

# STOmics

## 显微镜评估参考手册

参考手册版本号: A2

## 版本历史

参考手册版本	软件版本	修订日期	修订内容摘要
A0	V1.0	2021 年 8 月	<ul style="list-style-type: none"><li>◆ 首次发布</li></ul>
A1	V1.0.6	2021 年 11 月	<ul style="list-style-type: none"><li>◆ 更新拼接大图说明</li><li>◆ 修改 imageQC 未响应说明</li><li>◆ 修改芯片号和实验人员填写说明</li><li>◆ 增加 QC 时间过长的异常处理说明</li><li>◆ 增加安装目录建议</li></ul>
A2	V1.0.7	2022 年 2 月	<ul style="list-style-type: none"><li>◆ 更新图片为 V1.0.7 软件截图</li><li>◆ 增加安装模式选择说明</li><li>◆ 删除 QC 时间过长说明</li><li>◆ 增加结果界面 QC 出错提示说明</li><li>◆ 更新 2.5 评估流程中芯片染色、荧光成像和图像 QC 说明</li><li>◆ 新增芯片划痕和 track 线倾斜角过大图片示例</li></ul>

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的软件配套使用。

版权声明：

本说明书版权归深圳华大生命科学研究院所有。未经本机构书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式对本说明书中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译为其他语言。

## 目录

第一章 概况.....	- 1 -
第二章 内容.....	- 1 -
2.1 显微镜评估准备.....	- 1 -
2.2 成像配置.....	- 1 -
2.3 成像系统推荐.....	- 3 -
2.4 测试芯片.....	- 3 -
2.5 评估流程.....	- 3 -
2.6 QC软件介绍.....	- 4 -
2.6.1 软件安装说明.....	- 4 -
2.6.2 软件使用说明.....	- 7 -
2.7 图片示例.....	- 14 -

# 第一章 概况

STOmics 显微镜评估参考手册用于指导用户评估显微镜是否可以用于 STOmics 时空转录组技术拍照，内容包括 STOmics 测试芯片和 Image QC 软件的使用方法。

## 第二章 内容

### 2.1 显微镜评估准备

物料清单

STOmics 测试芯片（货号：1000029779）
Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
<b>Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212)</b>
<b>Power Dust remover（空气罐）(MATIN, M-6318)</b>

成像要求

避免接触芯片正面
拍照前将芯片放置在载物台
拍照区域需要包括芯片四个角在内的所有区域
单张图像短边分辨率不低于 1800 pixels，长边分辨率不低于 2000 pixels

成像系统需要具备至少 10mm\*10mm 区域自动扫描、清晰成像和图像拼接功能，且能查看和导出 TIFF/PNG 格式的 FOV（field of view）原图和拼接大图。显微镜 PC 配置可处理大型图片（>5G），并且支持安装第三方的图像处理等软件（如 ImageQC 软件）。

### 2.2 成像配置

显微镜需求概览

指标/参数	描述
显微镜 XY 运动范围（行程）	扫描范围覆盖标准 25*75mm 载玻片

拍摄目标	STOmics 测试芯片
明场	落射（反射）
对焦方式评估	预对焦地图，实时自动对焦
荧光通道	DAPI、FITC、TRITC、CY5
物镜	10X (NA≥0.3)、20X、40X(可选)
分辨率	相机分辨率匹配物镜理论分辨率，建议咨询显微镜供应商
相机和存图位深	16bits
背景平衡	功能具备，可设置打开
畸变校正	功能具备，可设置打开
Overlap 比例	可调，设置为 10%
图像格式	可查看和导出拼接大图和 FOV 原图，8bit/16bit、TIF/PNG、灰度
硬件配置需求	win10 x64 系统，内存 16G 及以上

#### 具体成像配置推荐

##### 明场配置（可用于 H&E 染色）:

落射明场
彩色相机（3x8 bit）
白平衡
5μm/pixel 最大像元尺寸
曝光时间 0.1~100ms

荧光配置：

光源波长范围 380-680 nm
黑白相机 (≥12 bit)
FITC filter cube (Excitation 470/40, Emission 525/50)
TRITC filter cube (Excitation 545/25, Emission 605/70)
5μm/pixel 最大像元尺寸
曝光时间 1 ms~2 s

### 2.3 成像系统推荐

厂家	描述
Leica	Leica DM6M
Zeiss	Automated Slider Scanning Microscope Axio Scan Z1 Automated slide scanner Zeiss Axioscan 7

### 2.4 测试芯片

STOmics 测试芯片 (货号: 1000029779)

### 2.5 评估流程


芯片染色	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 取芯片：用镊子小心从运输盒中夹取芯片，置于 24 孔板中，注意芯片正反面，不要划到芯片正面，记录芯片号信息；</li> <li>● 检查芯片表面无切片碎屑、无波纹状白色纹理(若有,用 400μL Nuclease free water 清洗两遍，吸弃芯片表面液体)，保持芯片表面干燥或 37℃ 烤干 1 min，即可进行芯片染色；</li> <li>● 将芯片放在贴有封口膜的培养皿中，参考表 1 染色液配制方法，使用量为</li> </ul>
------	---

	<p>200 <math>\mu</math>L，室温避光染色 5 min。吸掉表面的染色液，用 200 <math>\mu</math>L Nuclease free water 清洗一次，并用气瓶将芯片表面吹干，锡箔纸包裹孔板避光等待拍照。</p> <p>表 1 染色液配制方法</p> <table> <tr> <th>组分</th><th>单个反应体积</th></tr> <tr> <td>Invitrogen® Qubit ssDNA Buffer</td><td>199 <math>\mu</math>L</td></tr> <tr> <td>Qubit ssDNA Reagent</td><td>1 <math>\mu</math>L</td></tr> <tr> <td>Total</td><td>200 <math>\mu</math>L</td></tr> </table>	组分	单个反应体积	Invitrogen® Qubit ssDNA Buffer	199 $\mu$ L	Qubit ssDNA Reagent	1 $\mu$ L	Total	200 $\mu$ L
组分	单个反应体积								
Invitrogen® Qubit ssDNA Buffer	199 $\mu$ L								
Qubit ssDNA Reagent	1 $\mu$ L								
Total	200 $\mu$ L								
通道选择	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 使用 10 倍物镜下 FITC 通道。</li> </ul>								
荧光成像	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 芯片正置于平台上，尽量平行于平台边缘，倾斜角度少于 8 度；</li> <li>● 整个芯片区域都需要用荧光通道清晰成像，包括芯片四个角。</li> </ul>								
图像 QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 下载最新 QC 软件包，并参考 2.6 QC 软件介绍使用；</li> </ul> <p>QC 软件可接收 2.3 中显微镜的原始下机小图路径或拼接大图。</p> <p>若显微镜型号不为 2.3 中的推荐显微镜，可先用 TIFF/PNG 格式拼接大图 QC 评估。然后把显微镜拍图的原始下机文件，导出的 FOV TIFF/PNG 格式的小图原始文件打包给开发同事，以便开发对应的 QC 接口。若不能自动保存且不能手动导出 FOV 原图的情况，请联系 FAS 同事确认。</p>								

## 2.6 QC 软件介绍

### 2.6.1 软件安装说明

1. @ 在 win10 x64 系统，内存 16G 及以上的环境中运行 ImageQC-Setup 1.0.7.exe。

 ImageQC-Setup.exe

2. 选择安装模式，建议选择第一个。



## Select install mode

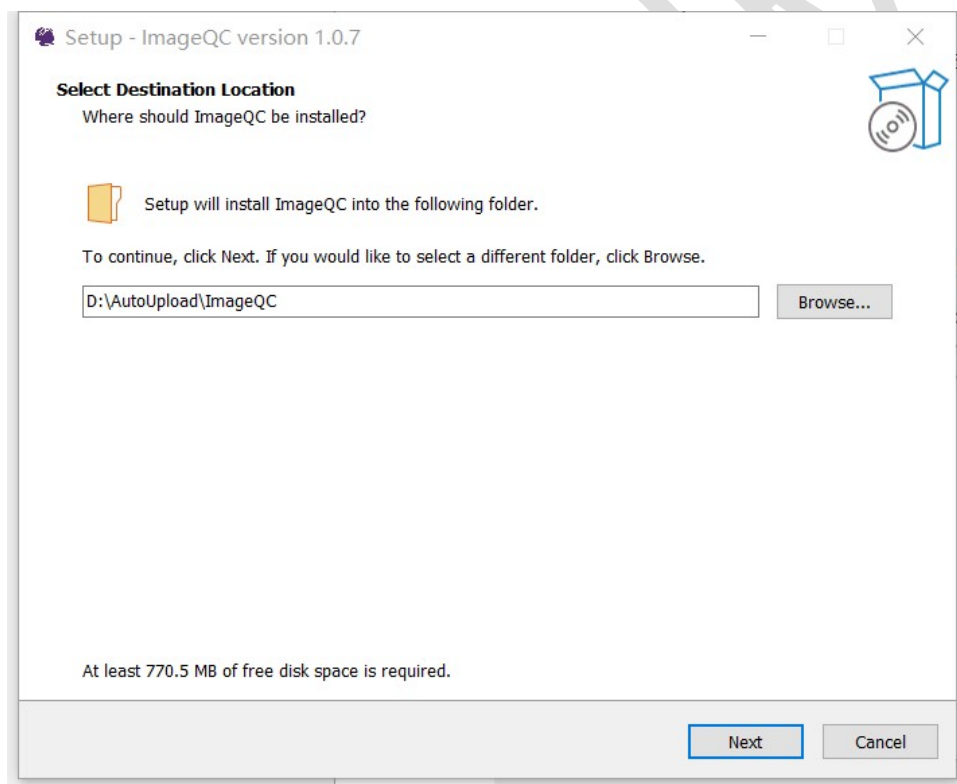
ImageQC can be installed for all users (requires administrative privileges), or for you only.

 **Install for all users**  
(recommended)

→ **Install for me only**

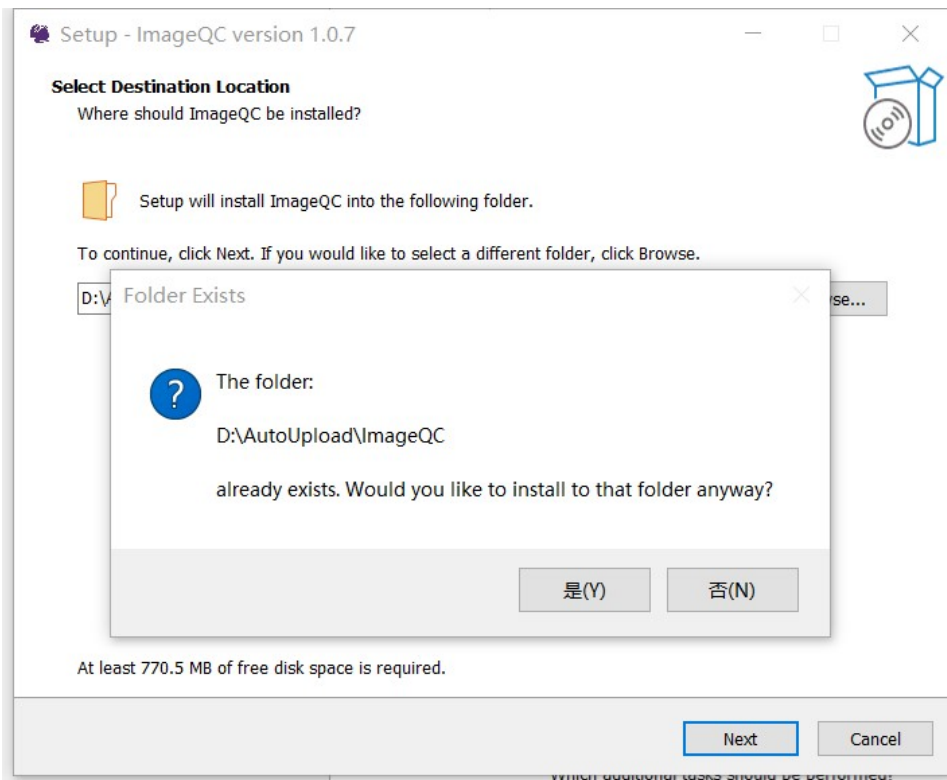
取消

2.选择安装目录，建议安装在 D 盘，安装在 C 盘可能会因为权限问题导致软件出错。

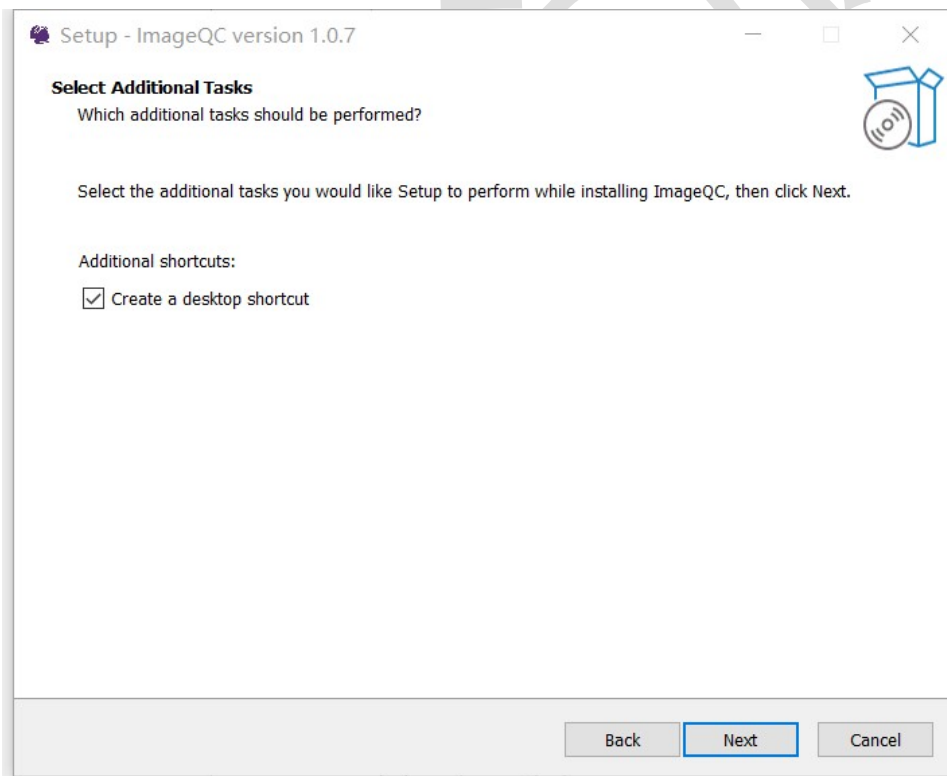


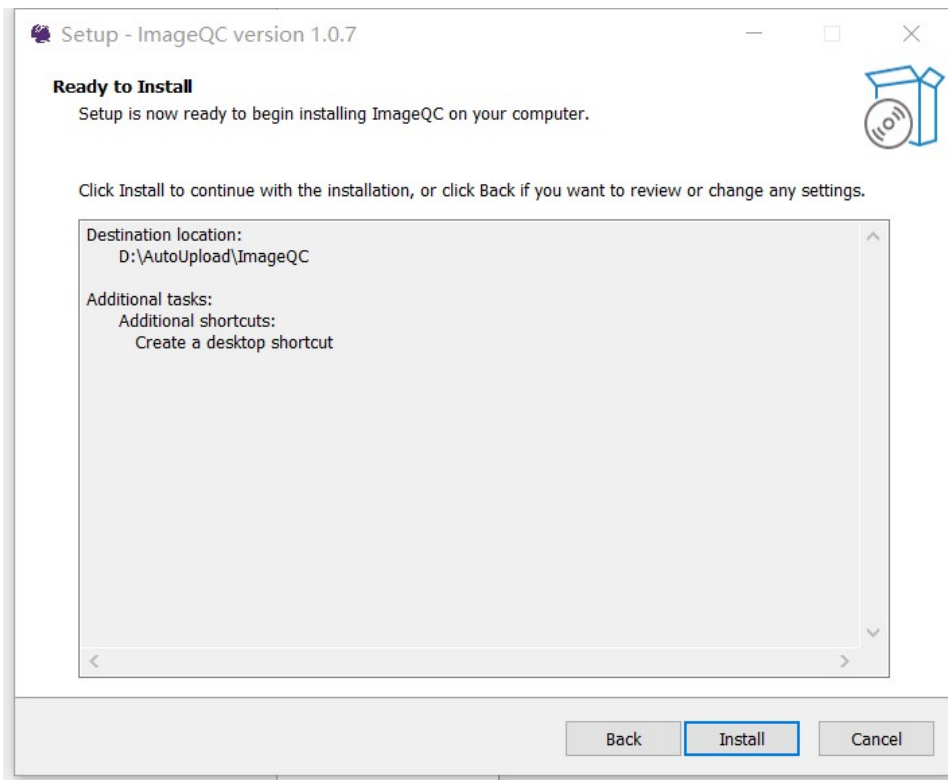
若之前已在该目录安装过 QC 程序，将提示是否安装，点击“是”即可。



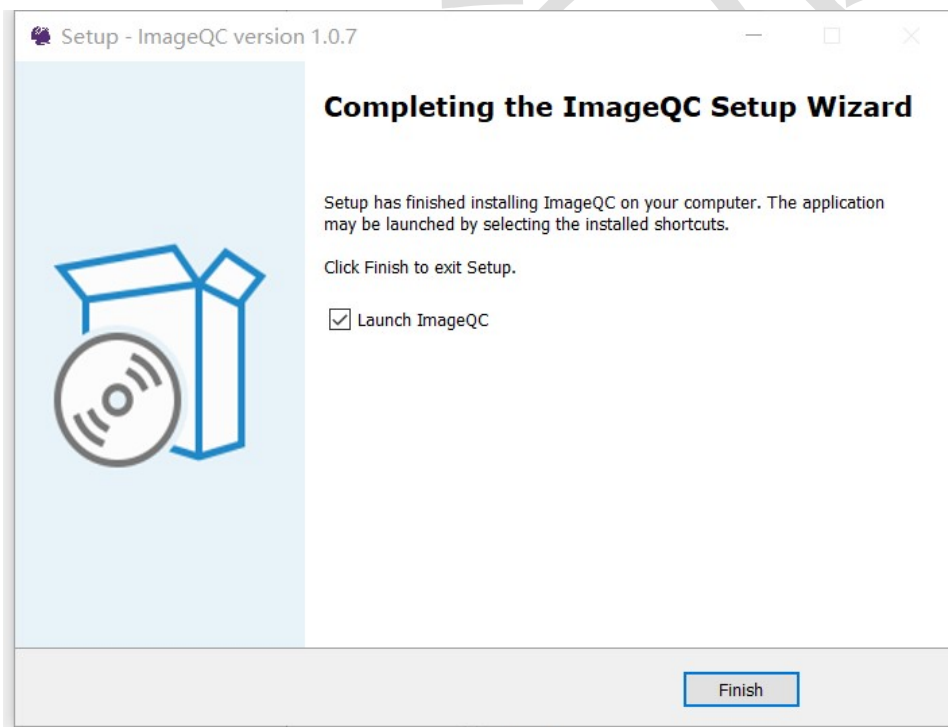


3.选择是否创建桌面快捷方式后点击“Install”进行安装。





4.安装完成，勾选 Launch ImageQC 选项可直接启动 QC 程序。



## 2.6.2 软件使用说明

1.拍照完成后，打开 QC app（可建立桌面快捷方式，打开后可以一直不关闭）。



2.从外部拖入拍照图像文件至程序窗口（拖入窗口范围即可，无需精准拖入文本框）。

Motic 显微镜：拖入 mdsx 文件所在的文件夹

Zeiss 显微镜：拖入 czi 文件

其他显微镜：输入按规则命名的小图路径或拼接大图文件（TIFF 或 PNG）

**注意：不能自动保存原 FOV 小图，且不能手动导出的显微镜类型，请反馈 FAS 寻求协助。**

**芯片号：**输入拍摄图像的芯片号，目前仅支持标准 STOmics 芯片号

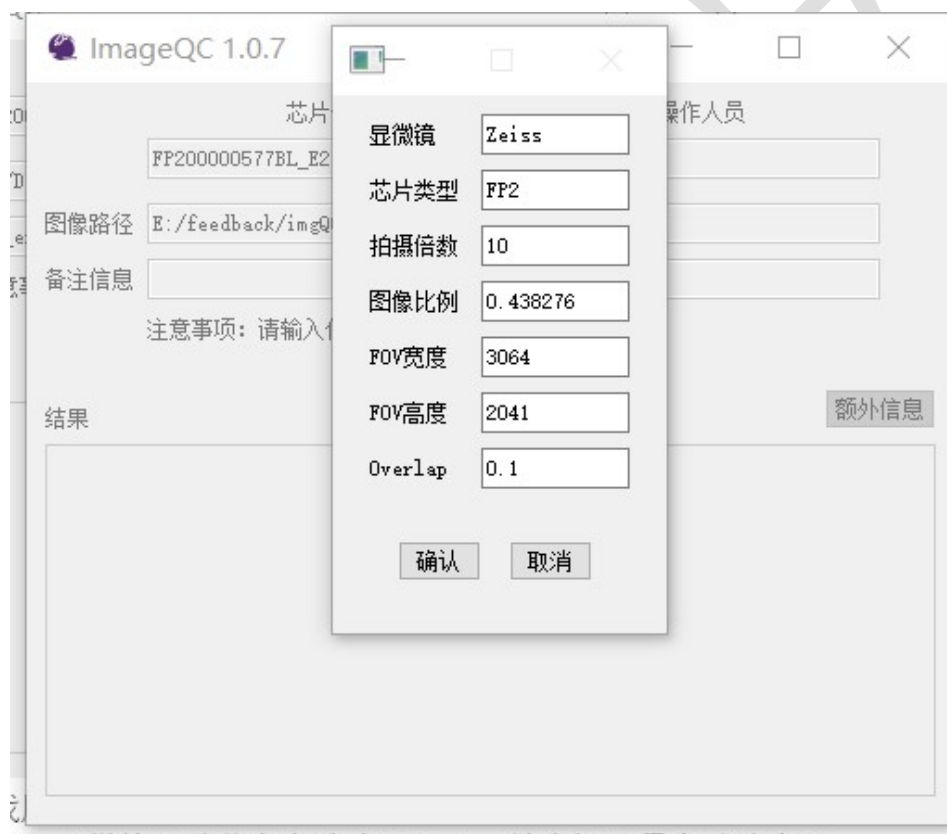
**操作人员：**输入拍图人员的邮箱前缀

**注意：**若拍照时已经输入芯片号和拍图人员邮箱，这两栏会自动读取芯片号和拍图人员并显示，如果在这两栏中输入内容，将覆盖拍照时输入的内容，用于修改拍照时可能出现的输入错误。

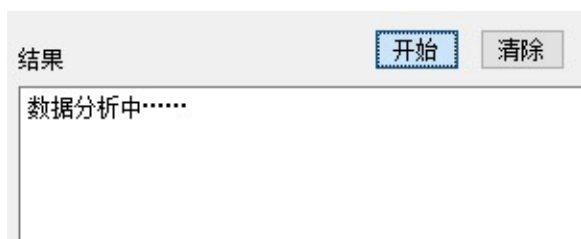
**备注信息：**输入图像的额外描述信息，用于记录各类不同情况

**额外信息：**当拖入图片为拼接好的大图，如 czi 等格式没有图像参数信息时，软件会自动弹框如下图所示。

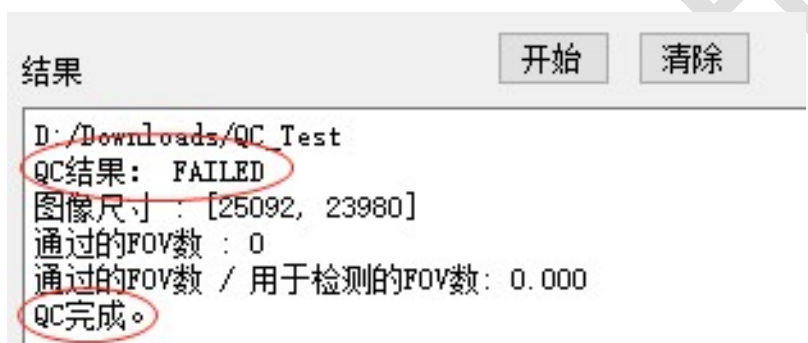
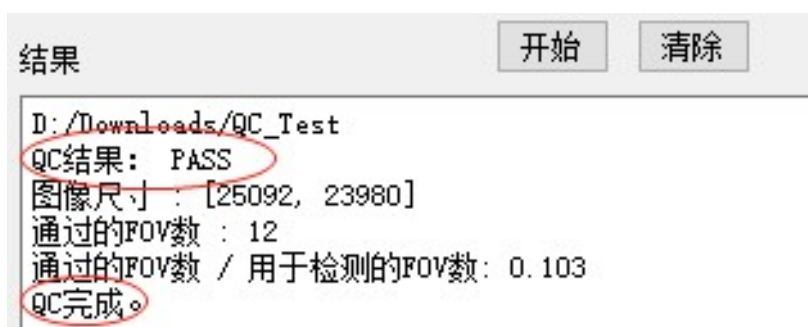
- **显微镜：**输入显微镜品牌英文名称，目前支持 Zeiss, Leica 和 Motic
- **芯片类型：**输入标准 STOmics 芯片型号，目前支持（FP2, SS2, DP8, DP84）
- **拍摄倍数：**输入拍摄时显微镜的放大倍数
- **图像比例：**输入拍摄图像的比例，单位为  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ （微米每像素），请至少输入三位小数
- **FOV 宽度，FOV 高度：**输入拍摄时的一个 FOV 的尺寸
- **Overlap：**输入相邻两个 FOV 拍照时的重叠比例（如果宽高的 overlap 不一样，取大的）



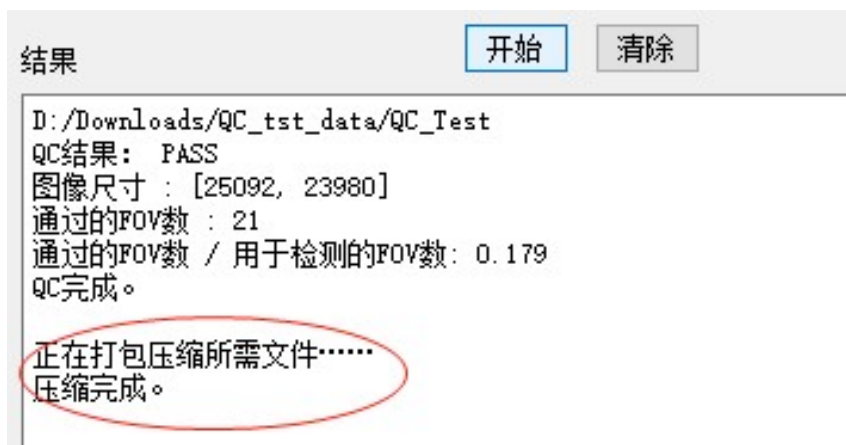
3. 点击“开始”按钮开始 QC，程序将显示“数据分析中”，此时正进行 QC 操作，等待完成即可。



4. QC 完成后，程序将显示 QC 结果，第二行显示 PASS 表示 QC 通过，FAILED 表示未通过（如果未通过请检查图片、芯片号或重新扫描拍照，重新拍照仍然不过请联系 FAS）；最后一行显示“QC 完成”表示 QC 流程正常结束。



5. QC 结束后，程序将把需要的文件打包成压缩文件，此时程序将显示“正在打包压缩所需文件”，结束后将显示“压缩完成”。



如不需要上传, 则图像 QC 至此完成, 点击“清除”按钮清空程序窗口中内容后即可拖入下一张图像进行 QC。

#### 6. 异常情况说明

1) 如输入芯片号等信息时输入了中文, 程序将弹出如下提示窗口:



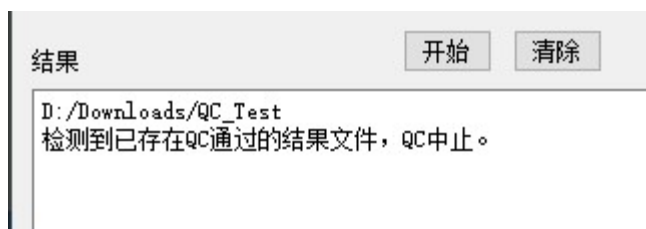
请确认输入的内容和图像路径不包含中文后重新开始 QC。

2) Motic 错误: 如显微镜输出的 info.ini 文件中存在中文, 程序将弹出如下窗口:



请检查并修改该文件中的内容后重新开始 QC。

3) 如 QC 结果输出目录已经存在同一芯片号 QC 通过的结果文件, 程序将显示如下内容:

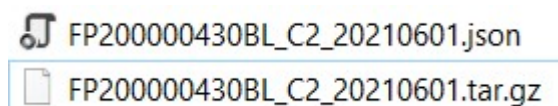


此时程序将自动跳过 QC 步骤至第 5 步结束。

注意：如之前已有相同芯片号的图片存在目录下，但又希望重新 QC 时，需到与 ImageQC 同级的 QCImgUpload 文件夹下，将需要重新 QC 的图像对应芯片号的结果文件移动至其他地方或删除。



同一芯片号对应的结果文件为一个 json 文件和一个 tar.gz 文件，如下图：



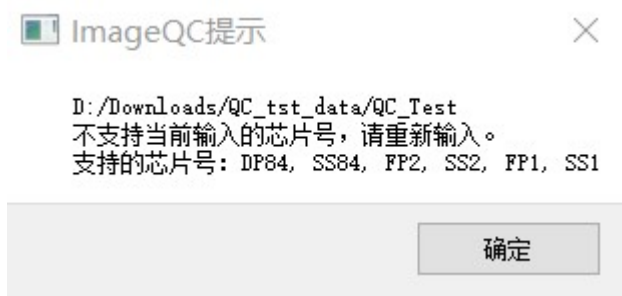
将这两个文件移动至其他地方或删除即可。

4) 若拍照时忘记填入芯片号、操作人员信息或填入不支持的芯片类型的芯片号，则 info 文件中相应信息将为空或错误。

此时若 QC 中也没有输入芯片号，将弹出如下提示窗口：



如输入了另一个错误的芯片号，将弹出如下提示窗口：



最后一行为支持的芯片类型。

5) 若拍照时没有输入邮箱，QC 中也没有输入邮箱前缀，将弹出如下提示窗口：



6) 发生预料之外的错误时，界面将提示“QC 出错，请联系开发人员”，请检查参数输入是否有误，若未能解决请将数据样本以及所填参数信息反馈给开发人员。



ImageQC 1.0.7

芯片号

SS200000145TR\_F4\_testbycc

操作人员

cc

图像路径

D:/test\_image2/SS200000145TR\_F4.tif

备注信息

注意事项: 请输入仅包含字母、数字、下划线的内容

结果

开始

清除

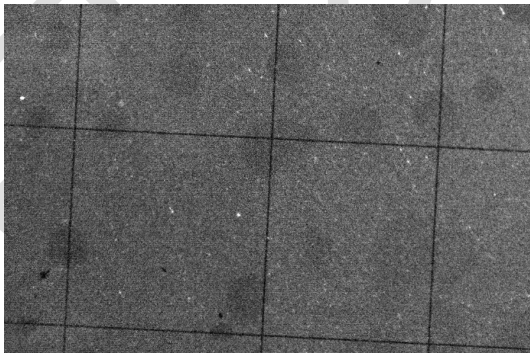
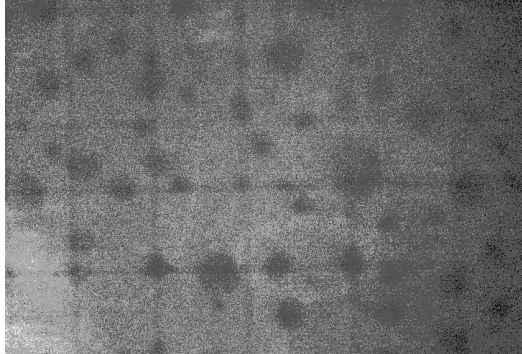
额外信息

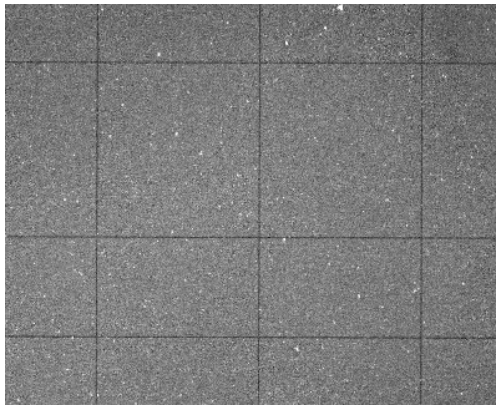
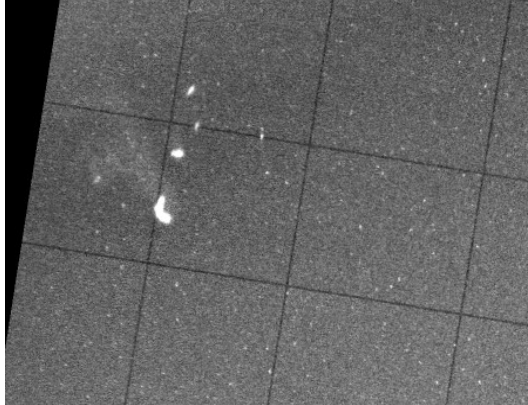
D:/test\_image2/SS200000145TR\_F4.tif

QC出错, 请联系开发人员

## 2.7 图片示例

以下提供部分图像示例供大家参考，以确保采集的图像质量能够通过 QC。

指标项	正确示例	错误示例
网格线		

<p>track 线倾 斜 角度° (小于 8°)</p>		
<p>划痕</p>	