

青岛百创智能制造技术有限公司

**BMKMANU S1000 BMKMANU Gene
Expression Kits User Guide V3.2**



时空产品部

2023. 10. 10

版本历史：

说明书版本：V1

试剂盒版本：V1

修订日期：2021 年 12 月

修订内容：首次发布

说明书版本：V2

试剂盒版本：V2

修订日期：2022 年 8 月

修订内容：

1. 更新试剂盒组分。
 2. 更新 2. 1. f 中杂交缓冲液配方。
 3. 更改二链合成步骤的反应时间。
-

说明书版本：V3

试剂盒版本：V3

修订日期：2023 年 3 月

修订内容：

1. 更新客户自备材料。
 2. 更新试剂盒组分。
 3. 更新芯片盒组分。
 4. 新增 1. 3. d. 扫片注意事项。
 5. 删除 2. 1. c. 塑料卡夹使用方法，更换为金属卡夹使用方法，并增加卡夹清理操作。
 6. 更新 3. 1. f. 二链合成体系。
-

说明书版本：V3. 1

试剂盒版本：V3，附加细胞分割试剂

修订日期：2023 年 6 月

修订内容：

1. 更新产品组分：（1）添加细胞分割试剂组分（2）增加透化酶装量。
 2. 更新客户自备材料。
 3. 在操作步骤中的 1. 1. 2-1. 1. 3 插入细胞分割相关染色及扫片操作。
 4. 新增产品运输与保存条件表格。
 5. 增加附录 1 植物细胞分割固定染色及成像操作说明。
-

说明书版本：V3. 2

试剂盒版本：V3. 2

修订日期：2023 年 10 月

修订内容：

1. 版说明书整体重新排版，增加细节，细胞分割操作见附录。
2. 更新客户自备物料，增加仪器耗材等。
3. 3 号试剂 Permeabilization Enzyme 改为干粉，使用方法见 3. 1 实验前准备。

目录

一、 产品信息.....	4
1.1. 产品描述.....	4
1.2. 产品组分.....	4
1.3. 自备物料.....	5
1.4. 注意事项.....	8
二、 实验流程概览（共约 8h）.....	8
三、 S1000 基因表达操作说明.....	9
3.1. 实验前准备.....	9
3.2. 组织固定.....	10
3.3. 组织 H&E 染色.....	10
3.4. 组织 H&E 成像.....	11
3.5. 组织透化.....	11
3.6. 逆转录.....	13
3.7. cDNA 一链变性.....	13
3.8. cDNA 二链合成.....	14
3.9. cDNA 二链变性及回收.....	15
3.10. cDNA 扩增与纯化.....	15
四、 附录I：细胞分割.....	18
4.1. 细胞分割试剂盒产品组分.....	18
4.2. 细胞分割荧光染色.....	18
4.3. 细胞分割荧光成像.....	19
五、 附录II：植物组织及植物组织细胞分割操作说明.....	21
5.1. 植物组织固定.....	21
5.2. 植物组织染色（细胞分割）.....	21
六、 附录 III：百创 S1000 成像要求.....	22

一、产品信息

1.1. 产品描述

BMKMANU S1000 Gene Expression kit 是一款将新鲜冰切样本 3' 端全转录本数据与其空间位置信息相结合而定向开发的空间专用试剂盒。

BMKMANU S1000 Gene Expression slides 在保留空间信息的基础上具有更高的分辨率，本产品所使用的芯片和试剂已经过严格质量控制及功能验证，最大程度上保证了结果的稳定性和重复性。

1.2. 产品组分

S1000 空间转录组基因表达试剂盒 V3.2 版					
管盖编号	试剂盒	1rxn	4rxns	储存条件	使用节点
1	Protective Agent I	20ul	80ul	-20°C	3.5. 组织透化
2	Protective Agent II	9ul	36ul	-20°C	
3	Permeabilization Enzyme	10mg	10mg	-20°C	
4	RT Reagent	26ul	104ul	-20°C	3.6. 逆转录
5	RT Enzyme	15ul	60ul	-20°C	
6	Reducing Reagent	10ul	40ul	-20°C	
7	In Reagent	20ul	80ul	-20°C	
8	Strand-Switching Primer	10ul	40ul	-80°C	3.8. cDNA 二链合成
9	Second Strand Reagent	18ul	72ul	-20°C	
10	Second Strand Enzyme	4ul	16ul	-20°C	
11	Second Strand Primer	5ul	20ul	-20°C	3.10. cDNA 扩增与纯化
12	15×cDNA Primer	2ul	8ul	-20°C	
13	Amp mix	50ul	200ul	-20°C	

S1000 空间转录组芯片盒 V2 版			
	1rxn	4rxns	储存条件
BMKMANU S1000 Gene Expression slides	1	4	干燥, 常温
BMKMANU S1000 Slide Gasket	1	4	干燥, 常温
BMKMANU S1000 Slide Seals	2	8	干燥, 常温

 细胞分割实验还需细胞分割试剂盒, 详见 4.1. 细胞分割试剂盒产品组分

1.3. 自备物料

自备试剂		
供应商	名称	货号
安捷伦 (Agilent)	苏木精染色液	CS700
	返蓝染色液	CS702
	伊红染色液	CS701
	High Sensitivity Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer System	5067-4626 (50-7000bp)
西格玛 (Millipore Sigma)	甲醇, $\geq 99.9\%$	34860
	异丙醇, $\geq 99.5\%$	I9516-25ml
	KOH (氢氧化钾) 溶液, 8M	P4494-50ml
	SSC 缓冲液 20X 浓缩液	S66391L
	甲苯胺蓝 (植物组织染色用)	89640-5G
赛默飞 (Thermo Fisher)	Tris Base	BP152-500
	Tris 1M, pH 7.0, 无 RNA 酶	AM9850G
	Qubit™ dsDNA HS 和 BR 定量试剂盒	Q32854
	Nuclease-free Water	AM9932
	RNaseZap™	AM9780/AM9782
KAPA Biosystems	Kapa SYBR® FAST qPCR Master Mix	KK4600
QIAGEN	Buffer EB	19086

贝克曼 (BECKMAN COULTER)	SPRIselect	B23317
-	0.1N HCL (pH1-2)	N/A
	无水乙醇	N/A
	醋酸 Acetic acid, ≥99.9%	N/A
宝日医 (Takara)	Recombinant RNase Inhibitor (细胞分割使用)	2313A

自备仪器	
供应商	名称
实时荧光定量 qPCR 仪(共推荐两款,二选一)	
罗氏 (Roche)	荧光定量 LC480 II
伯乐(Bio-Rad)	CFX96 实时荧光 qPCR 仪(SYBR/FAM)
PCR 仪(热盖温度最低可达 50°C、100 ul 深孔)(共推荐三款,三选一)	
赛默飞 (Thermo Fisher)	Veriti™ 96 孔 PCR 热循环仪
伯乐(Bio-Rad)	C1000 Touch™ 深孔 PCR 热循环仪
艾本德(Eppendorf)	PCR 热循环仪 MasterCycler™ Pro
-	明场显微镜或幻灯片扫描仪(彩色摄像机) (不可盖盖玻片)
	荧光显微镜或幻灯片扫描仪 (fitc、cy3 通道, 不可盖盖玻片)
	用于超纯水或无 RNase 的 Milli-Q 一体化净水系统
	冷冻切片机(切片机只要符合实验要求即可)
	PH 计
	-80°C立式超低温冰箱
	-20°C和 4°C冰箱
	实验室制冰机
	震荡涡旋仪
	金属浴 (带 1.5ml 管适配器)
	迷你离心机(适用于 1.5 ml 试管)

	迷你离心机(适用于 PCR8 联排管)
	迷你离心机 (适用 96 孔板)
	适用于 50ml 试管离心机
	不同量程的移液器
	0.2ml 管磁力架
百创智造 (BMKMANU)	适配器 A/适配器 B (ST03004/ST03005)
赛默飞 (Thermo Fisher)	Qubit™ 4 荧光定量仪
核酸片段分析仪二选一 (或其它同等功能仪器)	
瑞孚迪 (Revvity)	LabChip GX Touch 24(cDNA、文库片段分析)
安捷伦(Agilent)	2100 分析仪(cDNA、文库片段分析)

 显微镜成像要求, 可以详细[参见附录](#)

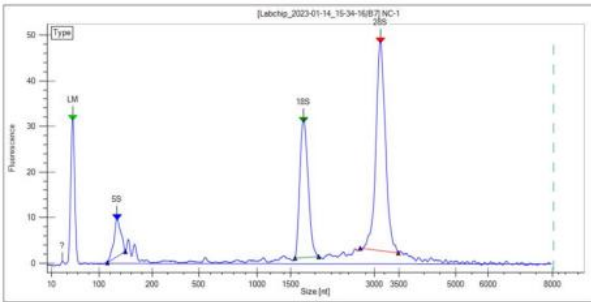
自备耗材		
供应商	名称	货号
金佰利 (Kimtech)	无尘纸	34155
爱思进 (Axygen)	1000ul 灭菌枪头	T-1000-B-R-S
	100ul/200ul 低吸附枪头	T-200-C-L-R-S
	10ul 低吸附枪头	T-300-L-R
	1.5ml 离心管	MCT-150-C
	0.2ml PCR 管	PCR-02-L-C
	0.5ml 薄壁管	PCR-05-C
	封口膜	UC-500
伯乐(Bio-Rad)	96 孔板	MLL9601
莫纳 (Monad)	15ml 离心管	GC80501
	50ml 离心管	GC80701
默克 (Merck)	0.22um 滤头	SLGPR33RB
-	冰板	N/A

1.4. 注意事项

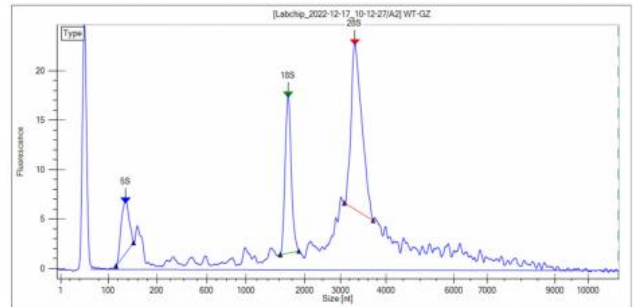
1.4.1. 组织样品准备请参考百创智造空间转录组样品准备指南。

1.4.2. 组织样品 RNA 质检：为保证 RNA 捕获效率及质量，实验前需对组织样本进行 RNA 提取质检，

要求 RIN \geq 7，如下图：



(RIN=9.3)




(RIN=7.7)

1.4.3. 本操作说明提供的 H&E 染色时间仅供参考，为达到较好的染色效果，建议不同组织类型进行预染来确定染色时间。

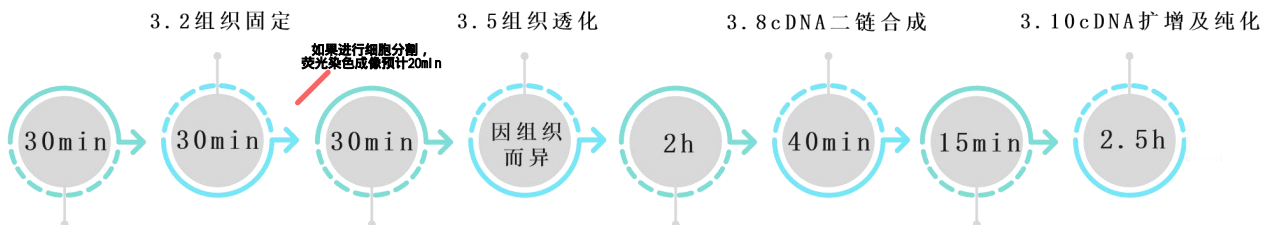
1.4.4. 基因表达实验前需对样品进行组织优化实验，摸索好合适的透化时间。

1.4.5. 操作环境、操作台及实验工具需保持洁净，可用 70%乙醇或核酸酶清除剂喷洒清洁台面。

1.4.6. 操作时注意枪头始终不能触碰组织，可倾斜适配器沿孔四角加入和吸出液体。

1.4.7. 注意操作说明中的细胞分割实验节点 。

二、实验流程概览（共约 8h）



3.1 实验前准备 3.3-3.4 组织H&E染色与成像 3.6-3.7 逆转录及一链变性 3.9 cDNA二链变性及回收

可停止节点： 基因表达贴片之后，可以-80℃保存5天左右



3.10.cDNA 扩增产物可 4℃保存 \leq 72h; -20℃保存 \leq 1W

三、S1000 基因表达操作说明

3.1. 实验前准备

3.1.1. 苏木精染色液需使用 0.22um 滤头过滤。

3.1.2. 伊红稀释液配制：取 11g Tris Base 溶于 100ml Nuclease-free Water 中，醋酸调 PH 至 6.0，定容至 200ml，用 0.22um 滤膜过滤，配置成 Tris-Acetic Acid buffer (0.45M PH6.0)，可用来按照不同比例稀释伊红染色液。

3.1.3. 准备好 H&E 染色所用到的所有试剂，每样本不少于 2ml，包括：异丙醇、苏木精染色液、返蓝染色液、伊红染色液以及用来涮洗的 3 管 40ml Nuclease-free Water（装于 50ml 离心管）。

3.1.4. 透化酶 10×母液及工作液配制：取出 3 号管试剂 Permeabilization Enzyme 干粉离心 15s，向管内加入 1ml 0.1N HCL 溶液 (pH=1-2)，吹吸混匀后配制成 10×透化酶母液，可分装成若干份置于 -20°C 保存；使用时每反应取 10ul 母液加入 90ul 0.1N HCL (pH=1-2) 配制成 100ul 1×透化酶工作液，置于冰上备用。

⚠ 注意：透化酶母液建议分装 ≥100ul/管进行保存，不可反复冻融，1×透化酶工作液需要现配现用。

3.1.5. 植物组织染色推荐 0.05% 甲苯胺蓝染液：取 20mg 甲苯胺蓝粉末稀释至 40ml Nuclease-free Water 中，完全溶解后使用 0.22um 滤头过滤使用。

3.1.6. 0.1×SSC 配制：取 50ul 20×SSC 稀释至 9050ul Nuclease-free Water 中，涡旋混匀后取出 91ul，加入 9ul Protective Agent II 再次涡旋混匀，置于冰上备用。

3.1.7. 0.08M KOH 配制：取 100ul 8M KOH 用 Nuclease-free Water 稀释至 10ml，分装后常温放置备用。

3.1.8. 配制 80% 无水乙醇。

3.1.9. 每芯片应 -20°C 预冷 40ml 甲醇。

3.1.10. 将要使用的试剂取出置于冰上融化备用，若待做组织样本透化时间较短 (<5min)，可在 3.5 组织透化前将 3.6.2 逆转录预混液配制好，置于冰上备用。

3.2. 组织固定

3.2.1. 将贴好组织的芯片干冰运输，放置于 37°C 预热的适配器上孵育 1min。

3.2.2. 将孵育好的芯片放入 -20°C 预冷后的甲醇中，放置到 -20°C 冰箱内孵育 30min。

3.3. 组织 H&E 染色

3.3.1. 取出固定好的组织芯片，使用无尘纸擦拭组织区域外的残留甲醇并挥干组织上多余甲醇。



细胞分割实验节点：组织固定完成后需先进行细胞分割荧光染色及扫片（详见 4.2. 细胞分割荧光染色及

4.3. 细胞分割荧光成像）再继续下文步骤。 **⚠️ 如果不进行细胞分割操作，可以跳过该步骤**

3.3.2. 取 500ul 异丙醇覆盖至全部组织区域，避免气泡，孵育 1min。

3.3.3. 去除异丙醇，挥干组织上的异丙醇，取 500ul 苏木精染色液覆盖至全部组织区域，避免气泡，孵育 3-7min（因组织而异）。

3.3.4. 取 500ul 苏木精染色液覆盖至全部组织区域，避免气泡，孵育 3-7min（因组织而异）。

3.3.5. 去除苏木精，并于 Nuclease-free Water 中轻轻涮洗至无多余染液（约 15 次左右），使用无尘纸擦拭掉多余水分。

3.3.6. 取 500ul 返蓝染色液覆盖至全部组织区域，避免气泡，孵育 2min（因组织而异）。

3.3.7. 去除返蓝染色液，并于 Nuclease-free Water 中轻轻涮洗至无多余染液（约 15 次左右），使用无尘纸擦拭掉多余水分。

3.3.8. 取 500ul 伊红染色液覆盖至全部组织区域，避免气泡，孵育 30s-2min（因组织而异）。

3.3.9. 去除伊红染色液，并于 Nuclease-free Water 中轻轻涮洗至无多余染液（约 30 次左右），使用无尘纸擦拭掉多余水分。

3.3.10. 将染好的组织芯片放置于洁净的 50ml 离心管中，250rpm，离心 30s。

3.4. 组织 H&E 成像（以 3D HISTECH 病理切片数字扫描仪为例）


3.4.1. 将芯片置于载物架上并加载进入仪器中。

3.4.2. 待系统预采集成像后，将光标点置于组织图像上进行自动对焦。

3.4.3. 将对焦好的数值 ± 50 ，选好图像保存的文件夹并命名。

3.4.4. 框出矩阵（需完整），设置无缝合模式，点击扫描即可，扫描图需检查矩阵四角是否完整及 spot 点是否清晰。

3.4.5. 其他仪器扫片结果需无拼接问题，能提供扫描原始文件，以供后期拼接。

 3.4.6. 注意：需仔细记录好样本对应的芯片手柄上的编码，以供后期分析使用，如下图：

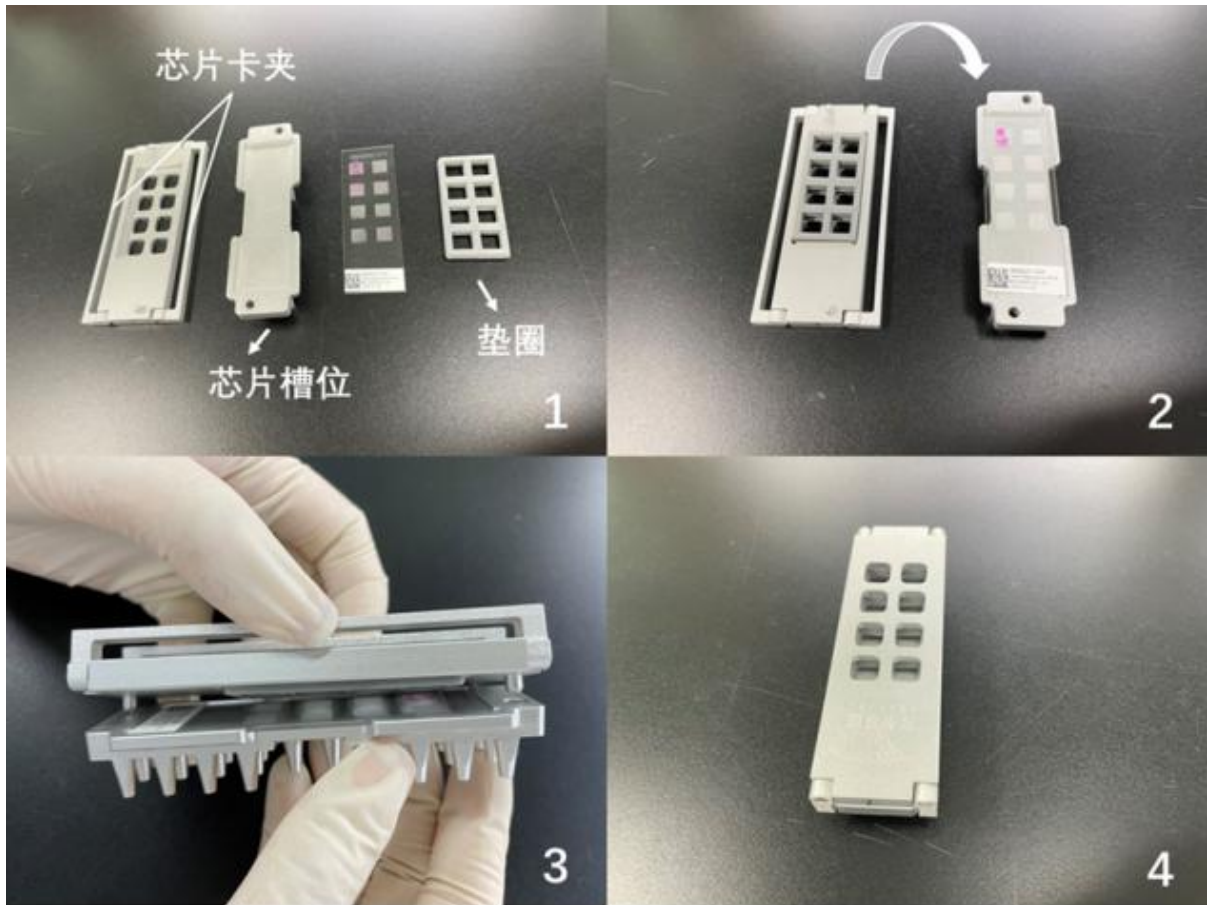


3.5. 组织透化

3.5.1. 将 PCR 仪调至 37°C 恒温。

3.5.2. 取 3.1.4 准备好的 100ul 的 1×透化酶工作液放置于 37°C 预热 10min，加入 20ul Protective Agent I，吹吸混匀后放置于 37°C 适配器上。

3.5.3. 将芯片按下图装入百创适配器 A 或 B 内并贴好封口膜，封口膜需覆盖 8 个孔，可将贴有组织的孔用马克笔做好标记。具体操作如下（以适配器 A 为例）



3.5.4. 撕开封口膜，取 100ul 3.5.2 步骤中预热好的透化酶加至贴有组织的孔内，注意均匀覆盖，避免气泡。

3.5.5. 将适配器放置于 PCR 仪上 37°C 孵育至相应时间（已在组织优化实验中确定好的时间）。

⚠ 等待期间可将下文中 3.6.2 逆转录预混液配好，若透化时间较短可在组织透化前将逆转录预混液配好，置于冰上备用

3.5.6. 完全吸出透化酶，加入 3.1.6 准备好的 0.1×SSC，注意均匀覆盖，避免气泡，封好封口膜，将适配器放置于冰板上。

3.6. 逆转录

3.6.1. PCR 仪调至如下程序：

热盖	反应体积	
50°C	100ul	
步骤	温度	时间
预热	42°C	Hold
逆转录	42°C	90min
/	4°C	Hold

3.6.2. 按下表顺序配制逆转录预混液（注意配制完涡旋混匀，瞬时离心）：

组分	1rxn (ul)	4rxns+10% (ul)
Nuclease-Free Water	19	83.6
RT Reagent（用前涡旋混匀，瞬时离心）	26	114.4
Reducing Reagent（用前涡旋混匀，瞬时离心，若有沉淀需完全溶解再使用）	10	44
In Reagent	20	88
Strand-Switching Primer（用前涡旋混匀，瞬时离心）	10	44
RT Enzyme	15	66
Total	100	440

3.6.3. 撕开封口膜，吸出孔内的 0.1×SSC，注意将残留液体吸干。

3.6.4. 向孔内加入 100ul 逆转录预混液，注意均匀覆盖，避免气泡，再次封好封口膜。

3.6.5. 将适配器水平抬起擦干底部水渍，放置于 PCR 仪内，跳过预热步骤进行 1.5h 逆转录反应。

3.7. cDNA 一链变性

3.7.1. 逆转录反应结束后，等 PCR 仪温度降至 4°C 取出适配器。

3.7.2. 撕开封口膜吸出逆转录预混液，注意将残留液体吸干。

3.7.3. 加入 150ul 0.08M KOH，注意均匀覆盖，避免气泡，封好封口膜，室温孵育 5min。

⚠ 等待期间可将下文中 3.8.2 cDNA 二链合成预混液配好，置于冰上备用。

3.7.4. 撕开封口膜，吸出 0.08M KOH，注意将残留液体吸干。

3.7.5. 加入 200ul EB，注意均匀覆盖，避免气泡，封好封口膜，室温孵育 2min。

3.8. cDNA 二链合成

3.8.1. PCR 仪调至如下程序：

热盖	反应体积	
65°C	100ul	
步骤	温度	时间
预热	65°C	Hold
二链合成	65°C	30min
/	4°C	Hold

3.8.2. 按下表顺序配制二链合成预混液（注意配制完涡旋混匀，瞬时离心）：

组分	1rxn(ul)	4rxns+10% (ul)
Nuclease-Free Water	73	321.2
Second Strand Reagent（用前涡旋混匀，瞬时离心，若有沉淀需完全溶化再使用）	18	79.2
Second Strand Primer（用前涡旋混匀，瞬时离心）	5	22
Second Strand Enzyme	4	17.6
Total	100	440

3.8.3. 撕开封口膜，吸出 EB，注意吸干残留液体。

3.8.4. 加入 100ul 二链合成预混液，均匀覆盖，避免气泡，封好封口膜。

3.8.5. 将适配器放置于 PCR 仪内，跳过预热步骤进行 30min 的二链合成反应。

3.9. cDNA 二链变性及回收

3.9.1. 二链合成反应结束后，等 PCR 仪温度降至 4°C 取出适配器。

3.9.2. 撕开封口膜，吸出二链合成预混液，注意吸干残留液体。

3.9.3. 加入 200ul EB，注意均匀覆盖，避免气泡，封好封口膜，室温孵育 2min。

3.9.4. 撕开封口膜，吸出 EB，注意吸干残留液体。

3.9.5. 加入 46ul 0.08M KOH，注意避免气泡，封好封口膜，室温孵育 10min，每间隔 2min 吹吸两次，

⚠ 注意枪头不要带走液体造成损失。

3.9.6. 准备 0.2ml PCR 管，管内加入 6ul Tris (1M, pH=7)。

3.9.10. 撕开封口膜，吸出 45ul 0.08M KOH 加入到上一步准备的 PCR 管内，吹吸混匀，

⚠ 注意枪头不要带走液体造成损失。

3.9.11. cDNA 回收完成。

3.10. cDNA 扩增与纯化

3.10.1. 通过 qPCR 实验确定扩增循环数

3.10.1.1. 按照下表配制 qPCR 预混液（配制完涡旋混匀，瞬时离心）：

组分	1rxn (ul)	4rxns+10% (ul)
Nuclease-Free Water	25.9	113.96
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	35	154
1×cDNA Primer (使用 12 号试剂 15×cDNA Primer 稀释 15 倍配制)	2.1	9.24
Total	63	277.2

3.10.1.2. 在 qPCR 孔板中，在 6 个孔内，每孔加入 9ul qPCR 预混液。

3.10.1.3. 分别在两个孔内各加入 1ul 3.9.11 步骤中回收的 cDNA 产物，两个孔内各加入 1ul Nuclease-free Water，两个孔内各加入 1ul 已质控过的 S1000 空转产物作为阳性对照（若没有可不做）。

3.10.1.4. 封好封口膜，注意加样孔严格隔离开，在涡旋振荡仪上轻轻混合均匀，瞬时离心。

3.10.1.5. 按照如下程序扩增：

热盖	反应体积
105°C	10ul

步骤	温度	时间
1	98°C	3min
2	98°C	5s
3	63°C	30s
4	2-3 步设置 25 个循环	

3.10.1.6. 记录所得 Cq 值。

3.10.2. cDNA 扩增

3.10.2.1. 按下表配制 cDNA 扩增预混液（配完涡旋混匀，瞬时离心）：

组分	1rxn (ul)	4rxns+10% (ul)
Amp mix	50	220
15×cDNA Primer	1	4.4
Total	51	224.4

3.10.2.2. 向 3.9.11 剩余 49ul 回收产物中加入上步骤配制的 cDNA 扩增预混液，吹吸混匀，瞬时离心，注意避免气泡。

3.10.2.3. 按照下表程序进行扩增：

热盖	反应体积
105°C	100ul

步骤	温度	时间
预变性 (1)	95°C	30s
变性 (2)	95°C	15s
退火 (3)	62°C	15s
延伸 (4)	65°C	4min
5	2-4 步按步骤 3. 10. 6 所得 Cq 值四舍五入进行循环数设置	
彻底延伸 (6)	65°C	6min
	4°C	Hold

⚠ 质控节点：扩增结束后可取 1ul cDNA PCR 扩增原液通过 qubit 测定浓度，若浓度低于 10ng/ul 则可以适当增加 1~2 循环。

3.10.3. cDNA 扩增产物纯化

3.10.3.1. 涡旋 SPRIselect 磁珠使其充分混匀，向 cDNA 扩增产物（共 100ul）中加入 60ul 的 SPRIselect 磁珠（0.6X），吹吸混匀，注意需要完全混匀（移液器混合 20 次），避免气泡。

3.10.3.2. 室温孵育 4min。

3.10.3.3. 瞬时离心，放置于磁力架高位，静置 2min，注意上清需要完全清澈。

3.10.3.4. 吸出上清丢弃，注意不要吸到磁珠，造成损失。

3.10.3.5. 加入 80%乙醇，注意避免直接冲洗到磁珠，室温 30s-1min 后吸出丢弃，注意不要吸到磁珠，造成损失。

3.10.3.6. 重复上一步骤。

3.10.3.7. 从磁力架上取下 PCR 管，瞬时离心后，放置于磁力架低位。

3.10.3.8. 适用 10ul 移液枪小心吸干多余液体。

3.10.3.9. 开管盖静置约 2min，直至多余乙醇挥发，注意避免磁珠过度干燥导致干裂。

3.10.3.10. 从磁力架上取下 PCR 管，向管内加入 40ul EB，吹吸混匀，注意完全混匀，约吹吸 20 次。

3.10.3.11. 室温静置 4min。

3.10.3.12. 瞬时离心，放置于磁力架低位，静置 2min，注意上清需要完全清澈。

3.10.3.13. 小心吸取 40ul 上清至洁净 1.5ml 离心管内，避免吸到磁珠。

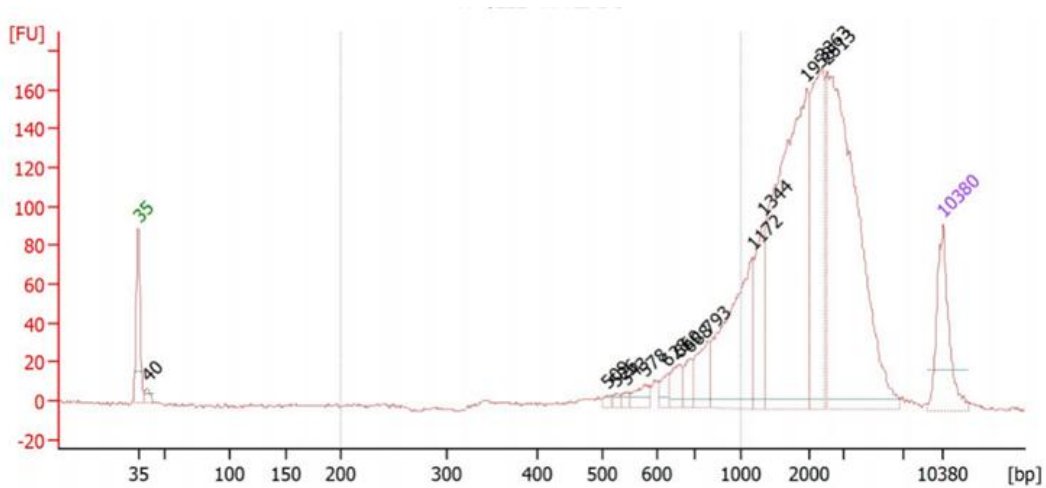
3.10.3.14. cDNA 扩增产物纯化完成，得到该组织样本 S1000 空间转录组最终 cDNA 文库。

3.10.4. cDNA 质检

3.10.4.1. 取 1ul cDNA 产物进行 qubit 浓度测定。

3.10.4.2. 根据浓度再取 1ul 进行稀释至 2ng/ul，稀释产物可用于 2100 质检。

3.10.4.3. 2100 质检示意图：



四、附录 I：细胞分割

4.1. 细胞分割试剂盒产品组分

S1000 空间转录组细胞分割试剂盒 V1 版			
管盖编号	试剂名称	80rxns	储存条件
1	Cell Segmentation Fluorescent Reagent	50ul	避光, 4°C
2	Cell Segmentation Fluorescent Buffer	1.5ml × 2	避光, 4°C

4.2. 细胞分割荧光染色

4.2.1. 按照下表配制细胞分割荧光试剂（配制完涡旋混匀，瞬时离心，避光放置）：

组分	1rxn (ul)	4rxns+10% (ul)
Nuclease-Free Water	82.5	363
Cell Segmentation Fluorescent Buffer(用前恢复室温，涡旋混匀，瞬时离心)	27.5	121
Cell Segmentation Fluorescent Reagent(用前恢复室温，涡旋混匀，瞬时离心)	0.55	2.42
Recombinant RNase Inhibitor	5.5	24.2
Total	116.05	510.62

4.2.2. 将芯片放置于水平台面，将细胞分割荧光试剂均匀覆盖组织避免气泡，室温避光孵育 5min。

4.2.3. 使用 50ml 离心管按照下表配制 0.1×SSC（配制完涡旋混匀，瞬时离心，冰上放置备用）：

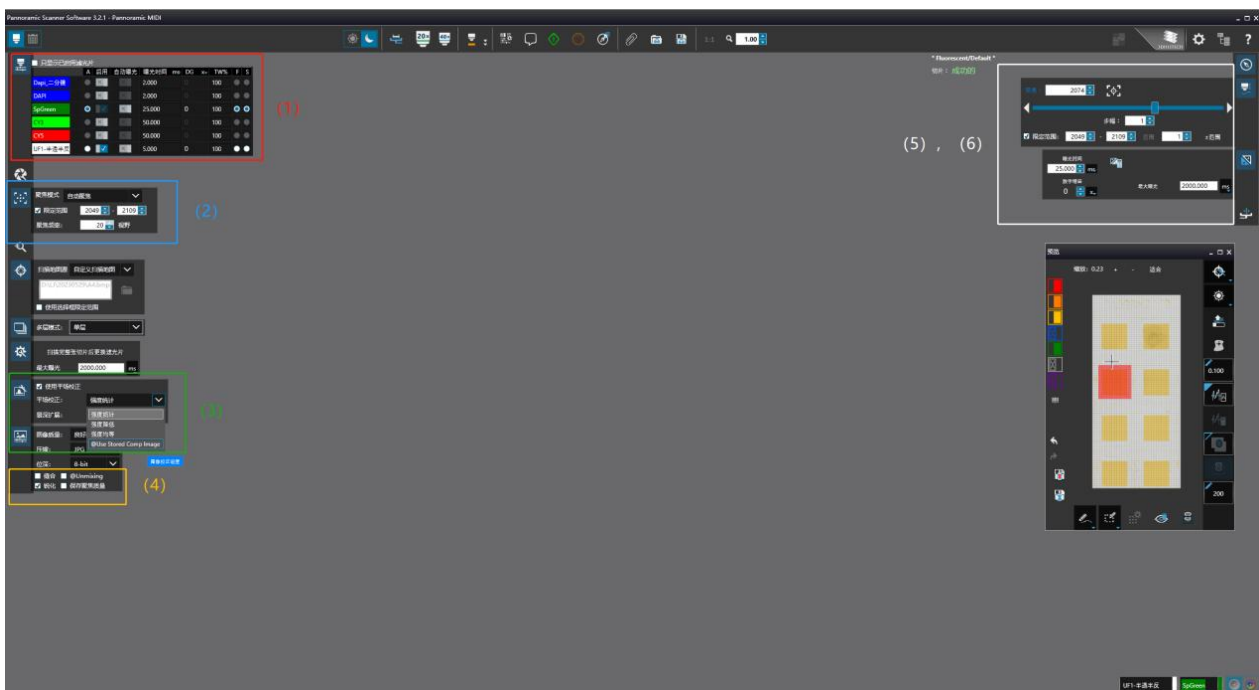
组分	1rxn (ml)
Nuclease-Free Water	39.8
20×SSC	0.2
Total	40

4.2.4. 荧光试剂孵育完成后，倒掉多余试剂，在上步骤配制好的 0.1×SSC 中轻轻涮洗约 5 次左右。注意此时组织周边 OCT 应已涮洗干净，若还有残留可适当增加涮洗次数。

4.2.5. 使用无尘纸擦拭干除组织区域外的多余液体，水平放置于 37°C 金属浴上，避光烤干组织上多余液体，用时约 2min。

4.3. 细胞分割荧光成像（以 3D HISTECH 病理切片数字扫描仪为例）

4.3.1. 切换到暗场模式，载入芯片，呈现以下界面：



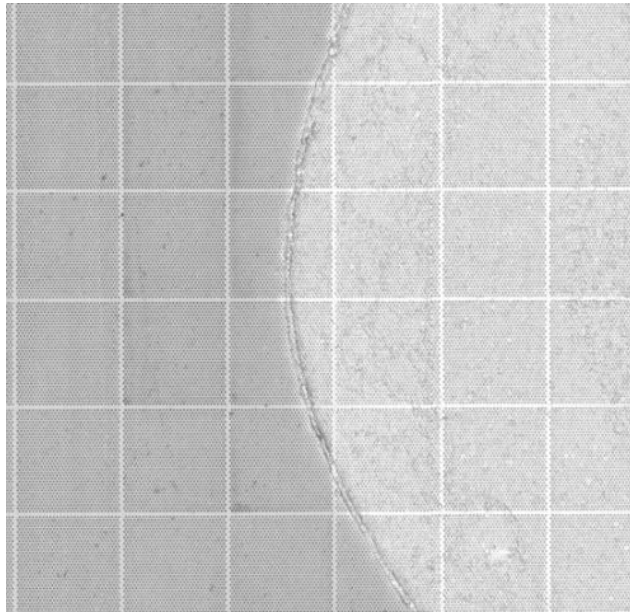
4.3.2. 选择 SpGreen、半透半反通道，关闭自动曝光，F/S 均点选 SpGreen 通道。

4.3.3. 选择 20×物镜，使用自动聚焦，聚焦频率设为 20。

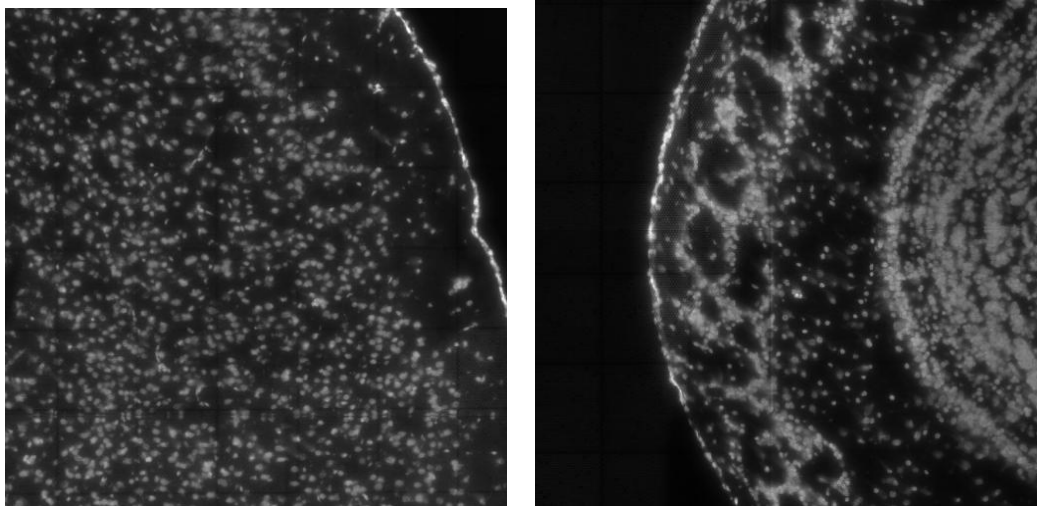
4.3.4. 平场校正选择：最强统计。注意：若扫描结果呈现不均匀曝光，则可尝试 Use Stored Comp Image。

4.3.5. 选择无缝合模式。

4.3.6. 先使用半透半反通道聚焦芯片底板，手动调节聚焦值和曝光时间（起始可设置 5ms 尝试），选择最清晰的值，范围 ± 1 ，要求：图像在有组织和无组织处都能看清楚芯片底板的分割线，如下所示：



4.3.7. 再切换到 SpGreen 通道，手动调节聚焦值和曝光时间（起始可设置 25ms 尝试），左右调整过程中可以看到图像呈现“模糊-->清晰-->模糊”的过程，选择最清晰的值，范围 ± 1 ，要求：组织最亮的部分不应过曝（不应呈现亮白色），暗的部分不宜太暗（无法看清细胞核），需要肉眼清晰分辨，如下所示。注意：对焦过程中，时刻注意不要在同一个地方反复调整，避免淬灭。



4.3.8. 注意记录好每个样品对应的芯片手柄处编号，如下示图，可记录为：**20230114-CA03BN11F2-A3**。

框选组织所在矩阵，框选完整的矩阵区域，开始扫描即可。



五、附录 II：植物组织及植物组织细胞分割操作说明

5.1. 植物组织固定

5.1.1. 将贴好组织的芯片干冰运输，放置于 37°C 预热的适配器上孵育 1min。

5.2.2. 将孵育好的芯片放入 -20°C 预冷后的甲醇中，放置到 -20°C 冰箱内孵育 1h。

5.2. 植物组织染色（细胞分割）

⚠ 说明：植物组织染色及细胞分割染色为同一流程。

5.2.1. 取出固定好的组织芯片，使用无尘纸擦拭组织区域外的残留甲醇并挥干组织上多余甲醇。

5.2.2. 取 500ul 0.05% 甲苯胺蓝染色液覆盖至全部组织区域，避免气泡，孵育 30s-1min（因组织而异，可调整甲苯胺蓝染液浓度）。

5.2.3. 去除甲苯胺蓝，并于 Nuclease-free Water 中轻轻涮洗至无多余染液（约 15 次左右），使用无尘纸擦拭掉多余水分。

5.2.4. 将染好的组织芯片放置于洁净的 50ml 离心管中，250rpm，离心 30s。

5.3. 植物组织染色（细胞分割）成像（以 3D HISTECH 病理切片数字扫描仪为例）

- 5.3.1. 将芯片置于载物架上并加载进入仪器中。
- 5.3.2. 待系统预采集成像后，将光标点置于组织图像上进行自动对焦。
- 5.3.3. 将对焦好的数值±50，选好图像保存的文件夹并命名。
- 5.3.4. 框出矩阵（需完整），设置无缝合模式，点击扫描即可，扫描图需检查矩阵四角是否完整及 spot 点是否清晰。
- 5.3.5. 其他仪器扫片结果需无拼接问题，能提供扫描原始文件，以供后期拼接。
- 5.3.6. 注意：需仔细记录好样本对应的芯片手柄上的编码，以供后期分析使用，如下图：



 植物组织后续操作从 3.5 组织透化开始执行。

六、附录 III：百创 S1000 成像要求

6.1 明场成像系统配置需求（任何等效的成像装置都可以作为替代）

- 彩色相机(色彩 3 × 8bit, 2424 × 2424 像素分辨率)具有白平衡功能
- 最小捕获分辨率 2.18μm/像素
- 曝光时间 2-10ms
- 扫描时间要求：40X 下 10min 内完成 6.8mm*6.8mm 面积成像扫描

6.2 暗场成像系统配置需求（任何等效的成像装置都可以作为替代）

- 波长范围为 380-680 nm 的光源(或等效光源)
- 黑白相机(色彩 14bit, 2424 x 2424 像素分辨率)
- DAPI 滤波器 (激发 392/23, 发射 447/60)
- FITC 滤波器 (激发 480/40, 发射 535/50)
- TRITC 滤波器 (激发 542/20, 发射 620/52)
- Cy5 滤波器 (激发 618/50, 发射 698/70)
- 最小捕获分辨率 2.18 μ m/像素曝光时间 100 ms-2 s
- 扫描时间要求: 20X 下 20min 内完成 6.8mm*6.8mm 面积成像扫描

6.3 成像系统推荐（扫描不改盖玻片，不存在拼接错误）

品牌	型号
3D HISTECH	Pannoramic ScanII
Hamamatsu	NanoZoomer S60
Nikon	Nikon Eclipse Ti2
Molecular Devices	ImageXpress Nano Automated Cell Imaging System
Keyence	Keyence BZX800
BioTek	Cytation 7
Leica	Leica DMI8 Versa 8

6.4 细胞分割-成像特殊模块建议

需要定制百创细胞分割滤光模块，货号：ST03006

百创细胞分割滤光模块完全兼容标准滤光块盒尺寸（例如：chroma）

百创细胞分割滤光模块功能：在扫描荧光图像的同时，有另一个通道做类似于明场的扫描且两通道无错位。在这个特殊通道扫描出的图像，能够清晰可见 S1000 芯片中的微球阵列，即底板图案

扫描仪推荐：3D HISTECH（品牌） Pannoramic ScanII（型号）