo-seq 转录组试剂套装 (2cm*3cm)

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： V1.0
修订日期： 2023 年 6 月
修订内容摘要： 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。
2022 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。

目录



第一章 产品介绍	01	第二章 样本准备	06
1.1 产品描述	02	2.1 包埋说明	07
1.2 测序指南	02	2.2 样本准备	07
1.3 试剂套装组成	02	2.3 样本要求	07
1.4 需自备物料清单	04	2.3.1 样本类型	07
1.5 注意事项	05	2.3.2 样本包埋组织 RNA 完整值 RIN	07
		2.4 样本包埋	08
		2.5 样本的保存和运输	11
第三章 STOmics® Stereo-seq 定制化芯片		第四章 文库构建	28
转录组试剂套装标准操作流程(新鲜冷冻样本)	12	4.1. 实验前准备	30
3.1 实验前准备	13	4.2. cDNA 打断与扩增	30
3.2 切片准备	14	4.3. PCR 产物双选	32
3.3 芯片处理与组织贴片	15	第五章 文库结构和测序	33
3.4 组织固定	15	5.1. 文库结构	34
3.5 荧光染色	16	5.2. 适配测序仪	34
3.6 荧光拍照	16	5.3. 文库测序类型	34
3.7 组织透化	17	附录	35
3.8 反转录反应	18	附录 A：PCR Barcode Primer Mix	35
3.9 组织去除	21	使用规则	
3.10 cDNA 释放与回收	22		
3.11 cDNA 纯化与扩增	23		
3.11.1 cDNA 纯化	24		
3.11.2 cDNA 扩增	25		



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： 您可以在这里暂停实验并存储样品。

01

产品介绍



1.1 产品描述

STOmics® Stereo-seq 定制化芯片转录组试剂套装是用于制备组织切片样本全转录本 3' 端文库构建的试剂套装。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。Stereo-seq 芯片 T（时空 poly-T 芯片）上装载具有空间坐标信息的捕获探针，探针与组织切片结合后，在芯片上原位抓取组织内的 mRNA 分子并进行 cDNA 合成，通过测序和配套的可视化系统，获取全视场样本的转录组信息。

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。

1.3 试剂套装组成

每个试剂套装由以下两个部分组成：

- Stereo-seq 转录组试剂盒 * 1 (2 RXN/1 RXN/1 RXN)
- Stereo-seq 芯片 T (1 cm * 2 cm) * 1 (2 EA) 或者 Stereo-seq 芯片 T (2 cm * 2 cm) * 1 (1 EA) 或者 Stereo seq 芯片 T (2 cm * 3 cm) * 1 (1 EA)

关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 与表格 1-2。



收到 Stereo-seq 芯片后，请参照《Stereo-seq 芯片（1 cm*2 cm，2 cm*2 cm，2 cm*3 cm）保存操作指南》对产品进行正确地保存。

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

干冰运输时，收到产品后请检查干冰是否还有剩余。

当运输条件、储存条件及使用方式都正确时，所有组分在有效期内均能保持完整活性。

表格1-1

试剂盒种类	组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Stereo-seq 转录组试剂盒 T 货号： 101KT002 (2 RXN) / 101KT001 (1 RXN)	RI	1000028499		300 μL × 2
	PR Enzyme	1000028500		10 mg × 1
	PR Rinse Buffer	1000042897		880 μL × 1
	Glycerol	1000031615		50 μL × 1
	RT Reagent	1000028507	○ (透明)	360 μL × 1
	RT Oligo	1000028508	○ (透明)	1 OD × 1
	RT Additive	1000028502	○ (透明)	44 μL × 1
	ReverseT Enzyme	1000028509	○ (透明)	22 μL × 1
	TR Buffer	1000039987	○ (透明)	3458 μL × 1
	cDNA Release Enzyme	1000039986		182 μL × 1
	cDNA Release Buffer	1000039988	○ (透明)	3458 μL × 1
	cDNA Primer	1000039989		72 μL × 1
	cDNA Amplification Mix	1000040200		440 μL × 1
 储存温度：-25 °C ~ -18 °C  干冰运输  有效期：见标签				

表格1-2

试剂盒种类	组分信息	规格及数量
Stereo-seq 芯片 T (1 cm * 2 cm) 货号：100CT122	Stereo-seq 芯片 T (1 cm * 2 cm)	2 EA*1
Stereo-seq 芯片 T (2 cm * 2 cm) 货号：100CT221	Stereo-seq 芯片 T (2 cm * 2 cm)	1 EA*1
Stereo-seq 芯片 T (2 cm * 3 cm) 货号：100CT231	Stereo-seq 芯片 T (2 cm * 3 cm)	1 EA*1
 储存温度：-25 °C ~ 8 °C  常温运输（两周内）  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 1-3 不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱等。关于显微镜的要求，请参考《显微镜评估手册》。

表格 1-3 客户自备物料清单推荐

仪器	
冰冻切片机	NEBNext® Magnetic Separation Rack (NEB, S1515S)
小型离心机	1.5-2 mL 管磁力架 (Thermo Fisher, Cat. No. 12321D)
移液器	15 mL 管磁力架 (麦伯生物, Cat. No. M8051)
烤片机	漩涡混匀仪
恒温培养箱	金属浴
荧光显微镜 (拼接功能)	
PCR 仪 (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad*; ProFlex3 x 32-well PCR System, ABI*)	
Qubit® 3.0 荧光定量仪 (Thermo Fisher, Cat. No. Q33216) 或同等功能仪器	
Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA) 或同等功能仪器	



可从所列品牌 中任选一个 (带 * 标记) 使用。

试剂
Nuclease Free Water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
1X TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858)
20X SSC (AMBION, AM9770)
无水乙醇 (分析纯)
AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882)
SPRIselect (Beckman Coulter, Cat. No. B23317/B23318/B23319) (三种磁珠任选一种)
VAHTS DNA Clean Beads (VAZYME, Cat. No. N411-02)
甲醇 (SIGMA, 34860-1L-R)
盐酸 (SIGMA, 2104-50ML)
SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound (SAKURA, 4583)
Qubit ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212)
Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854)
安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-4626)
安捷伦高灵敏度 RNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-1513)

耗材	
一次性培养皿（6 cm）（赛默飞 , 150462）	一次性培养皿（9 cm）
细胞培养板（6 孔板）（CORNING, 3516）	锡箔纸
1.5 mL、15 mL、50 mL 离心管	封口膜
Kimwipes 无尘纸（Kimtech, 34155）	封板膜
Power Dust remover（空气罐）（MATIN, M-6318）	保鲜膜
0.2 mL PCR 管（Axygen, Cat. No. PCR-02-C）或 96 孔板（Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C）	
10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL 带滤芯吸头	
Qubit Assay Tubes（Invitrogen, Cat. No. Q32856）	
0.5 mL 透明薄壁管（Axygen, Cat. No. PCR-05-C）	
显微镜盖玻片（尺寸：24 × 24 mm，厚度：0.13-0.16 mm）	
显微镜盖玻片（尺寸：24 × 32 mm，厚度：0.13-0.16 mm）	

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。

02

样本准备

定制化大芯片样本包埋建议



2.1 包埋说明

此包埋方式适用于尺寸 <2 cm x 3 cm x 0.7 cm 的组织。

2.2 样本准备



实验室条件下严格保证新鲜样本在离体 30 min 内进行直接包埋处理，以最大程度避免组织内部 RNA 降解。组织尺寸不应超过 1.8 cm x 1.8 cm x 0.7 cm (Stereo-seq 芯片 1 cm * 2 cm)，1.8 cm x 1.8 cm x 0.7 cm (Stereo-seq 芯片 2 cm * 2 cm)，1.8 cm x 2.7 cm x 0.7 cm (Stereo-seq 芯片 2 cm * 3 cm)，组织切片占芯片面积不应超过 80%。

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

2.3 样本要求

2.3.1 样本类型

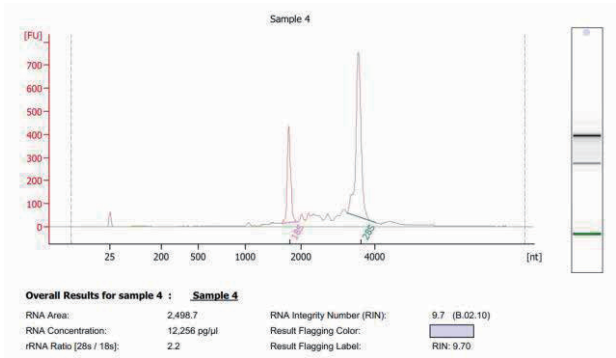
适用于常见动物物种的时空转录组研究，包括但不限于人、猴、鼠等样本，详情可参考《Stereo-seq 试剂套装推荐样本》。

2.3.2 样本包埋组织 RNA 完整值 RIN

为保证样本质量，降低实验风险，建议切取 10-20 片 10 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。



QC 强烈建议只对 RIN≥7 的组织样本进行后续实验操作。



图一. 小鼠大脑组织切片RNA RIN值峰图

2.4 样本包埋

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。

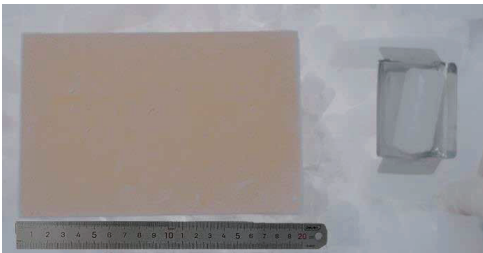
名称	推荐品牌/名称/货号	规格	数量
碎冰	/	泡沫箱	1
干冰	/	泡沫箱	1
锡箔纸	/	卷	1
自封袋	/	个	1
金属块	BIOSHARP/BC032	块	1
无菌无纺布	/	张	2
平皿	/	个	1
OCT	Sakura/Base Molds/ 4583	瓶	1
金属包埋盒 A	Sakura/Base Molds/4162/4132/4133 或其他品牌合适尺寸的包埋盒	个（按组织大小决定）	1
金属包埋盒 B	Sakura/Base Molds/4133/41565/4124 或其他品牌合适尺寸的包埋盒	个	1
钝头镊子	/	支	1
注射器	/	支	1
药匙或抹刀	/	个	1
剪刀	/	把	1
钢尺	/	把	1



1. 提前准备一泡沫箱碎冰并将 OCT 放在冰上预冷 **10 min**;
2. 根据组织大小提前准备适量合适大小的金属包埋盒 A 和 B;
3. 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);
4. 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);



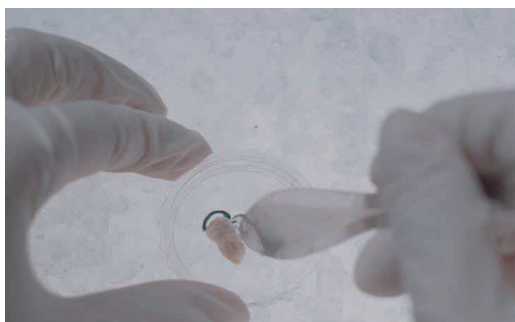
5. 准备一泡沫箱干冰;
6. 准备具有平整面的金属块, 金属块面积需大于金属包埋盒 A, 用于平放金属包埋盒;
7. 将金属块平整面向上放置到干冰中, 预冷 **5 min** 以上;
8. 将钢尺和金属包埋盒 B 放置于干冰中预冷 **5 min** 以上。



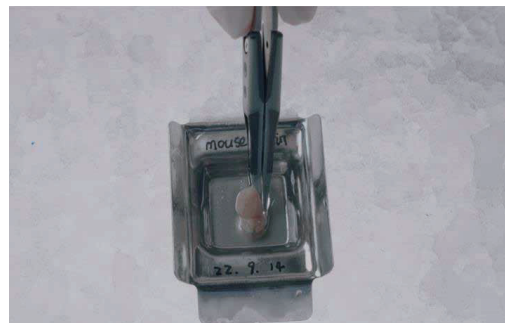
b. 新鲜组织离体 **30 min** 内，用无菌无纺布或无尘纸擦干组织表面液体，以避免在组织表面形成冰块，影响后续包埋切片；



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



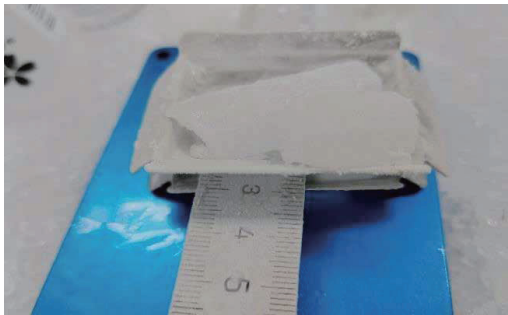
d. 将组织的拟切面朝下，放入冰上预冷的金属包埋盒 A 中（根据组织大小选择包埋盒 A 的尺寸），使组织接触到金属包埋盒 A 的底部。在不产生气泡的前提下用预冷的 OCT 填满金属包埋盒 A，直至将组织完全覆盖（可使用注射器吸弃产生的气泡）；



e. 将装有组织的金属包埋盒 A，水平放置在干冰预冷的金属块上；



f. 先将预冷的钢尺放在金属包埋盒 A 的**长高边**上（防止组织被压变形），然后将金属包埋盒 B 开口向上，轻轻加盖于装有组织块的金属包埋盒 A 的上方，并在其开口中放置碎干冰，使干冰尽可能充分覆盖金属包埋盒表面；



g. 冷冻 **5 min** 后，移去金属包埋盒 B 和钢尺，检查 OCT 是否完全凝固且变成白色不透明状，若未完全冷冻好，则重复 f；



h. 如果组织块完全凝固并变成白色不透明状，用手轻掰金属包埋盒 A 两侧，即可使 OCT 包埋组织块从金属包埋盒 A 中脱模；



i. 检查包埋块底部是否被完全覆盖，如未完全覆盖，则将组织块放置在金属块上，底部向上，在表面涂上少量 OCT，待 OCT 完全凝固且不透明，在包埋块切面位置做好标记。

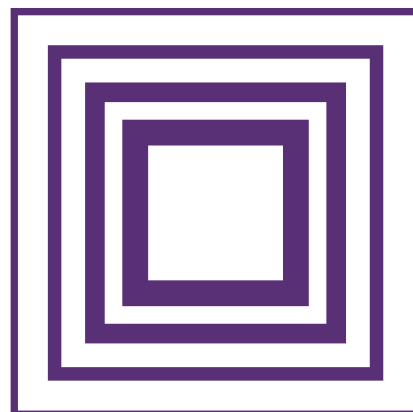


2.5 样本的保存和运输

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

03

STOmics® Stereo-seq 定制化芯片转录组试剂套装 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。

准备试剂	1 * 2 芯片 准备流程	2 * 2 芯片 准备流程	2 * 3 芯片 准备流程	储存
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 稀释到 20 mL	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	常温
0.1X SSC	取 20X SSC 100 μL 稀释到 20 mL 取 20X SSC 250 μL 稀释到 50 mL	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	常温
wash buffer	取 7.5 μL RI 加入 142.5 μL 0.1X SSC 中，用量 至少为 150 μL/芯片	取 15 μL RI 加入 285 μL 0.1X SSC 中，用量 至少为 300 μL/芯片	取 32.5 μL RI 加入 617.5 μL 0.1X SSC 中， 用量至少为 650 μL/芯片	冰上 备用
DAPI 储存液	提前用 5X SSC 稀释 DAPI 原液，稀释成 1:100	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	4℃ 避光 1 d
0.01N HCl ¹	按照 HCL 浓度梯度稀释 到 0.01N，PH值准确到 2（确保pH 值在 1.9-2.1 范围内；至少 2 mL/样本）	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	室温 48 hr ²
10X 透化 试剂储存液	用 1 mL 新鲜配制的 0.01N HCl 将 PR Enzyme（红盖，粉末 状）溶解后，通过移液器吹打 混匀（可分装成若干份）	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	-20℃
1X 透化 试剂工作液	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 20 μL 稀释到 200 μL （至少 150 μL/芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 35 μL 稀释到 350 μL （至少 300 μL/ 芯片）	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液 70 μL 稀释到 700 μL （至少 650 μL/ 芯片）	冰上 备用 6 hr
RT Oligo	短暂离心，加入 79 μL TE buffer 重悬。盖紧 盖子后最大速度涡旋 15 s，然后短暂离心	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	-80℃
Glycerol	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	室温
PR Rinse Buffer	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	室温
PR Rinse Buffer （含 5% RI）	每张芯片至少准备 150 μL（142.5 μL PR Rinse Buffer + 7.5 μL RI）	每张芯片至少准备 300 μL（285 μL PR Rinse Buffer + 15 μL RI）	每张芯片至少准备 650 μL（617.5 μL PR Rinse Buffer + 32.5 μL RI）	冰上 备用
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	室温 1 d
磁珠	提前取出，室温放置 30 min 平衡	同 1*2 芯片	同 1*2 芯片	4℃



- 0.01N HCl 需现配现用。对于预制的 0.1N HCl 和新购买的 HCl，实验前请检查pH 值。
- 储存时间超过 48 hr 将影响预期 pH 值，请在配制后 48 hr 内使用。

显微镜准备

仪器	设定	备注
荧光显微镜	FITC通道 (ssDNA 染色)	-

其他准备

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
放置芯片	9 cm 培养皿 (贴有封口膜)	9 cm 培养皿 (贴有封口膜)	9 cm 培养皿 (贴有封口膜)
芯片清洗	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿
甲醇固定	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿
清洗甘油	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿
组织去除	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿
cDNA 释放	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿

3.2 切片准备



- a. 提前将烤片机温度调节到 37 °C;

b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20 °C，样本头预冷至 -10 °C~-15 °C（根据实际操作过程调整）;

...

样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷;

d. 将 OCT 包埋的组织块从 -80 °C 冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡至适合温度 ;

≡

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

e. 将组织块修剪成合适的尺寸（1 cm * 2 cm 芯片切面小于 0.9 cm x 1.8 cm、2 cm * 2 cm 芯片切面小于 1.8 cm x 1.8 cm、2 cm * 3 cm 芯片切面小于 1.8 cm x 2.7 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；

f. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；

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

3.3 芯片处理与组织贴片

- a. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出 Stereo-seq 芯片 T，记录芯片背面的编号；注意不要触碰芯片正面；
- b. 将芯片置于 9 cm 培养皿（底部铺有封口膜）中复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片在六孔板中使用 3000 μL Nuclease Free Water 清洗 2 次（2 cm * 3 cm 芯片在 6 cm 培养皿中使用 4000 μL Nuclease Free Water 清洗 2 次），清洗后气瓶吹干芯片四周及表面；如芯片表面无杂质、无明显痕迹，无任何液体残留、无波纹状纹理，即可准备贴片；
- c. 预冷甲醇：1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片在六孔板中加入 2-4 mL 甲醇，2 cm * 3 cm 芯片在 6 cm 培养皿中加入 3-5 mL 甲醇，确保甲醇能将芯片完全覆盖。预冷（-20℃）时间 **5 min-30 min**；
- d. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- e. 组织贴片有两种操作方式可选：热贴（A）和冷贴（B）。

A. 热贴

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

表格 3-1 各尺寸大芯片烤片时间

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

B. 冷贴

- 1) 将芯片正面朝上置于切片机中，预冷 **3 min-10 min**；
- 2) 切下一张切片，将冷冻切片小心覆盖在芯片正中央，尽量一次贴片成功，用指腹加温载体背面使切片贴合，建议组织切片贴片控制在 **5 min** 内。快速将芯片至于 37℃烤片机上，烤片时间如表格 3-1。

3.4 组织固定

- a. 将上一步烤干的芯片立即放于 -20℃ 下预冷的甲醇中固定 **40 min**，确保甲醇浸没过所有芯片；
- b. 固定好后，将 6 孔板 / 6 cm 培养皿转移到通风橱中；
- c. 将芯片从 6 孔板 / 6 cm 培养皿中取出，用无尘纸吸干芯片背面和周围多余的甲醇；

- d. 将芯片放于贴有封口膜的 9 cm 培养皿中，在通风柜中通风 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；
- e. 甲醇挥发干后，肉眼可见组织变白，将芯片转移至实验桌上。

3.5 荧光染色

- a. 按照表格 3-2 配制 ssDNA 荧光染色液；

表格 3-2 组织荧光染色液配制

组分	1 * 2 芯片 单个反应体积	2 * 2 芯片 单个反应体积	2 * 3 芯片 单个反应体积
5X SSC	189 μL	378 μL	756 μL
Qubit ssDNA Reagent	1 μL	2 μL	4 μL
RI	10 μL	20 μL	40 μL
Total	200 μL	400 μL	800 μL

- b. 将组织荧光染色液加到芯片上，用量参考表格 3-2。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。

- c. 染色结束前配制 wash buffer，含量如表格 3-3；

表格 3-3 各尺寸大芯片清洗溶液加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
wash buffer	150 μL/一张芯片	300 μL/一张芯片	650 μL/一张芯片

- d. 用移液器从芯片一角吸去组织荧光染色液，可稍稍倾斜芯片吸液，尽量减少表面液体；
- e. 向芯片加入 wash buffer，加液量参考表格 3-3；
- f. 用移液器从芯片一角吸弃 wash buffer，可稍稍倾斜芯片吸液，尽量减少表面液体；
- g. 将芯片转移至无尘纸上，一只手拿镊子固定芯片，另一只手拿空气罐，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；

⋯ 确保芯片上没有残留的染色液。

- h. 用移液器缓慢吸取 Glycerol 甘油滴加到组织中央，可均匀份几滴滴加在芯片表面，加液量参考表格 3-4（样本较大，可适量多加甘油），避免产生气泡；

表格 3-4 各尺寸大芯片甘油封片加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
甘油	8-12 μL/一张芯片	16-24 μL/一张芯片	24-36 μL/一张芯片

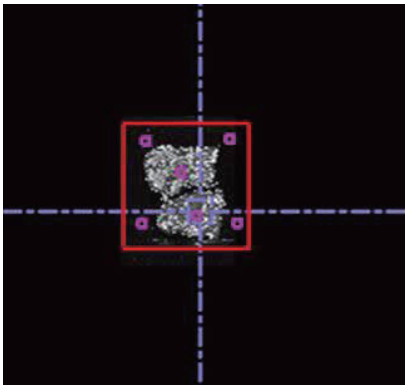
i. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时夹住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，立即安排拍照，避免荧光猝灭。

⋯ 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。
- b. 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，模式选择：选择落射荧光，选择 10 倍镜、FITC 通道；
- 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 ImageStudio 软件进行图像 QC，可参考《显微镜评估手册》的指引操作；

⚠ 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，夹起盖玻片一角，将其从载玻片上分离（芯片在盖玻片下方）；
- h. 用镊子夹住盖玻片边缘，将芯片移至培养皿或孔板内边缘，用镊子轻轻地移动盖玻片，直到芯片和盖玻片完全分离；

i. 将 1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片放置于 6 孔板, 2 cm * 3 cm 芯片放置于 6 cm 培养皿, 加入 0.1 X SSC 溶液 (用量如表格 3-5 所示), 吸打芯片 5 次左右 (沿上芯片边缘从左到右, 清洗 3 次左右, 芯片侧边各吸打 2 次);

表格 3-5 各尺寸大芯片甘油清洗溶液加液量

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

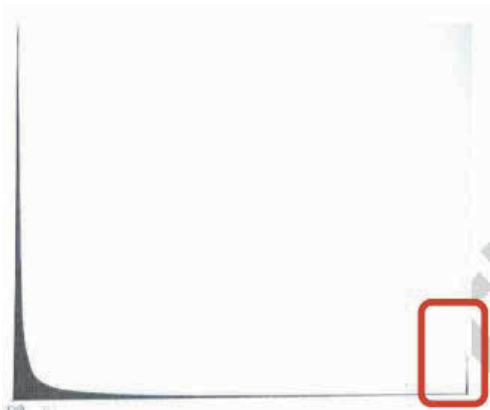
j. 吸弃 0.1X SSC 液体, 重复步骤 i (用量如表格 3-5 所示);

... 确保液体浸没芯片。

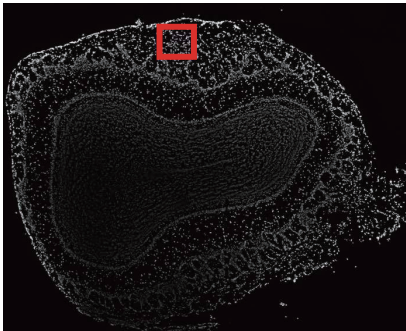
k. 将芯片取出放置于无尘纸上, 吸干背面水分, 放置于 9 cm 培养皿中。

! 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;

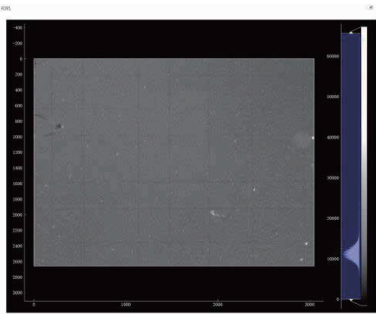


- c. 在拍照过程中请勿将贴有组织的芯片长时间照射荧光, 非拍照时间关闭激光, 避免长时间照射;
- d. 推荐使用手动对焦, 按照上文策略在芯片四角和组织内分别定焦, 以此同时获得清晰的 Track 线和染色图像;
- e. 手动定焦拍照过程中有多次曝光和灯光强度参数调整, 为进行 Track 线对焦, 可以拉高增益 (Gain) 和灯光强度。Track 线选点之后, 对组织进行对焦时, 将增益降到最低, 灯光强度降低到组织区域不过曝 (参考注意事项 b)。在整体扫描前, 选择图像上占据较大面积, 又较亮的区域 (如图红色框内区域), 调节曝光时间 (不超过 500 ms) 和灯光强度 (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;

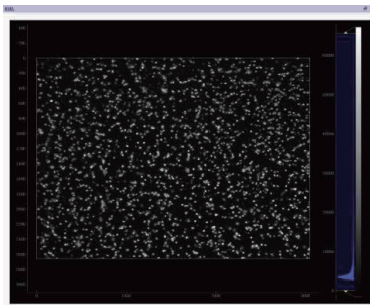


- f. 如果在甘油封片过程中，存在较大区域（超过 4 个视野大小）未被甘油浸润，则需要对此区域增加建模点；
- g. 谨慎使用自动对焦模式，大部分自动对焦策略无法对 Track 线精确定焦，容易造成 QC 失败，同时还有可能造成荧光淬灭。

正确示例：



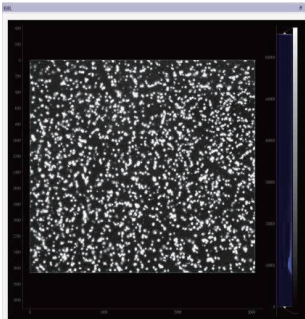
图一



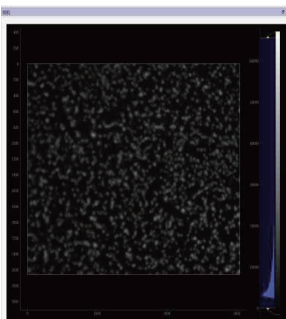
图二

- 图一．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；
- 图二．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爆。

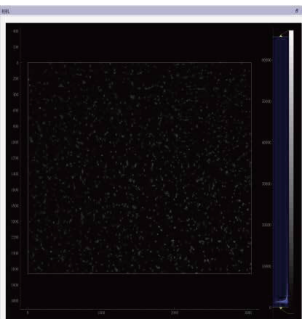
错误示例：



图三



图四



图五

- 图三．为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，过曝时图像及直方图状态（图右侧）；
- 图四．为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，欠曝时图像及直方图状态（图右侧）；
- 图五．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

a. 根据【实验前准备】，提前配制 0.01N HCl，准备好 1X 透化试剂工作液，各尺寸所需透化工作液的量如表格 3-6；

表格 3-6 各尺寸大芯片透化工作液加液量

芯片尺寸（cm）	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
1X 透化工作液加液量	150 μL/一张芯片	300 μL/一张芯片	650 μL/一张芯片

- b. 透化工作液使用前 37 °C 温箱孵育 **10 min**；
- c. 提前解冻 RT Reagent，RT Additive 和 RT Oligo，RT Oligo 溶解后冰上放置；
- d. 复温结束后，芯片置于 37 °C 温箱，芯片四角加入 1X 透化试剂工作液，用量参考表格 3-6；
- e. 37 °C 下进行透化反应（透化时间根据实际情况调整）；

最佳透化时间通过 STOmics® Stereo-seq 透化试剂套装预先确定。详情请参考 STOmics® Stereo seq 透化试剂套装使用说明书。

f. 在等待透化期间，参考表格 3-7 配制 RT Mix，放置于冰上；

表格 3-7 RT Mix

组分	1 * 2 芯片 单个反应体积	2 * 2 芯片 单个反应体积	2 * 3 芯片 单个反应体积
RT Reagent	136 μL	256 μL	336 μL
RT Additive	8.5 μL	16 μL	21 μL
RI	8.5 μL	16 μL	21 μL
RT Oligo	8.5 μL	16 μL	21 μL
ReverseT Enzyme	8.5 μL	16 μL	21 μL
Total	170 μL	320 μL	420 μL
加液量	150 μL	300 μL	400 μL

- g. 将芯片从 37 °C 温箱中取出；
- h. 用移液器从芯片的一角吸掉透化试剂，可稍稍倾斜芯片吸液，尽量减少表面液体；
- i. 加入 PR Rinse Buffer 溶液（含 5% RI，用量参考表格 3-8）；

表格 3-8 各尺寸大芯片透化后清洗溶液加液量

芯片尺寸（cm）	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
PR Rinse Buffer 溶液（5% RI）	150 μL/一张芯片	300 μL/一张芯片	650 μL/一张芯片



j. 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

k. 立即加入 RT Mix，以避免 RNA 降解。

3.8 反转录反应

- a. 取出配制好的RT Mix吹打混匀后瞬时离心，在芯片四角加入RT Mix，确保RT Mix均匀覆盖全芯片；
- b. 在42 °C 温箱反应，反应**5 hr**或以上，最长不超过**16 hr**（若需过夜，反应器皿需用封口膜封口，外包裹保鲜膜）。

3.9 组织去除

表格 3-9 组织去除前试剂准备

准备试剂	准备流程	储存
TR Buffer	提前取出放于 55 °C 5 min 溶解沉淀，再恢复至室温	室温
cDNA Release 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. 将芯片从 42 °C 温箱中取出；
- b. 用移液器吸弃芯片表面的 RT Mix，可稍稍倾斜芯片吸液，尽量减少表面液体；
- c. 加入 0.1X SSC 溶液，用量参考表格 3-10；

表格 3-10 RT 后清洗溶液加液量

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

- d. 用移液器吸弃芯片表面的 0.1X SSC 溶液，将芯片转移至反应器皿（1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片使用 6 孔板，2 cm * 3 cm 芯片使用 6 cm 培养皿）；
- e. 加入 TR Buffer（用量参考表格 3-11），然后放置于 55 °C 温箱反应 **10-30 min**；

表格 3-11 各尺寸大芯片 TR Buffer 加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
TR Buffer	1500 μL/一张芯片	2000 μL/一张芯片	3000 μL/一张芯片
反应容器	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿

此步反应时可提前配制 cDNA Release Mix

f. 微微倾斜六孔板 /6 cm 培养皿，用移液器吸弃 TR Buffer。

如组织移除不干净，加入表格3-12所示量的 0.1X SSC，用移液器轻轻吸打，除去芯片上组织，然后微微倾斜六孔板/6 cm培养皿，用移液器吸弃0.1X SSC试剂。

表格 3-12 各尺寸大芯片清洗溶液加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
0.1X SSC 溶液	1500 μL/一张芯片	2000 μL/一张芯片	3000 μL/一张芯片

3.10 cDNA 释放与回收

- a. 按照表格 3-13 配制 cDNA Release Mix，室温放置；
- b. 加入 cDNA Release Mix（用量参考表格 3-13）；
- c. 用封板膜对六孔板进行封口（6 cm 培养皿用封口膜在外圈封口），六孔板 /6 cm 培养皿外部再用保鲜膜包裹，防止挥发，放置 55 °C 温箱反应 **3 hr** 或以上，最长不超过 **18 hr**；

表格 3-13 cDNA Release Mix

组分	1 * 2 芯片 单个反应体积	2 * 2 芯片 单个反应体积	2 * 3 芯片 单个反应体积
cDNA Release Enzyme	55 μL	55 μL	155 μL
cDNA Release Buffer	1045 μL	1045 μL	2945 μL
Total	1100 μL	1100 μL	3100 μL
加液量	1000 μL	1000 μL	3000 μL
反应容器	六孔板	六孔板	6 cm 培养皿

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。

- d. 反应结束后，若使用小磁力架（1.5 mL）纯化，则将 1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片将反应孔内液体完全回收至新的 5 mL（2 cm * 3 cm 芯片释放液回收至新 15 mL 离心管）离心管内；若使用大磁力架（15 mL）纯化，则将反应孔内液体完全回收至 15 mL 离心管中；
- e. 等分两次加入 Nuclease Free Water 清洗反应孔芯片（用量参考表格 3-14），收集到同一个 5 mL/15 mL 离心管内。

表格 3-14 各尺寸大芯片 Nuclease Free Water 加液量

芯片尺寸 (cm)	1 * 2 芯片	2 * 2 芯片	2 * 3 芯片
Nuclease Free Water	1000 μL/一张芯片	1000 μL/一张芯片	3000 μL/一张芯片



此步骤需要回收 cDNA Release Mix 1000/3000 μL（体积可能小于 1000/3000 μL）和 Nuclease Free Water 1000/3000 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。
- 磁珠使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 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 的体积少 ~2 μL。
- 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. 0.8X 磁珠 cDNA 纯化步骤（小磁力架 1.5 mL）

1) 将上一步回收液与室温平衡好的磁珠按照 1: 0.8 混合，震荡混匀，1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片分装 4 份于 1.5 mL 离心管中（2 cm * 3 cm 芯片分装 8 份于 1.5 mL 离心管中），再室温孵育 **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) 每管先加 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）转移到新的 0.2 mL PCR 管中；

9) 再将 22 μL Nuclease Free Water 加入步骤 8 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 所示的 PCR 管中，合并总体积 42 μL；

如果上述回收样品不足 42 μL，用 Nuclease Free Water 补足。

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



(可选磁力架) 0.8X 磁珠 cDNA 纯化步骤 (大磁力架 15 mL)

- 1) 将上一步回收液与室温平衡好的磁珠按照 1: 0.8 混合，震荡混匀（其中 2 cm * 3 cm 芯片可分装 2 管于 15 mL 离心管中），再室温孵育 **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 10 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) 每管先加 88 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（~84 μL cDNA）分装转移到 4 个新的 0.2 mL PCR（~21 μL cDNA）管中；
- 9) 再将 88 μL Nuclease Free Water 加入 8) 磁珠中，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（~84 μL cDNA）转移至 8) 所示的 4 个 PCR 中，合并总体积 42 μL；
- 如果上述回收样品不足 42 μL，用 Nuclease Free Water 补足。



纯化后，可用 160 μL Nuclease-free Water 在 4 °C 保存磁珠，直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

3.11.2 cDNA 扩增

- a. 按照表格 3-15 配制 PCR Mix，共 100 μL；

表格 3-15 PCR Mix

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

b. 瞬时离心，按照表格 3-16 PCR 程序进行扩增：

表格 3-16 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	15
72 °C	3 min	15
72 °C	5 min	1
12 °C	Hold	-

c. 按照表格 3-17 准备 Qubit dsDNA HS Kit 测定 PCR 产物浓度并记录；

表格 3-17 Qubit dsDNA HS Kit

组分	单个反应体积
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	198 μL
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1 μL
PCR 产物	1 μL
Total	200 μL

d. PCR 产物合并与 1.5 mL 离心管中，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。

e. 对 PCR 产物进行 0.6X 磁珠纯化

- 1) 将 PCR 产物合并（1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片大约 400 μL，2 cm * 3 cm 芯片大约 800 μL）至 1.5 mL 离心管，与室温平衡好的磁珠按照 1：0.6 混合，震荡混匀，室温孵育 **10 min**；
- 2) 瞬时离心后，将 1.5 mL 离心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 1 mL 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。

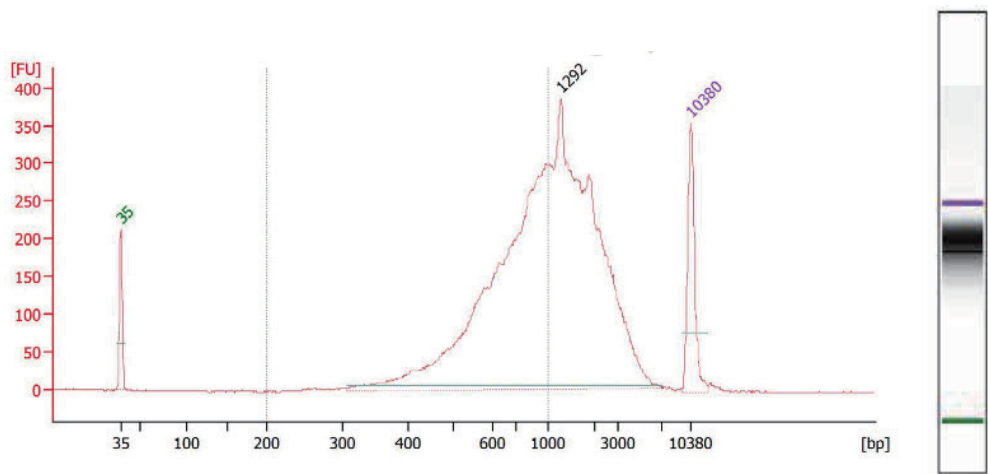


- 4) 重复一次步骤 3;
- 5) 将离心管保持在磁力架上，打开盖子，室温风干 **5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂
- 6) 1 cm * 2 cm 和 2 cm * 2 cm 芯片用加 40 μL 的 TE 回溶（2 cm * 3 cm 芯片用加 80 μL 的 TE 回溶），震荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清转移到新的 1.5 mL 离心管中。（此步骤可停止，样本 -20 °C 保存）

— 停止点：cDNA 纯化产物可在 -20 °C 下保存 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 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

04

文库构建



后续步骤需要用到 Stereo-seq 建库试剂盒，请提前准备。试剂盒具体信息如下表所示：

Stereo-seq 建库试剂盒 货号：101KL114			
组分信息	货号	管盖颜色	规格与数量
TME	1000028515	●（白色）	4 μL × 1
Stop Buffer	1000028516	●（白色）	40 μL × 1
TMB	1000028517	●（白色）	40 μL × 1
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 57-64)	1000028519	●	50 μL × 1
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 81-88)	1000029088	●	50 μL × 1
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 89-96)	1000029089	●	50 μL × 1
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 97-104)	1000029180	●	50 μL × 1
PCR Amplification Mix	1000029181	●	400 μL × 1
 储存温度：-25℃~-18℃  干冰运输  有效期：见标签			



-  干冰运输时，收到产品后请检查干冰是否还有剩余。
-  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。

4.1 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	存储
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 天
磁珠	提前取出平衡至室温	4℃
10 倍稀释的 TME	用 TE buffer 将 1 μL 稀释至 10 μL	冰上 1 hr
不要一次稀释所有的TME，试剂盒提供的量可供稀释4次。		
Stop Buffer	至少提前 30 min 将 Stop Buffer 取出至室温平衡	室温 1 天

4.2 cDNA 打断与扩增

- a. 将 3.11 中得到的 20 ng cDNA 扩增产物用于打断反应；
- b. 先用移液枪将稀释后的 TME 吹打混匀，按照表 4-1 准备打断 Mix 体系，瞬时离心后轻轻吹打混匀，全程置于冰上操作；

 不可剧烈震荡

表格 4-1 打断 Mix

组分	1X (μL)
TMB	4
10 倍稀释的 TME	1
cDNA 产物	X
Nuclease-free water	15-X
Total	20



 cDNA 产物投入量：X(μL) = 20 ng/ cDNA 浓度（ng/μL）。



c. 准备 PCR 仪，待模块开始升温，将反应管放入 PCR 仪。反应结束后，取出反应管置于室温，注意请勿冰上转移反应管；

请勿冰上转移反应管。

表格 4-2 打断条件

温度	时间
60℃ 热盖	on
55℃	10 min
4℃	Hold

d. 室温下每管加 5 μL Stop Buffer，移液器吹打混匀，室温静置 5 min 终止反应；

e. 打断产物扩增：按照表格 4-3 配制 PCR Mix 体系；

表格 4-3 PCR Mix

组分	1X (μL)
上一步打断产物	25
PCR Barcode Primer Mix	25
PCR Amplification Mix	50
Total	100

请参照附录 A PCR Barcode Primer Mix 使用规则

f. 震荡混匀，瞬时离心后置于 PCR 仪中，参照如下反应程序进行扩增。

表格 4-4 PCR 扩增程序 (反应体系 100 μL)

温度	时间	循环数
105℃ 热盖	on	-
95℃	5 min	1
98℃	20 sec	13
58℃	20 sec	
72℃	30 sec	
72℃	5 min	1
12℃	Hold	-

g. 取 1 μL PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，浓度通常为 10-100 ng/μL。

4.3 PCR 产物双选

- a. 将上述 PCR 产物和室温平衡好的磁珠按照 1: 0.55 混合 (100 μL PCR 产物、55 μL 磁珠)，震荡混匀后室温孵育 **5 min**；
- b. 将上述反应 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上，静置 **3 min**，液体澄清后将上清转移到新的 PCR 管；

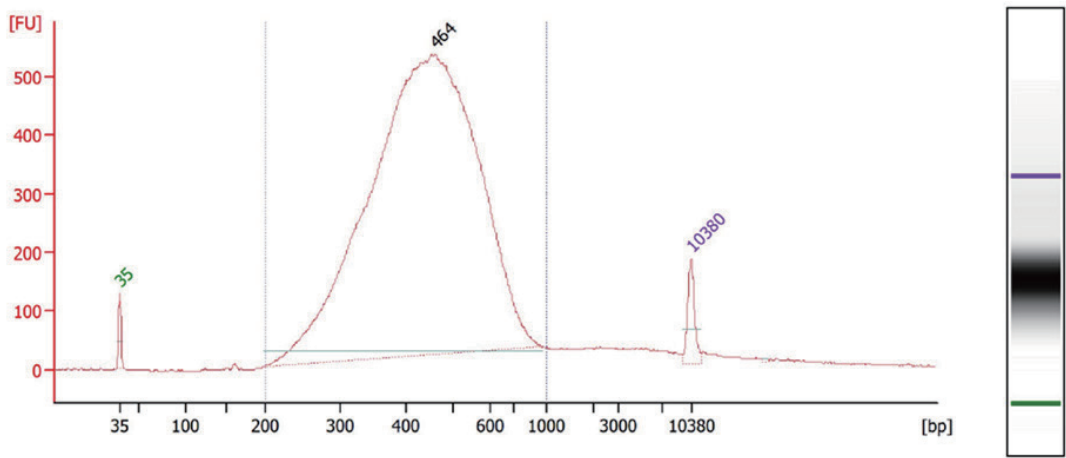


保留上清

- c. 加 15 μL 磁珠与上清混合，震荡混匀，室温孵育 **5 min**；
- d. 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，静置 **3-5 min**，至液体澄清后用移液器小心吸取上清并弃掉；
- e. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 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；
- f. 重复一次步骤 e；
- g. 尽量吸干管内液体。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，用小量程的移液器将管底液体吸干；
- h. 室温下静置 **3-5 min** 风干磁珠，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- i. 加 20 μL 的 TE buffer 进行回溶，震荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心后置于磁力架上静置 **3 min**，待液体澄清后将上清转移到 1.5 mL 离心管内；

保留上清

- j. 取 1 μL 片筛产物，先用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，再通过 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 PCR 扩增产物进行片段分布检测。要求片段分布主峰在 200-600bp (如图三)，纯化后产量通常大于 100 ng。QC



图三 . PCR 扩增产物 2100 峰图

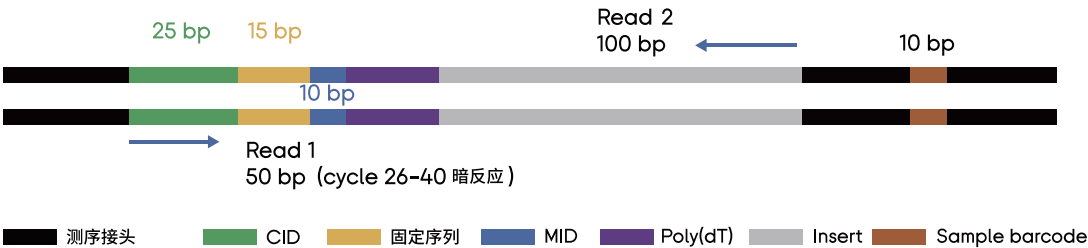
05

文库结构和顺序



华大智造基因测序仪将为 Stereo-seq 文库提供测序支持。

5.1 文库结构



图四 . 转录组文库结构

请参考试剂盒 [《940-000037-00，高通量测序引物试剂盒（时空组学）》](#) 说明书制备 DNB。

5.2 适配测序仪

MGISEQ-2000	DNBSEQ-T7	DNBSEQ-T10×4RS
-------------	-----------	----------------

5.3 文库测序类型

- 50 (read1) +100 (read2)
- 50 (read1) +100 (read2) +10 (Sample Barcode)



一链暗反应，26-40

测序前请仔细阅读对应的说明书，并严格按照说明书的内容进行操作。如有任何测序疑问，请您随时联系当地的华大智造客户经理或技术支持。

附录A： PCR Barcode Primer Mix使用规则

本试剂盒 PCR Barcode Primer Mix 是预先混合一组碱基平衡的 barcode 组合，客户可随机挑选组合使用，建议使用两个及两个以上的样本进行拆分 barcode 测序，只有一个样本上机时不拆分 barcode 测序。下表是每个预设的 PCR Barcode Primer Mix 包含的 barcode 序列号。

PCR Barcode Primer Mix 名称	包含 barcode 序列号							
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 57~64)	57	58	59	60	61	62	63	64
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 81~88)	81	82	83	84	85	86	87	88
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 89~96)	89	90	91	92	93	94	95	96
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 97~104)	97	98	99	100	101	102	103	104