

Go Spatial 时空转录组 FFPE V1.1 转录组实验操作说明书



货号：401SN11114

试剂盒版本号：V1.1

适配硬件型号：Go Spatial-V2-24

文档编号：STOG02013

说明书版本号：A

版本历史

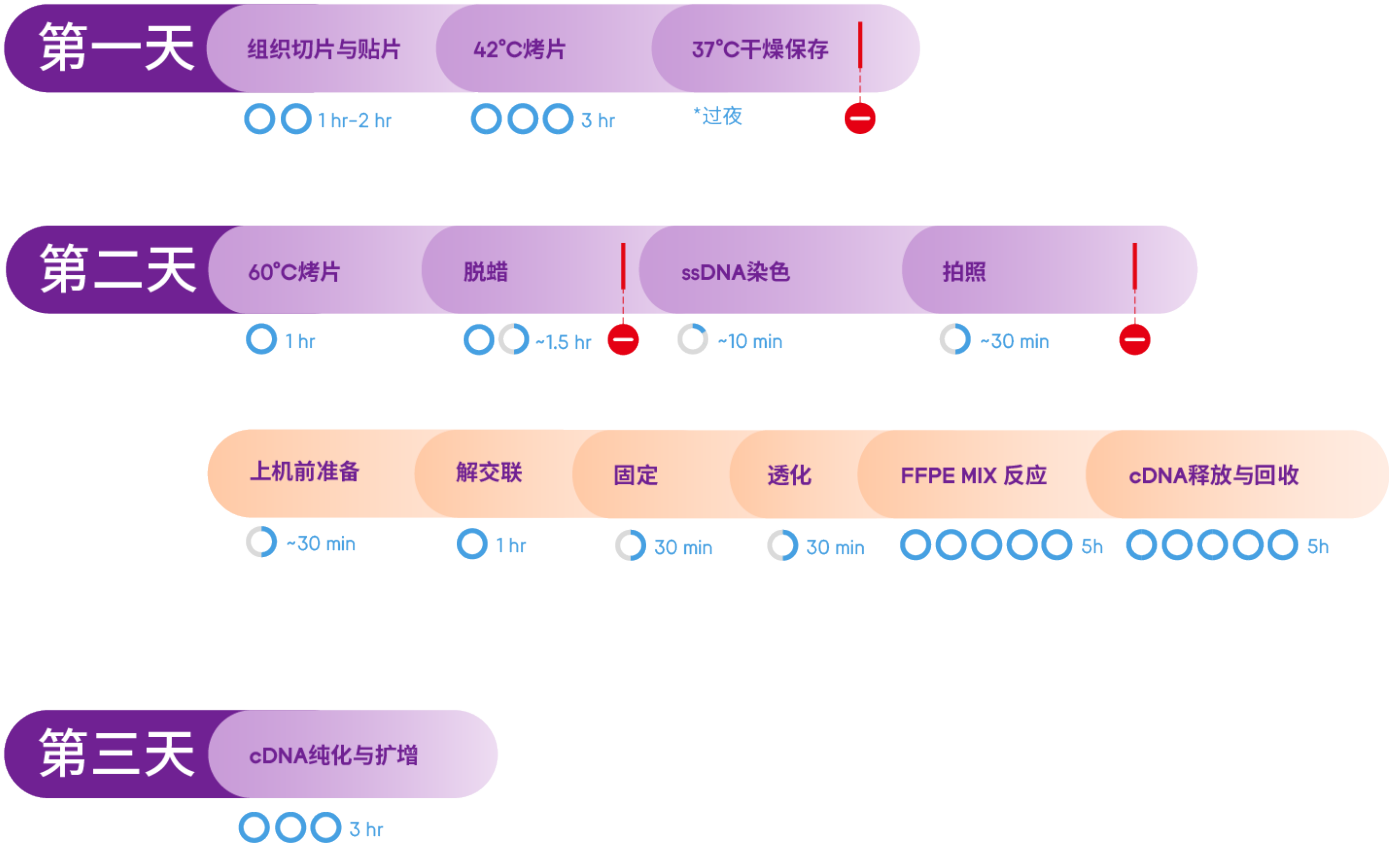
说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.1
修订日期：2026 年 8 月
描述：首次发布

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。
2026 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

- 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。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司和 /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. 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司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。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不做任何保证，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。

工作流程





目录

第一章 产品介绍	
1.1. 产品描述	1
1.2. 测序指南	1
1.3. 试剂套装组成	1
1.4. 适配的硬件	3
1.5. 需搭配的试剂耗材	3
1.6. 需自备物料清单	4
1.7. Stereo-seq 芯片 N 载体介绍	5
1.8. 注意事项	6
第二章 样本准备	9
第三章 Go Spatial 时空转录组 FFPE 标准操作流程	
3.1. 实验前准备	10
3.2. 切片准备与组织切片、捞片	12
3.2.1. 芯片预处理	12
3.2.2. 组织切片、捞片	14
3.3. 脱蜡	18
3.4. 荧光染色	20
3.5. 荧光拍照	22
3.6. Go Spatial 流程运行	25
3.6.1. Go Spatial 功能区介绍	25
3.6.2. Go Spatial 仪器准备	26
3.6.3. 上机试剂准备	28
3.6.4. 上机耗材准备	32
3.6.5. 载具安装	34
3.6.6. 程序信息录入	35
3.6.7. 流程开始	38
3.6.8. 多模块上样	40
3.6.9. 流程结束和 cDNA 回收	44
3.6.10. 设备机舱清洁	46

3.7. cDNA 纯化与扩增	48
3.7.1. cDNA 纯化	51
3.7.2. cDNA 扩增	52

附录

附录 A 同一试剂盒“2+2”模式上机实验操作指引	54
附录 B Stereo-seq FFPE 转录组 V1.1 for Go Spatial 吸头使用数量参考	57

- 

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。
- 

QC 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。

第一章

产品介绍



1.1. 产品描述

本操作说明书适配于 **Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 V1.1 for Go Spatial**。

华大智造（MGI）自研的时空自动化样本处理系统 Go Spatial-V2-24 可自动化批量化完成对福尔马林固定石蜡包埋（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded，FFPE）样本的时空转录组实验。目前该系统已适配 Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 V1.1 for Go Spatial，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。利用带有空间坐标信息的探针对 FFPE 样本中组织细胞内的 Total RNA 分子进行原位捕获并进行 cDNA 合成与连接，通过空间条形码（Coordinate ID）还原回空间位置，实现单细胞分辨率全转录组空间表达图谱的构建。

本试剂套装 401SN11114 中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了产品的稳定性和可重复性。

1.2. 测序指南



使用本产品构建的文库可使用 DNBSEQ 测序平台进行测序。文库构建详情请参考[《时空转录组 FFPE V1.1 建库实验操作说明书》](#)。

- ⋯ 时空转录组 FFPE 适配的 SAW 分析流程的入参为：
- `kit-version='Stereo-seq N FFPE V1.1'`
 - `sequencing-type='PE75_50+100'`

1.3. 试剂套装产品组成

试剂套装的具体组分信息如下：

表格 1-1 Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 V1.1 for Go Spatial 产品信息

Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 V1.1 for Go Spatial 货号：401SN11114（4 RXN）		
组分货号	组分名称	规格和数量
401KN11114	Stereo-seq 转录组试剂盒 N	4 RXN*1
400CN11114	Stereo-seq 芯片 N 载体（1 cm*1 cm）-Dual	4 EA*1
310AK007	时空组学配件套装 -FFPE V1.1 Go Spatial	8 PCS*1



- ⚠ 收到 Stereo-seq 芯片载体后，请参照[《Stereo-seq 芯片载体保存操作指南》](#)对产品进行正确地保存。
- <https://www.stomics.tech/resources/sop/>

收到产品后

- 请尽快将产品按照指定条件保存。若转移时间较长，建议使用控温容器运输。
- 若发现冷链箱温度异常，可要求物流方现场打印温度实时监控记录表；签收后也可联系当地科研合作代表，以查询相关记录。
- 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 1-2 Stereo-seq 转录组试剂盒 N 试剂组分信息

Stereo-seq 转录组试剂盒 N 货号：401KN11114				
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量	
Coating Buffer I	1000064221	● 绿色	220 μL	× 1
Coating Buffer II	1000064222	● 绿色	10 μL	× 1
Mounting Medium	1000064223	● 紫色	50 μL	× 1
Decrosslinking Reagent	1000064224	● 绿色	1700 μL	× 1
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg	× 1
RI	1000069883	● 橙色	70 μL	× 1
RT Buffer Mix	1000047911	○ 透明	731 μL	× 1
RT Oligo	1000047913	○ 透明	44 μL	× 1
RT Enzyme Mix	1000047914	○ 透明	88 μL	× 1
RT Plus	1000047912	● 黄色	18 μL	× 1
Elute Buffer	1000064226	● 黑色	1725 μL	× 2
Elute Additive	1000064227	● 黑色	88 μL	× 1
4X cDNA PCR Mix	1000069884	● 蓝色	110 μL	× 1
cDNA Primer	1000047917	● 蓝色	53 μL	× 1
🌡 储存温度：－ 25℃ ~ － 15℃ 🚚 运输温度：－ 25℃ ~ － 15℃ ⌚ 有效期：见标签				

表格 1-3 Stereo-seq 芯片 N 载体信息

Stereo-seq 芯片 N 载体 (1 cm * 1 cm) -Dual 货号: 400CN11114		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 N 载体 (1 cm * 1 cm) -Dual	-	4 EA
 储存温度: -25°C ~ -15°C  运输温度: -25°C ~ -15°C  有效期: 见标签		

表格 1-4 时空组学配件套装 -FFPE V1.1 for Go Spatial 产品信息

时空组学配件套装 -FFPE V 1.1 for Go Spatial 货号: 310AK007		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq V3 载具上盖	1000066738	2 PCS
Stereo-seq V3 载具底座	1000066739	2 PCS
Stereo-seq V3 载具垫圈	1000066760	4 PCS
 储存温度: 18°C ~25°C  运输温度: 0°C ~30°C  有效期: 见标签		

1.4. 适配的硬件

适用的硬件: **时空自动化样本处理系统 Go Spatial-V2-24**

适用的控制软件的版本号: STOmics 软件 V2.5.0 版本及以上

适用的应用流程: Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (ssDNA 染色) (1cmx1cm)。

1.5. 需搭配的试剂耗材

表格 1-5 需要额外搭配的核心试剂盒信息

应用阶段	试剂	品牌	货号
文库构建	Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 V1.1	STOmics	101KL11160
测序	DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装 *	MGI	940-001895-00

* 仅以 DNBSEQ-T7RS 测序仪配套测序试剂为例, DNBSEQ-T7+RS、DNBSEQ-T1+RS、MGISEQ-2000RS 等测序仪均具备配套时空可视化试剂套装, 如需采购, 请咨询当地销售代表。



表格 1-6 Go Spatial 适配耗材信息

应用阶段	品牌	描述	货号	
Go Spatial 耗材上机	MGI	1.3 mL 深孔板	1000004644	
		50 mL 试剂槽	012-000780-00	
		100 mL 试剂槽（可选）	012-000779-00	
		1000 μL 透明吸头	1000023970	
		1000 μL 黑色斜口吸头	091-000376-00	
		200 μL 透明吸头	091-000158-00	
		50 μL 透明吸头	091-000157-00	
		5 mL 试剂管	1000002452	
		0.5 mL 管盖	1000000981	
时空组学配件套装拆卸		STOmics	Stereo-seq V3 载具拆卸工具	303TA30011

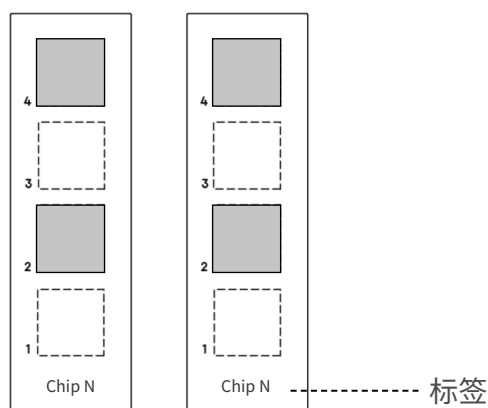
1.6. 客户自备物料清单

本实验所需的第三方设备和物料参考 [《Go Spatial 时空转录组 FFPE V1.1 生化流程第三方物料需求表》](#)。该表格中不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱、天平等。关于显微镜的要求，请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)，<https://www.stomics.tech/resources/sop>。

1.7. Stereo-seq 芯片 N 载体介绍

Stereo-seq 芯片 N 载体 (1 cm*1 cm) -Dual 包含 2 个载体, 每个载体上均贴有 2 张 Stereo-seq 芯片 N (1 cm*1 cm)。

Stereo-seq 芯片 N 载体 (1 cm*1 cm) -Dual 示意图:



Stereo-seq 芯片 (N) 载体保存方法

Stereo-seq 芯片 N 载体装于真空密封的铝袋中, 冷链运输。收到产品后须立即将未开封的 Stereo-seq 芯片 N 载体储存在 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 。若拆袋后未使用, 需重新干燥密封并储存在 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 。



需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。



时空组学配件套装 - FFPE V1.1 for Go Spatial 介绍

时空组学配件套装 - FFPE V1.1 for Go Spatial 中包含 Stereo-seq V3 载具上盖、Stereo-seq V3 载具底座及可装卸的 Stereo-seq V3 载具垫圈。使用前需要进行组装。

有关时空组学配件套装的组装和拆卸演示视频, 请参阅以下链接或扫描二维码:

<https://www.stomics.tech/resources/Videos/3671.html>

可参考《[Stereo-seq V3 载具使用说明书](#)》:

<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

1.8. 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。
- 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。
- 首次运行该应用前，请确认 Go Spatial-V2-24 已经导入正确的控制软件版本号和应用流程。
- 在每次实验前后，请参照本使用说明书的 3.6.10 章节进行清洁。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

第二章 样本准备





请参照《[时空实验 FFPE 样本准备操作指南](#)》的 2.2 章节进行样本准备。

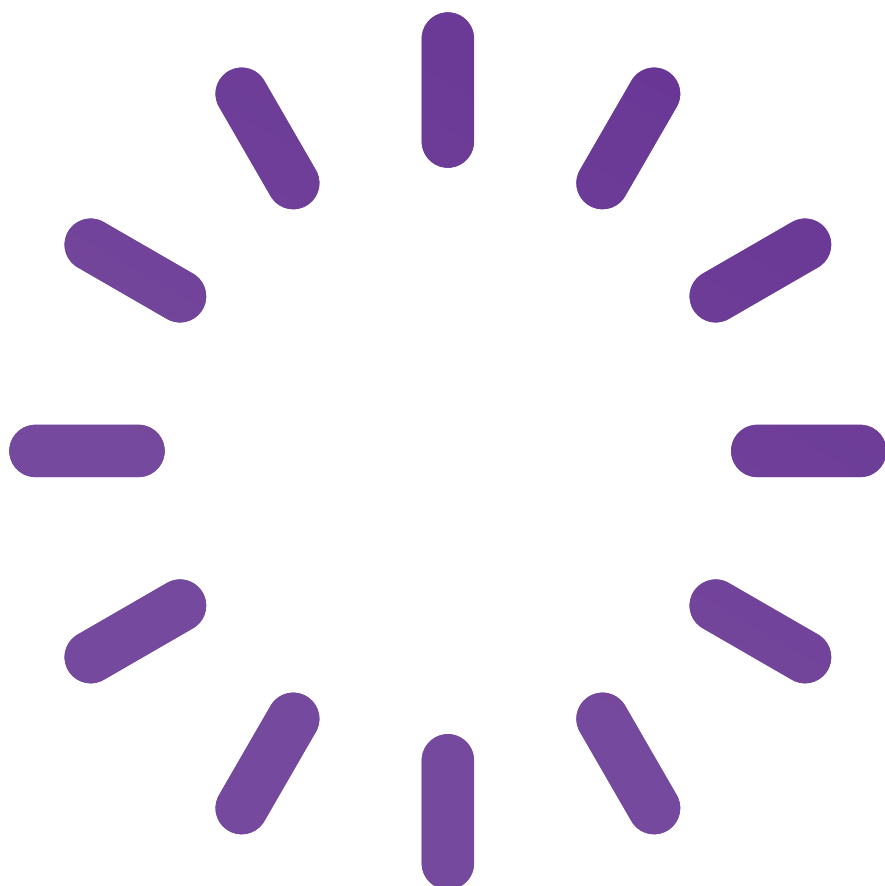


建议针对 $DV200 \geq 30\%$ 的组织进行后续实验流程。

第三章

Go Spatial

时空转录组 FFPE V1.1 转录组 标准操作流程



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。

第一天

准备试剂	用途	准备流程	暂存条件
400 mL 30% 乙醇	组织切片与贴片	使用 ddH ₂ O 将无水乙醇稀释到 30%	室温 1 天
Coating Buffer I	芯片预处理	提前从 -20℃取出置于冰上融化，若有结晶，涡旋振荡至结晶消失，后建议长期保存于 -20℃	4℃ 1 天
Coating Buffer II	芯片预处理	提前从 -20℃取出，放于冰上	冰上 2 hr

第二天

准备试剂	用途	准备流程	暂存条件
100 mL 96% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 96%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
50 mL 90% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 90%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
50 mL 80% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 80%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
50 mL 70% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 70%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
50 mL 50% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 50%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
50 mL 30% 乙醇	脱蜡	无水乙醇稀释到 30%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
Mounting Medium	ssDNA 染色	提前从 -20℃取出待其融化后建议保存于室温	室温
5X SSC	ssDNA 染色、Go Spatial 执行透化后清洗	一张芯片载体 N（1 cm * 1 cm） – Dual：取 350 μL 20X SSC 加入 1050 μL Nuclease-free 水中，混匀后取 398 μL 用于制备 ssDNA 染液，剩余的用于 Go Spatial 流程运行。根据上机芯片数量，参考 3.4 和 3.6.3 章节，准备足量试剂	室温一周
ssDNA 染色液	ssDNA 染色	一张芯片载体 N（1 cm * 1 cm） – Dual：将 2 μL Qubit ssDNA Reagent 加入 398 μL 5X SSC 并混匀	现配现用，室温放置不超 1 hr
0.1X SSC	ssDNA 染色后清洗、封片剂清洗、Go Spatial 执行 FFPE MIX 后清洗	将 250 μL 20X SSC 加入到 49.75 mL NF-H ₂ O 中并混匀	室温 1 周
0.01N HCl	Go Spatial 执行透化试剂配制及盐酸清洗	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，将 pH 值准确到 2（确保 pH 值在 1.9-2.1 范围内），按照上机芯片数量准备足量试剂	室温 48 hr

- 上机试剂准备具体参考“[3.6.3. 上机试剂准备](#)”章节和表格 1-2 STOmics Stereo-seq FFPE 转录组试剂盒明细表。

第三天

准备试剂	用途	准备流程	暂存条件
磁珠	cDNA 纯化	提前取出，42°C 预热 30 min	室温 12 hr
30 mL 80% 乙醇	cDNA 纯化	无水乙醇稀释到 80%（使用 NF-H ₂ O）	室温 1 天
4X cDNA PCR Mix	cDNA 扩增	提前从 -20°C取出，在冰上融化，并暂存于冰上	使用期间置于冰上
cDNA Primer	cDNA 扩增	提前从 -20°C取出，在冰上融化，并暂存于冰上	使用期间置于冰上
TE Buffer, pH8.0	cDNA 纯化	提前准备，室温备用，长期可在室温储存 12 个月	室温

准备仪器	设置程序	备注
摊烤片一体机 /PCR 仪	42°C、37°C和 60°C用于烤片	检查设备是否有异常，必要时更换
PCR 仪	95°C、98°C、58°C、72°C反应温度用于 PCR 扩增程序（105°C热盖）	检查设备是否有异常，必要时更换
Go Spatial	-	烤片脱蜡期间开机，进行预降温
荧光显微镜	FITC 通道（荧光染色）	检查显微镜是否有异常，必要时更换
恒温箱 / 金属浴	42°C用于 cDNA 纯化和扩增时的磁珠平衡及孵育	检查设备是否有异常，必要时更换

3.2. 切片准备与组织切片、捞片

3.2.1. 芯片预处理



⚠ 芯片预处理后需要尽快使用。如果不做组织贴芯片实验，请不要预处理芯片。



⋯ 针对经过运输（或运输后保存）的蜡片样本，如果不确定其是否可以顺利展片，可以在芯片预处理之前，取 1 张切片在 30% 乙醇溶液中预展片，评估样本状态。

试剂	准备方法流程	暂存条件
400mL 30% 乙醇	无水乙醇稀释到 30%（使用 ddH ₂ O）	室温 1 天
Coating Buffer I	提前从 -20℃取出置于冰上融化，若有结晶，涡旋振荡至结晶消失，用后建议长期保存于 -20℃	4℃ 1 天
Coating Buffer II	提前从 -20℃取出，放于冰上	冰上 2 hr



a. 从 Stereo-seq 转录组试剂盒 N（货号：401KN11114）中取出 Coating Buffer I 与 Coating Buffer II 试剂；



如果本次样本切片并贴芯片后，不立刻继续做转录组实验，则其他试剂立刻放回 -20℃。

b. 按照表格 3-1 配制芯片处理液，振荡混匀并置于冰上备用；

表格 3-1 芯片处理液配制

试剂	2X+10%(μL)	4X+10%(μL)
NF-H ₂ O	325.6	651.2
Coating Buffer I	110	220
Coating Buffer II	4.4	8.8
Total	440	880

c. 将芯片载体从真空密封的铝袋中取出，记录贴片背面的 SN（Chip ID）号，注意不要触摸芯片的表面；

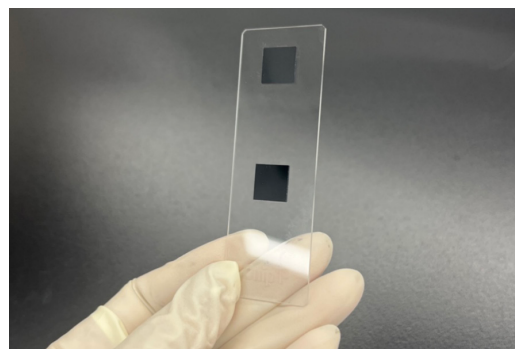
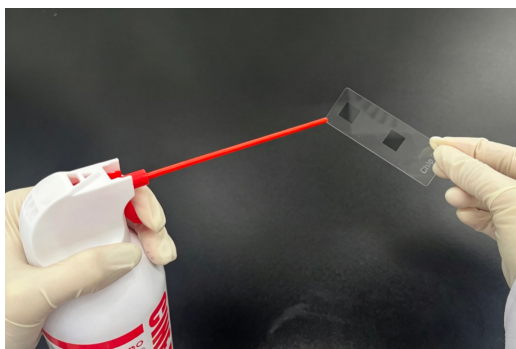


打开包装袋后，请检查玻片盒中的所有 Stereo-seq 芯片载体，并确保它们正面朝上。芯片的正面反光，包含用于捕获 RNA 的 DNB 探针，请不要接触其表面。



未使用的芯片载体若已开封，请于 2 周内进行实验。若未开封且保留在原包装中（在玻片盒中，可密封的铝箔袋外层保护），可在效期前进行实验。

- d. 将芯片载体平放在实验台 **1 min**，平衡到室温；
- e. 安装载具，具体操作可参考 [《Stereoseq V3 载具使用说明书》](#)，将芯片处理液，按照 **200 μ L/ 芯片**，从芯片四角加入到载具内，常温孵育 **30 min**；
- f. 吸弃芯片处理液，从芯片四角加 200 μ L NF-H₂O 到载具内，清洗芯片；
- g. 重复步骤 **f.**；
- h. 吸弃反应孔内 NF-H₂O，拆卸载具，丢弃垫圈，具体操作可参考 [《Stereoseq V3 载具使用说明书》](#)，使用气瓶吹干芯片表面备用。



- ... 芯片预处理后，如果可以在 1 hr 内完成贴片使用，可常温暂存；如预处理后的芯片等待时间 > 1 hr，需要将芯片载体放入玻片盒，并添加干燥剂后置于 4℃ 暂存，并且须当天内使用。

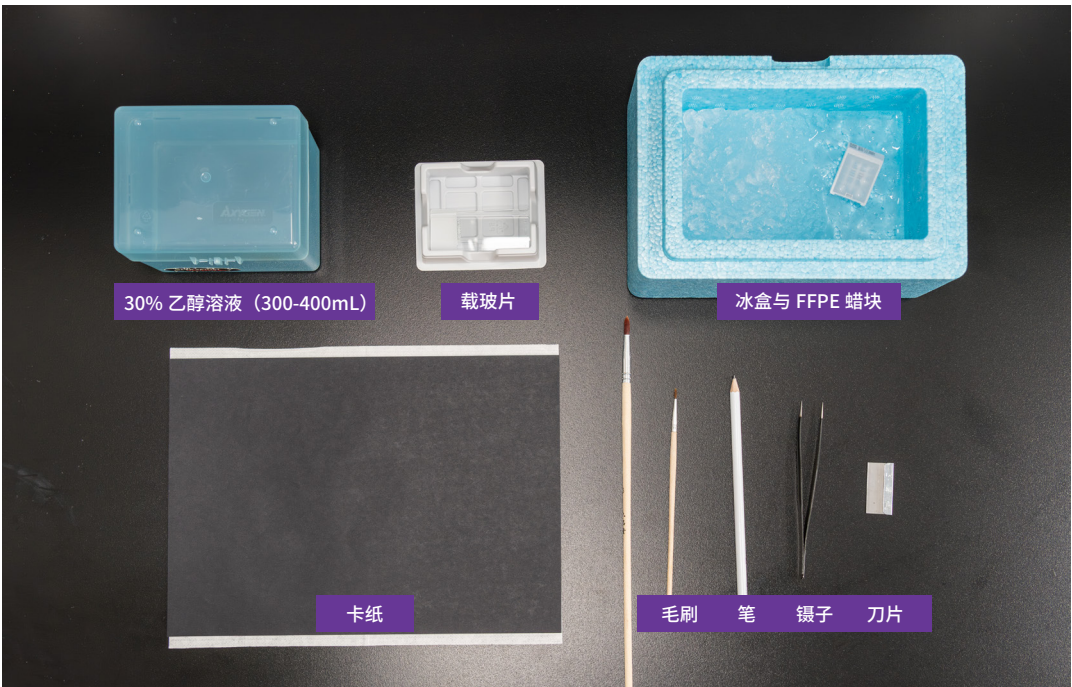
3.2.2. 组织切片与捞片



有关组织切片与贴片的操作演示视频，可参阅以下链接或扫描二维码：

<https://www.stomics.tech/resources/Videos/1168.html>

试剂	准备方法（1 片用量）	备注
30% 乙醇	120 mL 无水乙醇加入到 280 mL ddH ₂ O 中，混匀，加入容器中	捞片，现配现用



该流程建议由具有丰富经验的石蜡切片技术人员操作。

a. 提前开启摊烤片一体机，设置水浴温度 40 ~ 48℃（医院病理科可按照各自常用的水浴温度设置），烤片温度 42℃；



如无摊烤片一体机，可采用摊片水浴锅配合 PCR 仪替代，提前装置 PCR 适配器（adaptor）（货号：301AUX001）到 PCR 仪上，设置程序如下并点击运行：

表格 3-2 解交联程序设置

程序选择：Incubate	
温度	时间
45℃热盖	on
42℃	∞
42℃	3 hr
37℃	∞

- b. 准备好石蜡切片机，准备毛刷、铅笔、镊子以及新的刀片；准备 30% 乙醇（300~400 mL），装于 1 mL 或 200 μ L 枪头盒内（或其他可以承装液体的宽口容器）；
- c. 取出 FFPE 蜡块，置于冰水混合物中 **10-30 min**；或将组织面贴在冷却台上冷敷 **5-10 min**；



 当蜡块是脂肪含量高的组织（如乳腺组织）时，可以将蜡块置于 -20°C 冷冻 10 min 再切片。

- d. 切片前擦拭蜡块表面及周围水迹，固定在切片机上准备切片，若组织包埋较深，可以先用旧刀片修除多余的蜡，切到组织暴露后，锁住刀头，换新的刀片进行切片；



- e. 调整切片厚度，普通组织建议 5 μm 、脂肪含量高的组织（如乳腺组织）建议 4 μm （为降低后续操作中的脱片风险）进行切片；
- f. 正式切片时，首先将第 1 片丢弃（厚度不符合要求）；
- g. 在随后的切片过程中选出需要的目标切片，用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体；

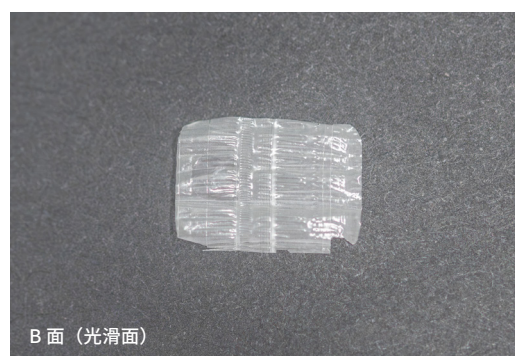
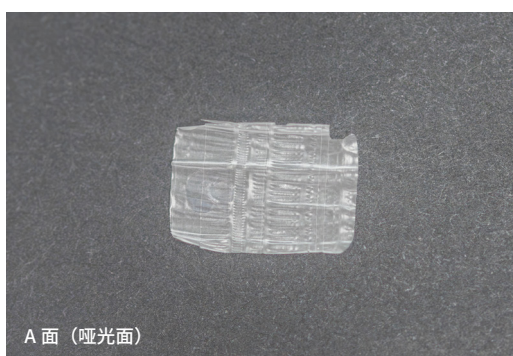


 如需保留相邻切片，则可连续切 3 片，将第 1 片和第 3 片贴于粘附载玻片用于后续 H&E 染色；小心分割出第 2 片用于修片后贴于 Stereo-seq 芯片 N 载体；

 蜡片样本可以直接寄送，注意事项见《时空实验样本准备操作指南》- 第五章时空转录组 FFPE 样本准备流程 5.3 章节（STOG00004）。



 一张石蜡切片分 A、B 面，正对切片操作人员的一面为 A 面（哑光面），贴于刀刃的面为 B 面（光滑面）；后续操作始终保持 B 面朝下，贴于液体、芯片和玻片，以防脱片。





h. 将目标切片修剪至芯片大小合适的尺寸（以 1 cm×1 cm 芯片为例，修剪至切面小于 0.9 cm×0.9 cm），将修剪后的蜡片用毛刷或镊子小心转移至 30% 乙醇中预展片，注意保持 B 面朝下贴于 30% 乙醇；

如需保留严格相邻切片，则建议两张邻片分开转移至 30% 乙醇和水浴锅，后续捞片时分别贴于两张粘附载玻片，做好标记便于区分。

该步骤用于辅助转移切片至水浴锅中，可确保展片顺利，若由经验丰富的实验师操作，可跳过该步骤。

i. 确认水浴锅预热到目标温度（40 ~ 48℃），用干净的普通载玻片将蜡片从 30% 乙醇溶液捞起，转移至预热好的水浴锅中，保持 B 面朝下接触水面；

建议切片新手注意观察切片组织在水浴锅中的状态。

组织状态	原因	操作
组织部分完全展平无褶皱	正常	按实验说明开展下一步
组织部分一直有褶皱	温度过低	调高水浴锅温度 0.5 ~ 1℃，继续观察，直到组织完全展平
组织周围的蜡有融化迹象	温度过高	停止加热并添加少量冷水，并准备立即捞片

j. 组织切片完全展平后，取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，记录芯片编号，注意不要触碰芯片表面；

k. 用毛刷 / 铅笔轻轻抵住已展平的切片一角，将芯片载体靠近组织，使组织切片的 B 面能够覆盖到 Stereo-seq 芯片 N 载体上的芯片，离开水面完成贴片（捞片）；建议先贴靠近手持端的 2 号位、再贴 4 号位，已贴片不能重复下水。



先贴 2 号位（靠近手持端）



再贴 4 号位



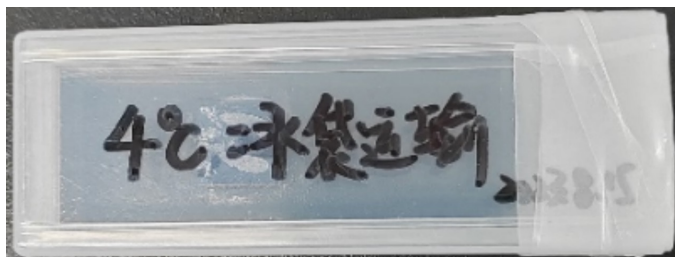
已贴片不能重复下水

- l. 用无尘纸小心擦去载体背面及芯片四周的水迹，平放在 PCR 适配器 (adaptor) 上，点击 edit 并点击 next step，跳过 42°C ∞ ，42°C 烤 3 hr 后 37°C 烤过夜。如需保留邻片，将捞片后的粘附载玻片按常规 H&E 染色流程进行操作即可；



停止点：

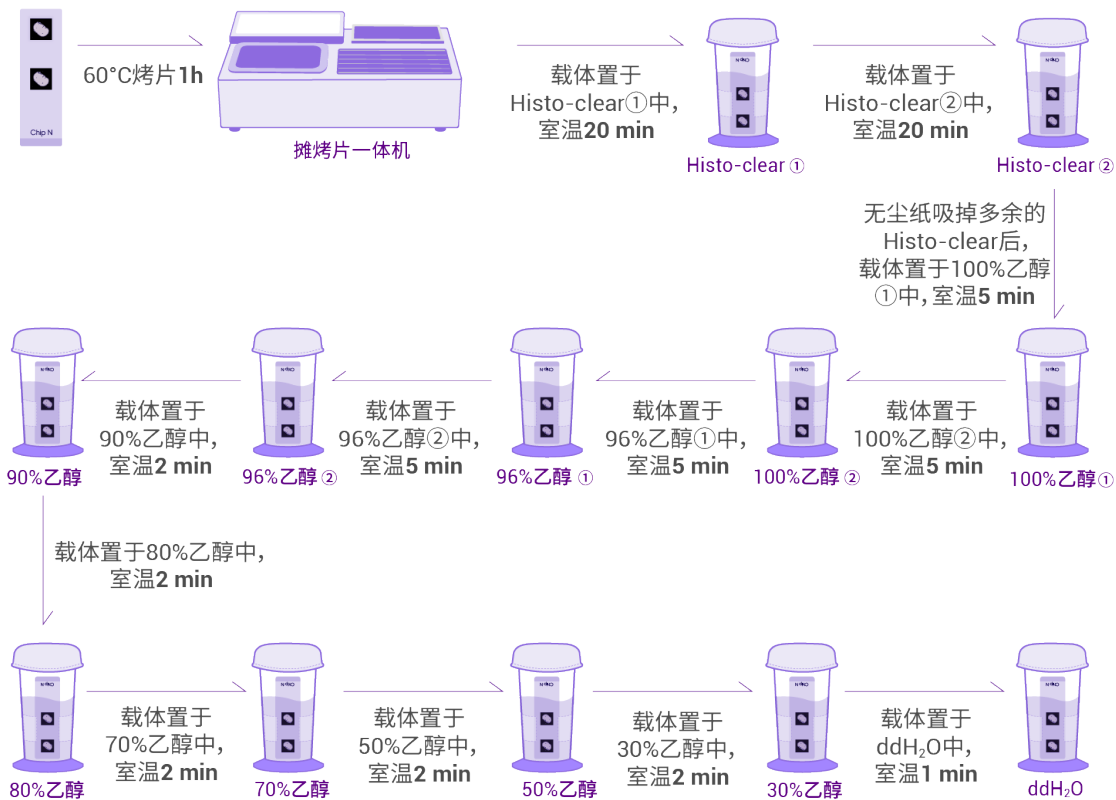
- 将烤干的 Stereo-seq 芯片 N 载体放入玻片保存盒中，盖上盖子，置于 25°C 或 37°C 烘箱中，可存放 48 hr；或置于 4°C 并添加干燥剂保存 1 周。



蜡片样本可以直接寄送，注意事项见《[时空实验 FFPE 样本准备操作指南](#)》- 附录 1.2 《FFPE 组织切片（蜡片组织）的保存与运输》。

- ① 具有丰富切片经验的实验人员可按照自己的习惯进行切片和贴片操作，贴芯片操作与贴玻片相同；
- ② 注意贴片后，贴到芯片的切片表面应避免出现气泡；
- ③ 烤片也可以使用金属浴，或其他能够准确恒定加热的模块做替代。

3.3. 脱蜡



脱蜡步骤实验流程图

- a. 提前开启摊烤片一体机（或烤片机、金属浴等），并设置烤片温度 60℃；
- b. 取出已经完成贴片的 Stereo-seq 芯片 N 载体，置于 60℃烤片机，烤片 **1 hr**（斜烤平烤均可），对于易脱片样本建议适当延长烤片时间，不超过 2 hr；
- c. 在通风橱中用染色缸准备以下试剂，每个染色缸至少 **30 mL** 试剂，以充分没过芯片载体：

试剂	数量
☐ Histo-clear ① & ②	2
☐ 100% 乙醇 ① & ②	2
☐ 96% 乙醇 ① & ②	2
☐ 90% 乙醇	1
☐ 80% 乙醇	1
☐ 70% 乙醇	1
☐ 50% 乙醇	1
☐ 30% 乙醇	1
☐ ddH ₂ O	1

 二甲苯可代替 Histo-clear。



- d. 完成烤片后，将 Stereo-seq 芯片 N 载体放置到 Histo-clear ①中，室温 **20 min**；
然后取出放到 Histo-clear ②中，室温 **20 min**；
- e. 取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，用无尘纸吸掉多余的 Histo-clear；
- f. 将 Stereo-seq 芯片 N 载体依次放置到以下试剂的染色缸中：
 - 1. 100% 乙醇①中 **5 min**
 - 2. 100% 乙醇②中 **5 min**
 - 3. 96% 乙醇①中 **5 min**
 - 4. 96% 乙醇②中 **5 min**
 - 5. 90% 乙醇中 **2 min**
 - 6. 80% 乙醇中 **2 min**
 - 7. 70% 乙醇中 **2 min**
 - 8. 50% 乙醇中 **2 min**
 - 9. 30% 乙醇中 **2 min**
 - 10. ddH₂O 中 **1 min**
- g. 取出 Stereo-seq 芯片 N 载体，用无尘纸吸掉芯片四周的多余水分，注意请勿触碰芯片表面；
- h. 使用气瓶将芯片吹干；



 完成脱蜡后，将 Stereo-seq 芯片 N 载体放入玻片保存盒中，盖上盖子，装入自封袋并加入干燥剂，可置于 4℃密封保存 72 hr。

3.4. 荧光染色

试剂	准备方法（2 张芯片用量）	用途
☐ 5X SSC	取 350 μL 20X SSC 加入 1050 μL Nuclease-free 水中，混匀后取 398 μL 用于制备 ssDNA 染液，剩余的用于 Go Spatial 流程运行。根据上机芯片数量，参考 3.4 和 3.6.3 章节，准备足量试剂	稀释
☐ Mounting Medium (1000064223)	提前从 -20℃取出平衡至室温	封片剂
☐ 0.1X SSC	将 250 μL 20X SSC 加入到 49.75 mL NF-H ₂ O 中并混匀	清洗 ssDNA 染液

a. 按照表格 3-3，配置 ssDNA 染色液，**全程注意避光**；

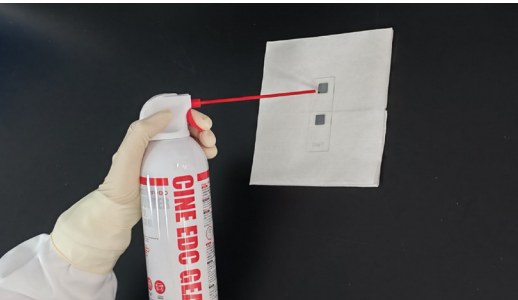
表格 3-3 ssDNA 染色试剂配制

组分	2X	4X
5X SSC	398	796
Qubit ssDNA Reagent	2	4
Total	400	800

b. 将配制好的组织荧光染色液加到芯片上，1 cm * 1 cm 芯片的用量为 **150 μL/ 芯片**。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 **Mounting Medium** 置于室温平衡 5 min。

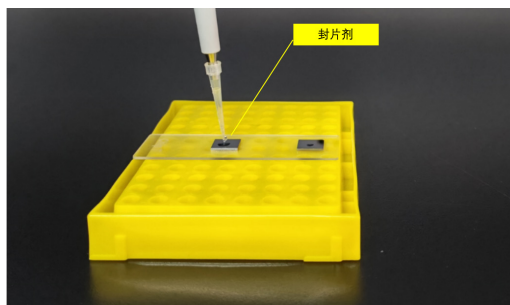
- c. 手持载体倾倒弃掉 ssDNA 染色液到无尘纸上；
- d. 滴加 0.1X SSC 到芯片上，1 cm * 1 cm 芯片的用量为 **150 μL/ 芯片**。清洗芯片，手持载体倾倒弃掉 0.1X SSC，
- e. 重复步骤 f.；
- f. 将载体转移至无尘纸上，一手固定载体，另一手持空气罐，出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30°倾角缓慢吹气，从芯片角落起始顺序推进，吹干芯片表面液体，勿使气流过猛；



⋯ 确保芯片上没有残留的染色液。

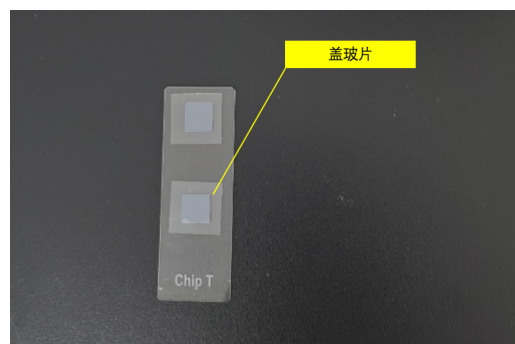
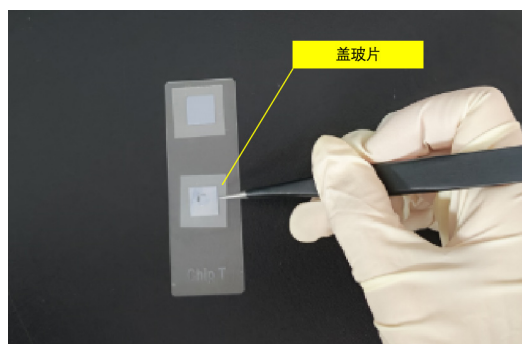
⋯ 确保已将 **Mounting Medium** 提前置于室温平衡 5 min。

- g. (可选操作) 使用载玻片离心机 (微型玻片离心机 LX-700) 离心 **10 s** 甩干芯片上液体;
- h. Mounting Medium 使用前离心, 确保试剂中无气泡。用移液器缓慢吸取封片剂滴加到组织中央, 避免产生气泡, 1 cm * 1 cm 芯片的用量为 **5 μ L/ 芯片**;



⋯ 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。

- i. 用镊子夹取盖玻片, 小心将盖玻片的一端放在芯片边上, 同时握住另一端, 然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片; 待 Mounting Medium 浸润整张芯片后, 立即拍照, 避免荧光淬灭。



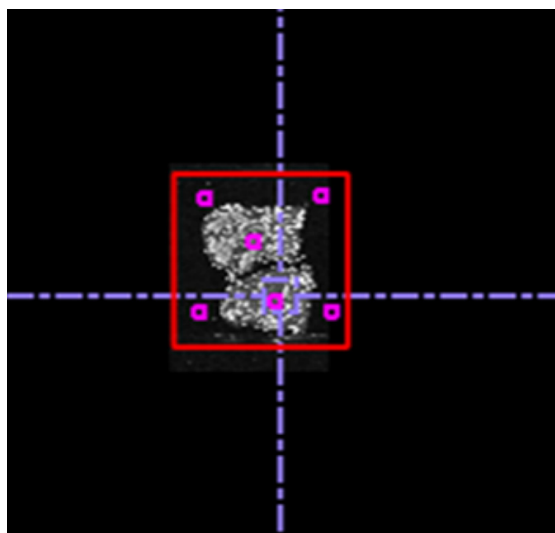
— 停止点:
封片状态下室温可放置 4 hr。

3.5. 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。

- 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；
- 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、指定染色通道 ssDNA 染色（FITC 通道）；
- 框选视野：框选芯片，减少芯片外区域；
- 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 个点对组织定焦（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；



- 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；
- 打开 StereoMap 软件的 Tools->ImageQC 模块，上传 ssDNA 染色图，并参考《[StereoMap 用户手册](#)》来进行图像 QC。
 - 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)。



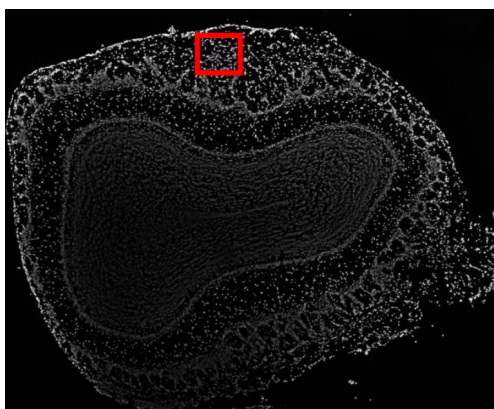
 如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，继续实验。实验结束可联系 FAS 帮助排查问题。

拍照注意事项

- 1) 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；
- 2) 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，即直方图横坐标最大值处仅有微小突起；



- 3) 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；
- 4) 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；
- 5) 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；



- 6) 如果在封片过程中，存在较大区域（超过 4 个视野大小）未被 Mounting Medium 浸润，则需要对此区域增加建模点；
- 7) 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：

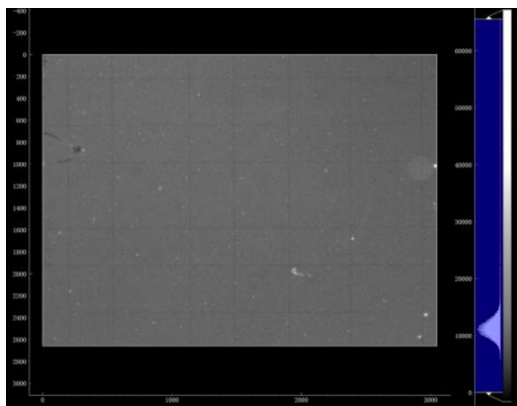


图 a

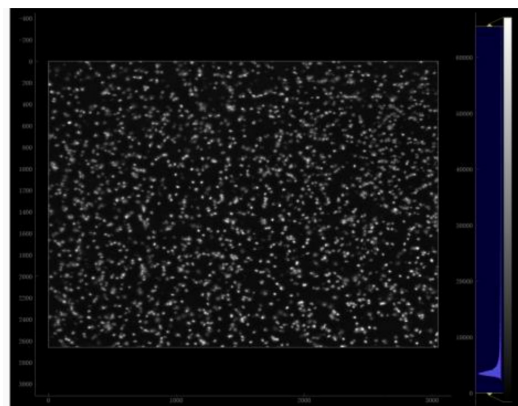


图 b

- 图 a 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 b 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曝。

错误示例：

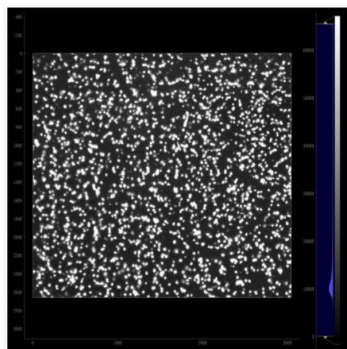


图 c

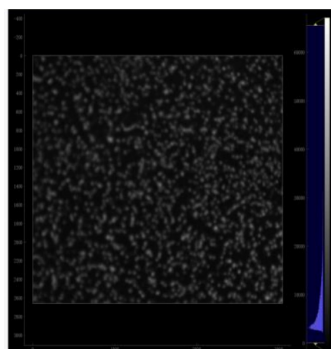


图 d

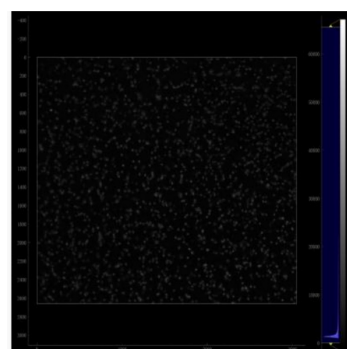


图 e

- 图 c 为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，过曝时图像及像素统计状态（图右侧）；
- 图 d 为组织内选取的一个对焦点视野窗口截图，欠曝时图像及像素统计状态（图右侧）；
- 图 e 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）。

3.6. Go Spatial 流程运行

3.6.1. Go Spatial 功能区介绍

设备台面分为吸头载架区、上料区、低温产物回收区、低温试剂区、常温试剂区、低温中转区和反应模块，其示意图见图 3-1；



图 3-1 设备台面平面示意图

- 1) **吸头载架区**：用于放置自动化实验过程中使用的吸头耗材一共四种：1000 μL 平口透明吸头、1000 μL 斜口黑色吸头、200 μL 透明吸头、50 μL 透明吸头；**注意：每次上样前吸头需保持插满状态；**
- 2) **上料区 B/C**：“Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (ssDNA 染色)(1cm $\times$ 1cm)”流程支持在 2 个上料区 C、B 上样，各上料区均可放置 2 个载体，每个载体贴有 2 张芯片（处于 2 号和 4 号位），可实现的最大通量为 8 张芯片 / 轮；实验时，上料区 C、B 中对应 I 位或 II 位的载体，将分别被转移至反应模块 C、B 中对应 I 位或 II 位的区域进行反应，例如：上料区 C- I 位置的载体会被转移至反应模块 C- I 区域进行后续实验操作；
- 3) **低温产物回收区**：用于放置 1.3 mL 96 孔深孔板，每轮流程运行产出的 cDNA 产物会回收该区域；
- 4) **低温试剂区**：用于放置实验流程中使用到、并需要在低温保存的试剂，可放置 0.5 mL/1.5 mL/2 mL 试剂管（1、2、3 列），5 mL 试剂管（4、5、6 列）以及 8 连管（7、8 列），具体试剂摆放位置参考图 3-1 中的低温试剂区放大图；
- 5) **常温试剂区**：用于放置实验流程中使用到、并需要在常温保存的试剂，常温试剂区支持放置 2 种耗材，分别为 50 mL 试剂槽（1、2、3 列）和 5 mL 试剂管（4、5、6 列）具体试剂摆放位置参考图 3-1 中的常温试剂区放大图；
- 6) **反应模块 B/C**：“Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (ssDNA 染色) (1cm $\times$ 1cm)”流程支持在 2 个反应模块 C、B 进行生化实验，每个反应区支持放置 2 个载体，反应区载体和上料区载体位置一一对应。
- 7) **反应模块 A—低温中转区**：反应区模块 A 在“Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (ssDNA 染色) (1cm $\times$ 1cm)”流程中为共用的低温中转区。当反应模块 C 与 B 的样本分别运行至固定步骤时，会转移其模块的载具至反应模块 A 进行临时的低温中转，进行快速降温。反应模块 A 不用于样本的长反应区。

3.6.2. Go Spatial 仪器准备



- ③ 正式上机前,需要预留 30 - 60 min,进行开机、预冷(10-20 min)、上机前的清洁消毒(可参考 3.6.10 章节)、实验耗材准备,实验试剂准备等工作,建议组织固定前开始进行上述操作。
 - a. 仪器启动:开启所有硬件设施,包括: Go Spatial 主机、电控箱、接通外置扫码器、电脑主机与显示器。等待 **1 min** 左右,让硬件部件之间联上通讯;
 - b. 软件开启:在电脑桌面双击 Go Spatial 运行软件快捷方式“**STOmics**”,打开操作软件,输入用户名“**user**”,密码为“**123456**”。如图 3-2 及 3-3 所示;
- ③ 使用前请确保已安装 STOmics 软件 V2.5.0 版本或以上。软件版本号可通过 STOmics 软件登录界面中的正中下方的文字查阅。



图 3-2 STOmics 软件图标

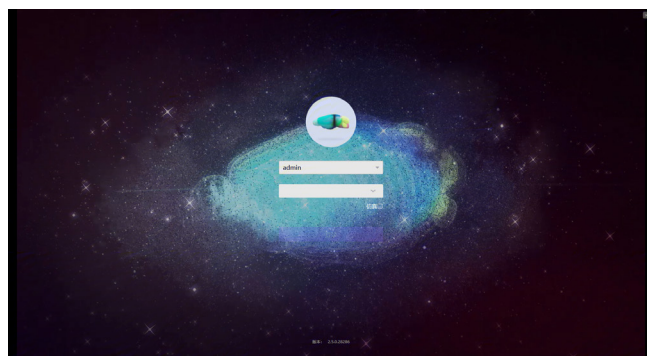


图 3-3 STOmics 软件登录界面

- c. 仪器初始化:打开软件后,请点击“仪器初始化”按钮进行系统自检,此过程预计为 **1-2 min**, 界面如图 3-4 所示;

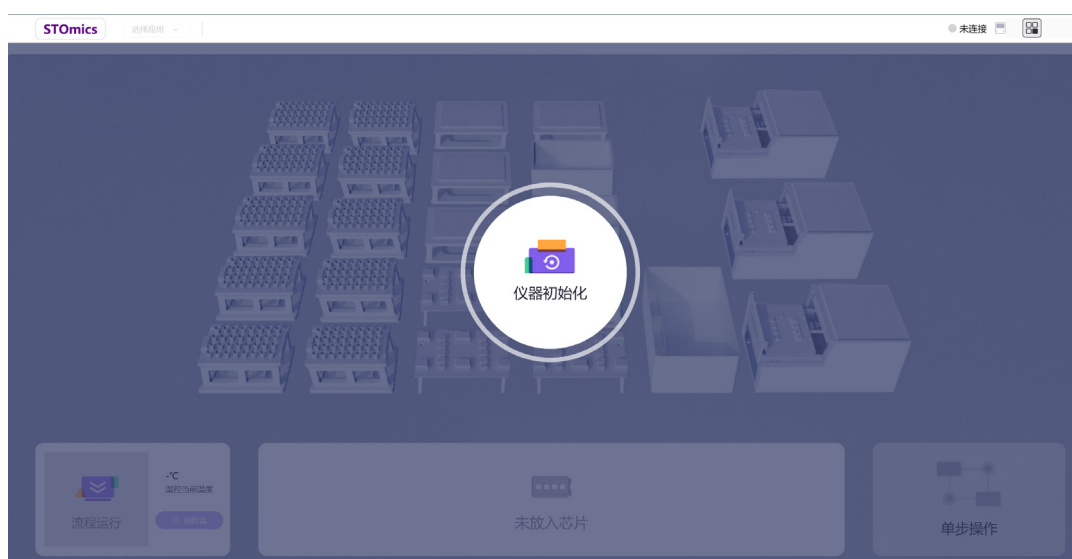


图 3-4 STOmics 软件仪器初始化界面

- d. 选择运行流程: 点击软件界面左上方的”请选择应用“下拉菜单, 选择“Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 (ssDNA 染色) (1cm x 1cm)” 并点击确定, 界面如图 3-5 所示;

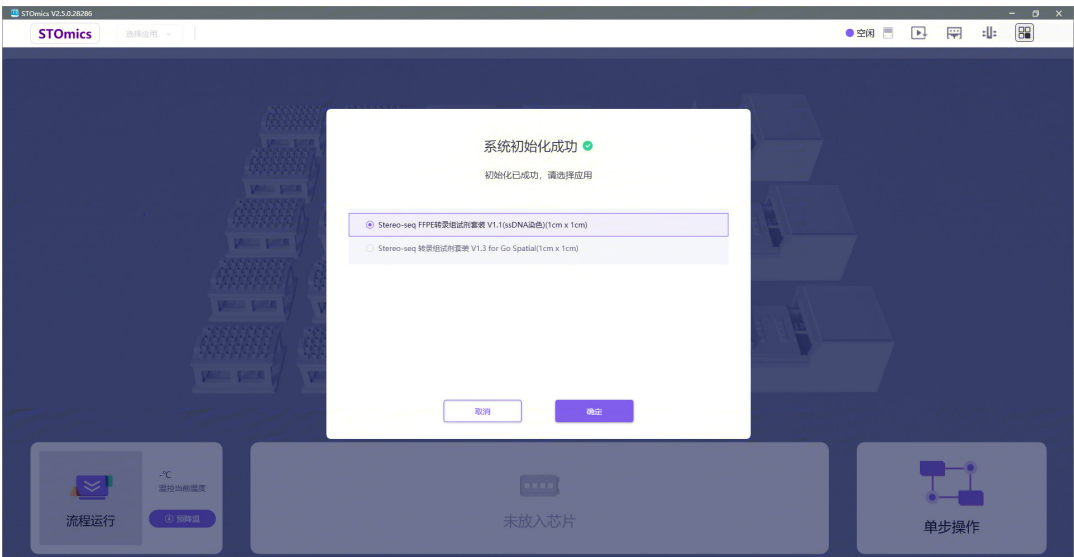


图 3-5 STOmics 软件应用流程选择

- e. 预冷低温试剂区: 点击软件界面左下方的“预降温”界面如图 3-6 所示, 使低温试剂区温度降至 4℃, 降温过程约 10 - 20 min。



- ⚠ 低温试剂区的温度需要稳定降低到 4℃及以下, 才可以点击下一步按钮开始实验流程。
- ⚠ 需要低温试剂区温度稳定在 4℃及以下, 才可以放置低温保存的试剂。



图 3-6 预降温按钮



图 3-7 预降温进行中

3.6.3. 上机试剂准备

实验试剂的准备与芯片数量及上料区位置相关：芯片数量决定了需要在多少个上料区进行上样，上料区位置决定了实验试剂摆放位置。以下章节按照单模块上样及多模块上样两种应用类型介绍，请根据实际操作场景参考对应章节内容。

一. 实验试剂位置说明

A. 单模块上样：单次流程运行仅使用一个反应模块

a. 仅使用反应模块 B：请参考图 3-8 放置低温试剂和常温试剂；

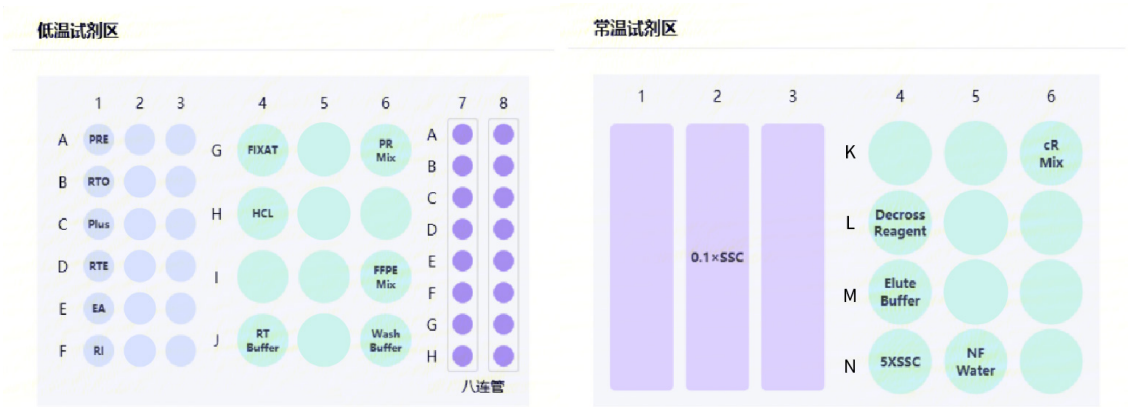


图 3-8 低温试剂区及常温试剂区台面放置示意图 - 反应模块 B

b. 仅使用反应模块 C：请参考图 3-9 放置低温试剂和常温试剂；



图 3-9 低温试剂区及常温试剂区台面放置示意图 - 反应模块 C

B. 多模块上样：单次流程运行使用多个反应模块

Go Spatial-V2-24 适配 Stereo-seq FFPE 转录组 V1.1，采取模块化分时上样模式。**反应模块 B 或 C 均可作为第一模块上样**，本文以反应模块 B 作为第一模块为例进行说明。根据实验的样本数量，一次性将所有芯片需要的多模块共用试剂准备好。在第一个模块的芯片上料时，将第一个模块芯片的单模块专用试剂及多模块共用试剂，按照本轮运行的样本安排情况，参考图 3-8 至图 3-10 的 Go Spatial 台面示意图，打开试剂管盖并将试剂放入对应区域。

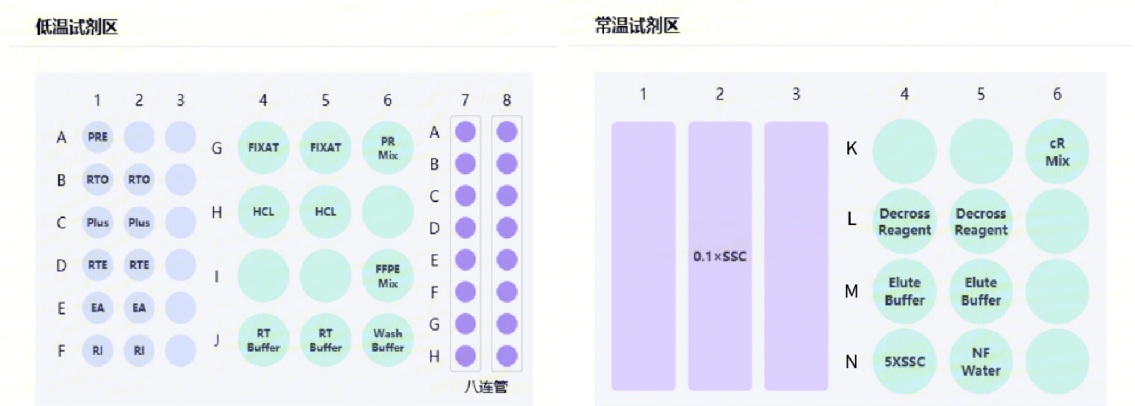


图 3-10 B 和 C 两个反应模块使用时，低温试剂 & 常温试剂区的试剂及耗材放置示意图

二．试剂准备

流程使用到的试剂分为 a. 多模块共用试剂，及 b. 单模块专用试剂：

- a. **多模块共用试剂**：根据单次运行所需的试剂用量，全流程只需准备 1 份试剂，即可满足多个反应模块的使用需求。
- b. **单模块专用试剂**：除了多模块共用试剂，其他试剂需单独为每个反应模块提供专用试剂，单个试剂盒最多可支持一个反应模块的 4 张芯片的用量。专用试剂取用及放置规则如下：

反应模块 B：取用低温试剂区第 1 列、第 4 列和常温试剂区第 4 列的模块 B 专用试剂；
反应模块 C：取用低温试剂区第 2 列、第 5 列和常温试剂区第 5 列的模块 C 专用试剂。
参考表格 3-4，根据单次运行所需处理的芯片数量准备对应的数量及体积的试剂。

表格 3-4 Stereo-seq FFPE 转录组 V1.1 for Go Spatial 试剂上机前准备对照表

孔位编号 *	台面代号	试剂名称	上机前准备及提示
低温试剂区 - 小管			
A1	PRE	PR Enzyme	原管上机，干粉，4℃暂存，上机前瞬时离心，确保粉末聚集于管底，多模块共用
B1/B2	RTO	FFPE RT Oligo	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
C1/C2	Plus	FFPE RT Plus	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
D1/D2	RTE	FFPE RT Enzyme Mix	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
E1/E2	EA	Elute Additive	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
F1/F2	RI	RI	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心

孔位编号 * 台面代号	试剂名称	上台前准备及提示
低温试剂区 - 大管		
G1/G2	FIXAT	甲醇
H1/H2	HCL	0.01N HCl
J1/J2	RT Buffer	RT Buffer Mix
G3	PR Mix	PR Mix
I3	FFPE Mix	FFPE Mix
J3	Wash buffer	Wash buffer
常温试剂区		
L1/L2	Decross Reagent	FFPE Decrosslinking Reagent
M1/M2	Elute Buffer	Elute Buffer
N1	5X SSC	5X SSC
N2	NF Water	Nuclease-free Water
K3	cR Mix	cR Mix
单孔槽 2	0.1×SSC	0.1×SSC

* 孔位编号，参考图 3-8 至 3-10 的台面示意图中的编号。

试剂准备说明：

- 1) 试剂盒中的 PR Enzyme 为透化酶干粉，所有反应模块只需 1 管透化酶干粉（多模块共用试剂）。在放置进仪器前请瞬时离心，离心后观察粉末位置。若有粉末聚集管壁，请拧紧上盖后，在桌面轻敲几下管体，保证干粉处于管底；



若使用先前运行剩余的 10X 透化酶母液，先将剩余试剂从 -20℃ 取出放在冰上化冻，再瞬时离心后上机。该操作仅适合同一试剂盒分成 2 次单模块上机使用的场景（每次运行只有 1 张载体，2 张芯片，详情请参考附录 A）；多模块运行的使用场景下，需使用试剂盒内一管全新的、未开封的透化酶干粉。

- 2) 自备试剂甲醇需要上台前现备，装入一个新的 5 mL 空管中。上台前需密封备用。该试剂为独立模块试剂，每增加一个反应模块，按照芯片数量增加一管试剂用量。摆放的孔位需与反应模块对应。试剂用量与芯片数量相关，详细见下表：

芯片数量	2 张芯片	4 张芯片
甲醇准备量	1.5 mL	3 mL

3) 自备试剂 0.01N HCl, 需要现配。装入一个新的 5 mL 空管中。该试剂为独立模块试剂，每增加一个反应模块，按照芯片数量增加一管试剂用量。摆放的孔位需与反应模块对应。试剂用量与芯片数量相关，详细见下表：

芯片数量	2 张芯片	4 张芯片
0.01N HCl 准备量	3 mL	4.5 mL

4) 自备试剂 5X SSC 和 Nuclease-free Water 需要上机前现备，该试剂为多模块共用试剂。转移至干净的 5 mL 空管后，上机前可室温暂存，试剂用量与芯片数量相关，详细见下表：

芯片数量	2 张芯片	4 张芯片	6 张芯片	8 张芯片
5X SSC 准备量	1 mL	1.7 mL	2.4 mL	3 mL
NF Water 准备量	1 mL	1.7 mL	2.4 mL	3 mL

5) 常温试剂区左侧中间编号为 2 的位置为 0.1X SSC，该试剂为多模块共用试剂。在 50 mL 试剂槽中加入 15 mL 的自配试剂 0.1X SSC；



先将干净的 50 mL 试剂槽平稳放置在仪器中后再倒入配制好的 0.1X SSC，以防固定试剂槽的时候导致液体溅出。

- 6) 自配试剂 0.01N HCl、5X SSC、0.1X SSC 试剂放置前请确保混匀；
- 7) 不建议将套装内试剂分装使用，容易导致试剂冗余不足，影响实验流程。

试剂上机前注意事项：

- 1) 低温试剂（试剂孔位编号 A-J）需要设备的低温试剂区降至 4℃及以下后才可放置，且放置前需确保试剂充分解冻并瞬时离心；
- 2) 试剂摆放一定要注意将试剂完全放置到孔位中，可以在放置到对应孔位后，轻轻压下试剂管边缘保证试剂管触底，即为正确放置；
- 3) 所有试剂均需揭盖敞口放置上机；
- 4) 建议全流程开始将所有模块需要的试剂放置于机舱内，避免在多模块上样窗口期开放时放置试剂，以防操作失误导致仪器中途报错或试剂不足导致实验结果不佳。

3.6.4. 上机耗材准备

- a. 按表格 3-5 进行实验耗材的准备，如需了解详细吸头使用数量请参考《附录 B: Stereo-seq FFPE 转录组 V1.1 for Go Spatial 吸头使用数量参考》；

表格 3-5 Stereo-seq FFPE 转录组试剂套装 V1.1 for Go Spatial 流程吸头使用明细表

芯片数量	1000 μ L 透明吸头	1000 μ L 黑色斜口吸头	200 μ L 吸头	50 μ L 吸头	96 孔深孔板	5 mL 试剂管 (含试剂)	5 mL 试剂空管 (无试剂)	50 mL 试剂槽	100 mL 试剂槽
2/4	1 盒	1 盒	1 盒	1 盒	1 个	7 个	4 个	1 个	1 个
6/8	1 盒	1 盒	1 盒	1 盒	1 个	12 个	4 个	1 个	1 个

- b. 按照图 3-11 放置耗材：
- a) 表格 3-5 中 4 种吸头按照图 3-11 标识放置到对应吸头载架区；
 - b) 表格 3-5 中 96 孔深孔板按照图 3-11 标识放置到 “1.3 mL 96 孔深孔板” 区；
 - c) 表格 3-5 中 50 mL 液体槽，100 mL 废液槽按照图 3-11 标识放置到对应区；
 - d) 表格 3-5 中 5 mL 空管，参考表格 3-4 和 3.6.3 章节的信息放置到对应试剂区。



图 3-11 耗材放置示意图

耗材放置注意事项：

- 1) 吸头放置：每次实验前，应始终使用满载的吸头盒，以确保在设备自动化工作中，能够可靠地使用吸头，避免因吸头缺失导致的实验失败；吸头盒放置的时候，保持 A1 位于左上角的方向，枪头板椭圆形缺口与吸头架左上侧靠齐；

- 2) 深孔板放置：每次实验前，先打开深孔板的盖板，将深孔板区的固定框（参考图 3-12）取下，然后放置一个全新干净的深孔板（见图 3-13），按照 A1 号孔位为最左上方的方向放置，再依次放置固定框，盖上深孔板的盖板；

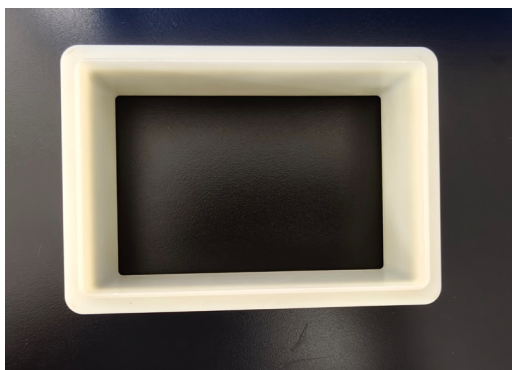


图 3-12 深孔板区的固定框

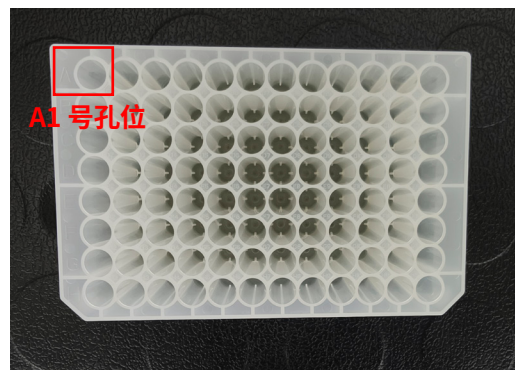


图 3-13 深孔板

- 3) 温控盖板放置：试剂和深孔板放置完毕后，按照图 3-14 请将白色的温控盖板盖上低温试剂区和深孔板区。



图 3-14 温控盖板

（右上，为深孔板区盖有盖板的正确状态；右下，为低温试剂区未盖上盖板的错误状态）

3.6.5. 载具安装

- 上机试剂和耗材摆放无误，芯片拍照后，将芯片拿到 Go Spatial 附近干净的实验台面上；
- 用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，用无尘纸擦拭芯片周围封片剂（图 3-15）；

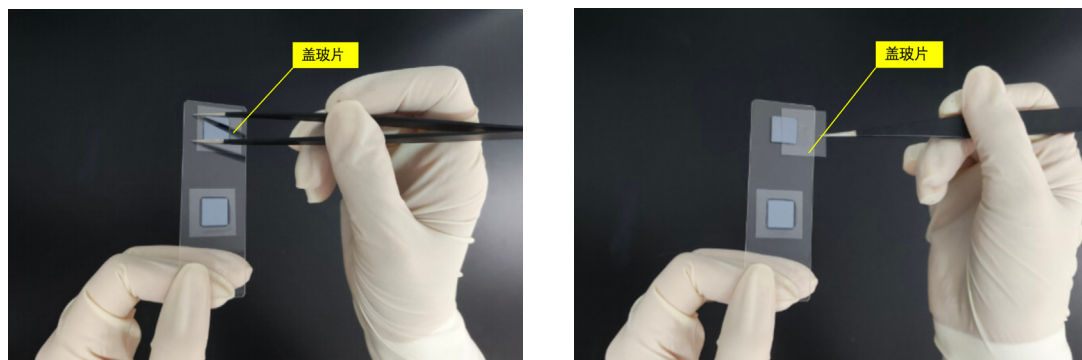


图 3-15 盖玻片移除操作



 试剂和耗材摆放无误后，再揭盖玻片进行上料。

- 将芯片载体置于 30-40 mL 0.1X SSC 的染色缸、玻片盒或 50 mL 离心管中浸泡 **3-5 s**，清洗芯片；
- 将芯片载体取出，用无尘纸小心擦拭芯片周围液体，将芯片使用气瓶吹干；
- 按照 [《Stereo-seq V3 载具使用说明书》](#) 将垫圈与载具上盖、底座组合成载具，并将芯片载体固定于载具上，组合成适用于 Go Spatial 上机的载具，进入“**程序信息录入**”的步骤。

3.6.6. 程序信息录入

- a. 流程运行：点击页面左下方的“流程运行”，将进入实验信息填写界面，如图 3-16 所示；

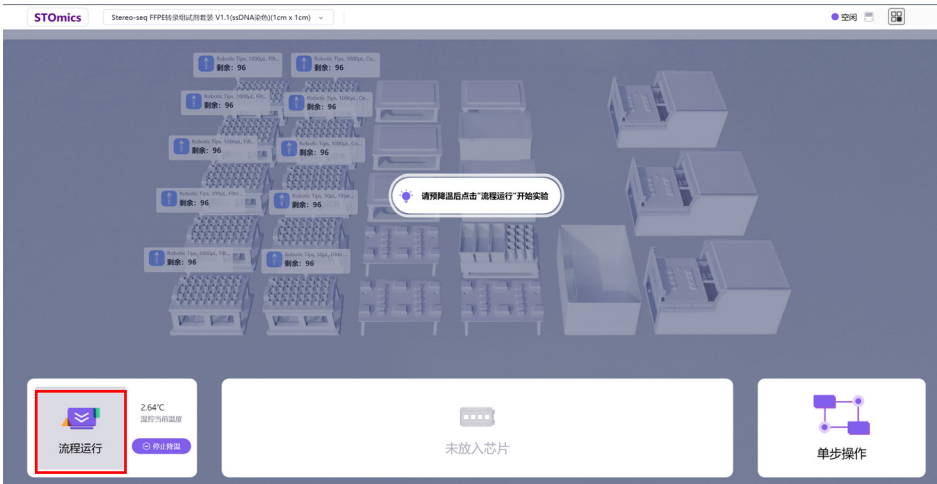


图 3-16 流程运行界面

- b. 信息录入：点击流程运行后，进入“芯片扫码”界面。选择即将上料的芯片将要使用的对应反应模块，录入实验信息，包括芯片 ID、样本编号、样本类型及实验员邮箱。图 3-17 展示的是芯片载体 B-1 的录入页面；



软件默认需要仪器配制 10X 透化酶，请确保 A1 孔位已放置 PR Enzyme 透化酶干粉。若使用先前运行剩余的 10X 透化酶母液，不需要仪器再次配制 10X 透化酶母液，请点击取消勾选“配制 10X 透化酶（PR Enzyme）”选项，具体操作见图 3-18 和 3-19。

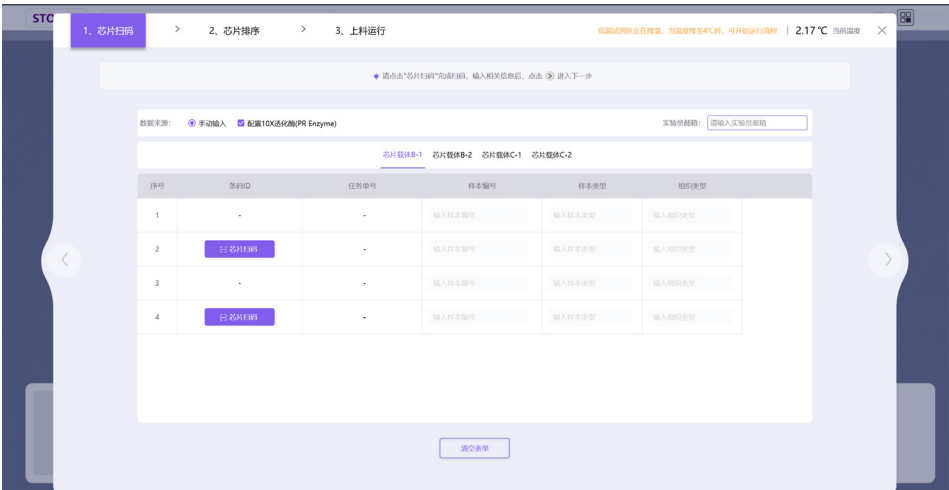


图 3-17 STOmics 软件芯片信息录入界面

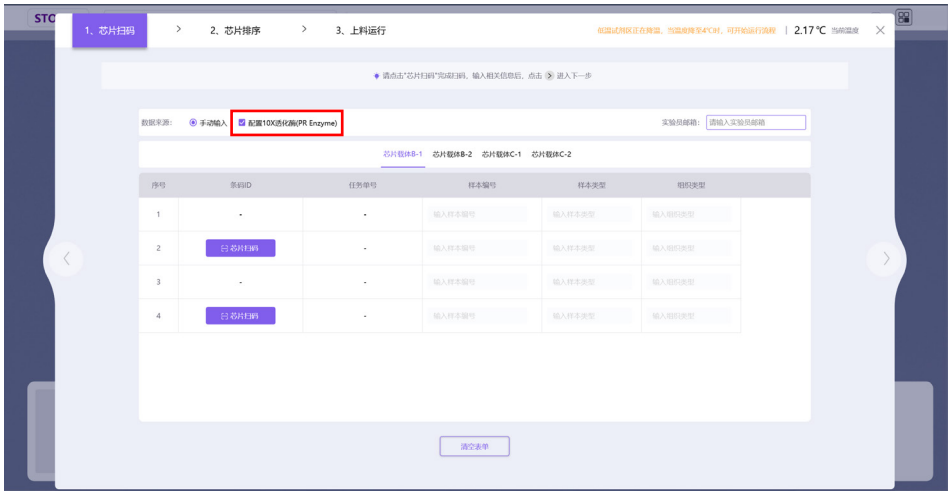


图 3-18 B 模块信息录入界面，点选取消透化酶配制选项

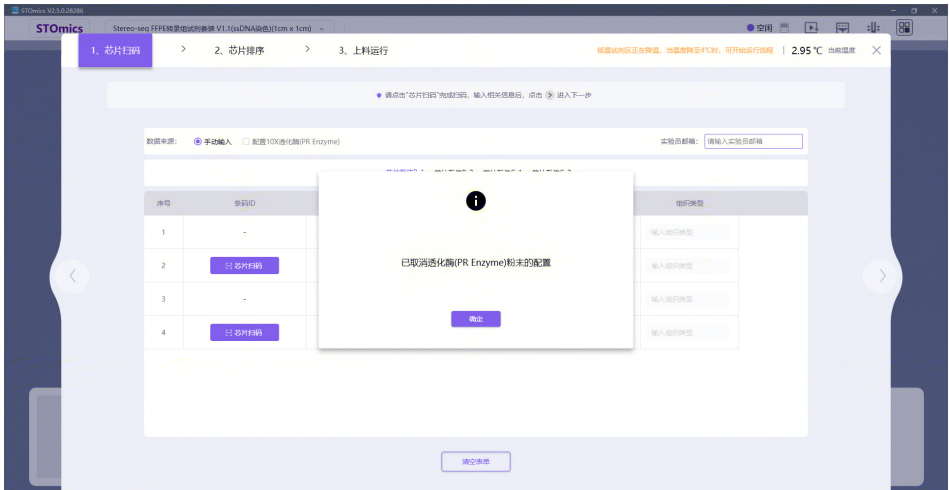


图 3-19 取消透化酶配制确认界面图

芯片 ID 录入说明：

芯片 ID 录入有两个方式：扫码输入 (a) 和 手动输入 (b)：

(a) 扫码输入

把载具放置在外置扫码器上，让扫码窗口对准芯片背面的 ID 码（图 3-20，图 3-21），点击软件界面中下方的“**芯片扫码**”按钮（图 3-17），便可以读取芯片背面的编号，机器读取到的编号会显示在软件中。扫描的时候注意，载具上面的芯片位置号（2 号和 4 号）需要和软件界面中的序号保持一致。

(b) 手动输入

鼠标点击录入框，键入芯片 ID 号即可。



图 3-20 外部扫码器

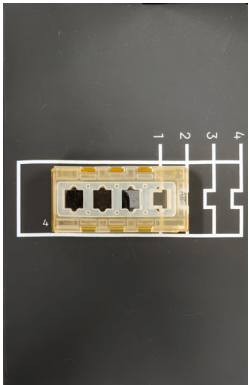


图 3-21 芯片扫码

c. 信息录入：如图 3-22 所示，完成所有样本的信息输入；

序号	芯片ID	任务序号	样本编号	样本类型	组织类型
1	-	-	输入样本编号	输入样本类型	输入组织类型
2	C20584C7	-	3A88	Rat	Heart
3	-	-	输入样本编号	输入样本类型	输入组织类型
4	C20584C8	-	8Cac9	Mouse	Intestine

图 3-22 样本信息录入

d. 信息确认：点击下一页，进行图 3-23 所示的页面，再次确认录入信息，确认无误后点击下一步按钮。

1
无芯片
⌚ - ⌚

2
C20584C7
芯片编号
⌚ 30 min ⌚

3
无芯片
⌚ - ⌚

4
C20584C8
芯片编号
⌚ 30 min ⌚

图 3-23 样本信息确认

3.6.7. 流程开始

- a. 点击下一步按钮后，进入如下图 3-24 的“上料运行”界面。请确保所有试剂耗材已如软件界面提示的位置放置；

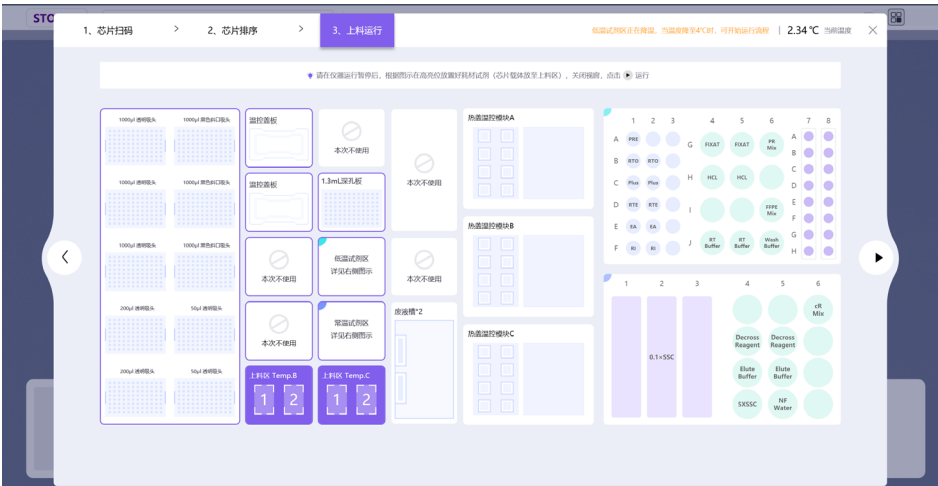


图 3-24 上料运行界面

- b. 将载具按照图 3-25 所示的正确方向放置在上料区，手柄端在顶部，可在载具上简单标注芯片信息及上样位置；



图 3-25 上料区 B 上的芯片载具放置示意图

- c. 所有试剂耗材核对放置无误后，手动关闭设备舱门，点击下一步按钮，会弹出如图 3-26 所示的“是否确定开始”弹窗，点击“确定”，实验流程开始运行。此时设备舱门会自动锁上。

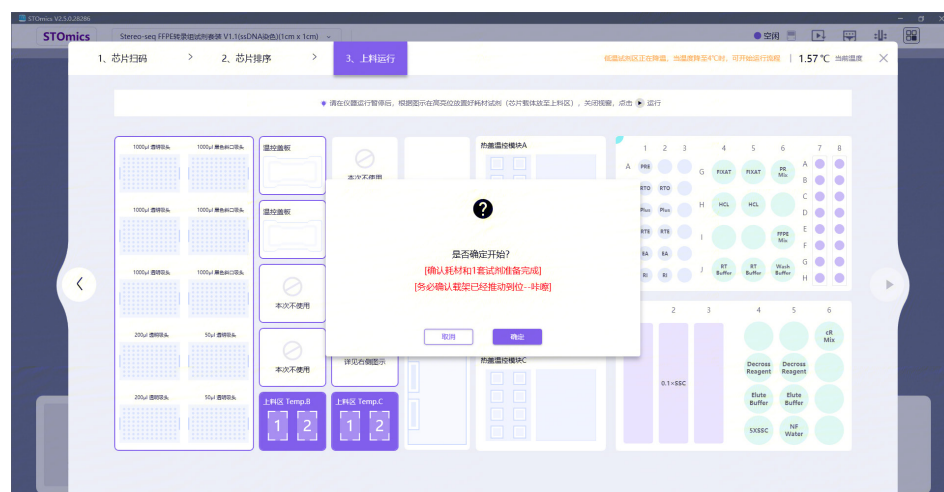


图 3-26 STOmics 软件流程确定开始界面



- ⚠ 流程开始后，请勿随意点击“暂停”按钮，以免暂停过久导致各步骤反应超时。
- ⚠ 从“解交联”步骤至“固定”步骤结束前，若流程暂停过久，可能会导致“固定”步骤所需的低温反应模块制冷过久，模块表面过度结冰，载具因冻住而无法转移。正常运行中轻微结霜（如图 3-27 所示）为正常物理现象，不影响运行。

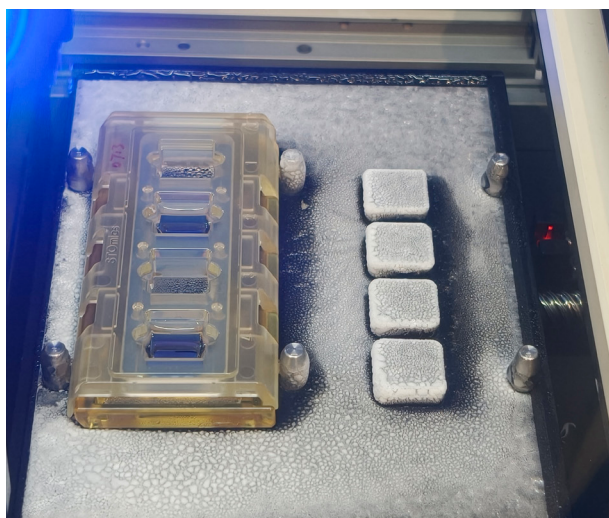


图 3-27 反应模块制冷过程中产生轻微结霜，属正常物理现象

3.6.8. 多模块上样

Go Spatial-V2-24 适配 FFPE 转录组 V1.1 应用，采取模块化分时上样模式。

- a. 多模块上样准备：将新模块的专用试剂放置到位，并确保新模块运行所需的试剂耗材准备充足。完成载具安装后，可准备录入芯片信息及新流程上样。详情参考 3.6.3 到 3.6.7 章节；
- b. 当第一个反应模块的样本运行至“FFPE MIX 反应”或“cDNA 释放反应”阶段时，机器会发出蜂鸣声，软件弹窗提示“当前可上料”，如图 3-28 所示。此时点击软件页面左下方的“上料”按钮，即可进入“芯片扫码”页面（如图 3-29）；



在 FFPE 转录组 V1.1 流程中，当第一个反应模块进入“FFPE MIX 反应”步骤（约在运行开始后 2 hr 40 min）和“cDNA 释放反应”步骤时（约在运行开始后 7 hr 50 min），软件将开放第二个反应模块的上样权限，每次上料窗口持续 5 hr。可根据时间处理第二组样本，染色拍照后在窗口期上料即可。请务必在第一个反应模块完成 FFPE MIX 反应和 cDNA 释放反应前，完成第二个反应模块的所有芯片上样，否则需待本次流程结束回收 cDNA 后，重启新流程再进行上样。

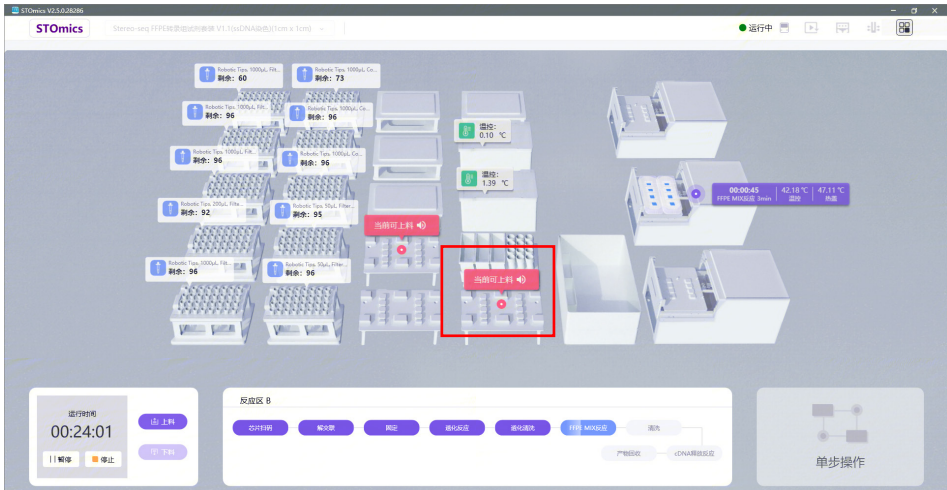


图 3-28 STOmics 软件提示可在其他上样区上样

- c. 如图 3-29 所示，选择第二个反应模块对应的芯片载体的信息录入界面，扫描录入芯片 ID 等样本信息；

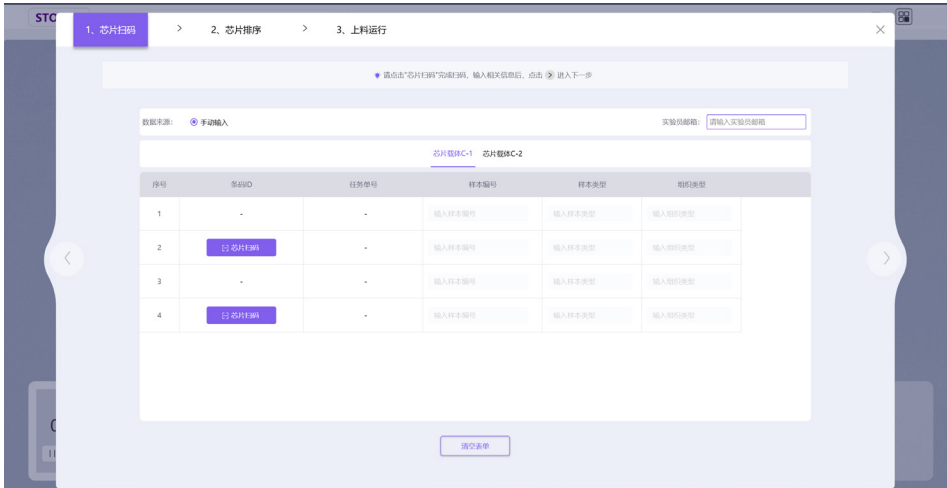


图 3-29 第二个反应模块的芯片扫码界面

- d. 信息录入完毕后，点击下一页，进行图 3-30 所示的页面，再次确认录入信息，确认无误后点击下一步按钮；

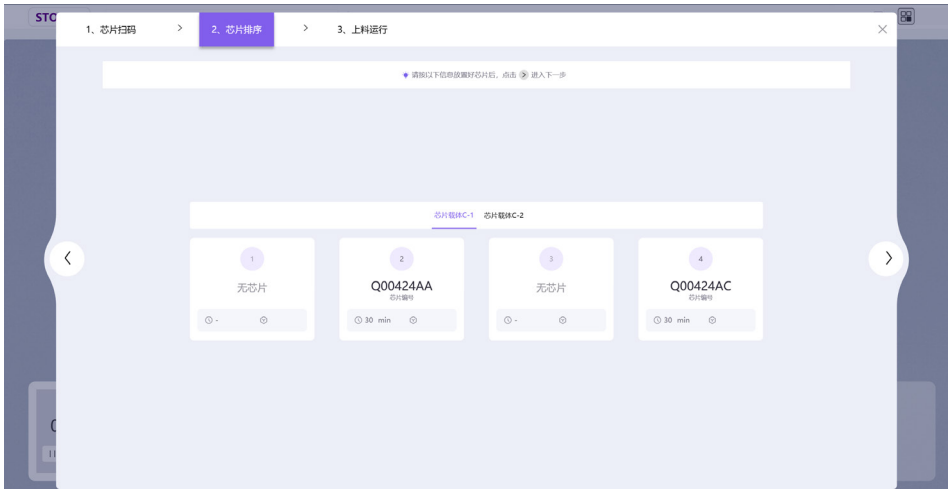


图 3-30 第二个反应模块芯片信息确认界面

- e. 录入信息确认后，点击下一步按钮，进入如下图所示的上料运行界面，点击页面下方的“暂停仪器”按钮，如图 3-31。打开舱门，将芯片放置在上料区对应位置，如图 3-32，便可关闭舱门；

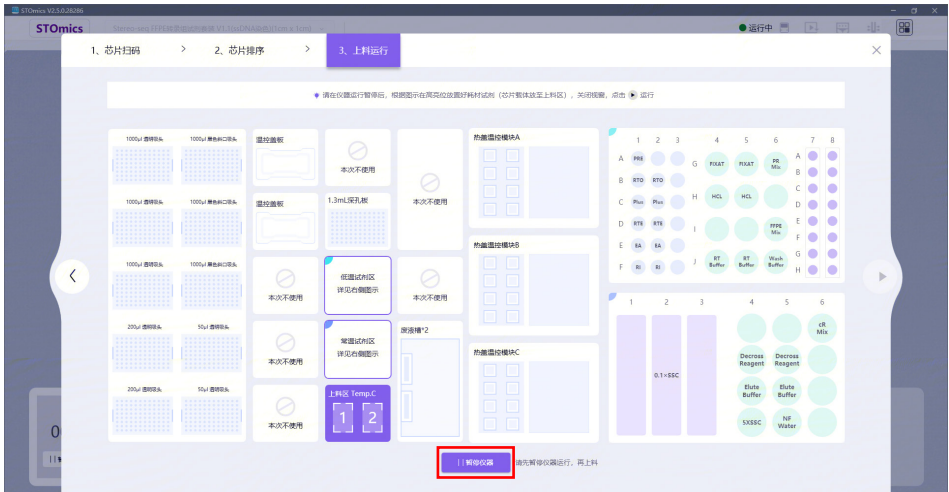


图 3-31 STOmics 软件流程暂停仪器多个上样区界面

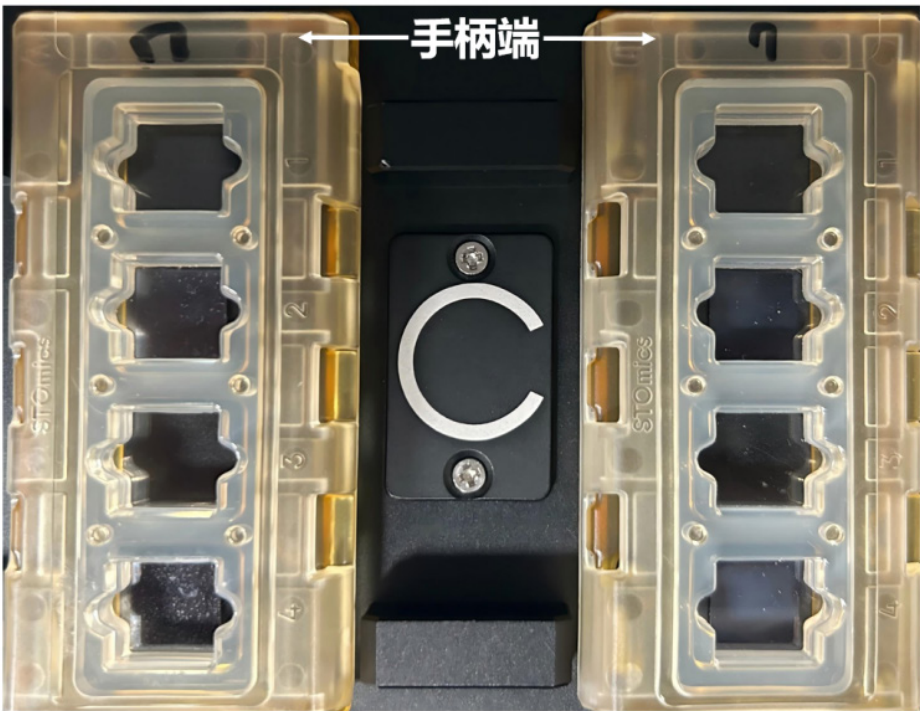


图 3-32 上料区 C 上的芯片载具放置示意图

- f. 载具放置完成后，点击下一步按钮，进入如图 3-33 所示界面，点击“确定”按钮，即可开始第二个模块的流程运行。

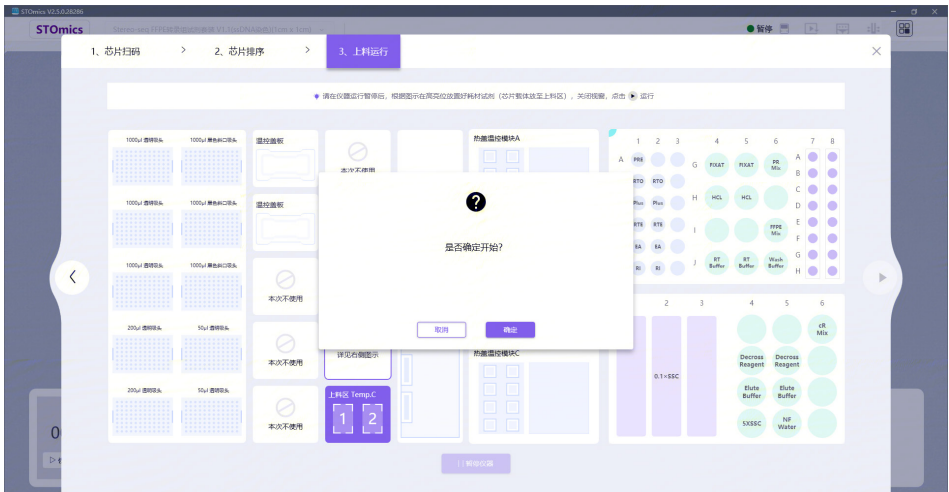


图 3-33 第二个反应模块流程运行开始前确认界面



⚠ 若流程运行不在多模块上样窗口时，软件底部的“暂停仪器”会无法点击，提示该步骤无法进行多模块上样（图 3-34）。

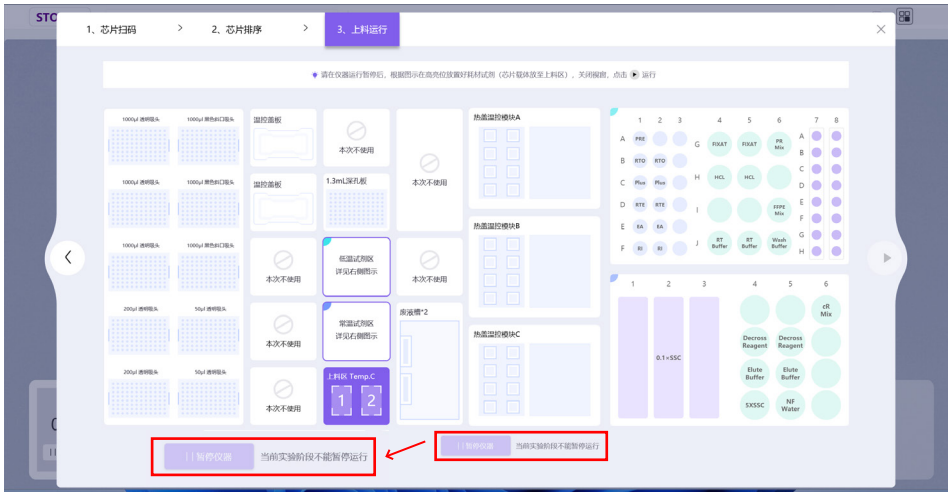


图 3-34 STOmics 软件流程至非上样窗口时的界面

3.6.9. 流程结束和 cDNA 回收

一. cDNA 产物及剩余试剂回收：

- a. 应用流程运行结束后，会弹出“是否停止所有温控”的弹窗（图 3-35），暂时不操作软件界面，直接打开设备舱门，平稳小心地从深孔板区拿出 96 孔深孔板，释放后的 cDNA 产物存储于此；

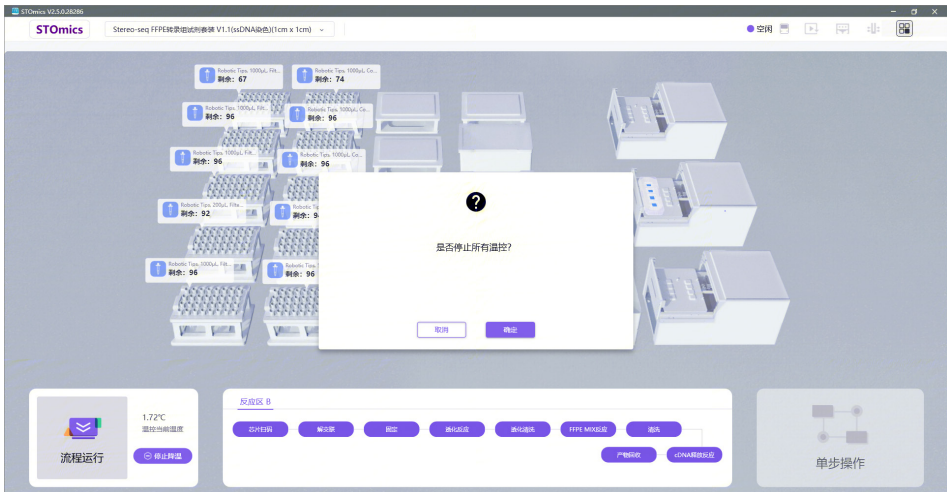


图 3-35 STOmics 软件流程结束界面

cDNA 产物回收孔位说明：

96 孔深孔板第 2 至 3 列分别对应模块 B 至 C，各列 A、B、C、D 行依次对应 I 区近手柄 2 号位、I 区远手柄 4 号位、II 区近手柄 2 号位、II 区远手柄 4 号位。若仅使用单一放置区（I 区或 II 区），所有产物按 2 号位、4 号位的先后顺序统一回收至对应列的 A、B 两孔，不留空跨行。示意图如图 3-36 & 图 3-37。

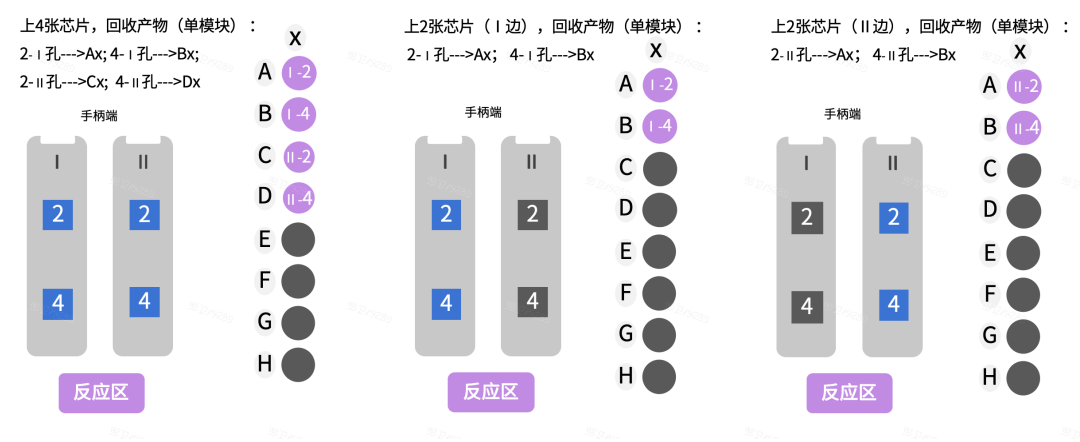


图 3-36 单模块 cDNA 产物存放于深孔板的位置

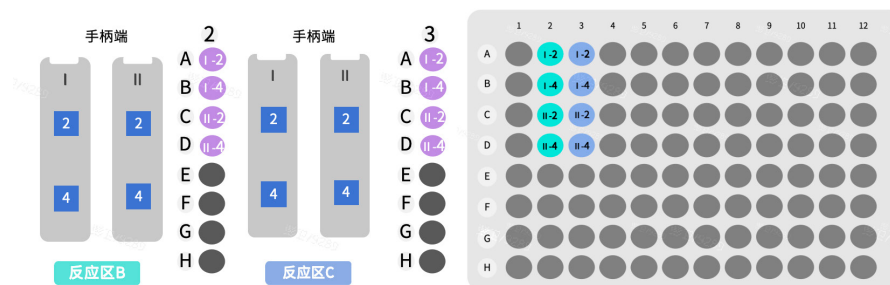


图 3-37 多模块 cDNA 产物存放于深孔板的位置

- b. 参考图 3-38 示意的步骤，将 cDNA 产物从深孔板的孔中转移至新的 1.5 mL 离心管中，在管盖上记录好相关样本信息及 cDNA 回收量。



图 3-38 深孔板取出示意图

回收注意事项（重要）：从深孔板回收至 1.5 mL 离心管时，请严格按照以下步骤：

- 1) 因深孔板中的产物可能挂壁在孔位内壁，请先使用 10 μ L 移液枪（调整到 10 μ L 液量），配合 10 μ L 枪头，对内壁产物进行回收；
- 2) 然后使用 1000 μ L 的移液枪（调整到 480 μ L 液量），配合 1000 μ L 枪头，进行底部产物回收；
- 3) 最后再次使用 1) 方式，对孔内底部产物进行多次回收，直至深孔板中所有产物被回收。

二．试剂回收及关闭所有温控：

- a. 取出剩余试剂。若单个反应模块仅使用了两个芯片的反应量，需要回收剩余试剂，请使用新的 0.5 mL 试剂管盖（MGI, Cat. No. 1000000981）和新的 5 mL 试剂管的管盖，将对应容量的试剂密封盖好，避免污染；随后立即将剩余试剂装回试剂盒套装内，放置 -20 $^{\circ}$ C 保存。



温控提示的弹窗出现时或点击“取消”按钮后（图 3-35），低温试剂区仍会保持在 4 $^{\circ}$ C 及以下，请本阶段及时回收剩余试剂；待试剂以及 cDNA 回收完成后，再停止所有温控。

- b. 确定试剂已回收后，点击图 3-35 的“确定”即结束全流程，此时低温试剂区的温控停止，温度逐渐恢复至室温。

3.6.10. 设备机舱清洁

- a. 流程结束后，请清空台面实验剩余的试剂耗材等；使用无尘布擦拭低温试剂区模块底部的冷凝水（如有），并用 75% 乙醇擦拭 3 个反应区热盖，具体操作见图 3-39 到图 3-45；

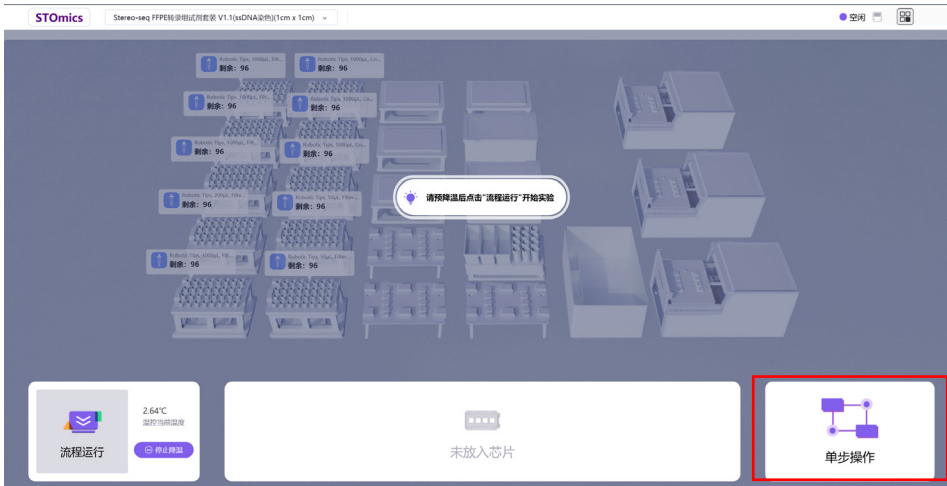


图 3-39 点击界面右下角“单步操作”



图 3-40 依次选择 A、B、C 模块的温控热盖，点击“关门”，使热盖弹出



图 3-41 双手按压两侧的卡扣，打开热盖

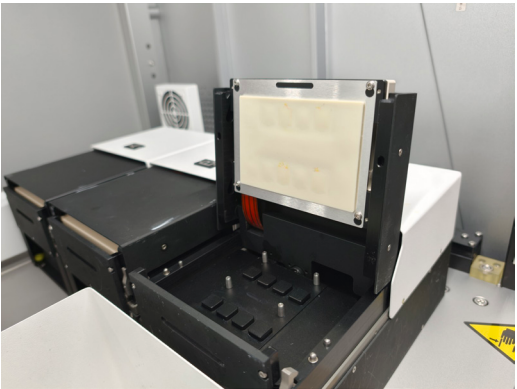


图 3-42 热盖打开

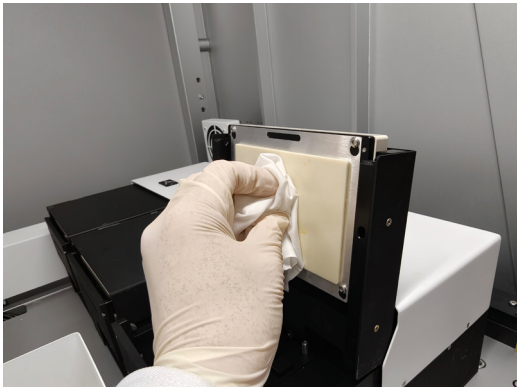


图 3-43 用喷洒 75% 乙醇的无尘布擦拭热盖



图 3-44 双手按压两侧卡扣，关闭热盖



图 3-45 缩回反应热盖，保持“开门”状态 (需依次操作 3 个反应模块的热盖)



⚠ 下轮实验开始前，需确认 3 个反应模块的热盖是处在“开门”状态（即反应热盖缩回）。若处在“关门”状态（即反应热盖伸出），夹爪转移载具的时候会撞到热盖，导致实验失败。

b. （可选）推荐每天实验完成后，开启设备自带的清洁功能，进行紫外消毒。开启消毒步骤如图 3-46，消毒流程时长为 30 min；



图 3-46 STOmics 软件进行紫外消毒的步骤示意图

⚠ 开启紫外消毒时，请确保全程周围没有人，并避免直视灯光；同时，需确认 3 个反应模块的热盖是处在“开门”状态（即反应热盖缩回）。

c. 消毒结束后，收拾好机舱内的所有试剂物料耗材后，关闭 Go Spatial 主机、电控箱、接通外置扫码器、电脑主机与显示器的电源。

3.7. cDNA 纯化与扩增

试剂	准备方法	暂存条件
☐ 磁珠	提前取出，42°C放置 30 min 平衡	室温 12 hr
☐ 80% 乙醇	使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇	-
☐ NF-H ₂ O	直接取用	-
☐ TE Buffer pH8.0	直接取用	室温

背景信息

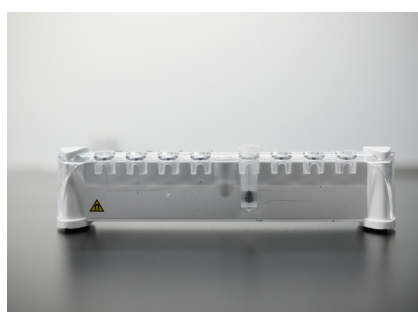
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

- 提前 **30 min** 从 4°C取出，涡旋混匀且在 42°C平衡 **30 min**，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。



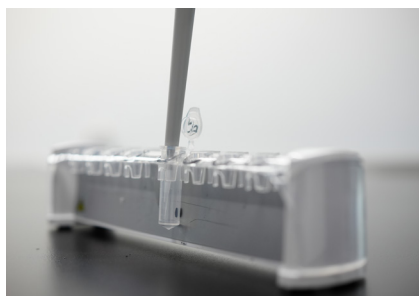
- 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留 2-3 μ L 液体，以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。



- 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。



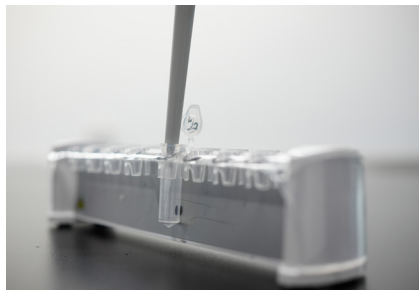
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。



- 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 pH8.0 或 Nuclease-Free Water 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 pH8.0 或 Nuclease-Free Water 的体积少 $\sim 2\ \mu\text{L}$ 。



- 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。



3.7.1. cDNA 纯化

- a. 提前取出磁珠，42°C平衡 **30 min**；
- b. 1.0X 磁珠 cDNA 纯化步骤；
 - 1) 将从深孔板取出的回收液与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合，振荡混匀，42°C 孵育 **10 min**；
 - 2) 瞬时离心后，将离心管放在磁力架上静置 **3 min**，至液体澄清；
 - 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 1.5 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，再次旋转离心管，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；
 - 5) 重复一次步骤 **4)** ；
 - 6) 将离心管保持在磁力架上，室温风干 **5-15 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
 - 7) 加 **44 µL** NF-H₂O 回溶，振荡混匀后 42°C 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（~**42 µL** cDNA）转移至新的 0.2 mL PCR 管中。

... 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）。

3.7.2. cDNA 扩增

- a. 按照表格 3-6 配制 PCR Mix，共 100 μL ；

表格 3-6 PCR Mix

试剂	1X	2X+10% (μL)	4X+10% (μL)
4X cDNA PCR Mix (1000047916)	25	55	110
cDNA Primer (1000047917)	8	17.6	35.2
NF-H ₂ O	25	55	110
Total	58	127.6	255.2

- b. 将 PCR Mix 按照 **58 μL / 芯片** 加入到上一步回收的 **42 μL** 产物中，振荡混匀；
c. 瞬时离心，按照表格 3-7 PCR 程序进行扩增；

表格 3-7 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	20
58°C	20 s	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
12°C	∞	-

- d. 按照表格 3-8 准备 Qubit dsDNA HS Kit ；

表格 3-8 Qubit dsDNA HS Kit

组分	1X μL)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	199
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1
Total	200

- e. 配制完成后，振荡混匀，取 199 μL 至新的检测管（Qubit dsDNA HS Assay Kit 配套检测管）；
f. 将 PCR 产物振荡混匀，取 1 μL 加入 199 μL Qubit dsDNA HS Kit 混匀，检测浓度并记录；

 DNA 浓度通常高于 10 ng/ μL 。



g. 对 PCR 产物进行 1.0X 磁珠纯化：

- 1) 将 PCR 产物 (100 μ L) 与室温平衡好的磁珠按照 1 : 1 混合，振荡混匀，42°C 孵育 **10 min**；
- 2) 瞬时离心后，将 PCR 管放在磁力架上静置 **3 min**；
- 3) 待液体澄清后去除上清；
- 4) 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 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。

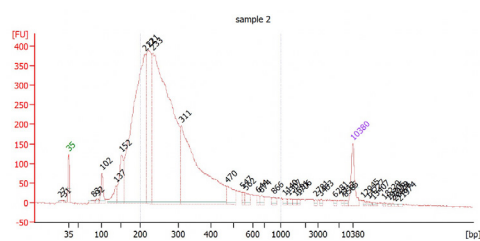
- 5) 重复一次步骤 4) ；
- 6) 将离心管保持在磁力架上，打开盖子，室温风干 **5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- 7) 加 **42 μ L** 的 TE Buffer pH8.0 回溶，振荡混匀后 42°C 静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清 (~40 μ L) 转移到新的 1.5 mL 离心管中。

h. 取 1 μ L cDNA 样品，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录；

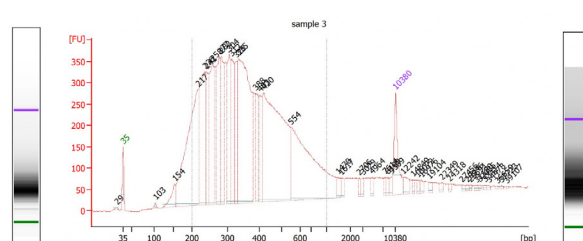
i. 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 cDNA 片段分布进行检测。

QC cDNA 纯化产物片段分布主峰一般在 150-350 bp（如图一），纯化后产量通常大于 300 ng。

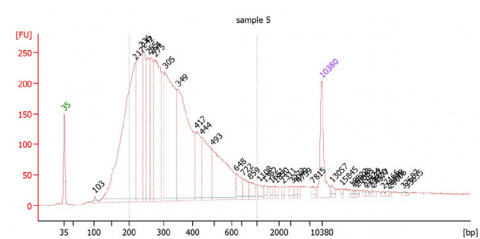
例 1：RNA 的 DV200 < 30% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



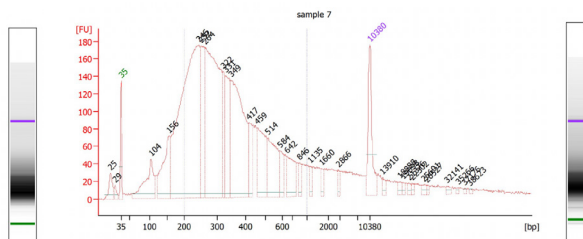
例 2：RNA 的 DV200 在 30%-50% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



例 3：RNA 的 DV200 在 50%-70% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



例 4：RNA 的 DV200 > 70% 对应的 cDNA 纯化产物片段分布



图一 . cDNA 纯化产物片段分布图

— cDNA 纯化产物可在 -20°C 下保存 1 个月。

⊙ 后续文库构建具体操作参考《时空转录组 FFPE V1.1 建库实验操作说明书》。

⋯ 《Go Spatial 时空转录组 FFPE V1.1 转录组实验操作说明书》只能搭配《时空转录组 FFPE V1.1 建库实验操作说明书》

附录 A 同一试剂盒“2+2”模式上机实验操作指引

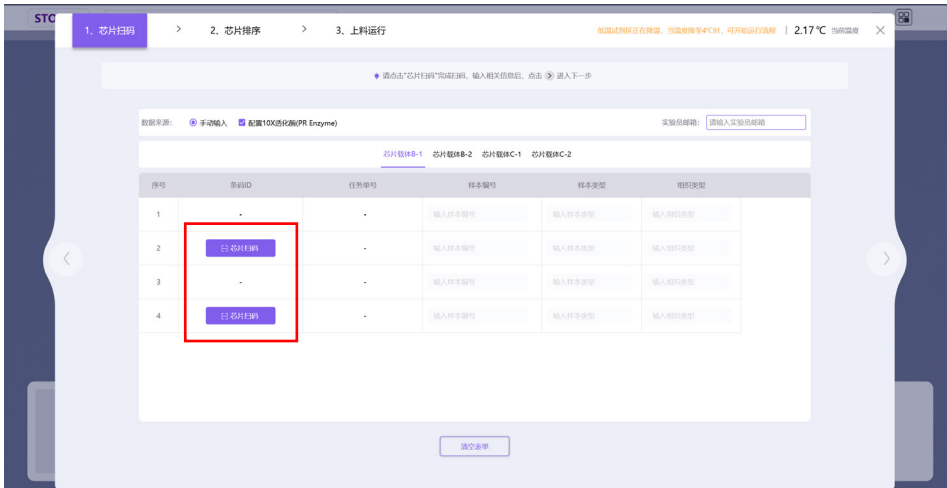
“2+2”模式上机：使用同一试剂盒，进行两次独立上样方式说明（以在 B 模块上样为例）：

Go Spatial-V2-24 适配 Stereo-seq FFPE V1.1 试剂套装的装量，支持进行 2 次独立实验（不同时间），每次实验上样 1 张玻片（含 2 张芯片）。



A.1：第一次上料操作

- a. 仪器准备及耗材放置以及试剂放置配制流程按照 3.6.2 至 3.6.4 章节进行常规操作。
- b. “芯片信息输入”仅输入一张玻片上 2 张芯片的信息（红色框标注）。其余按照 3.6.3 章节进行常规操作。



附图 A-1B 模块上料信息录入界面示意图



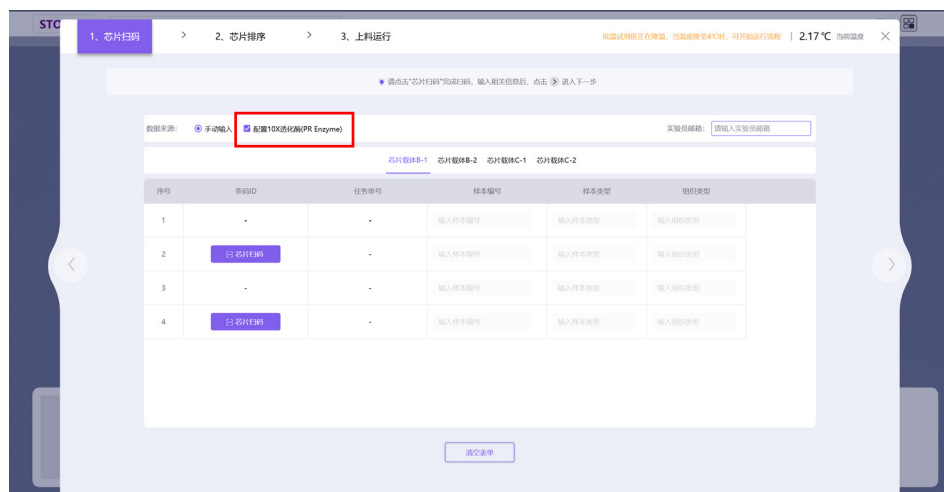
 上机完成后注意回收低温试剂区剩余试剂，按照表格 A-1 提示使用新的管盖盖好后储存在 -20℃。

表格 A-1 Stereo-seq FFPE 转录组试剂盒套装 V1.1 中的试剂回收后的保存方式

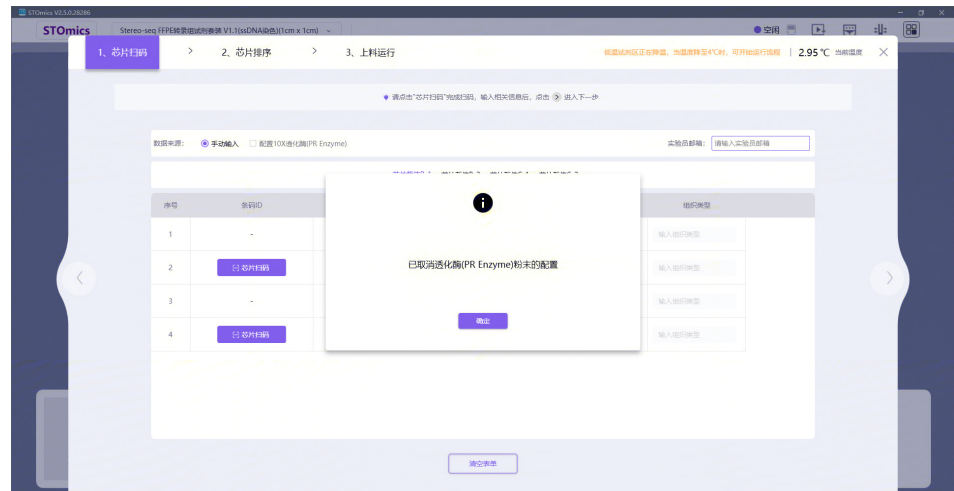
孔位编号 * 台面代号	试剂名称	回收细节
A1	PRE	使用新的 0.5 mL 试管管盖 (MGI, Cat. No. 1000000981) 密封好试剂后, -20°C 保存
B1	RTO	
C1	Plus	
D1	RTE	
E1	EA	
F1	RI	
J1	RT Buffer Mix	使用新的 5mL 试剂管的管盖密封好试剂后, -20°C 保存
L1	Decross Reagent	
M1	Elute Buffer	

A.2 第二次上样操作

- 试剂准备：将第一次上机回收并在 -20°C 保存的试剂提前解冻，上机前试剂进行瞬时离心。自配试剂按照 3.6.3 章节进行准备。
- 流程准备，耗材和试剂的放置，流程运行按照 3.6.2-3.6.4 章节操作。
- 信息录入：点击流程运行后，将进入“芯片扫码”界面。参考图 A-2 和图 A-3，点击取消软件界面“配制 10X 透化酶 (PR Enzyme)”前的勾选项；跳出弹框“已取消透化酶 (PR Enzyme) 粉末的配置”，点击“确认”。软件会取消 10X 透化酶粉末的配制步骤。



附图 A-2 B 模块信息录入界面，点选取消透化酶配制选项



附图 A-3 取消透化酶配制确认界面图

- d. 后续步骤参考 3.6.3 章节 继续进入到芯片信息录入，信息确认，安装载具，放置载具，确认运行过程中。

附录 B Stereo-seq FFPE 转录组 V1.1 for Go Spatial 吸头使用数量参考

表格 B-1 列出了 Go Spatial 运行时所需的各类枪头数量。吸头消耗量因芯片数及使用模块数而异，表中数据为各芯片数量下吸头消耗最多的场景所对应的值。

表格 B-1* Stereo-seq FFPE 转录组 V1.1 for Go Spatial 吸头使用参考表

芯片数量	1000 μ L 透明枪头	1000 μ L 黑色斜口枪头	200 μ L 枪头	50 μ L 枪头
2	29	22	4	2
4 (2+2)	57	44	8	4
6	71	62	9	3
8	85	80	10	2



* 本文档基于 STOmics 软件 V2.5.0.25398 版本的流程进行统计，不同版本的流程所需的吸头数可能存在差异，建议预留余量，防止因吸头不足造成实验失败。