青岛百创智能制造技术有限公司

BMKMANU Tissue Optimization Reagent kits User Guide V2.1

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. 变更逆转录反应体系

说明书版本：V2.1
试剂盒版本：V2.1
修订日期：2023 年 10 月
修订内容：
1. 更新试剂盒组分
2. 变更逆转录反应体系

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 7
二、 实验流程概览(共约 6h) 8
三、 S1000 组织优化操作说明 8
3.1. 实验前准备 8
3.2. 组织固定 9
3.3. 组织 H&E 染色 9
3.4. 组织 H&E 成像（以 3D HISTECH 病理切片数字扫描仪为例） . . . 10
3.5. 组织透化 10
3.6. 逆转录 11
3.7. 组织移除 12
3.8. 芯片清洗 13
3.9. 荧光成像（以 3D HISTECH 病理切片数字扫描仪为例） 14

一、产品信息

1.1. 产品描述

BMKMANU Tissue Optimization Slides & Reagent kits 是针对百迈客空间转录组基因表达而定向开发的组织优化专用试剂盒。试剂盒包含 BMKMANU Tissue Optimization slides 及配套试剂。本试剂盒所使用的芯片，酶和缓冲液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 空间转录组组织优化试剂盒 V2.1 版					
管盖编号	试剂名称	1rxn	4rxns	储存条件	使用节点
1	Permeabilization Enzyme	10mg	10mg	-20°C	3.5 组织透化
2	RT Reagent I	51ul	204ul	-20°C，避光	3.6 逆转录
3	RT Reagent II	85ul	340ul	-20°C	
4	RT Reagent III	42.5ul	170ul	-20°C	
5	RT Enzyme I	42.5ul	170ul	-20°C	
6	RT Enzyme II	17ul	68ul	-20°C	
7	Strand-Switching Primer	25.5ul	102ul	-80°C	
8	Reducing Reagent	17	68ul	-20°C	
9	Tissue Removal Buffer	875ul	3500ul	常温	3.7. 组织移除
10	Tissue Removal Enzyme	125ul	500ul	常温	

S1000 空间转录组组织优化芯片盒 V2 版			
	1rxn	4rxns	储存条件
BMKMANU Tissue Optimization slides	1	4	常温，干燥
BMKMANU Slide Gasket	1	4	常温，干燥
BMKMANU Slide Seals	2	8	常温，干燥

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
西格玛（Millipore Sigma）	甲醇， ≥ 99.9%	34860
	异丙醇，≥99.5%	I9516-25ml
	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
	Nuclease-free Water	AM9932
	RNaseZap™	AM9780/AM9782
	20% SDS	AM9820
宝日医（Takara）	Recombinant RNase Inhibitor	2313A
-	0.1N HCL （pH1-2）	N/A
	醋酸 Acetic acid, ≥99.9%	N/A

自备仪器	
供应商	名称
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
	-80C 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
	适用于 50ml 试管水浴锅
百创智造（BMKMANU）	适配器 A（ST03004）

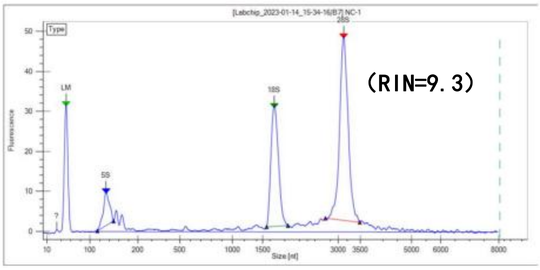
自备耗材		
供应商	名称	货号
金佰利（Kimtech）	无尘纸	34155
爱思进（Axygen）	1000ul 灭菌枪头	T-1000-B-R-S
	100ul/200ul 低吸附枪头	T-200-C-L-R-S
	10ul 低吸附枪头	T-300-L-R
	1.5ml 离心管	MCT-150-C
	0.2ml PCR 管	PCR-02-L-C
	0.5ml 薄壁管	PCR-05-C
	封口膜	UC-500
伯乐(Bio-Rad)	96 孔板	MLL9601
莫纳（Monad）	15ml 离心管	GC80501
	50ml 离心管	GC80701

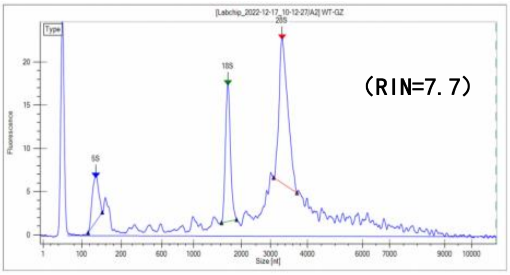
默克（Merck）	0.22um 滤头	SLGPR33RB
-	冰板	N/A

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 质控：为保证 RNA 捕获效率及质量，实验前需对组织样本进行 RNA 提取质控，要求 RIN≥7，如下图：





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。

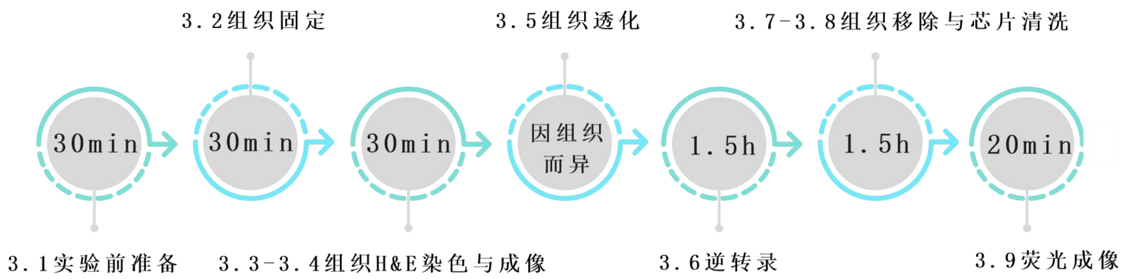
1.4.4 操作环境、操作台及实验工具需保持洁净，可用 70%乙醇或核酸酶清除剂喷洒清洁台面。

1.4.5 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。

1.4.6 阳性对照孔使用的 RNA 完整度需 RIN≥9，浓度 1ug/ul 左右。

1.4.7 组织优化 8 个孔实验设置应为 6 个实验梯度孔，1 个阴性对照孔，1 个阳性对照孔。注意贴片时阳性对照孔勿贴组织。

二、实验流程概览(共约 6h)



三、S1000 组织优化操作说明

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，使用 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，每芯片不少于 5ml，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；使用时每芯片取 100ul 母液加入 900ul 0.1N HCL（pH=1-2）配制成 1ml 1×透化酶工作液，置于冰上备用。使用前需预热 15min。

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 1：取 50ul 20×SSC 稀释至 9900ul Nuclease-free Water 中，涡旋混匀后取出 995ul，加入 5ul Recombinant RNase Inhibitor 再次涡旋混匀，置于冰上备用。

3.1.7 0.1×SSC 配制 2：取 50ul 20×SSC 稀释至 9950ul Nuclease-free Water 中，涡旋混匀，取 1ml 于管内备用。

3.1.8 每芯片应-20℃预冷 40ml 甲醇。

3.1.9 将要使用的试剂及阳性对照样品取出置于冰上融化备用，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℃预热的适配器上孵育 1min。

3.2.2 将孵育好的芯片放入-20℃预冷后的甲醇中，放置到-20℃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。

3.3.2 取 2ml 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 2ml 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 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。

3.3.5 取 2ml 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）。

3.3.6 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。

3.3.7 取 2ml 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）。

3.3.8 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。

3.3.9 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）

⚠ **在此可先将准备好的 1×透化酶工作液放置于 37℃金属浴适配器上进行预热。**

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 8 个矩阵（可保存扫描地图），点击扫描即可。

3.4.5 扫描图像需清晰。

3.5. 组织透化

⚠ **可先将下文 3.6.2 的逆转录预混液配制好，放于冰上避光备用。**

3.5.1 将 PCR 仪调至 37℃恒温。

3.5.2 1×透化酶工作液需预热 15min。

3.5.3 将芯片水平置于 37℃金属浴上，将阳性对照样品取 2ul 滴至预留的阳性孔内，注

意在孔内需成圆形液滴状，烤片约 5min 左右直至阳性对照样品烤干。

3.5.4 将芯片装入适配器内并贴好封口膜，封口膜需覆盖 8 个孔，可用马克笔将预先设置好的时间梯度标记至孔侧。

3.5.5 按照设置好的时间梯度依次向孔内加入预热好的透化酶，每孔 80ul，注意均匀覆盖组织，避免气泡，阴、阳性对照不加透化酶，剩余透化酶放回 37℃金属浴上恒温。

举例：如时间梯度设置为 50min-40min-30min-20min-15min-10min，则将计时器设置为 50min，将透化酶加置 50min 孔内，封好封口膜放置于 37℃ PCR 仪内开始计时，计时器倒计时到 40min15s 时拿出卡夹，撕开封口膜将预热的透化酶加置 40min 孔内，封好封口膜放回 37℃ PCR 仪内。按此方法将剩余的孔依次加入透化酶。

3.5.6 透化完成后，按时间梯度从长到短的顺序依次吸出透化酶，每孔按顺序加入 3.1.6 准备好的 0.1×SSC，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℃	100ul	
步骤	温度	时间
预热	42℃	Hold
逆转录	42℃	90min
/	4℃	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，冰上避光放置）：

组分	体积/芯片 （ul）
Nuclease-Free Water	144.5
RT Reagent I（用前涡旋混匀，瞬时离心）	51
RT Reagent II（用前涡旋混匀，瞬时离心）	85
RT Reagent III（用前涡旋混匀，瞬时离心）	42.5
RT EnzymeI	42.5
RT EnzymeII	17
Strand-Switching Primer（用前涡旋混匀，瞬时离心）	25.5
Reducing Reagent（用前涡旋混匀，瞬时离心，若有沉淀需完全溶解再使用）	17
Total	425

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 8 个孔内加入逆转录预混液，每孔 50ul，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. 组织移除

3.7.1 逆转录反应结束后，等 PCR 仪温度降至 4℃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 向每孔内加入 3.1.7 配制好的 0.1×SSC，静置 2min。

3.7.4 PCR 仪调至如下程序：

热盖	反应体积	
56℃	100ul	
步骤	温度	时间
预热	56℃	Hold

组织移除	56℃	60min
/	22℃	Hold

3.7.5. 按照下表配制组织移除预混液（注意配制完涡旋混匀，瞬时离心，避免气泡）：

组分	体积/芯片 （ul）
Tissue Removal Buffer	875
Tissue Removal Enzyme	125
Total	1000

3.7.6. 撕开封口膜，完全吸出 0.1×SSC。

3.7.7. 除阳性对照孔，其他孔加入组织移除预混液，每孔 80ul，注意均匀覆盖，避免气泡。

3.7.8. 将适配器放置于 PCR 仪内，跳过预热步骤，开始组织移除反应。

等待期间需要配制芯片清洗缓冲液及进行清洗缓冲液 I 的预热，见下文 3.8.1–3.8.2

3.8. 芯片清洗

3.8.1 按照下面三个表配制芯片清洗缓冲液（配制完涡旋混匀）：

清洗缓冲液I（2×SDS/0.1%SDS）	
试剂	体积
20×SSC	4ml
20%SDS	0.2ml
Water	35.8ml
Total	40ml

清洗缓冲液II（0.2×SSC）	
试剂	体积
20×SSC	0.4ml

Water	39.6ml
Total	40ml

清洗缓冲液III（0.1×SSC）	
试剂	体积
20×SSC	0.2ml
Water	39.8ml
Total	40ml

3.8.2 将清洗缓冲液I放置于 50°C水浴锅中预热 30min。

3.8.3 组织移除反应结束后，等 PCR 仪降至 22°C后取出适配器。

3.8.4 完全吸出所有孔内组织移除预混液。

3.8.5 打开适配器，取出芯片，注意不要触碰到芯片孔。

3.8.6 将芯片放入预热好的清洗缓冲液I中，涮洗 20 次，注意应涮洗到所有孔。

3.8.7 擦拭掉多余液体，将芯片放入清洗缓冲液II中，涮洗 20 次，注意应涮洗到所有孔。

3.8.8 擦拭掉多余液体，将芯片放入清洗缓冲液III中，涮洗 20 次，注意应涮洗到所有孔。

3.8.9 将清洗好的芯片放置于洁净的 50ml 离心管中，250rpm，离心 30s。

3.9. 荧光成像（以 3D HISTECH 病理切片数字扫描仪为例）

3.9.1 将仪器切换至暗场模式。

3.9.2 将芯片置于载物架上并加载进入仪器中。

3.9.3 待系统预采集成像后，只开启 cy3 通道，曝光时间设置为 80ms。将光标点置于组织图像上进行自动对焦。

3.9.4 将对焦好的数值±50，选好图像保存的文件夹并命名。

3.9.5 框出 8 个矩阵（也可直接导入 3.4.4 保存好的扫描地图），点击扫描即可。

3.9.6 荧光扫描完成得到该样本组织优化结果，若有荧光亮度一致的情况，原则上选择时间长的作为该组织最优透化时间。