



SeekSpace®单细胞空间转录组试剂盒 操作说明书

V1.0

REF: K02501-02 (2 tests) , K02501-08 (8 tests)

K02501-0201&K02501-0202&K02501-0203&K00202-0201&K00801-0202&
K00801-0203&K00801-0803&K02101-0204&K00202-0205&K02101-0206&
K02101-0207&K02401-0808&K02401-0209

K02501-0201&K02501-0802&K02501-0803&K00202-0801&K00801-0802&
K00801-0803&K02101-0804&K00202-0805&K02101-0806&K02101-0807&
K02401-0808&K02401-0209

Envision the Future
预见未来

目录

声明	1
1、 产品介绍.....	2
1.1 产品简介	2
1.2 预期用途	2
1.3 使用者要求	2
1.4 检验方法的局限性.....	2
1.5 空间芯片与标签.....	3
1.6 实验原理和流程图示.....	4
1.7 建库流程	5
1.8 产品试剂组分	7
1.9 保存及运输条件.....	12
1.10 参数说明	12
1.11 配套使用的仪器和耗材.....	12
1.12 需自备的仪器和试剂.....	14
1.12.1 自备仪器及耗材.....	14
1.12.2 自备试剂/试剂盒.....	16
1.13 样本要求	16
1.13.1 适用样本类型	16
1.13.2 样本收集注意事项	16
1.13.3 样本储存.....	17
1.13.4 样本运输	17
1.13.5 样本质量要求	17
1.13.6 上样量建议	17
2、 操作步骤及建议.....	18
Step 1 带有空间标记的细胞核悬液制备.....	20
Step 1-1 实验前准备	20
Step 1-2 芯片准备	23
Step 1-3 切片准备	25
Step 1-4 组织贴片	26

Step 1-5 组织标记	28
Step 1-6 组织荧光拍照	30
Step 1-7 组织切片提核	31
Step 1-8 核悬液质检	34
Step 2 初步逆转录反应.....	35
Step 2-1 实验前准备	35
Step 2-2 初步逆转录反应.....	38
Step 3 油包水生成及 Barcode 标记.....	39
Step 3-1 实验前准备	39
Step 3-2 准备单细胞混合液.....	40
Step 3-3 向 Chip S3 加入试剂.....	40
Step 3-4 运行 SeekOne® DD.....	42
Step 3-5 转移生成的油包水.....	43
Step 3-6 油包水连接反应.....	44
Step 4 解交联和纯化.....	44
Step 4-1 实验前准备	44
Step 4-2 油包水破乳	45
Step 4-3 解交联	45
Step 4-4 纯化	46
Step 5 二次逆转录反应及逆转录产物纯化.....	47
Step 5-1 实验前准备	47
Step 5-2 二次逆转录反应.....	48
Step 5-3 二次逆转录产物纯化.....	48
Step 6 cDNA 和空间标签预扩增与纯化	49
Step 6-1 实验前准备	49
Step 6-2 预扩增	50
Step 6-3 预扩增产物纯化.....	50
Step 6-4 预扩增产物定量.....	51
Step 7 转录组 cDNA 扩增及表达文库构建.....	51
Step 7-1 实验前准备	51

Step 7-2 cDNA 扩增.....	52
Step 7-3 cDNA 纯化.....	53
Step 7-4 cDNA 产物质控.....	53
Step 7-5 表达文库扩增	54
Step 7-6 表达文库纯化	55
Step 7-7 表达文库质控	56
Step 8 空间标签文库扩增与纯化.....	56
Step 8-1 实验前准备	56
Step 8-2 文库扩增	57
Step 8-3 文库纯化	58
Step 8-4 空间标签文库质控.....	59
附录 1: 分组标签序列及 Index 序列.....	60
附录 2: 高通量测序	62
附录 3: 生物信息学分析.....	64
附录 4: 包装符号释义.....	65
附录 5: 修订历史	66

声 明

1、本试剂盒结果受样品来源、采集过程、质量、运输条件、预处理等因素影响，同时也受细胞核质量、操作环境等限制，使用者需了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性。

2、试剂盒使用完毕，废弃物按相关医疗垃圾处理。

1、产品介绍

1.1 产品简介

SeekSpace® 单细胞空间转录组技术是北京寻因生物科技有限公司自主研发的具有组织位置信息的单细胞空间转录组检测平台，其原理是通过空间芯片上可断裂的位置核酸序列标记组织切片上每个细胞核并制备成单细胞核悬液，然后通过 SeekOne® DD 微液滴平台进行高通量单细胞核转录组和位置序列共检测，利用共享的细胞标签将单细胞表达信息与空间位置信息一一对应，打破了常规空间转录组无法实现单细胞精度的技术局限。该技术同时配备分析软件 SeekSpace® Tools 及云平台 SeekSoul Online，为您提供一站式单细胞空间转录组解决方案。

SeekSpace® 单细胞空间转录组试剂盒包括：SeekSpace® 单细胞空间芯片（SeekSpace® Chip，简称空间芯片）、盖片（Space Chamber）、刮板（Tissue Scraper）、空间标记试剂、油包水芯片（SeekOne® DD Chip S3，简称 Chip S3）、垫片（Gasket）、油（Carrier Oil）、凝胶微珠（SeekOne® DD Barcoded Beads，简称 Barcoded Beads）、逆转录试剂、逆转录样本标签引物试剂、模板转换引物试剂、油包水连接试剂、解交联试剂、文库扩增试剂和纯化试剂。

1.2 预期用途

本试剂盒使用具有位置核酸序列的空间芯片对 OCT 包埋样本来源的组织切片中的细胞核进行空间位置标记，制备得到单细胞核悬液后使用带有分组标签的 Oligo-dT 和随机引物对单细胞核中的 mRNA 和空间标签进行分组标记，再通过油包水和核酸修饰的凝胶微珠对不同细胞核来源的 mRNA 和空间标签分别进行液滴标签标记，最终构建兼容真迈和 Illumina 测序平台的高通量单细胞转录组文库和单细胞空间标签文库，用于肿瘤微环境细胞互作、细胞发育图谱追踪、疾病发生发展机制等研究。

1.3 使用者要求

本试剂盒的操作人员主要是实验室人员。

应具有一定的分子生物学理论知识和操作技能，只有经过培训和合格后才能操作本试剂盒。

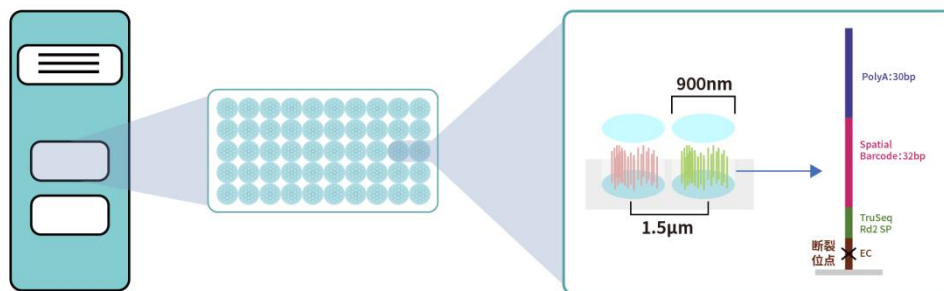
1.4 检验方法的局限性

本试剂盒仅适用于科研用途，不可用于临床诊断。

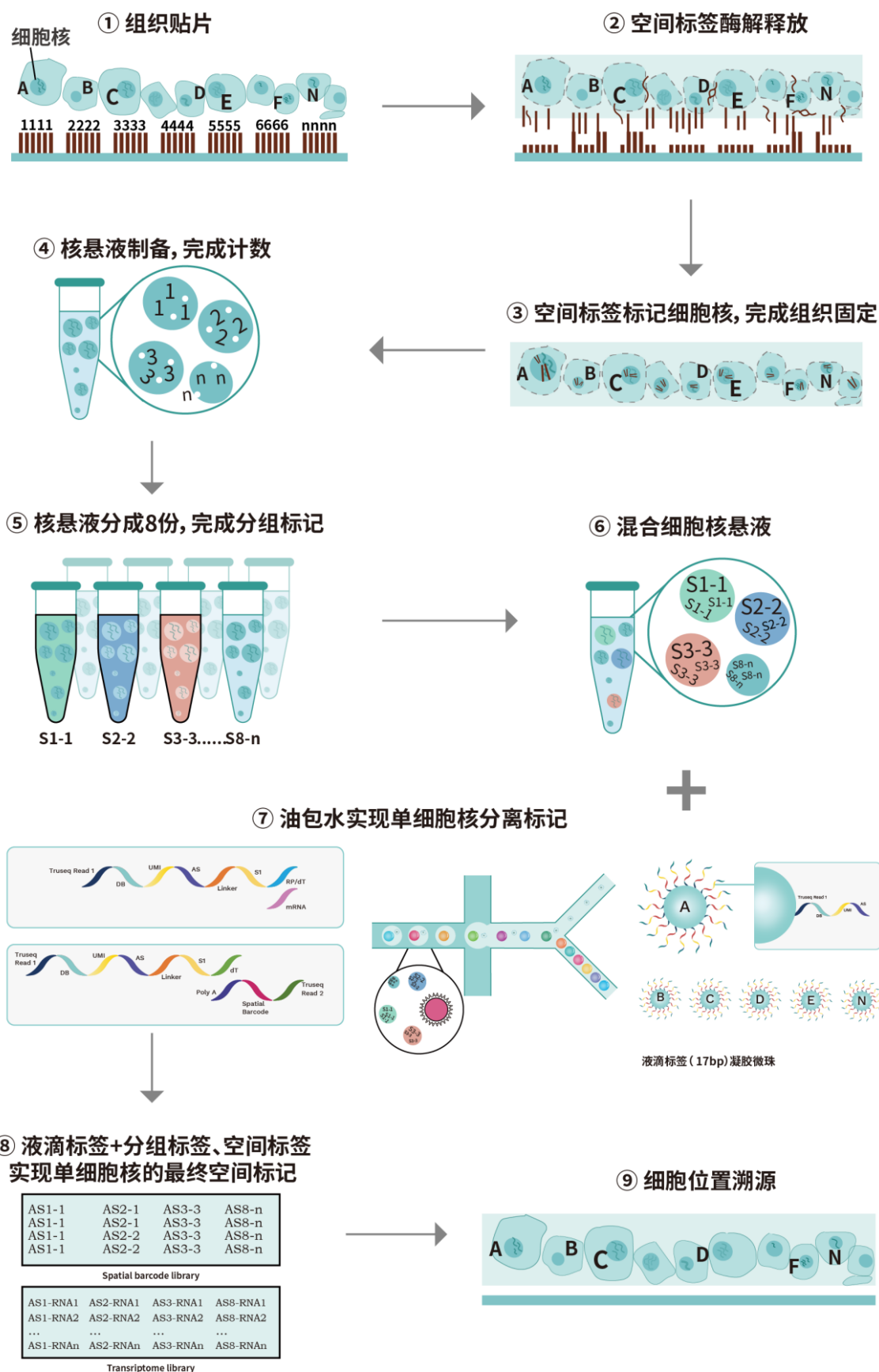
1.5 空间芯片与标签

SeekSpace® 空间芯片包含 2 个标记区域，每个标记区域大小为 $5.5 \times 15 \text{ mm}$ ，包含标签簇约 3000 万种，每个标签簇直径约为 900 nm，两个标签簇中心点间隔约为 $1.5 \mu\text{m}$ 。

标签簇由 EC、TruSeq Read2 Sequence Primer (TruSeq Rd2 SP)、Spatial Barcode 和 Poly A 组成。EC 序列上有条件性断裂位点以释放空间标签，TruSeq Rd2 SP 是 TruSeq Read2 测序引物序列，Spatial Barcode (32 bp) 是空间标签序列，Poly A (30 bp) 是分组标签引物的结合位点。



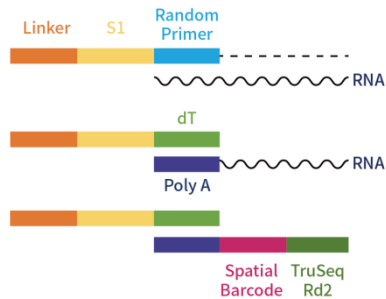
1.6 实验原理和流程图示



1.7 建库流程

1) 初步逆转录实现分组标记:

空间标签标记细胞核后，对切片进行固定并提取细胞核悬液，再使用分组标签对细胞核悬液进行初步逆转录，实现 mRNA 及空间标签的分组标记。

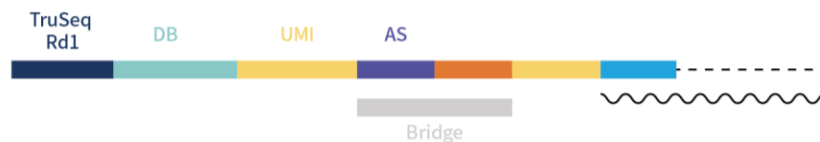


分组标签由三段核酸序列组成，包括 Linker、标签序列及引物序列。其中 Linker 是连接序列，用于完成与凝胶微珠液滴标记的桥式连接。标签序列一共有八种，空间标记完成的细胞核悬液会分成 8 份，实现分组标记，S1 是其中一种标签序列。引物序列包括随机引物 Random Primer 和 dT Primer 两种，dT Primer 用来捕获带有 Poly A 尾巴的空间标签序列和 mRNA 信息，Random Primer 能更充分捕获 mRNA 信息。

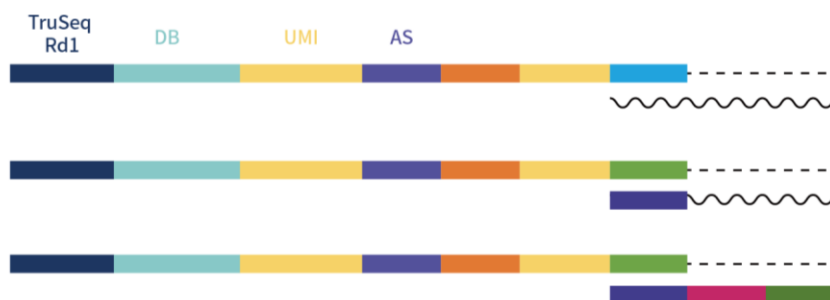
2) 油包水实现细胞标记:

油包水环节将液滴标签和分组标签进行桥式连接，最终通过液滴标签与分组标签的组合实现空间标签和转录组共享的超高通量单细胞标记。

桥式连接:



连接后产物:

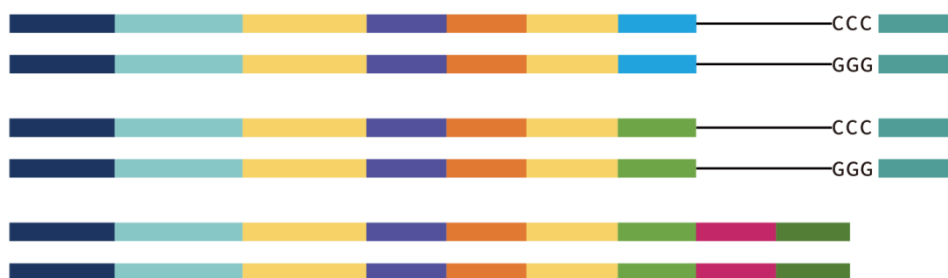


3) 解交联，完成二次逆转录：

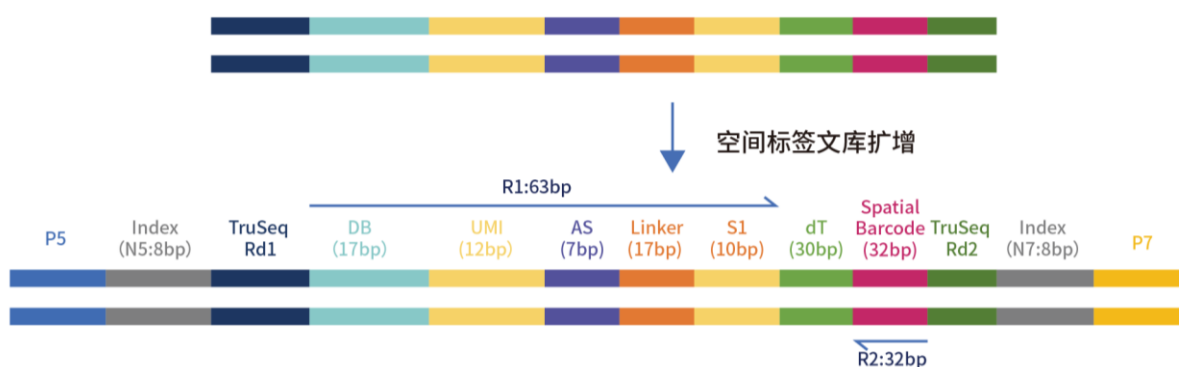
消化交联的蛋白，使之前未完全暴露的 mRNA 充分暴露，二次 RT 实现 cDNA 的充分延伸及模板转换。



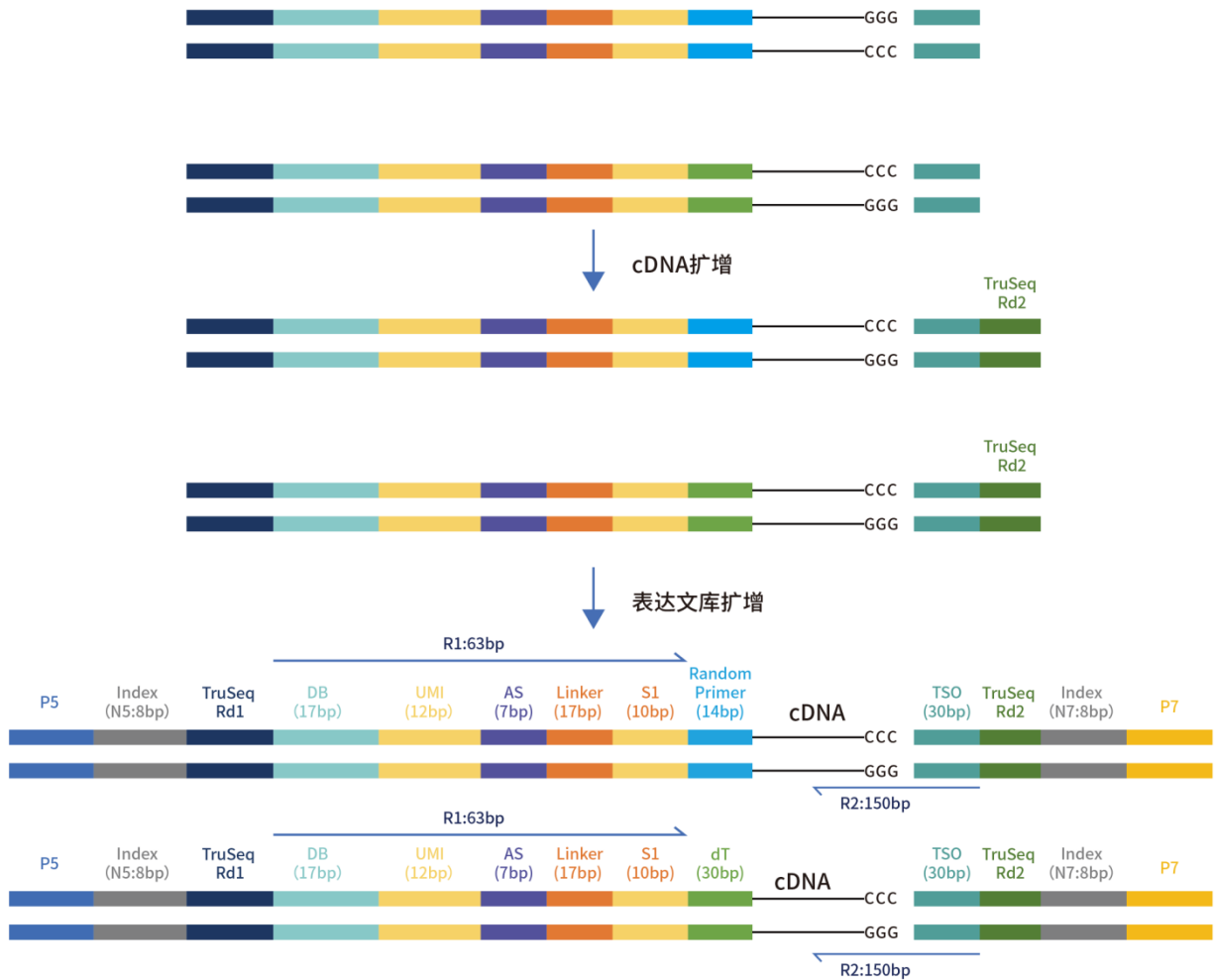
4) 预扩增，富集模板链：



5) 单细胞空间标签文库构建：



6) 单细胞转录组文库构建



1.8 产品试剂组分

SeekSpace® 单细胞空间转录组试剂盒按照试剂 功能及储存条件分为：SeekSpace® 单细胞空间芯片、SeekSpace® 单细胞空间芯片配件、SeekSpace® 单细胞空间标记试剂盒、SeekOne® DD S3 芯片试剂盒、SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒、SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒、SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒、SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒、SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒、SeekOne® DD 单细胞逆转录样本标签引物试剂盒、SeekOne® DD 单细胞模板转换引物试剂盒和 SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒。

表 1 SeekSpace® 单细胞空间转录组试剂盒, 2 tests, REF: K02501-02

产品名称/版本	数量	管盖颜色	组分	CN	装量/数量
SeekSpace® 单细胞空间芯片 V1.0					
K02501-0201	1	-	SeekSpace® Chip	-	1 张
2~8℃					
SeekSpace® 单细胞空间芯片配件 V1.0					
K02501-0202	1	-	Space Chamber	SP00055	2 张
室温					
SeekSpace® 单细胞空间标记试剂盒 V1.0					
K02501-0203	1	-	Tissue Scraper	SP00056	1 袋
-20±5℃					
		●	10× Labeling Buffer	R0015201	50 μL
		●	Labeling Enzyme	R0015301	25 μL
		●	Labeling Enhancer	R0015401	50 μL
		●	RNase Inhibitor-B	R0015501	12 μL
		●	NLB	R0012902	1.5 mL×2 管
		●	Fix Buffer B	R0015601	1.6 mL
		●	Buffer T	R0012601	0.5 mL
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0					
K00202-0201	1	-	SeekOne® DD Chip S3	R0003001	2 张
室温					
		-	Gasket	R0003101	2 张
		●	Carrier Oil	R0003201	0.6 mL
		●	Demulsion Agent	R0003301	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒 V1.2					
K00801-0202	1	○	Single Cell Whole Transcriptome Barcoded Beads	R0008601	45 μL ×2 管
-80℃					
		○	TSO	R0003601	10 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒 V1.2					
K00801-0203	1	●	3× RT Buffer	R0008401	80 μL
-20±5℃					
		●	RT Enzyme	R0003801	15 μL
		●	Reducing Buffer	R0003901	100 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒 V1.2					
K00801-0803	1	●	3× RT Buffer	R0008402	280 μL
-20±5℃					
		●	RT Enzyme	R0003802	50 μL
		●	Reducing Buffer	R0003901	100 μL
SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒 V1.0					
K02101-0204	1	●	DNA Ligase Mix	R0011801	15 μL
-20±5℃					
		●	RNase Inhibitor	R0011901	25 μL
		●	Primer R	R0012001	10 μL
		●	FFPE RT primers	R0012101	10 μL
		○	10× Ligation Buffer	R0012201	100 μL
SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒 V1.0					
K02101-0206	1	●	DCL Buffer	R0012301	0.5 mL
室温					
		●	Enzyme K1	R0012401	90 μL
		●	Buffer S	R0012501	0.5 mL
		●	Buffer T	R0012601	0.5 mL

表 1 SeekSpace® 单细胞空间转录组试剂盒, 2 tests, REF: K02501-02 (续)

产品名称/版本	数量	管盖颜色	组分	CN	装量/数量
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒 V1.0 K02101-0207 -20±5°C	1	●	2× PCR Master Mix	R0002102	240 μL
		●	Pre-Primers	R0012701	10 μL
		●	Post-Primers	R0012801	10 μL
		●	N501	R0004601	25 μL
		●	N502	R0004701	25 μL
		●	N701	R0005001	25 μL
		●	N702	R0005101	25 μL
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0205 2~8°C	2	○	Cleanup Beads	R0003401	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞逆转录样本标签引物试剂盒 V1.0 K02401-0808 -20±5°C	1	●	S1	R0013501	35 μL
		●	S2	R0013601	35 μL
		●	S3	R0013701	35 μL
		●	S4	R0013801	35 μL
		●	S5	R0013901	35 μL
		○	S6	R0014001	35 μL
		●	S7	R0014101	35 μL
		●	S8	R0014201	35 μL
		●	S9	R0014301	35 μL
		●	S10	R0014401	35 μL
		●	S11	R0014501	35 μL
		●	S12	R0014601	35 μL
		●	S13	R0014701	35 μL
		○	S14	R0014801	35 μL
		●	S15	R0014901	35 μL
		●	S16	R0015001	35 μL
SeekOne® DD 单细胞模板转换引物试剂盒 V1.0 K02401-0209 -80°C	1	○	TSO	R0003602	20 μL

表 2 SeekSpace® 单细胞空间转录组试剂盒, 8 tests, REF: K02501-08

产品名称/版本	数量	管盖颜色	组分	CN	装量/数量
SeekSpace® 单细胞空间芯片 V1.0					
K02501-0201	4	-	SeekSpace® Chip	-	4 张
2~8℃					
SeekSpace® 单细胞空间芯片配件 V1.0		-	Space Chamber	SP00055	8 张
K02501-0802	1	-	Tissue Scraper	SP00056	1 袋
室温					
SeekSpace® 单细胞空间标记试剂盒 V1.0			10× Labeling Buffer	R0015202	200 μL
K02501-0803	1		Labeling Enzyme	R0015302	100 μL
-20±5℃			Labeling Enhancer	R0015401	50 μL
			RNase Inhibitor-B	R0015502	50 μL
			NLB	R0012902	1.5 mL×8 管
			Fix Buffer B	R0015601	1.6 mL
			Buffer T	R0012601	0.5 mL
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0		-	SeekOne® DD Chip S3	R0003001	8 张
K00202-0801	1	-	Gasket	R0003101	8 张
室温			Carrier Oil	R0003202	1.2 mL×2 管
			Demulsion Agent	R0003302	1.8 mL
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒 V1.2			Single Cell Whole Transcriptome Barcoded Beads	R0008601	45 μL ×8 管
K00801-0802	1		TSO	R0003602	20 μL
-80℃			3× RT Buffer	R0008402	280 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒 V1.2			RT Enzyme	R0003802	50 μL
K00801-0803	5		Reducing Buffer	R0003901	100 μL
-20±5℃			DNA Ligase Mix	R0011802	50 μL
SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒 V1.0			RNase Inhibitor	R0011902	100 μL
K02101-0804	1		Primer R	R0012002	30 μL
-20±5℃			FFPE RT Primers	R0012102	30 μL
			10× Ligation Buffer	R0012201	100 μL
SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒 V1.0			DCL Buffer	R0012301	0.5 mL×2 管
K02101-0806	1		Enzyme K1	R0012401	90 μL×2 管
室温			Buffer S	R0012501	0.5 mL
			Buffer T	R0012601	0.5 mL

表 2 SeekSpace® 单细胞空间转录组试剂盒, 8 tests, REF: K02501-08 (续)

产品名称/版本	数量	管盖颜色	组分	CN	装量/数量
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒 V1.0 K02101-0807 -20±5°C	1		2× PCR Master Mix	R0002102	240 µL×4 管
			Pre-Primers	R0012702	30 µL
			Post-Primers	R0012802	30 µL
			N501	R0004601	25 µL
			N502	R0004701	25 µL
			N503	R0004801	25 µL
			N504	R0004901	25 µL
			N701	R0005001	25 µL
			N702	R0005101	25 µL
			N703	R0005201	25 µL
			N704	R0005301	25 µL
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0805 2~8°C	2		Cleanup Beads	R0003402	1.75 mL
SeekOne® DD 单细胞逆转录样本标签 引物试剂盒 V1.0 K02401-0808 -20±5°C	1		S1	R0013501	35 µL
			S2	R0013601	35 µL
			S3	R0013701	35 µL
			S4	R0013801	35 µL
			S5	R0013901	35 µL
			S6	R0014001	35 µL
			S7	R0014101	35 µL
			S8	R0014201	35 µL
			S9	R0014301	35 µL
			S10	R0014401	35 µL
			S11	R0014501	35 µL
			S12	R0014601	35 µL
			S13	R0014701	35 µL
			S14	R0014801	35 µL
			S15	R0014901	35 µL
			S16	R0015001	35 µL
SeekOne® DD 单细胞模板转换引物试 剂盒 V1.0 K02401-0209 -80°C	4		TSO	R0003602	20 µL

1.9 保存及运输条件

名称	保存温度	运输温度
SeekSpace® 单细胞空间芯片	2~8℃	常温
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒	2~8℃	常温
SeekSpace® 单细胞空间芯片配件	室温	常温
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒	室温	常温
SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒	室温	常温
SeekSpace® 单细胞空间标记试剂盒	-20±5℃	干冰
SeekOne® DD 单细胞逆转录样本标签引物试剂盒	-20±5℃	干冰
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒	-20±5℃	干冰
SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒	-20±5℃	干冰
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒	-20±5℃	干冰
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒	-80℃	干冰
SeekOne® DD 单细胞模板转换引物试剂盒	-80℃	干冰

注：干冰运输时，收到产品后请检查干冰是否还有剩余。

1.10 参数说明

1. 样本通量：每张空间芯片上有 2 个标记区域；
2. 单个标记区域尺寸为 5.5 × 15 mm；
3. Chip S3 是单通道芯片，根据需要单次可灵活运行 1-8 个芯片；
4. 油包水速率：3 min 生成 15 万个油包水液滴。

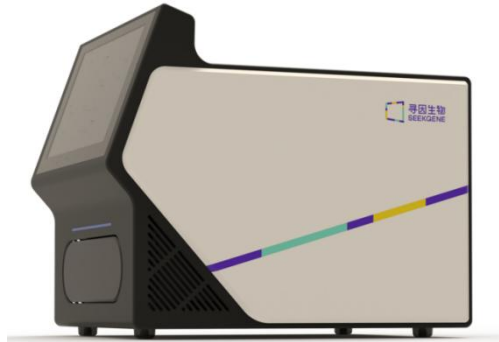
注：空间芯片装于真空密封的铝袋中，常温运输。收到产品后需立即将未开封的空间芯片储存在 2~8℃。若开封后未使用，需重新将芯片放置芯片盒中干燥密封并储存在 2~8℃。重新密封的空间芯片放置不可超过一个月。

1.11 配套使用的仪器和耗材

1. SeekSpace® 芯片夹（SeekSpace® sc-Spatial Chip Holder，简称 Space Holder）：与空间芯片配套使用。



2. SeekOne® 数字液滴仪 (SeekOne® Digital Droplet System)



3. SeekOne® DD 配件 (SeekOne® DD Accessories)：每台仪器配套 1 套该配件，包括以下两个部分：

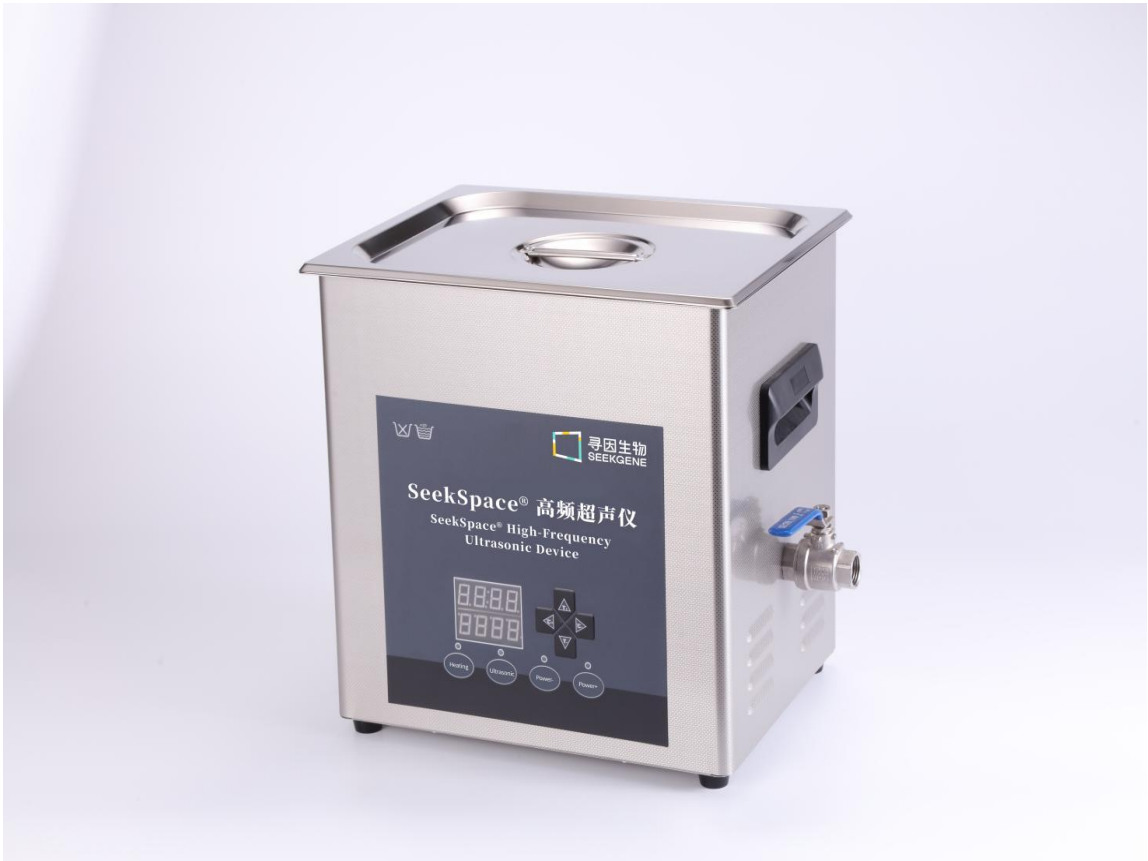
1) SeekOne® DD 芯片夹具 (SeekOne® DD Chip Holder, 简称 Chip Holder)：与 SeekOne® 数字液滴仪及 Chip S3 配套使用；



2) 占位芯片 (Placed Chip, 简称 Chip P)：放置于芯片夹具中 (每台仪器附带 8 张 Chip P)；样本量不足 8 个时，Chip P 置于未添加样品孔位。

4. SeekSpace® 高频超声仪 (SeekSpace® High-Frequency Ultrasonic Device)

通过调整工作频率、功率以及作用的时间实现超声振荡的作用，该震荡作用力可以很好的降低细胞悬液中的结团率，增加细胞核量得率。



注：SeekSpace® 高频超声仪的具体使用操作要求详见《SeekSpace® 高频超声仪使用说明》。

1.12 需自备的仪器和试剂

1.12.1 自备仪器及耗材

自备仪器以及耗材名称	推荐品牌及货号
细胞计数设备	北京寻因生物，M002C
	Countstar，IN030101
冰冻切片机	Leica，CM1950
	达科为，CT520
荧光显微镜（拼接功能）	Leica，DMi8
高速冷冻离心机	Thermo Fisher Scientific，75009880
	湘仪，H1850R
核酸片段分析仪	Agilent，G2991AA（Agilent 4200 TapeStation 系统）
	Agilent，G2939BA（Agilent 2100 生物分析仪）
	Bioptronic，Qsep400
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific，4375786

自备仪器以及耗材名称	推荐品牌及货号
	Long Gene, A300 深模
	BioRad, 1851196 (C1000)
微型离心机	天根生化, OSE-MP25
振荡仪	IKA, MS3 basic (圆周震荡器及附件)
恒温混匀仪	杭州瑞城, TCS10
研磨棒	KIMBLE, D8938
40 μ m 细胞筛	NEST, 258369
	Corning, 352340
30 μ m 细胞筛	MACS [®] Smart Strainers 30 μ m, 130-110-915
20 μ m 细胞筛	PluriStrainer 20 μ m, 43-50020-03
0.2 mL 磁力架	Mich Scientific, Magpow-24
1.5 mL 磁力架	Thermo Scientific DynaMag, 12321D
移液器	Eppendorf, 2.5 μ L/10 μ L/20 μ L/200 μ L/1, 000 μ L
	RAININ, 2.5 μ L/10 μ L/20 μ L/200 μ L/1, 000 μ L
0.2 mL PCR 管	Axygen, PCR-02-L-C
0.2 mL 八联排管	翌圣生物, 83602ES03
Qubit 4.0	Thermo Fisher Scientific, Q33238
50 mL 离心管	Corning, 430829
5 mL 离心管	Axygen, MCT-500-C
1.5 mL 离心管	Axygen, MCT-150-L-C
0.5mL 平盖 PCR 管	Axygen, PCR-05-C
DNase/RNase-free 低吸附 EP 管	Axygen, MCT-150-L-C
低吸附滤芯枪头	Axygen, T-300-L-R-S/T-200-C-L-R-S/ T-1000-C-L-R-S
空气罐	MATIN, M-6318

1.12.2 自备试剂/试剂盒

试剂名称	推荐品牌及货号
1X PBS 缓冲液	生工, B540626
	寻因, R0015801
RNAse Inhibitor-A (40 U/μL)	Enzymatics, Y9240-40000
	诺唯赞, R301-03
OCT	樱花牌, 4583
	Scigen, 4586
Qubit ssDNA Assay Kit	Invitrogen, Q10212
	ABP, FP006
无水乙醇 (分析纯)	Millipore Sigma, E7023-500ML
Nuclease-Free Water	Thermo Fisher Scientific, AM9937
无尘纸	金佰利, 34155
DNA 分选磁珠	Beckman Coulter, B23318/A63882
	诺唯赞, N411-03
AO/PI 细胞染色液	寻因, K01701
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Q32854
片段分析仪配套试剂	
High Sensitivity D1000 ScreenTape/Reagents	Agilent, 5067-5592/5067-5593
High Sensitivity D5000 ScreenTape/Reagents	Agilent, 5067-5584/5067-5585
S1-高分辨率定量试剂盒	Bioptrix, C105202/C105802/C405102

1.13 样本要求

1.13.1 适用样本类型

- 适用于 OCT 包埋新鲜冷冻组织 (实体组织); 不适宜骨组织等不易切片样本、心脏组织等提核后杂质多易结团样本、胰腺组织等 RNA 易降解样本。

1.13.2 样本收集注意事项

- 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;
- 如手术为电刀切割组织, 去除因与电刀接触的坏死组织;

- 实验室条件下严格保证新鲜样本在离体 30min 内进行直接包埋处理，以最大程度避免组织内部 RNA 降解；
- 组织包埋完整，不能有外露的情况，防止样本降解；
- 支持对冻存组织包埋处理后进行实验；
- 组织切片面积不小于 3×3mm；组织厚度不小于 3mm；
- 提前考虑实验模型，是否会对细胞有影响；如小鼠肺部打入二氧化硅颗粒后，二氧化硅密度和细胞类似，后续无法去除干净；
- 提前考虑药物治疗，是否会对细胞有影响，如肿瘤治疗后，大部分肿瘤细胞凋亡后形成的碎片不易与细胞区分，影响细胞质检有核率。

1.13.3 样本储存

- 将 OCT 包埋组织放入密封袋中，放入-80℃冰箱保存，建议冻存时间不超过 3 个月。

1.13.4 样本运输

- 密封好的 OCT 包埋组织平稳放置在有干冰的保温箱中运输。

1.13.5 样本质量要求

- 为保证样本质量，降低实验风险，建议切取 10-20 片 10 μm 厚的组织切片，进行 Total RNA 的提取和质量检测，强烈建议只对 RQN/RIN ≥ 7 的组织样本进行后续实验操作。

1.13.6 上样量建议

- 单个样本标记区域的初步逆转录总细胞核数不超过 24 万，初步逆转录单管反应细胞核上样量不少于 600 且不超过 3 万；
- 单个油包水连接反应的细胞核上样量不超过 12 万。

2、操作步骤及建议

总用时	操作步骤	分步用时
Step 1 带有空间标记的细胞核悬液制备		
~ 3 h	Step 1-1 实验前准备	~30 min
	Step 1-2 切片准备	~20 min
	Step 1-3 芯片准备	~5 min
	Step 1-4 组织贴片	~30 min
	Step 1-5 组织标记	15 min
	Step 1-6 组织荧光拍照	~12 min
	Step 1-7 组织切片提核	~60 min
	Step 1-8 核悬液质检	~10 min
Step 2 初步逆转录反应		
~ 2 h	Step 2-1 实验前准备	~15 min
	Step 2-2 初步逆转录反应	100 min
Step 3 油包水生成及 Barcode 标记		
~ 2.5 h	Step 3-1 实验前准备	~50 min
	Step 3-2 准备单细胞混合液	~10 min
	Step 3-3 向 Chip S3 加入试剂	~5 min
	Step 3-4 运行 SeekOne® DD	4.5 min
	Step 3-5 转移生成的油包水	~5 min
	Step 3-6 油包水连接反应	70 min
 停止点：4°C过夜，或-80°C储存≤4 天		
Step 4 解交联和纯化		
~1.5 h	Step 4-1 实验前准备	~15 min
	Step 4-2 油包水破乳	~2 min
	Step 4-3 解交联	30 min
 停止点：破油后的液体加入试剂震荡混匀后可-80°C过夜保存； 解交联结束后可-80°C过夜保存。		

总用时	操作步骤	分步用时
	Step 4-4 纯化	~40 min
Step 5 二次逆转录反应及逆转录产物纯化		
	Step 5-1 实验前准备	~20 min
	Step 5-2 二次逆转录反应	90 min
~2.5 h	 停止点：4°C 储存≤ 72 h，或-20°C 储存≤ 1 周。	
	Step 5-3 二次逆转录产物纯化	~30 min
	 停止点：4°C 储存≤ 72 h，或-20°C 储存≤ 1 周。	
Step 6 cDNA 和空间标签预扩增与纯化		
	Step 6-1 实验前准备	~10 min
	Step 6-2 预扩增	25 min
~1 h	Step 6-3 预扩增产物纯化	~30 min
	 停止点：4°C 储存≤ 72 h，或-20°C 储存≤ 1 个月。	
	Step 6-4 预产物定量	-
Step 7 转录组 cDNA 扩增及表达文库构建		
	Step 7-1 实验前准备	~10 min
	Step 7-2 cDNA 扩增	30 min
	Step 7-3 cDNA 纯化	~30 min
	 停止点：-20°C 储存≤ 1 个月。	
~2.5 h	Step 7-4 cDNA 产物质控	~15 min
	Step 7-5 表达文库扩增	30 min
	Step 7-6 表达文库纯化	~30 min
	 停止点：-20°C 储存≤ 6 个月。	
	Step 7-7 表达文库质控	~15 min
Step 8 空间标签文库扩增与纯化		
	Step 8-1 实验前准备	~10 min
~2 h	Step 8-2 文库扩增	50 min
	Step 8-3 文库纯化	~30 min

总用时	操作步骤	分步用时
	 停止点：-20°C 储存≤ 6 个月。	
	Step 8-4 空间标签文库质控	~15 min

Step 1 带有空间标记的细胞核悬液制备

Step 1-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekSpace® 单细胞 空间标记试剂盒	10× Labeling Buffer	●	-20°C	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	NLB	●			
	Labeling Enzyme	●			
	RNase Inhibitor-B	●		室温	充分振荡后瞬时离心，室温放置备用
	Buffer T	●			
	Fix Buffer B	●			
	Labeling Enhancer	●		冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
SeekSpace® 单细胞 空间芯片	SeekSpace® Chip	-	2~8°C	室温	取出记录编号后用 Nuclease-Free Water 冲洗，吹干，勿碰触标记区域位置，放置芯片盒内室温备用
SeekSpace® 单细胞 空间芯片配件	Tissue Scraper	-	室温	室温	刮板
	Space Chamber	-	室温	室温	盖片
自备试剂	1× PBS	-	室温	室温	-
	ssDNA Reagent	-	2~8°C	冰上	-
	Nuclease-Free Water	-	室温	室温	-
	RNase Inhibitor-A	-	-20°C	冰上	瞬时离心，置于冰盒上备用
	OCT	-	室温	冰上	冰上预冷
	干冰	-	阴凉	阴凉	-
自备耗材	毛刷	-	室温	-20°C	提前在冰冻切片机中冷却

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
				(冰冻切片机)	
	刀片	-	室温	-20°C (冰冻切片机)	提前在冰冻切片机中冷却
	无尘纸	-	室温	室温	-
	空气罐	-	室温	室温	-
	研磨棒	-	室温	室温	使用前用 1X PBS-RI 清洗
	40 μm 细胞筛	-	室温	室温	使用前用 Wash Buffer 湿润
	30 μm 细胞筛	-	室温	室温	使用前用 Wash Buffer 湿润
	50 mL 离心管	-	室温	室温	-
	5 mL 离心管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-
	移液器	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- 提前将 PCR 仪 1 温度设置到 4°C Hold, 4°C 5 min, 37°C 10 min, 热盖温度为 42°C; PCR 仪 2 温度设置到 37°C Hold, 无需热盖;
- 冷冻切片机箱体预冷至-20°C, 样本头预冷至-15°C~-10°C;
- 超声仪频率 20KHz, 超声功率 50 W, 水放置到超声仪水槽 1/4 的位置, 温度不打开;
- 荧光显微镜: 实验前打开备用;
- 高速冷冻离心机: 温度降至 4°C 备用;
- 细胞计数仪设备: 打开备用;
- 微型离心机: 打开备用;
- 振荡仪: 打开备用;
- 恒温混匀仪: 打开备用。

3 试剂配制

a、Wash Buffer、1X PBS-RI 配制：

组分	Wash Buffer	1X PBS-RI
1× PBS（自备）	18 mL	11 mL
RNase Inhibitor-A（自备）	450 μL	275 μL
● Buffer T	180 μL	/
Total	18.63 mL	11.275 mL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 2 个标记区域所需用量。

b、固定液配制：

组分	固定液
1× PBS（自备）	120 μL
● Fix Buffer B	360 μL
Total	480 μL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 2 个标记区域所需用量。

c、N-1 反应液配制：

组分	N-1
● 10× Labeling Buffer	33 μL
● Labeling Enzyme	22 μL
● Labeling Enhancer	3.3 μL
● RNase Inhibitor-B	8.25 μL
ssDNA Reagent（自备）	1 μL
Nuclease-Free Water（自备）	262.45 μL
Total	330 μL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 2 个标记区域所需用量。

d、提核液配制：

组分	提核液
● NLB	3 mL
RNAse Inhibitor-A（自备）	75 μ L
Total	3.075 mL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 2 个标记区域所需用量。

Step 1-2 芯片准备

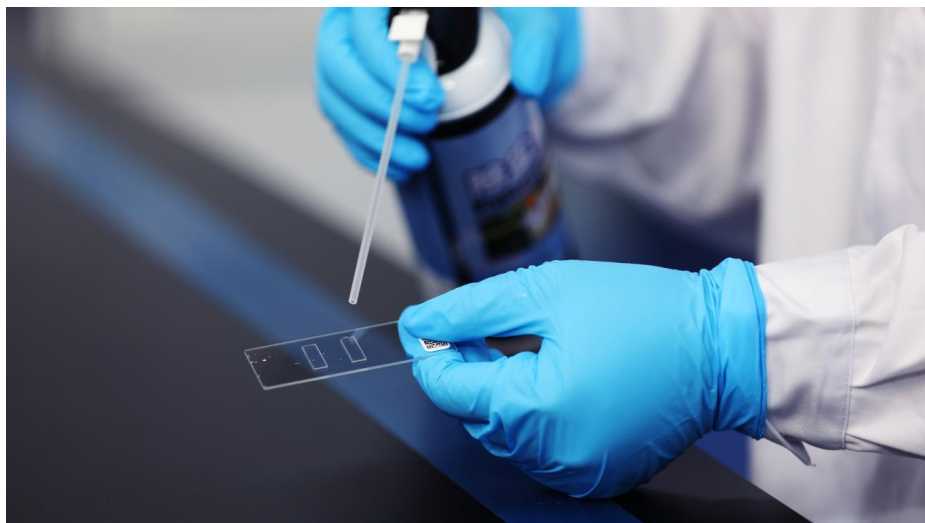
1. 取空间芯片：从真空干燥铝箔袋中取出空间芯片，记录空间芯片正面的编号，标记区域正面含有用于标记细胞核位置的空间标签，请勿触碰标记区域正面；



2. 手持空间芯片的编号区域在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中上下抽拉式清洗 5-10 次；



3. 清洗后先用无尘纸吸干空间芯片背面和标记区域周围多余的液体，然后再用空气罐吹干或者直接晾干标记区域四周及正面的液体；



4. 当标记区域正面无杂质、无明显痕迹、无任何液体残留、无波纹状纹理，即可准备贴片。



Step 1-3 切片准备

1. 将 OCT 包埋的组织块从-80℃冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 30 min；
2. 使用 OCT 将组织块按照目的切面朝上固定到适配切片机的样品托上，然后将样品托固定到切片机上；



3. 使用切片机进行组织修片，切去组织块上的 OCT，露出组织，确定切片位置；
4. 根据需要使用刀片对组织目的区域做最后地修剪（切面小于 $5.5 \times 15 \text{ mm}$ ），以确保组织切片能更好地适配标记区域，随后可进行冷冻切片；

注 1：切片厚度通常为 $10\text{-}20 \mu\text{m}$ ，细胞核直径为 $3\text{-}5 \mu\text{m}$ 组织建议切片厚度为 $10 \mu\text{m}$ ，细胞核直径为 $6\text{-}10 \mu\text{m}$ 组织建议切片厚度为 $14 \mu\text{m}$ ，细胞核直径 $> 10 \mu\text{m}$ 组织建议切片厚度为 $20 \mu\text{m}$ ，细胞核量较少的组织建议切片厚度为 $14\text{-}20 \mu\text{m}$ ；

注 2：切片前需将所有样本均修至目标区域附近，减少样本间修片时间；

注 3：如果需要拼片，单个标记区域所贴的切片最多不超过 3 张，请把需拼在一起的样本进行顺序排列，拼片组织切片间建议最少预留出 2 mm 间隔，每增加一张切片最少预留出 2 mm 间隔，防止贴片时导致样本重叠或者贴到标记区域外；

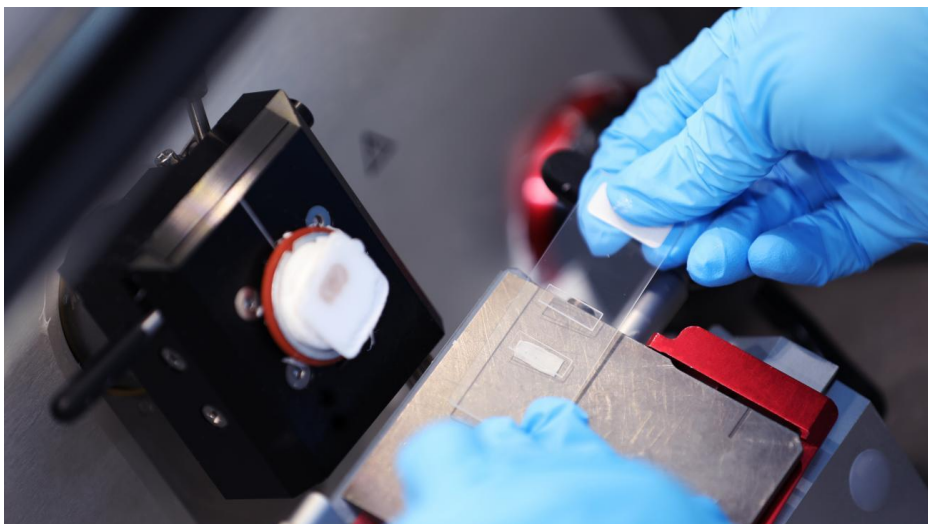
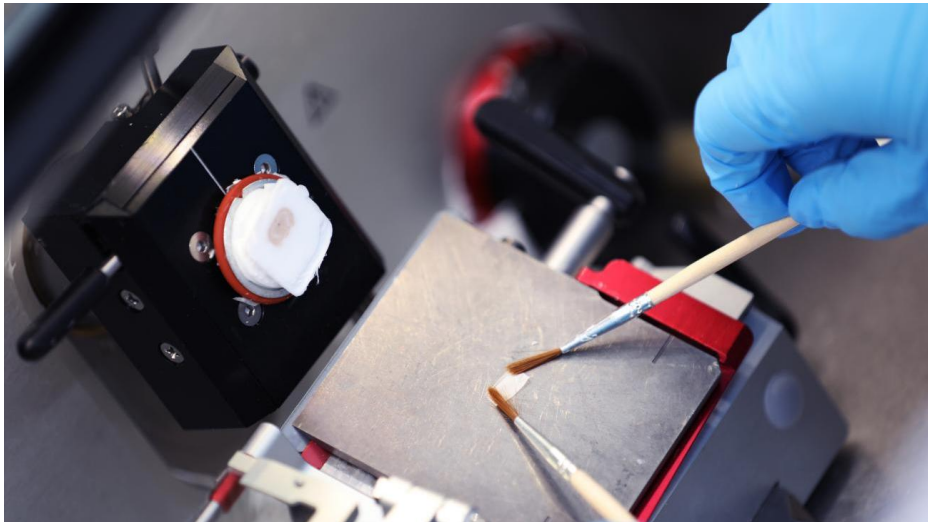
注 4：拼片样本建议选择相同组织类型且组织病理结构相似的样本；

注 5：根据需要可选择相邻切片进行 HE 染色。

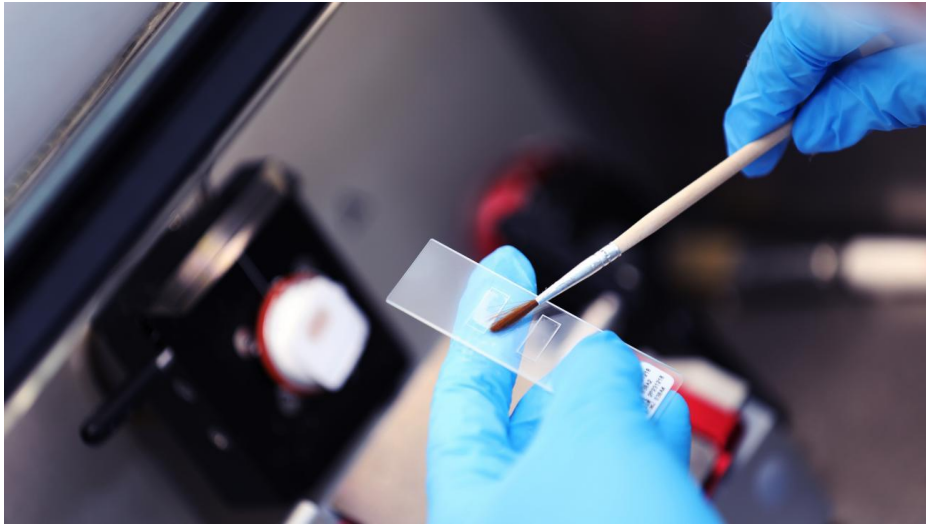


Step 1-4 组织贴片

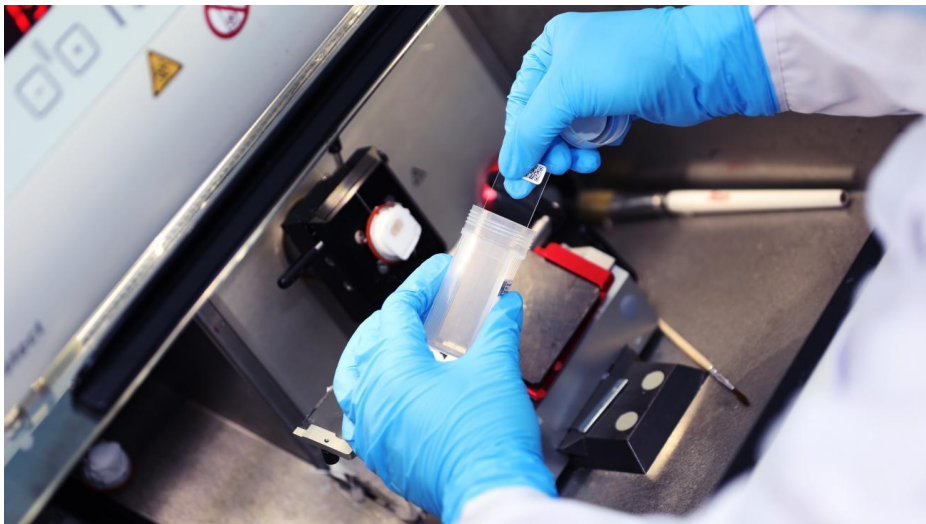
1. 将空间芯片正面朝上置于切片机中，预冷 2 min;
2. 切取组织切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，将目标区域切片移到切片台右侧靠近边缘处，拿起空间芯片的标签位置，使芯片正面朝下，对准切片轻轻一压；



3. 立即拿起空间芯片，用指腹放在空间芯片背面加温几秒钟，直至切片贴合；



4. 将贴好组织的空间芯片正面朝上放回芯片盒中，芯片盒放于干冰内；

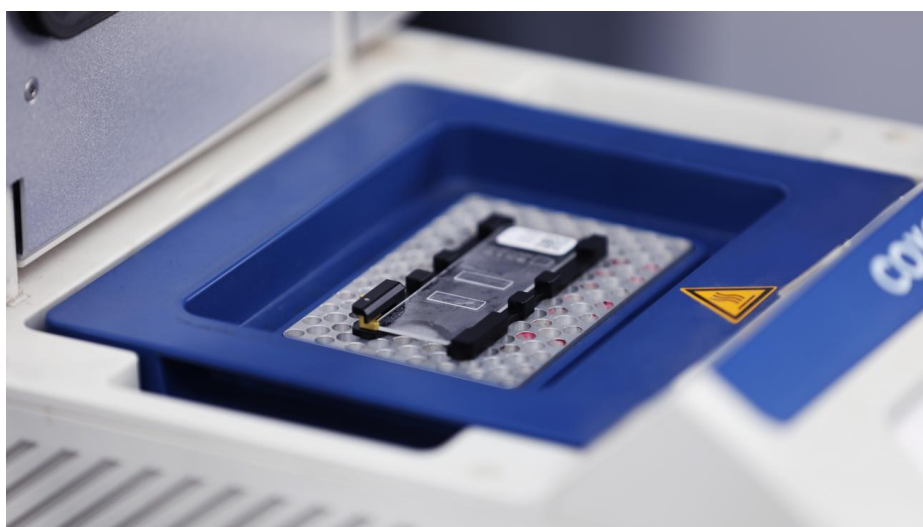


5. 重复上述 2-4 操作，直至所有样本组织切片贴片完成，从第一个样本切片到最后一个样本切片贴片完成时间建议控制在 30 min 内。

注：进行贴片时需控制好每张切片贴片时间，间隔时间太长，组织贴片会干燥皱缩，RNA 降解。

Step 1-5 组织标记

1. 烤片：快速将空间芯片置于 SeekSpace®芯片夹上，安全卡好后放置到 PCR 仪 2 中 37°C 孵育 90 s，无需盖 PCR 热盖；

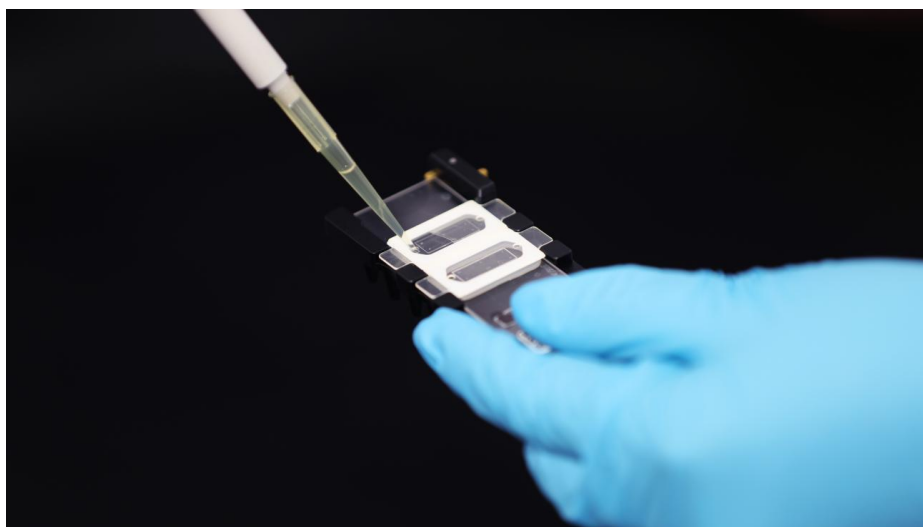


2. 烤片期间，将盖片（Space Chamber）上的绿色膜纸和黄色贴纸撕下，等组织孵育结束后将盖片（Space Chamber）包围住芯片上的标记区域贴下，盖片翅膀应置于 SeekSpace®芯片夹限位柱中间，适度按压盖片四周以保证盖片完全贴紧芯片；



3. 吸取 150 μL 的 N-1 反应液加入到反应腔室内，轻轻吹吸一次，确保 N-1 浸没空间芯片上的所有标记区域，然后将装有空间芯片的 SeekSpace[®] 芯片夹放置到设置好温度的 PCR 仪 1 上。标记程序如下（热盖 42℃）：

温度	时间
4°C	5 min
37°C	10 min



4. 反应结束后吸走腔室内的 N-1，分别使用 150 μ L 1X PBS-RI 溶液清洗标记区域两次；
5. 吸取 150 μ L 固定液加入到反应腔室内，浸没空间芯片上的所有标记区域，室温反应 12 min。

Step 1-6 组织荧光拍照

1. 固定过程中进行组织荧光拍照，按住 SeekSpace® 芯片的卡扣取下空间芯片，正置放到荧光显微镜(LEICA DMi8)载物台上；



 注：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。

2. 将镜头调至 10X 物镜下，选择 Black and White Mode 和 Image Format，Live Format 选择 bin 2 × 2，推荐使用手动对焦，空间芯片标记区域四角和组织内分别定焦，以此同时获得清晰的芯片和染色图像，拍照区域应包括空间芯片的整个标记区域及组织，ssDNA 图像呈现效果参照下图，组织形态边界清晰；

注 1：固定过程中荧光拍照时间为 12 min，如果固定过程中拍照未完成，可以将固定液换成提核液后继续拍照，时间必须控制在 10 min 内完成；



3. 手动定焦拍照过程中对组织进行对焦时，将增益降到 1，FIM 设置 100%，灯光强度降低到组织区域不过曝。

注 1：使用其他型号的荧光显微镜必须带有图片拼接功能；

注 2：成像过程必须保证芯片边缘和组织区域同时清晰且组织区域不过曝。

Step 1-7 组织切片提核

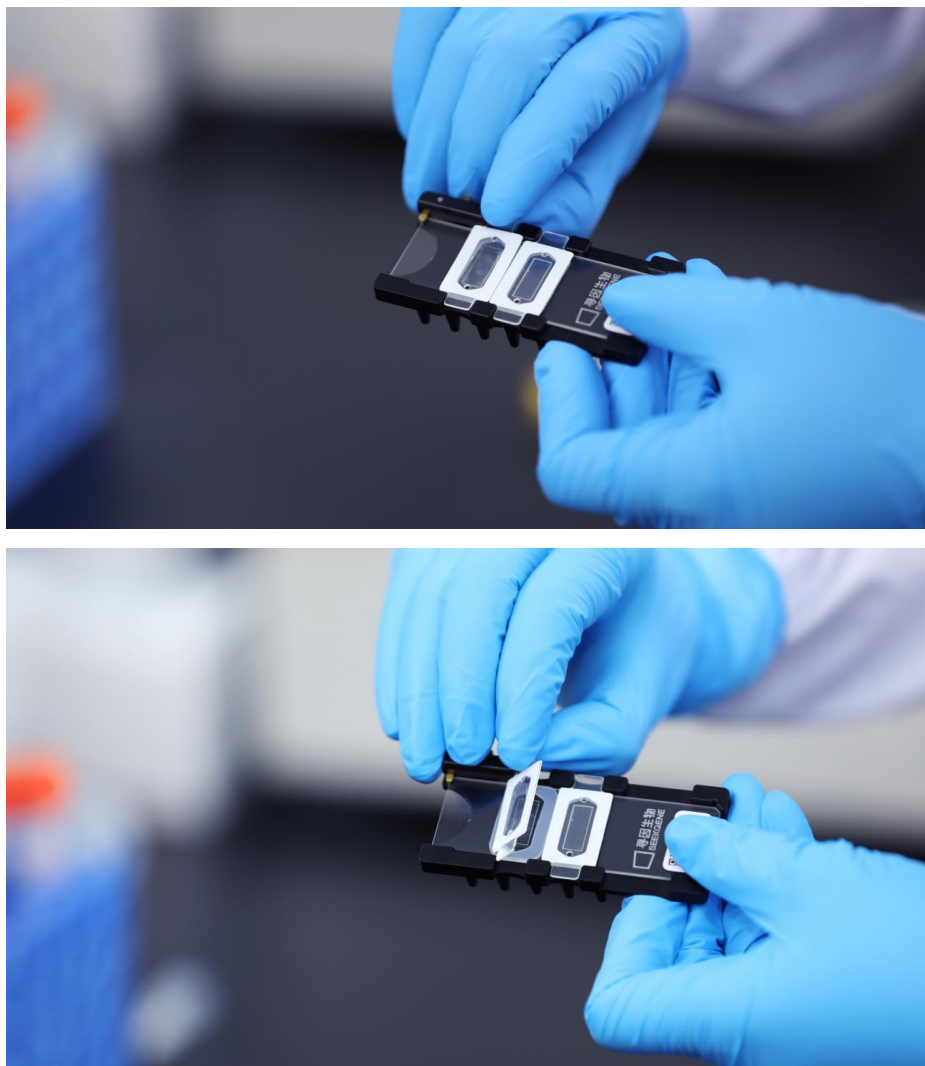
1. 固定结束后吸走腔室内的全部液体，加入 150 μL 的提核液；

2. 将腔室内的提核液吸入到新的 1.5 mL 的离心管中，然后揭掉盖片上层盖板（Space Chamber）将组织暴露出来；

注 1：揭掉盖片上层盖板后留有一圈硅胶附着在标记区域周围；

注 2：揭掉一个标记区域盖片上层盖板按步骤 3 操作完成后，再揭掉第二个标记区域的盖片上层盖板执行步骤 3 操作。

3. 立即吸取 150 μL 新的提核液滴加到标记区域的组织上，期间避免组织干燥；



4. 打开密封的刮板（Tissue Scraper），调整刮板的角度，使刮板和芯片标记区域成 20° 夹角，用刮板轻轻地按照一个方向完全刮下白色组织，用 $200\ \mu\text{L}$ 量程的移液器将刮下的组织回收吸到含有提核液的离心管中；

⚠ 注：务必注意不可来回用力刮取组织及没有组织的其他标记区域，防止刮下芯片上未被完全切除的空间标签污染细胞核，影响细胞核的空间标记效果。

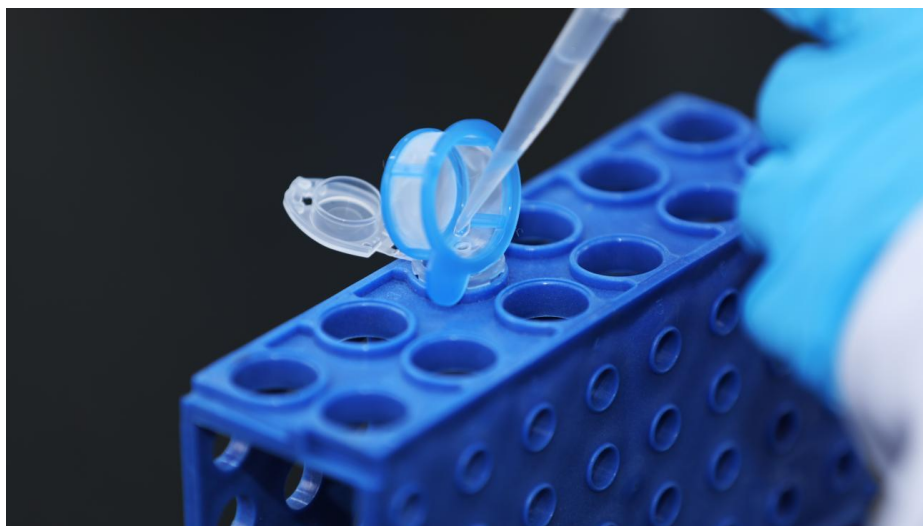


5. 然后再使用 150 μL 提核液清洗芯片，并回收提核液；
6. 如有组织还在芯片上，则重复一次步骤 3 与步骤 4；
7. 将回收的所有含有组织的提核液转移到研磨管中，再加入 300 μL 的提核液清洗离心管，然后将提核液加入到研磨管中，研磨管中提核液总体积不超过 1 mL；
8. 将研磨管置于冰或者冰砖上，使用研磨棒 A 棒上下抽拉式研磨 20-25 下，研磨棒 B 棒上下抽拉式研磨 20-25 下，将研磨液吸到 5 mL 离心管中；



9. 使用 1 mL 1X PBS-RI 溶液清洗研磨管和研磨棒，回收 1 $\times$ PBS-RI 到有细胞核悬液的 5 mL 离心管中；
10. 重复步骤 9 两次；
11. 研磨结束后在有回收细胞核悬液的 5 mL 离心管中加入 7.5 μL Buffer T，将细胞核悬液吹打混匀，1000 g，4 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min 离心，去掉上清液，保留上清大约 50 μL ，避免吸到细胞核沉淀；
12. 然后将细胞核悬液吹打混匀，将细胞核悬液转移至 1.5 mL 离心管中，使用 100 μL 1 $\times$ PBS-RI 清洗 5 mL 离心管，然后将 1 $\times$ PBS-RI 清洗液转移至 1.5 mL 离心管中，将细胞核悬液吹打混匀；

13. 超声仪频率 20KHz，超声功率 50 W，水放置到超声仪水槽 1/4 的位置，温度不打开，将 1.5 mL 离心管放到超声仪内的超声探头上方 1 cm 超声 10 s；
14. 将超声后的细胞核悬液使用 1 mL Wash Buffer 重悬，使用移液器将细胞核悬液轻轻吹打混匀；
15. 首先先用 300 μ L Wash Buffer 溶液湿润 40 μ m 细胞筛，然后将 1.1 mL 细胞核悬液用 40 μ m 细胞筛过滤至新的 5 mL 离心管中；



16. 使用 1 mL Wash Buffer 溶液洗细胞筛过滤至含有细胞核悬液的 5 mL 离心管中；
17. 重复步骤 16 一次；
18. 使用 1000 g，4°C，5 min，离心，去掉上清液，加入 1 $\times$ PBS-RI 溶液重悬细胞核至 190 μ L(保证核悬液质检后剩余量不低于 175 μ L)。

Step 1-8 核悬液质检

1. 单个样本标记区域的初步逆转录总细胞核数不超过 24 万，初步逆转录单管反应细胞核上样量不少于 600 不超过 3 万；
2. 有核率 > 5%，有核率低会影响捕获细胞数及基因数；
3. 结团率 < 30%；

注：结团率 > 30%需将大块组织吸出重新用研磨棒 B 棒研磨 10-20 下或用 20/30 μ m 细胞筛过滤再合并入单细胞核悬液中。



Step 2 初步逆转录反应

Step 2-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒	3× RT Buffer	●	-20°C		冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	Reducing Buffer	●	-20°C		
	RT Enzyme	●	-20°C		
SeekOne® DD 单细胞逆转录样本标签引物试剂盒	S1	●	-20°C	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	S2	●	-20°C		
	S3	●	-20°C		
	S4	●	-20°C		
	S5	●	-20°C		
	S6	○	-20°C		
	S7	●	-20°C		
	S8	●	-20°C		
SeekOne® DD 单细胞模板转换引物试剂盒	TSO	○	-80°C		冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒	Buffer T	●	室温	室温	充分振荡后瞬时离心备用
	Buffer S	●			
自备试剂	1× PBS	-	室温	室温	-
	RNase Inhibitor-A	-	-20°C	冰上	瞬时离心，置于冰盒上备用
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	50 mL 离心管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-
	0.2 mL 八联排管	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- PCR 仪：打开备用；
- 超声仪：超声仪频率 20KHz，超声功率 50 W，水放置到超声仪水槽 1/4 的位置，温度不打开；
- 细胞计数仪设备：打开备用；
- 微型离心机：打开备用；
- 振荡仪：打开备用；
- 恒温混匀仪：打开备用。

3 试剂配制

- 初步逆转录 Mix 配制：

冰上配制 Mix，吹打 15 次混匀，瞬时离心（一定要先按下表配制成反应 Mix 后再使用）。

组分	单样本
● 3× RT Buffer	106.4 μL
● RT Enzyme	20.8 μL
○ TSO	8 μL
● Reducing Buffer	6.4 μL
Total	17.7 μL*8 孔

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 1 个样本所需用量。

Step 2-2 初步逆转录反应

1. 单个样本分为 8 份进行初步逆转录反应，将初步逆转录 Mix 按照 17.7 μL 分装到 0.2 mL 八连排的 8 个孔中，然后向每孔加入 1.5 μL 不同的逆转录样本标签引物（S1, S2, ... S8），做好标记；
2. 确定细胞核投入量，单个样本的初步逆转录总细胞核量不超过 24 万，每孔单反应细胞核上样量不少于 600 且不超过 3 万；计算单样本细胞核上样体积，每孔先加入 $(20.8 (\mu\text{L}) - \text{单细胞悬液上样体积} (\mu\text{L}))$ 的 1 $\times$ PBS-RI 至 Mix 吹打混匀，共 8 孔，再加入对应的单细胞悬液（单细胞悬液加入前需吹打混匀），最终每孔反应液总体积为 40 μL ，然后进行逆转录反应。逆转录程序如下（热盖 85 $^{\circ}\text{C}$ ）：

循环数	温度	时间	变温速率
15	8 $^{\circ}\text{C}$	12 s	
	15 $^{\circ}\text{C}$	45 s	1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$
	20 $^{\circ}\text{C}$	45 s	1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$
	30 $^{\circ}\text{C}$	30 s	1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$
	42 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$
	42 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

3. 初步逆转录反应结束后八联排每孔加入 1.5 μL Buffer S，吹打混匀后同一样本的 8 个逆转录反应液转移到同一个新的 1.5 mL 离心管中，再加入 100 μL Wash Buffer 清洗八联排，从第 1 个孔开始清洗，然后将清洗液转入第 2 孔进行清洗，8 个孔逐一清洗完成后将清洗液全部转移到装有逆转录反应液的 1.5 mL 离心管中；
4. 加入 1 mL Wash Buffer，吹打混匀，1000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，去上清液；
注 1：本步骤中 Wash Buffer 用量至少是逆转录反应总体积的 2 倍；
注 2：去上清时，预留 50 μL 液体，避免吸到细胞沉淀，导致细胞损失。
5. 加入 1 mL Wash Buffer，吹打混匀，1000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，去上清液；
6. 重复 1 次步骤 5，然后使用 1 $\times$ PBS-RI 将细胞核溶液重悬至 90 μL （保证细胞悬液计数后剩余量不低于 70 μL ）；
7. 超声仪频率 20KHz，超声功率 50 W，水放置到超声仪水槽 1/4 的位置，温度不打开，将 1.5 mL 离心管放到超声仪内的超声探头上方 1 cm 超声 5 s；
8. 细胞核计数。

Step 3 油包水生成及 Barcode 标记

Step 3-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒	10× Ligation Buffer	○	-20°C	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	Primer R	●	-20°C		
	DNA Ligase Mix	●	-20°C		
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒	Reducing Buffer	●	-20°C		
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒	Single Cell Whole Transcriptome Barcoded Beads	○	-80°C	室温	平衡 30 min 备用
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒	SeekOne® DD Chip S3	-			替换芯片夹具中对应位置的 Chip P
	Gasket	-	室温	室温	挂载于芯片夹具上层
	Carrier Oil	●			注入标签 3 对应的孔位
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	0.2 mL PCR 管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-
	20 μm 细胞筛	-	室温	室温	-

2 仪器准备

a、SeekOne® 数字液滴仪：确保平稳放置，室温运行，无震动碰撞；开启 SeekOne® 数字液滴仪，放置占位芯片，运行自检程序，自检成功等待后续实验使用；

注：提前预备的凝胶微珠如果中途实验取消不进行上机，待凝胶微珠平衡至 30 min 彻底融化再收回，-80°C 保存，短时间内的冻融容易导致胶珠密度、粘稠度改变。

- b、PCR 仪：打开备用；
- c、微型离心机：打开备用；
- d、振荡仪：打开备用；
- e、恒温混匀仪：打开备用。

3 试剂配制

Mix 配制：

冰上配制 Mix，吹打 15 次混匀，瞬时离心（一定要先按下表配制成反应 Mix 后再使用）。

组分	体积/样本
○ 10× Ligation Buffer	8 μL
● DNA Ligase Mix	5.2 μL
● Primer R	2.4 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
Total	17.2 μL

注 1：DNA Ligase Mix 粘滞度较高，取液时枪头不宜插入液面过深，缓慢吸取，避免挂壁导致的试剂不足；

注 2：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 3：以上配制用量为 1 个样本所需用量。

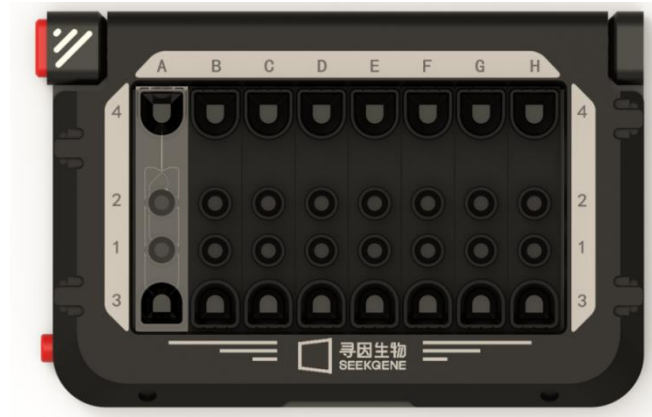
Step 3-2 准备单细胞核混合液

1. 单个油包水细胞核上样量不超过 12 万，计算上样体积，先加入相应体积（62.8（μL）-单细胞核悬液上样体积（μL））的 1×PBS-RI 至 Mix 吹打混匀；再加入对应的单细胞核悬液（单细胞核悬液加入前需吹打混匀）；最终单细胞核混合液总体积为 80 μL。

注：结团率≤ 20%；结团率> 20%需用 20 μm 细胞筛过滤，结团率过高可能会造成油包水堵孔。

Step 3-3 向 Chip S3 加入试剂

1. 取出对应样本数量的 Chip S3，替换芯片夹具中对应位置的 Chip P，然后将芯片夹具盖上（如下图所示）；



注 1: 不加样位置必须放入 Chip P;

注 2: 从包装袋中取出对应样本数量的 Chip S3 开封后 24 h 内使用。

2. 将单细胞核混合液用移液器吹打混匀后吸取 78 μL , 吸头尖垂直插入标签 1 对应的孔位底部中心稍高于底部平面位置, 缓慢注入, 不要产生气泡, 静置 30 sec;

3. 将室温平衡好的凝胶微珠充分振荡 30 sec, 瞬时离心 2 sec, 确保凝胶微珠液体内没有气泡, 用移液器吸取 38 μL , 吸头尖垂直插入标签 2 对应的孔位底部中心稍高于底部平面位置, 缓慢注入, 不要产生气泡;

注 1: 加试剂时, 移液器吸头随着液面移动, 始终保持吸头尖在液面 3 mm 以下, 避免产生气泡;

注 2: 凝胶微珠液体粘稠, 吸取到设定量程后枪尖在试剂管中等待 5 sec 再取出加样。

4. 用 200 μL 移液器吸取 120 μL Carrier Oil, 插入标签 3 对应的孔位, 斜靠内壁, 缓慢注入, 不要产生气泡; 重复此步骤一次, 共加入 240 μL Carrier Oil。

注: Carrier Oil 添加失败, 可能导致油包水生成失败或损坏仪器。

5. 按图示将 Gasket 挂载于芯片夹具上层, 确保 Gasket 孔和芯片孔对齐。



注: 手不要触碰 Gasket 光滑面, 取用时捏住两端空白处。

Step 3-4 运行 SeekOne® DD

1. 点击 SeekOne® DD 上的“出仓”按钮，弹出托盘；



2. 根据图示将覆盖 Gasket 的芯片夹具放入托盘，确保夹具水平放置，点击“进仓”按钮，收回夹具托盘；



3. 在仪器屏幕上点击“空间转录组”程序和“确认”按钮，启动程序；



4. 程序运行结束后，点击“出仓”按钮，取出夹具。立即进行下一步实验。



注：SeekOne® DD 的具体使用操作要求和故障处理详见《SeekOne® 数字液滴仪使用说明》。

Step 3-5 转移生成的油包水

1. 在冰上放置一个新的 0.2 mL PCR 管；
2. 取下 Gasket，根据图示按住 PUSH 按钮，打开夹具盖，使芯片与水平成 45°放置；



3. 观察标签 1 和 2 对应孔中的单细胞核混合液和 Barcoded Beads 溶液体积，任一孔剩余体积异常表明芯片有堵塞；

注：1 号孔剩余应 <10 μL ，2 号孔剩余应 <15 μL ，产物总体积约 120 μL 。

4. 使用移液器从标签 4 号对应的孔中缓慢吸取全部油包水液体；

注 1：吸取生成的油包水时，枪尖保持在产物液体中悬空，不紧贴芯片底部吸取，防止挤裂油包水结构，如果底部有多余透明的油，可以用 0.5-10 μL 的小量程枪头吸掉，注意不要带吸走生成的油包水产物；

注 2：多芯片同时运行时，会小概率观察到个别芯片的标签 4 号对应的孔道中出现气泡，这属于正常现象，不会影响文库及后续结果。

5. 观察吸头内的液体情况，正常液相呈均一不透明乳浊状；



6. 将吸头内的油包水沿着置于冰上的 PCR 管壁缓慢 (~20 sec) 注入 PCR 管中，不可离心、震荡，转出的油包水立即进行连接反应。

Step 3-6 油包水连接反应

1. 将 Step 3-5 中装有油包水的 PCR 管，放入 PCR 仪中运行下列程序，PCR 热盖 85°C，体积 100 μ L；

温度	时间
20°C	60 min
65°C	10 min
4°C	Hold

注：若液面高度高于加热块高度，则将油包水产物均一分成两管进行连接反应，结束后离心合并成一管。



STOPPING POINT: 此步反应结束后的油包水可在 4°C 过夜，或者 -80°C 储存 $\leq$ 4 天。

Step 4 解交联和纯化

Step 4-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒	Reducing Buffer	●	-20°C	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒	Cleanup Beads	○	2~8°C	室温	平衡至室温混匀备用
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒	Demulsion Agent	●	室温	室温	充分振荡后瞬时离心备用
SeekOne® DD 单细胞解	DCL Buffer	●			

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
交联试剂盒	Enzyme K1	●			
自备试剂	80%乙醇	-	室温	室温	当天现用现配
	DNA 分选磁珠	-	2~8°C	室温	平衡至室温混匀备用
	Nuclease-Free Water	-	室温	室温	-
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- a、恒温混匀仪：打开备用；
- b、1.5 mL 磁力架：备用；
- c、微型离心机：打开备用；
- d、振荡仪：打开备用。

Step 4-2 油包水破乳

- 室温下，向每管油包水液体中加入 100 μ L Demulsion Agent，室温静置 2 min；
- 从 PCR 管底部缓慢吸取去除 130 μ L Demulsion Agent/Carrier Oil 混合液，底部留 2~5 μ L 体积的透明混合液，防止吸到水相反应液；

注 1：如果破油后上层水相仍出现雾状浑浊反应液，可以重复步骤 1 和 2 进行二次破油；

注 2：如果二次破油后，仍有雾状浑浊液，则去除底部透明混合液后，保留雾状浑浊液与水相一起直接进行下一步解交联反应。

Step 4-3 解交联

- 转移 Step 4-2 破油后的全部水相反应液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 90 μ L DCL Buffer 和 18 μ L Enzyme K1，震荡混匀；

注：在使用过程中，DCL Buffer 溶液若出现白色固状或结晶，可在 55°C 加热至澄清。



STOPPING POINT: 此步结束后可放置于-80℃过夜保存。

2. 样本置于恒温混匀仪中，运行以下程序：55℃ 500 rpm 15 min，80℃ 500 rpm 15 min;



STOPPING POINT: 此步结束后可放置于-80℃过夜保存。

Step 4-4 纯化

1. Cleanup Mix 配制：

组分	体积/样本
○ Cleanup Beads	390 μL
● Reducing Buffer	10 μL
Total	400 μL

注 1：以上配制用量为 1 个样本所需用量。

2. 向每管样本加入 396 μL 振荡混匀后的 Cleanup Mix，轻轻缓慢吹打至少 15 次，室温孵育 10 min

 注：反应液加入 Cleanup Mix 后若出现白色固状或结晶，可在 55℃加热至澄清，然后室温继续孵育。

3. 孵育结束后，将离心管置于 1.5 mL 磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

4. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 在步骤 3 的离心管中加入 50 μL Nuclease-Free Water，再加入 80 μL (1.6×) DNA 分选磁珠，吹打混匀；

注：1.6×是指加入的 DNA 分选磁珠与产物的体积比，即 80 μL/50 μL=1.6×。

6. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后，置于 1.5 mL 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。

7. 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；

8. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

9. 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 46 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min；

注 1：如室内温度过高或过低，根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间，否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀；

注 2：充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离，再用枪头吹吸 15 次。

10. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 44.6 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

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。

Step 5 二次逆转录反应及逆转录产物纯化

Step 5-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒	3× RT buffer	●	-20°C	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	Reducing Buffer	●	-20°C		
	RT Enzyme	●	-20°C		瞬时离心，置于冰盒上备用
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒	TSO	○	-80°C		冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
自备试剂	80%乙醇	-	室温	室温	当天现用现配
	DNA 分选磁珠	-	2~8°C	室温	平衡至室温混匀备用
	Nuclease-Free Water	-	室温	室温	-
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	0.2 mL PCR 管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- PCR：打开备用；
- 0.2 mL 磁力架：备用；
- 微型离心机：打开备用；
- 振荡仪：打开备用。

3 试剂配制

二次逆转录 Mix 配制：

冰上配制 Mix，吹打 15 次混匀，瞬时离心（一定要先按下表配制成反应 Mix 后再使用）。

组分	体积/样本
● 3× RT Buffer	26.6 μL
● RT Enzyme	5.2 μL
○ TSO	2 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
Total	35.4 μL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 1 个样本所需用量。

Step 5-2 二次逆转录反应

1. 将配制好的上述试剂加入到 Step 4-4 纯化后的 44.6 μL cDNA 产物中，吹打混匀 10 次，瞬时离心，然后进行逆转录反应。PCR 热盖 85°C，体积 80 μL，逆转录程序如下：

温度	时间
42°C	90 min
4°C	Hold



STOPPING POINT: 逆转录后产物可在 4°C 储存 ≤ 72 h，或 -20°C 储存 ≤ 1 周。

Step 5-3 二次逆转录产物纯化

1. 逆转录反应结束后，加入 144 μL (1.8×) 的 DNA 分选磁珠，吹打 10 次混匀或振荡混匀后瞬时离心；

注：1.8× 是指加入的 DNA 分选磁珠与产物的体积比，即 144 μL/80 μL=1.8×。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后，置于 0.2 mL 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。

3. 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清。重复此步骤一次；

4. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 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 24 μL Nuclease-Free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min；

注 1：如室内温度过高或过低，根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间，否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀；

注 2: 充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离, 再用枪头吹吸 15 次。

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移 23 μ L 上清至新的 0.2 mL PCR 管中。

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。



STOPPING POINT: 纯化产物可在 4°C 储存 ≤ 72 h, 或 -20°C ≤ 1 周。

Step 6 cDNA 和空间标签预扩增与纯化

Step 6-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒	2× PCR Master Mix	●	-20°C	冰上	冰上解冻, 充分振荡后瞬时离心, 置于冰盒上备用
	Pre-Primers	●	-20°C		
自备试剂	80%乙醇	-	室温	室温	当天现用现配
	DNA 分选磁珠	-	2~8°C	室温	平衡至室温混匀备用
	Nuclease-Free Water	-	室温	室温	-
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	0.2 mL PCR 管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- PCR 仪: 打开备用;
- 0.2 mL 磁力架: 备用;
- Qubit 4.0: 打开备用;
- 微型离心机: 打开备用;
- 振荡仪: 打开备用。

3 试剂配制

预扩增 Mix 配制：

组分	体积
● 2× PCR Master Mix	25 μL
● Pre-Primers	2 μL
Total	27 μL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 1 个样本所需用量。

Step 6-2 预扩增

1. 将配制好的 27 μL 预扩增 Mix 加入到 Step 5 纯化后的 23 μL cDNA 产物中，吹打混匀 10 次，瞬时离心，然后进行 PCR。设置 PCR 程序如下，热盖温度 105℃，体积 50 μL：

扩增循环数	温度	时间
7	98℃	3 min
	98℃	10 sec
	63℃	15 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

Step 6-3 预扩增产物纯化

1. 吸取 80 μL (1.6×) 的 DNA 分选磁珠加入 Step 6-2 PCR 产物中，吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：1.6×是指加入的 DNA 分选磁珠与产物的体积比，即 80 μL/50 μL=1.6×。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后瞬离，置于 0.2 mL 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。

3. 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；

4. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 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 101 μ L Nuclease-Free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min；

注 1：如室内温度过高或过低，根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间，否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀；

注 2：充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离，再用枪头吹吸 15 次。

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 100 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

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。



STOPPING POINT: 纯化产物可在 4°C 储存 $\leq$ 72 h，或 -20°C 储存 $\leq$ 1 个月。

Step 6-4 预扩增产物定量

检测产物浓度（Qubit），用于确定转录组 cDNA 扩增及空间文库构建中加入预扩增产物量。

Step 7 转录组 cDNA 扩增及表达文库构建

Step 7-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeckOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒	2× PCR Master Mix	●	-20°C	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	Post-Primers	●	-20°C		
	N5、N7	●	-20°C		
自备试剂	80%乙醇	-	室温	室温	当天现用现配
	DNA 分选磁珠	-	2~8°C	室温	平衡至室温混匀备用
	Nuclease-Free Water	-	室温	室温	-
	片段分析仪配套试剂	-	4°C	室温	-
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	0.2 mL PCR 管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- a、PCR 仪：打开备用；
- b、0.2 mL 磁力架：备用；
- c、Qubit 4.0：打开备用；
- d、核酸片段分析仪：打开备用；
- e、微型离心机：打开备用；
- f、振荡仪：打开备用。

Step 7-2 cDNA 扩增

1. 转录组 cDNA 扩增 Mix 配制：

组分	体积/样本
● 2× PCR Master Mix	25 μL
● Post-Primers	1 μL
Step 6-3 纯化产物 ≤ 20 ng	24 μL
Total	50 μL

注 1：配制完成的溶液置于冰上备用；

注 2：以上配制用量为 1 个样本所需用量。

2. 使用步骤 6-3 纯化产物进行转录组 cDNA 扩增，吸取 24 μL（最大投入量为 20 ng，如果预扩增产物浓度超过 0.833 ng/μL，则只取 20 ng，用 Nuclease-Free Water 补到 24 μL；如果预扩增产物浓度不足 0.833 ng/μL 则直接吸取 24 μL）预扩增纯化产物，加入到转录组 cDNA 扩增 Mix 中，震荡混匀，瞬时离心，进行 PCR 反应，设置 PCR 程序如下，热盖 105℃，体积 50 μL：

扩增循环数	温度	时间
8-10 (见下表)	98℃	3 min
	98℃	10 sec
	63℃	15 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

cDNA 投入量	推荐扩增循环数
≤7 ng	10
8-15 ng	9
16-20 ng	8

Step 7-3 cDNA 纯化

1. 吸取 40 μL (0.8 $\times$) 的 DNA 分选磁珠加入 cDNA 扩增产物中，吹打 10 次混匀或振荡混匀后瞬时离心；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与产物的体积比，即 40 μL /50 μL =0.8 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后，放置于 0.2 mL 磁力架吸附至溶液澄清，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。

3. 加入 200 μL 80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；

4. 将 PCR 管进行瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 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 41 μL Nuclease-Free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min；

注 1：如室内温度过高或过低，根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间，否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀；

注 2：充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离，再用枪头吹吸 15 次。

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 40 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

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。



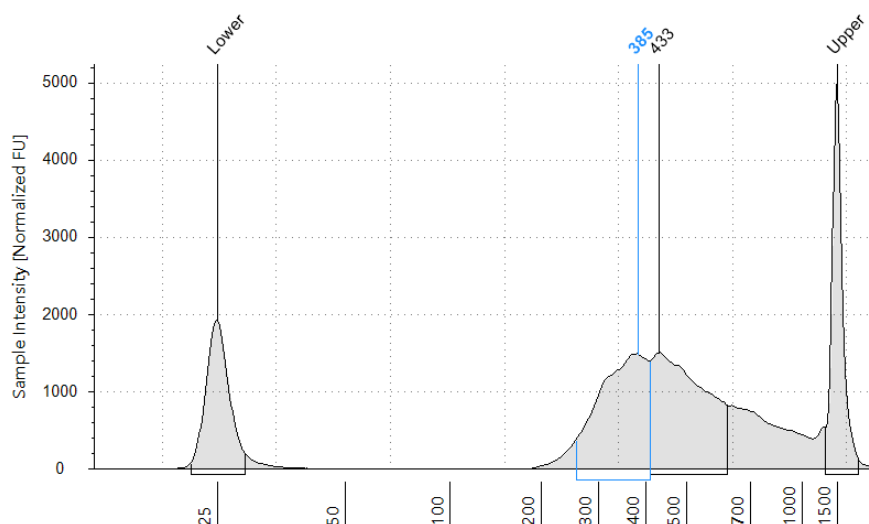
STOPPING POINT: cDNA 产物分选后可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存≤1 个月。

Step 7-4 cDNA 产物质控

1. cDNA 富集产物浓度 (Qubit) $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产物峰型在 200-2500 bp 范围，主峰在 250-1000 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation)，判定合格；

2. $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq \text{cDNA 富集产物浓度} \leq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产物峰型片段范围在 200-2500 bp 范围，主峰在 250-1000 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation)，判定风险；

3. cDNA 富集产物浓度 $\leq 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，判定为不合格。



Step 7-5 表达文库扩增

1. 表达文库扩增 Mix 配制:

组分	体积/样本
● 2× PCR Master Mix	25 μL
● N5	1 μL
● N7	1 μL
Step 7-3 cDNA 纯化产物 ≤ 20 ng	10 μL
Nuclease-Free Water	13 μL
Total	50 μL

注 1: 若样本多可以采购 96 孔板 Index 单品, 此单品 Index 种类更多, 且单孔是 I5 和 I7 混合标签, 用于样本量大、包 lane 的测序策略, 使用量混匀后直接吸取 2 μL 添加到扩增体系中, 产品货号 K02001-96;

注 2: 配制完成的溶液置于冰上备用;

注 3: 以上配制用量为 1 个样本所需用量。

2. 吸取 10 μL (最大投入量为 20 ng, 如果 cDNA 纯化产物浓度超过 2 ng/μL, 则只取 20 ng, 用 Nuclease-Free Water 补到 23 μL; 如果 cDNA 纯化产物浓度不足 2 ng/μL, 则直接吸取 10 μL) cDNA 纯化产物, 加入到表达文库扩增 Mix 中, 震荡混匀, 瞬时离心, 进行 PCR 反应, 设置 PCR 程序如下, 热盖 105℃, 体积 50 μL:

扩增循环数	温度	时间
7-9 (见下表)	98°C	3 min
	98°C	20 sec
	54°C	30 sec
	72°C	1 min
	72°C	5 min
	4°C	Hold

cDNA 投入量	推荐扩增循环数
5-10 ng	9
11-30 ng	8
31-50 ng	7

Step 7-6 表达文库纯化

1. 吸取 40 μL (0.8 $\times$) 的 DNA 分选磁珠加入 cDNA 扩增产物中，吹打 10 次混匀或振荡混匀后瞬时离心；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与产物的体积比，即 40 μL /50 μL =0.8 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后，放置于 0.2 mL 磁力架吸附至溶液澄清，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。

3. 加入 200 μL 80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；

4. 将 PCR 管进行瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 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 31 μL Nuclease-Free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min；

注 1：如室内温度过高或过低，根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间，否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀；

注 2：充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离，再用枪头吹吸 15 次。

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 30 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

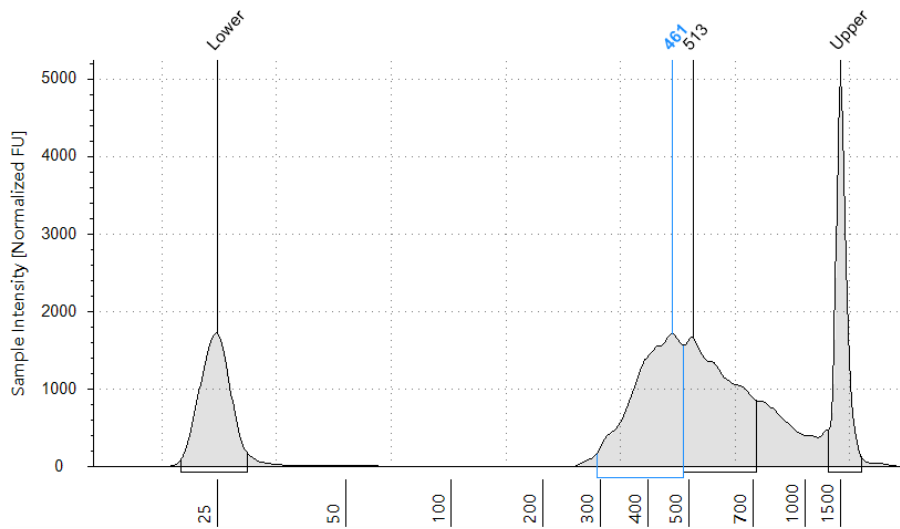
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。



STOPPING POINT: 文库产物分选后可在 -20°C 下储存 ≤ 6 个月。

Step 7-7 表达文库质控

1. 文库浓度 (Qubit) $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，无大片段污染，主峰在 300-1000 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation)，判定合格；
2. $1 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq \text{文库浓度} < 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，主峰在 300-1000 bp 范围，无大片段污染，可风险上机；
3. 文库浓度 $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产物主峰型片段范围在 300-1000 bp，但有超过 2000 bp 的大片段污染，大片段高度低于目标片段高度，再次分选直至无大片段，可风险上机；
4. 文库浓度 $< 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，或产物峰型检测在 300-1000 bp 无目的片段，无明显主峰，或大片段高度高于目标片段高度，判定不合格。



Step 8 空间标签文库扩增与纯化

Step 8-1 实验前准备

1 试剂耗材准备

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒	2× PCR Master Mix	●	-20℃	冰上	冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用
	N5、N7	●	-20℃		
自备试剂	80%乙醇	-	室温	室温	当天现用现配
	DNA 分选磁珠	-	2~8℃	室温	平衡至室温混匀备用
	Nuclease-Free Water	-	室温	室温	-
	片段分析仪配套试剂	-	4℃	室温	-

试剂盒来源	试剂/耗材	管盖颜色	储存温度	实验温度	使用前处理
自备耗材	移液器	-	室温	室温	-
	DNase/RNase-Free 低吸附 EP 管	-	室温	室温	-
	低吸附滤芯枪头	-	室温	室温	-
	0.2 mL PCR 管	-	室温	室温	-
	1.5 mL 离心管	-	室温	室温	-

2 仪器准备

- a、PCR 仪：打开备用；
- b、0.2 mL 磁力架：备用；
- c、Qubit 4.0：打开备用；
- d、核酸片段分析仪：打开备用；
- e、微型离心机：打开备用；
- f、振荡仪：打开备用。

3 试剂配制

Mix 配制：

组分	体积/样本
● 2× PCR Master Mix	25 μL
● N5	1 μL
● N7	1 μL
Step 6-3 纯化产物 ≤ 20 ng	23 μL
Total	50 μL

注 1：若样本多可以采购 96 孔板 Index 单品，此单品 Index 种类更多，且单孔是 I5 和 I7 混合标签，用于样本量大、包 lane 的测序策略，使用量混匀后直接吸取 2 μL 添加到扩增体系中，产品货号 K02001-96；

注 2：配制完成的溶液置于冰上备用。

Step 8-2 文库扩增

- 使用步骤 6-3 纯化得到的预扩增产物进行空间标签文库构建，吸取 23 μL（最大投入量为 20 ng，如果预扩增产物浓度超过 0.87 ng/μL，则只取 20 ng，用 Nuclease-free Water 补到 23 μL；如果预扩增产物浓度不

足 0.87 ng/ μ L 则直接吸取 23 μ L) 加入到上述配置好的 Mix 中, 震荡混匀, 瞬时离心, 进行 PCR 反应, 设置 PCR 程序如下, 热盖 105°C, 体积 50 μ L:

扩增循环数	温度	时间
13-16 (见下表)	98°C	3 min
	98°C	20 sec
	54°C	30 sec
	72°C	20 sec
	72°C	5 min
	4°C	Hold

预扩增产物投入量	推荐扩增循环数
≤ 5 ng	16
6-10 ng	15
11-15 ng	14
16-20 ng	13

Step 8-3 文库纯化

1. 反应结束后瞬时离心, 加入 60 μ L DNA 分选磁珠 (1.2 $\times$), 用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀;

注: 1.2 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与产物的体积比, 即 60 μ L/50 μ L=1.2 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min, 放置于 0.2 mL 磁力架吸附至溶液澄清, 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。

3. 保持在磁力架上加入 200 μ L 80%乙醇, 约 30 sec 后小心去除上清; 重复此步骤一次;

4. 闭盖瞬时离心 (离心时磁珠吸附管面朝外侧, 防止离心将磁珠甩飞至管壁), 用 10 μ L 移液器去除所有残留的上清;

5. 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 31 μ L Nuclease-Free Water 充分悬浮磁珠, 室温静置 5 min;

注 1: 如室内温度过高或过低, 根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间, 否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀;

注 2: 充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离, 再用枪头吹吸 15 次。

6. 然后置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移上清 30 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

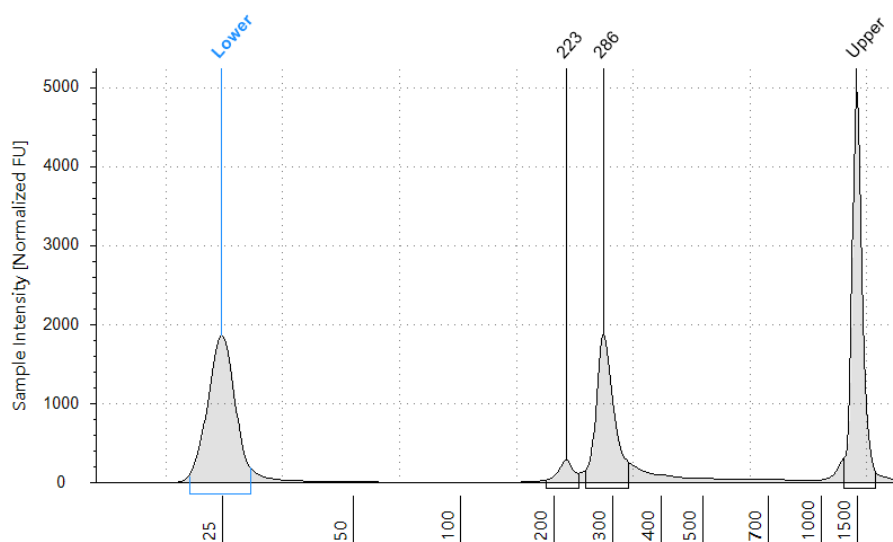
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。



STOPPING POINT: 文库产物分选后可在-20℃下储存≤6 个月。

Step 8-4 空间标签文库质控

1. 文库浓度 (Qubit) ≥ 1 ng/ μ L，主峰在 220-330 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation)，无大片段污染，判定合格；
2. 文库浓度 (Qubit) ≥ 1 ng/ μ L，主峰在 220-330 bp 范围，但有大片段污染，大片段摩尔质量占比小于 20%，判断风险；
3. 文库浓度 (Qubit) < 1 ng/ μ L，或产物峰形检测在在 220-330 bp 无目的片段，大片段摩尔质量占比超过 20%，判定不合格。



附录 1: 分组标签序列及 Index 序列

分组标签序列

样本标签号	正向序列
● S1	GTGATAAGCA
● S2	TCCTATTAGG
● S3	CATGGCGTAC
● S4	AGACCGCCTT
● S5	CGTGCCGATT
○ S6	TTCAGGTGGC
● S7	AAGTTACTCG
● S8	GCACATACAA
● S9	GGACTGTGGA
● S10	CCTAATAACG
● S11	AAGGCACTAT
● S12	TTCTGCGCTC
● S13	GCTCTGCTTC
○ S14	TAGTCATACG
● S15	CTAAGTACGA
● S16	AGCGACGGAT

Index 序列

Index 号	正向序列
● N501	ACTAGAGC
● N502	TGCCTATA
● N503	GCAGCTGT
● N504	ACGTTAAG
● N701	TCAAGTAT
● N702	CACTTCGA
● N703	GCCAAGAC
● N704	AAACATCG

注 1: Index 正向序列是指与 Illumina 官方提供的序列方向相一致, 如果是在 HiSeq X Ten 平台上测序, N5 Index 需提供反向互补序列;

注 2: 本试剂盒提供的 Index 序列可最多同时标记 16 个文库样品;

注 3: 文库的接头序列如下:

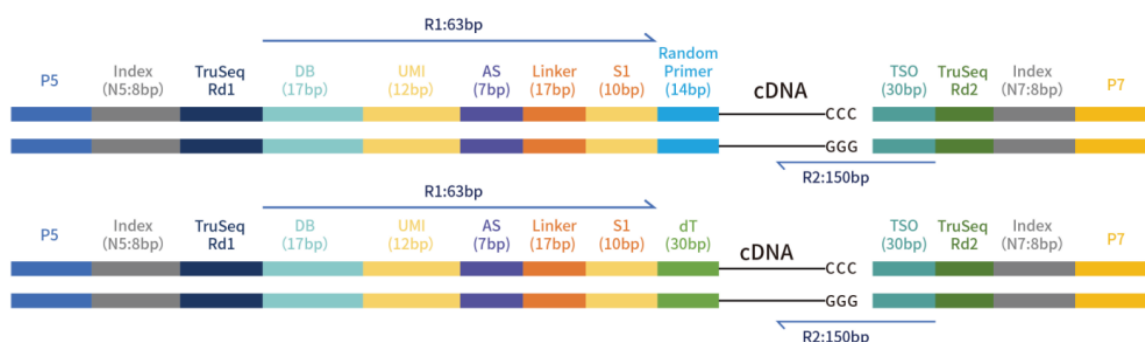
N5 5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[N5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
3'

N7 5'GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[N7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'

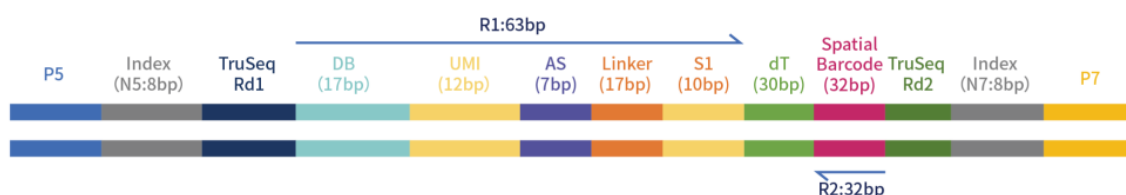
附录 2：高通量测序

1. 测序文库：SeekSpace®单细胞空间转录组试剂盒构建的测序文库包含转录组文库和空间标签文库，文库都以 P5 开始，P7 结束，其中 Cell Barcode 包含 17 bp 的液滴标签+10 bp 的分组标签，UMI 包含 12 bp，连接序列包含 24 bp，模板转换序列包含 30 bp，样本双端 Index 分别为 8 bp 的 N5 和 N7。通过文库的测序，可以获得用于单细胞标准分析的基本数据 FASTQ。

转录组文库：



空间标签文库：



2. 测序平台：此试剂盒构建的单细胞文库可适配于真迈和 Illumina 测序平台。

真迈平台：SURFSeq 5000。

Illumina 平台：MiSeq、NextSeq 500/550、NextSeq 1000/2000、HiSeq 2500（Rapid Run）、HiSeq 3000/4000、NovaSeq。

3. 文库测序数据量及运行参数

测序策略	单细胞转录组文库	空间标签文库
测序数据量	≥ 120 G	≥ 30 G
测序类型	双端测序	双端测序
测序读长	Read 1: 63 bp	Read 1: 63 bp
	N7 Index: 8 bp	N7 Index: 8 bp
	N5 Index: 8 bp	N5 Index: 8 bp
	Read 2: 150 bp	Read 2: 32 bp

4. 文库上样量

平台	仪器	上样浓度 (pM)	PhiX (%)
Illumina 平台	MiSeq	11	1
	NextSeq 500/550	1.8	1
	NextSeq 1000/2000	650	1
	HiSeq 2500 (RR)	11	1
	HiSeq 4000	240	1
	NovaSeq	150*/300	1
真迈平台	SURFSeq 5000	160	1

注: Use 150 pM loading concentration for Illumina XP workflow.

其他测序平台信息请联系 (support@seekgene.com) 以获得进一步帮助。

5. 文库 pooling

考虑到不同样本的基因表达文库和空间标签文库可能会被 pooling 到一条 lane 进行测序, 则同一条 lane 进行上样测序的文库中不能使用相同 index, 相同 index 的样本不能在后续分析中进行样本间数据的拆分。

当基因表达文库和空间标签文库合并测序时, 由于混合文库对测序深度需求存在差异, 因此可根据文库摩尔比进行混样, 基因表达文库建议先测 120 G 数据量, 根据测序饱和度确定是否加测数据:

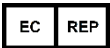
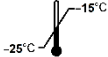
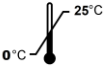
文库类型	测序数据量	文库摩尔比
基因表达文库	≥ 120 G	5
空间标签文库	≥ 30 G	1

附录 3：生物信息学分析

分析软件：SeekSpace® Tools 是寻因生物开发的一套处理单细胞空间转录组数据的软件，该软件延用了 SeekSoul® Tools 模块进行单细胞转录组的分析，包含 Cell Barcode 定量，判定细胞，得到下游分析的细胞表达矩阵；针对空间文库，SeekSpace® Tools 可以通过芯片上的空间标签的位置和细胞标签的关系将细胞精确定位到芯片上，并且对组织图像中的组织与背景进行分割，对定位成功的细胞进行下游聚类 and 差异分析，实现对聚类结果的空间可视化。

- 1) 输入文件：Expression FASTQ (clean data)，Spatial FASTQ (clean data)，HDMI FASTQ，Slide Image (tiff format: HE/DAPI)，gtf, genomeDir
- 2) 输出文件：bam, html, csv, rds, zarr, matrix (filtered_feature_bc_matrix)，image (_DAPI.png/_HE.png/_HE_TIMG.png)
- 3) 操作系统：Linux

附录 4：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		储存温度为 -80°C
	储存温度为 0 ~ 25°C		

附录 5：修订历史

序号	变更类型	修改条款及主要内容	修改人	审核人	生效日期
1	新建	新建文件			