

Stereo-seq透化试剂套装 for Go Spatial使用说明书



货号：401SP118 (8 RXNs)

试剂盒版本号：V1.1

文档编号：STOG04001

说明书版本号：A1

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

说明书版本：A1
试剂盒版本：V1.1
修订日期：2024年7月
修订内容摘要：耗材信息变更

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。未经本单位的书面同意，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



2.5 Go Spatial流程运行



 **总耗时: ~ 4 HRS**

目录

第一章 产品介绍

1.1 产品描述	4
1.2 试剂套装组成	4
1.3 需自备物料清单	7
1.4 注意事项	8

第二章 STOmics Stereo-seq 透化试剂套装for Go Spatial标准操作流程

2.1 实验前准备	11
2.2 切片准备	12
2.3 芯片处理与组织切片	12
2.4 组织固定	13
2.5 Go Spatial 流程运行	14
2.6 荧光拍照	24
2.7 组织透化判断	25



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 透化试剂套装 for Go Spatial（时空自动化样本处理系统）是用于摸索时空转录组中组织透化时间的一款预实验试剂套装，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 P（透化测试芯片）上载有核苷酸捕获探针，探针与组织切片结合后，在芯片上原位抓取组织内的 mRNA 分子，再利用带有荧光标记的核苷酸进行 cDNA 合成。研究人员通过荧光成像可以快速判断特定组织的最佳透化时间。

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. 试剂套组成

每个试剂套装由以下两个部分组成：

- Stereo-seq 透化试剂盒 for Go Spatial * 1 (8 RXN)
- Stereo-seq 芯片 P (1 cm*1 cm)*1 (8 EA)

辅助性耗材：

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



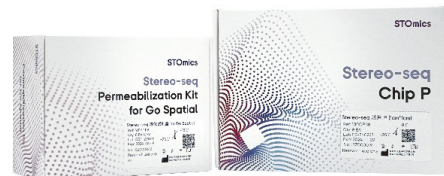
- （需单独订购）Go Spatial 配套耗材

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透化试剂盒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
RT QC Enzyme	1000040202	○ 透明	182 μL × 1
TR Enzyme	1000045421	● 绿色	72.8 μL × 1
RT QC Reagent	1000035168	● 棕色	3900 μL × 1
TR Buffer	1000045420	○ 白色	3900 μL × 1
Glycerol	1000031615	● 紫色	50 μL × 1
5 mL 试剂管 (空)	/	○ 白色	5 个
🧊 储存温度：-25°C ~ -18°C		❄️ 冷链运输	
🕒 有效期：见标签			

表格 1-2

Stereo-seq 芯片P (1 cm * 1 cm)		货号：100CP118	
组分信息	货号	规格及数量	
Stereo-seq 芯片 P (1 cm * 1 cm)	/	8 EA	
🧊 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
100 mL 试剂槽	012-000779-00	50 个 / 盒
50 mL 试剂槽	012-000780-00	50 个 / 盒
1000 μL 透明吸头	1000023970	96 支 / 架, 16 架 / 箱
1000 μL 黑色斜口吸头	091-000376-00	96 支 / 架, 16 架 / 箱
200 μL 透明吸头	091-000158-00	96 支 / 架, 24 架 / 箱
50 μL 透明吸头	091-000157-00	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	1000001509	500 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



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, 吸头开封后, 剩余未使用的吸头请放回原盒保存, 并尽快使用;

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	/
/	恒温箱	/
/	漩涡混匀仪	/
/	（可选）烤片机	/
/	pH 计	/
*Bio-Rad	T100™ PCR 仪	1861096
*ABI	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636



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
Ambion	Nuclease Free Water	AM9937
Ambion	20 × SSC	AM9770
Sigma Aldrich	甲醇	34860-1L-R
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
SAKURA	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583

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)	/
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
PARAFILM	封口膜	PM996
BIOSHARP	金属块	BC032

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。

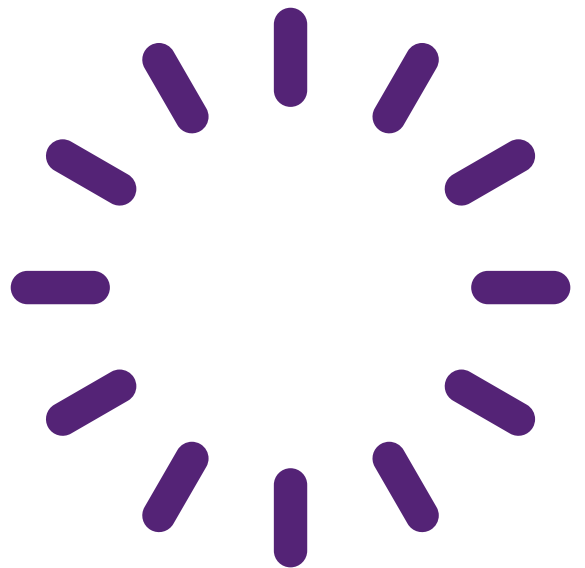
推荐把 PCR 仪或烤片机温度预热至烤片温度 37°C。

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 透化试剂套装 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。

使用Go spatial当天		
准备试剂	准备流程	暂存温度
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
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。		
*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5min取出，平衡至室温	室温

准备仪器	准备流程	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°C; * 将烤片机设置为37°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°C，用于孵育试剂	
荧光显微镜	TRITC 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. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- f. 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；
- 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 P，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，用 100 μL Nuclease Free Water 清洗 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；

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，使切片更好地贴附在芯片上；
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 2.5 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 **30 min**；
2. 待组织固定 **30 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橱中 **2-3 min**，让甲醇充分挥发，直至肉眼可见组织变白；
3. 确认无甲醇残留后，将芯片转移至一个干净且干燥的 24 孔板中或 35 mm 培养皿，盖上容器盖后用封口膜将其密封，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

4. 上机当天，请提前按照 2.5 章节【上机前准备】部分做好 Go Spatial 上机前的准备；
5. 将装有芯片的孔板或培养皿从 -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。若冷凝水较多，则放在烤片机上 37 °C 烤干 **1 min**。随后可直接跳转至 2.5 章节【芯片放置】的步骤 d。

2.5.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；

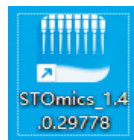


图 2-1 STOmicS 软件图标

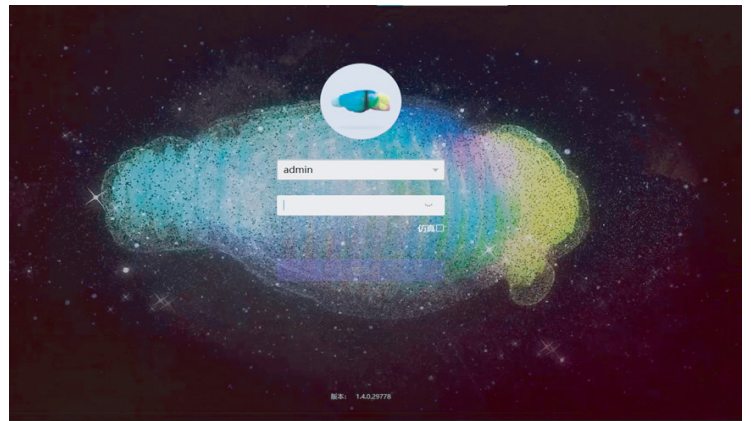


图 2-2 STOmicS 软件登录界面

- 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：

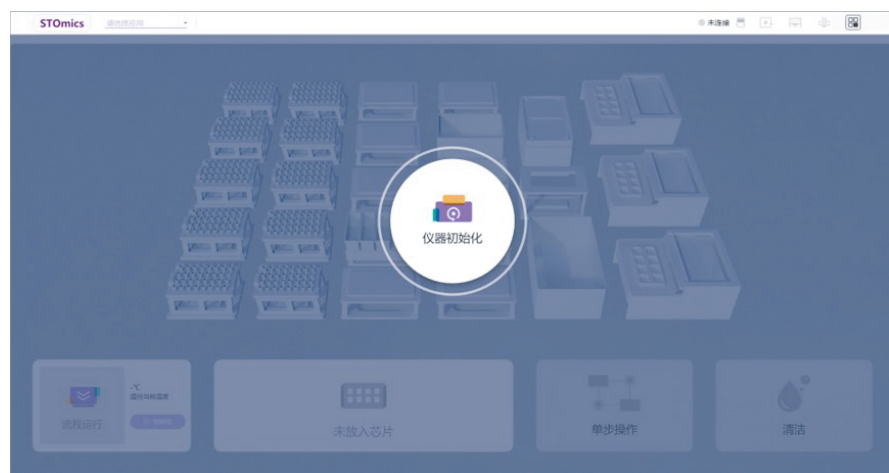


图 2-3 STOmicS 软件仪器初始化界面

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 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 2-1 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 2-1 STOmics Stereo-seq for Go Spatial 透化流程枪头使用明细表

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
1 张 / 芯片容器	9	7	1	4
2 张 / 芯片容器	11	14	1	4
3 张 / 芯片容器	13	21	5	/
4 张 / 芯片容器	15	28	5	/
5 张 / 芯片容器	17	35	6	/
6 张 / 芯片容器	19	42	6	/
7 张 / 芯片容器	21	49	6	/
8 张 / 芯片容器	23	56	6	/
8 张 / 芯片容器 *3	69	168	18	/

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 试剂槽可用作废液槽；



图 2-5 STOmics 软件台面模块示意图

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

表格 2-2 STOmics Stereo-seq 透化流程 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	/	/	/
E	RTE	RT QC Enzyme	离心后 4°C 暂存
F	TR Enz	TR 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 ³
H	PR Mix	/	5 mL 空管 ⁴
I	RT Reagent	RT QC Reagent	冰上解冻后, 按需转移至 5 mL 空管 ⁵
J	RT mix	/	5 mL 空管 ⁴
K	/	/	/
L	TR Buffer	TR Buffer	55°C 恒温箱解冻后, 至少颠倒混匀 3 次, 常温放置
M	TR Mix	/	5 mL 空管 ⁴
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. 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;
4. H、J、M 孔位为 5 mL 空管, 其作用为 Go Spatial 配制混合试剂时的容器;
5. I 孔位为 RT QC Reagent, 按照所需的反应体积量, 从 8 mL 棕色避光广口瓶转移至一个 5 mL 空管中, 在上机前冰上避光保存。若一板芯片容器处理 4 张芯片, 则只需按标签体积, 转移一半的试剂至一个干净的 5 mL 空管中。若一板芯片容器处理 8 张芯片, 则按标签体积, 转移全部试剂至一个干净的 5 mL 空管中;
6. 常温试剂区左侧中间编号为 2 的位置为 0.1X SSC, 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 2-5 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 6 h, 需及时回收, 回收及后续使用方法请见 2.5 章节步骤 (8)【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

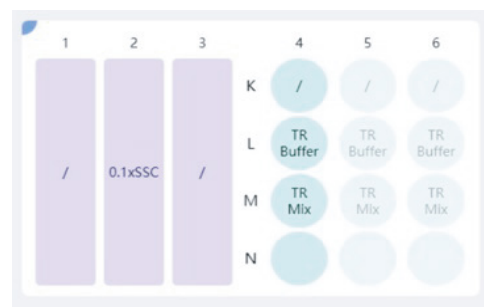


图 2-7 常温试剂台面放置示意图

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



透化流程无须使用 1.3 mL 深孔板, 虽运行前无需放置深孔板, 但仍需将深孔板区盖上温控盖板。

(2) 芯片放置

- a. 甲醇固定结束后, 将 24 孔板转移到通风橱中;
- b. 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;

- c. 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，直至肉眼可见组织表面变干；
- d. 甲醇挥干后，在干净的芯片容器每个孔中央加 $3\ \mu\text{L}$ 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 2-8 的红框所示。



图 2-8 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 2-9 所示。

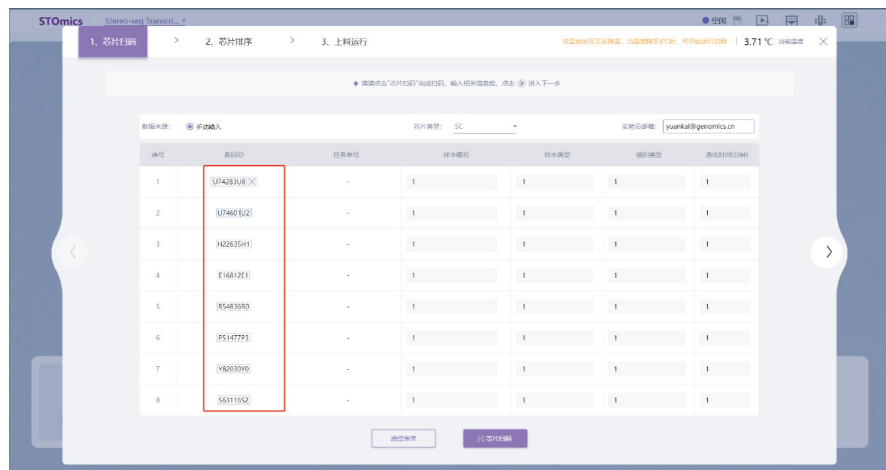


图 2-9 STOmics 软件芯片信息录入

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 2-10 和图 2-11), 点击页面下方的“芯片扫码”按钮(图 2-9), 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 2-12 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;

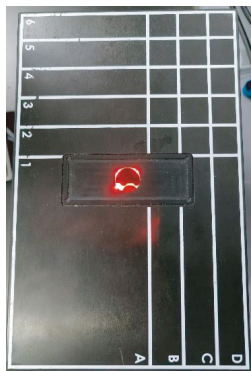


图 2-10 外部扫码器俯视图及侧视图

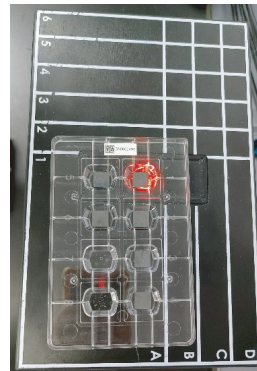
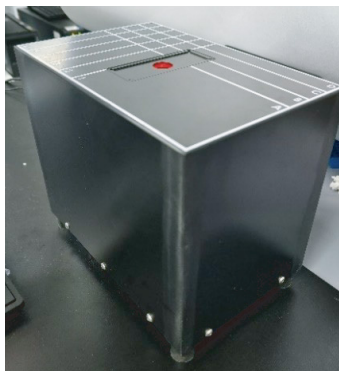


图 2-11 芯片扫码

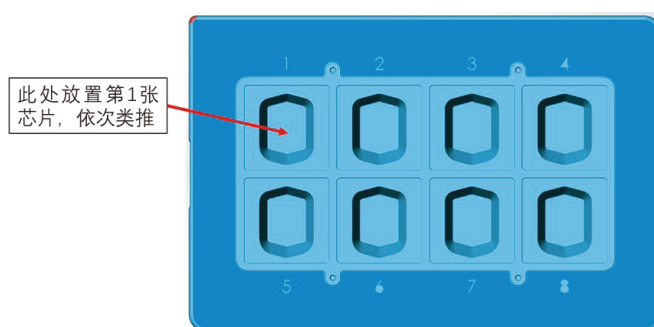


图 2-12 芯片容器放置示意图

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 FC;

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**)。每个组织块初次实验建议设置 **6 min**、**12 min**、**18 min**、**24 min** 等 4 个组进行测试;

5. 请按照透化时间“由短至长”的顺序在 1-8 号孔位 (见图 2-12) 依次放置芯片。同一行相邻孔位, 可为相同透化时间, 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 4 号孔与第 5、6、7 或 8 号孔有时长差”, 则不得少于 **4.5 min**);



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。

6. 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 2-13 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。

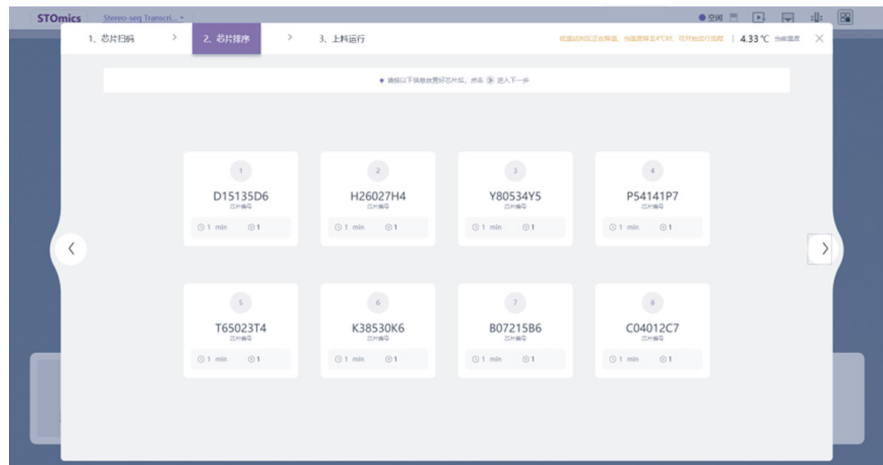



图 2-13

(4) 流程开始

a. 点击翻页按钮后 ，进入如下图 2-14 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；

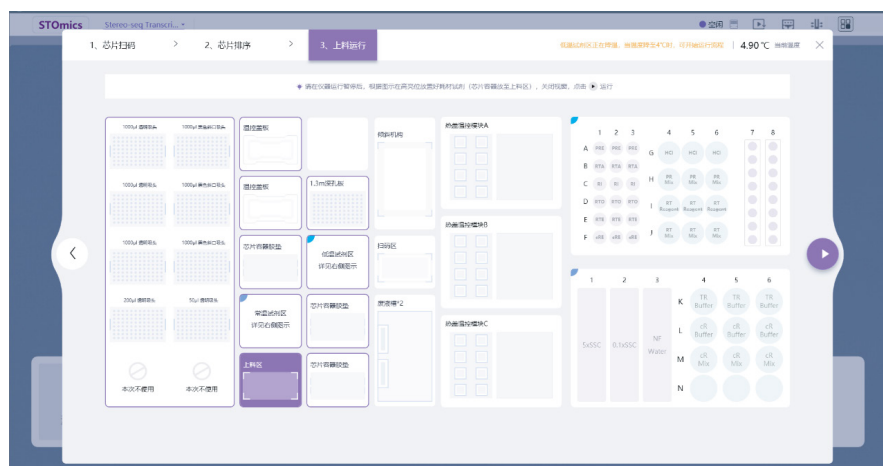

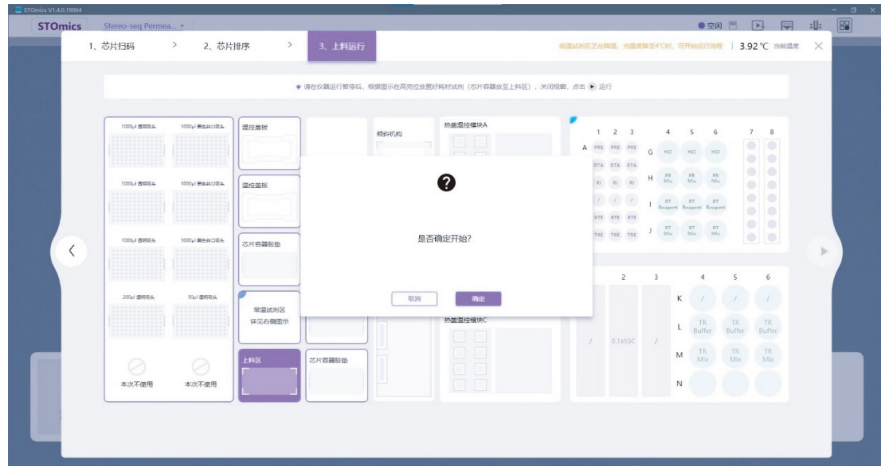


图 2-14 STOmics 软件上料运行界面

- b. 将装有芯片的芯片容器按照图 2-12 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 2-14）；
- 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 2-15 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。



2-15 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 2-16 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 2.5 章中的(1)-(3)小节；

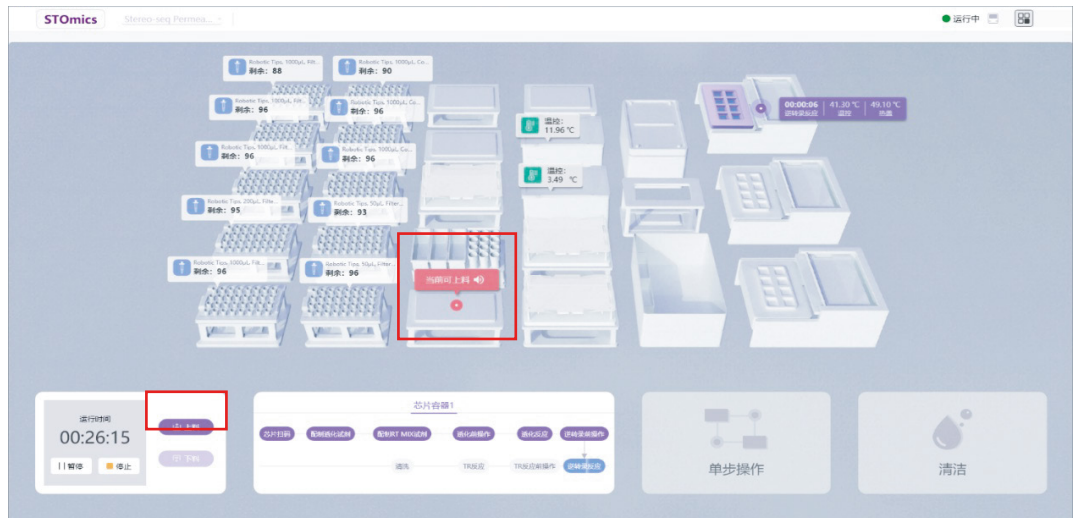


图 2-16 STOmics 软件提示可多板上样

b. 多板上样运行：如图 2-17 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。

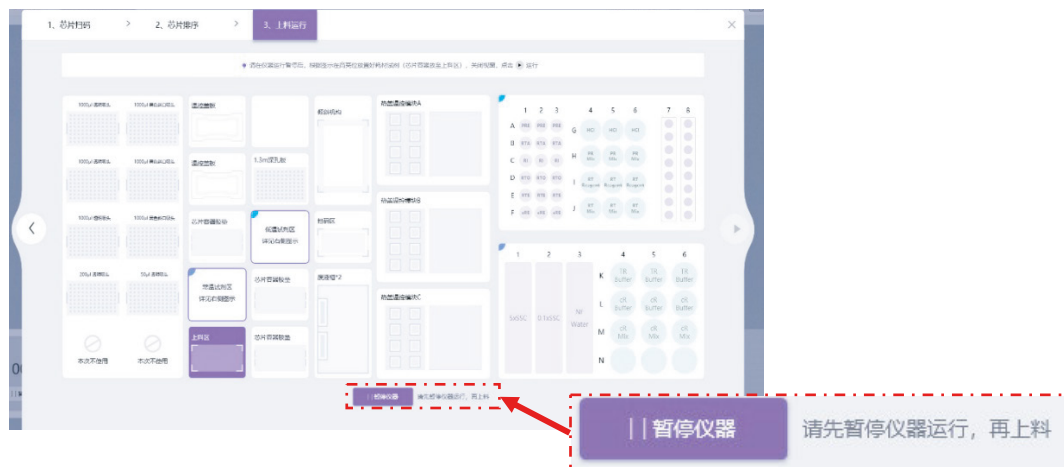


图 2-17 STOmics 软件流程暂停仪器多板上样界面

(6) 流程结束

a. Go Spatial 时空流程运行结束后，需按照“A. 单板上样”与“B. 多板上样”的情况操作：

A. 单板上样

实验流程结束后，会弹出“是否停止所有温控”的弹窗（图 2-18），无需操作，直接打开舱门，从温控模块 A 中取下已处理好的芯片容器。

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

B. 多板上样（以上满三板芯片容器为例）

- 较早开始的第一、二板芯片容器的流程结束后，只会在软件界面中下方显示“清洗”步骤完成（即：“清洗”步骤框为紫色），无弹窗提示。需在第一、二板芯片容器流程结束后及时点击软件左下放的“暂停”按钮，取下相应反应模块中的芯片容器；
- 最后一板芯片容器的流程结束后，会弹出“是否停止所有温控”的弹窗（图 2-18），无需操作，直接打开舱门，从温控模块 C 中取下已处理好的芯片容器。

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

b. 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 2.5 章（8）A 管透化酶保存及冻融使用】；

c. 确定试剂已回收后，点击“确定”即结束运行（图 2-18），此时低温试剂区的温控停止，温度逐渐恢复至室温。

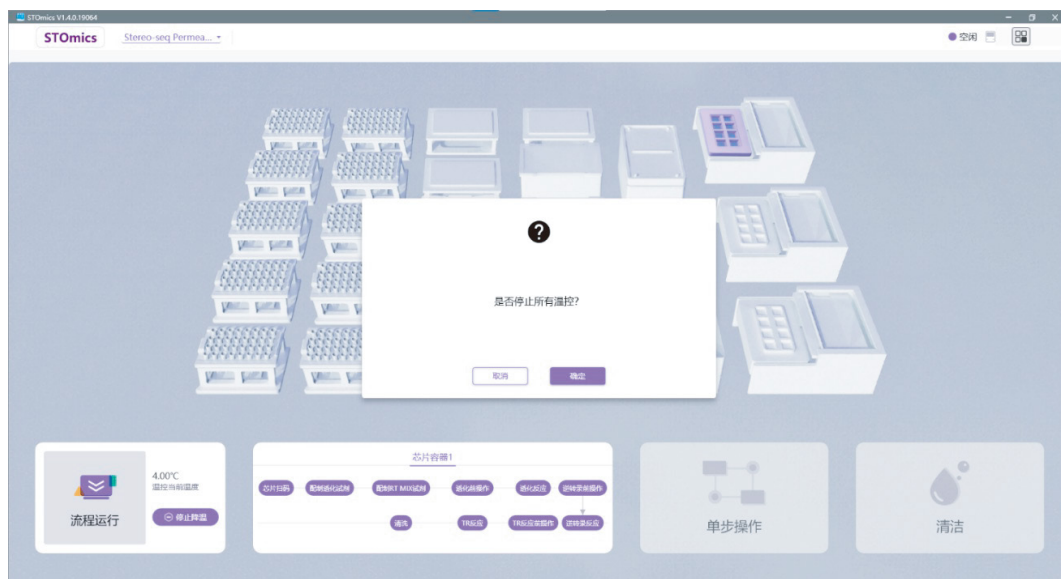


图 2-18 STOmics 软件透化流程结束界面

(7) 清洗芯片

- 在芯片容器内加入 Nuclease Free Water（用量为 400 μL / 孔）进行二次清洗；
- 上下吸打冲洗芯片表面以洗掉表面盐分；
- 用镊子将芯片转移到无尘纸上，吸干芯片背面和周围的液体；
- 用气瓶将芯片表面轻轻吹干；
- 将芯片放置于一个干净的底部贴有封口膜的培养皿中或一个干净的 24 孔板中，锡箔纸包裹培养皿或孔板以避光，等待拍照。

(8) (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 μL 。

(9) 机舱清洁与物料回收

- a. 取出所有试剂，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；
- b. (可选) 可根据使用情况，开启仪器自带的清洁功能，进行紫外消毒。消毒软件界面如图 2-19，消毒流程时长为 **30 min**；

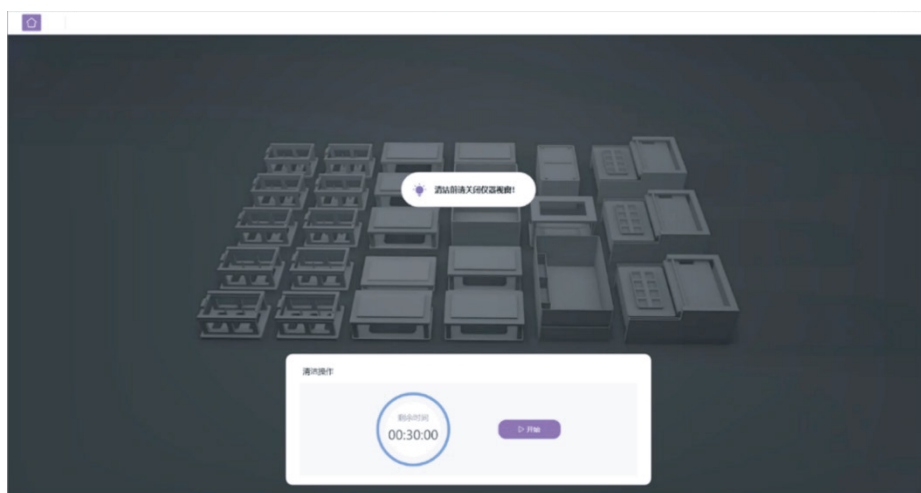


图 2-19 STOmics 软件登录界面



开启紫外消毒时，请确保全程周围没有人，并避免直视灯光。

- c. 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；
- d. 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。

2.6. 荧光拍照

- a. 使用荧光显微镜（具备拼接功能），选择“落射荧光扫描模式”及“TRITC 通道”；
- b. 在一张干净的载玻片上加一滴水（约 $2\ \mu\text{L}$ ），接着用镊子小心地将芯片放置于水珠上，使芯片贴合载玻片；



为了方便对比差异，可将同一组织所有不同透化时间的芯片并排放置在同一载玻片上拍照。

c. 平稳地将带有芯片的载玻片转移到显微镜载物台上，使用 10 倍镜扫描整张芯片。

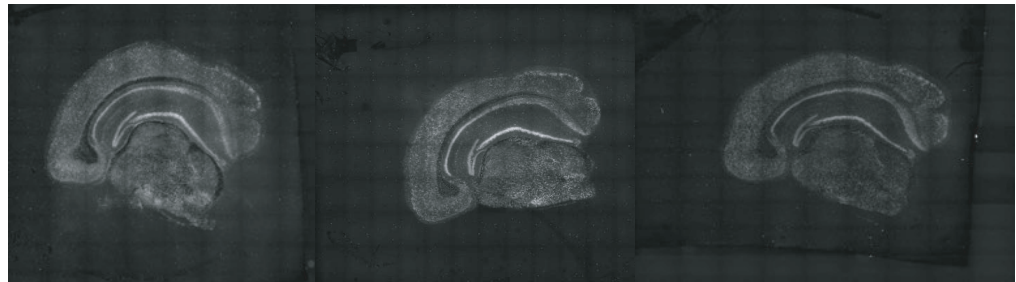


同一组织不同透化时间的芯片要在相同的成像条件下扫描，包括如曝光时间和亮度等条件，如有阳参，也请使用此成像条件拍摄。

2.7. 组织透化判断

最佳组织透化时间判断标准：在组织移除干净且保持相同成像条件（包括亮度和曝光等条件）的情况下，组织形态完整，荧光值较强，无弥散为合适优化条件。

如图 2-20 所示，**3 min** 透化时间下，组织呈现同一皮层亮度不均匀的情况，说明透化不充分；**12 min** 下，细节清晰，信号均匀，亮度最大；**24 min** 下的信号弱于 **12 min** 下的信号；因此，最佳的透化时间是 **12 min**。



3min

12min

24min

图 2-20 小鼠大脑半球冠状面切面透化时间摸索