Salus 空间转录组试剂使用说明书
（11 mm 芯片）

版本记录

版本	发布日期	修订内容摘要
1.0	20240118	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 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-S00183	Salus 空间转录组基因表达套装（11 mm）	1.1
SL-S00186	Salus 空间组学芯片载具（11 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（11 mm）》产品使用说明等信息。

1.1. 产品描述

《Salus 空间转录组基因表达套装（11 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（11 mm） 货号：SL-S00183

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（11 mm/4 rxns） 货号：SL-S00185	测序芯片	1 张	/
Salus 空间转录组基因表达试剂盒（4 rxns） 货号：SL-S00184	Permeabilization Enzyme	10 µL/管×4 管	橙色
	RT Reagent II	540 µL/管×1 管	绿色
	RT Enzyme	30 µL/管×1 管	黄色
	RNase Inhibitor	90 µL/管×1 管	无色
	ExoI Buffer	560 µL/管×1 管	绿色
	ExoI	18 µL/管×1 管	橙色
	Second Strand Reagent	500 µL/管×1 管	绿色
	Second Strand Primer	60 µL/管×1 管	蓝色
	Second Strand Enzyme	45 µL/管×1 管	黄色
	cDNA Amp Primers	12 µL/管×1 管	蓝色
	PCR Amp Mix	680 µL/管×1 管	橙色
	TMB	16 µL/管×1 管	绿色
	TME	8 µL/管×1 管	紫色
	Stop Buffer	20 µL/管×1 管	无色
	Library Primers	100 µL/管×1 管	蓝色
	Salus 空间转录组密封垫（11 mm ）	4 个/盒×1 盒	/
	Salus 空间转录组封板膜	10 张/盒×1 盒	/

存储：

Salus 空间转录组基因表达芯片（11 mm） 存储温度：2~8℃

Salus 空间转录组基因表达试剂盒（4 rxns）存储温度：-25~-15℃

运输：

Salus 空间转录组基因表达芯片（11 mm） 运输：冷链运输（2~8℃）

Salus 空间转录组基因表达试剂盒（4 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_2O	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 0.2mL 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℃预冷的 1.5 mL 无酶 EP 管中，进行 Total RNA 提取和质量检测（RIN ≥7 视为合格样本）。剩余样本放回-80℃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 RIN ≥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× SSC	取 20× SSC 100 μL 稀释到 20 mL	室温
0.1× SSC（含 5% RNase Inhibitor）	取 7.5 μL RI 加入 142.5 μL 0.1× SSC 中，用量至少为 150 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（pH = 1.0±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 hr 将影响预期 pH 值，请在配制后 24 hr 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（pH = 2.0±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 ×透化试剂工作液	用 0.1 M HCl 将 100 ×透化试剂储存液 1 μL 稀释到 100 μL（至少 200 μL/孔）。	冰上备用 6 h

设备准备

仪器	设定	备注
烤片机	37℃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℃用于透化 42℃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；

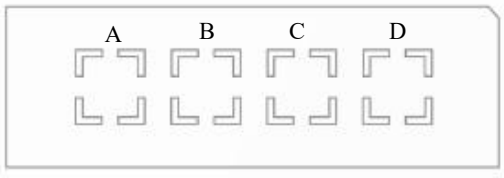
3）使用 OCT 将组织块固定到样品托上；根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

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 ddH_2O 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℃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 1 cm × 1 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℃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℃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 ddH_2O。

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℃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 2 min，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：0.45MTris-乙酸=1：9），加入稀释后的伊红染液均匀覆盖组织，室温孵育 30 s-2 min，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℃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）：

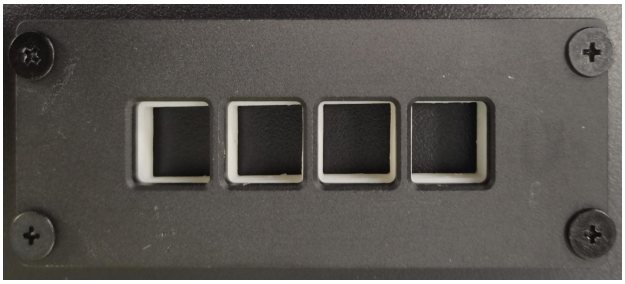
甲醇固定时，将试剂盒中 100× 的 Permeabilization Enzyme 储存液，用 HCl 稀释 100 倍配置成透化工作液，不同样本使用的 HCl 浓度见附录 1。

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℃预热 3 分钟。滴加预热平衡好的透化试剂 200 μL/孔，注意液体要浸没芯片，载具表面覆盖密封膜，放置在 37℃ 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，拿出 0.1× SSC（含 5% RNase Inhibitor）和 RT Mix II试剂进行室温复温 3~5 min。

5）透化结束后揭开封板膜，吸弃芯片表面的透化试剂，加 150 μL/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	135
黄色	RT Enzyme	7.5
无色	Rnase Inhibitor	7.5
	Total	150

2）加入 150 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℃ 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	4.5
绿色	Exo I Buffer	138
无色	RNase Inhibitor	7.5
	Total	150

2）吸弃芯片捕获区域内 RT Mix II，加 150 μL/孔 0.1× SSC，注意液体要浸没芯片，清洗一次并吸弃。

3）加入 150μL/孔 Exo I Mix，注意液体要浸没芯片，载具表面覆盖密封膜，37℃ 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 150 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 需现用现配。

5）吸弃 0.08 M KOH，加入 150 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	124.2
蓝色	Second Strand Primer	15
黄色	Second Strand Enzyme	10.8
	Total	150

2）加入 150 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℃ 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 150 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 106 μL/孔 0.08M KOH，注意液体要浸没芯片，载具表面覆盖密封膜，室温反

应 15 min。

5）回收 106 μL 0.08 M KOH 到两个 0.2 mL PCR 管中（53 μL/管），并加入 7.5 μL/管 1 M pH 7.0 Tris-HCl 混匀中和，此时每管的回收样品体积均为 60.5 μL。

6）准备 cDNA PCR Mix：回收样品 60.5 μL/管，不足 60.5 μL 时用 NF- H_2O 补足，加入 PCR Amp Mix 及 cDNA Amp Primers 共 61.5 μL/管，总体积 122 μL/管，两管 cDNA PCR Mix 分别进行 PCR 反应。

表 15 cDNA PCR Mix/管

试剂盖子颜色	试剂名称	单个反应体积（μL）
橙色	PCR Amp Mix	60
蓝色	cDNA Amp Primers	1.5
	回收样品	60.5
	Total	122

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℃		122 μL	
步骤	温度	时间	循环数
1	95℃	3min	/
2	95℃	30s	15
3	60℃	1min	
4	72℃	1min	
5	72℃	2min	/
6	4℃	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 150 μL 保存液封膜保存，芯片保存液可用 TE Buffer 替换，2~8℃避光保存，后续实验正常使用即可。

3.3.9 cDNA 纯化和质检

1）提前 30 min 取出 VAHTS™ DNA Clean Beads（VAZYME）置于室温，使用前充分震荡混匀。

2）测量 PCR 反应液体积，2 管反应液与室温平衡好的 VAHTS™ DNA Clean Beads（VAZYME）分别按照 1：0.8 混合，吹打混匀，室温孵育 10 min。

3）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。

4）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。

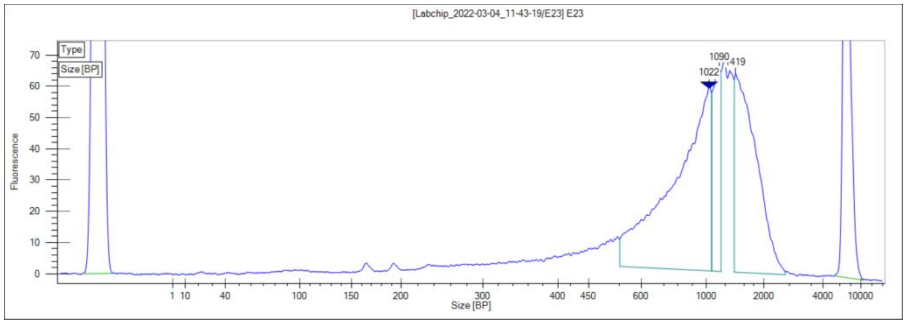
6）保持 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温晾干 3-5 min，直至磁珠表面无反光、无开裂。

7）将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 40 μL 的 NF- H_2O 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，2 个 PCR 管合并回收上清至 1 管。

9）取 1 μL 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℃存放。

10）QC 标准：要求 cDNA 样品浓度≥5 ng/μL，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 μL 用 NF-H_2O 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（μL）
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℃的 PCR 仪中，孵育 10 min，结束后置于室温，

每管加入 5 μL 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（μL）
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℃		100 μL	
步骤	温度	时间	循环数
1	95℃	5min	/
2	98℃	20s	13
3	60℃	20s	
4	72℃	30s	
5	72℃	5min	/
6	4℃	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 μL 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 μL 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 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。

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。

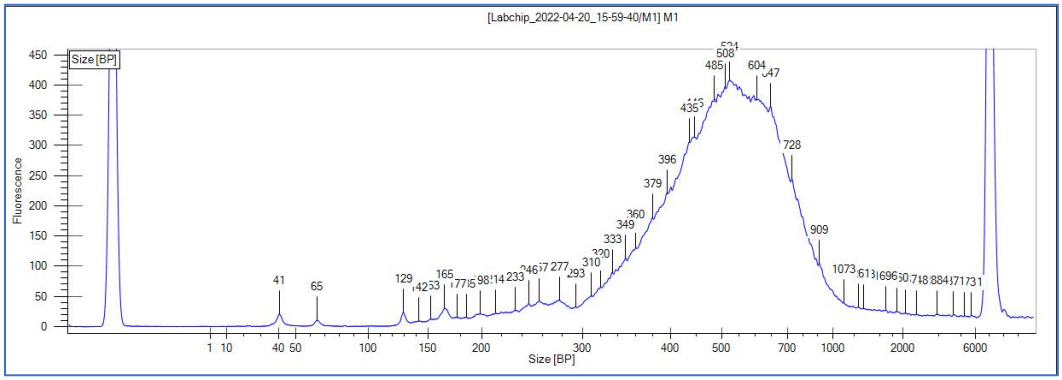
10）保持 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温 3-5 min，直至磁珠表面无反光、无开裂。

11）将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 20 μL 的 NF-H_2O 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。

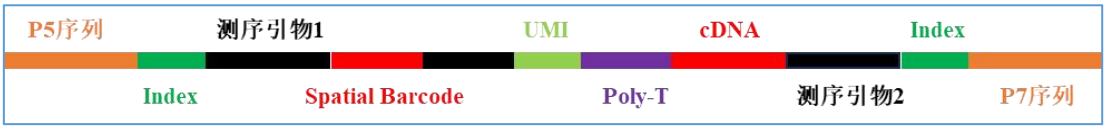
13）取 1 μL 文库样品用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度，使用 Agilent 2100 Chip 或 Labchip 对文库片段分布进行质检，产物可放置在-20℃存放。

14）QC 标准：要求文库浓度≥5 ng/μL，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	18min	**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	18min	**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	18min	**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