

Stereo-seq转录组试剂套装 for Go Spatial使用说明书



货号：401SP118

试剂盒版本号：V1.1

文档编号：STOG04002

说明书版本号：A

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V1.1
修订日期：2024年6月
修订内容摘要：首次发布

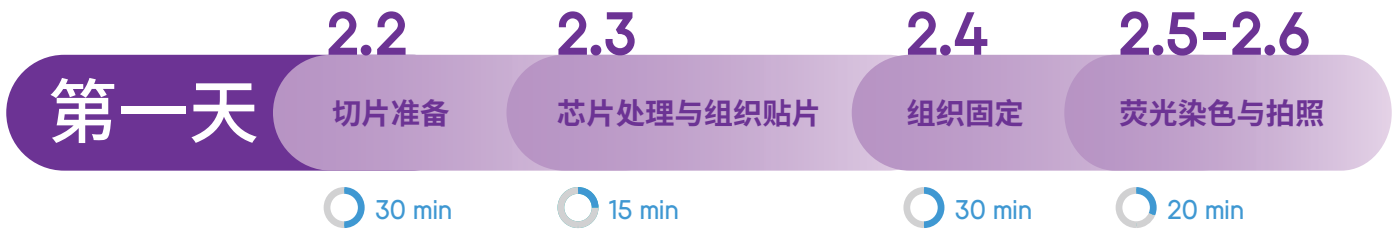
提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒配套使用。

© 法律声明。

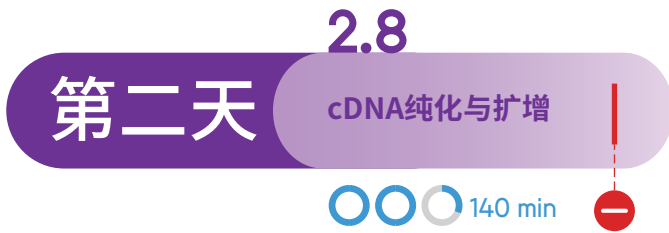
2024 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

- 本产品仅用于研究，不用于诊断。
- 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。
- 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）。
- 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



2.7 Go Spatial流程运行



总耗时: ~ 1.5 天

目录

第一章 产品介绍

1.1 产品描述	2
1.2 试剂套装组成	2
1.3 需自备物料清单	5
1.4 注意事项	7

第二章 STOmics Stereo-seq 转录组试剂套装for Go Spatial标准操作流程

2.1 实验前准备	9
2.2 切片准备	10
2.3 芯片处理与组织贴片	10
2.4 组织固定	11
2.5 荧光染色	12
2.6 荧光拍照	13
2.7 Go Spatial 流程运行	14
2.8 cDNA纯化与扩增	26



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。



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：您可以在此暂停实验并存储样品。

01

产品介绍



1.1. 产品描述

STOmics Stereo-seq 转录组试剂套装 for Go Spatial (时空自动化样本处理系统) 是用于构建组织切片全转录本 3' 端文库的试剂套装, 适配时空自动化样本处理系统 Go Spatial, 可实现高效率、高操作一致性的时空实验, 最高通量可达 24 张芯片 / 天。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。Stereo-seq 芯片 T (时空 poly-T 芯片) 上载有核苷酸捕获探针, 与组织切片结合后通过探针原位抓取组织内的 mRNA 分子并进行 cDNA 合成。研究人员通过 DNBSEQ 测序和 STOmics 配套的可视化分析工具, 可获取特定样本超高分辨率下的空间转录组信息。

本试剂套装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性能的稳定性和重复性。

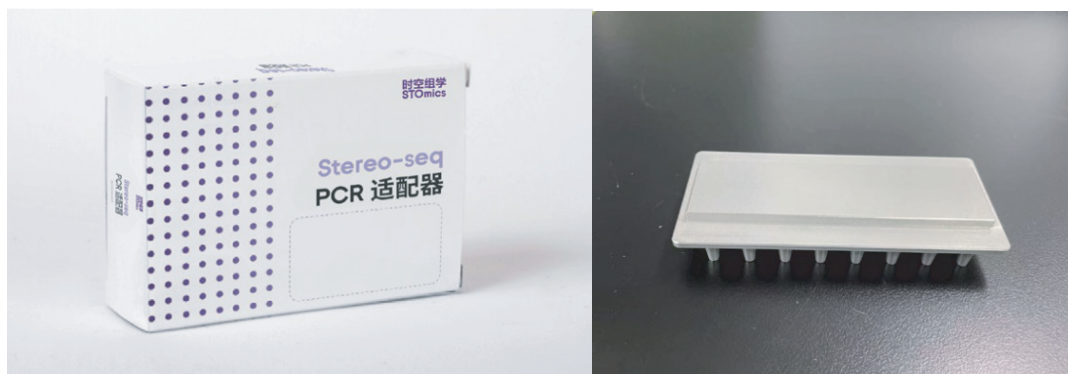
1.2. 试剂套装组成

每个试剂套装由以下两个部分组成:

- Stereo-seq 转录组试剂盒 T for Go Spatial * 1 (8 RXN)
- Stereo-seq 芯片 T (1 cm*1 cm) *2 (4 EA)

辅助性耗材:

- (需单独订购) Stereo-seq PCR 适配器 *1 (2 EA)



- (需单独订购) Go Spatial 配套耗材

关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 至 1-3。

收到 Stereo-seq 芯片后, 请参照《Stereo-seq 芯片移取保存操作指南 for Go Spatial》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 1-1

Stereo-seq转录组试剂盒for Go Spatial		货号：401KP118	
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg × 1
RT Additive	1000039982	○ 透明	182 μL × 1
RI	1000028499	● 橙色	300 μL × 1
NRT Reagent	1000039983	○ 透明	2912 μL × 1
NRT Oligo	1000039984	○ 透明	3 OD × 1
ReverseT Enzyme	1000039985	○ 透明	182 μL × 1
cDNA Release Enzyme	1000039986	● 黑色	182 μL × 1
TR Buffer	1000039987	○ 透明	3458 μL × 1
cDNA Release Buffer	1000045419	○ 透明	3500 μL × 1
cDNA Primer	1000039989	● 蓝色	72 μL × 1
cDNA Amplification Mix	1000040200	● 蓝色	440 μL × 1
Glycerol	1000031615	● 紫色	50 μL × 1
5 mL 试剂管 (空)	/	○ 白色	4 个
0.5 mL 试剂管 (空)	/	○ 白色	1 个
🔒 储存温度：-25°C~ -18°C		❄️ 冷链运输	🕒 有效期：见标签

表格 1-2

组分信息	货号	规格及数量
Stereo-seq 芯片 T (1 cm * 1 cm)	100CT114	4 EA*2
🔒 储存温度：-25°C~ 8°C		❄️ 冷链运输
		🕒 有效期：见标签

表格 1-3

Stereo-seq PCR 适配器 (需单独订购) 货号: 301AUX001		
组分信息	货号	规格及数量
Stereo-seq PCR 适配器	/	2 EA
 储存温度: 常温	 常温运输	 有效期: 见标签
Go Spatial配套耗材 ¹ (需单独订购)		
组分信息	货号	规格及数量
1.3mL 深孔板	1000004644	2 个 / 包
100 mL 试剂槽	012-000779-00	50 个 / 盒
50 mL 试剂槽	012-000780-00	50 个 / 盒
1000 μ L 透明吸头	1000023970	96 支 / 架, 16 架 / 箱
1000 μ L 黑色斜口吸头	091-000223-00	96 支 / 架, 40 架 / 箱
200 μ L 透明吸头	091-000158-00	96 支 / 架, 24 架 / 箱
50 μ L 透明吸头	091-000159-00	96 支 / 架, 24 架 / 箱
芯片容器	012-001131-00	1 个 / 袋
5 mL 试剂管	1000002452	1000 个 / 箱
0.5 mL 管盖	1000000981	500 个 / 包
0.5 mL 试剂管	1000005567	100 个 / 包
PCR 密封胶垫 ²	1000001526	10 个 / 袋
 储存温度: 常温	 常温运输	 有效期: 见标签



1. 本部分所有耗材为 Go Spatial 配套耗材, 需联系华大销售代表采购, 不建议替换为其他耗材; 所有耗材请注意密封保存, 拿取试剂管后请及时密封自封袋, 枪头使用后请放回原枪头盒;
2. PCR 密封胶垫为可多次使用的耗材, 使用寿命为 3 个月, 请注意按时更换。

1.3.需自备物料清单

此清单列出了本实验所需的设备和物料。表格 1-4 不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱等。关于显微镜的要求，请参考《STOmicS 显微镜评估参考手册》。

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

表格 1-4 客户自备物料清单推荐

仪器		
品牌	描述	产品编号
/	冰冻切片机	/
/	荧光显微镜（拼接功能）	/
/	小型离心机	/
/	移液器	/
/	漩涡混匀仪	/
/	pH 计	/
/	（可选）烤片机	/
*Bio-Rad	T100™ PCR 仪	1861096
*ABI	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636
/	恒温箱	/
NEB	NEBNext® Magnetic Separation Rack	S1515S
Thermo Fisher	DynaMag-2 磁力架	12321D
	Qubit® 3.0 荧光定量仪	Q33216（或同等功能仪器）
Agilent	Agilent 2100 Bioanalyzer	G2939AA（或同等功能仪器）



可从所列品牌中任选一个（带 * 标记），直接使用可进行 PCR 反应，搭配 PCR 适配器使用可用于烤片。如单次处理的芯片较多，也可选择使用烤片机烤片。

试剂		
品牌	描述	产品编号
/	甘油（100%）	/
/	Nuclease Free Water	/
Ambion	1 × TE buffer, pH 8.0	AM9937
	20 × SSC	AM9858
	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	AM9770
*Agencourt	AMPure® XP	A63882

品牌	描述	产品编号
*Beckman Coulter	SPRIselect	B23317/B23318/B23319
*VAZYME	VAHTSTM DNA Clean Beads	N411-02
Sigma Aldrich	甲醇 (SIGMA, 34860-1L-R)	34860-1L-R
	盐酸	2104-50ML
SAKURA	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	AM9770
Invitrogen	Qubit ssDNA Assay Kit	Q10212
	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854
Agilent	安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒	5067-4626
	安捷伦高灵敏度 RNA 分析试剂盒	5067-1513



从带 * 号品牌中任选其一。

耗材

品牌	描述	产品编号
/	金属包埋盒	/
/	锡箔纸	/
/	镊子	/
/	载玻片 (尺寸: 25×75 mm)	/
/	盖玻片 (尺寸: 18 × 18mm, 厚度: 0.13-0.16mm)	/
CORNING	Corning® 35mm 培养皿	353001
	24 孔细胞培养板	3524
	15 mL 离心管	430791
	50 mL 离心管	430829
Kimtech	Kimwipes 无尘纸	34155
MATIN	Power Dust remover (空气罐)	M-6318
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	10 μL 带滤芯吸头	TF-10-L-R-S
	100 μL 带滤芯吸头	TF-100-L-R-S
	200 μL 带滤芯吸头	TF-200-L-R-S
	1,000 μL 带滤芯吸头	TF-1000-L-R-S

品牌	描述	产品编号
	96 孔板 ¹	PCR-96M2-HS
Axygen	0.2 mL PCR 管 ¹	PCR-02-C
	0.5 mL 透明薄壁管 ²	PCR-05
Invitrogen	Qubit Assay Tubes ²	Q32856
PARAFILM	封口膜	PM996
BIOSHARP	金属块	BC032



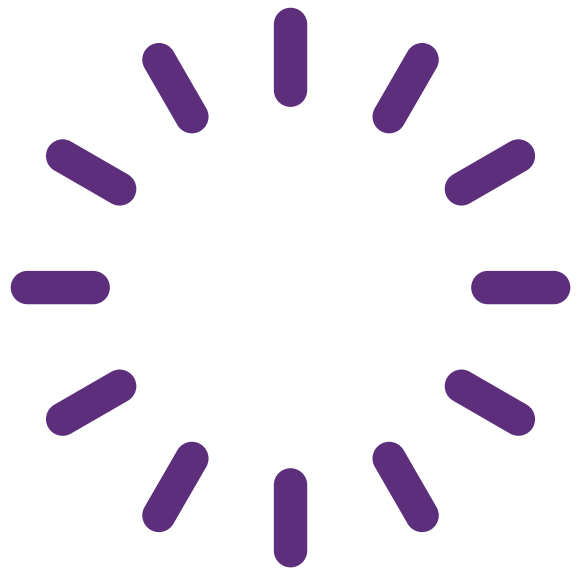
1. 可根据需求选择 96 孔板或 0.2 mL PCR 管进行 cDNA 扩增、纯化及文库构建的反应；
2. Axygen 的 0.5 mL 透明薄壁管和 Invitrogen 的 Qubit Assay Tubes 均可用作 Qubit 浓度检测时的容器，选择其一即可。

1.4.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。
- 推荐把 PCR 仪或烤片机温度预热至烤片温度 37°C。
- 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。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

02

STOmics Stereo-seq 转录组试剂套装 for Go Spatial 标准操作流程



2.1.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	准备流程	暂存温度
5X SSC	取20X SSC 5 mL 稀释到20 mL	室温
0.1X SSC	取20X SSC 250 μ L 稀释到50 mL，上机前装在一个干净的50 mL试剂槽中	室温
Wash Buffer	取5 μ L RI 加入 95 μ L 0.1X SSC中，用量至少为100 μ L/芯片	冰上备用
0.01N HCl	按照 HCL 浓度梯度稀释到 0.01N, pH 值准确到 2.0 (确保 pH 值在 1.9 - 2.1 范围内；至少 4.5 mL/8 芯片)，上机前分装到试剂盒配套的一个 5 mL 空管中	室温48h
0.01N HCl (pH=2.0) 需现配现用。对于预制的0.1N HCl 和新购买的HCl，实验前请检查pH值。 储存时间超过48 hr 将影响预期pH 值，请在配制后48 hr 内使用。		
NRT Oligo	全速离心，加入 240 μ L TE buffer 重悬，盖紧盖子后最大速度涡旋 15 s，然后再全速离心。上机前按芯片量转移至试剂盒配套的 0.5 mL 空管“D”中。举例，若一板芯片容器放置 4 张芯片，则只需转移 120 μ L 溶液至 0.5 mL 空管中。	冰上备用
*1X透化试剂工作液	用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液按照 1200 μ L + 400 μ L \times n (n 为芯片数量) 的用量，稀释为 1X 透化试剂工作液，上机前分装到一个干净的 5 mL 空管中	冰上备用6 h
*如使用新开封的试剂，请忽略此步骤，仅需按照表格2-2将PR Enzyme干粉放置到正确位置，Go Spatial会自动配置1X透化试剂工作液，如为二次使用，请按照以上步骤手动配置		
Glycerol	使用前，至少提前5 min取出，平衡至室温	室温
第二天		
准备试剂	准备流程	保存条件
80%乙醇	取无水乙醇稀释到80%	室温1天
磁珠	提前取出，室温放置30 min平衡	4 $^{\circ}$ C
准备仪器	设定	备注
PCR仪/烤片机	* 将PCR适配器放置在PCR仪上，并将PCR仪设置为37 $^{\circ}$ C； * 将烤片机设置为37 $^{\circ}$ C。 (*以上步骤选择其一即可)	检查仪器是否有异常，必要时更换
恒温箱	设置为 55 $^{\circ}$ C，用于孵育试剂	
荧光显微镜	FITC 通道	

2.2.切片准备



- a. 请按照 2.1 章节【实验前准备】，将 PCR 仪或烤片机设置为 37°C 烤片温度；
- b. 冷冻切片机箱体预冷至 -20°C，样本头预冷至 -10°C~-15°C（根据实际操作过程调整）；
样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。
- c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；
- d. 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 30 min；
- e. 将组织块修剪成合适的尺寸（切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- f. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- g. 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。

2.3.芯片处理与组织贴片

- a. 准备培养皿作为转移芯片的容器，底部覆盖大小合适的封口膜，用镊子钝头轻压膜的四周，使其平整固定于培养皿底部，后期操作中将芯片置于膜上，防止芯片滑动；



- b. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出芯片盒，并用镊子的末端左右撬动 Stereo-seq 芯片 T，使芯片与芯片盒分离，并用镊子夹入制备好的培养皿中，记录芯片背面的编号；注意不要触碰芯片正面；



芯片夹取的详细方法请参照《Stereo-seq 芯片移取保存操作指南 for Go Spatial》。
<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

- c. (可选) 若观察到芯片表面有杂质，可待芯片复温后，可用气瓶轻轻吹干芯片四周及表面至无明显痕迹或液体残留后，即可准备贴片；亦可将芯片放置于一个底部带有封口膜的培养皿中，滴加 100 μL Nuclease Free Water 清洗芯片表面 2 次，清洗后再用气瓶轻轻吹干芯片四周及表面至无明显痕迹或液体残留，即可准备贴片；
- d. 预冷甲醇：在 24 孔板中加入甲醇（用量为 1 mL/ 芯片 / 孔），置于 -20°C 预冷，请确保甲醇提前预冷 5-30 min，并确保 24 孔板盖子盖严，减少甲醇挥发；
- e. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- f. 组织贴片有两种操作方式可选：热贴 (A) 和冷贴 (B)；

A. 热贴

1. 切片后，将冷冻切片移到切片台右侧靠近边缘处，用细毛刷将冷冻切片轻轻展开铺平整
2. 用镊子夹住芯片的一角，将其翻转，使芯片正面朝下，尽量使芯片中央对准贴片；轻轻一压，肉眼可见切片已经吸附到芯片表面；再次翻转芯片，使其正面朝上，快速置于 37°C 下烤片 **3 min**。

B. 冷贴

1. 将芯片正面朝上置于切片机中，预冷 **0.5-6 min**；

 **预冷时间不可过长，以免芯片表面产生水雾；预冷时间不可太短，以免芯片无法达到预冷温度。**

2. 切片后，将冷冻切片小心覆盖在芯片正中央，尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，没有褶皱。用指腹加温芯片反面，使切片更好地贴在芯片上；
3. 快速置于 37°C 下烤片 **3 min**。

2.4.组织固定

a. 若在切片当天即使用 Go Spatial 进行后续实验，可按照【A. 切片当天上机】操作，若需提升通量，可冻存芯片后统一上机，请按照【B. 芯片冻存后上机】操作：

A. 切片当天上机；

1. 用镊子将上一步烤干的芯片立即置于-20°C下预冷的甲醇中固定 **30 min**；
2. 在甲醇固定时，请根据表格 2-1 配置组织荧光染色液，并根据 2.7 章节【上机前准备】进行 Go Spatial 流程准备操作。

B. 芯片冻存后上机；

1. 用镊子将上一步烤干的芯片立即置于-20°C下预冷的甲醇中固定 **10 min**；
2. 待组织固定 **10 min** 结束后，将 24 孔板转移到通风橱中，用镊子将芯片从 24 孔板中取出，用无尘纸吸干芯片背面和周围多余的甲醇，将芯片放在底部贴有封口膜的培养皿中，无需盖上盖子，放置在通风柜中 **2-3 min**，让甲醇充分挥发，直至肉眼可见组织变白，将培养皿转移至实验桌上；
3. 确认无甲醇残留后，将芯片转移至一个干净且贴有封口膜的 3.5 cm 培养皿中，加入 8 μL 的 Glycerol 甘油至芯片表面，待甘油浸润整张芯片后，盖上盖玻片；
4. 盖上容器盖后用封口膜密封，放进-80°C冰箱中冻存，最长可保存一周；

 **停止点：您可以在此暂停实验并储存样品。**

5. 上机当天，先在 24 孔板中加入甲醇（用量为 1 mL/ 芯片 / 孔），置于-20°C 预冷 **5-30 min**；
6. 将装有芯片的培养皿从-80°C 冰箱中取出，撕开封口膜，将盖子打开，常温放置 **3 min** 等待复温；
7. 将覆盖着盖玻片的芯片从培养皿中取出，一只手固定住盖玻片，另一只手用镊子将芯

片平行推至盖玻片边缘，并夹住芯片无组织覆盖的一角，轻轻地平行移动芯片，直到芯片与盖玻片完全分离；

8. 将芯片正面朝上放入 -20°C 预冷的甲醇溶液中固定 **30 min**；

9. 在甲醇固定时，请根据表格 2-1 配置组织荧光染色液，并根据 2.7 章节【上机前准备】进行 Go Spatial 流程准备操作。

b. 甲醇固定结束后，将 24 孔板转移到通风橱中；

c. 用镊子将芯片从 24 孔板中取出，用无尘纸吸干芯片背面和周围多余的甲醇；

d. 将芯片放在底部贴有封口膜的培养皿中，无需盖上盖子，放置在通风柜中 **2-3 min**，让甲醇充分挥发，直至肉眼可见组织变白，将培养皿转移至实验桌上。

2.5. 荧光染色

a. 按照表格 2-1 配制组织荧光染色液；

表格 2-1 组织荧光染色液配制

组分	1X (μL)	4X + 10% (μL)	8X + 10% (μL)	24X + 10% (μL)
5 × SSC	94.5	415.8	831.6	2494.8
Qubit ssDNA Reagent	0.5	2.2	4.4	13.2
RI	5	22	44	132
Total	100	440	880	2640

b. 将组织荧光染色液加到芯片上，用量为 $100\ \mu\text{L}$ / 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**；

c. 染色结束前分别配制够量的 Wash Buffer（每张芯片需至少 $100\ \mu\text{L}$ ）；

d. 倾斜培养皿，用移液器从芯片一角吸去组织荧光染色液，尽量减少表面液体；

e. 向芯片滴 Wash Buffer，用量至少为 $100\ \mu\text{L}$ / 芯片；

f. 倾斜培养皿，用移液器从芯片一角吸弃 Wash Buffer，尽量减少表面液体；

g. 将芯片转移至无尘纸上，一只手用镊子固定芯片，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；

h. 在一张干净的载玻片上加一滴水 ($\sim 1\ \mu\text{L}$)，然后用镊子小心地将芯片移至载玻片上。水有助于芯片更好地粘在载玻片上；

i. 用移液器缓慢吸取 $5\ \mu\text{L}$ Glycerol 甘油滴加到组织中央，避免产生气泡；

j. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时夹住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，立即安排拍照，避免荧光猝灭。

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。



2.6. 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。

a. 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；

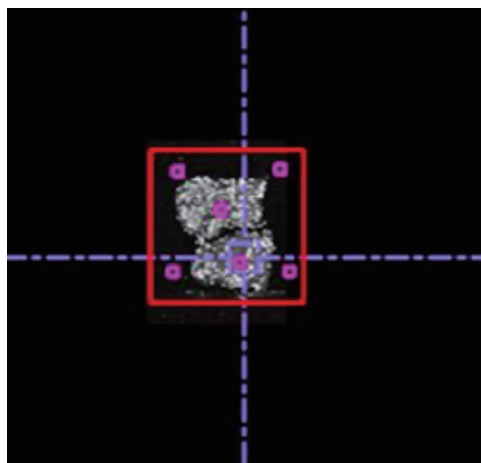


文件夹名称只使用字母、数字、下划线，禁止使用空格等特殊字符。
例：B00249A1

b. 使用荧光显微镜，选择落射荧光扫描模式，选择 FITC 通道，10 倍镜；

c. 框选视野：框选整张芯片，减少芯片外区域；

d. 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；



e. 最终成像：Track 线建模点完成后，将增益（Gain）调至最小，参考拍照注意事项确定最终拍照参数后开始成像，待成像完成，保存整个文件夹（原始 FOV 小图与拼接大图）；

f. 打开 StereoMap 软件的图像“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。

g. 提前准备：显微镜成像及图像 QC 期间，可按照 2.7 章节步骤（1）进行上机前准备。

2.7.Go Spatial流程运行

(1) 上机前准备;

- 仪器启动：开启所有硬件设施，包括：Go Spatial 主机、电控箱、电脑主机与显示器。等待 **1 min** 左右，以供硬件各部件之间连接通讯；
- 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 2-1 及图 2-2 所示；

使用之前请确保已安装 STOmics 软件 V1.4.0 版本或以上，如非此版本，请联系硬件工程师更新。

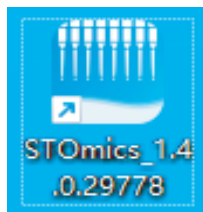


图 2-1 STOmics 软件图标

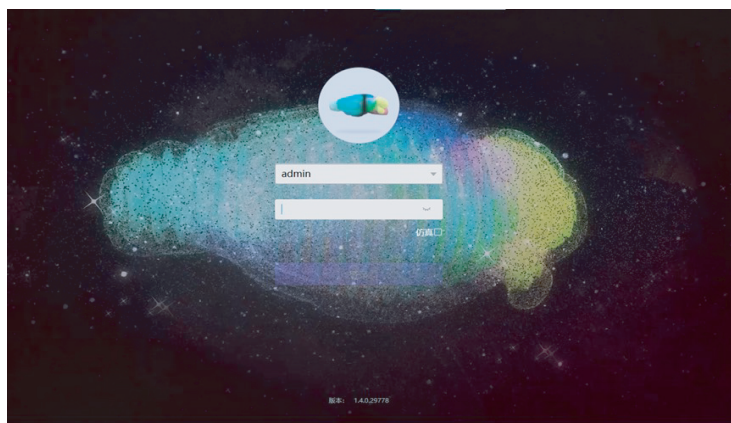


图 2-2 STOmics 软件登录界面

- 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 2-3 所示：

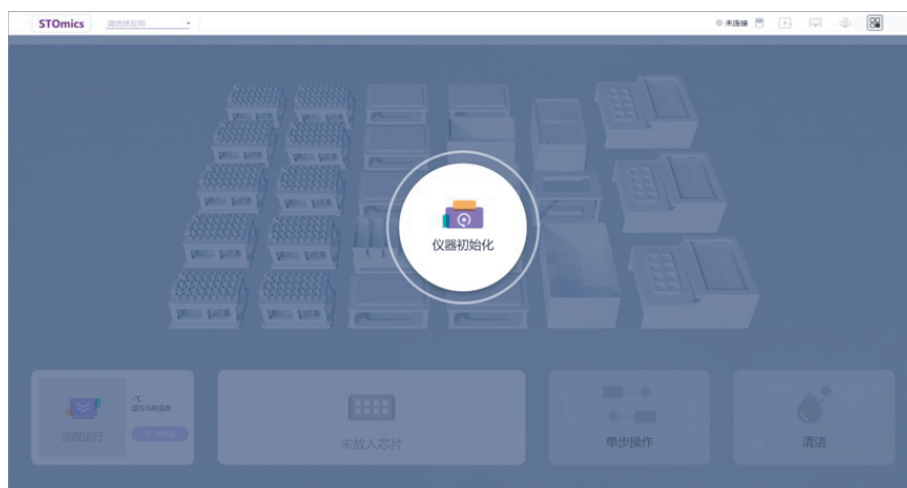


图 2-3 STOmics 软件仪器初始化界面

- 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 Permeabilization”透化流程。界面如图 2-4 所示：



图 2-4 STOmics 软件应用流程选择

- e. 仪器预降温：点击软件界面左下方的“预降温”，使低温试剂区温度降至 4°C，降温过程约 **15-20 min**；
- f. 枪头准备：按表格 2-2 计算好上机所需的每种枪头数量。确保枪头是按照“从上到下，从左到右”的顺序放置，然后放入对应规格的枪头盒；

表格 2-2 STOmics Stereo-seq for Go Spatial 转录组流程枪头使用明细表

芯片数量	1000 μL 透明枪头	1000 μL 黑色斜口枪头	200 μL 枪头	50 μL 枪头
1 张 / 芯片容器	11	7	1	5
2 张 / 芯片容器	14	14	1	5
3 张 / 芯片容器	17	21	6	/
4 张 / 芯片容器	20	28	6	/
5 张 / 芯片容器	23	35	7	/
6 张 / 芯片容器	26	42	7	/
7 张 / 芯片容器	29	49	7	/
8 张 / 芯片容器	32	56	7	/
8 张 / 芯片容器 *3	96	168	21	/



若一次运行涉及多板上样，需提前要把第 2、3 板芯片容器所需的枪头量备齐，以防使用过程中枪头数量不足导致流程中断。



举例：以 1000 μL 透明枪头的数量举例，若一次运行，第一板容器上机 4 张芯片，第二板容器上机 4 张芯片。根据表格 2-2 可得知，需要的 1000 μL 透明枪头数量为：20+20 = 40 支。

g. 耗材放置：准备完毕后，按照图 2-5 的 Go Spatial 台面模块示意图，将枪头及废液槽依次放入对应的舱内模块区。100 mL 试剂槽可作为废液槽；



图 2-5 STOmics 软件台面模块示意图

h. 试剂准备：按照表格 2-3 以及 2.1 章节【实验前准备】准备好所需试剂；

表格 2-3 STOmics Stereo-seq 转录组流程 for Go Spatial 试剂上机前准备对照表

试剂编号 ¹	代号	试剂名称	上机前准备 ²
A	PR Enz	PR Enzyme	干粉，离心后 4°C 暂存
B	RTA	RT Additive	室温解冻后离心
C	RI	RI	离心后 4°C 暂存
D	RTO	NRT Oligo	离心后，使用 240 µL TE buffer 溶解，转移至 0.5 mL 的空管 D ³
E	RTE	RT QC Enzyme	离心后 4°C 暂存
F	cRE	cDNA Release Enzyme	离心后 4°C 暂存
G	0.01N HCl	0.01N HCl	现配现用，并分装到 5 mL 空管中 ⁴
H	PR Mix	/	5 mL 空管 ⁵
I	RT Reagent	NRT Reagent	室温解冻并颠倒混匀 3 次以上
J	RT mix	/	5 mL 空管 ⁵

K	TR Buffer	TR Buffer	55°C恒温箱解冻后，至少颠倒混匀3次，常温放置
L	cR Buffer	cDNA Release Buffer	55°C恒温箱解冻后，至少颠倒混匀3次，常温放置
M	cR Mix	/	5 mL 空管 ⁵
2	0.1xSSC	0.1xSSC	转移至 50 mL 试剂槽，常温放置 ⁶



- 1.A-M 孔位 (见图 2-6 和 2-7) 每行有 3 列，每一列对应一板芯片容器。每多上机一板芯片容器，则需多上机一套试剂；
2. 如无特殊说明，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；
3. NRT Oligo 的溶解方法为：将 NRT Oligo 短暂离心，加入 240 μ L TE buffer 重悬，盖紧盖子后最大速度涡旋 15 s，然后短暂离心，随后按芯片量将试剂转移到试剂盒配套的 0.5 mL 空管 D 中待上机使用；
举例：若一板芯片容器放置 4 张芯片，则只需转移 120 μ L 溶液至 0.5 mL 空管中。若一板芯片容器放置 8 张芯片，则转移全部溶液至 0.5 mL 空管中，未使用的 NRT Oligo 溶液请于 -80°C 保存，请勿反复冻融。
- 4.G 孔位为 0.01N 盐酸，需要现用现配，保证 $\text{pH}=2\pm 0.1$ ；请按照 $1200\ \mu\text{L}+400\ \mu\text{L}\times n$ (n 为芯片数量) 的体积配置，并分装到一个试剂盒配套的 5 mL 空管中；
- 5.H、J、M 孔位为 5mL 空管，其作用为 Go Spatial 配制混合试剂时的容器；
6. 常温试剂区左侧中间编号为 2 的位置为 0.1XSSC，按照 2.1 章节【实验前准备】配置 50 mL 0.1XSSC，上机前转移至 50 mL 试剂槽中；



由于试剂冗余有限，为避免试剂分装带来的损耗，每套试剂仅支持对半分装一次，即单次上机的最小单位为 4 张芯片。

i. 试剂放置：将准备好的所有试剂，打开盖子，按照图 2-6 至 2-7 的示意图所示顺序放置好相应试剂。低温试剂（编号 A-J）需要在低温试剂区降至 4°C 后才可转移；



- 低温试剂区的 1-3 列和 4-6 列，以及常温试剂区的 4-6 列分别对应 1-3 板芯片容器，如需多板上样，请按需放置试剂。
- 若有试剂无法一次性用完，请务必将管盖保留，方便后续密封保存试剂。
- 请注意 A 管中配置的 10X 透化试剂储存液在 4°C 最多可存放 6h，需及时回收，回收及后续使用方法请见 2.7 章节步骤 (7) 【A 管透化酶保存及冻融使用】。

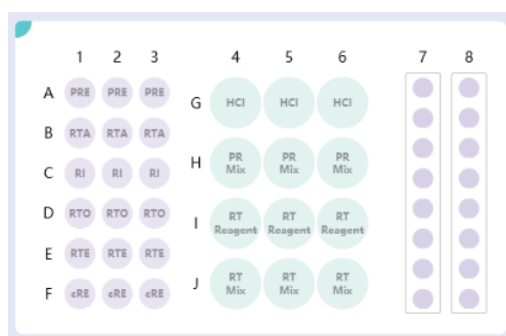


图 2-6 低温试剂台面放置示意图

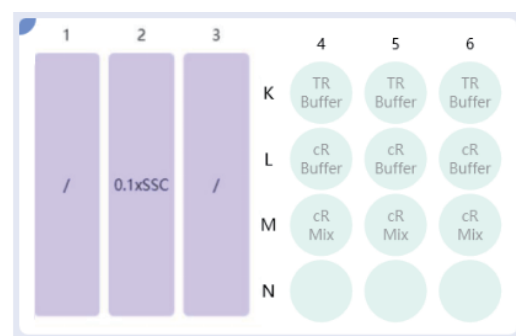


图 2-7 常温试剂台面放置示意图

j. 深孔板放置：每次实验前，先将深孔板区的固定框（图 2-8）取下，然后按照图 2-5 在深孔板区放置一个干净的深孔板，请按照 A1 号孔位（图 2-9）为最左上方的方向放置；

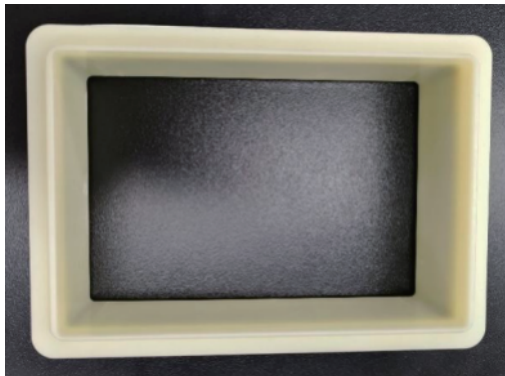


图 2-8 深孔板区的固定框

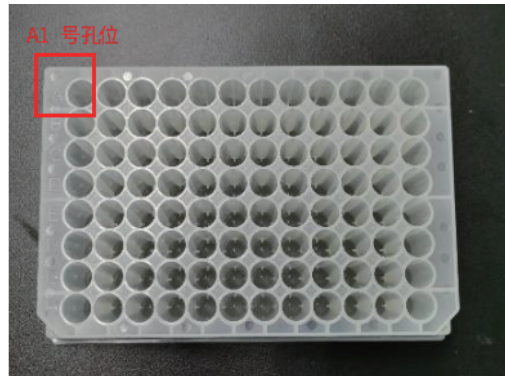
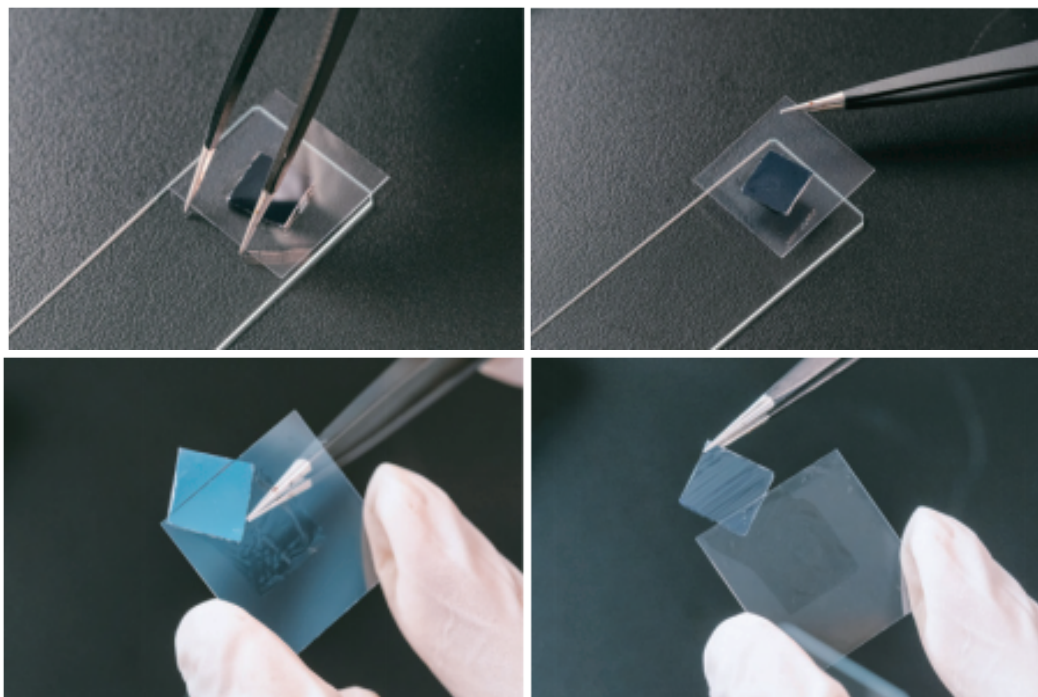


图 2-9 深孔板

k. 温控盖板放置：试剂和深孔板放置完毕后，请将白色的温控盖板盖上低温试剂区和深孔板区。

(2) 芯片放置

- 芯片放入仪器前，用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，夹起盖玻片一角，将其从载玻片上分离（芯片在盖玻片下方）；
- 用镊子轻轻地平行移动芯片，直到它稍微超出盖玻片边缘；
- 用镊子夹住芯片突出的一角，并慢慢地拉动芯片滑过盖玻片，直到芯片和盖玻片完全分离；



- c. 在干净的芯片容器单孔中央加 3 μ L 左右甘油，将芯片平放至芯片容器中央。请按照透化时间“由短至长”的顺序放置第 1-8 孔的芯片（细节请见（3）程序信息录入的步骤 b）。

(3) 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 2-10 的红框所示；

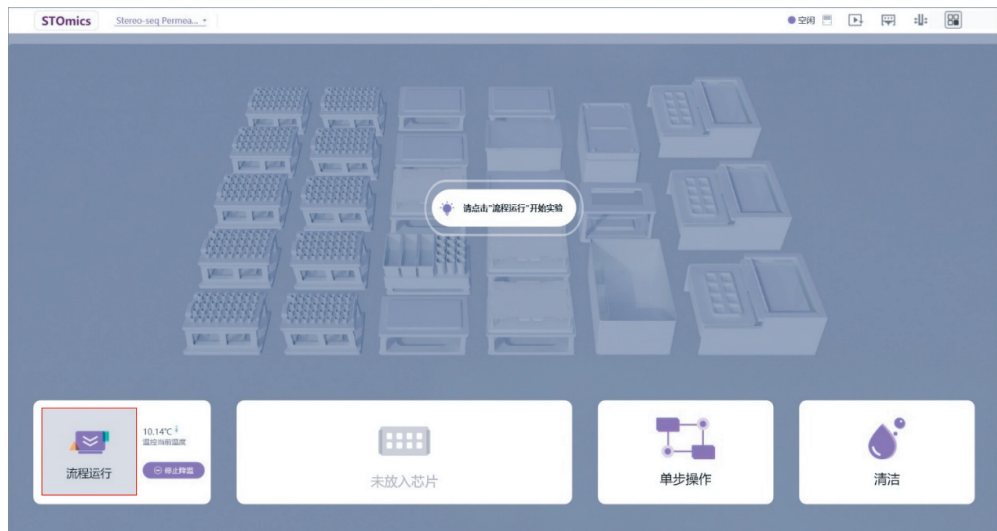


图 2-10 芯片容器放置示意图

- b. 信息录入：点击“流程运行”后，将进入“芯片扫码”界面，录入实验信息。界面如图 2-11 所示；

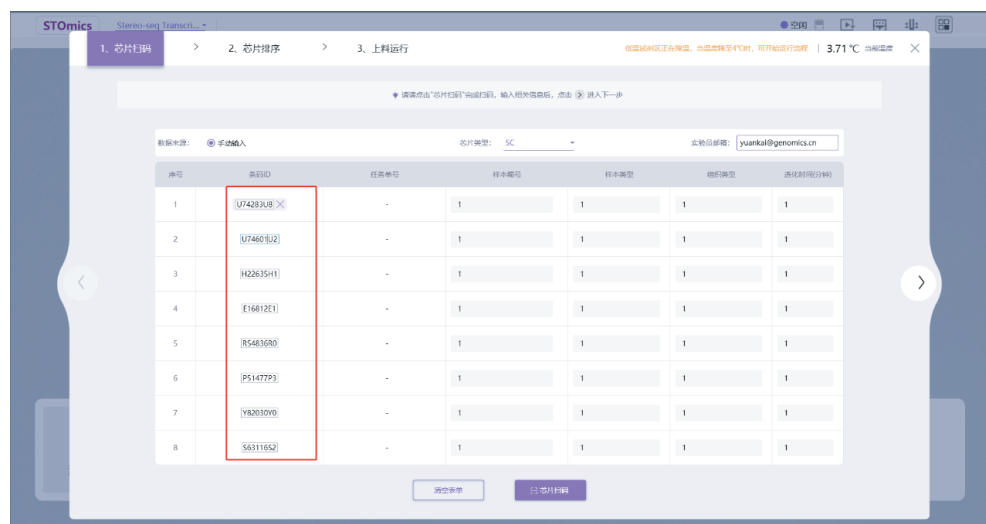


图 2-11 STOmics 软件芯片信息录入

信息录入额外说明

1. 芯片编号 (即: 条码 ID) 录入有两个方式: 【A. 扫码输入】和【B. 手动输入】:

A. 扫码输入: 把芯片容器放在外置扫码器上 (图 2-12 和图 2-13), 点击页面下方的“芯片扫码”按钮 (图 2-11), 便可以读取芯片底部的编号, 机器读取到的编号会显示在软件中。手动转移芯片容器, 按孔位 1-8 (如图 2-14 所示) 的顺序依次读取芯片编号;

B. 手动输入: 鼠标点击录入框, 在“条码 ID”处键入芯片号即可;

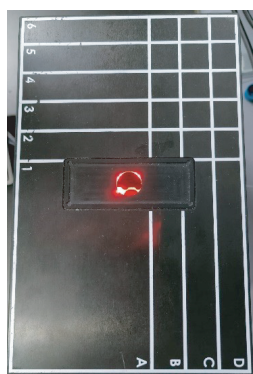


图 2-12 外部扫码器俯视及侧视图

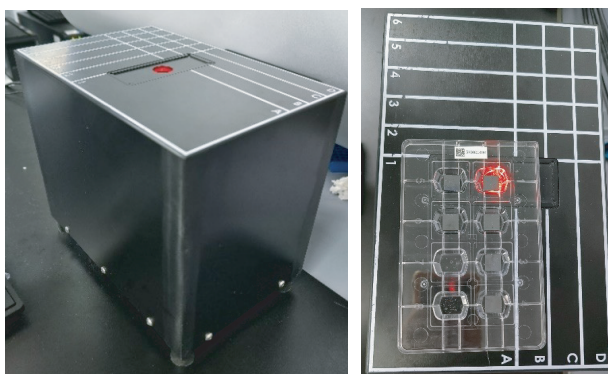


图 2-13 芯片扫码

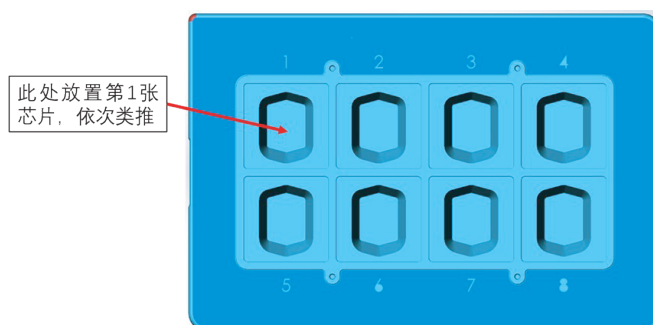


图 2-14 芯片容器放置示意图

2. 样本编号、样本类型、组织类型及实验员邮箱的信息录入支持输入中英文及阿拉伯数字;


3. 芯片类型分为 FC (即: 透化芯片 Chip P) 和 SC (即: 转录组芯片 Chip T), 本流程选择 SC;

4. 组织透化时间可输入的范围是 **3-30 min**, 可支持输入小数点后一位 (如: **7.8 min**);

5. 请按照透化时间“由短至长”的顺序在 1-8 号孔位 (见图 2-14) 依次放置芯片。同一行相邻孔位, 可以为相同透化时间, 若相邻孔位为不同透化时间, 则最小时间间隔为 **3 min**, 跨行先后两个孔位可以为相同透化时间 (即: 第 4 号孔与第 5 号可设置相同的透化时长), 跨行不同透化时间最小时间间隔是 **4.5 min** (即: 第 6 号孔与第 5、6、7 或 8 号孔若有时长差, 则不得少于 **4.5 min**);

6. 请将芯片信息录入页面（图 2-11）中所有信息录入（即：样本编号、样本类型、组织类型、透化时间、芯片类型及实验员邮箱），否则软件无法跳转下一步；

7. 请将芯片信息录入页面（图 2-9）中所有信息录入（即：样本编号、样本类型、组织类型、透化时间、芯片类型及实验员邮箱），否则软件无法跳转下一步。

c. 芯片排序：点击翻页按钮后 ，进入“芯片排序”界面，如图 2-15 所示，填写的芯片信息会自动排序。请再次核对真实芯片顺序是否与建议芯片顺序相符，若不符则在上机前及时调整。

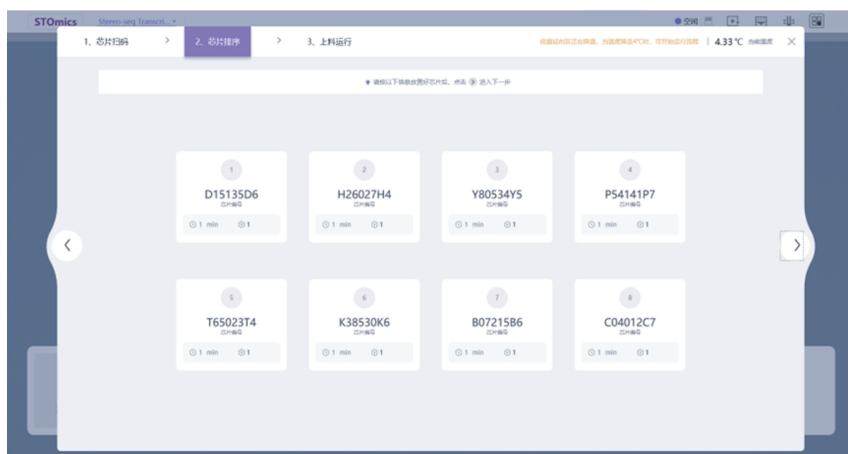



图 2-15 STOmics 软件芯片排序界面

(4) 流程开始

- a. 点击翻页按钮后 ，进入如下图 2-16 的“上料运行”界面。请确保所有物料耗材已如软件界面提示的位置已放进仪器内；
- b. 将装有芯片的芯片容器按照图 2-14 所示的正确方向（芯片容器编号 1 在左上角）放置在上料区（模块所在区可参见图 2-16）；

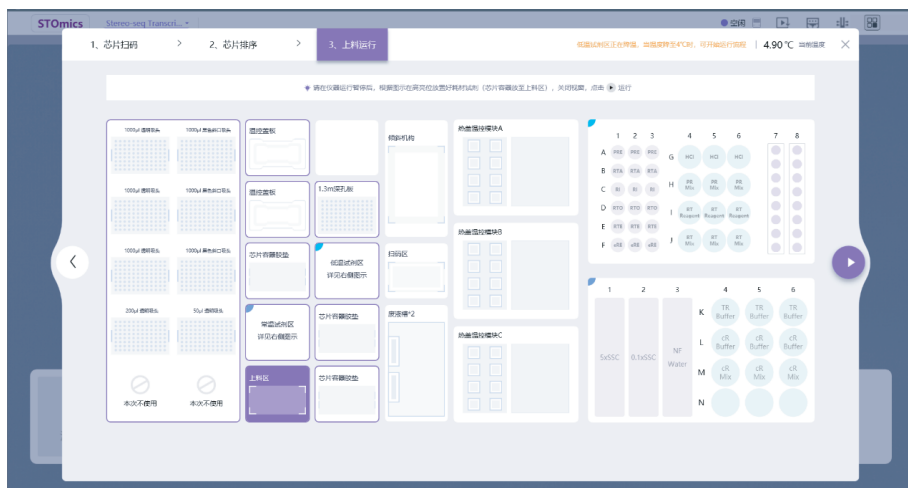



图 2-16 STOmics 软件上料运行界面

- c. 所有物料耗材核对放置无误后，关上舱门，点击继续按钮 ，会弹出如图 2-17 所示的“是否确定开始”弹窗，点击“确定”，实验流程开始运行。此时舱门会自动锁上。

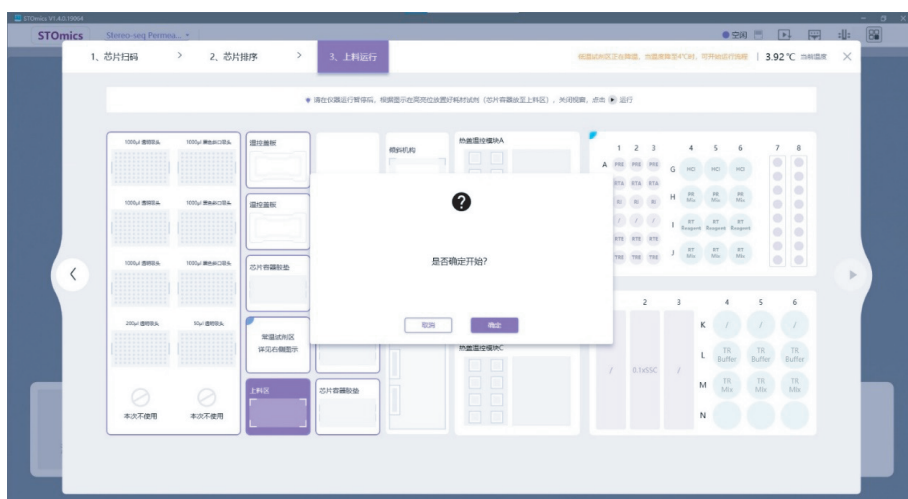


图 2-17 STOmics 软件流程确定开始界面

(5) (可选) 多板上样

a. 多板上样准备：当第一板芯片容器流程运行至“逆转录反应”或“TR 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 2-18 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 2-9）。上样前准备操作与之前一致，可参考说明书 2.7 章中的（1） - （3）小节；



图 2-18 STOmics 软件提示可多板上样

b. 多板上样运行：如图 2-19 所示，信息录入完毕，软件点击至上料运行页面后，点击页面中下方的“暂停仪器”按钮，打开舱门，将芯片容器放置在上料区，确认所有试剂耗材足够且放置无误，便可关上舱门，开始新一板的运行流程。



图 2-19 STOmics 软件流程暂停仪器多板上样界面

(6) 流程结束

a. Go Spatial 流程运行结束后，会弹出“是否停止所有温控”的弹窗（图 2-20），无需操作，直接打开舱门，平稳小心地从深孔板区拿出 96 孔深孔板，释放后的 cDNA 试剂存储于此，cDNA 产物存放位置如图 2-21 所示。



此时请勿点击“是否停止所有温控”弹窗的“确认”按钮，如提前点击了，低温试剂区将逐渐恢复至室温，请尽快回收剩余试剂。

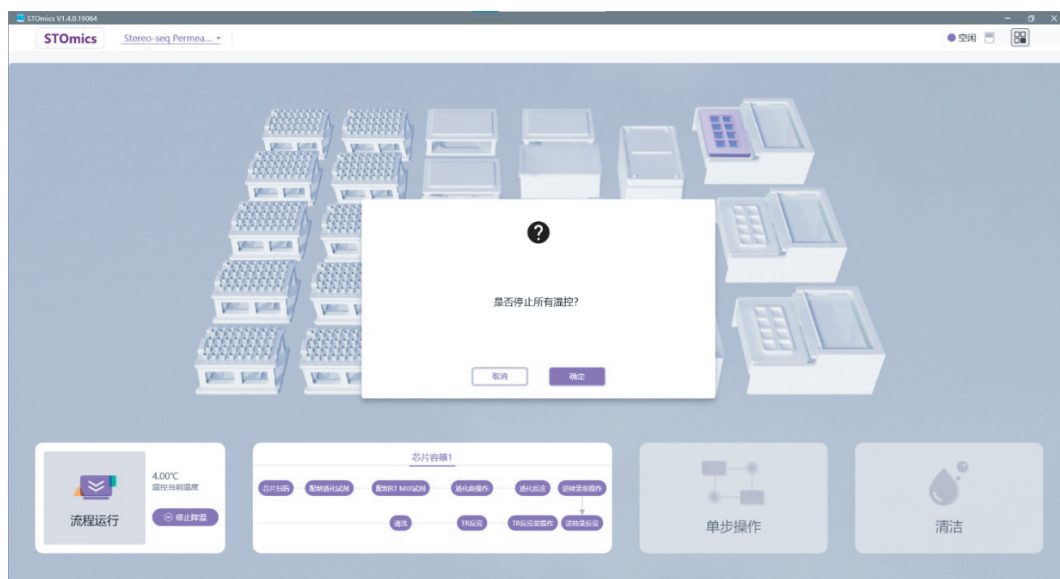


图 2-20 STOmics 软件透化流程结束界面

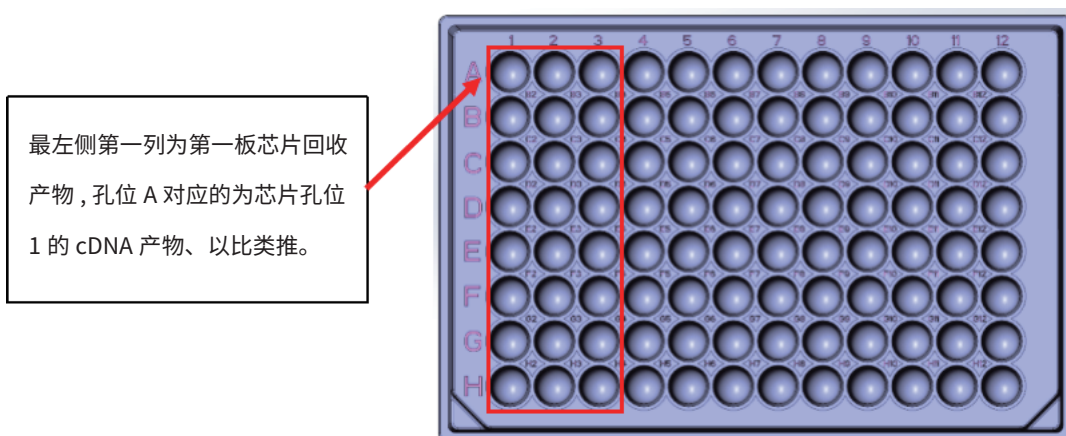


图 2-21 cDNA 释放后存放于深孔板的位置

- b. 将 cDNA 产物从深孔板的孔中转移至新的 1.5 mL 离心管中，做好标记；
- c. 此时低温试剂区仍保持在 4° C，如要回收剩余试剂，请在此时将剩余试剂盖好对应的原装盖子，放回原试剂盒内，A 管透化酶试剂液的保存及冻融使用请参见 2.7 章节（7）【A 管透化酶保存及冻融使用】；
- d. 确定试剂已回收后，点击“确定”即结束运行（图 2-20），此时低温试剂区的温控停止，温度逐渐恢复至室温。

(7) (可选) A 管透化酶保存及冻融使用

- 经过 Go Spatial 处理后，试剂盒内的 A 管 PR Enzyme（透化酶）已被溶解成 10X 透化酶试剂储存液。如需保留该储存液，可在“逆转录反应”区间或“TR 反应”区间“暂停”机器运行，或在全流程结束后，及时将 A 孔内的 10X 透化酶试剂储存液取出，按需求分装成多份（分装体积可根据使用习惯，参考步骤 b 的用量合理安排），并保存至 -20°C ，避免反复冻融；
- 再次使用时，将 10X 透化酶试剂储存液从 -20°C 取出，在冰上冻融后，在一个干净的 5 mL 空管中，用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液稀释为 1X 透化试剂工作液，请根据上机芯片数量 (n)，按照 $1200\ \mu\text{L} + 400\ \mu\text{L} \times n$ 计算用量，配制完成后置于低温试剂区的 H 孔位。A 和 G 孔位请空出。



如单板芯片容器上机芯片数量为 4 张，则需要用 0.01N HCl 将 10X 透化试剂储存液手动稀释为 $1200\ \mu\text{L} + 400\ \mu\text{L} \times 4 = 2800\ \mu\text{L}$ 的 1X 透化试剂工作液，其中 10X 透化试剂储存液用量为 $280\ \mu\text{L}$ 。

(8) 机舱清洁与物料回收

- 取出所有试剂及芯片耗材，清理废料区内的枪头和废液，并擦拭低温试剂区模块底部的冷凝水和加热模块的上盖；
- (可选) 可根据使用情况，开启一体机自带的清洁功能，进行紫外消毒。消毒软件界面如图 2-22，消毒流程时长为 30 min；

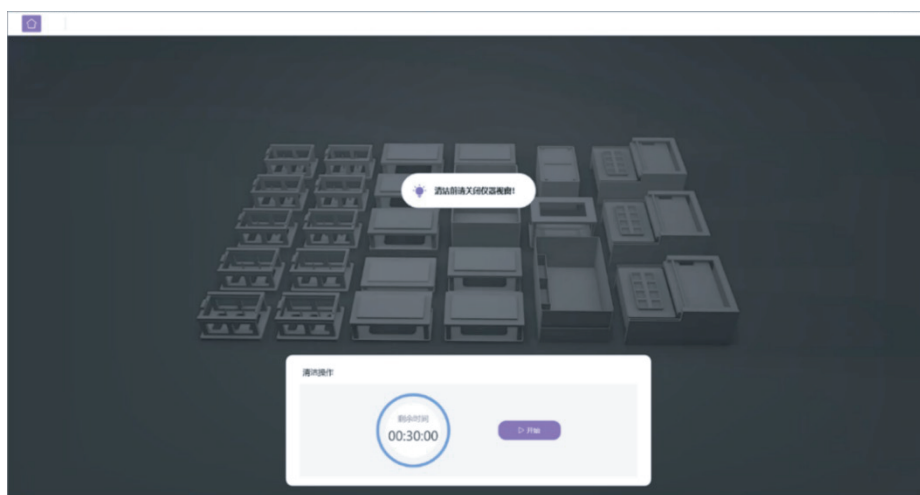


图 2-22 STOmics 软件登录界面



开启紫外消毒时，请确保全程周围没有人，并避免直视灯光。

- 将未使用的枪头回收至原装枪头盒，并在保存期间尽量减少 RNA 酶污染，在下一次使用前，建议再次进行步骤 b. 紫外消毒操作，如长期未使用，建议开封一盒新的枪头替换；
- 收拾好机舱内的所有试剂物料耗材后，关闭所有硬件部件的电源。

2.8.cDNA纯化与扩增

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, 涡旋混匀且平衡至室温, 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 μL 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 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 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。

2.8.1 cDNA纯化

a. cDNA 回收液如果观察到有白色沉淀析出，可放于 55°C 溶解，恢复至室温后进行纯化，提前 **30 min** 取出磁珠，平衡至室温；

b. 1 X 磁珠 cDNA 纯化步骤：

1. 将上一步回收液（650-750 μL ）与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合，震荡混匀，室温孵育 **10 min**；
2. 瞬时离心后，将离心管放在磁力架上静置 **3 min**；
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 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。



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）。

5. 重复一次步骤 4；
6. 将离心管保持在磁力架上，室温风干 **5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
7. 先加 22 μL Nuclease Free Water 回溶，震荡混匀后室温静置 **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（~21 μL cDNA）转移到新的 0.2 mL PCR 管中；
9. 再将 22 μL Nuclease-Free Water 加入步骤 7) 的磁珠中进行二次回溶，震荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，直至液体变澄清；
10. 将上清（~21 μL cDNA）转移到步骤 8) 的 PCR 管中，合并总体积 ~ 42 μL 。

c. 如果上述回收样品不足 42 μL ，用 Nuclease Free Water 补足。



收集了洗脱的 cDNA 后，可用 40 μL Nuclease-free Water 在 4°C 保存磁珠，直至 cDNA 最终产品 QC 通过。

2.8.2 cDNA扩增

a. 按照表格 2-4 配制 PCR Mix，共 100 μL ；

表格 2-4 PCR Mix

组分	1X (μL)	4X + 10% (μL)	8X + 10% (μL)	24X + 10% (μL)
回收样本	42	42 \times 4	42 \times 8	42 \times 24
cDNA Amplification Mix	50	220	440	440
cDNA Primer	8	35.2	70.4	211.2
Total	100	4 \times 100	8 \times 100	24 \times 100

b. 涡旋混匀，瞬时离心，按照表格 2-5 PCR 程序进行扩增：

表格2-5 PCR扩增程序(反应体系100 μL)

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	on	-
95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 s	
58 $^{\circ}\text{C}$	20 s	15
72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
12 $^{\circ}\text{C}$	Hold	-

c. 按照表格 2-6 准备 Qubit dsDNA HS Kit 测定 PCR 产物浓度并记录；

表格 2-6 Qubit dsDNA HS Kit

组分	单个反应体积
Invitrogen TM Qubit dsDNA HS Buffer	199 μL
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1 μL
Total	200 μL

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）；
d. 振荡混匀后取 1 μL PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，DNA 浓度通常高于 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。



QC 为后续 troubleshooting 考虑，建议保留 2 μL PCR 产物。

e. 对 PCR 产物进行 1 X 磁珠纯化：

1. 将 PCR 产物（100 μL ）与室温平衡好的磁珠按照 1:1 混合，振荡混匀，室温孵育 **10 min**；
2. 瞬时离心后，将 PCR 管放在磁力架上静置 **3 min**，待液体澄清后去除上清；
3. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 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；
4. 重复一次步骤 3；
5. 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。加 42 μL 的 TE 回溶，振荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清（~40 μL ）转移到新的 1.5 mL 离心管中。（此步骤可停止，样本 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存）

QC 纯化后，可用 40 μL Nuclease-free Water 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存磁珠，直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

f. 取 1 μL cDNA 样品，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录；

g. 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。

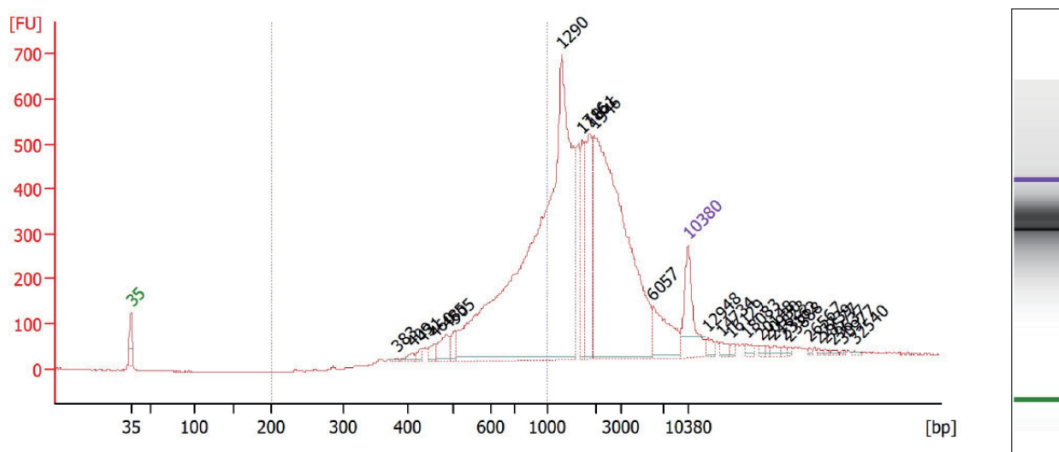


图 2-23 Go Spatial 产生的 cDNA 扩增产物 2100 峰图

QC 要求片段分布主峰在 1000-1500 bp（如图 2-23），纯化后产量通常大于 20 ng。

— 停止点：

- cDNA 纯化产物可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 1 个月。

◎ 后续文库构建具体操作参考《Stereo-seq 建库试剂盒使用说明书》。

