

Salus 空间转录组试剂使用说明书

(8.6 mm 芯片)

版本记录

版本	发布日期	修订内容摘要
1.0	20231222	首次发布
1.1	20250704	优化部分实验操作描述，增加附录 1

目录

关于说明书.....	2
产品信息.....	2
第一章 介绍.....	3
1.1. 产品描述.....	3
1.2. 注意事项.....	3
第二章 试剂套装及自备耗材.....	4
2.1. Salus 空间转录组基因表达套装试剂信息.....	4
2.2. Salus 空间转录组基因表达实验自备物料需求.....	5
第三章 产品实验流程详解.....	7
3.1. 实验流程图.....	7
3.2. 样本制备和质检.....	7
3.3. 空间转录组基因表达实验流程.....	10
附录 1 组织建议透化时间.....	19
附录 2 制造商信息.....	20

关于说明书

本产品说明书适用于 Salus 空间转录组试剂, 说明书版本 V1.1。

本产品说明书及其包含的信息为深圳赛陆医疗科技有限公司(以下简称赛陆医疗)的专有保密信息, 未经赛陆医疗的书面许可, 任何个人或组织不得全部或部分地对本产品说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本产品说明书的读者为终端用户。产品说明书作为试剂盒的一部分, 由赛陆医疗授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本产品说明书。

赛陆医疗对本产品说明书不做任何种类的保证, 包括(但不限于)用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。赛陆医疗已经采取措施, 确保本产品说明书的准确性。但是, 赛陆医疗对遗漏不承担责任, 并保留任何对本产品说明书和仪器进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

产品信息

产品货号	产品名称	版本
SL-S00179	Salus 空间转录组基因表达套装 (8.6 mm)	1.1
SL-S00182	Salus 空间组学芯片载具 (8.6 mm)	1.0
SL-M00105	Salus 空间转录组 PCR 适配器	1.0

[*更多详细产品信息请与商务沟通。](#)

第一章 介绍

本产品说明书是使用 Salus 空间转录组试剂进行实验操作的作业指导书，内容包括《Salus 空间转录组基因表达套装（8.6 mm）》产品使用说明信息。

1.1. 产品描述

《Salus 空间转录组基因表达套装（8.6 mm）》

Salus 空间基因表达试剂套装是适用于制备新鲜组织空间全转录组 3'文库制备的试剂套装。Salus 空间原位捕获芯片表面通过杂交扩增的形式种植着高密度探针簇，探针簇由随机生成的空间条形码序列 SBC、UMI 序列和 Poly T 序列等核心序列组成。最后，通过解析空间条形码序列与坐标位置的映射关系，得到带有序列信息的空间转录组芯片。

1.2. 注意事项

- 1.2.1 本产品仅用于科学研究，使用前请仔细阅读产品说明书。
- 1.2.2 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。
- 1.2.3 所有样本及试剂切勿吞咽，并避免直接接触皮肤和眼睛，若发生此类情况请立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊。
- 1.2.4 样本及废弃物具有其潜在感染性，应按当地相关法规规定进行处理。
- 1.2.5 超过有效期的产品严禁使用。

第二章 试剂套装及自备耗材

2.1. Salus 空间转录组基因表达套装试剂信息

Salus 空间转录组基因表达套装 (8.6 mm) 货号: SL-S00179

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	管盖颜色
Salus 空间转录组基因表达 芯片 (8.6 mm/10 rxns) 货号: SL-S00181	测序芯片	1 张	/
Salus 空间转录组基因表达 试剂盒 (10 rxns) 货号: SL-S00180	Permeabilization Enzyme	10 μ L/管×4 管	橙色
	RT Reagent II	980 μ L/管×1 管	绿色
	RT Enzyme	50 μ L/管×1 管	黄色
	RNase Inhibitor	150 μ L/管×1 管	无色
	ExoI Buffer	920 μ L/管×1 管	绿色
	ExoI	30 μ L/管×1 管	橙色
	Second Strand Reagent	830 μ L/管×1 管	绿色
	Second Strand Primer	100 μ L/管×1 管	蓝色
	Second Strand Enzyme	72 μ L/管×1 管	黄色
	cDNA Amp Primers	15 μ L/管×1 管	蓝色
	PCR Amp Mix	1200 μ L/管×1 管	橙色
	TMB	40 μ L/管×1 管	绿色
	TME	20 μ L/管×1 管	紫色
	Stop Buffer	50 μ L/管×1 管	无色
	Library Primers	250 μ L/管×1 管	蓝色
Salus 空间转录组密封垫 (8.6 mm)	6 个/盒×1 盒	/	
Salus 空间转录组封板膜	20 张/盒×1 盒	/	

存储:

Salus 空间转录组基因表达芯片 (8.6 mm) 存储温度: 2~8°C

Salus 空间转录组基因表达试剂盒 (10 rxns) 存储温度: -25~-15°C

运输:

Salus 空间转录组基因表达芯片 (8.6 mm) 运输: 冷链运输 (2~8°C)

Salus 空间转录组基因表达试剂盒 (10 rxns) 运输: 冷链运输

2.2. Salus 空间转录组基因表达实验自备物料需求

试剂	品牌	货号
异丙醇	不限	/
三(羟甲基)氨基甲烷	不限	/
乙酸	不限	/
苏木精染色液	sigma	51275
返蓝液	Dako	CS702
伊红	Dako	CS701
SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	SAKURA	4583
VAHTS DNA Clean Beads	Vazyme	N411
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo	Q32854
1M Tris-HCl pH7.0	Thermo	AM9850G
Nuclease Free Water (NF water)	Ambion	AM9937
ddH ₂ O	不限	/
20×SSC	Ambion	AM9770
Buffer EB	Qiagen	19086
甲醇	Sigma	34860
浓盐酸	不限	/
无水乙醇	不限	/
8M KOH	Sigma	P4494-50ML
TE buffer	不限	/
耗材	品牌	货号
锡箔纸	不限	/
镊子	不限	/
1.5 mL、15 mL、50 mL 离心管	不限	/
100 mm 细胞培养皿	Corning	/
10 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 无菌吸头	不限	/
金属包埋盒	不限	/
Qubit Assay Tubes	Invitrogen	Cat. No. Q32856

烧杯	不限	/
0.2 mL PCR 管	不限	/
无尘纸	不限	/
塑料载玻片盒	不限	/
仪器	品牌	货号
冰冻切片机	不限	/
烤片机	不限	/
金属浴加热器	不限	/
PCR 仪 (深孔)	不限	/
荧光显微镜 (彩色相机, 明场, 可自动拼图)	不限	/
Qubit 或同等功能仪器	不限	/
Agilent 2100 Bioanalyzer 或同等功能仪器	安捷伦	G2939AA
磁力架适用于 1.5-2 mL EP 管和 PCR 管	不限	/
-80℃ 冰箱	不限	/

实验室级用水准则

请仅使用以下等级的水或等效物:

- 去离子水
- 18 兆欧 (MΩ) 水
- 高纯水
- 超纯水
- 分子生物学级纯水

第三章 产品实验流程详解

3.1. 实验流程图



3.2. 样本制备和质检

3.2.1 样本要求

- 1) 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。
- 2) 组织尺寸不应超过 0.9 cm × 0.9 cm × 2 cm，组织切片占芯片面积不应超过 80%。
- 3) 样本类型：已在多个常见物种组织样本中验证，理论上适用于各种真核生物的空间转录组研究。

3.2.2 样本准备与包埋

- 1) 组织包埋流程：



- 2) 耗材准备

所需耗材	用途
金属包埋盖	放置干冰上预冷，用于覆盖包埋组织使其表面快速冷冻
金属包埋盒 A、B	挑选与组织合适尺寸的金属包埋盒
钝头镊子	消毒好钝头镊子用于转移组织
无菌注射器	用于去除包埋时产生的气泡
药匙	搅拌 OCT，让组织表面被 OCT 包裹
剪刀	剪锡箔纸，包裹包埋好的组织
表面平整的金属块	预冷金属包埋盒，并使其保持水平

培养皿	选择大小适合的平皿即可, 用于盛装 PBS 和 OCT。
OCT	包埋剂
1× PBS	清洗组织
锡箔纸	包裹组织包埋块
密封袋	保存组织
长镊子	用于夹住金属包埋盒
干冰	冷冻 OCT 包埋的组织
无菌纱布	擦拭组织杂质
75%酒精	用于包埋器具的消毒
碎冰	用于 OCT 和 1× PBS 溶液的预冷
RNA 提取试剂盒	提取样本 RNA 进行质检

3) 预冷

- 3.1) 将 1× PBS 倒入合适大小平皿 2/3 位置, 放置于碎冰上预冷, 用于组织清洗。
- 3.2) 预先取合适大小平皿, 倒入 OCT 高度约 1 cm 预冷, 视组织大小而定 (若有气泡则用无菌注射器吸弃或将气泡剥离组织区域即可), 用于将新鲜组织包裹。
- 3.3) OCT 倒入准备好的金属包埋盒中, 使其均匀铺在约 2/3 高度预冷 5 min (注意是否有气泡, 有则吸弃)。
- 3.4) 将倒好的 OCT 置于提前准备好的碎冰上预冷约 5-10 min (整瓶 OCT 也需预冷备用)。
- 3.5) 将表面平整的金属块和包埋盒 A 置于干冰上预冷 5 min (根据大小调整时间)。

4) OCT 包埋

- 4.1) 用预冷的 1× PBS 清洗带有血渍和组织液的组织, 将剖好的新鲜组织放置于碎冰上操作, 待包埋组织较多时, 避免长时间放置室温。
- 4.2) 用无菌布吸干组织表面液体和杂质 (确保表面无液体)。
- 4.3) 用药匙将擦干的组织置于碎冰上的平皿 OCT (已预冷) 中, 使组织表面与 OCT 充分混合 (注意是否有气泡)。
- 4.4) OCT 包裹的组织放入碎冰上预冷的金属包埋盒 B 中 (注意切面, 包埋盒 B 中应有预冷的 OCT), OCT 不足可补充, 直至 OCT 完全覆盖组织。
- 4.5) 将带有组织的金属包埋盒 B 放入干冰上的平整金属块中冷冻, 预冷的金属包埋盒 A 中放入一块干冰, 作为盖子置于包埋盒 B 上加速冷冻。
- 4.6) 5 min 后, 移除作为盖子的金属包埋盒 A, 查看组织包埋块表面 OCT 是否完全凝

固。

4.7) 完全凝固后在包埋块和金属包埋盒上做好标记及切面。

4.8) 取出包埋块: 用手轻掰金属包埋盒 B 两侧, 即可使 OCT 包埋组织块从金属包埋盒 B 中脱模切片。

5) 保存及运输

5.1) 包埋好的组织块用锡箔纸包裹, 可装进密封袋做好标记。

5.2) 包埋好的组织块需立刻置于-80°C 冰箱保存, 邮寄则需用干冰保存。根据邮寄时间, 推荐所需干冰量约 3 kg/天。

6) 注意事项

6.1) 新鲜组织离体后, 需在 30 分钟内完成包埋。操作时应在低温环境下迅速进行, 以避免 RNA 的降解。

6.2) 在包埋过程中, 需要特别注意取材尺寸, 并尽量选择与组织大小相匹配的包埋盒。如果组织形态严重变形, 可能是取材过程中对组织造成挤压, 需要调整取样方式; 或者是组织太小而 OCT 太多, 在包埋过程中 OCT 包埋剂膨胀挤压组织造成变形。应根据具体情况调整包埋条件, 例如更换适合尺寸和材质的包埋盒等。

6.3) 考虑组织类型自身的影响, 组织撕裂或空洞形成可能是由以下原因引起的: 缓慢或者不充分的冷冻过程中形成的冰晶; 在组织包埋过程中引入的气泡。

6.4) 建议在取材后包埋之前, 需尽量将组织表面的水分吸干。

缓慢的冷冻过程也可能导致较大的冰晶形成, 建议在组织包埋过程中迅速冷冻。组织包埋过程中要尽量吸弃组织周围的 OCT 气泡, 避免 OCT 中气泡对组织切片完整性的影响。

3.2.3 冷冻切片

1) 冷冻切片机箱体预冷 (-20°C) 和样本头预冷 (-10~ -20°C, 根据不同组织调整);

2) 提前将毛刷、刀片等置于-20°C箱体预冷;

3) 将组织块从-80°C冰箱取出放在冷冻切片机内平衡 10-15 min, 若包埋组织块较大, 可适当延长平衡时间;

4) 对组织块进行修理, 切去组织块周围多余的 OCT 包埋剂;

5) 使用 OCT 将组织块固定到样品托上, 注意确定切片方向;

6) 根据需要稍稍修理组织块后进行组织切片。

3.2.4 样本质检

- 1) 包埋好的组织样本切 10-20 片 10 μm 厚度的切片存放至 -20°C 预冷的 1.5 mL 无酶 EP 管中, 进行 Total RNA 提取和质量检测 ($\text{RIN} \geq 7$ 视为合格样本)。剩余样本放回 -80°C 冰箱保存, 等到确认质检合格后, 再切片进行正式空间转录组实验。

Tips: 仅有组织切片完整性高且 $\text{RIN} \geq 7$ 的样本才可进入后续实验流程。

- 2) 在进行正式实验前, 需对组织包埋块进行切片染色质检, 显微镜观察切片的组织完整性。

3.3 空间转录组基因表达实验流程

3.3.1 实验前准备

试剂准备

准备试剂	准备流程	储存
0.45M Tris-乙酸缓冲液(pH6.0)	将 11 g 三(羟甲基)氨基甲烷溶解于 100 mL Nuclease Free Water 中; 使用 100%乙酸将 pH 调至 6.0; 用 Nuclease Free Water 将体积定容至 200 mL; 通过 0.2 μm 滤膜进行过滤。	室温
0.1 \times SSC	取 20 \times SSC 100 μL 稀释到 20 mL	室温
0.1 \times SSC (含 5% RNase Inhibitor)	取 5 μL RI 加入 95 μL 0.1 \times SSC 中, 用量至少为 100 μL /孔。	冰上备用
0.1 M HCl	按照 HCL 浓度梯度稀释到 1 M, 再稀释到 0.1 M。 注意: 0.1 M HCl ($\text{pH} = 1.0 \pm 0.1$) 需现配现用。 对于预制的 0.1 M HCl 和新购买的 HCl, 实验前请检查 pH 值。 储存时间超过 24 h 将影响预期 pH 值, 请在配制后 24 h 内使用。	室温 24 h
0.01 M HCl	按照 HCL 浓度梯度稀释到 1 M、0.1 M, 再稀释到 0.01 M。 注意: 0.01 M HCl ($\text{pH} = 2.0 \pm 0.1$) 需现配现用。 对于预制的 0.01 M HCl 和新购买的 HCl, 实验前请检查 pH 值。 储存时间超过 24 h 将影响预期 pH 值, 请在配制后 24 h 内使用。	室温 24 h
1 \times 透化试剂工作液	用 0.1M HCl 将 100 \times 透化试剂储存液 1 μL 稀释到 100 μL (至少 120 μL /孔)	冰上备用 6 h

设备准备

仪器	设定	备注
烤片机	37 $^{\circ}\text{C}$ 用于烤片	-

冷冻切片机	箱体预冷至-20°C； 样本头预冷至-15~-10°C（根据实际操作过程调整）； 毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷。	-
Salus 空间转录组 PCR 适配器 (PCR 适配器)	按顺序依次设定： 37°C用于透化 42°C用于反转录	热盖温度设置与反应温度相同
显微镜	白光通道	-

3.3.2 切片前样本准备

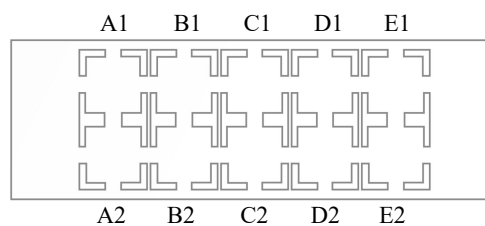
- 1) 将 OCT 包埋的组织块从-80°C 冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 10-15 min，若包埋组织块较大，可适当延长平衡时间；
- 2) 将组织块修剪成合适的尺寸，切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- 3) 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

3.3.3 芯片处理与组织贴片

- 1) 芯片清洗：

从载玻片盒中取出芯片，用 50 mL ddH₂O 涮洗芯片 2-3 次，用无尘纸擦干净芯片背面，然后将芯片放置于 37°C 烤片机烤干至表面无任何液体残留即可。

芯片烤干后置于常温准备下一步操作，不可长时间放置在烤片机上，以免在后续芯片遇冷时温差过大。



Tips: 芯片缺角处朝右上为正面朝上，芯片孔编号如图，切勿放反导致破坏芯片表面探针信息。

- 2) 甲醇预冷：

用一个干净且密封性较好的载玻片盒盛装 40 mL 甲醇，提前 10-20 min 在冷冻切片机中预冷甲醇。

Tips: 甲醇预冷时间不可超过 30 min，时间过长甲醇吸附空气中水汽，影响组织固定效果。

- 3) 组织切片贴片：

将组织包埋块固定至冻头上，选取合适大小（小于 0.8 cm × 0.8 cm）的组织部位进

行修片切片。

贴片采取冷贴法, 将芯片置于切片机箱中预冷, 用细毛笔小心将冷冻切片覆盖在芯片捕获区域上, 用手置于覆有组织切片的芯片背面, 使切片贴合于捕获芯片上, 后迅速转移至 37°C 烤片机上, 烤片 5 min。

- 4) 若需贴多张切片, 同一个样本可以多切几张后用指腹依次复温, 等所有切片贴片完毕后再一同烤片。

若不同样本, 则需每个样本分开切片贴片后再一同烤片, 等待间隙芯片始终放置于切片机内预冷。

3.3.4 组织固定与 HE 染色

- 1) 将烤好的芯片放于 -20°C 预冷的甲醇溶液中固定 30-40 min。
2) 甲醇固定期间准备 HE 染色试剂和 3 个烧杯, 每个烧杯装不少于 800 mL ddH₂O。

Tips: ① 甲醇固定过程中还可以提前配置下文所需的伊红染液、透化工作液、RT MIX II 试剂以及 0.1×SSC (含 5% RNase Inhibitor)。

② 配置好的伊红染液常温避光, 透化工作液、RT MIX II 试剂以及 0.1×SSC (含 5% RNase Inhibitor) 置于 4°C 冰箱备用。

- 3) 芯片从甲醇中取出晾干后, 加入异丙醇均匀覆盖组织, 室温孵育 1 min。

Tips: 实验全程加液和吸液过程避免碰到组织; 染色步骤建议在通风橱中进行。

- 4) 倾斜芯片倒掉异丙醇, 待异丙醇挥发, 此过程不超过 5 min。
5) 加入苏木精染液均匀覆盖组织, 室温孵育 1-8 min, 正式实验前需摸索一下染色时间。
6) 倾斜芯片倒掉苏木精染液, 在 50 mL 离心管中涮洗 5 次, 然后在第一个烧杯中涮洗 15 次, 第二个烧杯中涮洗 15 次, 用无尘纸擦掉芯片背面多余液体。
7) 加入返蓝液均匀覆盖组织, 室温孵育 2min, 倾斜倒掉返蓝液后, 在第二个烧杯中涮洗 15 次, 用无尘纸擦掉芯片背面多余液体。
8) 配制伊红染液 (伊红: 0.45M Tris-乙酸=1: 9), 加入稀释后的伊红染液均匀覆盖组织, 室温孵育 30s-2min, 倾斜倒掉伊红染液后, 在第三个烧杯中涮洗 15 次, 用无尘纸擦掉芯片背面多余液体, 转移至 37°C 烤片机上, 烤片 3 min。

- 9) 显微镜白光拍照。

3.3.5 组织透化

- 1) 准备透化试剂 (现用现配):

甲醇固定时, 将试剂盒中 100× 的 Permeabilization Enzyme 储存液, 用 HCl 稀释 100 倍配置成透化工作液, 不同样本使用的 HCl 浓度见附录 1。

Tips: Permeabilization Enzyme 不可涡旋震荡;

0.1M/0.01M HCl 需由浓盐酸稀释配置, 并且测定 pH, 配置好后存放时间应不超过 24 小时。

2) 夹具安装:

将拍照结束后的芯片放置于反应载具中, 将密封垫光滑面朝下, 盖上盖板, 将全部固定螺丝拧至一定程度后, 再逐一将螺丝拧紧。



3) 将已固定在载具上的芯片放置在 PCR 仪中预热, 预先配置的透化试剂放置在金属浴中预热, 37°C 预热 3 min。滴加预热平衡好的透化试剂 120 μL/孔, 注意液体要浸没芯片, 载具表面覆盖密封膜, 放置在 37°C PCR 仪中反应, 组织透化时间根据附录 1 组织建议透化时间。若不同样本透化时间不同, 按照透化时间由长至短的顺序, 逐一滴加预热平衡好的透化试剂, 直至添加完最短时间的透化试剂。务必注意确保液体充分浸没芯片, 勿使芯片大幅度晃动。

4) 透化过程结束前, 提前 3~5min 拿出 0.1× SSC (含 5% RNase Inhibitor) 和 RT MIX II 试剂进行室温复温。

5) 透化结束后揭开封板膜, 吸弃芯片表面的透化试剂, 加 100μL/孔 0.1×SSC (含 5% RNase Inhibitor), 注意液体要浸没芯片, 清洗一次并吸弃。

Tips: 吸弃芯片表面液体务必干净, 避免残留液体影响下一步试剂反应。

3.3.6 反转录反应

1) 在甲醇固定或组织透化时, 可提前进行 RT MIX II 体系的配置。

RT Mix II 体系

试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积 (μL)
绿色	RT Reagent II	90
黄色	RT Enzyme	5
无色	RNase Inhibitor	5
	Total	100

- 2) 加入 100 μL /孔平衡至室温的 RT Mix II, 注意液体要浸没芯片, 载具表面覆盖封板膜, 42°C PCR 仪内反应 3 h 或过夜, 热盖温度设置与模块反应温度一致。

3.3.7 组织消化

- 1) 配置 Exo I Mix, 置于冰上备用。

Exo I Mix		
试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积 (μL)
橙色	Exo I	3
绿色	Exo I Buffer	92
无色	RNase Inhibitor	5
	Total	100

- 2) 吸弃芯片捕获区域内 RT Mix II, 加 100 μL /孔 0.1 \times SSC, 注意液体要浸没芯片, 清洗一次并吸弃。
- 3) 加入 100 μL /孔 Exo I Mix, 注意液体要浸没芯片, 载具表面覆盖密封膜, 37°C PCR 仪内反应 30 min, 热盖温度设置与模块反应温度一致。
- 4) 吸弃 Exo I Mix, 加入 100 μL /孔 0.08 M KOH 溶液, 注意液体要浸没芯片, 载具表面覆盖密封膜, 室温反应 10 min。

Tip: 0.08 M KOH 需用现配。

- 5) 吸弃 0.08 M KOH, 加入 100 μL /孔 Buffer EB, 注意液体要浸没芯片, 清洗芯片一次并吸弃。

3.3.8 二链延伸

- 1) 提前配置 cDNA 二链合成 Mix, 置于冰上备用。

cDNA 二链合成 Mix		
试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积 (μL)
绿色	Second Strand Reagent	82.8
蓝色	Second Strand Primer	10
黄色	Second Strand Enzyme	7.2
	Total	100

- 2) 加入 100 μL /孔 cDNA 二链合成 Mix, 注意液体要浸没芯片, 载具表面覆盖密封膜, 37°C PCR 仪内反应 1 h, 热盖温度设置与模块反应温度一致。
- 3) 吸弃 cDNA 二链合成 Mix, 加入 100 μL /孔 Buffer EB, 注意液体要浸没芯片, 清洗芯片一次并吸弃。
- 4) 加入 60 μL /孔 0.08M KOH, 用移液器缓慢吹打确保液体浸没芯片, 但尽量不要引入气泡, 载具表面覆盖密封膜, 室温反应 15min。

- 5) 回收到 0.2 mL PCR 管中, 每管 60 μL , 并加入 8 μL 1M pH7.0 Tris-HCl 混匀中和, 若回收体积不足加 NF-H₂O 补至 68 μL 。
- 6) 准备 cDNA PCR Mix: 回收样品 68 μL , 加入 PCR Amp Mix 及 cDNA Amp Primers 共 69.5 μL , 总体积 137.5 μL , 进行 PCR 反应。

cDNA PCR Mix

试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积 (μL)
橙色	PCR Amp Mix	68
蓝色	cDNA Amp Primers	1.5
	回收样品	68
	Total	137.5

按照如下程序进行扩增:

反应程序设置

热盖温度		反应体系	
105°C		137.5 μL	
步骤	温度	时间	循环数
1	95°C	3min	/
2	95°C	30s	15
3	60°C	1min	
4	72°C	1min	
5	72°C	2min	/
6	4°C	Hold	/

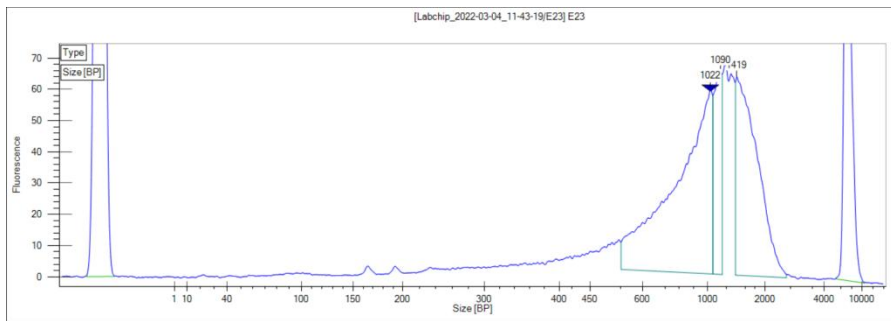
- 7) 取 1 μL 扩增后的产物用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度, 要求产物浓度 ≥ 10 ng/ μL 。

Tip: 芯片保存方式: 若基因表达芯片未一次性全部用完, 将芯片放在芯片保存液中, 或将芯片置于载具中加入芯片 100 μL 保存液封膜保存, 芯片保存液可用 TE Buffer 替换, 2~8°C 避光保存, 后续实验正常使用即可。

3.3.9 cDNA 纯化和质检

- 提前 30 min 取出 VAHTS™ DNA Clean Beads (VAZYME) 置于室温, 使用前充分震荡混匀。
- 测量 PCR 反应液体积, 反应液与室温平衡好的 VAHTS™ DNA Clean Beads (VAZYME) 按照 1: 0.8 混合, 吹打混匀, 室温孵育 10 min。
- 瞬时离心, 将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上静置 3 min, 待液体澄清后吸弃上清。
- 保持 0.2 mL PCR 管置于磁力架上, 沿管壁加入 200 μL 新鲜配置的 80%乙醇清洗磁

- 珠及管壁，静置 30 s 后吸弃上清。
- 5) 重复步骤 4)，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸弃。
 - 6) 保持 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温晾干 3-5 min，直至磁珠表面无反光、无开裂。
 - 7) 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 40 μ L 的 NF- H₂O 回溶，震荡混匀后室温静置 5 min。
 - 8) 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上静置 3-5 min，待液体澄清后回收上清。
 - 9) 取 1 μ L cDNA 样品用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度，使用 Agilent 2100 Chip 或 Lab chip 对 cDNA 片段分布进行质检，产物可放置在 -20°C 存放。
 - 10) QC 标准：要求 cDNA 样品浓度 ≥ 5 ng/ μ L，片段分布主峰在 600-1500 bp。



3.3.10 文库构建

- 1) 取 50 ng cDNA 产物（体积不足 14 μ L 用 NF-H₂O 补足）用于构建测序文库，按照下表在 0.2 mL PCR 管配置打断 Mix：

打断 Mix		
试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积 (μ L)
绿色	TMB	4
紫色	TME	2
/	cDNA 产物	14
	Total	20

Tips: TME 使用移液器轻轻吹打混匀，不可涡旋震荡。

- 2) 将 0.2 mL PCR 管置于提前预热到 55°C 的 PCR 仪中，孵育 10 min，结束后置于室温，每管加入 5 μ L 的 Stop Buffer，用移液器缓慢吹打混匀后，室温静置 5 min，按下表配置 PCR Library Mix 来扩增打断产物：

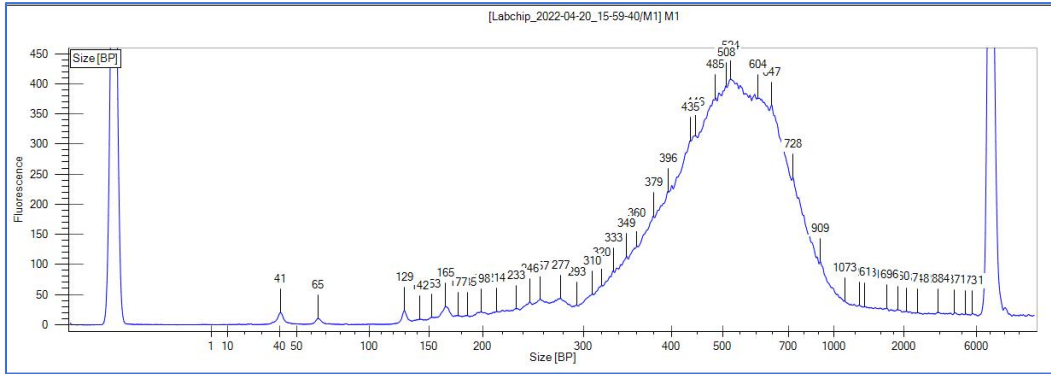
PCR Library Mix		
试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积 (μ L)
橙色	PCR Amp Mix	50

蓝色	Library Primers	25
	打断产物	25
	Total	100

按照如下程序进行扩增:

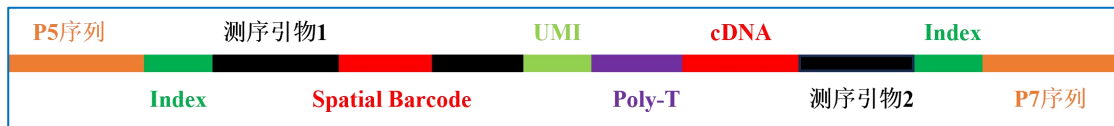
反应程序设置			
热盖温度		反应体系	
105°C		100 μ L	
步骤	温度	时间	循环数
1	95°C	5min	/
2	98°C	20s	13
3	60°C	20s	
4	72°C	30s	
5	72°C	5min	/
6	4°C	Hold	/

- 3) 提前 30 min 取出 VAHTS™ DNA Clean Beads (VAZYME) 置于室温, 使用前充分震荡混匀。
- 4) PCR 反应液中加入 50 μ L 磁珠, 震荡混匀, 室温孵育 10 min。
- 5) 瞬时离心后, 将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上静置 3 min, 待液体澄清后吸取全部上清到新的 0.2 mL PCR 管。
- 6) 上清中加入 20 μ L 磁珠, 震荡混匀, 室温孵育 10 min。
- 7) 瞬时离心后, 将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上静置 3 min, 待液体澄清后吸弃上清。
- 8) 保持 0.2 mL PCR 管置于磁力架上, 沿管壁加入 200 μ L 新鲜配置的 80%乙醇清洗磁珠及管壁, 静置 30 s 后吸弃上清。
- 9) 重复步骤 8), 尽量吸干管内液体, 有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程移液器将管底液体吸弃。
- 10) 保持 0.2 mL PCR 管置于磁力架上, 打开管盖, 室温晾干 3-5 min, 直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 11) 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下, 加入 20 μ L 的 NF-H₂O 回溶, 震荡混匀后室温静置 5 min。
- 12) 瞬时离心, 将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上静置 3-5 min, 待液体澄清后回收上清。
- 13) 取 1 μ L 文库样品用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度, 使用 Agilent 2100 Chip 或 Lab chip 对文库片段分布进行质检, 产物可放置在-20°C存放。
- 14) QC 标准: 要求文库浓度 \geq 5 ng/ μ L, 片段分布主峰在 300-600 bp。



3.3.11 文库结构及测序方案

文库结构如图所示。



文库测序类型:

Read 1 > 97bp; Read 2 > 100bp; 双 Index 为 8bp;

请参考 Salus Pro 测序试剂套装 (PRM-PE100-500M) 或其他品牌测序试剂盒使用说明书进行测序。

Index	序列 (5' - 3')
i5_02	CGATGTTT
i7_02	AGTGGTCA

Tips: 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, 请联系赛陆医疗技术支持人员。

附录1 组织建议透化时间

物种	样本类型	透化时间	HCl 浓度
小鼠	脑	3 min	0.1M
小鼠	嗅球	3 min	0.1M
小鼠	脾	3 min	0.1M
小鼠	心脏	6 min	0.1M
小鼠	胚胎胸腺	18 min	0.01M
小鼠	肾	6 min	0.1M
小鼠	肝	6 min	0.1M
小鼠	睾丸	3 min	0.1M
小鼠	卵巢	3 min	0.1M
小鼠	甲状旁腺	6 min	0.1M
小鼠	垂体	18 min	0.01M
人	脑海马体	3 min	0.1M
人	淋巴结	18 min	0.01M
人	肝(穿刺)	6 min	0.1M
人	肝癌	6 min	0.1M
人	乳腺癌	6 min	0.1M
人	脑膜瘤	18 min	0.01M
人	肺癌	3 min	0.1M
人	胃癌	6 min	0.1M
人	滑膜	3 min	0.1M
大鼠	肺	3 min	0.1M
大鼠	脑	3 min	0.1M

表格中未列出的样本类型需提前对透化条件进行测试摸索,详细测试方法请与赛陆技术人员沟通。

参考测试条件: 0.1M HCl 透化 3min、6min, 0.01M HCl 透化 12min、18min。

推荐判定标准: 组织形态完整,符合 HE 展示结构,捕获量大于 150 UMI/100 μm^2 。

附录 2 制造商信息

生产企业名称	深圳赛陆医疗科技有限公司
公司地址	深圳市光明区凤凰街道塘尾社区恒泰裕大厦 1 栋 2001、3 栋 3A 7-11 层
生产地址	深圳市光明区凤凰街道塘尾社区恒泰裕大厦 3A 栋 10-11 层
技术支持厂家	深圳赛陆医疗科技有限公司
客服电话	400-8072-587
