



**Nucleus Seperation Kit (Manual , 16 RXNs)**

**单细胞核分离试剂盒 (手工版, 16 反应)**

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
1370062	Nucleus Separation Kit ( Manual )	16 RXNs

### 文件信息

- 文件名称：单细胞核分离试剂盒用户手册（手工版，16 RXNs）
- 版本号：2025/04
- 版本日期：2025/04

### 版权说明

新格元生物科技有限公司保留所有解释权利。本手册所描述的所有产品和服务仅供科学研究使用，不可用于临床诊断。

## 目录

1. 基本信息.....	- 1 -
1.1 产品概述.....	- 1 -
1.2 产品组成.....	- 1 -
2. 自备仪器耗材试剂.....	- 2 -
3. 实验操作.....	- 3 -
3.1 细胞核提取.....	- 3 -
附录 A 新格元单细胞测序样本采集、运输及收样标准.....	- 6 -
附录 B 常见问答.....	- 8 -



## 1. 基本信息

### 1.1 产品概述

从组织直接分离提取细胞核是进行单细胞核转录组测序的第一步，从单细胞核转录状态检测基因表达信息，解析不同细胞间的异质性，从而以更高的分辨率认识生命现象。本产品可以快速、高效从哺乳动物的新鲜或冷冻组织中分离提取纯净的细胞核，没有膜和细胞质组分的污染，分离的细胞核悬液可以进行高通量的单细胞核转录组测序。

单细胞核转录组测序无需组织消化，直接从组织抽提细胞核，进行单细胞测序有以下优势：

1. 不依赖高活性的单细胞悬液，无需进行组织解离，避免组织处理引起的偏差
2. 适用于难消化及冷冻组织，突破样本限制，覆盖更多样本类型
3. 真是反应组织内部各细胞类型：细胞体积大，形状不规则的样本都可适用

本产品可搭配 GEXSCOPE®单细胞核转录组文库试剂盒高效无偏好性地完成反转录、cDNA 扩增及文库构建，显著提高测序文库产物得率及同等测序深度下的基因检出率，从而完成对数百至数万个细胞中的 mRNA 进行测序。

### 1.2 产品组成

#### Nucleus Separation Kit ( Manual , 16RXNs )

组分	体积	储存条件
Nucleus Separation Solution	16*1.2mL	-25℃~-15℃
RNase Inhibitor	300 μL	
100 mM DTT	400 μL	



## 2. 自备仪器耗材试剂

### 仪器、耗材:

- 1.5 mL 或 2 mL 无核酸低吸附离心管
- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 巴氏吸管
- 无菌培养皿 (6cm)
- 1mg 精度的电子秤
- 不同量程单通道移液器
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 小型离心机
- 涡旋混匀仪
- RNase Away 或其他同类产品
- 兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管的高速冷冻离心机
- 40  $\mu\text{m}$  细胞过滤网
- 医用眼科钳(10 厘米)和医用眼科剪刀
- 倒置显微镜
- 血球计数板

### 试剂:

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 1×PBS (不含  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$ )
- DAPI 染液或 0.4% 台盼蓝染液
- 10 % Tween-20

注意: 试剂耗材必须是无菌、无核酸酶的。

### 3. 实验操作

#### 3.1 细胞核提取

##### 准备材料:

- Nucleus Separation Solution (橙色);
- 100mM DTT (绿色);
- RNase Inhibitor (绿色)。



##### 自备材料:

- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管;
  - 1mg 精度的电子秤;
  - 巴氏吸管;
  - 兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管的高速冷冻离心机;
  - 医用眼科钳(10 厘米)和医用眼科剪刀;
  - 40  $\mu$ m 细胞过滤网;
  - DAPI 染液或 0.4% 台盼蓝染液;
  - PBS;
  - HBSS
  - 10%BSA。
- 按下表提前配制 Nucleus Separation Mix，涡旋混匀并瞬时离心。RNase Inhibitor 在用之前 20min 内加入。

##### Nucleus Separation Mix:

组分	1 RXN ( $\mu$ L ) ×1	2 RXNs ( $\mu$ L ) ×2.2
Nucleus Separation Solution	985	2167
100mM DTT	10	22
RNase Inhibitor	5	11
Total	1000	2200

2. 按下表配制 15 mL PBSA (PBS + 10%BSA) ，涡旋混匀，并瞬时离心，冰上放置备用。

**1%PBSA:**

组分	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) ×1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) ×2.2
PBS	13500	29700
10%BSA	1500	3300
Total	15000	33000

3. 按下表提前配制 PBS Mix，涡旋混匀并瞬时离心。RNase Inhibitor 在用之前 20min 内加入。

**PBSA Mix:**

组分	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) ×1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) ×2.2
1%PBSA	487.5	1072.5
RNase Inhibitor	12.5	27.5
Total	500	1100

**注意：**所有试剂配制好之后，均在冰上低温保存。

4. 称取 100mg 左右重量的组织，若组织重量超过 200mg，则将组织切取一部分。

**注意：**组织重量不应低于 50mg，不应高于 200mg。

5. 将称重好的组织置于 1.5mL 离心管，用 1mL 预冷的 HBSS 清洗样品表面血渍或其他杂质，丢弃上清后，重复一次（清洗两次）。
1. 将组织转移至新的 1.5mL 离心管中，加入 100 $\mu\text{L}$  预冷的 Nucleus Separation Mix (使用前加入 RNase Inhibitor 和 DTT，终浓度分别为 0.2U/ $\mu\text{L}$  和 0.1mM)，将 1.5mL 管放置在冰盒上，用医用手术剪（常用眼科剪），剪碎组织至糜状物。
  2. 加入预冷的 900 $\mu\text{L}$  Nucleus Separation Mix (已加 RNase Inhibitor 和 DTT)，移液器吹吸混匀，冰上静置 5min（脑/肺组织建议静置 10min），静置期间每间隔 2min 上下颠倒混匀一次。
  3. 将管中的样品经 40 $\mu\text{m}$  滤网过滤至 50mL 离心管中，并用 9mL 预冷的 PBSA 多次冲洗滤网。
  4. 将上一步过滤后的细胞核悬液离心 5min 后（4 $^{\circ}\text{C}$  200rcf），取 9mL 上清液于新的 15mL 离心管中用于后续实验，剩余液体和沉淀暂留。

5. 装有上清的离心管，进一步离心 5min (4°C 500rcf)，吸取上清至新的离心管中暂留（肉眼不易观察的沉淀为细胞核），沉淀用 50 $\mu$ L 预冷的 PBSA mix 轻轻吹打混匀(向 PBSA 在使用前加入 RNase Inhibitor, 终浓度为 1.4 U/ $\mu$ L)。
6. 加入 200 $\mu$ L DAPI 染色液，轻轻吹打混匀，冰上避光反应 2min。
7. 使用荧光显微镜观察细胞核的状态、数目和细胞核悬液中杂质的情况。
8. （选做）根据细胞核浓度及杂质占比确定是否需要二次过滤：加入 5mL 预冷的 PBSA，吹打混匀，用 40 $\mu$ m 滤网再次过滤至新的 15ml 离心管中，4°C 500rcf 离心 5min，取上清至新的管子中暂留。
9. （选做）加入 50 $\mu$ L 预冷的 PBSA mix，轻轻重悬细胞核沉淀。
10. 使用荧光显微镜观察二次过滤后细胞核的状态、数目和细胞核悬液中杂质的情况。荧光显微镜要求：观察 DAPI 染色,当 DAPI 与双链 DNA 结合时,最大吸收波长为 364nm,最大发射波长为 454nm。
11. 细胞核提取后，需尽快进行单细胞核分选和 mRNA 捕获。



## 附录 A 新格元单细胞测序样本采集、运输及收样标准

### 一 样本采集

#### (一) 冻存组织

1)样品要求：-80℃保存组织不超过 3 个月，液氮保存组织不超过 6 个月，且样本未经过反复冻融。

2)标记：在样品信息单上填写样本名称（样品名称：字母、数字或下划线，不超过 8 位，首位是字母，下划线位于中间，例如 A2019\_01），标记要清晰、准确、完整、可识别。并注明保存条件和保存时间。

#### (二) 新鲜组织

##### 1) 采样前准备：

- a) 确认冻存管完整、无裂痕。
- b) 提前准备液氮或者-80℃低温冰箱。
- c) 进入手术室取样本前，需先标记冷冻管。
- d) 将无菌的 PBS 或者生理盐水预冷至 4℃

2) **取样**：手术切割下来组织后，立即于无菌条件下处理组织或者 30 分钟内处理组织。30 分钟后，组织不再适合取样，还需要避免放置过久而变干或者与其他组织或样本接触被污染的情况发生。

- a) 取样时用无菌手术刀或剪刀进行取样。电刀会引起目标组织灼伤，因此应避免使用电刀取样。
- b) 取样组织不能有坏死。
- c) 不能取靠近电刀灼烧部位的组织。
- d) 取样组织上不能有血凝块。

3) **处理组织**：取好目标组织后，如果样本的太大（超过 200mg），需要将样本切成黄豆粒大小（100mg 左右）的小块置于离心管中，然后用预冷的无菌 PBS(或无菌生理盐水)清洗 3 遍去除血液，然后取出并立即放入冻存管中，用封口膜封口。

**注意**：每个冻存管中只能放一份组织（黄豆粒大小）。

4) **冻存组织:** 将冷冻管浸入液氮中, 样品应浸没 30-60 秒。

5) **标记样本和储存:** 用 marker 笔在冻存管上标记样本名称 ( 字母、数字或下划线 , 不超过 8 位, 首位是字母, 下划线位于中间, 例如 A2019\_01 ), 标记要清晰、准确、完整、可识别。标记好的样本放置于液氮或者-80℃冰箱待运输 ( 运输前要确保样本完全冻住 ) 。



## 附录 B 常见问题

### 1、试剂盒适用于哪些样本类型？

答：本产品可用于人类和小鼠来源的冷冻组织，如心脏、大脑、肝脏、肺、脾脏、睾丸、骨肉瘤和许多其他组织类型。在 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下，组织保存时间不应超过 3 个月，应避免重复冷冻和解冻组织。

### 2、荧光显微镜下出现微弱 DAPI 信号的原因是什么？

答：可能的原因是：①向细胞核中添加的 DAPI 不足，与 DAPI 的孵育时间较短（低于 2 分钟）；②由于悬浮液中的细胞核数量不足，信号减弱。

### 3、在细胞核提取和重悬后，细胞核聚集在一起，不可能将它们分散成均匀的悬浮液。如何解决这个问题？

答：使用重悬缓冲液（ $1\times\text{PBS}+1\%\text{BSA}+0.2\text{U}/\mu\text{l}$  RNase 抑制剂）减少核聚集。

### 4、如果组织只是部分消化，我该怎么办？

答：彻底切开组织，用细胞核分离混合物延长处理时间。

### 5、为什么只有少量的微孔充满了细胞核？

答：落入微孔中的细胞核数量较少可能是由以下原因造成的：①未达到最低核浓度：（ $20\,000$  核/ $100\mu\text{L}$ ）在注入微芯片之前，核悬浮液未充分混合。②细胞核加载到微芯片的速度太快了。未等待 5 分钟就将细胞核冲洗出来，并没有稳定下来。PBS 洗得太快了。

### 6、为什么只有少量的微孔中有分子标签磁珠？

答：可能的原因是：分子标签磁珠的注入速度过快或不均匀；PBS 冲洗太快了。

**新格元生物科技有限公司**

电 话：025-58862675

电子邮件：product-service-support@singleronbio.com

网 址：www.singleronbio.com

地 址：苏州市工业园区新泽路 1 号生物医药产业园三期 A 区 1 号楼 401 单元（苏州）  
南京市江北新区药谷大道 11 号加速器二期 06 栋 3-4 层（南京）