

Takara Bio USA

Seeker™ 3x3 Bundle V1.1

说明书

Cat. Nos. SK004 & K006
(061325)

目录

I. 制品说明	1
II. 制品内容	4
III. 试剂盒外所需主要试剂、仪器及耗材	5
IV. 一般注意事项	6
A. 组织要求及质量评估建议	6
B. 实验技巧与注意事项	6
V. 操作步骤	6
A. 实验前准备	6
B. 组织切片制备与 Seeker 芯片杂交	7
C. 反转录	8
D. 组织透化与 Seeker 微珠重悬	9
E. 第二链合成	10
F. cDNA 扩增	11
G. 纯化与定量	12
H. 酶切片段化 (使用 Nextera XT Library Prep Kit)	13
I. 文库纯化与定量	14
J. 测序	15
VI. 生物信息学分析	16
VII. 常见问题及解决方案	17

I. 制品说明

本说明书描述了 **Seeker 3x3 Bundle V1.1** (Code No. SK004) 的操作说明, 以下简称为 Seeker 实验流程。该流程适用于新鲜冷冻 (Fresh frozen tissue, FF) 组织, 以生成高质量、兼容 Illumina® 测序平台的文库, 并获得样本的高分辨率空间转录组信息。在实验开始时, 组织被切片并放置在 Seeker 芯片 (tile) 上 (以下简称“芯片”) (见图 1), 该芯片是一种玻璃基质, 表面覆盖有单层独特 DNA 条形码标记的微粒 (以下简称“微珠”), 整个流程可在 8 小时内完成 (见图 2), 并设有多个安全暂停点。Seeker 实验流程 (见图 3) 从 RNA 与芯片上的微珠杂交开始, 随后进行反转录。接着, 通过组织透化步骤将组织消化并释放微珠到溶液中。然后, 通过半随机引物引发的第二链合成, 再进行 cDNA 扩增。最后, 使用 Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit 生成兼容 Illumina 测序平台的文库。

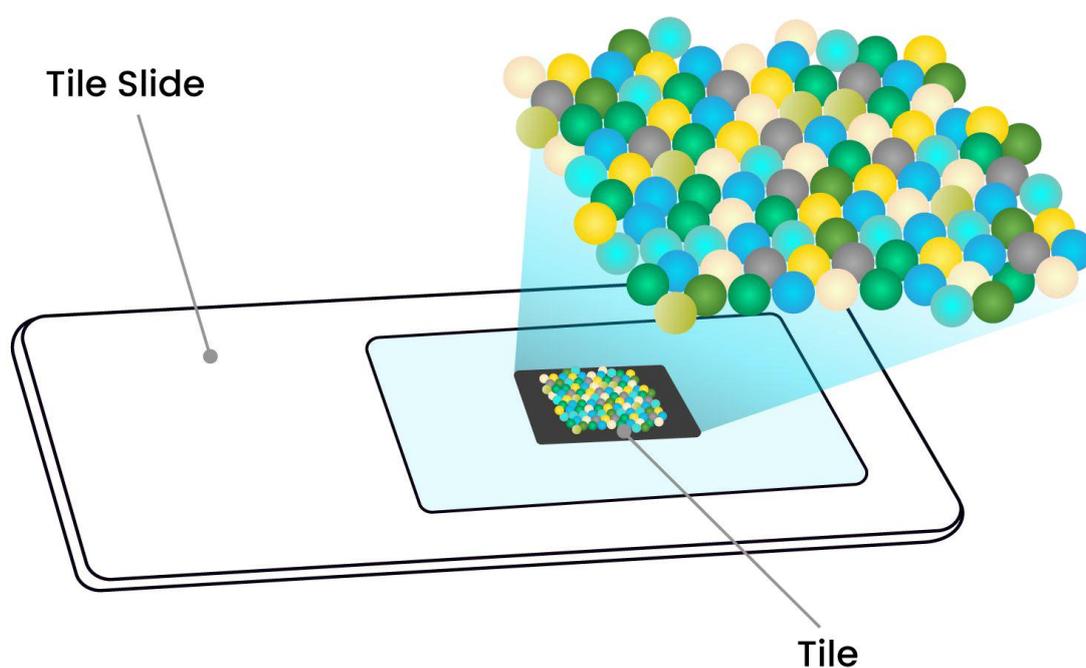


图 1. Seeker 芯片 (tile)

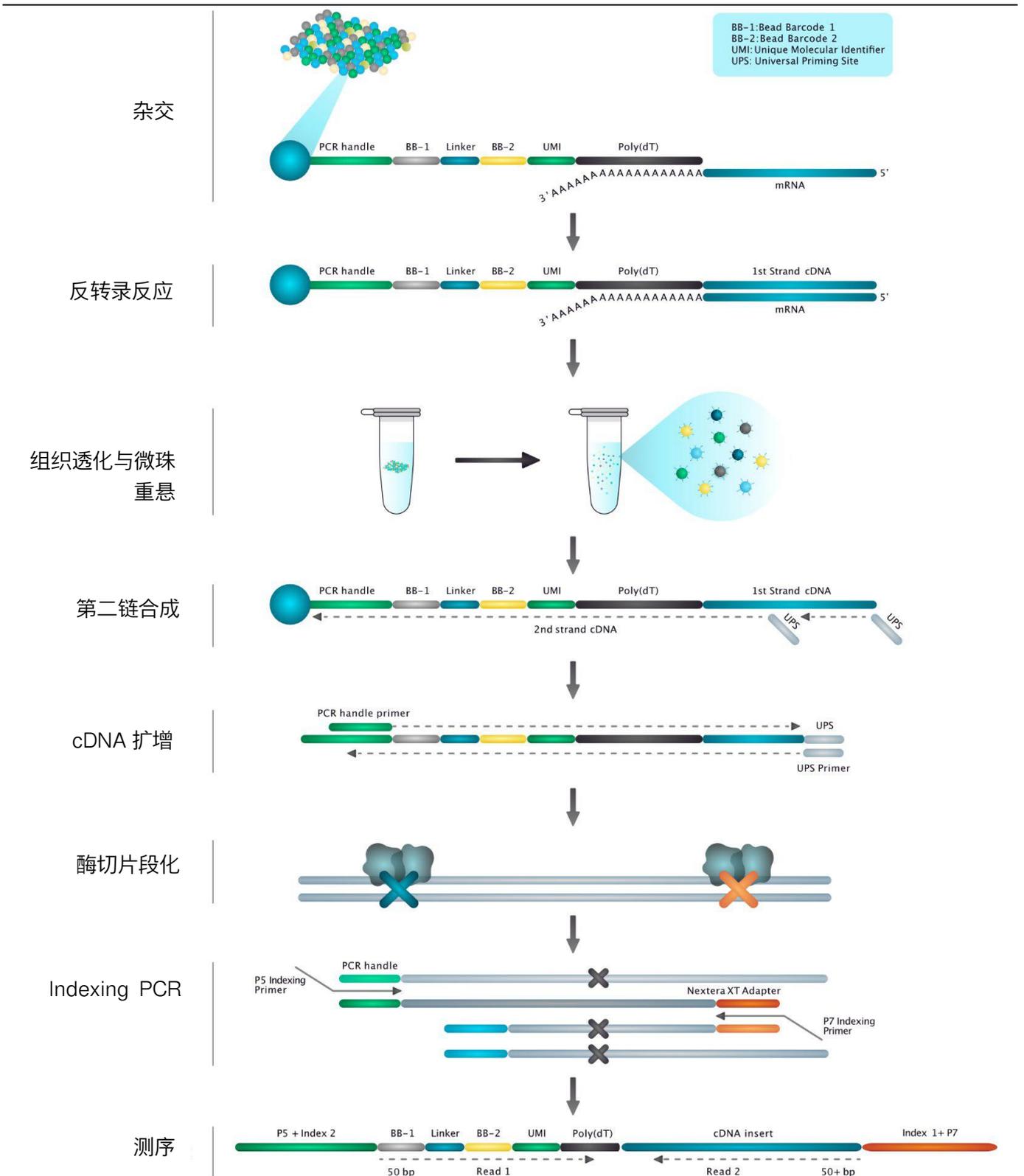


图 2. Seeker 实验流程。请参考本文件末尾的补充部分以获取更详细的测序信息。

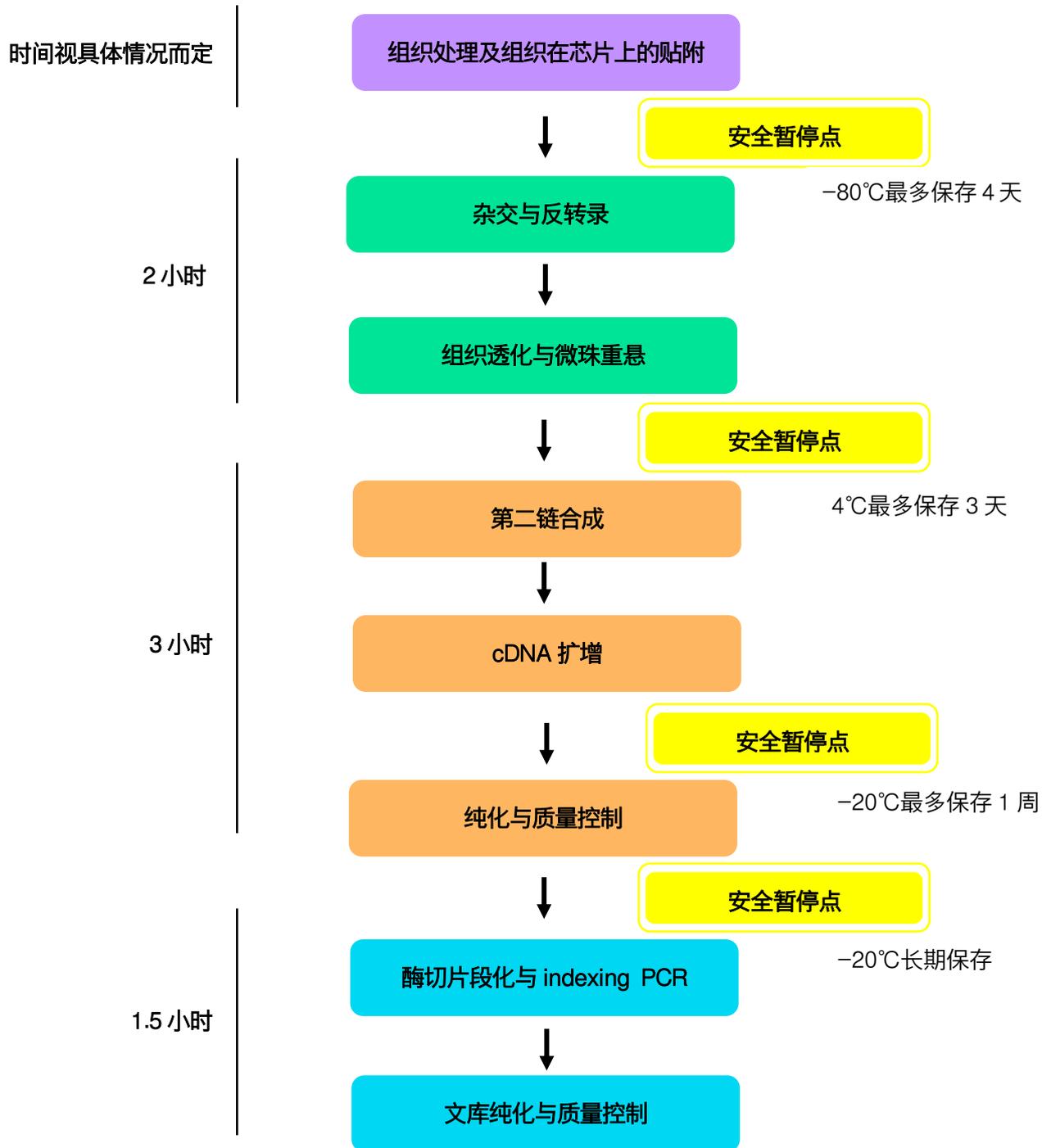


图 3. 预计实验流程时间

II. 制品内容

表 1. Seeker 3x3 Bundle V1.1 组分

Seeker 3x3 Bundle V1.1 (Code No. SK004; 8 rxns)	管帽颜色
Seeker 3x3 Tiles (Code No. SQB003; 4°C保存)*	
Seeker 3x3 Tile v1.1	—
Seeker Reagent Box 1 (Code No. K001; 室温保存)*	
Hyb Buffer	—
TC Buffer	红色
Nuclease-free Water	—
Bead Wash Buffer	—
Seeker Reagent Box 2 (Code No. K002; -20°C保存)*	
RNase Inhibitor	—
RT/SS Buffer	—
dNTP	—
RT Enzyme	—
TC Enzyme	红色
SS Primer	黄色
SS Enzyme	黄色
cDNA Amp Buffer	蓝色
cDNA Amp Primer Mix	蓝色
cDNA Amp Enzyme	蓝色
TE	—
CryoCube (Code No. JW001; -80°C保存)*	
Seeker Dual Indexing Primer Kit v2 (Code No. K006; -20°C保存)	
Index Primer F1	—
Index Primer F2	—
Index Primer F3	—
Index Primer F4	—
Index Primer F5	—
Index Primer R1	—
Index Primer R2	—
Index Primer R3	—
Index Primer R4	—
Index Primer R5	—

* 不单独销售。

III. 试剂盒外所需主要试剂、仪器及耗材

试剂:

- 无水乙醇 (Sigma Aldrich, Code No. 459844-1L)
- SPRIselect Reagent (Beckman Coulter, Code No. B23318) 或 sparQ PureMag beads (Quanta Bio, Code No. 95196-005)
- Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, Code No. FC-131-1024)
- [注]: 请勿使用其他文库制备试剂盒替代。
- Bioanalyzer High Sensitivity DNA kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 或 TapeStation High Sensitivity DNA D5000 ScreenTape (Agilent, Code No. 5067-5592) 和 TapeStation High Sensitivity DNA D5000 Reagents (Agilent, Code No. 5067-5593)
- Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Code No. Q33230)

仪器:

- 冷冻切片机 (Leica, Code No. CM3050S)
- 单通道移液枪: 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, and 1,000 μ l (Rainin, Code No. 17014388, 17014392, 17014391 & 17014382)
- 八通道或十二通道移液枪: 20 μ l and 200 μ l (Rainin, Code No. 17013803 & 17013805)
- 适用于 1.5 ml EP 管的小型离心机
- 适用于 0.2 ml EP 管的小型离心机
- Eppendorf 离心机 5415 D (Eppendorf, Code No. 5425-55001) 或 同等设备
- 2 个适用于 1.5 ml EP 管的金属浴
- 96 孔 PCR 冷却架 (MIDSCI, Code No. 5640-T4) 或 96 孔铝制冷却块 (Light Labs, Code No. A-7079)
- C1000 Touch PCR 仪 (Bio-Rad, Code No. 1851148)
- [注]: 虽然不同型号的 PCR 仪之间预计不会有显著的结果差异, 但本实验方案是基于 C1000 Touch PCR 仪开发的, 其具有 3°C/秒的升温速率, 且支持 96 孔运行。

- 涡旋振荡器
- 镊子 (Ted Pella, Code No. 58083-NM)
- 2100 生物分析仪 (Agilent, Code No. G2939BA/G2953CA) 或 4200 TapeStation 系统 (Agilent, Code No. G2991AA)
- DynaMag-2 磁力架 (适用于 1.5 ml EP 管) (Invitrogen, Code No. 12321D)
- 12 管磁分离架 (PCR 管) (NEB, Code No. S1515S)
- Qubit 4 荧光计 (Thermo Fisher, Code No. Q33238)

耗材:

- 滤芯移液枪枪头: 20 μ l, 200 μ l, and 1,000 μ l (Rainin, Code No. 30389226, 30389240 & 30389213)
- DNA LoBind 1.5 ml EP 管 (Eppendorf, Code No. 22431021)
- 0.2 ml PCR 八联管 (USA Scientific, Code No. 1402-4700)
- 最佳切割温度包埋剂 (OCT 包埋剂)
- Qubit 分析管 (Thermo Fisher, Code No. Q32856)

IV. 一般注意事项

A. 组织要求及质量评估建议

- 通过以下方式进行 RNA 质量评估：取 5 片 10 μm 组织切片，并使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen P/N 74104) 或等效产品提取 RNA；在 Agilent Bioanalyzer 或 TapeStation 上分析 RNA 质量，以获得 RNA 完整性 RIN 值。高品质 RNA 的 RIN 值应至少为 7。您可以自行选用 RIN 值较低的样本，但有一定风险导致数据质量较差。
- 在与 Seeker 实验流程中所用切片相邻的部分进行 H&E 染色，评估组织质量，以获取组织结构信息并判断切片质量。
- 在新组织样本上进行 Seeker 芯片预实验，通过低深度测序 (3×10^7 reads) 以评估文库质量。

B. 实验技巧与注意事项

- 在所有标示需要 1.5 ml EP 管的步骤中使用 Eppendorf LoBind 1.5 ml 离心管 (Eppendorf, Code No. 022431021)。
- 使用镊子或镊钳转移芯片时，避免直接接触微珠区域。请勿直接按压芯片的中央，而应如下所示，夹持芯片角边缘进行操作。

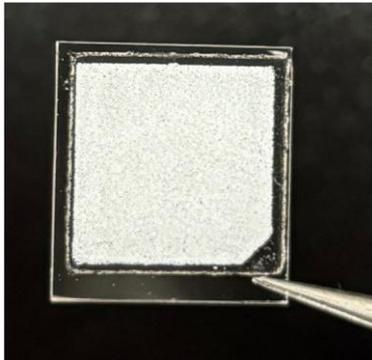


图 4. 转移芯片时正确使用镊子，夹住片角附近，避免直接接触微珠区域。

- 在处理多个样本时，每个样本之间都要清洁镊子或镊钳。清洁方法是将镊子尖端浸入无水乙醇中，并用无尘纸擦拭，以防止交叉污染。
- 制备反应混合液时，所有酶类应始终置于冰上保存。
- 按照表中列出的顺序制备所有混合液。
- 如遇组织切片时出现静电问题，请采取以下措施：
 1. 切片前先接地释放静电。
 2. 更换新手套。
 3. 用无水乙醇擦拭蓝色粘合剂背面，干燥 15–20 秒后再置入冷冻切片机。
 4. 用无水乙醇定期清洁冷冻切片机腔室，减少静电积聚。
 5. 在冷冻切片机角落放置小块防静电干燥片。

V. 操作步骤

A. 实验前准备

1. 以下试剂需在室温下解冻，涡旋，短暂离心后置于冰上备用。
 - a. RT/SS buffer
 - i. 如果观察到沉淀，请将 RT/SS buffer 在 37°C 下加热 5 分钟并短暂涡旋混匀后使用。
 - b. dNTP
2. 设置金属浴：分别为 52°C 和 37°C。

B. 组织切片制备与 Seeker 芯片杂交

1. 将新鲜冷冻的组织在冷冻切片机（如 Leica CM3050S）中预平衡至 -18°C ，至少保持 20 分钟，之后再行切片。切片的最佳温度可能会因组织类型而异。
2. 使用最佳切割温度包埋剂（OCT 包埋剂）将组织块和 CryoCube 固定在切割模块上。
3. 将 Seeker 芯片放入冷冻切片机中预冷至少 1 分钟。
4. 记录 Seeker 芯片的唯一 ID（例如：A0001_001），参考右侧示例图。



图 5. 用于标识 Seeker 芯片 ID 的标签。芯片 ID 号: A0084_046，被用蓝色框标记。



重要提示： 每个 Seeker 芯片对应唯一 ID，用于检索测序数据生成空间定位的正确文件。

5. 切取 $10\ \mu\text{m}$ 厚的组织切片。
6. 根据以下两种方法之一，将组织切片贴附至 Seeker 芯片：
 - a. 方法 1：精准贴附目标区域
 - i. 将 Seeker 芯片放入冷冻切片机中预冷至少 1 分钟。
 - ii. 取出冷却后的 Seeker 芯片，将其放置于切片平台上。使用刷子将组织切片小心摆放在芯片上。确保目标区域对准芯片有效区域。
 - iii. 芯片和组织切片朝上，缓慢将芯片移出冷冻切片机。轻轻用手指接触芯片底部使其缓慢升温并贴附组织，如下所示。



图 6. 组织切片精准贴附至 Seeker 芯片上的示例

- iv. 为了避免组织卷曲，应从一侧开始逐步向另一侧缓慢移动手指，而不是直接从中心加热。可使用小刷子固定另一端，防止组织卷曲，并从另一端开始逐步贴附。
- b. 方法 2：快速贴附目标区域
 - i. 将室温芯片固定于芯片夹具中，使芯片朝下。悬停于目标区域上方。芯片保持水平，缓慢下降，使其接触组织切片。组织切片应立即贴附于芯片。
7. 将含有贴附组织切片的芯片放回冷冻切片机中。
 8. （可选择）取 $10\ \mu\text{m}$ 相邻切片进行 H&E 染色。在显微镜载玻片上融化组织，并将其储存在低温恒温器中，直至准备好处理。
 9. 取下组织块，替换为 CryoCube。
 10. 切取 $30\ \mu\text{m}$ 厚的 CryoCube 切片。对于表达水平较高的组织，可以使用 $60\ \mu\text{m}$ 厚的切片。

【注】： CryoCube 覆盖层用于防止冷冻切片后 mRNA 信号在组织表面泄漏，以减少背景值。
 11. 将 CryoCube 切片移动到芯片上，确保其覆盖整个芯片有效区域。
 12. 通过将手指放在芯片下方并在芯片上移动，直到 CryoCube 切片和组织切片完全融化在芯片上，从

而将 CryoCube 切片贴附到芯片上。或者，可以通过将手指短暂地放在芯片下方几秒钟来稍微加热芯片和组织切片，然后使用步骤 6b 中描述的“快速贴附法”将 CryoCube 切片贴附到芯片上。

13. 将处理完的芯片放回冷冻切片机中，或者将芯片放在干冰上的芯片支架上，准备在下一步中配制杂交反应混合液，或密封后保存于 -80°C ，最多可保存四天。

14. 将剩余的组织块和 CryoCube 从低温切片机取出，并存放于 -80°C 。

[注]：建议在储存之前，用一滴 OCT 包埋剂覆盖暴露的组织并冷冻，以防组织干燥。

安全暂停点：芯片可以在密封容器中保存于 -80°C ，最多可达四天。

15. 按照下表配制的杂交反应混合液，额外加入总体积的 5%作为余量。用移液枪吸打混匀 10 次并保持室温。请在 15 分钟内使用。

[注]：当处理具有高 RNase 含量的组织时，可以向杂交反应混合物中添加额外的（高达 1.8X）RNase 抑制剂。

杂交反应混合液：

190 μl	Hyb buffer
10 μl	RNase inhibitor
<hr/>	
200 μl	总体积

16. 从冷冻切片机、干冰或 -80°C 环境中取出芯片，并通过将手指轻触芯片下方使其升温，直到组织重新融化。

17. 小心地将芯片用镊子从蓝色粘合剂上分离，并将其放入含有 200 μl 杂交反应混合液的 1.5 ml EP 管中。确保芯片完全浸没，如下图 7 所示。



图 7. Seeker 芯片浸没在杂交反应混合液中

18. 在室温下孵育 30 分钟。

C. 反转录

1. 按照下表配制 $1\times$ RT wash buffer，用于 RT PCR 反应前的芯片洗涤，并保持室温：

40 μl	RT/SS buffer
160 μl	Nuclease-free water
<hr/>	
200 μl	总体积/反应

2. 按照下表配制 RT 反应预混液，额外加入总体积的 5%作为余量。用移液枪吸打混匀 10 次并保持放于冰上。

40 μl	RT/SS buffer
20 μl	dNTP
5 μl	RNase inhibitor
10 μl	RT enzyme
125 μl	Nuclease-free water
<hr/>	
200 μl	总体积/反应

3. 使用干净的镊子,将芯片从杂交反应混合液中取出,并将其浸入 $1 \times$ RT 清洗缓冲液中快速浸洗三秒。
4. 将芯片转移到一个新的 1.5 ml EP 管中, 并加入 200 μ l 反转录反应混合液, 确保芯片完全浸没。
5. 在室温下孵育 10 分钟。
6. 将 EP 管移到预热至 52°C 的金属浴中, 孵育 30 分钟。

D. 组织透化与 Seeker 微珠重悬

1. 如果观察到沉淀, 请将 TC buffer 在 37°C 下加热 5 分钟并轻微涡旋混匀后再使用。
2. 如果实验室的室温低于 20°C , 则将微珠洗涤缓冲液预热至 37°C , 以防止洗涤步骤中出现沉淀。
3. 按照下表配制组织透化反应预混液, 额外加入总体积的 5% 作为余量。用移液枪吸打混匀 10 次并保持室温:

196 μ l	TC buffer
4 μ l	TC enzyme
<hr/>	
200 μ l	总体积/反应

4. 向包含芯片和 RT 反应预混液的 EP 管中加入 200 μ l 组织透化反应预混液。为了避免破坏芯片, 建议将移液枪调至 190 μ l, 从管底吸取液体打到管侧壁上, 重复 10 次。
5. 在 37°C 孵育 30 分钟。

[注]: 如果组织较难消化或含有植物细胞壁, 可以将组织透化孵育时间从 30 分钟延长到总时长 1 小时。

6. 结束后, 添加 200 μ l 微珠洗涤缓冲液, 通过反复吸打混匀以便实现将微珠从玻璃芯片上分离和机械性地剪切组织。



重要提示: 确保完全分离微珠, 特别是在组织切片覆盖的芯片区域。在分离微珠后, 您可能会看到芯片表面残留一层类似膜的物质。切勿试图去除这层物质, 否则将抑制后续反应并影响后续步骤中回收微珠的效果。

[注]:

- 在分离微珠时, 请将移液枪枪头对准微珠区的中心。吹打时, 可看到微珠从玻璃芯片上分离。残余的组织和微珠在从玻璃载芯片脱离后可能仍然松散地连接在一起。用移液枪上下吸打, 直到组织和微珠完全分散。如果组织未完全分散, 可以将其重新放置在 37°C 下孵育 10 分钟。
 - 未被组织覆盖的芯片区域可能较难解离。对于较难解离的区域, 可以通过将移液枪枪头平行于芯片, 轻轻侧向刷动, 并对残留微珠区域进行吸打, 从而机械性地将微珠从芯片上移除。未被组织覆盖的微珠如果未完全解离, 不会影响数据质量和实验结果。
7. 使用移液枪枪头将残留的玻璃碎片引导至 1.5 ml EP 管的管口边缘。用镊子或钳子将其从 EP 管中夹出并丢弃。
 8. 将液体转移至新的 1.5 ml EP 管中, 以确保微珠能够有效沉淀。
 9. 以 $3000 \times g$ 室温离心 2 分钟, 应可见白色的微珠沉淀 (见图 8)。

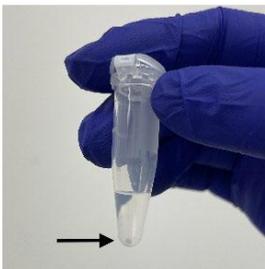


图 8. 解离离心后的微珠沉淀

10. 吸除上清液中的气泡。

11. 小心地吸除上清液，避免扰动微珠沉淀。

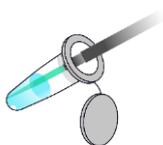


图 9. 从微珠沉淀周围去除上清液时移液枪枪头的放置位置



重要提示：离心后应立即吸除上清液，因为沉淀可能会随着时间的推移滑到底部，变得更难观察。吸除上清液时，应将移液枪枪头朝向沉淀的远端，缓慢吸取，避免扰动沉淀。在吸除上清液过程中，务必小心操作，防止微珠损失。如果微珠沉淀开始滑动，可以再进行 $3000 \times g$ 离心 30 秒。此步骤适用于本实验方案中的所有微珠洗涤步骤。

[注]：为了尽可能保留更多的微珠，在初次洗涤过程中不必完全吸除所有上清液。可保留 15–20 μl 的上清液。但在加入反应混合液之前，应确保留下少于 10 μl 的微珠洗涤缓冲液。此步骤适用于所有微珠洗涤步骤。

12. 将微珠沉淀重悬于 200 μl 微珠洗涤缓冲液中，并通过 $3000 \times g$ 离心 2 分钟使微珠沉淀。

13. 立即吸除并丢弃上清液（可保留少于 10 μl 的微珠洗涤缓冲液，以保护微珠沉淀），并将微珠沉淀重悬于 200 μl 微珠洗涤缓冲液中。

安全暂停点：微珠可在 4°C 下保存最多三天。

E. 第二链合成

1. 设置金属浴：分别为 95°C 和 37°C 。

2. 以下试剂需在室温下解冻，涡旋，短暂离心后置于冰上备用：

- a. RT/SS buffer
- b. dNTP
- c. SS primer

3. 将 SS enzyme 始终置于冰上。

4. 轻轻使用移液枪混匀前一步骤中的微珠 5 次。

5. 将微珠在 95°C 下孵育 5 分钟。

6. 制备第二链反应混合液，额外加入总体积的 5% 作为余量。用移液枪吸打混匀 10 次并保持在室温下。

Second-Strand Mix:

40 μl	RT/SS buffer
20 μl	dNTP
2 μl	SS primer
5 μl	SS enzyme
133 μl	Nuclease-free water
200 μl	总体积/反应

[注]：如同时处理多个样本，可将样本保持在金属浴中保持 95°C 直至开始处理，最长不超过 10 分钟。

7. 在 95°C 孵育 5 分钟后，立即以 $3000 \times g$ 离心 30 秒，并小心吸除上清。



重要提示：离心后应立即吸除上清。此步骤适用于本节所有后续步骤。

8. 立即向微珠中加入 200 μl 第二链反应混合液。

9. 于 37°C 下孵育 1 小时。

10. 加入 200 μ l 微珠洗涤缓冲液。
11. 3000 \times g 室温离心 2 分钟后，立即吸除上清。
12. 再次重悬于 200 μ l 微珠洗涤缓冲液中。

F. cDNA 扩增

1. 以下试剂需在室温下解冻，涡旋，短暂离心后置于冰上备用：
 - a. cDNA amp buffer
 - b. cDNA amp primer mix
2. cDNA 扩增酶除使用外，应全程置于冰上。
3. 预热 PCR 仪至 98°C，以待扩增。热盖温度设定为 105°C，设置反应体系体积为 50 μ l。
4. 按照下表配制 cDNA 扩增反应体系，额外加入总体积的 5% 作为余量。用移液枪吸打混匀 15 次并保持置于冰上备用：

cDNA Amplification Mix:

100 μ l	cDNA amp buffer			
8 μ l	cDNA amp primer mix			
4 μ l	cDNA amp enzyme			
88 μ l	Nuclease-free water			

200 μ l 总体积/反应

5. 3000 \times g 室温离心 2 分钟后，立即吸弃上清。
6. 向微珠中加入 200 μ l cDNA 扩增混合液。
7. 平均分装至 4 个 PCR 管（每管 50 μ l）。
8. 用移液枪轻轻混匀后置于 PCR 仪中。
9. 在预热的 PCR 仪上立即运行 cDNA 扩增程序，设置参数如下：

98°C 2 min

4 cycles:

98°C	20 sec	Phase 1
65°C	45 sec	
72°C	3 min	

9 cycles*:

98°C	20 sec	Phase 2
67°C	20 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

* 若组织切片未完全覆盖芯片或组织细胞含量较低，则需增加 Phase 2 循环数：如果组织仅覆盖芯片的 50%，建议增加 1-2 个循环。对于 RNA 丰度较低的组织，增加 2-3 个循环。详细请参考表 2。

表 2. 基于组织覆盖率的 cDNA 扩增程序中的循环数

芯片组织覆盖占比	Phase 2 推荐循环数
>2/3 但未完全覆盖	10-11
2/3	11-12
1/3	12-13

G. 纯化与定量

[注]: sparQ PureMag 磁珠可用于所有适用于 SPRI 磁珠的步骤。使用前, 将 PureMag 磁珠室温平衡 30 分钟。

1. 第一轮 0.6× 磁珠纯化

- 1) 使用前现配 80%乙醇溶液。
- 2) 将 4 管反应液合并至一个 1.5 ml EP 管中。
- 3) 以 3000×g 室温离心 2 分钟后, **立即**将上清液转移至新的 1.5 ml EP 管。
- 4) 200 μl TE 缓冲液重悬磁珠, 并于 4°C 保存。

[注]: 可对回收的磁珠进行重扩增, 但不保证性能。联系技术支持, 可指导进一步如何进行磁珠重扩增。

- 5) 充分涡旋混匀 SPRIselect 磁珠 30 秒, 小心加入 120 μl 至含有上清液的管中 (体积为扩增产物体积的 0.6×)。用移液枪充分混匀。
- 6) 振荡混匀 10–15 秒。
- 7) 在室温下孵育 5 分钟。
- 8) 短暂离心使液体集中在管底, 将 EP 管置于磁力架上。当溶液变澄清后, 小心吸取去除上清液。
- 9) 保持 EP 管在磁力架上, 加入 500 μl 80%乙醇。
- 10) 静置 30 秒后去除上清液。
- 11) 再次加入 500 μl 80%乙醇。
- 12) 静置 30 秒后去除上清液。
- 13) 短暂离心收集使残留的乙醇汇集至管底。
- 14) 将 EP 管放回磁力架, 小心吸除残余乙醇。
- 15) 在室温下晾干 SPRIselect 磁珠呈哑光状态 (约 1–2 分钟)。
- 16) 从磁力架上取下 EP 管, 加入 50 μl 无核酸酶水, 轻轻吸打混匀磁珠。
- 17) 在室温下孵育 1 分钟。
- 18) 将 EP 管放回磁力架。
- 19) 当溶液变澄清后, 转移上清液至新的 0.2 ml PCR 管中。弃去使用过的磁珠。

2. 第二轮 0.6× 磁珠纯化

- 20) 充分涡旋混匀 SPRIselect 磁珠 30 秒, 小心加入 30 μl 至不含上清液的 EP 管中 (体积为扩增产物体积的 0.6×)。用移液枪充分混匀。
- 21) 涡旋混匀 10–15 秒。
- 22) 在室温下孵育 5 分钟。
- 23) 短暂离心使液体集中在管底, 将管置于磁力架上。当溶液变澄清后, 小心吸取并去除上清液。
- 24) 保持 EP 管在磁力架上, 加入 200 μl 80%乙醇。
- 25) 静置 30 秒后去除上清液。
- 26) 再次加入 200 μl 80%乙醇。
- 27) 静置 30 秒后去除上清液。
- 28) 短暂离心收集残留的乙醇至管底。
- 29) 将 EP 管放回磁力架, 吸除残余乙醇。
- 30) 在室温下晾干 SPRIselect 磁珠呈哑光状态 (约 30 秒–2 分钟)。
- 31) 从磁力架上取下 EP 管, 加入 20 μl 无核酸酶水洗脱。用移液枪混匀磁珠, 在室温下孵育 1 分钟。

提示: 如果样本预计 cDNA 产量较低, 可使用 10 μl 无核酸酶水进行洗脱。

- 32) 将 EP 管置于磁力架上。
- 33) 当溶液变澄清后, 转移上清液至新反应管中。弃去使用过的磁珠。

34) 使用 Qubit (1X dsDNA HS assay kit) 及 Bioanalyzer 或 TapeStation 定量 cDNA 产物, 具体操作遵循生产厂商指南 (Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay, TapeStation High Sensitivity D5000 assay 或 TapeStation D5000 assay)。cDNA 浓度在 **0.2 ng/μl** 及以上为合格。如果检测到显著的引物二聚体, 可通过补加水至总体积 50 μl, 并重复步骤 18)–32) 重复一轮磁珠纯化。

TapeStation D5000

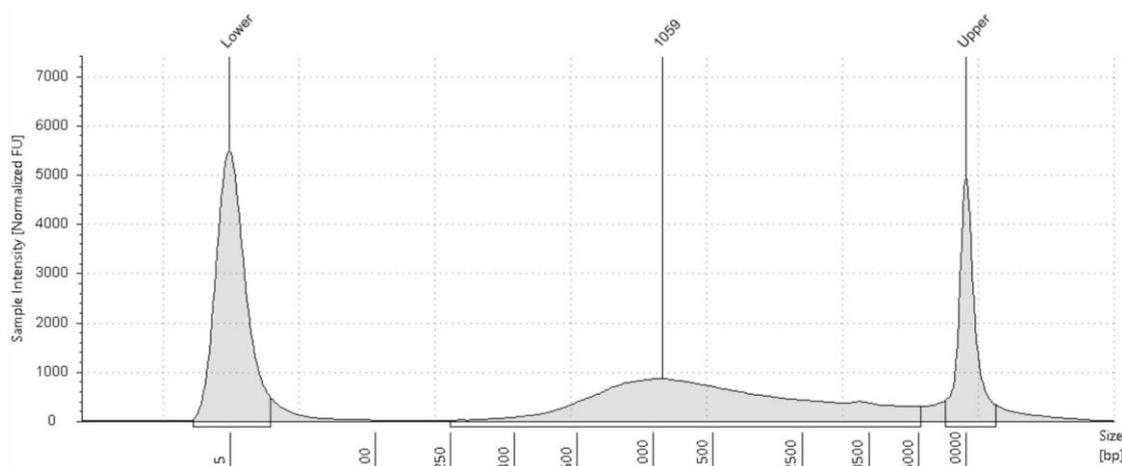


图 10. 在 TapeStation D5000 上 cDNA 扩增和纯化后的结果

安全暂停点: cDNA 样本可在 -20°C 存储一周, 用于后续实验。

H. 酶切片段化 (使用 Nextera XT Library Prep Kit)

1. 预热 PCR 仪至 55°C, 并将热盖加热至 105°C。设定反应体系为 50 μl。
2. 以下试剂需解冻至室温并置于冰上备用:
 - Dual Indexing Primers
 - Tagment DNA Buffer (TD) buffer
3. Amplicon Tagment Mix, (**ATM**) 及 Nextera PCR 预混液 (Nextera PCR Master Mix, **NPM**) 需始终置于冰上。
4. 在 0.2 ml PCR 管中, 加入 600 pg cDNA, 用无核酸酶水补足至 5 μl 总体积。例如: 若 cDNA 扩增产物浓度为 0.5 ng/μl, 则取 1.2 μl, 并补加 3.8 μl 水。若计算所得体积 < 1 μl, 应适当稀释 cDNA 以避免加样体积过小。
5. 加入 10 μl TD buffer。
6. 加入 5 μl **ATM**。轻轻吸打混匀。
7. 短暂离心归聚液体。
8. 55°C 孵育 5 分钟。
9. 5 分钟后, **立即**加入 5 μl **Neutralize Tagment Buffer (NT)**。用移液枪轻柔吸打混匀约 5 次, 并短暂离心。
10. 在室温下孵育 5 分钟。
11. 向每个 EP 管中加入 15 μl **NPM**。

重要提示:



- 在步骤 12 中, 请确保同一批次测序的所有样本均使用唯一组合的 F 引物和 R 引物组合。
- 如果您计划在 NextSeq® 2000 或 NovaSeq™ X/X Pro 上使用 Illumina XLEAP-SBS chemistry 测试 2–3 个样品, 请使用以下推荐组合以确保足够的色彩平衡:
 - 2 个样品: F1+F3 或 F2+F3; R1+R3 或 R1+R4

3 个样品: F1+F3+任意 或 F2+F3+任意; R1+R3+任意 或 R1+R4+任意

12. 取 Seeker dual indexing primer v2 kit (Code No. K006)中 index primer F 和 index primer R 分别加入 5 μ l。

13. 充分混匀后短暂离心。

14. 按照下面运行 indexing PCR 程序: (总运行时间约 35 分钟)

72°C 3 min

95°C 30 sec

12 cycles:

95°C 10 sec

55°C 30 sec

72°C 30 sec

72°C 5 min

4°C Hold

I. 文库纯化与定量

[注]: sparQ PureMag 磁珠可用于所有适用于 SPRI 磁珠的步骤。使用前需将 PureMag 磁珠平衡至室温 30 分钟。

1. 第一轮 0.6 \times 磁珠纯化

- 1) 使用前, 现配 80%乙醇溶液。
- 2) 以高速涡旋振荡 SPRIselect 磁珠 30 秒, 使磁珠均匀悬浮并呈均一颜色。
- 3) 向 50 μ l 样本中加入 30 μ l SPRIselect 磁珠 (0.6 \times)。用移液枪充分混匀。
- 4) 涡旋混匀 10–15 秒。
- 5) 在室温下孵育 5 分钟。
- 6) 短暂离心后, 将 EP 管置于磁力架上。当溶液变澄清后, 小心吸除上清液。
- 7) 保持 EP 管在磁力架上, 加入 200 μ l 80%乙醇。
- 8) 静置 30 秒后去除上清液。
- 9) 再次加入 200 μ l 80%乙醇。
- 10) 静置 30 秒后去除上清液。
- 11) 短暂离心收集残留的乙醇至管底。
- 12) 将 EP 管放回磁力架, 去除残余乙醇。
- 13) 在室温下晾干 SPRIselect 磁珠呈哑光状态 (约 30 秒–2 分钟)。
- 14) 取出 EP 管, 加入 50 μ l TE 缓冲液洗脱。用移液枪混匀磁珠, 在室温下孵育 1 分钟。
- 15) 将 EP 管放回磁力架, 静置 1 分钟。
- 16) 转移上清液至新的 PCR 管中。

2. 第二轮 0.8 \times 磁珠纯化

- 17) 向 Tube 中加入 40 μ l SPRI 磁珠 (0.8 \times)。
- 18) 涡旋振荡 10–15 秒。
- 19) 在室温下孵育 5 分钟。
- 20) 短暂离心归聚液体。
- 21) 将 EP 管置于磁力架上。当溶液变澄清后, 小心去除上清液。
- 22) 保持 EP 管在磁力架上, 加入 200 μ l 80%乙醇。
- 23) 静置 30 秒后去除上清液。
- 24) 再次加入 200 μ l 80%乙醇。
- 25) 静置 30 秒后去除上清液。
- 26) 短暂离心使残留乙醇汇集至管底。

- 27) 将 EP 管放回磁力架，去除残余乙醇。
- 28) 在室温下晾干 SPRI 磁珠呈哑光状态（约 30 秒–2 分钟）。
- 29) 从磁力架上取出 EP 管，加入 10 μ l 无核酸酶水洗脱。用移液枪混匀磁珠，在室温下孵育 1 分钟。
- 30) 将 EP 管放回磁力架，静置 1 分钟。
- 31) 转移上清液至新的 0.2 ml PCR 管中。
- 32) 使用 Qubit (1 X dsDNA HS assay kit) 及 Bioanalyzer 或 TapeStation 定量文库产物，具体操作遵循生产厂商指南（Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay 或 TapeStation High Sensitivity D5000 assay 或 TapeStation D5000 assay）。cDNA 浓度在 1 ng/ μ l 及以上为合格。示例文库质检图谱如下：

TapeStation D5000

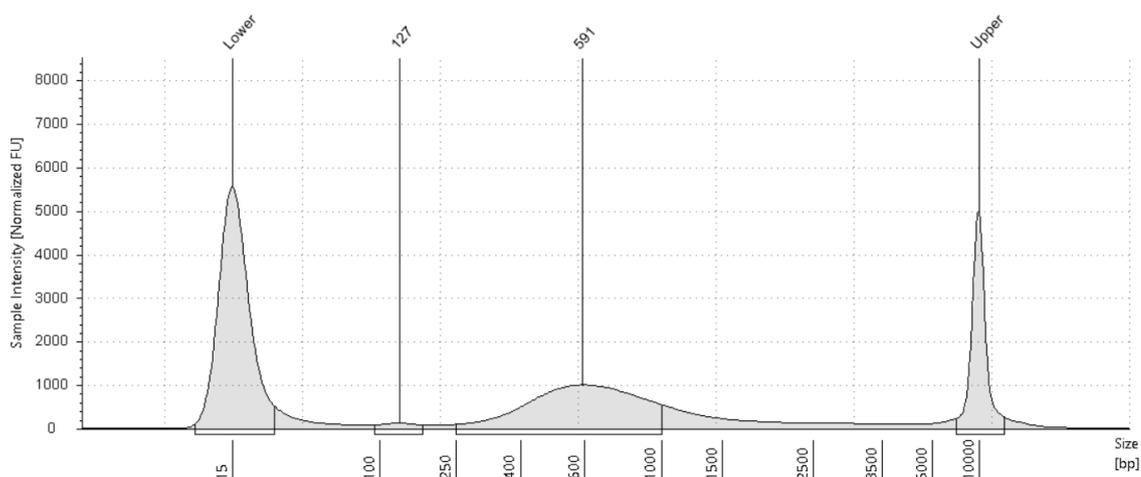


图 11. 文库纯化后 TapeStation D5000 电泳图结果

安全暂停点：纯化后的文库可于 -20°C 保存，用于后续实验或长期保存。

J. 测序

- 低深度测序（用于检查文库质量和空间表达预分析）：建议每个芯片数据量约 3.0×10^7 reads
- 深度测序（具体取决于组织类型和芯片覆盖率）：建议每个芯片数据量 $2-6 \times 10^8$ reads

1. 所需读长

- Read 1: 50 bp
- Index 1: 8 bp
- Index 2: 8 bp
- Read 2: minimum 50 bp



重要提示：请勿进行接头剪切。

2. 测序仪加载浓度推荐

- NextSeq 1000/2000:
 - 初始加载浓度 750 pM，可根据测序质量调整。
- NextSeq 500/550:
 - 初始加载浓度 1.8 pM，可根据测序质量调整。
- NovaSeq 6000:
 - 初始加载浓度 250–500 pM。可根据测序质量调整。
- NovaSeq X:

- 初始加载浓度 180 pM，可根据测序质量调整。

3. PhiX 内参掺入比例推荐

- Nextseq 1000/2000: 掺入 5% PhiX
- Nextseq 500/550: 掺入 5% PhiX
- Novaseq 6000:
 - 与非 Seeker 文库混合上机时，PhiX 掺入比例为 5%。
 - 仅 Seeker 文库单独上机时，PhiX 掺入比例为 10%。

4. 引物序列

表 3. Index 1 引物序列

Index 1 引物	i7 bases for Illumina Sample Sheet
Index Primer F1	TAAGGCGA
Index Primer F2	CGTACTAG
Index Primer F3	AGGCAGAA
Index Primer F4	TCCTGAGC
Index Primer F5	GGACTCCT

表 4. Index 2 引物序列

Index 2 引物	i5 bases for Illumina Sample Sheet (NovaSeq 6000 with v1.0 reagent kits, MiSeq®, HiSeq® 2000/2500, NextSeq 2000 (Sample Sheet v2))
Index Primer R1	TATCCTCT
Index Primer R2	AGAGTAGA
Index Primer R3	GTAAGGAG
Index Primer R4	ACTGCATA
Index Primer R5	AAGGAGTA

5. 文库结构



图 11. Seeker 3x3 文库结构

6. 寡核苷酸序列

表 5. 寡核苷酸引物序列

引物	序列
SS Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGANNNGGNNNB
cDNA Amp Primer Mix	PCR handle primer: CTACACGACGCTCTTCCGATCT UPS primer: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Index primer F	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-N8-GTCTCGTGGGCTCGG
Index primer R	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-N8- ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

VI. 生物信息学分析

Seeker 文库的测序生成的 FASTQ 文件可使用 Seeker 生物信息学分析流程进行分析。访问分析流程的两种方式：

1. Takara Bio 的云端分析平台上分析数据

2. 在本地安装分析流程

如需申请任一选项, 请联系 technical_support@takarabio.com

您可以在以下链接通过芯片 ID 下载条形码文件: <https://curiobioscience.com/support/barcode/>

VII. 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
组织切片在贴附过程中卷曲	组织切片未完全铺展平整	在贴附组织切片前, 使用小刷子将切片轻轻抚平。贴附时, 从组织的一侧开始, 缓慢移动加热区域, 直至整个切片均匀贴附在芯片上。 如果组织切片在贴附过程中出现卷曲, 可使用刷子轻轻按住, 使其保持平整。
	组织或 RNA 质量较差	针对您的特定组织类型, 确保按照最佳方式处理组织块。 使用 Qiagen RNeasy Mini Kit 提取 5–10 μm 厚的组织切片 RNA, 以评估 RNA 质量。
cDNA 扩增产物产量较低 ($<0.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$)	洗涤步骤中微珠损失	组织解离步骤中, 确保微珠已完全从芯片上解离。离心步骤需严格按照正确的速度和时间进行。离心结束后立即吸除上清, 避免微珠损失。 吸取上清时注意不要吸走微珠。重新离心以确保微珠充分沉淀。
	试剂在使用前或加入样本中后未充分混匀	SPRIselect 试剂具有较高粘稠度, 使用前需充分涡旋混匀, 使磁珠完全重悬。 充分混匀后, 小心吸取粘稠的 SPRI 试剂, 确保准确加样至样本中。 加入样本中后, 通过移液枪反复混匀, 确保溶液均一。
	80%乙醇非现配或浓度不准	乙醇易挥发, 每次使用当天现配 80%乙醇。即使存储于密闭管中, 乙醇仍可能挥发, 导致浓度变化, 影响 cDNA 纯化效率。
	组织切片未覆盖整个芯片	若组织切片仅部分覆盖芯片, 可能需要适当增加 PCR 循环数。先增加 2–3 次 PCR 循环, 并根据产量及文库电泳结果进行调整。
最终文库产量过低	组织切片过厚	确保组织切片厚度为 10 μm 。
	PCR 程序设置错误	确保使用正确的 PCR 反应程序。
	组织透化后, 微珠洗涤步骤的缓冲液出现沉淀。	确保微珠洗涤缓冲液及离心机温度 $>20^{\circ}\text{C}$ 。如果实验室温度较低, 可在 37°C 金属浴中预热缓冲液后使用。
	微珠洗涤后残留缓冲液过多, 影响 cDNA 扩增反应。	确保微珠洗涤后残留缓冲液 $<10 \mu\text{l}$, 然后再重悬于 cDNA 扩增反应混合液中。
微珠难以解离	用于 Nextera XT DNA 预处理的 cDNA 输入量过低	确保对 cDNA 扩增产物进行了准确的定量检测。
	PCR 程序设置错误	确保使用正确的 PCR 反应程序。
	芯片保存温度不当 (适合的保存温度为 4°C)	未被组织覆盖的芯片区域可能较难解离。对于较难解离的区域, 将移液枪枪头平行于芯片轻轻侧向刷动, 并对残留微珠区域进行吸打, 从而机械性

地将微珠从芯片上移除。未被组织覆盖的微珠如果未完全解离，不会影响数据质量和实验结果。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio USA, Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>