



SeekMate 石蜡包埋组织细胞核分离试剂盒 操作说明书

K02301-0801&K02301-0802&K02101-0806&K02301-0803

V1.0

Envision the Future
预见未来

北京寻因生物科技有限公司

SeekMate 石蜡包埋组织细胞核分离试剂盒说明书

【产品名称】

SeekMate 石蜡包埋组织细胞核分离试剂盒

【包装规格】

8 测试/盒

【预期用途】

本品用于福尔马林固定石蜡包埋样本（Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded，简称 FFPE）切片的细胞核分离，目前仅用于科研不用于回输治疗。

【检验原理】

通过对 FFPE 组织切片进行脱蜡、一系列梯度复水、破坏细胞膜等操作后，暴露细胞核的过程。

【主要组成成分及储存条件】

SeekMate 石蜡包埋组织细胞核分离试剂盒按照试剂功能及储存条件分为：SeekMate FFPE 细胞核分离试剂盒、SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒、SeekMate FFPE 细胞核预解交联试剂盒。

名称及货号	数量	管盖颜色	组分	CN	8 tests/盒
SeekMate FFPE 细胞核分离 试剂盒 V1.0 K02301-0801	1	●	NLB	R0012901	10 mL
		●	WB1	R0013001	50 mL
		●	WB2	R0013101	10 mL
SeekMate FFPE 细胞核预解 交联试剂盒 V1.0 K02301-0802	1	●	Enzyme K2	R0013201	18 μL
		●	RNase Inhibitor	R0011903	140 μL
SeekMate 固定细胞/核保存试 剂盒 V1.0 K02301-0803	1	●	Buffer Q	R0013301	0.5 mL×8 管
		●	WB3	R0013401	10 mL
SeekOne® DD 单细胞解交联 试剂盒 V1.0 K02101-0806	1	●	Buffer S	R0012501	0.5 mL
		●	Buffer T	R0012601	0.5 mL
		●	DCL buffer	R0012301	0.5 mL* 2 管
		●	Enzyme K1	R0012401	90 μL* 2 管

注：《SeekMate 固定细胞/核保存试剂盒》不是 FFPE 样本提核的必备试剂盒，解离结束后如不进行后续实验可选择搭配使用，使用方法详见附录 1。

保存条件

SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒：室温保存，常温运输；

SeekMate FFPE 细胞核分离试剂盒：2~8 °C保存，常温运输；

SeekMate FFPE 细胞核预解交联试剂盒：-20±5 °C保存，干冰运输；

SeekMate 固定细胞/核保存试剂盒：-20±5 °C保存，干冰运输。

【有效期】

试剂有效期为 12 个月。

【样本要求】

1. 适用样本类型：本试剂盒适用于福尔马林固定石蜡包埋组织切片。
2. 样本收集注意事项：
 - 2.1 在取样时（尤其是病变组织）尽量避免取到坏死、钙化、硬化、纤维化的部位；
 - 2.2 如手术为电刀切割组织，需去除因与电刀接触的坏死组织；
 - 2.3 确保目标组织术时无冰冻；
 - 2.4 在取样后可对组织进行修剪，尽可能快速去除非目标部位后进行组织包埋操作，以免影响最终测序结果；
 - 2.5 提前考虑实验模型，是否会对细胞有影响；
 - 2.6 提前考虑药物治疗，是否会对细胞有影响；
 - 2.7 样本制备时，组织使用 10%中性福尔马林室温固定超过 24 h；组织平面大小>0.5cm²；
3. 样本储存：FFPE 组织蜡块、切片均以不高于常温条件储存。
4. 样本运输：常温运输。

【需自备的仪器和试剂】

自备仪器以及耗材名称	推荐型号	推荐厂商及货号
二甲苯	1 L/瓶	Millipore Sigma; 214736
无水乙醇	500 mL/瓶	生工; A500737
双蒸水	500 mL/瓶	生工; A500197
1×PBS 缓冲液	500 mL/瓶	生工; B540626
DNA Clean beads	450 mL/瓶	南京诺唯赞, N411-03
4%多聚甲醛固定液	500 mL/瓶	生工; E672002-0500
NGS™ RNA HS Assay Kit	1000 次/盒	ABP; FP008
Qubit™ RNA 高灵敏度定量试剂盒	500 测试/盒	Thermo; Q32855
KIMBLE Dounce 组织研磨套装	2 mL; 7 mL	KIMBLE; D8938; D9036
无菌细胞筛	20 μm	pluriStrainer 20μm;

	30 μm	43-50020-03 MACS®SmartStrainers? (30 μm) ; 130-110-915
剪刀	10 cm 直剪	/
细胞计数仪设备	CountStar Rigel S2; SeekMateTinitan 荧光细胞计数仪	Countstar, IN030101; 北京寻因生物, M002C
磁力架	0.2 mL , 24 孔 1.5 mL, 16 孔	Mich Scientific, Magpow-24 Invitrogen; 12321D
移液器	2.5 μL ; 10 μL ; 20 μL ; 200 μL ; 1,000 μL	Eppendorf, -; RAININ, -
支持 100 μL 深孔 PCR 仪	C1000 Eppendorf, 货号 International 6321 000.019 Thermo Fisher Scientific, 货号 4375786 Long Gene, 型号 A300 深模	BioRad, 1851196
核酸片段分析仪	Agilent 4200 TapeStation Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, G2991AA
	Agilent 2100 生物分析仪	Agilent, G2939BA
	Qsep400	Bioptic, Qsep400
High Sensitivity RNA ScreenTape 胶条	112 次/盒	Agilent,5067-5579
高灵敏度 RNA ScreenTape 样品缓冲液	500 μL /瓶	Agilent,5067-5580
PCR 管	0.2 mL; 0.5 mL	Axygen, PCR-02-L-C Corning; PCR-05-C
0.2 mL 八联排管	0.2 mL	Axygen, PCR-2CP-RT-C
离心管	5 mL; 15 mL; 50 mL	Axygen; --
Qubit 4.0	Qubit 荧光计	Thermo Fisher Scientific, Q33238
微型离心机	-	天根生化, OSE-MP25
振荡仪	MS3 (MS3.4/MS3.5)	IKA, -
恒温混匀仪	TCS10	杭州瑞诚仪器有限公司, -
DNase/RNase-free 低吸附 EP 管	-	Axygen, MCT-150-L-C
低吸附滤芯枪头	0.5-10 μL / 200 μL / 1000 μL	Axygen, T-300-L-R-S; T-200-C-L-R-S; T-1000-C-L-R-S

【使用方法】

1. 提核操作过程

实验前准备

- 提核过程中的试剂（NLB，WB1 和 WB2）实验前需添加 RNase Inhibitor（每 1 mL 试剂中添加 1 μ L RNase Inhibitor）。
- 提前将金属混匀仪设置到 55 $^{\circ}$ C 和 20 $^{\circ}$ C 待用。
- 按需配制 95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、50%乙醇、30%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h）。
- 如未明确标注操作温度步骤，建议在冰上进行。

1.1. 取 50 μ m FFPE 切片 1-2 卷置于 5 mL 离心管中备用。向蜡卷中加入 2 mL 二甲苯，常温放置 10 min 脱蜡，脱蜡期间可颠倒混匀离心管，随后去除二甲苯；重复该操作一次，确保脱蜡完全；

1.2. 室温条件下对组织进行梯度复水，具体操作如下：先加入 2 mL 100%乙醇颠倒混匀后静置 1min，可瞬离后去除上清，重复该清洗步骤一次；再依次使用 2mL 95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇、30%乙醇、ddH₂O 各孵育 1 min 后去除上清，完成复水过程；

注 1：切片机使用前使用 70%乙醇和 RNAzap 溶液擦拭；脱蜡操作需要在通风橱中完成。

注 2：组织较碎或较小时，去除液体前可瞬离后再吸取溶液。 

注 3：切片脱蜡复水后可以短时间内于 70%乙醇中保存，冰上放置备用。

注 4：如组织平切面积 < 0.5cm²，可适当增加 1-2 片切片进行脱蜡、清洗等后续操作。

注 5：二甲苯处理组织两次后，如仍可看到白色石蜡未去除完全，需再重复二甲苯脱蜡操作一次，确保脱蜡完全。 

1.3. 复水完成后，去除 ddH₂O，加 1 mL NLB，转移至玻璃研磨套组（885300-0007，KIMBLE）的玻璃管中，A 棒上下抽拉式研磨 10-20 下，B 棒上下抽拉式研磨 10-25 下，冰上孵育 5 min；

注 1：开始研磨即可开始计时，较难研磨样本可适当增加研磨次数。

注 2：较大组织可以先加入 100 μ L NLB 预冷剪刀剪碎后，补 900 μ L NLB 吹打混匀转移至研磨套组的玻璃管中。 

注 3：研磨状态以 A 棒从大片组织变成小组织，B 棒从小组织变为白色混浊悬液状态为宜。

1.4. 孵育后加 1 mL WB1 至研磨管中轻柔混匀提核液，使用 20 μ m 或者 30 μ m 无菌细胞筛过滤；

注：细胞筛使用前用 WB1 润洗筛网。

- 1.5. 使用2 mL WB1冲洗细胞筛；
- 1.6. 将过滤后的细胞核液混匀离心，4 °C 1000g，离心5 min；去上清；
- 1.7. 取 1 mL WB1重悬细胞核沉淀；混匀悬液后对细胞核进行计数检测；
- 1.8. 冰上放置5 min，细胞核液混匀离心，4 °C 1000g，离心5 min；去上清；

注：若上一步计数总细胞核量<20 w，则将离心速率调为 2000 g。 

- 1.9. 取120 μL WB2重悬细胞核沉淀；混匀悬液后对细胞核进行计数检测。

注1：如配合 SeekOne® DD FFPE 样本单细胞转录组试剂盒（K02101-08；K02101-02）使用，则进行步骤 2、3；如有其它使用，需自行测试。

注2：此步骤结束后 2 小时内不进行后续实验时，可搭配使用《SeekMate 固定细胞/核保存试剂盒》，保存至-80°C，最多保存 30 天，使用方法详见附录 1。

2. 细胞核RNA质检操作过程

- 2.1. 取2万步骤 1.8 中细胞核于新的 1.5 mL 离心管中，补WB2至25 μL，加25 μL DCL buffer和10 μL Enzyme K1（共60 μL），震荡混匀后，恒温混匀仪55 °C孵育15 min，80 °C孵育15 min；

注1：若细胞核浓度高，则取适量体积细胞核使用 WB2 稀释至细胞核浓度在 2000-3000 个/μL 便于准确取样质控；

注2：若细胞核浓度较低，DCL buffer 所用体积与 2 万细胞核悬液体积相同， Enzyme K1 用量保持不变。

注3：在使用过程中，DCL buffer 若出现白色固状或结晶，可 55 °C 加热至溶液透明后使用。

- 2.2. 孵育结束，瞬离后加入120 μL DNA Clean beads（2×），震荡混匀；
- 2.3. 将混匀好的产物室温静置10 min后瞬时离心，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

- 2.4. 保持在磁力架上加入800 μL 80% 乙醇，约30 sec后小心去除上清；重复此步骤一次；
- 2.5. 将闭盖的离心管瞬时离心，用10 μL移液器去除所有残留的上清，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
- 2.6. 开盖室温静置使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂，约3-5 min），加入15.5 μL Nuclease-free Water充分悬浮磁珠，室温静置2 min后瞬时离心；
- 2.7. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清15 μL至新的0.2 mL PCR管中。
- 2.8. Total RNA定量质检（1-10 μL样本浓度检测）和核酸片段检测。根据剩余细胞核量及质控结果确定是否进行后续实验步骤。

质控标准：

序号	RNA质控结果（2w细胞核）				判定结果
	QUBIT检测总量	4150/4200检测主峰	DV200	剩余细胞核量	
1	>25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	≧ 35 w☑	合格
2	>25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	5-35 w☑	风险
3	>25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	≧ 5 w☑	
4	>25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	≧ 5 w☑	
5	10-25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	≧ 5 w☑	
6	10-25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	≧ 5 w☑	
7	10-25 ng☑	>200 bp☑	>40 %☑	≧ 5 w☑	
8	/	/	/	<5 w☑	不合格
9	<10 ng☑	/	/	/	
10	/	>200 bp☑	>40 %☑	/	

3. 细胞核预处理操作过程

3.1. 试剂准备：

按照下表配制单样本所需WB3和重悬buffer：

组分	WB3（终浓度 50 U/mL）	重悬 buffer（终浓度 50 U/mL）
1×PBS	3 mL	1 mL
● RNase Inhibitor	3.75 μL	1.25 μL
● Buffer T	30 μL	/
Total	3 mL	1 mL

3.2. 使用WB2调整1.8中细胞核悬液浓度至3,500个-5,000 个/μL 。取100 μL细胞核悬液，加2 μL Enzyme K2、1 μL RNase Inhibitor和4 μL Buffer S，吹打混匀后，恒温混匀仪20 °C孵育15 min，80 °C孵育45 min；

注：由于样本差异较大，本步骤推荐上样细胞核数 35w-50w；若细胞核量介于 5w-35w 之间，处理条件不变。

3.3. 孵育结束后，4 °C 2000g，离心5 min，离心富集细胞核。去除上清，200 μL WB2重悬细胞核沉淀，混匀悬液后对细胞核进行计数检测；

3.4. 剩余细胞核加相应体积甲醛溶液固定，使甲醛有效成分终浓度约为2.5%，吹打混匀后室温固定10 min；

注：例如180 μL细胞核悬液需要加入300 μL 4%多聚甲醛固定液（有效成分4%），保证有效成分浓度在2.5 %左右。⚠

3.5. 固定结束后，加入1 mL WB3，吹打混匀后4°C 1000g，离心5 min去上清；

3.6. 用1 mL WB3 吹打混匀，4°C 1000g，离心5 min；重复此清洗步骤一次；

3.7. 去上清后，用重悬buffer重悬细胞核沉淀，混匀后对细胞核进行计数检测；

注：重悬浓度建议 1,500-2,500 cells/ μ L，根据预计浓度调整重悬体积。

3.8. 细胞核暂存于冰上或4 $^{\circ}$ C备用（30 min内进行下一步实验）。

注：此步骤结束后不进行后续实验时，可搭配使用《SeekMate 固定细胞/核保存试剂盒》，保存至-80 $^{\circ}$ C，最多保存7天，具体使用方法详见附录1。

【注意事项】

1. 试剂开瓶后，应按规定的贮存条件保存，并在有效期内使用，试剂过期后，不建议使用。
2. 有效期内，如发现 NLB 出现白色沉淀，混合后不影响正常使用。
3. 产品用完后废弃物按照相关医疗垃圾进行处理。
4. 本试剂盒结果会受到样品本身的来源、样品采集过程、样品质量、样品运输条件、样品预处理等因素影响，同时也受到 细胞核质量、操作环境等限制，使用者须了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性，只有经过培训，具有相应实验室技术的人员才能使用本试剂盒。

附录 1: 《SeekMate 固定细胞/核保存液说明书》

本品适用范围: FFPE 石蜡切片解离得到的细胞核; 甲醛固定后的细胞或细胞核。

1. 使用方法:

1.1. FFPE石蜡切片解离得到的细胞核

FFPE 样本按照《SeekMate 石蜡包埋组织细胞核分离试剂盒操作说明书》直接解离后待保存的细胞核(步骤 1.8 的细胞核悬液), 4 °C 1000 g 离心 5 min, 去上清; 取 400 μL buffer Q (建议 50w 以内细胞核) 重悬, 吹打混匀后可保存于-80 °C, 最长可保存 30 天。

FFPE 样本预处理后细胞核(步骤 3.8 的细胞核悬液), 4 °C 2000 g 离心 5 min, 去上清; 取 400 μL buffer Q (建议 50w 以内细胞核) 重悬, 吹打混匀后可保存于-80 °C, 最长可保存 7 天。

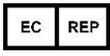
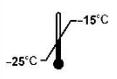
1.2. 甲醛固定后的细胞或细胞核

甲醛固定后的细胞或细胞核, 4 °C 1000 g离心5 min, 去上清; 取400 μL buffer Q (建议50w以内细胞核) 重悬, 吹打混匀后可保存于-80 °C, 最长可保存30天。

2. 保存后再使用处理方法

保存的细胞核溶液完全融化后加入 800μL WB3 吹打混匀, 4 °C 1000 g 离心 5 min, 去上清; 0.2 mL WB3 重悬吹打混匀后对细胞核进行计数检测; 冰上放置备用。

附录 2：包装符号释义

	制造商		欧盟代表
	体外诊断产品		保质期
	产品批次		产品货号
PN	试剂盒货号	CN	试剂瓶货号
	产品识别码		查阅使用说明书
	避免雨淋		避光保存
	如果包装损坏，请不要使用		注意
	生物危害		易碎
	储存温度为 -25 ~ -15 °C		CE 标识
	储存温度为 2 ~ 8 °C		